

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

NAIRA REZENDE MACIEL

**Estudos dos tempos de incubação de doenças priônicas utilizando o método
Monte Carlo Dinâmico**

Ribeirão Preto

2008

NAIRA REZENDE MACIEL

**Estudos dos tempos de incubação de doenças priônicas utilizando o método
Monte Carlo Dinâmico**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Física Biológica.
Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Alves da Silva

Ribeirão Preto

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Maciel, Naira Rezende.

Estudos dos tempos de incubação de doenças priônicas utilizando o método Monte Carlo Dinâmico / Naira Rezende Maciel; orientador Marco Antonio Alves da Silva – Ribeirão Preto, 2008.

106 p.; il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Física Biológica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

1. Príons. 2. Reações auto-catalíticas. 3. Monte Carlo Dinâmico. 4. Modelo Difusão Limitada à Agregação (DLA). 5. vCJD. 6. BSE. 7. *Scrapie* murina. 8. Distribuição lognormal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Naira Rezende Maciel

Estudos dos tempos de incubação de doenças priônicas utilizando o método Monte Carlo Dinâmico

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Física Biológica.

Aprovado em: ____ / ____ / _____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu Pai Dário e minha Mãe Madalena, autores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por todas as graças concedidas.

Ao CNPQ, pela bolsa concedida no período de Agosto de 2006 a Agosto de 2007 (Processo 134552/2006-7) e à FAPESP pela bolsa concedida no período de Setembro de 2007 a Julho de 2008 (Processo 2006/05866-2) e pelo auxílio financeiro (Processo 2007/04220-4), sem os quais, esse trabalho não poderia ser realizado.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Alves da Silva, pela orientação, confiança no meu trabalho e importantes discussões.

Ao Prof. Dr. Domingos Alves pelas sugestões tão importantes dadas por ocasião do Exame de Qualificação do presente trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Ana Isabel de Assis Pandochi pela oportunidade de realizar o Estágio PAE na disciplina de Bioquímica I, Prof^a. Dr^a. Ivone Carvalho e Prof. Dr. Carlos Tomich de P. da Silva pela oportunidade de realizar o Estágio PAE na disciplina de Química Farmacêutica Medicinal.

Ao Mestre Carlo José Freire de Oliveira, à Dr^a. Claudia da Silva Bitencourt, à Mestre Dayana Maria Teodoro Francino e à Mestre Viviane Oliveira Soares pelas correções e discussões sobre a pré-forma da dissertação.

Aos Professores e colegas de laboratório, pelo bom ambiente de trabalho, discussões e convivência.

À Universidade de São Paulo pela oportunidade de cursar o mestrado, pela moradia estudantil, assistência médica e toda a infra-estrutura.

A todos os amigos da Casa 13, pela convivência e amizade, em especial: Zé Wilson, Lourdes, Mirko, Camila, Paula, Lucas, Priscila, Claudia, Luciana e Leandro.

Aos amigos que fiz em Ribeirão Preto, em especial: Mato, Paty, Camis, Clau, Rose.

Aos amigos antigos, em especial: Júlio, Viviane, Paty, Day, Farliany, Karis.

A toda a minha família, em especial meu pai e minha mãe, tios e tias, principalmente minha madrinha Tia Rosa, primos e primas, irmãos, que compreenderam a minha ausência durante esse período de dois anos e me deram apoio incondicional.

Ao meu namorado Carlo pela presença, incentivo e paciência constantes.

RESUMO

Maciel, N. R. **Estudos dos tempos de incubação de doenças priônicas utilizando o método Monte Carlo Dinâmico**. 2008. 106f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Príons são patógenos infecciosos que causam um grupo de doenças neurodegenerativas fatais. A proteína normal, PrP celular, denominada PrP^C, é convertida em PrP^{Sc}, isoforma anormal e patogênica de PrP, através de um processo no qual uma porção de α -hélice da estrutura é reenovelada em folhas β . A conversão de PrP^C em PrP^{Sc} ocorre por um mecanismo auto-catalítico. Para um melhor entendimento do mecanismo de propagação dos príons, têm sido propostos vários modelos matemáticos. Nesse trabalho, estudamos o tempo de incubação de algumas doenças causadas por príons: Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), ou mal da vaca louca; doença variante de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), que afeta humanos, através da exposição ao agente de BSE; e Scrapie murina, uma infecção priônica experimental em camundongos. A distribuição de probabilidades da duração do período de incubação foi suposta ser lognormal, modelo este extensamente aceito em doenças infecciosas. Os objetivos desse trabalho foram esclarecer aspectos obscuros sobre a cinética de replicação priônica e o mecanismo de toxicidade das doenças priônicas, através de comparação dos resultados de simulações computacionais com os perfis de distribuição de tempos de incubação de BSE, vCJD e Scrapie murina. Foram realizadas simulações computacionais, utilizando o Método Monte Carlo Dinâmico (MCD) e o modelo Difusão Limitada à Agregação. Primeiramente, estudamos o modelo de Eigen (1996), através de simulações computacionais usando o MCD, para verificar quais termos são importantes para a cinética priônica. De posse desse resultado, partimos então para o estudo sobre a toxicidade das doenças priônicas, usando o modelo DLA e o método MCD: considerando que PrP^C se converte em PrP^{Sc} quando existe contato (auto-catalise); e PrP^Cs são livres e podem se movimentar por uma rede, enquanto PrP^{Sc}s, ou agregados de PrP^{Sc}s são fixos. Confirmamos a suspeita de Eigen de que o termo mais importante nas equações de cinética priônica é o termo de Michaelis-Menten, ou termo auto-catalítico. Os resultados obtidos através das simulações MCD e modelo DLA foram comparados com os perfis de distribuições de tempos dessas doenças (BSE, vCJD e Scrapie murina). Conseguimos o ajuste de diferentes perfis de distribuição de tempos de incubação para algumas doenças priônicas, lognormal para BSE e vCJD, e lognormal com segundo pico para Scrapie murina. A auto-catalise é o mecanismo mais importante na cinética priônica, a conversão espontânea de PrP^C em PrP^{Sc} pode ser negligenciada. A partir do modelo DLA, fica reforçada a hipótese de que para BSE e vCJD, doenças priônicas de ocorrência natural, a toxicidade é causada, principalmente, pela formação das placas amilóides. Para Scrapie murina, uma infecção experimentalmente induzida, a toxicidade é, possivelmente, causada por dois mecanismos: formação das placas amilóides e depleção de PrP^C. Apenas com a mudança dos parâmetros iniciais e finais, conseguimos ajustar as distribuições de tempos de incubação das três doenças priônicas estudadas, apesar de o modelo ser bastante simples. A lognormalidade, de acordo com o modelo, é resultado do processo difusivo. As concentrações de PrP^C devem ser baixas, menores que 1% e o número de PrP^{Sc}s deve ser menor que 10 para que a lognormalidade ocorra sem a depleção de PrP^C.

Palavras-chave: Príons; Reações auto-catalíticas; Monte Carlo Dinâmico; Modelo Difusão Limitada à Agregação (DLA); vCJD; BSE; Scrapie murina, distribuição lognormal.

ABSTRACT

Maciel, N. R. **Studies of the Incubation Times of Prionic Diseases by Dynamical Monte Carlo Method**. 2008. 106f. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Prions are infectious agents responsible for a group of fatal neurodegenerative disorders. A pathogenic isoform of the prion protein (PrP^{Sc}) generated by a posttranslational process involving the conversion of alpha-helices into beta-sheets of the normal cellular prion protein (PrP^{C}) is believed to be the main component of these infectious agents. The conversion of a normal PrP^{C} into an abnormal isoform PrP^{Sc} , kinetically follows through an autocatalytic process. For better understanding of this kind of abnormal protein propagation, many analytical models have been proposed. Thus, we studied, using the Monte Carlo method, the distribution of the incubation periods in some of these neurodegenerative disorders, such as: bovine spongiform encephalopathy well-known as mad-cow disease (BSE), Variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) and murine scrapie, an experimental murine prionic disease. The distribution of the incubation times of these diseases were considered lognormal. The aim of this study was to investigate some aspects of toxicity and replication of the prionic diseases, by comparing the results of computational simulations with the incubation times of BSE, vCJD and murine scrapie, previously established. Computational simulations, using a Dynamical Monte Carlo method (DMC) and the diffusion-limited aggregation model (DLA), were worked out. At first, we evaluate the Eigen model through computational simulations using the DMC to verify the essential parameters in the kinetic of the prionic diseases. Following the results, we studied the toxicity of the prionic diseases using the DMC and the DLA model; by considering that PrP^{C} converting in PrP^{Sc} just when exists contact (autocatalysis) and free PrP^{C} s are allowed to diffuse randomly to their nearest neighbour sites in a square lattice, while isolated PrP^{Sc} s or aggregate of PrP^{Sc} s are fixed. Confirming the Eigen suspicion, the most important parameter in the equation of the prionic kinetic is the Michaelis-Menten term (or the autocatalytic term). The results obtained through simulations using DMC and DLA model were compared with the time distribution profiles of the prionic diseases already established (BSE, vCJD and murine Scrapie). We get the fitting in different profiles of the distribution of the incubation periods (lognormal to BSE and vCJD and lognormal with a second peak to murine scrapie). It is concluded that autocatalysis is an essential mechanism for the prionic kinetics and the spontaneous conversion of PrP^{C} in PrP^{Sc} can be neglected. Starting from the DLA model, is reinforced that the hypothesis for BSE and vCJD, prionic diseases of natural occurrence, the toxicity is caused, mainly, by the formation of amyloid plaques. For Scrapie murina, an experimentally induced infection, the toxicity is, possibly, caused by two mechanisms: formation of amyloid plaques and depletion of PrP^{C} . Just with the change of the initial and final parameters, we fitted all studied prionic diseases, in spite of the model to be quite simple. The lognormality from the model, is resulting of a diffusive process. Concentrations of PrP^{C} should be low, smaller than 1% and the number of PrP^{Sc} s should be smaller than 10 for the lognormality take place without the depletion of PrP^{C} .

