Universidade de São Paulo

**“MODELO MATEMÁTICO DO
SISTEMA DE TEMPORIZAÇÃO
BIOLÓGICA CIRCADIANA”**

JOSÉ RICARDO LOPES

Dissertação apresentada ao Instituto
de Psicologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Neurociências e Comportamento

Orientador: Prof. Dr. Luiz Menna-Barreto

**São Paulo
2004**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luiz Menna-Barreto, orientador e amigo, que com honestidade intelectual estimulou e guiou o meu desenvolvimento como pesquisador.

Ao Professor Luiz Diambra, que me apresentou a essa temática e por ter fornecido os subsídios necessários para iniciar e finalizar de maneira adequada os processos computacionais da modelagem.

Ao Professor Andreas Bohn, que apresentou disponibilidade para discutir e sugerir metodologias de análise da dinâmica não-linear em momento importante da pesquisa.

Aos Professores Gisele Oda, Koishi Sameshima, Ronald Ranvaud, John Fontenele e José Cipolla Neto pelas sugestões e incentivos oferecidos durante os anos de pesquisa.

Especial agradecimento aos amigos do Laboratório do Grupo Multidisciplinar de Desenvolvimento e Ritmos Biológicos, cuja amizade e a boa convivência foram elementos de elevado valor.

*“Em toda parte onde algo vive,
há em algum lugar um
registro em que o tempo se inscreve.”*

Henri Bergson

Índice

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Ritmicidade Biológica.....	7
1.2 Sistema de Temporização Biológica Circadiano e os Mecanismos de Sincronização.....	9
1.3 Modelos Matemáticos do Sistema de Temporização Biológica.....	13
1.4 Objetivos.....	17
2. MATERIAS E MÉTODOS.....	19
2.1 Estrutura do Modelo.....	19
2.1.1 Equação Diferencial com Retardo.....	19
2.2 Integração Numérica.....	22
2.3 Análise Linear de Estabilidade.....	24
2.4 Métodos para Avaliação do Espectro de Frequências e de Algumas Propriedades Dinâmicas da Oscilação Gerada.....	28
2.5 Avaliação da Condição de Sincronização.....	33
3. RESULTADOS.....	35
3.1 Primeira Etapa – M.L.U.....	35
3.2 Segunda Etapa – M.L.D.....	46
4. COMENTÁRIOS E DISCUSSÃO.....	57
5. ANEXO 1 (Método de Integração Numérica de Gear).....	64
6.REFERÊNCIAS.....	68

RESUMO

Tanto as evidências experimentais que demonstraram a geração endógena de ritmos com períodos circadianos, quanto as investigações sobre os diferentes mecanismos de sincronização dos ritmos circadianos aos marcadores temporais externos de períodos fixos de 24h (tais como os ciclos fóticos e não-fóticos, p.ex.: ciclo claro/escuro e o ciclo diário de atividades sociais, respectivamente) forneceram material para a elaboração de proposições importantes sobre as características do sistema de temporização circadiana. Dentro desse cenário, foi de muita ajuda a aplicação da modelagem matemática. O desenvolvimento desses modelos permitiu a investigação de conjecturas que tentam explicar as características subjacentes dos mecanismos que coordenam este sistema.

Nosso objetivo, neste trabalho, foi de explorar a hipótese de que o mecanismo de controle da ritmicidade circadiana presente no sistema é exercido pela ação de laços de retroalimentação negativa acionados após tempos de retardo característicos do sistema. Para alcançarmos esse objetivo, elaboramos um modelo no qual o controle e a manutenção da expressão rítmica circadiana fossem conseqüentes da ação de dois laços de retroalimentação negativa com tempos de retardo distintos. Adicionalmente, avaliamos a resposta do modelo à ação de oscilações externas.

Por meio da dinâmica não-linear resultante do modelo, nós observamos sugestiva similaridade entre as respostas obtidas nas simulações e as descrições experimentais do sistema de temporização circadiana presentes na literatura. Esses resultados deram suporte a hipótese inicial como explicação do funcionamento do sistema.

ABSTRACT

Both the experimental evidences of generation of biological circadian rhythms and the results of investigation about the mechanisms of synchronization between the circadian rhythms with the external cycles of 24-hour period (such as, photic and non-photic cycles; for example: light/dark cycle and diary social activities, respectively) provided material for the development of important assumptions about the characteristics of the circadian timing system. Inside this scenery, it was helpful the application of mathematical models.

The development of these models permitted the inquiry of some hypotheses which try to explain the underlying characteristics of this system.

Our aim, in this work, was to investigate the hypothesis that explain the controlling mechanism of the circadian system as a result of the action of negative feedback loops triggered after characteristics time delays. For reaching this goal, our proposal was to build a mathematical model which simulated circadian rhythmic expressions controlled by two feedback loops with different time delays. Additionally, we also simulated the response of the model under external oscillations.

Through the non-linear dynamic resulting from the model we observed suggestive similarity between the simulations and the experimental descriptions of the circadian system expressions present in many works. These results gave support to the validation of the initial hypothesis.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Ritmicidade Biológica

A ritmicidade biológica em humanos observada em diferentes níveis funcionais com expressões distribuídas em um espectro amplo de períodos (e.g.: ritmo circadiano da temperatura central) refletem a marcação temporal realizada por sistemas internos abertos às oscilações ambientais.

Existem tentativas que procuram investigar e descrever a organização destes sistemas internos e os mecanismos de interação entre estes sistemas e às sinalizações temporais externas. Uma destas tentativas assume os fenômenos periódicos observados nos seres vivos vinculados a osciladores endógenos, possibilitando entender a organização temporal interna como propriedade emergente da sincronização de diferentes osciladores.

Neste contexto, há postulados que explicam, por exemplo, que os ritmos circadianos são expressões de um ou mais osciladores também circadianos. Os ritmos com períodos menores de 24h, além de serem entendidos como expressões de osciladores discretos, como aqueles ritmos gerados pelo marcapasso do coração (WINFREE, 1987), são também considerados como “subprodutos” da intermodulação de frequências de ciclos mais lentos (SEL'KOV, 1979; PAVLIDIS, 1981).

Segundo Halberg (1980), a averiguação desse cenário deve incluir a utilização de ferramentas matemáticas e estatísticas que quantifiquem os componentes do espectro de frequências dos ciclos experimentalmente observáveis. Essas ferramentas permitiriam demonstrar separadamente, ou de maneira concomitante, a presença de expressões rítmicas em diferentes órgãos, funções e sistemas biológicos. Por exemplo, nos primeiros meses de vida em humanos são observadas modificações na estrutura do ciclo vigília-sono (CVS), com a finalidade de investigar acuradamente quais seriam as alterações que caracterizam este ciclo nesta fase do desenvolvimento humano e em outras fases foram realizados estudos, em nosso grupo, que resultaram na elaboração de ferramentas e métodos matemáticos que possibilitam extrair informações importantes do CVS

(DIAMBRA, LOPES e MENNA-BARRETO, 2002; BRAZ, LOPES, e MENNA-BARRETO, 2003; DIAMBRA & MENNA-BARRETO, 2004).

Para Goldbeter (2002), as contribuições de áreas como a matemática e a física, através da elaboração de modelos teóricos, permitiriam explorar novos postulados biológicos e planejar novos desenhos experimentais. Sob este aspecto, apresentamos e analisamos nesta dissertação um modelo matemático que simula oscilações circadianas de origem endógena, através de um sistema com retroalimentação negativa com retardo. Na literatura, modelos deste tipo têm sido apresentado com uma alça de retroalimentação (e.g.: LEMA & GOLOMBEK, 2002; SHEPPER *et al.*, 1999); contudo devido ao fato de haver sistemas biológicos com sinalizações redundantes de retroalimentação e de não sabermos qual a função desta redundância na formação de ritmos, apresentamos um modelo a partir do qual avaliamos o papel exercido por duas alças de retroalimentação.

Nos próximos itens desta seção serão descritos alguns conceitos sobre o sistema de temporização biológica circadiano, sobre os mecanismos de sincronização com os agentes temporizadores externos, e as principais características da equação diferencial utilizada em nosso modelo, respectivamente nos itens 1.2, 1.3 e 1.4.

1.2 Sistema de Temporização Biológica Circadiana e os Mecanismos de Sincronização

As expressões rítmicas que se manifestam no organismo vivo podem ser divididas em três grupos:

- a) circadianas – expressões rítmicas com frequências no intervalo $\left[\frac{1}{20}, \frac{1}{28}\right] h^{-1}$;
- b) ultradianas – ritmos com frequências menores que as circadianas;
- c) infradianas – ritmos com frequências maiores que as circadianas.

No organismo, esses ritmos sincronizam-se mutuamente, através do estabelecimento de uma relação de fases estável. Muitos pesquisadores conjecturam que a organização temporal interna configurada é controlada pelos ritmos circadianos. Esta hipótese é motivada pela correspondência entre os ciclos geofísicos com período de 24h (e.g.: dia/noite) e as expressões rítmicas biológicas circadianas, tais como o ciclo vigília/sono.

A característica endógena dos ritmos biológicos, especificamente do ritmo circadiano, foi observada pela primeira vez pelo astrônomo francês Jean Jacques De Mairan em 1729 a partir do movimentos foliares persistentes e periódicos de uma espécie de *Mimosa* em condições de isolamento dos ciclos ambientais (ROTENBERG, 2002).

A averiguação experimental da endogenicidade da expressão rítmica circadiana consiste no estabelecimento de um ambiente em que são mantidos temporalmente constantes os sinais ambientais que estejam sincronizando o sistema biológico, como por exemplo a luz ou a temperatura. As observações decorrentes dessa metodologia se agrupam em 3 categorias:

- 1) perda de periodicidade ou amortecimento das oscilações biológicas; observação que não autoriza conclusões sobre a gênese do ritmo;

- 2) periodicidade inalterada e ausência de qualquer desvio na frequência de oscilação dos ciclos biológicos observáveis; este resultado sugere que pode haver pistas temporais sincronizando o sistema além daquelas excluídas experimentalmente;
- 3) periodicidade persistente, porém com desvio na frequência de oscilação; através deste resultado experimental há fortes indícios sobre a endogenicidade do ritmo coordenada por um sistema de temporização.

O sistema de temporização circadiana pode ser definido como um conjunto coordenado de elementos responsáveis pela ritmicidade biológica. Estes elementos são divididos em: oscilador (ou marcapasso), que é o subsistema responsável pela geração dos ritmos biológicos; um subsistema responsável pela sincronização desses relógios com eventos marcadores de tempo do ambiente externo ou interno e um subsistema responsável pela efetuação da expressão rítmica. Investigações experimentais sobre os mecanismos de sincronização entre os sinais temporais externos e os ritmos biológicos observáveis proporcionaram a elaboração de dois mecanismos: arrastamento e o mascaramento.

O arrastamento é entendido como um processo de sincronização que corresponde ao ajuste temporal do sistema biológico à sinalização periódica externa doadora de tempo (ASCHOFF, 1960, 1981, ROENNEBERG *et al.*; 2003). Esse mecanismo de sincronização, no entanto, está relacionado com a ressonância do oscilador biológico à ação de um estímulo periódico. Para que o estímulo periódico provoque arrastamento e que possa ser qualificado como doador de tempo (*Zeitgeber*), ele deve ser potente o bastante para sincronizar imediatamente ou em poucos ciclos a frequência natural do oscilador biológico à frequência do ciclo externo. Em função da amplitude de oscilação do estímulo o oscilador biológico também pode ser sincronizado em diferentes frequências definindo um intervalo de arrastamento.

Mascaramento, por outro lado, corresponde à sincronização da expressão oscilatória ao estímulo externo, sem haver qualquer participação do oscilador biológico (MROSOVSKY, 1999). Para animais diurnos, exemplo de mascaramentos podem ser observados no ritmo de atividade/repouso, onde há aumento de atividade nas transições do escuro ao claro ambiental e há redução da atividade nas transições do claro ao escuro. Neste exemplo o mascaramento é caracterizado pela alteração do ritmo de acordo com a

variação da sinalização ambiental, sem no entanto haver participação do oscilador biológico.

Dois modelos biológicos foram utilizados como motivação para a realização deste trabalho, além de representarem a ubiquidade do sistema de temporização nos organismos vivos. Na figura 1.1, apresentamos o primeiro desses modelos elaborado a partir de vários resultados experimentais, que esquematiza o sistema de temporização circadiana em mamíferos.

Figura 1.1: Organização do sistema de temporização circadiano de mamíferos.

