

## 1. Introdução

### 1.1. A *Pseudomonas aeruginosa*:

A *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 1) é um bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo, que mede 0,5 a 0,8  $\mu\text{m}$  por 1,5 a 3,0  $\mu\text{m}$ , e pertence à família *Pseudomonadaceae*. É classificada em 8 grupos (Skariyachan et al., 2017), sendo a *P. aeruginosa* a espécie-tipo do seu grupo, que contém mais 12 integrantes (Todar, 2008).



**Figura 1:** Método de Gram de células de *Pseudomonas aeruginosa*. Fonte: <http://pt.mymedinform.com/>, acessado em 7 de maio de 2018.

Esta bactéria é ubíqua no solo e na água, e em superfícies em contato com o solo ou água. Seu metabolismo é respiratório e nunca fermentativo, mas crescerá na ausência de  $\text{O}_2$  se  $\text{NO}_3$  estiver disponível como um aceptor de elétrons respiratório (Todar, 2008).

É um organismo oportunista, que raramente afeta tecidos saudáveis, podendo, porém, infectar qualquer tecido comprometido de alguma forma (European Commission, 2008).

A *P. aeruginosa* também apresenta uma combinação de características fisiológicas que são dignas de nota e podem estar relacionadas à sua patogênese: possui necessidades nutricionais muito simples; versatilidade metabólica; temperatura ideal para o crescimento de  $37^\circ\text{C}$ , sendo capaz de crescer a temperaturas de até  $42^\circ\text{C}$ ; é tolerante à uma ampla variedade de condições físicas; é resistente à, além de muitos antibióticos, altas concentrações de sais e corantes, antissépticos, bacteriófagos, desinfetantes e outros sistemas de defesa do hospedeiro (Todar, 2008; Skariyachan

et al., 2017; Dheilly et al., 2010). Estas propriedades naturais da bactéria contribuem, sem dúvida, para o seu sucesso ecológico como patógeno ubíquo e nosocomial, resultando na habilidade de adquirir uma infinidade de mutações adaptativas (Stefani et al., 2017).

É integrante do grupo de patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e espécies de *Enterobactérias*), que são os principais responsáveis por infecções nosocomiais (Muimhneacháin et al., 2018). As opções de tratamento para infecções causadas por integrantes deste grupo são extremamente limitadas, devido à sua resistência à maioria das classes de antibióticos atuais (Muimhneacháin et al., 2018). Alguns antibióticos como fluoroquinolonas, gentamicina e imipeném apresentam certa eficácia, porém somente contra uma faixa extremamente estreita de cepas desta bactéria (European Commission, 2008). Vários tipos de vacinas estão sendo testados, mas nenhum está disponível atualmente para uso geral (EHA Consulting Group, 2018).

## 1.2. Cepa CCBH 4851 e a polimixina B:

A cepa *P. aeruginosa* CCBH 4851 é a utilizada neste projeto, e foi isolada em 2008 da ponta de um cateter de um paciente hospitalizado em Goiás e depositada na Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar, situada no Laboratório de Infecção Hospitalar da Fiocruz (Silveira et al., 2014). Sua sequência genômica foi publicada em 2014, por Silveira e colaboradores. Inúmeros antibióticos foram testados, mas esta cepa mostrou-se resistente a todas, com exceção da polimixina B (PmxB).

De acordo com Mendes e Burdmann (2009), as polimixinas (polimixinas A, B, C, D e E) deixaram de ser usadas rotineiramente em virtude do desenvolvimento de outros agentes antimicrobianos com toxicidade inferior. Porém com o desenvolvimento de bactérias multirresistentes, o interesse por esta classe de medicamentos ressurgiu, apesar desta classe destacar-se dentre os fármacos nefrotóxicos (Neiva et al., 2013).

Os efeitos adversos mais importantes da PmxB são nefrotoxicidade (principalmente insuficiência renal aguda) e neurotoxicidade severas, por atuar na membrana citoplasmática, comprometendo as propriedades osmóticas e os mecanismos de transporte da membrana celular, uma vez que a composição dessa estrutura na bactéria e na célula humana é semelhante (Hermsen et al., 2003). Outros efeitos descritos são *rash* cutâneo, dor severa no local de injeção intramuscular, tromboflebite nos locais de injeção intravenosa e febre (Polixil B, bula de remédio).