Keywords: Prions; Autocatalytic reactions; Dynamical Monte Carlo; Diffusion Limited Aggregation model (DLA); vCJD; BSE; murine scrapie; lognormal distribution.

Lista de Figuras

Figura 1.1	Estruturas terciárias das isoformas da proteína príon.	2
Figura 1.2	Modelo conformacional de Prusiner para replicação de príons.	7
Figura 1.3	Mecanismo de Prusiner modificado por Eigen para reações priônicas.	8
Figura 1.4	Exemplos de diferentes tipos de vizinhanças em uma rede quadrada.	15
Figura 1.5	Condição periódica de contorno.	15
Figura 3.1	Movimentação de PrP^{C} na rede usando o modelo DLA.	23
Figura 4.1	Termo auto-catalítico da equação de Eigen resolvido por método analítico, Runge-Kutta e MCD. Evolução da concentração relativa de PrP^{Sc} em relação ao tempo.	37
Figura 4.2	Distribuição dos tempos de incubação de TSEs utilizando apenas o termo auto-catalítico das equações de Eigen.	38
Figura 4.3	Distribuição dos tempos de incubação observados de vCJD – <i>fitting</i> lognormal.	40
Figura 4.4	Distribuição dos tempos de incubação experimentais de <i>Scrapie</i> murina.	41
Figura 4.5	Representação esquemática de um fractal obtido através do modelo DLA.	42
Figura 4.6	Comparação entre os modelos DLA e de Ferreira, da Silva e Cressoni (2003): configuração final de uma matriz.	43
Figura 4.7	Simulações que se ajustaram aos tempos de incubação de BSE (Modelo DLA).	45
Figura 4.8	Comparação dos tempos de incubação de BSE, pelos modelos DLA e de Ferreira, da Silva e Cressoni (2003).	46
Figura 4.9	Simulações que se ajustaram aos tempos de incubação de vCJD (Modelo DLA).	47
Figura 4.10	Logaritmo neperiano do tempo médio absoluto <i>versus</i> logaritmo neperiano do tamanho da rede, para BSE e vCJD.	49
Figura 4.11	Formação de PrP^{Sc} em relação ao tempo: perda da cooperatividade com a diminuição da probabilidade de conversão de PrP^{C} em PrP^{Sc} .	51

Figura 4.12	Comparação entre as distribuições de tempos de incubação simulados pela hipótese da depleção de PrP ^C e os tempos de incubação observados.	54
Figura 4.13	Simulação que se ajustou aos tempos de incubação de <i>Scrapie</i> murina (Modelo DLA).	56
Figura A.1	Evolução temporal do preenchimento de uma matriz 3 x 3 para os geradores de números aleatórios (Fortran, Laboratório, Mersenne Twister, Precisão Dupla, Precisão Simples e Ruim). O tempo considerado é de 0 (zero) até $3,15 \times 10^9$ números aleatórios gerados (esse valor foi escolhido arbitrariamente).	85
Figura A.2	Evolução temporal do preenchimento de uma matriz 3 x 3 para os geradores de números aleatórios (Fortran, Laboratório, Mersenne Twister, Precisão Dupla, Precisão Simples e Ruim). O tempo considerado é de 0 (zero) até $6,43 \times 10^{10}$ números aleatórios gerados (quantidade de números aleatórios usados nas simulações).	89
Figura A.3	Pesos previamente definidos para uma matriz 3x3.	91
Figura A.4	Um vetor hipotético gerado a partir do sorteio de 18 pares de números aleatórios.	92
Figura C.1	<i>Loop</i> da resolução analítica da equação (3).	98
Figura C.2	Fluxograma da resolução por Runge-Kutta da equação (3).	99
Figura C.3	Fluxograma da resolução por MCD da equação (3).	100
Figura C.4	Fluxograma da resolução por MCD da equação (3), utilizando k_{TS} lognormalmente distribuídos.	101
Figura C.5	Fluxograma da resolução por MCD da equação (2) de Eigen, utilizando k_{TS} lognormalmente distribuídos e valores de k_{AB} , k_{BA} e k_{-B} tabelados.	102
Figura C.6	Fluxograma do Programa 3.5.3, modelo Difusão Limitada a Agregação (DLA), utilizando o método Monte Carlo (MC) e Autômata Celular (AC) para a hipótese de amilóide.	103
Figura C.7	Fluxograma do Programa 3.5.5, modelo Difusão Limitada a Agregação (DLA), utilizando o método Monte Carlo (MC) e Autômata Celular (AC) para a hipótese de depleção de PrP ^C .	104
Figura C.8	Fluxograma do Programa 3.5.3 mostrando uma particularidade de encerramento da realização, modelo Difusão Limitada a Agregação (DLA), utilizando o método Monte Carlo (MC) e Autômata Celular (AC) para a hipótese de amilóide atuando em conjunto com depleção de PrP ^C .	105

Lista de Tabelas

Tabela 1.1	Classificação das doenças humanas priônicas.	4
Tabela 1.2	Algumas doenças priônicas conhecidas em animais.	5
Tabela 1.3	Constantes envolvidas na reação auto-catalítica de $\text{PrP}^{\text{C}} + \text{PrP}^{\text{Sc}} \rightarrow 2\text{PrP}^{\text{Sc}}$.	9
Tabela 3.1	Conjuntos de valores de k_{AB} , k_{BA} e k_{-B} testados para resolução da equação 2 de Eigen por MCD.	21
Tabela 3.2	Conjunto de parâmetros iniciais usado na simulação de configuração final de uma matriz, para obtenção de um fractal.	24
Tabela 3.3	Conjunto de parâmetros iniciais usado na simulação de configuração final de uma matriz, para modelo DLA e modelo Ferreira, da Silva e Cressoni (2003).	25
Tabela 3.4	Conjunto de parâmetros iniciais usados nas simulações de hipótese de amilóide, Programa 3.5.3.	27
Tabela 3.5	Conjunto de parâmetros iniciais usados nas simulações de hipótese de amilóide, Programa 3.5.3 (adaptado), para verificação do efeito da probabilidade de conversão sobre a distribuição dos tempos.	30
Tabela 3.6	Conjunto de parâmetros iniciais usados nas simulações de hipótese de amilóide, para BSE, Programa 3.5.3 (adaptado), para verificação do efeito da geometria da distribuição de PrP^{Sc} sobre a distribuição dos tempos.	32
Tabela 3.7	Conjunto de parâmetros iniciais usados nas simulações de hipótese de amilóide, para vCJD, Programa 3.5.3 (adaptado), para verificação do efeito da geometria da distribuição de PrP^{Sc} sobre a distribuição dos tempos.	33
Tabela 3.8	Conjunto de parâmetros iniciais usados nas simulações de hipótese de depleção de PrP^{C} , Programa 3.5.5.	34
Tabela 3.9	Conjunto de parâmetros iniciais usados nas simulações de hipótese de amilóide atuando em conjunto com depleção de PrP^{C} , Programa 3.5.3.	36
Tabela 4.1	Análise dos gráficos obtidos a partir de simulações MCD para as equações de Eigen, com as constantes de reação k_{AB} , k_{BA} e k_{-B} variando segundo os valores tabelados.	39
Tabela 4.2	Perfil de distribuição dos tempos de incubação e desvio padrão (σ) \pm erro característicos para algumas doenças priônicas.	41

Tabela 4.3	Ajuste dos tempos de incubação observados de BSE, hipótese do amilóide, Programa 3.5.3.	44
Tabela 4.4	Ajuste dos tempos de incubação observados de vCJD, hipótese do amilóide, Programa 3.5.3.	46
Tabela 4.5	Comparação de parâmetros iniciais e finais para BSE e vCJD em porcentagem.	48
Tabela 4.6	Simulações de hipótese de amilóide com probabilidade de conversão de PrP ^C em PrP ^{Sc} menor que 1, Programa 3.5.3 (adaptado), para verificação do efeito sobre a distribuição dos tempos.	50
Tabela 4.7	Efeito da geometria da distribuição de PrP ^{Sc} sobre a distribuição dos tempos, para BSE. Programa 3.5.3 (adaptado).	52
Tabela 4.8	Efeito da geometria da distribuição de PrP ^{Sc} sobre a distribuição dos tempos, para vCJD. Programa 3.5.3 (adaptado).	53
Tabela 4.9	Resultados das simulações testando a hipótese de depleção de PrP ^C , Programa 3.5.5.	54
Tabela 4.10	Perfis das distribuições dos tempos de incubação das simulações testando a hipótese de depleção de PrP ^C atuando em conjunto com depleção de PrP ^C , Programa 3.5.3.	55
Tabela A.1	Evolução do preenchimento de uma matriz por $3,15 \times 10^9$ números aleatórios gerados pela rotina Fortran (acumulativo).	82
Tabela A.2	Evolução do preenchimento de uma matriz por $3,15 \times 10^9$ números aleatórios gerados pela rotina Laboratório (acumulativo).	82
Tabela A.3	Evolução do preenchimento de uma matriz por $3,15 \times 10^9$ números aleatórios gerados pela rotina Mersenne Twister (acumulativo).	83
Tabela A.4	Evolução do preenchimento de uma matriz por $3,15 \times 10^9$ números aleatórios gerados pela rotina PD (acumulativo).	83
Tabela A.5	Evolução do preenchimento de uma matriz por $3,15 \times 10^9$ números aleatórios gerados pela rotina PS (acumulativo).	83
Tabela A.6	Evolução do preenchimento de uma matriz por $3,15 \times 10^9$ números aleatórios gerados pela rotina Ruim ($seed = seed * 89 + 113$) (acumulativo).	84
Tabela A.7	Evolução do preenchimento de uma matriz por $6,43 \times 10^{10}$ números aleatórios gerados pela rotina Fortran (acumulativo).	86
Tabela A.8	Evolução do preenchimento de uma matriz por $6,43 \times 10^{10}$ números aleatórios gerados pela rotina Laboratório (acumulativo).	87