As aferências anatômicas do sistema de temporização nesse modelo biológico vem do trato retinohipotalâmico, folheto intergeniculado, núcleo dorsal da rafe, tálamo paraventricular e sistema límbico (MOGA & MOORE; 1997).

Estas aferências permitem que o sistema receba informações externas, fóticas ou não-fóticas, promovendo o acionamento dos mecanismos de arrastamento que ajustam o relógio aos padrões oscilatórios externos, sejam estes de natureza geofísica ou social.

A geração de oscilações circadianas e o processamento das informações temporais oriundas do meio externo provêm dos núcleos supraquiasmáticos (NSQs) região anatômica considerada como *marcapasso circadiano* (MOORE *et al.*; 2002).

As eferências do sistema, no modelo biológico, correspondem ao hipotálamo, rafe, tálamo, área pré-óptica, pineal (WATTS & SWANSON I, 1987, WATTS & SWANSON II, 1987, GOLOMBEK *et al.*; 2002).

As expressões oscilatórias do sistema são alvos de mascaramento. As alterações resultantes desse mecanismo, tais como modificações de amplitude ou fase da oscilação, são temporalmente pontuais sem modificações na gênese do ritmo.

O segundo modelo biológico utilizado como motivador deste trabalho, representado na figura 1.2, tem sido muito discutido recentemente por diferentes grupos de pesquisa (e.g.: HERZOG *et al.*,1998; LIU *et al.*, 1999; DUNLAP, 1999; OKAMURA 2002 e FROELICH, 2003). Este modelo descreve um sistema de temporização circadiana formado por um oscilador molecular no interior da célula do NSQ.

Figura 1.2: Diagrama de um sistema de temporização molecular circadiana na célula do NSQ, coordenado por uma alça de retroalimentação inibitória.

Os eventos que descrevem o funcionamento deste sistema de temporização molecular circadiana podem ser ordenados da seguinte forma:

- 1) a transcrição do gene *Per* é estimulada pelo heterodímero de proteínas CLOCK/BMAL1 ligados ao *e-box*¹ do gene, no interior do núcleo;
- 2) no citoplasma, proteínas PER são produzidas a partir da tradução de seus respectivos RNAs mensageiros, e são submetidas a múltiplos processos de fosforilação.
- 3) à proporção que a concentração das proteínas fosforiladas PER aumentarem no citoplasma ocorre a formação de novos complexos protéicos, decorrentes da interação de PER com as proteínas CRY também presentes nesta região;
- 4) os heterodímeros PER/CRY por sua vez, inibem a transcrição do gene *Per* devido à ação de alça de retroalimentação negativa sobre CLOCK/BMAL1 (OKAMURA *et al.*, 2002; ABE *et al.*, 2004; MÜHLBAUER *et al.*, 2004).

1.3 Modelos Matemáticos do Sistema de Temporização Biológica

Historicamente, os modelos de sistemas biológicos de temporização elaborados até hoje podem ser agrupados em modelos do tipo “caixa-preta” ou “dinâmicos”.

Modelos do tipo caixa-preta, fundamentalmente abordam a descrição quantitativa do sistema fisiológico baseado nos dados de entrada e/ou saída (CARSON & COBELLI, 2001). Como possuem característica essencialmente descritiva dos dados experimentais, esses modelos consistem em grande parte de ajuste de funções a séries temporais, como as funções senoidais; e em técnicas relacionadas com a utilização de sistemas lineares tais como a convolução e deconvolução de dados de entrada/saída (e.g., KLOTTER, 1960; BENEDITO-SILVA, 1997). Incluem-se entre esses modelos aqueles baseados em osciladores mecânicos ou eletrônicos (FERRARI *et al.*, 2003).

¹ *E-box*: Sequência de bases do gene que quando ativada promove o processo de transcrição.

Por outro lado, modelos dinâmicos são elaborados levando-se em conta a dinâmica ou aspectos da cinética presentes no sistema biológico (WEVER, 1984). Dependendo do fenômeno estudado e das hipóteses envolvidas na coordenação dos fenômenos biológicos de temporização, a abordagem matemática pode ser estocástica ou determinística.

A elaboração de modelos matemáticos com abordagem determinística, isto é, com elevada previsibilidade da evolução temporal a partir de condições iniciais definidas, envolve em sua maioria a descrição da dinâmica dos estados do sistema que oscilam ao longo do tempo. Para isso, equações diferenciais ordinárias lineares ou não-lineares constituem instrumentos apropriados para simulações de expressões do oscilador biológico.

Experimentos sobre a expressão do oscilador biológico circadiano revelam que, apesar de haver durante a ontogênese momentos em que há modificação de amplitude e de valor médio de oscilação, características como a estacionariedade e periodicidade de oscilação permanecem sempre presentes. Em matemática, oscilações com essas características são denominadas ciclos-limite, sendo esta definição proveniente de sua representação no espaço de fases. A evolução temporal de um sistema em regime periódico, como o mostrado na figura 1.3-A, apresenta a configuração de uma curva fechada no espaço de fases como mostra a figura 1.3-B.

A

B

Figura 1.3: Exemplo de um ciclo-limite. Em **A** está representado a oscilação de uma variável arbitrária ao longo do tempo e em **B** há a representação da mesma oscilação em uma reconstrução do diagrama de fases, onde no eixo das abscissas está o valor da variável em um tempo t_i e no eixo das ordenadas há o valor da mesma variável no tempo t_{i-2} . A curva fechada indica que o período e a amplitude da oscilação permanecem constantes ao longo do tempo.*

Um sistema dinâmico representado por uma equação diferencial linear pode apresentar ciclo-limite sob condições de contorno muito limitadas, tornando-o inadequado como modelo de sistemas biológicos. Sistemas dinâmicos representados por equações diferenciais não-lineares permitem explorar hipóteses variadas sobre os mecanismos do sistema biológico original e têm sido a opção mais utilizada no processo de modelagem (e.g.: ENRIGHT, 1980; KRONAUER, 1982, 1984; WINFREE, 1984).

* Devido a versão dos programas ORIGIN 6.0 e MATHEMATICA 5.0 os números decimais nos gráficos serão identificados por ponto.

Entre os vários modelos teóricos realizados, muitos utilizaram a retroalimentação negativa como mecanismo de controle responsável pela geração e sustentação de ciclos circadianos em vários sistemas biológicos. A primeira contribuição nesse sentido foi proporcionado por Goodwin em 1965 (GOODWIN, 1965), que modelou um relógio molecular circadiano de produção e degradação de enzimas. Neste modelo Goodwin propõe um sistema de equações diferenciais não-lineares em que a oscilação circadiana de produção de proteínas seja coordenada por um laço de retroalimentação inibitória sobre a transcrição gênica (GOODWIN, 1965; RENSING *et al.*, 2001).

Propostas subseqüentes de modelos do relógio molecular têm explorado como elementos essenciais para geração de ciclos circadianos não somente a retroalimentação inibitória, mas também o intervalo de tempo para que haja essa sinalização retroalimentadora. Duas destas elaborações teóricas, Scheper (1999) e Lema & Golombek (2000), postulam que um sistema dinâmico formado por uma alça de retroalimentação com tempo de retardo seria suficiente para representar a cinética do relógio circadiano molecular.

O modelo matemático com uma alça de retroalimentação negativa com retardo produz oscilações exclusivamente do tipo ciclo-limite, o que é conveniente matematicamente como representação do sistema de temporização circadiano. Contudo, cientistas como Oğuztörelli & Stein (1976), Mees & Rapp (1978) e Glass (1988) admitem que muitos sistemas biológicos são controlados por múltiplas alças de retroalimentação negativa. A implicação do controle exercido por múltiplas alças inibitórias é o aumento de estabilidade e robustez do sistema de temporização quando comparado com o sistema controlado por somente uma alça (OĞUZTÖRELLI & STEIN, 1976; MEES & RAPP, 1978).

Motivados pela possibilidade do sistema de temporização circadiana, também ser controlado por mais de uma alça inibitória, propomos um modelo dinâmico com duas alças de retroalimentação negativa como oscilador circadiano. Nós estudamos este modelo para entender como uma segunda alça poderia afetar a estabilidade e a robustez do sistema de temporização quando ele é forçado por um oscilador externo.

A limitação na utilização de duas alças no modelo proposto baseia-se nos resultados obtidos Bastos de Figueiredo *et al.* (2002) por Glass & Malta (1990), que

mostraram que oscilações aperiódicas e complexas podem ser encontrados com variações significativas dos parâmetros de controle em sistemas com duas ou mais alças de retroalimentação negativa.

1.4 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi de apresentar e avaliar um modelo do sistema de temporização circadiana. O sistema de temporização que modelamos corresponde a um oscilador cuja expressão oscilatória possui frequência circadiana, é controlado por duas alças de retroalimentação inibitória e é sincronizado por um forçador externo que representa o conjunto de sinais ambientais que sincronizam o sistema às 24h (figura 1.4).

Símbolos:

Retroalimentação inibitória – ●

Tempos de retardo - δ_1 ; δ_2

Constante moduladora da expressão oscilatória – k_d

Constante moduladora da retroalimentação – k_p

Figura 1.4: Modelo do sistema de temporização circadiana coordenado por alças de retroalimentação inibitória. O sistema é controlado por sinais retroalimentadores com atrasos δ_i , sendo, $\delta_1 < \delta_2$. Neste modelo, o “Forçador Externo” representa o conjunto de sinais ambientais que sincronizam o sistema ao ciclo de 24h.

Utilizamos para a elaboração do modelo uma equação diferencial não-linear com retardo (EDR) com duas alças de retroalimentação negativa.

O estudo foi dividido em duas etapas.

-a primeira delas pela análise de um oscilador com uma alça de retroalimentação negativa com retardo; e

-a segunda etapa do estudo pelo acréscimo da segunda alça de retroalimentação negativa.

A equação utilizada baseia-se na EDR desenvolvida por Mackey & Glass (1977), e é do tipo:

$$\frac{dp(t)}{dt} = -\lambda \cdot p(t) + f(p_{\delta}) \quad [1.1]$$

sendo,

p – variável dinâmica;

λ - constante de degradação; e

$f(p_{\delta})$ - uma função monotônica decrescente que representa a retroalimentação negativa não-linear.

A descrição detalhada dessa equação está presente na seção 2, item 2.1 e no item 2.5 descrevemos como avaliamos o modelo sob a ação de um agente externo.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1 Estrutura do Modelo

2.1.1 Equação Diferencial com Retardo

Equações diferenciais com retardo (EDRs) tem sido utilizadas para modelagem de vários sistemas biológicos, tais como a simulação da dilatação e contração pupilar (MILTON & LONGTIN, 1990), modelagem da variabilidade cardiovascular (CAVALCANTI & BELARDINELLI, 1996) e modelagem da alelopatia de planctons (MULKHOPADHYAY, CHATTOPADHYAY, TAPASWI, 1998) entre outros. A utilização deste tipo de equação pressupõe que o sistema modelado apresenta memória de estados passados que direcionam o comportamento do sistema no presente. A informação sobre o estado do sistema em um tempo $t - \delta$ engatilha um sinal retroalimentador que controla o comportamento do sistema no tempo t .

Nesta dissertação apresentamos e avaliamos um modelo do sistema de temporização circadiano descrito por um EDR com dois laços de retroalimentação:

$$\frac{dp(t)}{dt} = -k_d \cdot p(t) + \frac{k_p}{2} \left(\frac{\theta_1^n}{\theta_1^n + (p(t - \delta_1))^n} + \frac{\theta_2^n}{\theta_2^n + (p(t - \delta_2))^n} \right) \quad [2.1]$$

sendo,

p – a variável de interesse;

δ_i – tempo de retardo;

k_d – taxa de degradação;

k_p – taxa de produção;

Os segundo e terceiro termo do lado direito da equação correspondem a uma função sigmoideal, $F_i(p(t - \delta_i))$. Funções sigmoideais têm sido muito utilizadas como representação da ativação/desativação não-linear de expressões gênicas (e.g., GLASS &

MACKEY, 1988; LEMA & GOLOMBEK, 2000). A função F_i utilizada é uma função não-linear que depende de valores de p no passado, no tempo $t-\delta_i$. Como estamos interessados na retroalimentação negativa, assumimos que $F_i(p(t-\delta_i))$ é uma função monotônica decrescente, dada por:

$$F_i(p(t-\delta_i)) = \frac{\theta_i^n}{\theta_i^n + (p(t-\delta_i))^n}, \quad 0 < \theta_i < 1 \quad [2.2]$$

onde n e θ são parâmetros que controlam respectivamente a declividade e o limiar da função sigmoidal. Nas figuras 2.1-B e 2.1-D têm-se o limite $n \rightarrow \infty$, e a função $F_i(p(t-\delta_i))$ passa a ser uma função degrau dada por:

$$F_i(p(t-\delta_i)) = \begin{cases} 1 & p(t-\delta_i) < \theta \\ 0 & p(t-\delta_i) > \theta \end{cases} \quad [2.4],$$

no entanto, para modelos de sistemas biológicos transições menos abruptas entre a “ativação” (denotado pelo valor numérico 1) e “inibição” (denotado por 0) devem ser levadas em conta. Nas figuras 2.1-A e 2.1-C têm-se exemplos de curvas com valores de n menores, implicando declives suaves.