### 1.3. Rede de virulência:

A virulência de um microorganismo é definida por sua capacidade de se associar a um hospedeiro propenso, de invadir e multiplicar-se dentro dele, de produzir doença local e / ou sistêmica e, por fim, de dominar e até matar o hospedeiro (Pollack, 1984).

A *P. aeruginosa* produz uma série impressionante de fatores de virulência para neutralizar as defesas do hospedeiro e facilitar a competição inter-bacteriana (Bhagirath et al., 2016). A maquinaria de virulência de *P. aeruginosa* compreende tanto determinantes associados às células, como lipopolissacarídeos, pili, flagelos, quanto inúmeros fatores secretados por ela, como elastases, proteases, exotoxinas, polissacarídeos extracelulares (Balasubramanian et al., 2013). A expressão de genes de virulência em *P. aeruginosa* é controlada por circuitos reguladores e sistemas de sinalização extremamente complexos (Bhagirath et al., 2016).

A rede de regulação gênica de virulência (RRGV) da CCBH 4851 foi construída contendo genes de virulência da cepa de referência *P.aeruginosa* PAO1 (Balasubramanian) em comum com ortologia da rede de regulação gênica (RRG) da *P.aeruginosa* CCBH 4851 desenvolvida por Medeiros Filho, 2018 (Referência não disponível). Esta reconstrução da rede de regulação gênica é um trabalho do Grupo de Pesquisa em Modelagem Computacional de Bactérias Multirresistentes da Fiocruz que será relatado em detalhes em artigo a ser submetido ainda em 2018. Segue mais informações no item 3 (Metodologia) do presente trabalho.

#### 1.4. Resistência aos antibióticos, inclusive beta-lactâmicos:

Graças à exposição das bactérias aos antibióticos em situações clínicas fechadas, a resistência à múltiplas drogas pode desenvolver-se mais rapidamente em estabelecimentos de saúde do que na comunidade em geral, por conta do aumento da pressão evolutiva e da transferência horizontal de genes (Barlow, 2009).

O grupo dos antibióticos beta lactâmicos é formado pelas penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbonêmicos, monobactâmicos dentre outros, que possuem núcleo beta lactâmico (Azevedo, 2014). O mecanismo de ação desses medicamentos se dá mediante à inibição da síntese da parede celular das bactérias, impedindo a ligação cruzada dos peptidoglicanos, substância que confere proteção ao microrganismo (e-Santè, 2018). A membrana externa constitui, na verdade, uma barreira de penetração considerável, que é em grande parte responsável pela alta resistência intrínseca da *P. aeruginosa* (Godfrey & Bryan, 1984). Apesar do desenvolvimento de novos beta-lactâmicos, mesmo que em uma escala menor, a *P. aeruginosa* continuou a expressar mecanismos de resistência contra até mesmo os agentes mais potentes (Song et al., 2002).

Hogardt et al., 2006, e Oliver & Mena, 2010, mostraram que as células do hospedeiro apresentem níveis mais altos de resistência em infecções crônicas. A transição de infecção aguda para uma fase crônica é o resultado de inúmeras mudanças na fisiologia celular em resposta à estímulos externos (Hasset et al., 2009). Dentre estas alterações estão a regulação negativa de genes de virulência aguda com uma regulação positiva concomitante de fenótipos de infecção crônica e resistência a antibióticos, facilitando infecções recalcitrantes (Hogardt & Heesemann, 2013; Hasset et al., 2009). A invasão no hospedeiro, o estabelecimento da infecção e a transição subsequente para a fase crônica envolvem a expressão rigidamente regulada de muitos genes associados ao metabolismo, virulência e resistência a antibióticos (Balasubramanian, 2013). A carga cada vez maior de resistência diminui a eficácia dos antibióticos convencionais, enquanto pacientes gravemente doentes não respondem aos agentes apropriados, mesmo quando infectados por bactérias suscetíveis a eles (Hauser, 2011).