Tabela A.9	Evolução do preenchimento de uma matriz por $6,43 \times 10^{10}$ números aleatórios gerados pela rotina Mersenne Twister (acumulativo).	87
Tabela A.10	Evolução do preenchimento de uma matriz por $6,43 \times 10^{10}$ números aleatórios gerados pela rotina PD (acumulativo).	87
Tabela A.11	Evolução do preenchimento de uma matriz por $6,43 \times 10^{10}$ números aleatórios gerados pela rotina PS (acumulativo).	88
Tabela A.12	Evolução do preenchimento de uma matriz por $6,43 \times 10^{10}$ números aleatórios gerados pela rotina Ruim ($seed = seed * 89 + 113$) (acumulativo).	88
Tabela A.13	Porcentagem de intervalos que contém o valor zero para os diferentes geradores testados, para distintos tamanhos de vetores.	93
Tabela A.14	Módulos das diferenças entre o valor esperado (68,27) e os valores encontrados.	94
Tabela An.1	Série histórica de CDJ, estado de São Paulo, 1990 – 2006.	106

Lista de Abreviaturas

Bi	Tamanho final do aglomerado de PrP ^{Sc}
BSE	Encefalopatia bovina espongiforme (<i>Bovine Spongiform Encephalopathy</i>)
CJD	Doença de Creutzfeldt–Jakob (<i>Creutzfeldt–Jakob Disease</i>)
CWD	Doença debilitante crônica (<i>Chronic Wasting Disease</i>)
DLA	Difusão Limitada a Agregação
ENIAC	<i>Electronic Numerical Integrator And Computer</i>
EUE	Encefalopatia de ungulados exóticos (<i>Exotic Ungulate Encephalopathy</i>)
fCJD	CJD familiar (<i>familial CJD</i>)
FFI	Insônia familiar fatal (<i>Fatal Familial Insomnia</i>)
Fortran	<i>FORmula TRANslation</i>
FSE	Encefalopatia espongiforme felina (<i>Feline Spongiform Encephalopathy</i>)
FSI	Insônia esporádica fatal (<i>Fatal Sporadic Insomnia</i>)
GSS	Doença de Gerstmann–Sträussler–Scheinker
iCJD	CJD iatrogênica (<i>iatrogenic CJD</i>)
MANIAC	<i>Mathematical And Numerical Integrator And Computer</i>
MC	Monte Carlo
MCD	Monte Carlo Dinâmico
nA	nº inicial de PrP ^C
nB	nº inicial de PrP ^{Sc}
NMR	Ressonância Magnética Nuclear (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
PD	Precisão Dupla
Príon	Abreviação de <i>proteinaceous infectious</i> , uma proteína infecciosa que não codifica informação por ácido nucléico.
<i>Prnp</i>	Gene que codifica PrP
PrP	Proteína Prion

PrP 27–30	Fragmento protease-resistente de PrP ^{Sc} de massa entre 27-30 kDa
PrP ^C	PrP celular
PrP ^{Sc}	Isoforma anormal de PrP, patogênica.
PS	Precisão Simples
recPrP	PrP recombinante
sCJD	CJD esporádica (<i>sporadic CJD</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
TME	Encefalopatia transmissível de marta (<i>Transmissible Mink Encephalopathy</i>)
TSEs	Encefalopatias espongiformes transmissíveis (<i>Transmissible Spongiform Encephalopathies</i>)
vCJD	CJD variante (<i>variant CJD</i>)

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas	viii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. Príons	1
1.2. Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis	3
1.3. O modelo de Eigen	6
1.4. Simulação computacional	10
1.4.1. O método Monte Carlo	10
1.4.2. Método Monte Carlo Dinâmico	13
1.4.3. Autômatas Celulares	14
1.4.5. Modelo Difusão Limitada à Agregação	16
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Resolução do Modelo de Eigen	18
3.2. <i>Fitting</i> das distribuições dos tempos de incubação de vCJD e BSE utilizando apenas a equação (3)	19
3.3. Avaliação da importância do termo autocatalítico das equações de Eigen	20
3.4. Análise dos dados epidemiológicos de BSE e vCJD e de modelos experimentais de <i>Scrapie</i> murina	21
3.5. Modelo Difusão Limitada a Agregação	22
3.5.1. Hipótese: a toxicidade das doenças priônicas é causada pela formação das placas amilóides.	25
3.5.1.1. Probabilidade de reação diferente de 1 (um)	29
3.5.1.2. Interferência da geometria da distribuição de PrP ^{Sc}	31
3.4.2. Hipótese: a toxicidade das doenças priônicas é causada pela depleção de PrP ^C .	34
3.5.3. Hipótese: a toxicidade das doenças priônicas é causada pela formação das placas amilóides e depleção de PrP ^C .	35

4. RESULTADOS	37
4.1. Resolução do Modelo de Eigen	37
4.2. Fitting das distribuições dos tempos de incubação de vCJD e BSE utilizando apenas a equação (3)	38
4.3. Avaliação da importância do termo autocatalítico das equações de Eigen	38
4.4. Análise dos dados epidemiológicos de BSE e vCJD e de modelos experimentais de <i>Scrapie</i> murina	40
4.5. Modelo Difusão Limitada a Agregação	42
4.5.1. Hipótese: a toxicidade das doenças priônicas é causada pela formação das placas amilóides.	44
4.5.1.1. Probabilidade de reação diferente de 1 (um)	49
4.5.1.2. Interferência da geometria da distribuição de PrP ^{Sc}	51
4.4.2. Hipótese: a toxicidade das doenças priônicas é causada pela depleção de PrP ^C .	54
4.5.3. Hipótese: a toxicidade das doenças priônicas é causada pela formação das placas amilóides e depleção de PrP ^C .	55
5. DISCUSSÃO	57
5.1. O Modelo de Eigen	57
5.2. Distribuição dos tempos de incubação de doenças priônicas	59
5.3. Um olhar sobre as doenças priônicas através do modelo Difusão Limitada a Agregação	60
5.4. Considerações sobre o modelo Difusão Limitada à Agregação	64
5.4.1. Tamanho da rede	64
5.4.2. Probabilidade de reação diferente de 1 (um)	66
5.4.3. Interferência da geometria da distribuição de PrP ^{Sc}	67
5.5. Considerações finais	69
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
8. APÊNDICES	

APÊNDICE A – GERADORES DE NÚMEROS ALEATÓRIOS	78
A.1. Introdução	78
A.2. Análise dos geradores de números aleatórios	80
A.2.1. Teste de uniformidade	81
A.2.2. Teste de independência estatística	91
A.3. Conclusão	95
APÊNDICE B – O MÉTODO MONTE CARLO DINÂMICO	96
APÊNDICE C - FLUXOGRAMAS	98
C.1. Resolução Analítica da equação (3)	98
C.2. Resolução por Runge-Kutta da equação (3)	99
C.3. Resolução por Monte Carlo Dinâmico da equação (3)	100
C.4. <i>Fitting</i> das distribuições dos tempos de incubação de vCJD e BSE utilizando apenas a equação (3)	101
C.5. Avaliação da importância do termo autocatalítico das equações de Eigen	102
C.6. Hipótese: a toxicidade das doenças priônicas é causada pela formação das placas amilóides	103
C.7. Hipótese: a toxicidade das doenças priônicas é causada pela depleção de PrP ^C	104
C.8. Hipótese: a toxicidade das doenças priônicas é causada pela formação das placas amilóides e depleção de PrP ^C	105
9. ANEXO	
Anexo A: Série histórica de CDJ, estado de São Paulo, 1990 – 2006	106

1. INTRODUÇÃO e REVISÃO DA LITERATURA:

1.1. Príons

“Príon”, abreviação de *proteinaceous infectious* (PRUSINER, 1984), é uma proteína infecciosa que não codifica a informação por um ácido nucléico (WICKNER *et al.*, 2007). Príon é uma proteína expressa constitutivamente em diversos tipos celulares, especialmente em neurônios onde pode se acumular em membranas pré e pós sinápticas (BROWN, 2001; PRUSINER, 1998; SOTO, 2006). A proteína príon normal, é chamada PrP^C (PRUSINER, 1998). Recentemente, foram descobertas várias funções fisiológicas da PrP^C, tais como sua participação no amadurecimento e formação dos prolongamentos dos neurônios, na proteção contra morte celular programada (apoptose), na formação da memória, na modulação da resposta imune às inflamações, e na proteção das células do coração contra a agressão química (LINDEN *et al.*, 2008). A PrP é produto de um único gene, chamado *Prnp*, e possui 253 resíduos de aminoácidos (252 em algumas espécies) (SOTO, 2006). A PrP^C é convertida em PrP^{Sc} (isoforma anormal da proteína príon, patogênica) através de um processo no qual uma porção de α -hélice e *loops* (ou alças) da estrutura é reenovelada em folhas β (PRUSINER, 1998). A seqüência de aminoácidos de PrP^{Sc} corresponde à codificada pelo gene *Prnp* do hospedeiro mamífero (PRUSINER, 1998). Estruturalmente, PrP^C e PrP^{Sc} diferem unicamente em sua conformação (EIGEN, 1996). A estrutura de PrP^C e o modelo da estrutura de PrP^{Sc} podem ser vistos na Figura 1.1. A PrP^C pode ser facilmente digerida por enzimas, como, a proteinase K (EIGEN, 1996), enquanto a PrP^{Sc} possui um fragmento protease-resistente, com massa de 27 – 30 kDa (PrP 27–30), consistindo de aproximadamente 140 aminoácidos (PRUSINER; MCCARTY, 2006).