Figura 2.1: Exemplos da função sigmoidal – $F(p)$. Nestes exemplos observa-se que valores maiores de θ implicam aumento do limiar na transição produção/inibição (**B** e **D**) e transições mais suaves são alcançadas para valores menores de n (**A** e **C**).

O parâmetro k_d , denotado aqui como “taxa de degradação”, controla a fase descendente da cinética oscilatória da variável simulada. O parâmetro k_p , denotado como “taxa de produção”, modula a retroalimentação modificando os extremos de $F_i(p_d)$ de $0 \leq F_i(p_d) \leq 1$ para $0 \leq F_i(p_d) \leq k_p$.

As propriedades dinâmicas das equações diferenciais com retardo podem ser extraídas a partir de suas soluções obtidas por integração numérica (BAKER *et al.*, 1999). Nesta dissertação o estudo das propriedades dinâmicas da equação incluíram: a avaliação do regime estacionário em função dos parâmetros de controle (Análise Linear de Estabilidade), a avaliação do espectro de frequências presente em soluções com regime

oscilatório (Análise Espectral) e a reconstrução das propriedades topológicas no espaço de fases (Avaliação dos Atratores).

O modelo foi estudado em duas etapas, as quais permitiram avaliar o papel da alça redundante no sistema modelado. As etapas foram definidas em:

ETAPA 1: Oscilador com um laço de retroalimentação negativa com retardo , $N=1$;

ETAPA 2: Oscilador com dois laços de retroalimentação negativa, com tempos de retardo δ_1 e δ_2 , sendo $\delta_1 < \delta_2$; e $N=2$.

2.2 Integração Numérica

A partir do trabalho elaborado por Hodgkin e Huxley em 1952 (WEISS et al., 2003) a modelagem matemática de sistemas fisiológicos tem se tornado cada vez mais rotineira contribuindo no discernimento de propriedades qualitativas difíceis de acessar experimentalmente.

Em geral, o método de integração numérica implica considerar os elementos infinitesimais da equação como elementos finitos e discretos. A partir desta consideração, a variável dependente (p) passou a ser função do passo de integração (h) arbitrado. Em nosso trabalho bons resultados foram obtidos com valores de $h = 0,005$.

Os métodos numéricos de integração usados foram os de Runge-Kutta de quarta ordem (Press *et al.*, 1986) e o de Gear (Anexo 1), que foram implementados em linguagem FORTRAN 95, adotando como condição inicial $p=0$ no intervalo $0 < t < \delta$. O método de Gear é considerado o mais eficiente para equação diferencial com retardo.

Para garantir que as oscilações estudadas estivessem sob regime estacionário descartarmos o intervalo transiente da solução numérica. Na figura 2.2-A, apresentamos uma série temporal gerada pelo sistema onde o regime estacionário é de equilíbrio estável e na figura 2.2-B, o regime estacionário da série é oscilatório, com oscilação tipo “ciclo-limite”.

A

B

Figura 2.2: Exemplos de duas soluções numéricas com regiões transientes e estacionárias. Os regimes estacionários, exemplificados, são de estado em **A** e oscilatório em **B**.

2.3 Análise Linear de Estabilidade

Com o objetivo de identificar a região do espaço de parâmetros do sistema que proporcionam regime oscilatório, realizamos a análise linear de estabilidade. A análise linear consiste em estudar o comportamento dinâmico da equação EDR linearizada. Perturbando a solução de equilíbrio da equação linearizada, avaliamos se o fluxo resultante no diagrama de fases vai para um atrator ciclo-limite ou, a um ponto fixo, ou diverge. (GUKENHEIMER & HOLMES, 1983; FERRARA & PRADO, 1994). Atrator é o conjunto de pontos aos quais as trajetórias do espaço de fases convergem (FERRARA & PRADO, 1994). Na figura 2.3-A, está representado uma trajetória no diagrama de fases que converge a um **ponto fixo**. Por outro lado, na figura 2.3-B, a trajetória no diagrama de fases converge a um **ciclo limite**.

Figura 2.3: Reconstruções do diagrama de fases. Em **A** a trajetória converge a um atrator “ponto-fixa”, enquanto que em **B** a trajetória no diagrama de fases converge a um “ciclo-limite”.

Um aspecto importante nesta análise linear é que o atrator configurado no espaço de fases está vinculado à condição de estabilidade do(s) ponto(s) de equilíbrio da equação (HALE & LUNEL, 1993). O ponto de equilíbrio é uma solução constante $p(t) = p_{eq}$ obtido de:

$$\left. \frac{dp(t)}{dt} \right|_{p(t)=p_{eq}} = 0 \quad [2.5].$$

O estudo de sua condição de estabilidade na equação linearizada permite determinar os valores críticos dos parâmetros de controle que determinam a transição de uma dinâmica representada por um ponto fixo para um regime oscilatório ciclo-limite. Essa transição é definida na teoria como *bifurcação de Hopf*. Oliveira (1980) apresentou os princípios gerais sobre *bifurcações de Hopf* em equações diferenciais com retardo baseado no estudo da estabilidade dos pontos de equilíbrio desse tipo de equação (KUANG, 1993).

Abaixo descrevemos os passos adotados na análise linear de estabilidade:

- a) Determinação do ponto de equilíbrio do sistema, a partir da seguinte consideração:

$$\begin{aligned} \frac{dp(t)}{dt} &= 0 \quad [2.6] \Rightarrow \\ p_{eq} &= \frac{k_p}{2.k_d} \sum_{i=1}^2 \frac{\theta_i^n}{\theta_i^n + p_{eq}^n} \quad [2.7] \end{aligned}$$

- b) Para a verificação do comportamento das órbitas próximo ao ponto de equilíbrio, escrevemos:

$$p(t) = p_{eq} + \eta(t) \quad [2.8],$$

onde $\eta(t)$ corresponde a uma pequena perturbação adicionada ao ponto de equilíbrio

- c) Substituindo [2.8] na equação [2.1] e fazendo uma expansão em série de Taylor ao redor do ponto de equilíbrio, até o termo de primeira ordem, obtemos:

$$\frac{d\eta(t)}{dt} = -k_d \cdot (\eta - p_{eq}) - \frac{k_p}{2} \sum_{i=1}^2 \frac{n \cdot (p_{eq})^{n-1} \cdot \theta_i^n}{[\theta_i^n + p_{eq}^n]^2} \cdot (\eta - p_{eq}) \quad [2.9]$$

- d)** Como temos interesse em soluções do tipo $\eta(t)=e^{\lambda t}$, a equação acima pode ser reescrita como:

$$\frac{d(e^{\lambda t})}{dt} = -k_d \cdot e^{\lambda t} - \frac{k_p}{2} \sum_{i=1}^2 u_i \cdot e^{\lambda(t-\delta)} \quad [2.10]$$

$$\text{sendo } u_i = \frac{n \cdot (p_{eq})^{n-1} \cdot \theta_i^n}{[\theta_i^n + p_{eq}^n]^2} \quad [2.11].$$

O termo λ , por sua vez, será obtido através da resolução de [2.12]:

$$\lambda e^{\lambda t} = -k_d \cdot e^{\lambda t} - \frac{k_p}{2} \sum_{i=1}^2 u_i \cdot e^{\lambda t} \cdot e^{-\lambda \delta} \quad [2.13]$$

$$\Rightarrow \lambda = -k_d - \frac{k_p}{2} \sum_{i=1}^2 u_i \cdot e^{-\lambda \delta} \quad [2.14]$$

- e)** As soluções da equação [2.14] podem ser números reais ou complexos conjugados dependendo dos parâmetros do sistema. Seja λ um número complexo, este será denotado por:

$$\lambda = \alpha \pm i\beta \quad [2.15],$$

- f)** Aplicando a solução complexa [2.15] na equação [2.14], tem-se:

$$\alpha + i\beta = -k_d - \left(\frac{k_p}{2} \sum_{i=1}^2 u(\theta_i)\right) \cdot e^{-\alpha \delta_i} \cdot e^{-i\beta \delta_i} \quad [2.16] \Rightarrow$$

$$\alpha + i\beta = -k_d - \left(\frac{k_p}{2} \sum_{i=1}^2 u(\theta_i)\right) \cdot e^{-\alpha \delta_i} (\cos(\beta \delta_i) - i \operatorname{sen}(\beta \delta_i)) \quad [2.17] \Rightarrow$$

$$\alpha + i\beta = -k_d - \left[\left(\frac{k_p}{2} \sum u(\theta_i)\right) \cdot e^{-\alpha \delta_i} \cos(\beta \delta_i)\right] + i \left[\left(\frac{k_p}{2} \sum u(\theta_i)\right) \cdot e^{-\alpha \delta_i} \operatorname{sen}(\beta \delta_i)\right] \quad [2.18] \Rightarrow$$

$$-\alpha - k_d - \left[\left(\frac{k_p}{2} \sum_1^2 u(\theta_i) \right) . e^{-\alpha \delta_i} . \cos(\beta \delta_i) \right] + i \left[-\beta + \left(\frac{k_p}{2} \sum_1^2 u(\theta_i) . e^{-\alpha \delta_i} . \sin(\beta \delta_i) \right) \right] = 0 \quad [2.19]$$

$\Rightarrow$

$$\alpha + k_d + \left[\left(\frac{k_p}{2} \sum_1^2 u(\theta_i) \right) . e^{-\alpha \delta_i} . \cos(\beta \delta_i) \right] + i \left[\beta - \left(\frac{k_p}{2} \sum_1^2 u(\theta_i) . e^{-\alpha \delta_i} . \sin(\beta \delta_i) \right) \right] = 0 \quad [2.20] \Rightarrow$$

$$z(\alpha, \beta) = \alpha + k_d + \left[\left(\frac{k_p}{2} \sum_1^2 u(\theta_i) \right) . e^{-\alpha \delta_i} . \cos(\beta \delta_i) \right] + i \left[\beta - \left(\frac{k_p}{2} \sum_1^2 u(\theta_i) . e^{-\alpha \delta_i} . \sin(\beta \delta_i) \right) \right] = 0 \quad [2.21].$$

As partes real e imaginária da equação [2.21], podem ser separadas e escritas na forma:

$$\text{Re}(z(\alpha, \beta)) = \alpha + k_d + \left[\left(\frac{k_p}{2} \sum u(\theta_i) \right) . e^{-\alpha \delta_i} . \cos(\beta \delta_i) \right] = 0 \quad [2.22];$$

$$\text{Im}(z(\alpha, \beta)) = \beta - \left(\frac{k_p}{2} \sum u(\theta_i) \right) . e^{-\alpha \delta_i} . \sin(\beta \delta_i) = 0 \quad [2.23].$$

As eqs. [2.22] e [2.23] são equações algébricas não-lineares e para sua solução, nós utilizamos o método numérico de Newton-Raphson (Press *et al.*, 1986) implementado no software MATHEMATICA™, versão 5.0 (WolframResearch®).

g) Estudando as soluções desta forma pôde-se identificar para quais valores dos parâmetros de controle o sistema passa a apresentar ciclos-limite. As condições de estabilidade do ponto de equilíbrio foi avaliada de acordo com a seguinte classificação:

- 1) $\alpha < 0$, implica a presença de um **ponto-fixo** estável;
- 2) $\alpha=0$ e $\beta>0$ implica perda de estabilidade do ponto fixo quando submetido a pequena perturbação e o atrator configurado no espaço de fases passa a ser um **ciclo-limite** (GUKENHEIMER & HOLMES, 1983).