Segundo Muimhneacháin e colaboradores (2018), a história mostra que antibióticos apenas atrasam o início de resistência em bactérias, e que novas classes

desse medicamento são continuamente necessárias. Apesar disto, nas últimas décadas houve um declínio drástico em pesquisas para desenvolver novos antibióticos pela indústria farmacêutica, devido a altos custos para criar uma nova droga, aos regulamentos de preços governamentais mais rigorosos e à relação custo-eficácia dos medicamentos genéricos (Muimhneacháin et al., 2018).

Portanto identificar o gene que ativa ou inibe determinado fenótipo de virulência e controlar sua expressão é um dos métodos para aniquilar a virulência da bactéria, auxiliando no desenvolvimento de novas terapias que visam bloquear estes fenótipos e mecanismos, e não apenas matar ou inibir o crescimento do organismo (Hauser, 2011).

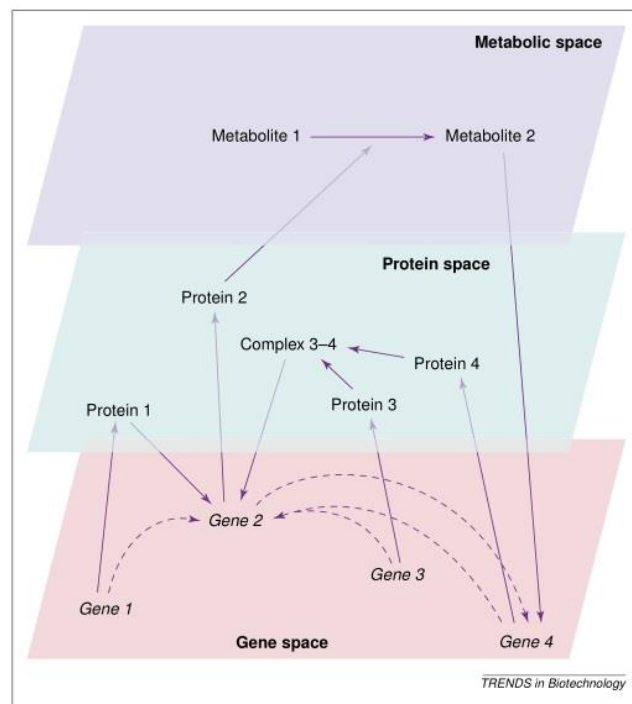
#### 1.5. Abordagem *in silico*:

Uma abordagem teórica, com menor custo, e com alta acurácia, por biologia de sistemas, pode auxiliar no desenvolvimento de novas drogas pela metodologia de inibir mecanismos de virulência, já que possibilita observar processos celulares de maneira sistêmica e integrada computacionalmente (Wang et al., 2015).

Segundo Santos et al., 2018, o principal objetivo da biologia de sistemas atualmente, de uma perspectiva ampla, é explicar como um organismo vivo realiza suas atividades básicas de crescimento, manutenção e reprodução. Conforme Wang et al. (2012), esta área visa elucidar como comportamentos de sistemas biológicos emergem das propriedades dos componentes e suas interações nestes sistemas, usando uma combinação de técnicas experimentais e abordagens computacionais para obter uma maior compreensão sobre sua complexidade.

Albert (2008) diz que as abordagens por biologia de sistemas geralmente consistem em duas etapas, que foram realizadas no presente trabalho. A primeira é a construção de um modelo do sistema biológico de interesse; uma representação que incorpora o conhecimento existente (no caso, a RRGV da CCBH 4851). Este modelo pode, então, ser submetido a várias simulações, usadas para gerar previsões qualitativas ou quantitativas sobre o comportamento geral do sistema (como detecção de atratores).

Uma das áreas da biologia de sistemas é a biologia de rede, que lida com a modelagem do comportamento celular em termos de estruturas de rede, como vias de sinalização e RRGs (Costa et al., 2008). Nessas redes, diferentes entidades biológicas, como genes, proteínas e metabólitos relacionam-se, dando origem a um sistema integrado (Figura 2).