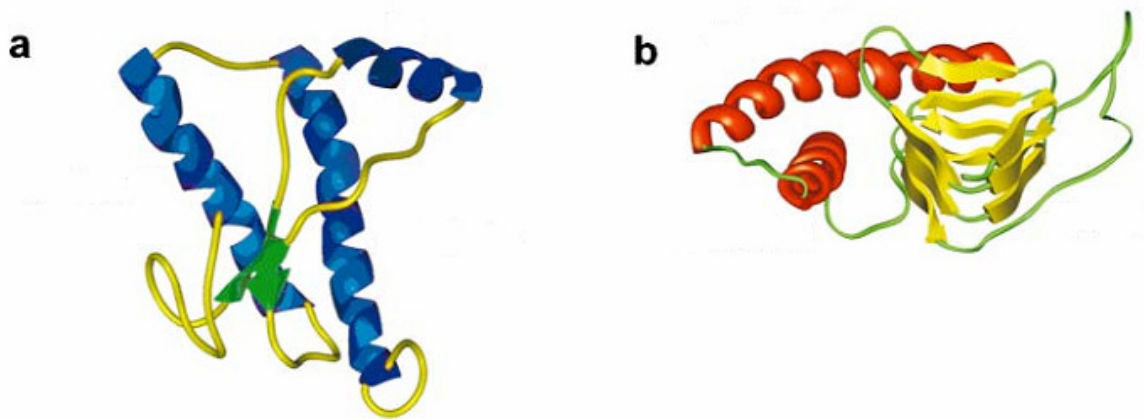


Figura 1.1: Estruturas terciárias das isoformas da proteína príon. (a) Estrutura determinada por Ressonância Magnética Nuclear (NMR) de PrP recombinante (recPrP) resíduos 90–231 (seqüência do Syrian hamster) mostrando três α -hélices e duas pequenas folhas β . Possivelmente, a estrutura da forma α -helicoidal de recPrP assemelha-se à de PrP^C. recPrP(90–231) é visto da interface onde se pensa que PrP^{Sc} se liga a PrP^C. (b) Modelo de um monômero de PrP 27–30 caracterizando β -hélice orientada à esquerda. (Adaptado de PRUSINER; MCCARTY, 2006).

Acredita-se que o processo infeccioso no qual a PrP^C é convertida em PrP^{Sc} ocorra por um mecanismo auto-catalítico: a PrP^C recrutada e (mal) enovelada por PrP^{Sc} subsequentemente catalisa a conversão de mais PrP^C, levando a uma replicação massiva, o que torna a doença progressiva e fatal (BIESCHKE *et al.*, 2004). Essa transição estrutural é acompanhada por mudanças profundas nas propriedades físico-químicas de PrP. As proteínas PrP^C e PrP^{Sc} apresentam propriedades bioquímicas e físico-químicas muito diferentes, tais como resistência a ação de proteases, solubilidade, resistência à desnaturação e agregação (SOTO, 2006). Interações hidrofóbicas são responsáveis pelo comportamento físico não ideal da PrP^{Sc} (PRUSINER, 1998). A molécula de PrP^{Sc} está em uma conformação mais estável que a PrP^C (PrP^C é meta-estável), o que significa que a reação $\text{PrP}^{\text{C}} + \text{PrP}^{\text{Sc}} \rightarrow 2 \text{PrP}^{\text{Sc}}$ é exotérmica e unidirecional (GALDINO *et al.*, 2001).

As PrP^{Sc}s são extremamente resistentes à inativação pelas radiações UV e ionizante (procedimentos que modificam ácidos nucleicos); à inativação por formalina e altas temperaturas, e resistentes a proteases (PRUSINER, 1998). Sendo assim, sua infectividade

pode ser reduzida por procedimentos que hidrolisam ou modificam proteínas, mas não por procedimentos que alteram ácidos nucleicos (PRUSINER, 1984).

Nos patógenos de genoma de ácido nucleico, as propriedades cepas-específicas são codificadas em genes. Ao contrário, nos príons as propriedades cepas-específicas são codificadas na sua estrutura terciária: PrP^{Sc} age como um molde sobre o qual PrP^C é reenovelada em uma molécula de PrP^{Sc} nascente (PRUSINER, 1998). Existem diferentes conformações de PrP^{Sc}, e cada uma dessas causa uma doença diferente (SOTO, 2006).

1.2. Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis

As doenças causadas por príons formam um grupo relacionado de distúrbios neurodegenerativos fatais, chamadas Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (TSEs), ou doenças priônicas, que afetam humanos e outros mamíferos (SOTO, 2001). Doenças priônicas podem se apresentar como distúrbios esporádicos, genéticos, ou infecciosos, e todas envolvem a modificação no enovelamento de PrP (PRUSINER, 1998). As características comuns dessas doenças são vacuolação espongiforme, perda neuronal e proliferação astrocítica que podem ser acompanhadas por placas amilóides (COLLINGE, 2001).

A formação das placas amilóides se dá pelo mau enovelamento e agregação de proteínas (usualmente via formação de folhas β). Proteínas formadoras de amilóides têm atraído muita atenção recentemente por causa de sua associação com mais de 30 doenças. Dentre as doenças causadas por amilóides, destacam-se doença de Alzheimer, doença de Huntington, doença de Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica (doença de Lou Gehrig), diabetes tipo II e doenças priônicas (HARRISON *et al.*, 2007; ROCHET, 2007). Os amilóides têm sido identificados como causadores da toxicidade celular e podem ser a fonte

da patologia aberrante nessas doenças (HARRISON *et al.*, 2007). Os amilóides formados nas doenças priônicas são hastes irregulares, compostos principalmente, se não inteiramente, de PrP^{Sc} 27-30 (núcleo protease-resistente da PrP^{Sc}, com massa de 27-30 kDa) que são indistinguíveis morfológicamente de outros amilóides purificados (PRUSINER, 1998). Uma hipótese complementar é que os neurônios não morreriam apenas porque a adesão dos príons infecciosos gera aglomerados tóxicos, mas também pela perda de moléculas saudáveis de príon, que deixaria os neurônios desprotegidos contra agressões químicas (LINDEN *et al.*, 2008).

As TSEs humanas (Tabela 1.1) são doenças raras, afetando uma a duas pessoas por milhão por ano no mundo, porém são fatais em 100% dos casos (COLLINGE, 2005). A maioria dos humanos afligidos por doenças priônicas apresenta demência com progressão rápida, e em alguns casos ataxia cerebelar (PRUSINER, 1998). Apesar de os cérebros dos pacientes parecerem normais após exame *post mortem*, eles usualmente apresentam degeneração espongiiforme e gliose astrocítica sob exame microscópico (PRUSINER, 1998).

Tabela 1.1: Classificação das doenças humanas priônicas.

Tipo de desordem	TSE	Frequência
Esporádicas	CJD esporádica (sCJD)	~ 85 %
	Insônia Fatal Esporádica (FSI)	
	Gerstmann–Sträussler–Scheinker (GSS)	
Genéticas	CJD familiar (fCJD)	~ 10 – 15 %
	Insônia familiar fatal (FFI)	
Adquiridas	CJD iatrogênica (iCJD)	< 5 %
	Kuru	
	CJD variante (vCJD)	

CJD: do inglês *Creutzfeldt-Jakob Disease*. (Adaptado de Collinge, 2005).

No Brasil, o Ministério da Saúde tem um programa de Vigilância Epidemiológica das Doenças Priônicas, e a CJD é um agravo de notificação compulsória desde 2006 (BRASIL, 2006). No estado de São Paulo, a CJD bem como outras doenças priônicas também são agravos de notificação compulsória (SÃO PAULO, 2006a). Entretanto, mesmo com a obrigatoriedade, supõe-se que a maioria dos casos não é notificada, visto que o número de notificações é bem menor que o número de casos esperados por ano (SÃO PAULO, 2006b). A série histórica de CDJ, estado de São Paulo, nos anos de 1990 a 2006 pode ser vista na tabela An.1, no Anexo 1.

Diferentemente do que ocorre em humanos, na maioria dos casos de doenças priônicas em animais, não se sabe sobre as origens ou rotas naturais de transmissão (COLLINGE, 2001). A tabela 1.2 descreve alguns exemplos dessas doenças.

Tabela 1.2. Algumas doenças priônicas conhecidas em animais.

Doença	Espécies hospedeiras
Encefalopatia Bovina Espongiforme (BSE)	Bovinos
<i>Scrapie</i>	Ovelhas, cabras
Encefalopatia transmissível de <i>Mink</i> (TME)	<i>Mink</i> (marta)
Encefalopatia espongiforme felina (FSE)	Vários felinos
Doença debilitante crônica (CWD)	Cervos, alces
Encefalopatia de ungulados exóticos (EUE)	Órix, niala, kudu (antílope africano)

Adaptado de Prusiner (1998).

Dentre as doenças priônicas que acometem os animais, a mais importante é a BSE, pois se acredita que essa doença seja responsável pela forma variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) em humanos, devido à ingestão de carne de gado contaminada (BÉRINGUE *et al.*, 2007). Essa doença já matou quase 200 pessoas entre 1985 e junho de 2007 (BÉRINGUE

et al., 2007; <http://www.cjd.ed.ac.uk/vcjdworld.htm>). Existe a possibilidade de que ocorra uma epidemia de vCJD no Reino Unido e outros países, como resultado da dieta ou outra exposição aos príons de BSE (COLLINGE, 2001). As conseqüências da epidemia de BSE em termos de doença humana ainda não são conhecidas: com diferentes suposições de análises de risco, em 1997, o número cumulativo de casos de vCJD no Reino Unido foi estimado entre 75 e 80.000, e mais recentemente, em 2000, entre 70 e 136.000 casos (VALLERON *et al.*, 2001). Essas estimativas são dependentes de suposições feitas sobre a duração média do período de incubação (VALLERON *et al.*, 2001). Em doenças priônicas humanas, o tempo de incubação é muito longo, da ordem de anos a décadas (SOTO, 2006). Infelizmente, nenhum estudo em animais ou de outra TSE humana provê dados precisos para o período de incubação (VALLERON *et al.*, 2001).