2.4 Métodos para Avaliação do Espectro de Frequências e de Algumas Propriedades Dinâmicas da Oscilação Gerada.

O objetivo básico da Análise Espectral de Fourier, utilizada neste estudo, é de escrever uma série temporal como uma combinação linear de componentes senoidais, cada uma com dada frequência. O conjunto $\{\omega_n(t) = e^{int} = \cos(nt) + i.\sin(nt), n=0, \pm 1, \dots\}$ de funções ortogonais, de período 2π , forma a base para a análise de Fourier (MORETIN, 1999). Os coeficientes desta combinação linear dão lugar ao chamado espectro de frequências ou de *Fourier*. A partir deste fundamento, Cooley e Tukey (1965) introduziram um algoritmo, chamado *Transformada Rápida de Fourier*, conhecido como FFT (*Fast Fourier Transform*), que possibilita a obtenção do espectro de frequências em um tempo consideravelmente curto. Neste trabalho, utilizamos o algoritmo FFT presente no software ORIGIN™, versão 6.0 (OriginLab®).

O espectro de frequências resultante da aplicação do algoritmo permitiu a avaliação do regime oscilatório presente na solução da Eq. [2.1]. Por exemplo, oscilações com regime periódico podem apresentar espectro de frequências com um pico bem definido em uma frequência f ou apresentar espectro com dois ou mais picos correspondentes a frequências harmônicas f_1, f_2, f_3 etc. Na figura 2.4-A, apresentamos uma solução numérica da eq. [2.1], com regime oscilatório periódico. Na figura 2.4-B, é possível observar no espectro de *Fourier* que há somente uma frequência de oscilação. Na figura 2.4-C, está representado outra solução numérica, também com regime oscilatório periódico, sendo que neste caso o espectro correspondente, figura 2.4-D, apresenta picos relacionados a harmônicos da frequência fundamental.

Oscilações com regime quasi-periódico, podem ser identificadas por espectros de *Fourier* com k picos ($k \geq 2$), cujas frequências f_1 e $f_2 \dots f_k$ são independentes. Entretanto, segundo Ruelle-Takens (1971), existe um cenário onde oscilações quasi-periódicas com 3 frequências ou mais pode sob condições bastante gerais, tornar-se instável e originar uma oscilação caótica. Oscilações com comportamento caótico, são aperiódicas, apresentam espectro contínuo de banda larga e são dependentes das condições iniciais. Nesta dissertação não serão abordados oscilações com comportamento caótico.

Na Figura 2.4-E, tem-se a representação de uma solução numérica da eq. [2.1], cujo regime oscilatório *quasi-periódico* pode ser identificado pelo espectro de *Fourier*, onde há dois picos referentes a duas frequências independentes f_1 e f_2 (figura 2.4-F).

Figura 2.4: Características dos espectros de frequências de oscilações periódicas e *quasi*-periódicas. Em **B**, tem-se o espectro de frequências de uma oscilação ciclo-limite(**A**), cujo pico corresponde a frequência $1/\tau$. Em **D**, é mostrado o espectro de uma oscilação periódica (**C**), cujo os picos correspondem a frequências harmônicas f_1 , f_2 e f_3 . Por outro lado, em **F** os dois picos proeminentes do espectro, correspondem a frequências cuja razão é um número irracional, caracterizando uma oscilação *quasi*-periódica (**E**).

Algumas das propriedades dinâmicas das oscilações foram detectadas através da reconstrução do espaço de fases. O espaço de fases permitiu a inspeção visual da evolução temporal da oscilação através do atrator configurado nele.

A primeira proposta da avaliação de uma série temporal através de sua geometria no espaço de fases foi realizada por Packard e colaboradores em 1980. Neste trabalho mostrou-se que as derivadas sucessivas dos estados do sistema – $\{x_j\}$, dadas por $\frac{d^m \{x_j\}}{dt^m}$, podem fornecer informação sobre a evolução dinâmica do sistema ao longo do tempo t no intervalo $[0, j]$, quando utilizadas como coordenadas de espaços de fases m -dimensionais. Apesar de eficaz, esse método torna-se pouco prático se o número de variáveis independentes envolvidas nos sistema for muito grande.

Um método que evita os problemas decorrentes do procedimento proposto por Packard é o processo de reconstrução do espaço de fases elaborado por Takens (1980). Takens demonstrou que é possível reconstruir qualitativamente as propriedades do atrator original do sistema a partir da construção de vetores $\mathbf{e}_j$ cujas coordenadas são os elementos da série temporal retardadas:

$$\vec{\mathbf{e}}_j = \{x(t), x(t-s), \dots, x(t-(m-1).s)\} \quad [2.24],$$

sendo m a dimensão de imersão e s o passo de reconstrução do atrator.

Valores apropriados de m e s são fundamentais para a reconstrução do atrator. A escolha destes valores pode ser facilitada através da inspeção visual do “*gráfico de primeiro retorno*”, definido pela relação $\mathbf{x}(t_j) \times \mathbf{x}(t_j-s)$ (FERRARA & PRADO, 1994). A inspeção visual deste gráfico fornece informações sobre os valores de s para os quais $\mathbf{x}(t_j)$ e $\mathbf{x}(t_j-s)$ deixam de ser fortemente correlacionados e passam a designar variáveis independentes, neste caso a distribuição dos pontos do atrator reconstruído passa a ser mais uniforme, como exemplificado na figura 2.5. A escolha da dimensão de imersão m é realizada de maneira semelhante, isto é, através da inspeção visual do gráfico é possível determinar o menor valor de m para que o atrator deixe de estar comprimido numa diagonal e passe a ter uma distribuição uniforme no gráfico.

Figura 2.5: Nesta figura estão exemplos de reconstrução de espaços de fase com diferentes passos de reconstrução - s . Em **B** o atrator configurado está comprimido na diagonal do diagrama devido a elevada correlação dos pontos que o compõe. Em **C** a configuração obtida proporciona melhor interpretação devido à distribuição mais adequada no diagrama.

Portanto, através da avaliação das propriedades topológicas no espaço de fases foi possível caracterizar significativamente as soluções obtidas da EDR estudada. Por exemplo, na figura 2.6 reapresentamos e reavaliamos as soluções presentes na figura 2.6. Em 2.6-A e em 2.6-C as oscilações do tipo periódicas apresentam no espaço de fases plano um atrator **ciclo-limite**, respectivamente 2.6-B e 2.6-D.

Por outro lado, oscilações quasi-periódicas com frequências f_1 e f_2 , figura 2.6-E, tem como atrator um **toro** - T^2 , que projetado no plano apresenta a configuração mostrada na figura 2.6-F.

Figura 2.6: Avaliação das propriedades topológicas de algumas oscilações. Em **A** e **C**, estão representados oscilações do tipo periódicas (correspondentes àquelas apresentadas nas figuras 2.4 -A e 2.4 -C) caracterizadas por um atratores tipo ciclo-limite, respectivamente em **B** e **D**. Em **E**, por outro lado, oscilações *quasi*-periódicas com 2 frequências independentes são caracterizadas por um atrator tipo toro, que projetados no espaço de fases plano tem a configuração presente em **F**.

2.5 Avaliação da Condição de Sincronização

Modelamos a condição de sincronização através da utilização do sistema forçado:

$$\frac{dp(t)}{dt} = -k_d \cdot p(t) + \frac{k_p}{2} \left(\frac{\theta_1^n}{\theta_1^n + (p(t - \delta_1))^n} + \frac{\theta_2^n}{\theta_2^n + (p(t - \delta_2))^n} \right) + S(t) \quad [2.25].$$

A função matemática $S(t)$ utilizada para exercer o papel do forçador foi definida como:

$$S(t) = A_e \cdot [\sin(2\pi \cdot f_e \cdot t) + 1] \quad [2.26]$$

sendo,

- A_e - amplitude de oscilação do forçador, responsável pelo contraste entre os valores máximo e mínimo de oscilação, e
- f_e - frequência do forçador, definida como:

$$f_e = \frac{pin}{T_e \cdot salto} \quad [2.27]$$

onde,

- T_e - corresponde ao período de oscilação do agente externo;
- pin - passo de integração numérica; e
- $salto$ - intervalo entre os dados de saída.

A avaliação da condição de sincronização do sistema foi baseado no *frequency-locking*. O conceito de *frequency-locking* ou **sincronização** é freqüentemente usado na análise de estabilidade estrutural de oscilações quasi-periódicas com frequências independentes f_1 e f_2 . Na análise estrutural desse tipo de oscilação estuda-se como pequenas perturbações podem promover a modificação de um regime quasi-periódico à periódico, isto é, a razão f_1/f_2 das frequências de oscilação deixa de ser irracional e passa a ser racional. Vejamos como isso ocorre raciocinando em termos de sistemas forçados. Se no espectro de *Fourier* aparecer duas frequências implica que o sistema “ignora” o oscilador externo. Neste caso, muito provavelmente se está fora de um intervalo de sincronização. O maior pico no espectro corresponde à frequência fundamental do sistema, que passaremos a denotar por f_s e o segundo pico corresponde a frequência do oscilador externo, que será denotado por f_e . No entanto, à medida que aumenta a

amplitude do oscilador externo, aumenta-se a probabilidade de ocorrer sincronização (FERRARA & PRADO, 1994). O espectro de *Fourier*, passa a apresentar somente um pico correspondente a frequência deste oscilador (f_e).

Nosso objetivo foi de aplicar esse raciocínio no modelo proposto e obter a região de sincronização no espaço A_e - T_e (Amplitude-Período) do “forçador externo”, na qual este é capaz de sincronizar o sistema temporizador.

Na figura 2.7-A, apresentamos o espectro de *Fourier* de uma oscilação característica do sistema sincronizado. Na figura 2.7-B, está exposto o espaço de fases desta oscilação, com a configuração do atrator correspondente, um ciclo-limite.

Na figura 2.7-C, é apresentado o espectro de *Fourier* de uma oscilação quasi-periódica, que caracteriza a expressão do sistema não-sincronizado ao agente forçador. Na figura 2.7-D, está representado o espaço de fases com o atrator correspondente, a projeção de um toro.

Figura 2.7: Condição de sincronização do sistema forçado [2.25]. Em A, está o espectro de *Fourier* da expressão de um sistema “sincronizado”, com um pico proeminente na frequência do oscilador externo f_e ; em B está a reconstrução do espaço de fases do sistema “sincronizado”, com a configuração de um ciclo-limite. Em C, no espectro de *Fourier* da expressão do sistema “não- sincronizada” há dois picos correspondentes à frequência fundamental do sistema (f_s) e à frequência do oscilador externo(f_e). Em D, é exposto o atrator correspondente a esta expressão, a projeção de um toro.

3. RESULTADOS

A apresentação dos resultados está dividido em duas etapas, com a intenção final de comparar e compreender o papel da uma segunda alça de retroalimentação no controle da dinâmica do modelo do sistema de temporização biológica aqui apresentado.

Comentários e discussão sobre as diferenças mais relevantes encontradas na comparação entre um modelo com laço unificado de retroalimentação (M.L.U.) e outro com laço duplo de retroalimentação (M.L.D.) serão realizados na seção 4.

3.1 Primeira Etapa – M.L.U.

A primeira etapa, consistiu na avaliação do modelo do sistema de temporização circadiano com uma alça de retroalimentação negativa. Para isto utilizamos a EDR abaixo:

$$\frac{dp(t)}{dt} = -k_d \cdot p(t) + k_p \cdot \frac{\theta^n}{\theta^n + p_\delta^n} \quad [3.1]$$

sendo,

p : variável de interesse;

k_d : constante de degradação;

k_p : constante de produção;

θ : controle do limiar da retroalimentação inibitória;

n : controle da não-linearidade da retroalimentação;

δ : tempo de retardo da retroalimentação.

As soluções da equação [3.1] foram obtidas por integração numérica, a partir da condição inicial, $P(t)=0$ para $0 < t < \delta$. Devido à sobreposição da janela entre os pontos das soluções numéricas à escala de tempo em horas, adotamos esta unidade de tempo em todas simulações.

Nesta etapa do estudo, para a apresentação e avaliação do modelo do sistema de temporização circadiano, arbitramos um conjunto inicial de valores de parâmetros que proporcionasse a simulação de uma oscilação circadiana, com base em observações experimentais apresentadas por Dunlap (1999), ver tabela 1. Na figura 3.1-A, está a representação gráfica da solução oscilatória obtida com os parâmetros inicialmente fixados. Na figura 3.1-B, está exposto o espectro de *Fourier* dessa solução, com a identificação da frequência circadiana de oscilação.

Parâmetro	Valor
k_d	1
k_p	1
δ	0,8
n	5
θ	0,4

Tabela 1: Valores dos parâmetros de controle adotados para simulação de uma oscilação circadiana com o M.L.U.