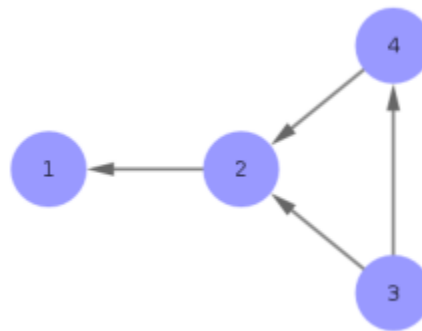


**Figura 2:** Representação da integração celular (Fonte: Brazhinik et al., 2002).

O Grupo de Pesquisa em Modelagem Computacional de Bactérias Multirresistentes da Fiocruz está desenvolvendo modelos computacionais da RRG da *P.aeruginosa* CCBH 4851, afim de prever comportamentos celulares, incluindo os relacionados à multirresistência, através das moléculas e suas interações para identificar possíveis alvos terapêuticos.

Dentro de uma célula há um conjunto de genes relacionados entre si. Ou seja, um determinado gene que seja um fator de transcrição pode ter influência sobre um grande número de genes que estarão ligados a ele. Portanto, verificar as interações entre os fatores de transcrição e os genes influenciados resulta em um grafo direcionado (Garg et al., 2012) (Figura 3). Um único fator de transcrição pode

influenciar a expressão de centenas de genes direta ou indiretamente. Dependendo da presença ou ausência de um determinado fator de transcrição, haverá a presença ou não de um determinado conjunto de genes. Assim, é possível prever o que pode acontecer através do computador, sendo possível fazer análises de perturbações no sistema para observar quais são fundamentais para o organismo e quais não são. As que são, transformam-se em potenciais alvos terapêuticos.



**Figura 3:** Exemplo de grafo direcionado. Fonte: Burke, 2016

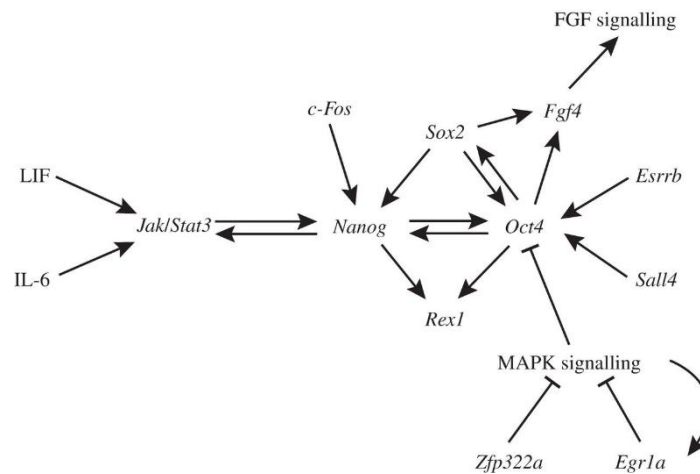
Para estas análises, é de muito interessante o desenvolvimento de regras booleanas, pois a rede de expressão gênica em si, em uma abstração da realidade, é booleana. Ou seja, de forma abstrata, ela é um sistema cujos eventos podem ser representados por dois estados possíveis para cada elemento da rede, e um conjunto de regras de transição (Covert, 2015).

#### 1.5.1. O que são Redes de Regulação Gênica?

Todos os processos fisiológicos são controlados, em última instância, pela interação do universo com os genes. A dinâmica destes genes, a forma como interagem entre si e com sinais do ambiente formam uma grande rede de influências. Podemos pensar em todos esses genes e proteínas como agentes que interagem com outros, segundo dinâmicas definidas das mais diferentes formas (Vision USP, 2018).

A maquinaria molecular de que a célula dispõe para cumprir sua função e se multiplicar é criada com base em seu genoma. Proteínas são sintetizadas de acordo com a demanda, e essa regulação da expressão gênica é feita através de fatores de

transcrição, os quais se ligam em regiões promotoras (sítios de ligação) de genes específicos (Covert, 2015), podendo incentivar ou inibir a expressão do gene. Uma vez que essas proteínas são produtos de outros genes, pode-se indicar a relação entre estes componentes no que tange a regulação de suas expressões (Burke, 2016). Ou seja, uma proteína pode ativar (ou inibir) a funcionalidade de outro gene ou proteína. Diferentes respostas e variações na expressão gênica são cuidadosamente reguladas pela ação dos fatores de transcrição (Das et al., 2010). Este sistema de regulação da expressão gênica é comumente modelado em formato de rede onde os vértices representam genes e os links entre os vértices podem representar dois tipos de interação: ativação ou inibição da expressão gênica (Garg, 2012). Desta forma, redes de regulação de expressão gênica são representadas por redes direcionadas (Figura 4).