Baseando-se nessas informações, muitos pesquisadores em todo o mundo vêm tentando usar modelos teóricos capazes de explicar questões ainda não respondidas sobre a fisiopatologia de doenças priônicas, bem como seu período de incubação.

1.3. O Modelo de Eigen

A forma de replicação dos príons é uma questão chave para o entendimento da fisiopatologia das doenças priônicas. Em 1994, o grupo de Prusiner foi o primeiro a propor um modelo conformacional para replicação de príons, que poderia explicar a patogênese das formas de doenças priônicas infecciosas, hereditárias e esporádicas (COHEN *et al.*, 1994). Esse modelo é representado na Figura 1.2.

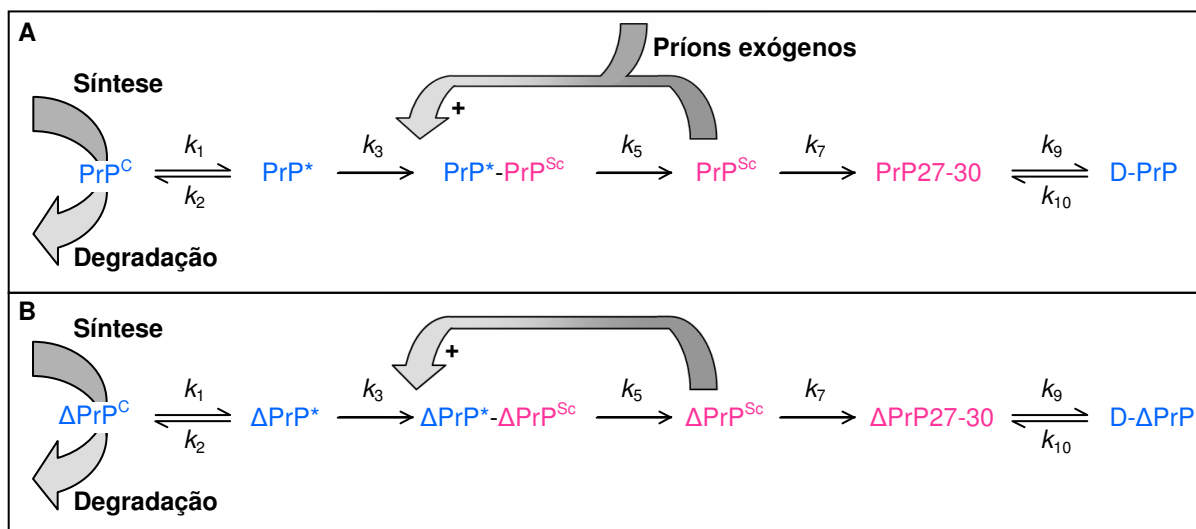


Figura 1.2. Modelo conformacional de Prusiner para replicação de príons. Formas infecciosas de PrP são mostradas em vermelho e formas não infecciosas em azul. (A) Eventos postulados em doenças priônicas infecciosas e esporádicas. PrP^{C} nativo é sintetizado e degradado como parte do metabolismo celular normal. Flutuações estocásticas na estrutura de PrP^{C} podem criar (k_1) um raro, parcialmente desenovelado monômero (PrP^*) que é um intermediário na formação de PrP^{Sc} . PrP^* pode reverter-se (k_2) em PrP^{C} e ser degradado, ou formar um complexo (k_3) com PrP^{Sc} . Normalmente, a concentração de PrP^* é baixa e a formação de PrP^{Sc} é insignificante. Em doenças infecciosas priônicas, príons exógenos entram na célula e estimulam a conversão (k_5) de PrP^* em PrP^{Sc} , o que provavelmente é um processo irreversível. Em doenças priônicas esporádicas, não existem príons exógenos, a concentração de PrP^{Sc} pode eventualmente alcançar um limiar onde um *feedback* positivo poderia estimular a formação de PrP^{Sc} . Proteólise limitada da parte aminoterminal de PrP^{Sc} produz (k_7) $\text{PrP}27-30$, uma forma de PrP^{Sc} truncada que polimeriza em amilóides e tem um alto conteúdo de folhas β . Desnaturação (k_9) de PrP^{Sc} ou $\text{PrP}27-30$ em D-PrP tornam essas moléculas sensíveis a proteases e abole sua infectividade; tentativas de renaturar (k_{10}) D-PrP parecem não ter sucesso. (B) Eventos postulados em doenças priônicas hereditárias. PrP^{C} mutante (Δ) é sintetizado e degradado como parte do metabolismo celular normal. Flutuações estocásticas na estrutura de $\Delta\text{PrP}^{\text{C}}$ são maiores que aquelas no PrP^{C} nativo; essas flutuações criam (k_1) quantidades significantes do parcialmente desenovelado monômero (PrP^*) que é um intermediário na formação de $\Delta\text{PrP}^{\text{Sc}}$. Proteólise limitada da parte aminoterminal de PrP^{Sc} produz (k_7) $\Delta\text{PrP}27-30$, que pode ser menos protease resistente que o tipo nativo $\text{PrP}27-30$ (Adaptado de Cohen *et al.*, 1994).

Manfred Eigen, ganhador do prêmio Nobel de química do ano de 1967, conhecido por seus trabalhos com cinética química e termodinâmica, adaptou o modelo de Prusiner descrito anteriormente e descreveu as equações químicas que governariam o processo de replicação dos príons (EIGEN, 1996). Essas equações, que se referem ao mecanismo de conversão: $\text{PrP}^{\text{C}} + \text{PrP}^{\text{Sc}} \rightarrow 2\text{PrP}^{\text{Sc}}$, serão analisadas neste trabalho. Por simplicidade, PrP^{C} é denotado por A e PrP^{Sc} por B . A figura 1.3 representa o modelo de Eigen (1996), modificação do mecanismo proposto por Prusiner (COHEN *et al.*, 1994) para a reação auto-catalítica de $\text{PrP}^{\text{C}} + \text{PrP}^{\text{Sc}} \rightarrow 2\text{PrP}^{\text{Sc}}$ e a Tabela 1.3 define as constantes envolvidas (EIGEN, 1996).

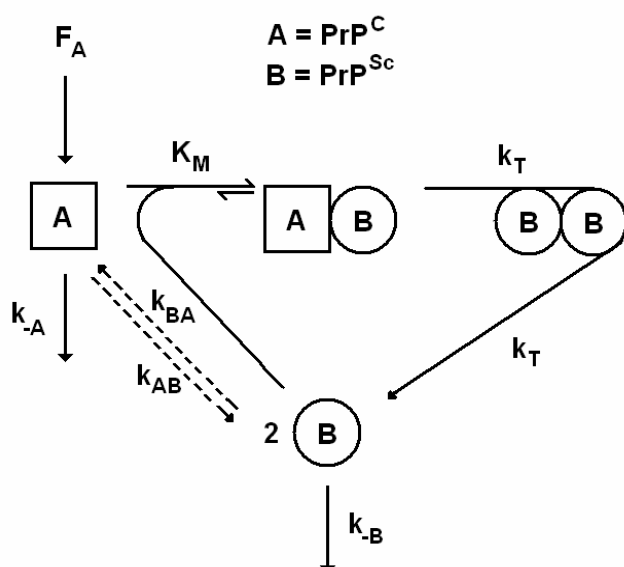


Figura 1.3: Mecanismo de Prusiner (COHEN *et al.*, 1994) modificado por Eigen (1996) para reações priônicas.

Tabela 1.3: Constantes envolvidas na reação auto-catalítica de $\text{PrP}^C + \text{PrP}^{\text{Sc}} \rightarrow 2\text{PrP}^{\text{Sc}}$.

Constantes de taxas de reação	Taxas de reação efetivas	
Conversão não-catalítica de $A \rightarrow B$	k_{AB}	$k_{AB}[A]$
Conversão não-catalítica de $B \rightarrow A$	k_{BA}	$k_{BA}[B]$
Decomposição metabólica de A	k_{-A}	$k_{-A}[A]$
Decomposição metabólica de B	k_{-B}	$k_{-B}[B]$
Formação metabólica de A	$F_A = \text{constante}$	
Formação auto-catalítica de B	$\frac{k_T[A]}{K_M + [A]}[B]$	
Número de <i>turnover</i> (retorno de B ao meio)	k_T	
Constante de Michaelis	K_M	

(Adaptado de Eigen, 1996)

De acordo com a figura 1.3, pode-se ver que: A (PrP^C), criado pelo organismo, pode ser digerido pelo mesmo, ou entrar em contato com B (PrP^{Sc}) e formar um par AB, ou ainda se converter em B espontaneamente (reação que não é auto-catalítica). O par AB pode dissociar-se, ou formar um par BB (reação auto-catalítica) com a devolução de um B adicional para o meio, podendo ser digerido pelo organismo. Ainda B pode se converter em A espontaneamente (reação que não é auto-catalítica).

Com essas definições, as seguintes equações podem ser escritas (EIGEN, 1996):

$$\frac{d}{dt}[A] = F_A - k_{-A}[A] - k_{AB}[A] - \frac{k_T[A]}{K_M + [A]}[B] + k_{BA}[B] \quad (1)$$

$$\frac{d}{dt}[B] = k_{AB}[A] + \frac{k_T[A]}{K_M + [A]}[B] - (k_{BA} + k_{-B})[B] \quad (2)$$

Nessas equações é suposto que A e B sejam uniformemente distribuídos no espaço. Não há distinção se eles são homoganeamente solúveis ou fixos nas membranas neuronais (EIGEN, 1996). No presente trabalho, o modelo de Eigen será desenvolvido através do Método Monte Carlo, pois esse método permite obter aproximações numéricas de funções complexas, como é o caso das equações de Eigen, que não poderiam ser resolvidas analiticamente.