Figura 3.1: Simulação de uma oscilação ciclo-limite circadiana. Em **A**, está representado a solução da equação [3.1], com os valores de parâmetros dados na tabela 1. Em **B**, está exposto o espectro de frequências da oscilação simulada.

Com a finalidade de averiguarmos quais valores de parâmetros controlam a expressão de regime de equilíbrio estável ou de regime oscilatório pelo sistema, realizamos a análise de estabilidade linear do ponto de equilíbrio da equação. A utilização das soluções de $z(\alpha, \beta)$, eq.[2.21], permitiram determinar os valores dos parâmetros onde o sistema perde estabilidade e ocorre a *bifurcação de Hopf*.

Nas figuras 3.2-A e 3.2-B, as curvas nos diagramas (α, β) correspondem às soluções das equações [2.22] e [2.23], para dois valores distintos de n , mantendo-se fixo o subconjunto $\{k_p=1, k_d=1, \theta=0,4 \text{ e } \delta=0,8h\}$. No diagrama, a intersecção das curvas correspondem à solução da equação [2.21], e dependendo de sua posição em relação a linha definida por $\alpha=0$, indica quando o sistema deixa de apresentar regime de equilíbrio estável e passa a apresentar regime oscilatório periódico, em função de n . Quando houver intersecção das curvas abaixo da linha definida por $\alpha=0$, o sistema apresenta regime de equilíbrio estável e quando houver intersecção a partir da linha definida por $\alpha=0$, o sistema apresenta regime oscilatório.

Na figura 3.2-A, para $n=3,5$, como a intersecção das curvas ocorre sob a linha $\alpha=0$, e tem-se a expressão de regime de equilíbrio estável. Na figura 3.2-B, para $n=3,6$, a intersecção da curva ocorre imediatamente acima da linha definida pelo valor de $\alpha=0$, e nesta condição tem-se regime oscilatório. A *bifurcação de Hopf* ocorre em $n \in]3,5; 3,6[$.

Apresentamos na figura 3.3 um diagrama de bifurcação em relação ao parâmetro n , que auxiliará a compreender a alteração do regime estacionário e a ocorrência da *bifurcação de Hopf*. Após a origem das oscilações ciclo-limite, com o mesmo de oscilação é possível notar o aumento da amplitude em função de n .

A **B**

Figura 3.2: Diagramas (α, β) com soluções da equação [2.21], em função do parâmetro n . Em **A**, para $n=3,5$ tem-se $\alpha < 0$ e o regime expresso pelo sistema é de equilíbrio estável. Em **B**, a partir de $n=3,6$ tem-se $\alpha \geq 0$ e o sistema passa a expressar regime oscilatório.

Figura 3.3: Diagrama de Bifurcação com o parâmetro n , para valores de $n < 3,55$, as soluções da EDR apresentam regime de equilíbrio estável, enquanto que para $n \geq 3,55$, originam-se oscilações ciclo-limite.

Prosseguimos com a análise de estabilidade linear estudando valores nos espaços de parâmetros (n, θ) , (n, δ) e (δ, θ) que determinassem regiões que indiquem a presença de regimes equilíbrio estável e oscilatório. Na figura 3.4, está configurado o espaço (n, θ) de um sistema com valores fixos de $k_p=1$, $k_d=1$ e $\delta=0,8h$, onde a área escura define os valores de n e θ que proporcionam a expressão do sistema com regime de equilíbrio estável. A linha de fronteira contém os valores em que ocorre *bifurcação de Hopf*.

Figura 3.4: Espaço de parâmetros (n, θ) , com a determinação da região em que há equilíbrio estável, com atrator “ponto-fixo”. Foram mantidos fixos $k_d=1$, $k_p=1$ e $\delta=0,8h$.

Na figura 3.5, está representado o espaço de parâmetro (n, δ) do sistema com valores fixos de $k_p=1$, $k_d=1$, $\theta=0,4$, onde está demarcada uma região escurecida contendo os valores de n e δ que proporcionam a expressão do regime de equilíbrio estável.

Figura 3.5: Espaço de parâmetros (n, δ) , com a demarcação da região contendo os valores de n e δ responsáveis pela expressão do regime de equilíbrio estável, no sistema com $k_d=1$, $k_p=1$ e $\theta=0,4$.

Na figura 3.6, está definido no espaço de parâmetros (δ, θ) a região de regime de equilíbrio estável, caracterizado pelo atrator ponto-fixo. Para construção deste diagrama foram mantidos constantes os parâmetros $k_d=1$, $k_p=1$ e $n=5$.

Figura 3.6: Espaço de fases (θ, δ) , com a região de regime estacionário ponto-fixo. O diagrama foi construído mantendo-se fixo o subconjunto de parâmetros $\{k_d=1, k_p=1$ e $n=5\}$.

A partir desta análise preliminar, passamos a estudar como os parâmetros do sistema influenciam as soluções ciclo-limite da eq. [3.1]. Isto foi feito estudando como mudam as propriedades de interesse, tais como período e amplitude das oscilações, à medida que variamos o valor de um parâmetro sendo os outros mantidos fixos, segundo indica a tabela 1.

Na figura 3.7-A, é possível observar que conforme θ aumenta, o período da oscilação diminui, isto é, conforme o limiar da função $F(p(t-\delta))$ aumenta, maior é a frequência de oscilação. Na figura 3.7-B, podemos notar que apesar da frequência de oscilação aumentar, a amplitude apresenta comportamento distinto, com aumento e sucessiva redução após alcançar um valor máximo.

Figura 3.7: Curvas ajustadas evidenciando a influência de θ nas soluções oscilatórias ciclo-limite da equação [3.1]. Em A, a curva ajustada mostra a tendência de redução do período de oscilação em função do aumento de θ . Em B, observa-se que em função de θ , a amplitude de oscilação aumenta e diminui após alcançar um máximo.

O controle exercido pelo tempo de retardo δ nas soluções de tipo ciclo-limite da eq. [3.1] estão representados nas figuras 3.8-A e 3.8-B. Em 3.8-A, observa-se que conforme o retardo aumenta as oscilações simuladas apresentam menor período. Na

figura 3.8-B, o gráfico exposto mostra que a amplitude aumenta com sucessivo aumento do tempo de retardo.

Figura 3.8: Controle exercido pelo tempo de retardo nas soluções ciclo-limite da eq. [3.1]. Em **A**, a curva ajustada mostra que o comportamento crescente do período de oscilação em função do tempo de retardo. Em **B**, também observa-se que a amplitude aumenta com a variação positiva do tempo de retardo.

Estudamos também o controle exercido pela constante de degradação (k_d) nas soluções com regime oscilatório periódico da eq. [3.1]. Na figura 3.9-A, está a representação gráfica da variação do período de oscilação em função de k_d , onde observa-se que o aumento de k_d promove a redução do período de oscilação. Enquanto que na figura 3.9-B, nota-se que em função k_d a amplitude de oscilação aumenta e diminui após alcançar um máximo.

A **B**

Figura 3.9: Controle exercido pelo parâmetro k_d nas soluções da eq. [3.1]. Em **A**, a curva ajustada evidencia a redução do período de oscilação com o aumento de k_d . Em **B**, é possível observar que após alcançar um máximo a amplitude das oscilações diminuem com o aumento de k_d .

O controle exercido por k_p reflete-se somente na amplitude de oscilação que aumenta com os valores crescentes de k_p , a frequência permanece inalterada com as variações do parâmetro (figura 3.10).

Figura 3.10: Variação da Amplitude de oscilação em função do parâmetro k_p .
A amplitude aumenta com variações positivas de k_p . Diagrama construído mantendo-se constante $k_d=1$, $\theta=0,4$, $\delta=0,8h$ e $n=5$.

A seguir submetemos o sistema a um agente externo, conforme explicitado na equação abaixo:

$$\frac{dp(t)}{dt} = -k_d \cdot p(t) + k_p \cdot \frac{\theta^n}{\theta^n + p_\delta^n} + A_e \cdot [\text{sen}(2\pi \cdot f_e \cdot t) + 1] \quad [3.2],$$

sendo $f_e = \frac{pin}{T_e \cdot salto} \quad [3.3].$

Na condição de sistema forçado, com valores de parâmetros presentes na tabela 1, avaliamos a ocorrência de sincronização, no espaço $(A_e - T_e)$ do agente externo. Na figura 3.11, observa-se no espaço $(A_e - T_e)$ a região de sincronização com a definição dos intervalos de sincronização em relação a amplitude de oscilação do agente externo. Por exemplo, lê-se no diagrama da figura 3.11 que para $A_e=0,05$ os períodos T_e em que o agente externo proporciona a sincronização do sistema pertence ao intervalo $[21; 27]h$.

Diagrama $A_e \times T_e$

Figura 3.11: Espaço (A_e-T_e) com a definição da região de sincronização para $A_e \in [0,015; 2]$. As curvas superior e inferior limitam o intervalo que o agente externo sincroniza o sistema simulado.

3.2 Segunda Etapa – M.L.D.

A segunda etapa estudada, consistiu na avaliação do modelo do sistema de temprização circadiano com duas alças de retroalimentação negativa. Para isto utilizamos a EDR abaixo:

[3.3]

$$\frac{dp(t)}{dt} = -k_d \cdot p(t) + \frac{k_p}{2} \left(\frac{\theta_1^n}{\theta_1^n + (p(t - \delta_1))^n} + \frac{\theta_2^n}{\theta_2^n + (p(t - \delta_2))^n} \right)$$

sendo,

p : variável de interesse;

k_d : constante de degradação;

k_p : constante de produção;

θ_i : controle do limiar da retroalimentação inibitória;

n : controle da não-linearidade da retroalimentação;

δ_i : tempos de retardo das retroalimentações.

As soluções numéricas foram obtidas a partir da integração da eq. [3.3] com a condição inicial $p(t)=0$ para $0 < t < \delta_{\min}$. Os valores dos parâmetros arbitrados nesta etapa correspondem aos mesmos apresentados na tabela 1, com o acréscimo de uma alça de retroalimentação, ver tabela 2. Com esses valores obtivemos a simulação de oscilação circadiana com $\tau=25,6h$ (figura 3.12).

Parâmetro	Valor
k_p k_d	1 1
δ_1	0,8 h
δ_2	12 h
n	5
θ_1	0,4
θ_2	0,04

Tabela 2: Valores dos parâmetros de controle adotados para simulação de uma oscilação circadiana com o M.L.D.

Figura 3.12: Simulação de uma oscilação ciclo-limite circadiana. Em **A**, está representado a solução da equação [3.3], com os valores de parâmetros dados na tabela 2. Em **B**, está exposto o espectro de frequências da oscilação simulada.

De maneira semelhante à etapa anterior, realizamos a análise linear de estabilidade do ponto de equilíbrio da equação [3.3]. Em função do parâmetro n , averiguamos as soluções da eq.[2.21] no espaço (α, β) , que permitiram identificar a ocorrência ou não da *bifurcação de Hopf*, mantendo-se fixo o subconjunto $\{k_d=1, k_p=1, \theta_1=0,4, \theta_2=0,04, \delta_1=0,8h \text{ e } \delta_2=12h\}$. Na figura 3.13-A, tem-se para $n=4$ a intersecção das curvas do diagrama, correspondente a solução da eq.[2.21], abaixo da linha definida por $\alpha=0$ implicando regime de equilíbrio estável. Na figura 3.13-B, observa-se que para $n=5$ a intersecção das curvas passa a ocorrer em $\alpha \geq 0$, implicando a expressão de regime oscilatório.

Figura 3.13: Diagramas (α, β) com soluções da equação [2.21], em função do parâmetro n . Em A, para $n=4$ tem-se $\alpha < 0$ e o regime expresso pelo sistema é de equilíbrio estável. Em B, a partir de $n=5$ tem-se $\alpha \geq 0$ e o sistema passa a expressar regime oscilatório.

Apresentamos na figura 3.14 um diagrama de bifurcação em relação ao parâmetro n , que facilitará a compreensão da alteração dos regimes estacionários do sistema em relação à *bifurcação de Hopf*. Após a origem das oscilações ciclo-limite, com o mesmo período de oscilação, é possível notar o aumento da amplitude em função de n .

Figura 3.14: Diagrama de Bifurcação com o parâmetro n , para valores de $n < 4,5$, as soluções da EDR apresentam regime de equilíbrio estável, enquanto que para $n \geq 4,5$, originam-se oscilações ciclo-limite.

Prosseguimos com a análise linear de estabilidade, determinando nos espaços $(n \times \theta_2/\theta_1)$ e $(n \times \delta_2/\delta_1)$ as regiões onde há expressão de ponto-fixo.

Na figura 3.15, apresentamos um diagrama com o espaço de parâmetros $(n \times \theta_2/\theta_1)$, cujas curvas correspondem aos pontos que ocorrem *bifurcação de Hopf* no sistema e foram obtidas com $\delta_2/\delta_1=8$ e $\delta_2/\delta_1=19$, com o subconjunto fixo $\{k_d=1, k_p=1, \theta_l=0,4$ e $\delta_l=0,8h\}$. No gráfico mostrado na figura 3.15 podemos observar que quando aumentamos o valor do segundo tempo de retardo em relação ao primeiro (8 para 19 vezes δ_l) a região de estabilidade do ponto-fixo no espaço $n-\theta_2/\theta_1$ diminui, quer dizer que a área cinza antes estável agora corresponde a uma região onde o sistema apresenta oscilações.

Figura 3.15: Espaço $(n \times \theta_2/\theta_1)$ com a definição de regiões cujos parâmetros controlam a expressão de um regime com atrator tipo “ponto-fixo”. As curvas no diagrama são formadas por pontos associados à ocorrência da *bifurcação de Hopf* no sistema, em que manteve-se fixo o subconjunto $\{k_d=1, k_p=1, \theta_I=0,4 \text{ e } \delta_I=0,8h\}$.

Na figura 3.16, é apresentado outro diagrama no mesmo espaço $(n \times \theta_2/\theta_1)$, onde determinamos a região em que há expressão de ponto-fixo para a relação $\delta_2/\delta_1=15$, com os parâmetros $\{k_d=1, k_p=1, \theta_I=0,4, \delta_I=0,8h \text{ e } \delta_I=12h\}$. Neste diagrama nota-se quando a θ_2 tem valor próximo a θ_1 a *bifurcação de Hopf* ocorre para valores menores de n .

Figura 3.16: Espaço $(n \times \theta_2/\theta_1)$ com a definição da região cujos parâmetros controlam a expressão de um regime com atrator tipo “ponto-fixo”. Construída analisando o sistema controlado pelos parâmetros $\{k_d=1, k_p=1, \theta_I=0,4, \delta_I=0,8h \text{ e } \delta_2=12h\}$.

Na figura 3.17, apresentamos o resultado da análise linear de estabilidade no espaço $(n \times \delta_2/\delta_1)$, onde determinamos regiões cujos pontos estão associados a expressão de um atrator “ponto-fixo”, para $\theta_2/\theta_1=0,5$ e $\theta_2/\theta_1=1,0$. Para construção do diagrama avaliamos foi mantido fixo o subconjunto $\{k_d=1, k_p=1, \theta_l=0,4, \delta_l=0,8h\}$. No diagrama da figura 3.17, é possível observar que quando θ_2 aumenta em relação a θ_l (de 0,5 para 1 θ_l), a expressão de ponto-fixo que correspondia à área cinza, passa a ser associada a expressão de regime oscilatório.

Figura 3.17: Espaço $(n \times \delta_2/\delta_1)$ com a determinação das regiões cujos parâmetros estão associados a expressão de atrator ponto-fixo. O diagrama foi construído mantendo-se fixo o subconjunto $\{k_d=1, k_p=1, \theta_l=0,4, \delta_l=0,8h \text{ e } n=5\}$.

Na figura 3.18, apresentamos o resultado da análise linear de estabilidade no espaço $(\delta_2/\delta_1 \times \theta_2/\theta_l)$, onde determinamos a região cujos parâmetros controlam a expressão de um atrator “ponto-fixo”. Para construção do diagrama foi mantido fixo o

subconjunto $\{k_d=1, k_p=1, \theta_l=0.4, \delta_l=0.8h \text{ e } n=5\}$. No diagrama da figura 3.18, nota-se que para que ocorra a modificação de regime estacionário, isto é, para que ocorra *bifurcação de Hopf* com um valor de n fixo, ao aumento de θ_2 em relação à θ_l deve-se associar o aumento do segundo tempo de retardo (δ_2) em relação ao primeiro (δ_l).

Figura 3.18: Espaço $(\delta_2/\delta_l \times \theta_2/\theta_l)$ com a determinação da região cujos parâmetros estão associados a expressão de atrator ponto-fixa. O diagrama foi construído mantendo-se fixo o subconjunto $\{k_d=1, k_p=1, \theta_l=0.4, \delta_l=0.8h \text{ e } n=5\}$.

A partir desses resultados avaliamos como os parâmetros de controle desse sistema influenciam as oscilações ciclo-limite simuladas. Para isso, averiguamos o período das oscilações através da combinação de 20 valores δ_2/δ_l sobre cada relação θ_2/θ_l ($\theta_l=0.4$). Os valores δ_2/δ_l foram definidos a partir da expressão:

$$\delta_2 = Ms \cdot \delta_l \quad [3.4]$$

sendo, Ms um elemento do conjunto $M=\{0,1; 0,2; 0,3; \dots; 1; 2; 3; \dots; 10\}$ e $\delta_l=0,8h$.

Na figura 3.19, apresentamos o diagrama onde associado a cada relação θ_2/θ_l (θ_l fixo e igual a 0,4) houve 20 simulações com diferentes pares δ_l e δ_2 , sendo δ_2 um múltiplo de δ_l como definido pela função [3.4]. Por exemplo, no diagrama lê-se que para $\theta_2/\theta_l=0,1$ todas as 20 oscilações simuladas com as combinações δ_l e δ_2 definidas acima tiveram o mesmo valor de $\tau = 25,6h$, enquanto que para $\theta_2/\theta_l=1,1$, as oscilações

simuladas tiveram uma gama variada de períodos que dependem da relação entre os tempos de retardo.

Períodos das oscilações geradas aplicando $\delta_2 = M_s \cdot \delta_1$, sendo M_s um elemento do conjunto $M = \{0, 1; 0, 2; 0, 3; \dots; 1; 2; 3; \dots; 10\}$ para cada relação θ_2/θ_1

Figura 3.19: Diagrama que expõe a cada relação θ_2/θ_1 , períodos de 20 oscilações simuladas com diferentes combinações δ_1 e δ_2 definidas pela relação $\delta_2 = M_s \cdot \delta_1$. Sendo M_s um elemento do conjunto $M = \{0, 1, 0, 2, 0, 3, \dots, 1, 2, 3, \dots, 10\}$ e $\delta_1 = 0,8h$.

Na figura 3.20, apresentamos o resultado da avaliação da influência de k_d sobre as oscilações simuladas pelo modelo mantendo-se constantes os parâmetros da tabela 2. No modelo com dois laços de retroalimentação, variações de k_d não proporcionam modificações significativas no período de oscilação, sua influência foi significativa nas alterações da amplitude de oscilação. No diagrama exposto na figura 3.20, a curva ajustada descreve que com o aumento de k_d a amplitude aumenta até um valor máximo e decresce logo a seguir.

Figura 3.20: Amplitude das oscilações simuladas pelo modelo com dois laços de retroalimentação em função do parâmetro k_d . Foram mantidos fixos os parâmetros $n=5$, $k_p=1$, $\theta_l=0,4$, $\theta_2=0,04$, $\delta_l=0,8h$ e $\delta_l=12h$.

A influência do parâmetro k_p sobre as oscilações simuladas proporcionaram alterações significativas somente na amplitude. Na figura 3.21, a curva ajustada no diagrama mostra que em função de k_p a amplitude aumenta até um máximo e decresce logo a seguir. Este diagrama foi construído mantendo-se fixo os valores de parâmetros da tabela 2.

Figura 3.21: Variação da Amplitude de oscilação em função do parâmetro k_p .
A amplitude aumenta com variações positivas de k_p . Diagrama construído mantendo-se constante $k_d=1$, $\theta_1=0,4$, $\theta_2=0,04$, $\delta_1=0,8h$, $\delta_2=12h$ e $n = 5$.

A seguir subtemos o sistema a um agente externo, conforme utilizando a equação abaixo:

$$\frac{dp(t)}{dt} = -k_d \cdot p(t) + k_p \cdot \left(\frac{\theta_1^n}{\theta_1^n + (p(t - \delta_1))^n} + \frac{\theta_2^n}{\theta_2^n + (p(t - \delta_2))^n} \right) + A_e \cdot [\text{sen}(2\pi \cdot f_e \cdot t) + 1] \quad [3.5],$$

sendo $f_e = \frac{pin}{T_e \cdot \text{salto}} \quad [3.6].$

Na condição de sistema forçado, com os valores de parâmetros presentes na tabela 2, avaliamos a ocorrência de sincronização, no espaço $(A_e - T_e)$ do agente externo. Na

figura 3.22, observa-se no espaço (A_e-T_e) a região de sincronização com a definição dos intervalos de sincronização em relação a amplitude de oscilação do agente externo. Por exemplo, lê-se no diagrama da figura 3.22 que para $A_e=0,05$ o agente externo sincroniza o sistema somente em 26h, que corresponde ao valor muito próximo à frequência fundamental do sistema $\frac{1}{25,6}h^{-1}$. Enquanto que $A_e=1$, o agente externo sincroniza o sistema no intervalo $[20; 30]h$.

Figura 3.21: Espaço (A_e-T_e) com a definição da região de sincronização para $A_e \in [0,015; 2]$. As curvas superior e inferior limitam o intervalo que o agente externo sincroniza o sistema

4. COMENTÁRIOS E DISCUSSÃO

Nossa proposta nesta dissertação foi de apresentar e avaliar um modelo do sistema de temporização biológica circadiana coordenado por duas alças de retroalimentação negativa com retardo. A motivação para elaboração deste modelo baseou-se em:

- i) resultados de pesquisas experimentais que permitem inferir a expressão de muitos dos ritmos circadianos observáveis como produto de um sistema de temporização interno (ASCHOFF, 1960; PITTENDRIGH, 1960); e
- ii) postulados que propõem alças de retroalimentação negativa como mecanismos de controle fundamentais do sistema de temporização circadiano (DUNLAP, 1999; GOODWIN, 1965).

Realizamos a apresentação em duas etapas, a primeira delas consistindo na abordagem de um modelo com laço unificado de retroalimentação (M.L.U.) e a segunda etapa por um modelo com laço duplo de retroalimentação (M.L.D.).

Ao compararmos os resultados da análise linear de estabilidade de ambas etapas em função do parâmetro n é possível notar a maior estabilidade e robustez do modelo do sistema de temporização com duas alças. Aqui, estabilidade é entendida como a insensibilidade do regime estacionário a variações dos parâmetros de controle e robustez como a relativa insensibilidade do período e amplitude de oscilação a variações dos parâmetros. Na figura 4.1, apresentamos os diagramas de bifurcação das eq. [3.1] e [3.3] onde observamos que a presença de duas alças de retroalimentação proporciona maior estabilidade do sistema, pois desloca a *bifurcação de Hopf* para um valor maior de n . Como as oscilações ciclo-limite originadas a partir de então têm menor amplitude no modelo com duas alças implica que o acréscimo da segunda alça de retroalimentação aumenta sua robustez.

Figura 4.1: Diagrama de bifurcação em função do parâmetro n . Em **A**, é identificado a *bifurcação de Hopf* da eq. [3.1] resultante do controle exercido por 1 laço de retroalimentação. Em **B**, há a identificação da *bifurcação de Hopf* da eq. [3.3], controlada por 2 laços de retroalimentação.

Ao avaliarmos a *bifurcação de Hopf* associada à modificação de atrator ponto-fixo para ciclo-limite no espaço $n \times \theta_2/\theta_1$ das figuras 3.15 e 3.16, observamos que as bifurcações ocorrem para menores valores de n , quando a relação $\theta_2/\theta_1 \cong 1$. Na figura abaixo, rerepresentamos o diagrama da figura 3.16, introduzindo a função $F_i(p-\delta_i)$ associada a três pontos de *bifurcação de Hopf*. Quando os limiares θ_i da $F_i(p-\delta_i)$ se distanciam, independente de corresponderem à primeira ou à segunda retroalimentação tendem a apresentar o mesmo cenário.

Figura 4.2: Reapresentação do espaço $n \times \theta_2/\theta_1$ da figura 3.16, com exemplos da função $f(p_\delta)$ para três pontos de bifurcação ($\theta_2/\theta_1=0,4$; $n=4,8$), ($\theta_2/\theta_1=1,0$; $n=3,5$), ($\theta_2/\theta_1=1,4$; $n=3,5$).