1.4. Simulação computacional

1.4.1. O método Monte Carlo

O método Monte Carlo refere-se a qualquer método que utiliza seqüências de números aleatórios (ou pseudo-aleatórios) para realizar uma simulação estatística (ROLLETT; MANOHAR, 2004). A geração desses números aleatórios, por ser um tópico de grande importância em simulação MC, está discutida em separado no Apêndice A.

Simulações computacionais, utilizando o método Monte Carlo (MC), podem dar contribuições substanciais para o entendimento de TSEs. Existem estudos que utilizam MC em várias áreas da saúde e biologia: física médica (ROGERS, 2006); imunologia (LOUZOUN, 2007); antibioticoterapia (AMBROSE, 2006); farmacocinética (DOKOUMETZIDIS *et al.*, 2005); dosagem de medicamentos (WATANABE *et al.*, 2007); toxicologia (ALLEN; HACK; CLEWELL, 2007); hibridização de DNA (KIM *et al.*, 2007); construção de árvores filogenéticas (CHEON; LIANG, 2007); difusão e reação de proteínas (ZHDANOV, 2007); epidemiologia (NIEUWENHUIJSEN; PAUSTENBACH, 2006), entre outros. Também existem vários estudos que utilizam MC para estudar problemas relacionados a príons, como por exemplo, a replicação de príons (RUBENSTEIN *et al.*,

2007); análise de risco de espalhamento de BSE (ABRIAL *et al.*, 2005 (a) e (b); PAISLEY; HOSTRUP-PEDERSEN, 2004 e 2005); estratégias para detecção de *scrapie* (HOPP; WEBB; JARP, 2003); validação de fármacos potenciais no tratamento de TSEs (RUDYK *et al.*, 2003); modelo teórico do mecanismo de autocatálise conformacional (MAŁOLEPSZA *et al.*, 2005; PENG; HANSMANN, 2003), entre outros.

O método Monte Carlo foi praticado originalmente sob um nome mais genérico: *Statistical Sampling*, ou Amostragem Estatística. A idéia central do método é mais antiga do que o nome dado para a técnica. Sua primeira aplicação data do século XVIII é a estimativa para o valor de π . O problema intitulado “A agulha de Buffon” foi proposto pelo naturalista francês Georges-Louis Leclerc, o Conde de Buffon em 1733, no *Proceedings of the Paris Academy of Sciences*, e resolvido por ele mesmo em seu livro *Essai d'arithmetique morale*, publicado em 1777. O problema constituía-se em encontrar a probabilidade de que uma agulha (de comprimento l), arremessada aleatoriamente em uma superfície plana, traçada por um conjunto de retas paralelas equidistantes, separadas por uma distância d ($d > l$), interceptará uma das retas. Essa probabilidade é $P = \frac{2l}{d\pi}$. Posteriormente, Pierre Simon de Laplace (1749-1827) reforçou que essa probabilidade poderia ser usada para encontrar uma aproximação de π , desde que a probabilidade é aproximadamente a proporção de vezes que a agulha intercepta uma das linhas quando o experimento é repetido um grande número de vezes h (CHAKRABORTY; NATARAJAN, 1998). Esse valor de π seria então $\pi \approx \frac{n}{h} \frac{2l}{d}$ (LINS, 2004). Na época em que não havia computadores e seus geradores de números pseudo-aleatórios, lançar agulhas era uma alternativa viável para aproximar π (LINS, 2004).

William Sealy Gosset (1876-1937), que usava o pseudônimo Student, publicou no jornal *Biometrika* o artigo *The probable error of a mean*, que falava sobre o erro quando se trabalha com pequenas amostras e trazia a famosa Tabela de Student (STUDENT, 1908).

Enrico Fermi foi um dos primeiros a usar as técnicas de *Statistical Sampling* para prever resultados experimentais sobre a difusão de nêutrons, em 1930, mas de uma forma simples e calculada à mão (ANDERSON, 1986; METROPOLIS, 1987).

Com a construção do primeiro computador eletrônico, o ENIAC (abreviação de *Electronic Numerical Integrator And Computer*), em 1945, Stanislaw Ulam ressaltou para Von Neumann que as técnicas de *Statistical Sampling* caíram em desuso por causa dos enormes e tediosos cálculos, mas que poderiam ser ressuscitadas utilizando o ENIAC (METROPOLIS, 1987). Em 1948, Nicholas Metropolis idealizou um modo de implementar o Monte Carlo no ENIAC (ANDERSON, 1986). Tanto o ENIAC quanto a técnica Monte Carlo foram desenvolvidos durante a Segunda Guerra Mundial, para o Projeto Manhattan, com o objetivo de construir a bomba atômica.

O termo “Monte Carlo”, popularizado por pioneiros no campo, incluindo Stanislaw Marcin Ulam, Enrico Fermi, John Von Neumann e Nicholas Metropolis, é uma referência ao cassino famoso em Mônaco. O uso da aleatoriedade e a natureza repetitiva do processo são análogos às atividades conduzidas em um cassino. O nome Monte Carlo foi dado por Nicholas Metropolis em 1947 em honra ao tio de Ulam, que era um jogador e pedia dinheiro emprestado aos parentes para ir ao cassino de Monte Carlo (METROPOLIS, 1987).

Nicholas Metropolis ainda idealizou e construiu o MANIAC (abreviação de *Mathematical And Numerical Integrator And Computer*). Um avanço significativo do Método Monte Carlo veio da colaboração entre Nicholas Metropolis e Edward Teller. Teller propôs que o MANIAC e o método Monte Carlo fossem usados para realizar cálculos da equação de estado para esferas rígidas em duas dimensões. Esses cálculos introduziram a idéia do que é hoje conhecido como *Importance Sampling*, também referido como algoritmo de Metropolis (ANDERSON, 1986). Resumidamente, o método de Metropolis pode ser descrito do seguinte modo: calcula-se a energia do sistema, move-se aleatoriamente cada partícula a uma pequena

distância, e recalcula-se a energia. Se a energia diminui, a nova posição é aceita, caso contrário, a nova posição é aceita com certa probabilidade definida pelo peso de Boltzmann. O processo continua até que a energia média se estabilize (DOOLEN; HENDRICKS, 1987). O método de Metropolis é um procedimento eficiente para calcular propriedades de equilíbrio de sólidos, líquidos, gases, e plasmas.

1.4.2. Método Monte Carlo Dinâmico

Apesar de a técnica do Monte Carlo ser associada com propriedades estáticas ou de equilíbrio dos sistemas modelados, o método Monte Carlo pode ser usado para estudar fenômenos dinâmicos (FICHTHORN; WEINBERG, 1991). Uma técnica de simulação chave é a simulação estocástica para reações químicas desenvolvida por Gillespie (1977) através do *Stochastic Simulation Algorithm* (SSA) (TURNER; SCHNELL; BURRAGE, 2004). Derivado da equação mestra química, o algoritmo evolui o sistema uma reação por vez, escolhendo uma reação a realizar, avançando o tempo por um intervalo apropriado, e atualizando a distribuição de probabilidade de reações futuras para refletir o resultado da reação selecionada (SLEPOY, 2008). Outros modelos importantes são o *Monte Carlo Dinâmico* apresentado por Fichthorn e Weinberg (1991) e o *Next Reaction Method* apresentado por Gibson e Bruck (2000). O método Monte Carlo Dinâmico (MCD), ou Monte Carlo Cinético, utiliza as idéias básicas do método tradicional Monte Carlo, mas como a aceitação de novas configurações é baseada nas taxas para os processos elementares, é possível fazer uma conexão com o tempo real (AIELLO; DA SILVA, 2003). Sendo assim, o método Monte Carlo Dinâmico permite que se estudem processos ao nível macroscópico ou mesoscópico.

Os sistemas biológicos, como é o caso das doenças priônicas, são sistemas fora do equilíbrio, por isso, para simulá-los, é necessário usar o método Monte Carlo Dinâmico, descrito acima. Além disso, alguns conceitos de Autômatas Celulares (AC) também foram usados: o sistema é desenhado em uma rede quadrada, com vizinhança de von Neumann e condições periódicas de contorno, com regras locais de transição e todas as posições são atualizadas ao mesmo tempo. O AC algumas vezes se confunde com MC, quando a geração de números aleatórios está envolvida. Todavia, AC se refere ao modelo, e aqui, trabalha com um processo estocástico; então, o método de simulação é Monte Carlo (DA SILVA; CALIRI, 2007).

1.4.3. Autômatas Celulares

Algumas técnicas têm sido usadas para análises de problemas epidêmicos, uma delas usa os ACs como modelos simples de uma doença que se espalha com contato local (AIELLO; DA SILVA, 2003). Os ACs foram introduzidos em 1966 por John von Neumann, como um modelo formal sistemas biológicos de auto-reprodução (SARKAR, 2000).

Os ACs são caracterizados por quatro fatores: a geometria; a vizinhança da célula; o estado da célula e; a regra de transição local (SARKAR, 2000). A geometria consiste na forma e dimensão da rede. Em duas dimensões, existem três possíveis redes regulares: triangular, quadrada e hexagonal. Na maioria dos casos, a rede quadrada é usada por simplicidade. A vizinhança especifica o conjunto de células que são vizinhas a uma determinada célula. Para uma rede quadrada e triangular, normalmente são usados dois tipos de vizinhança, a de von Neumann e a de Moore (VIHER; DOBNIKAR; ZAZULA, 1998), exemplificados na figura 1.4. O estado da célula é um valor inteiro, tomado de um conjunto

possível de valores, e a regra de transição local evolui os valores das células em passos de tempos discretos, de acordo com regras determinísticas ou estocásticas que especificam o valor de cada sítio considerando os valores dos sítios vizinhos (WOLFRAM, 1983).

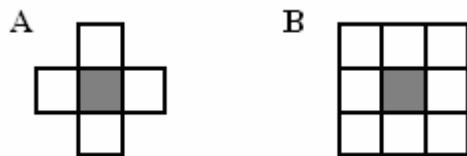


Figura 1.4: Exemplos de diferentes tipos de vizinhanças em uma rede quadrada. (A) Primeiros vizinhos em uma vizinhança de von Neumann; e (B) Primeiros vizinhos em uma vizinhança de Moore.