No diagrama da figura 3.19 é possível observar que no M.L.D., à medida que a relação θ_2/θ_1 aumenta, também aumenta a expressão de simulações de ciclos-limite com períodos variados em função das modificações da relação δ_2/δ_1 .

Ao avaliarmos as oscilações ciclo-limite simuladas sobre a influência da constante de degradação k_d verificamos a robustez do M.L.D., refletido na invariância da frequência de oscilação, enquanto que no M.L.U. observamos que os parâmetros oscilatórios como período e amplitude do sistema, foram mais sensíveis às variações de k_d (figuras 3.9 e 3.20).

O acréscimo de mais uma alça de retroalimentação não alterou significativamente o efeito modulador da constante de produção k_p , em ambos os casos proporcionou taxa de variação semelhante na amplitude de oscilação, como pode ser visto na figura 4.3.

Amplitude em função de k_p

Figura 4.3: Amplitude em função do parâmetro k_p . As curvas no diagrama apresentam taxas de variação semelhante, implicando que o acréscimo de mais uma alça no modelo não alterou a influência de k_p sobre a amplitude de oscilação.

A avaliação do modelo sob a influência de um forçador, que represente o acoplamento do conjunto dos sinais periódicos externos sobre o sistema de temporização (fig. 4.4), permitiu observar a insensibilidade do M.L.D. à sinalização externa com pequenas amplitudes $A_e \in [0,015; 0,05]$. Os resultados desta avaliação demonstram que a segunda alça de retroalimentação confere ao sistema, menor intervalo de sincronização.

Figura 4.4: Neste diagrama $A_e \times T_e$, nota-se que o M.D.A. apresenta menor intervalo de sincronização. O intervalo de sincronização limitado pelas linhas tracejadas (- - -) está relacionado à sincronização do M.L.U.. O intervalo limitado pelas linhas contínuas (—) está relacionado à sincronização do M.L.D..

Atualmente, um dos grandes desafios da pesquisa em cronobiologia é a identificação de estruturas ou de mecanismos que proporcionam robustez ao sistema de temporização biológica. A robustez do sistema é uma característica chave do sistema. Por exemplo, sistemas de temporização celulares devem estabelecer funções robustas tanto para tolerar alterações do ambiente interno devido à variabilidade da concentração de alguns componentes celulares, quanto para habilitar ajuste a mudanças externas (STELLING *et al.*, 2004). No entanto, à medida que entende-se robustez do sistema como propriedade emergente da participação de grande número de vias ou de componentes corre-se o risco de paradoxalmente adicionar potenciais efeitos deletérios a manutenção dessa propriedade (CSETE & DOYLE, 2002). Devido a este cenário, a demanda por explicações que definam as causas da robustez do sistema de temporização é crescente e a utilização de modelos matemáticos pode contribuir no processo investigativo.

O modelo proposto neste trabalho, consiste em instrumento teórico que explora o controle exercido por duas alças de retroalimentação inibitória como responsável pela robustez do sistema de temporização biológica.

Outros elementos chave são os tempos de retardo δ_1 e δ_2 , que exercem fundamental controle na expressão oscilatória circadiana. No modelo, os períodos de oscilação no intervalo circadiano são dependentes dos valores δ_1 e δ_2 , que correspondem ao tempo entre a expressão de estados do sistema e as retroalimentações que estes estados fornecem ao sistema.

Quando acoplamos um agente externo periódico em ambos modelos, foi observado menor intervalo de sincronização do agente externo sobre o M.L.D., correspondendo ao aumento de rigidez proporcionado pelo acréscimo da segunda alça de retroalimentação no modelo.

Segundo evidências apresentadas por Dunlap (1999) e King & Takahashi (2000), entre outros, características como autonomia e persistência da expressão circadiana de proteínas PER em células dos NSQs são decorrentes de um sistema de temporização robusto a perturbações do meio interno. Inspirados nestas evidências experimentais, o M.L.D. foi elaborado de modo a proporcionar simulações que possam ser interpretadas em termos moleculares. Neste cenário, sem a influência de um agente externo, a expressão e a degradação de proteínas são controladas por duas alças retro-inibitórias atrasadas, onde há um número reduzido de parâmetros correspondentes a fases e vias fundamentais para a expressão do sistema. A maior robustez e estabilidade deste modelo diante de perturbações dos parâmetros de controle, quando comparamos com o M.L.U., sugerem que o M.L.D. proporciona simulações com características mais realistas.

Como em nosso modelo o agente externo representa o conjunto dos sinais ambientais oscilatórios que chegam à entrada do sistema, a maior rigidez à sincronização de um agente externo apresentado pelo M.L.D. em relação ao M.L.U., representa o efeito global do sistema diante do sinal externo. Esses resultados contêm sugestiva semelhança aos resultados de experimentos feitos por Takahashi *et al.* (1984) e Nelson & Takahashi (1991) que observaram a diferença na sincronização do sistema com a modificação da intensidade do sinal externo em uma mesma fase do “dia circadiano”.

Outra inspiração deste trabalho é a aplicação do M.L.D. na modelagem do sistema de temporização circadiano comportamental em situações que demandam a compreensão dos mecanismos subjacentes a expressão do sistema. Por exemplo, Nakao *et al.* (2001) propuseram um modelo do sistema de temporização, construído pelo acoplamento de

várias equações diferenciais, a partir do qual há a representação de um sistema controlado pela retroalimentação do ciclo vigília/sono sobre sua própria expressão. Sob esta mesma conjectura, os resultados obtidos por nosso modelo sugerem a possibilidade de também obtermos simulações com interpretações comportamentais relativas ao ciclo vigília/sono, com a utilização de uma única equação diferencial e um número reduzido de parâmetros.

Portanto, acreditamos que a disponibilização deste modelo pode contribuir no processo investigativo da expressão rítmica circadiana, bem como dos mecanismos subjacentes a sua síntese.

5. ANEXO 1

Método de Integração Numérica de Gear

A solução de equações diferenciais da classe de fórmulas denominadas por *Multi-Step Backward Differentiation Formulas* (FORSYTHE *et al.*, 1977) é obtida pelo Método de Gear (GEAR, 1977).

Ao tomarmos um mapa de fases descrito pela seguinte equação diferencial:

$$\frac{dx}{dt} = f(x(t), t) \quad [\text{A.1}]$$

Sua solução numérica pode ser obtida, considerando uma seqüência discreta reversa no tempo da variável independente t , isto é: $t_0 = -h$, $t_1 = -h$, $t_2 = -2h$, ..., $t_n = -nh$. Onde h corresponde ao passo de integração numérica.

Portanto, em cada instante t_n , a solução pode ser aproximada por um polinômio de grau n , ou seja

$$x_n = a_0 + a_1 t_n + \dots + a_{n-1} (t_n)^{n-1} + a_n (t_n)^n \quad [\text{A.2}]$$

Onde $a_0, a_1, \dots, a_n$ são coeficientes do polinômio.

Substituindo os valores de t_i pelo número correspondente de unidades de passo h temos:

$$x_0 = a_0.$$

$$x_1 = a_0 - ha_1 + h^2 a_2 - \dots + (-h)^n a_n.$$

$$x_2 = a_0 - 2ha_1 + 4h^2 a_2 - \dots + (-2h)^n a_n.$$

.

.

.

$$x_n = a_0 - nha_1 + n^2 h^2 a_2 - \dots + (-nh)^n a_n \quad [\text{A.3}]$$

Escrevendo o sistema acima na forma matricial teremos:

$$\begin{pmatrix} x_0 \\ x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ \vdots \\ \vdots \\ x_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & \cdot & \cdot & \cdot & 0 \\ 1 & -1 & 1 & \cdot & \cdot & \cdot & (-1)^n \\ 1 & -2 & 4 & \cdot & \cdot & \cdot & (-2)^n \\ & & & \cdot & & & \\ & & & \cdot & & & \\ & & & \cdot & & & \\ 1 & -n & n^2 & \cdot & \cdot & \cdot & (-n)^n \end{pmatrix} \bullet \begin{pmatrix} 1 \\ h \\ h^2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ h^n \end{pmatrix} \bullet \begin{pmatrix} a_0 \\ a_1 \\ a_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ a_n \end{pmatrix} \quad [\text{A.4}]$$

A derivada genérica $\frac{dx_n}{dt}$ é dada por:

$$\frac{dx_n}{dt} = 0 + a_1 + \dots + (n-1)a_{n-1}(t_n)^{n-2} + na_n(t_n)^n \quad [\text{A.5}]$$

e na forma matricial pode ser escrito como:

$$\frac{hdx_0}{dt} = [010\dots 0] \bullet \begin{pmatrix} 1 \\ h \\ h^2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ h^n \end{pmatrix} \bullet \begin{pmatrix} a_0 \\ a_1 \\ a_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ a_n \end{pmatrix} \quad [\text{A.6}]$$

combinando o sistema [A.4] e o sistema formado pela derivada genérica $\frac{dx_n}{dt}$, [A.6], obtemos a

fórmula matricial de Gear.

$$\begin{pmatrix} x_0 & 1 & 0 & 0 & . & . & . & 0 \\ x_1 & 1 & -1 & 1 & . & . & . & (-1)^n \\ x_2 & 1 & -2 & 4 & . & . & . & (-2)^n \\ & & & . & & & & \\ & & & . & & & & \\ & & & . & & & & \\ x_n & 1 & -n & n^2 & . & . & . & (-n)^n \\ hx'_0 & 0 & 1 & 0 & . & . & . & 0 \end{pmatrix} \bullet \begin{pmatrix} 1 & & & & & & & \\ & 1 & & & & & & \\ & & h & & & & & \\ & & & h^2 & & & & \\ & & & & . & & & \\ & & & & & . & & \\ & & & & & & . & \\ & & & & & & & h^n \end{pmatrix} \bullet \begin{pmatrix} -1 \\ a_0 \\ a_1 \\ a_2 \\ . \\ . \\ . \\ a_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ . \\ . \\ . \\ 0 \end{pmatrix} \quad [\text{A.7}]$$

Para $n = 3$ (*three-step Gear*), a expressão recursiva para integração numérica é obtida resolvendo-se:

$$\det \begin{pmatrix} x_0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ x_1 & 1 & -1 & 1 & -1 \\ x_2 & 1 & -2 & 4 & -8 \\ x_3 & 1 & -3 & 9 & -27 \\ hx'_0 & 0 & 1 & 0 & 0 \end{pmatrix} = 12x'_0 - 22x_0 + 36x_1 - 18x_2 + 4x_3 = 0 \quad [\text{A.8}]$$

Isolando o valor de x_0 na equação acima e reescrevendo a expressão em termos de valores genéricos (x_i) obtemos finalmente:

$$x_{i+1} = \frac{1}{11}(18x_i + 9x_{i-1} + 2x_{i-2}) + \frac{6h}{11}x'_{i+1}$$

[A. 9]

que é a fórmula de integração numérica utilizada neste projeto.

Para resolver as equação diferencial [3.1] o tempo foi discretizado com o uso de um passo h . Esse passo é escolhido de tal forma que os retardos τ_i serão dados por um número inteiro de unidades de passos h , denotado por d_i .

Sendo assim, a condição inicial deve ser definida no intervalo discreto: $-\max(d_i) \leq k \leq 0$. Se escrevermos $x_k = x(hk)$ e representarmos a função sigmoïdal como $S_k = S(x_k)$, obtemos, substituindo a equação [3.1], na equação [A.9], a expressão [A.10], a qual corresponde à expressão recursiva para integração numérica da equação.

$$x_{i+1} = \frac{1}{11+6h} (18x - 9x_{i-1} + 2x_{i-2}) + \frac{6h}{11+6h} \left[\frac{1}{2} (S_1 + S_2) \right] \quad [\text{A.10}]$$

$$\text{onde } S_{j=1,2} = \frac{\theta_j^n}{\theta_j^n + [p_j(t - \tau_j)]^n} \quad [\text{A.11}]$$

6.REFERÊNCIAS:

ASCHOFF, J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In: **Cold Spring Harbor Symposia on Quantative Biology** : Biological Clocks. New York, Cold Spring Harbor, 1960. v. 25., p. 20.

BAKER C.T.H., BOCHAROV G.H.; RIHAN F.A. **A report on the use of delay differential equations in numerical modelling in the biosciences**. UK, 1999. (Numerical analysis Report, University of Manchester, v. 343).

BASTOS DE FIGUEIREDO, J.C. Estudo das Soluções. In: **Equações diferenciais não-lineares com três retardos: estudo detalhado de soluções**. São Paulo, Universidade de São Paulo. 2000. Cap. 4. p.56.

BASTOS DE FIGUEIREDO, J.C.; DIAMBRA, L.; GLASS, L.; MALTA, C.P. Chaos in two-loop negative feedback systems. **Physical Review E**, v. 65, n.2, 2002.

BENEDITO-SILVA, A.A. A Modelagem dos ritmos biológicos. In: MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. (org). In: **Cronobiologia: princípios e aplicações**. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, 1997. p.97-110.

BRAZ, M., LOPES, J.R., MENNA-BARRETO, L. et al. Longitudinal study of the sleep/wake cycle of identical twins along the first six months of life. In: **LATIN-AMERICAN SYMPOSIUM ON CHRONOBIOLOGY**, 7., Tlaxcala, Mexico, 2003. **Program & Abstracts**. Tlaxcala, Universidad Autónoma de Tlaxcala, 2003. Resumo 70.

CARSON, E. ; COBELLI, C. An introduction to modelling methodology. In: **Modelling methodology for physiology and medicine**. New York, Academic Press, 2001. Cap. 1, p.4.

CAVALCANTI, S.; BERLARDINELLI, E. Modeling of cardiovascular variability using a differential delay equation. **IEEE Transactions on Bio-medical Engineering**, v. 43, n.10, p.982-989, 1996.

CSETE, M.E. & DOYLE, J.C. **Reverse engineering of biological complexity**. Science. 2002 Mar 1;295(5560):1664-9.

COOLEY, J.W.; TUKEY, J.W. An algorithm for the machine calculation of complex fourier series. **Mathematics of Computation**, v.19, p.297-301, 1965.

DIAMBRA, L.; LOPES, J. R.; MENNA-BARRETO, L.; RIGOLINO, R. Ciclograma a tool for the analysis of ultradian components in polyphasic sleep. **Chronobiology International**, v.19, n.4, p. 793-803, 2002.

DIAMBRA, L.; MENNA-BARRETO, L. Infradian rhythmicity in sleep/wake ratio in developing infants. **Chronobiology International**, v. 21, n.2, p. 217-227, 2004.

DUNLAP, J.C. **Molecular bases for circadian clocks**. Cell. Vol.96. pag. 271-290. 1999.

ENRIGHT, J.T. Temporal precision in circadian systems: a reliable neuronal clock from unreliable components? **Science**, v.209, n.4464, p.1542-5, 1980.

FERRARA, N.F.; PRADO, C.P.C. Estabilidade linear e não-linear. In: **Caos uma Introdução**. São Paulo, Edgard Blücher, 1994. p.51.

FERRARI, G.; KOZARSKI, M.; De LAZZARI, C.; GORCZYNSKA, K.; MIMMO, R.; GUARAGNO, M.; TOSTI, G.; DAROWSKI, M. Modelling of cardiovascular system: development of a hybrid (numerical-physical) model. **The International Journal of Artificial Organs**, v.26, n.12, p.1104-14, 2003.

FROELICH, A.C.; PREGUEIRO, A.; LEE, K.; DENAULT, D.; COLOT, H.; NOWROUSIAN, M.; LOROS, J.J.; DUNLAP, J.C. The molecular workings of the neurospora biological clock. **Novartis Foundation Symposium**, v.253, p.184-98; Discussion 102-9, 198-202, 281-4, 2003.

GLASS, L.; MALTA, C.P. Chaos in multi-looped negative feedback systems. **Journal of Theoretical Biology**, v.145, n.2, p.217-23.1990.

GOLDBETER, A. Computational approaches to cellular rhythms. **Nature**, v.420, n.6912, p.238-45, 2002.

GOLOMBEK, D.; CARDINALI, D.; AGUILAR-ROBLERO, R. Mecanismos de temporização em vertebrados. In: MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. (orgs.) **Cronobiologia: princípios e aplicações**. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, 1997. p.137-162.

GOODWIN, B.C. Oscillatory behavior in enzymatic control processes. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 3, p.425-438, 1965.

GUCKENHEIMER, J.; HOLMES, P. Local bifurcations. In: **Nonlinear oscillations, dynamical systems and bifurcations of vector fields**. New York, Springer-Verlag, 1983. (Applied Mathematical Sciences, v.42). Cap. 3 . p.117-165.

HALBERG, F. Chronobiology: methodological problems. **Acta Medica Romana**, v.18, p.399-440.1980.

HALE, J.K. ; LUNEL, S.M.V. **Introduction to functional differential equations**. New York , Springer-Verlag, 1993. (Applied Mathematical Sciences, v. 99). 447p.

HERZOG, E.D., TAKAHASHI, J.S., BLOCK, G.D. Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. **Nature Neuroscience**, v.1, p.708–713. 1998.

KING, D.P., TAKAHASHI, J.S. **Molecular genetics of circadian rhythms in mammals**. Annu. Rev. Neurosci. 2000; 23:713-42.

KLOTTER, K. Theoretical analysis of some biological models. In: **Cold Spring Harbor Symposia on Quantative Biology**: Biological Clocks. New York, Cold Spring Harbor, 1960. v. 25., p. 189.

KRONAUER, R.E.; CZEISLER, C.A.; PILATO, S.F.; MOORE-EDE, M.C.; WEITZMAN, E.D. Mathematical model of the human circadian system with two interacting oscillators. **American Journal of Physiology**. Regulatory Integrative and Comparative Physiology, v. 242, p. R3-R17, 1982.

KUANG, Y. **Delay differential equations with applications in population dynamics**. Boston, Academic Press, 1993. (Mathematics in Science and Engineering, v.191).

LEMA, M.A.; GOLOMBEK, D.A.; ECHAVE, J. Delay model of the circadian pacemaker. **Journal of Theoretical Biology**, v.204, p.564-573, 2000.

LIAO, B., PASCHAL, B. M., LUBY-PHELPS K. Mechanism of Ca^{2+} -dependent nuclear accumulation of calmodulin. **Cell Biology**, v. 96, n.11, p.6217-6222, 1999.

LIU, Y.; HEINTZEN, C.; LOROS, J.; DUNLAP, J.C. Regulation of clock genes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.55, n.10, p.1195-205, 1999.

MACKEY, M.C.; GLASS, L. Oscillation and chaos in physiological control systems. **Science**, v.197, p.287-287, 1977.

MEES, A.I., RAPP, P.E., Periodic metabolic systems: oscillations in multiple-loop negative feedback biochemical control networks. **Journal of Mathematical Biology**, v.5, p.99-114, 1978.

MILTON, J.G.; LONGTIN A. Evaluation of pupil constriction and dilation from cycling measurements. **Vision Research**, v.30, n.4, p.515-25, 1990.

MOGA, M.M.; MOORE, R. Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v.389, p.508–534, 1997.

MOORE, R.Y.; SPEH, J.C.; LEAK, R.K. Suprachiasmatic nucleus organization. **Cell and Tissue Research**, v. 309, p.89–98, 2002.

MORETIN, P.A. Análise de fourier clássica. In: MORETTIN, P. A. **Ondas e Ondaletas: da análise de Fourier à análise de ondaletas**. São Paulo, EDUSP. 1999. p.31-39.

MROSOVSKY, N. Masking: history, definitions, and measurement. **Chronobiology International**, v.16, n.4, p. 415-429, 1999.

MUKHOPADHYAY, A.; CHATTOPADHYAY, J.; TAPASWI, P.K. A delay differential equations model of plankton allelopathy. **Mathematical Biosciences**, v.149, n.2, p.167-189,1998.

NAKAO, M., YAMAMOTO K., NAKAMURA, K., KATAYAMA, N., YAMAMOTO, M. **A circadian system model with feedback of cross-correlation between sleep-wake rhythm and oscillator.** *Psychiatry Clin Neurosci.* 2001Jun;55(3):295-7.

NELSON, D.E., TAKAHASHI, J.S. **Sensitivity and integration in a visual pathway for circadian entrainment in the hamster (*Mesocricetus auratus*).** *J. Physiol. (Lond).* 1991; 439:115– 45.

OĞUZTÖRELLI,M.N., STEIN, R.B., The effects of multiple reflex pathways on the oscillations in neuro-muscular systems. **Journal of Mathematical Biology**, v.3, p.87-101, 1976.

OKAMURA, H.; YAMAGUCHI, S.; YAGITA, K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. **Cell and Tissue Research**, v. 309, n.1, p.47-56. 2002.

OLIVEIRA, J.C.F. Hopf bifurcation for functional differential equations. **Nonlinear Analysis**, v.4, n.2, p.217-229. 1980.

OTT, E. **Chaos in dynamical systems.** New York, Cambridge University. 2000. 385p.

PACKARD, N.H.; CRUTCHFIELD, J.P.; FARMER, J.D.; SHAW R.S. Geometry from a time series. **Physical Review Letter**, v. 45, p.712-716,1980.

PAVLIDIS, T. Evidence of a circadian rhythm in nucleolar components of rat superior cervical ganglion neurons with particular reference to the fibrillar centers: an ultra structural and stereo logical analysis. **Journal of Ultrastructure Research**, v.77, p.83-92, 1981.

PITTENDRIGH, C.S.. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 25, p.159-184. 1960.

PRESS, W.H.; FLANNERY, B.P.; TEUKOLSKY, S.A.; VETTERLING, W.T. ROOT Finding and nonlinear sets of equations. In: **Numerical recipes: the art of scientific computing.** New York, Cambridge University, 1986. Cap.9 ,p. 254.

PRESS, W.H.; FLANNERY, B.P.; TEUKOLSKY, S.A.; VETTERLING, W.T. Integration of Ordinary differential equations. In: **Numerical recipes: the art of scientific computing.** New York, Cambridge University, 1986. Cap.15, p. 547.

RENSING, L.; MEYER-GRAHLE, U.; RUOFF, P. Biological timing and the clock metaphor: oscillatory and hourglass mechanisms. **Chronobiology International**, v.18, n.3, p.329-69, 2001.

ROTEMBERG, L.; MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. Desenvolvimento da cronobiologia. In: MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. (orgs.) In: **Cronobiologia: princípios e aplicações**. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, 1997. p.23-44.

RUELLE, D.; TAKENS, F. On the nature of turbulence. **Communication on Mathematical Physics**, v. 20, p.167-192, 1971. (addendum 21, p.21).

RUELLE, D.; TAKENS, F. On the nature of turbulence. **Communication on Mathematical Physics**, v. 23, p.343-344, 1971.

SCHEPER, T.O.; KLINKENBERG, D.; PENNARTZ, C. ; PELT, J.V. A Mathematical model for the intracellular circadian rhythm generator. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n.1, p.40-47, 1999.

SEL'KOV, E.E. A unifying theory of the cell mechanisms. **Chronobiologia**, v.6, p.155, 1979.

STELLING, J., SAUER, U., SZALLASI, Z., DOYLE, F.J. 3rd., DOYLE, J. **Robustness of cellular functions**. Cell. 2004 Sep 17;118(6):675-85.

TAKAHASHI, J.S., DeCOURSEY, P.J., BAUMAN, L., MENAKER, M. **Spectral sensitivity of a novel photoreceptive system mediating entrainment of mammalian circadian rhythms**. Nature. 1984; 308:186-88.

TAKENS, F. Detecting strange attractors in turbulence. In: RAND, D.; YOUNG, L. **Dynamical systems and turbulence**. Berlin, Springer-Verlag, 1980. (Lecture notes in mathematics, v. 898). p. 366–381.

WATTS, A.G.; SWANSON, L.W.; SANCHEZ-WATTS, G. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. studies using anterograde transport of phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. **The Journal of Comparative Neurology** , v. 258, n.2, p.204-229, 1987.

WATTS, A.G.; SWANSON, L.W. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide Immunohistochemistry in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 258, n.2, p.230-252, 1987.

WEISS, J.N.; QU, Z.; GARFINKEL, A. Understanding biological complexity: lessons from the past. **FASEB Journal**, v.17, n.1, p.1-6, 2003.

WEVER, R.A. Toward a mathematical model of circadian rhythmicity. In: MOORE-EDE, M.C.; CZEISLER, C.A. (eds.) **Mathematical models for the circadian sleep/wake cycle** . New York, Raven Press Books. 1984. Cap. 2. p.17.

WINFREE, A.T. **The timing of biological clocks**. New York, Scientific American Library. 1987. 199p.

ZAKS, M.A.; NEIMAN, A.B.; FEISTEL, S.; SCHIMANSKY-GEIER, L. Noise-controlled oscillations and their bifurcations in coupled phase oscillators. **Physical Review E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, v. 68, n.6 pt 2, p.066206, 2003.