Na definição original de AC, o tamanho da rede é infinito. Utilizando redes finitas, recorre-se ao uso de condições de contorno periódicas, para tornar a simulação próxima de uma rede infinita (SARKAR, 2000). Quando são usadas condições de contorno periódicas, a matriz assume uma forma toroidal: as bordas superior e inferior são unidas, assim como as bordas laterais (VIHER; DOBNIKAR; ZAZULA, 1998), como mostrado na Figura 1.5.

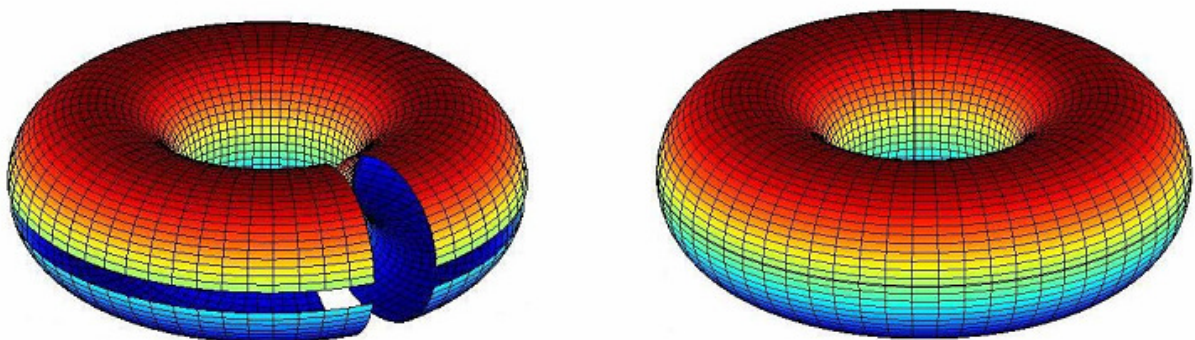


Figura 1.5: Condição periódica de contorno. Une-se as bordas superior e inferior, e as bordas direita e esquerda, a rede assume uma topologia toroidal (Adaptado de Ferreira, 2005).

1.4.4. Modelo Difusão Limitada à Agregação

No presente trabalho serão utilizados alguns conceitos do modelo Difusão Limitada à Agregação (DLA). Nesse modelo, uma partícula executa uma caminhada aleatória (*random walk*) no espaço, dando um passo a cada intervalo de tempo, até encontrar uma “semente” e se aderir a ela. O crescimento dessa “massa” pode ser estudado considerando muitos *random walkers* sendo inicializados ao mesmo tempo. O objeto resultante da DLA é um *fractal*, um objeto geométrico que pode ser dividido em partes, cada uma das quais semelhantes ao objeto original. Não existe uma teoria analítica para DLA, e a simulação computacional é o método de escolha. De fato, o fenômeno de DLA foi primeiramente descoberto pela simulação Monte Carlo (LANDAU, 2005).

A partir dos conhecimentos existentes sobre as doenças priônicas, principalmente no que se refere aos tempos de incubação, o MCD será utilizado, aliado aos modelos de Autômatas Celulares e Difusão Limitada à Agregação, para previsão de alguns aspectos básicos dessas doenças, os quais ainda não estão esclarecidos cientificamente.

6. CONCLUSÕES:

Nesse trabalho, através de simulações computacionais, alguns aspectos sobre a cinética de replicação e a toxicidade das doenças priônicas foram esclarecidos.

- Para a cinética priônica proposta por Eigen (1996), confirmamos que o termo mais importante no processo de conversão $\text{PrP}^{\text{C}} + \text{PrP}^{\text{Sc}} \rightarrow 2\text{PrP}^{\text{Sc}}$ é o termo de Michaelis-Menten, e que as outras constantes k_{AB} , k_{BA} e k_{B} possuem valores negligenciáveis, como previa Eigen (1996). O termo de Michaelis-Menten representa a conversão autocatalítica $\text{PrP}^{\text{C}} + \text{PrP}^{\text{Sc}} \rightarrow 2\text{PrP}^{\text{Sc}}$, e as outras constantes representam a conversão não-catalítica (espontânea) de $\text{A} \rightarrow \text{B}$ (k_{AB}); a conversão não-catalítica (espontânea) de $\text{B} \rightarrow \text{A}$ (k_{BA}); e a decomposição metabólica de B (k_{B}).
- Utilizando o modelo DLA, confirmamos a hipótese de que para BSE e vCJD, doenças priônicas de ocorrência natural, a toxicidade é causada principalmente pela formação das placas amilóides. Para *Scrapie* murina, uma infecção experimental, mostramos que a toxicidade causada pela formação das placas amilóides em adição à depleção de PrP^{C} é bastante provável.
- Para o modelo DLA propriamente dito: (1) conseguimos o ajuste de diferentes perfis de distribuição de tempos de incubação para algumas doenças priônicas (lognormal para BSE e vCJD e lognormal com segundo pico para *Scrapie* murina), apenas com a mudança dos parâmetros iniciais e finais, apesar de o modelo ser bastante simples; (2) a largura da lognormal pode ser afetada pela geometria, além dos parâmetros iniciais e finais; (3) a lognormalidade é resultado do processo difusivo; (4) as concentrações de PrP^{C} devem ser baixas, menores que 1% e o número de PrP^{Sc} s deve ser menor que 10 para que a lognormalidade ocorra sem o mecanismo de depleção de PrP^{C} .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. (a) Abrial D, Calavas D, Jarrige N, Ducrot C. Poultry, pig and the risk of BSE following the feed ban in France--a spatial analysis. *Vet Res*, 2005, vol. 36, nº 4, p. 615-628.
2. (b) Abrial D, Calavas D, Jarrige N, Ducrot C. Spatial heterogeneity of the risk of BSE in France following the ban of meat and bone meal in cattle feed. *Prev Vet Med*, 2005, vol. 67, nº 1, p. 69-82.
3. Aiello OE, da Silva MAA. New approach to dynamical Monte Carlo methods: Application to an epidemic model. *Physica A*, 2003, vol. 327, p. 525-534.
4. Allen BC, Hack CE, Clewell HJ. Use of Markov Chain Monte Carlo analysis with a physiologically-based pharmacokinetic model of methylmercury to estimate exposures in US women of childbearing age. *Risk Anal*, 2007, vol. 27, nº 4, p. 947-959.
5. Ambrose PG. Monte Carlo simulation in the evaluation of susceptibility breakpoints: predicting the future: insights from the society of infectious diseases pharmacists. *Pharmacotherapy*, 2006, vol. 26, nº 1, p. 129-134.
6. Anderson HL, Metropolis, Monte Carlo, and the MANIAC. *Los Alamos Science*, 1986, nº 14, p. 96-108.
7. Béringue V, Andréoletti O, Le Dur A, Essalmani R, Vilotte JL, Lacroux C, Reine F, Herzog L, Biacabé AG, Baron T, Caramelli M, Casalone C, Laude H. A bovine prion acquires an epidemic bovine spongiform encephalopathy strain-like phenotype on interspecies transmission. *J Neurosci*, 2007, vol. 27, nº 26, p. 6965-6971.
8. Bieschke J, Weber P, Sarafoff N, Beekes M, Giese A, Kretzschmar H. Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, vol. 101, nº 33, p. 12207-12211.
9. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria nº 5, de 21 de fevereiro de 2006 "Inclui doenças na relação nacional de notificação compulsória, define doenças de notificação imediata, relação dos resultados laboratoriais que devem ser notificados pelos Laboratórios de Referência Nacional ou Regional e normas para notificação de casos.". *Diário Oficial da União*, 2006. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/NIVE/dnc.2006/DNC_2006.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2008.
10. Brent RP. Fast and Reliable Random Number Generators for Scientific Computing. In: Dongarra J, Madsen K, Wasniewski J. *Applied parallel computing: State of the art in scientific computing*. New York: Springer-Verlag; 2006. p. 1-10.

11. Chakraborty S, Natarajan S. Buffon's needle problem revisited. *Resonance*, 1998, vol.3, nº 9, p. 70-73.
12. Cheon S, Liang F. Phylogenetic tree construction using sequential stochastic approximation Monte Carlo. *Biosystems*, 2008, vol. 91, p. 94-107.
13. Cohen FE, Pan KM, Huang Z, Baldwin M, Fletterick RJ, Prusiner SB. Structural clues to prion replication. *Science*, 1994, vol. 264, nº 5158, p. 530-531.
14. Collinge J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*, 2001, vol. 24, p. 519-550.
15. Collinge J. Molecular neurology of prion disease. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005, vol. 76, p. 906-919.
16. Cox DL, Sing RRP, Yangy S. Prion disease: exponential growth requires membrane binding. *Biophys J*, 2006, vol. 90, nº 11, p. L77-L79.
17. da Silva, MAA, Caliri, A. Monte Carlo methods applied to epidemics. In: Taft CA, Silva CHTP. (Org.). *Current Methods in Medicinal Chemistry and Biological Physics*. 1ª ed. Trivandrum: Research Signpost, 2007, v. 1, p. 163-186.
18. da Rosa FHFP, Pedro Junior VA. Gerando números aleatórios. Laboratório de Matemática Aplicada Prof. Dr. Eduardo Colli. 2002. Disponível em <http://www.feferraz.net/files/lista/random_numbers.pdf>. Acesso em: 06 fev. 2007.
19. DeVries PL. *A first course in computational physics*. New York: John Wiley & Sons, 1994.
20. Dokoumetzidis A, Kosmidis K, Argyrakis P, Macheras P. Modeling and Monte Carlo simulations in oral drug absorption. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2005, vol. 96, nº 3, p. 200-205.
21. Doolen GD, Hendricks J. *Monte Carlo at Work*. Los Alamos Science, 1987, nº 15, p. 142-143.
22. Eigen M. Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys Chem*, 1996, vol. 63, p. A1-A18.
23. Ferreira AS, da Silva MAA, Cressoni JC. Stochastic modeling approach to the incubation time of prionic diseases. *Phys Rev Lett*, 2003, vol. 90, nº 19, p. 198101-1 – 198101-4.
24. Ferreira AS. *Modelagem analítico-estocástica de doenças priônicas [dissertação]*. Alagoas: Centro de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal de Alagoas; 2005.

25. Fichthorn, KA, Weinberg, WH. Theoretical foundations of dynamical Monte Carlo simulations. *J. Chem. Phys.*, 1991, vol. 95, nº 2, p. 1090-1096.
26. Galdino ML, de Albuquerque SS, Ferreira AS, Cressoni JC, dos Santos RJV. Thermo-kinetic model for Prion diseases. *Physica A*, 2001, vol. 295, p. 58-63.
27. Gibson M, Bruck J. Efficient exact stochastic simulation of chemical systems with many species and many channels. *J. Phys. Chem. A*, 2000, vol. 104, nº 9, p. 1876-1889.
28. Gillespie DT. Exact stochastic simulation of coupled chemical-reactions. *J. Phys. Chem.*, 1977, vol. 81, nº 25, p. 2340-2361.
29. Harrison RS, Sharpe PC, Singh Y, Fairlie DP. Amyloid peptides and proteins in review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2007, vol.159, p.1-77.
30. Hayes, B. Randomness as a resource. *Am Sci*, 2001, vol. 89 nº. 4, p. 300-304.
31. Hehl ME. Linguagem de programação estruturada Fortran 77. São Paulo: Editora McGraw-Hill, 1986.
32. Hopp P, Webb CR, Jarp J. Monte Carlo simulation of surveillance strategies for scrapie in Norwegian sheep. *Prev Vet Med*, 2003, vol. 61, nº 2, p. 103-125.
33. Kim JS, Lee JW, Noh YK, Park JY, Lee DY, Yang KA, Chai YG, Kim JC, Zhang BT. An evolutionary Monte Carlo algorithm for predicting DNA hybridization. *Biosystems*, 2008, vol. 91, p. 69-75.
34. Landau DP, Binder K. A guide to Monte Carlo simulations in statistical physics. 2ª Edição. New York: Cambridge University Press, 2005.
35. Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. *Physiol Rev*, 2008, vol. 88, nº 2, p. 673-728.
36. Lins LD. Agulha de Buffon. 2004. Disponível em <www.cin.ufpe.br/~ldl/buffon.pdf>. Acesso em 12 jun. 2008.
37. Louzoun Y. The evolution of mathematical immunology. *Immunol Rev*. 2007, vol. 216, p. 9-20.
38. Magalhães ACR. Internalização e Tráfego de PrPs [Tese]. Minas Gerais: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais; 2005.
39. Małolepsza E, Boniecki M, Kolinski A, Piela L. Theoretical model of prion propagation: a misfolded protein induces misfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, vol. 102, nº 22, p.7835-7840.

40. Masel J, Jansen VAA. Designing drugs to stop the formation of prion aggregates and other amyloids. *Biophys Chem*, 2000, vol. 88, p. 47-59.
41. Matsumoto M, Nishimura T. Mersenne twister: A 623-dimensionally equidistributed uniform pseudorandom number generator. *ACM Trans Model Comput Simul*, 1998, vol. 8, n° 3, p. 3-30.
42. McLean AR, Bostock CJ. Scrapie infections initiated at varying doses: an analysis of 117 titration experiments. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2000, vol. 355, n° 1400, p. 1043-1050.
43. Metropolis N. The beginning of the Monte Carlo Method. *Los Alamos Science*, 1987, n° 15, p. 125-130.
44. Nieuwenhuijsen M, Paustenbach D, Duarte-Davidson R. New developments in exposure assessment: the impact on the practice of health risk assessment and epidemiological studies. *Environ Int*, 2006, vol. 32, n° 8, p. 996-1009.
45. Paisley LG, Hostrup-Pedersen J. A quantitative assessment of the risk of transmission of bovine spongiform encephalopathy by tallow-based calf milk-replacer. *Prev Vet Méd*, 2004, vol. 63, n° 1-2, p. 135-149.
46. Paisley LG, Hostrup-Pedersen J. A quantitative assessment of the BSE risk associated with fly ash and slag from the incineration of meat-and-bone meal in a gas-fired power plant in Denmark. *Prev Vet Méd*, 2005, vol. 68, n° 2-4, p. 263-275.
47. Peng Y, Hansmann UH. Helix versus sheet formation in a small peptide. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 2003, vol. 68, n° 4 Pt 1, p. 041911-1 a 041911-7.
48. Providelo FC. Modelo computacional da dinâmica de transmissão da tuberculose [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2000.
49. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982, vol. 216, p. 136-144.
50. Prusiner SB. Prions. *Sci Am*, 1984, vol. 251, n° 4, p. 48-57.
51. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, vol. 95, p. 13363-13383.
52. Prusiner SB, McCarty M. Discovering DNA encodes heredity and prions are infectious proteins. *Annu Rev Genet*, 2006, vol. 40, p. 25-45.
53. Rochet JC. Novel therapeutic strategies for the treatment of protein-misfolding diseases. *Expert Rev Mol Med*, 2007, vol. 9, n° 17, p. 1-34.

54. Rogers DW. Fifty years of Monte Carlo simulations for medical physics. *Phys Med Biol*, 2006, vol. 51, nº 13, p. 287-301.
55. Rollett AD, Manohar P. The Monte Carlo Method. In: Raabe D, Roters F, Barlat F, Chen LQ. *Continuum scale simulation of engineering materials: fundamentals – microstructures – process applications*. Weinheim: Wiley Interscience; 2004. p. 76-113.
56. Rubenstein R, Gray PC, Cleland TJ, Piltch MS, Hlavacek WS, Roberts RM, Ambrosiano J, Kim JI. Dynamics of the nucleated polymerization model of prion replication. *Biophys Chem*, 2007, vol. 125, nº 2-3, p. 360-367.
57. Rudyk H, Knaggs MH, Vasiljevic S, Hope J, Birkett C, Gilbert IH. Synthesis and evaluation of analogues of Congo red as potential compounds against transmissible spongiform encephalopathies. *Eur J Med Chem*, 2003, vol. 38, nº 6, p.567-579.
58. (a) São Paulo. Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo. Resolução SS-20, de 22 de fevereiro de 2006. “Atualiza a Lista das Doenças de Notificação Compulsória - DNC no Estado de São Paulo e dá outras providências.”. *Diário Oficial do Estado*, 2006. Disponível em <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/nive/dncsp_220206.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2008.
59. (b) São Paulo. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2006. *Vigilância das Doenças Priônicas no Estado de São Paulo*. Disponível em <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/aulas/7VEDCJESP.ppt>. Acesso em: 06 jun. 2008.
60. São Paulo. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2007. *Série histórica das doenças de transmissão hídrica e alimentar, Estado de São Paulo, 1998 – 2006*. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/ddtha_sh9805.htm>. Acesso em: 06 jun. 2008.
61. Sarkar, P. A Brief History of Cellular Automata. *ACM Computing Surveys*, 2000, vol. 32, nº 1, p.80-107.
62. Slepoy A, Singh RR, Pázmándi F, Kulkarni RV, Cox DL. Statistical mechanics of prion diseases. *Phys Rev Lett*, 2001, vol. 87, nº 5, p.058101-1 a 058101-4.
63. Slepoy A, Thompson AP, Plimpton SJ. A constant-time kinetic Monte Carlo algorithm for simulation of large biochemical reaction networks. *J. Chem. Phys.*, 2008, vol. 128, nº 20, p. 205101-1 - 205101-8.
64. Soto C. *Prions: the new biology of proteins*. Boca Raton: Editora Taylor & Francis, 2006.
65. Student. The probable error of a mean. *Biometrika*, 1908, nº 6, p.1-24.

66. Tada T. A Fortran77 code version of mt19937ar.c. 2002. Disponível em <<http://www.math.sci.hiroshima-u.ac.jp/~m-mat/MT/VERSIONS/FORTRAN/mt19937ar.f>>. Acesso em: 06 fev. 2007.
67. Tanaka M, Collins SR, Toyama BH, Weissman JS. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature*, 2006, vol. 442, nº 3, p. 585-589.
68. Turner TE, Schnell S, Burrage K. Stochastic approaches for modelling in vivo reactions. *Comput Biol Chem*, 2004, nº 28, vol. 3, p.165-178.
69. Valleron AJ, Boelle PY, Will R, Cesbron JY. Estimation of epidemic size and incubation time based on age characteristics of vCJD in the United Kingdom. *Science*, 2001, vol. 294, p. 1726-1728.
70. Viher B, Dobnikar A, Zazula D. Cellular automata and follicle recognition problem and possibilities of using cellular automata for image recognition purposes. *Int J Med Inform*, 1998, vol. 49, nº 2, p. 231-241.
71. Vuolo, JH. Fundamentos da teoria de erros. 2ª edição. São Paulo: 2001.
72. Watanabe A, Fujimura S, Kikuchi T, Gomi K, Fuse K, Nukiwa T. Evaluation of dosing designs of carbapenems for severe respiratory infection using Monte Carlo simulation. *J Infect Chemother*, 2007, vol. 13, nº 5, p.332-340.
73. Wickner RB, Edskes HK, Shewmaker F, Nakayashiki T. Prions of fungi: inherited structures and biological roles. *Nat Rev Microbiol*, 2007, vol. 5, nº 8, p.611-618.
74. Wolfram S. Cellular Automata. Los Alamos Science, 1983, nº 9, p. 2-21.
75. Zhdanov VP. Three-dimensional Monte Carlo simulations of intracellular diffusion and reaction of signaling proteins. *J Chem Phys*, 2007, vol. 127, nº 3, p. 035101-1 a 035101-4.