**Figura 4:** Rede de regulação gênica de células tronco no desenvolvimento embrionário de ratos (*Mus musculus*). Fonte: David-Emlyn et al., 2014.

O processo para identificar a estrutura de uma RRG em laboratório envolve diversos ensaios como eletroforese, *microarrays* e também técnicas computacionais de bioinformática para analisar possíveis sequências promissoras a receber fatores de transcrição (Materna, 2008). Para determinar com exatidão essas interações, é necessário gerar dados para alimentar esse tipo de rede (Burke, 2016). Os dados gerados até então para diversos organismos e linhagens celulares podem ser encontrados em banco de dados como *GeneNetwork*, *Reactome.org*, *Pseudomonas Genome DB*, dentre muitos outros. Os dados fornecidos por uma RRG servem como base para simulações computacionais de expressão gênica podendo prever em



alguns casos, comportamentos celulares (Karlebach, 2008). Os benefícios de modelos precisos de RRGs para medicina e biotecnologia são de grande valia no entendimento do funcionamento de um sistema vivo, porém ainda são necessários muitos avanços para que se possam obter mapas mais confiáveis e de maior porte.

#### 1.5.2. Modelos booleanos em sistemas biológicos:

Redes booleanas são modelos baseados em lógica usadas como ferramentas preditivas sobre um sistema que podem ser aproveitadas na ausência de informações confiáveis sobre os parâmetros (Wynn et al., 2012). Há, todavia, a necessidade de caracterizar adequadamente a natureza de todas as interações na rede e entender o significado implícito das funções lógicas usadas no modelo.

De acordo com Kaufmann e Mueller-Roeber (2017), um modelo booleano dinâmico de uma RRG possui dois componentes essenciais:

- Uma lista de genes que resume as propriedades de interesse do sistema em desenvolvimento, com o intuito de prever como essas propriedades mudarão ao longo do tempo, e
- Um conjunto de regras de atualização que especificam em termos de proposições lógicas ou tabelas verdade como a atividade de cada gene muda ao longo do tempo.

O modelo booleano de uma RRG é um grafo direcionado (rede), no qual os nós representam os elementos de um sistema (genes, proteínas), e as arestas que os ligam representam relações reguladoras entre elementos (ativação ou inativação). Mais definições estão na Tabela 1.

**Tabela 1.** Conceitos do modelo booleano da RRG (traduzido e adaptado de Kaufmann e Mueller-Roeber, 2017).

Conceitos	Definições
Nó	Representação de uma molécula (gene, proteína, ...)
Arestas	Interação reguladora representando a influência funcional
Estado do nó	Valor de expressão (1 ou 0) que um nó assume em um determinado momento
Estado de rede	Valores de expressão (1 ou 0) atribuídos a todos os nós da rede
Atrator	Conjunto de estados de rede que se alternam entre si ao longo da evolução temporal do sistema. Um atrator simples é composto de um único estado, enquanto um atrator complexo é composto de múltiplos estados
Fenótipo celular observável	Perfis de expressão gênica (configurações do gene) obtidos de ensaios experimentais e reportados na literatura científica para um tipo particular de célula
Regra de atualização	Proposição lógica formalizando a maneira que um determinado gene depende da atividade de seus reguladores
Nó de entrada	Nós que possuem apenas arestas de saída; não mudam em função do estado de rede

Este tipo de representação booleana é muito comum em biologia, embora dificilmente seja chamado assim (Albert et al., 2008). Por exemplo, a análise dos níveis de expressão gênica leva à uma classificação de genes como diferencialmente expressos ou não; durante uma infecção, o patógeno é eliminado ou persiste; a concentração de uma molécula, por exemplo, está acima ou abaixo de um certo limite; etc. Esta classificação determinística de uma dada característica celular foi comparada ao cálculo digital (Bornholdt, 2008). Fundamentalmente, as leituras digitais são binárias de 0 e 1, sendo 0 igual a ausente/inibido/*False* e 1 sendo igual a presente/ativo/*True*.

Essa classificação é um desejo muito natural de ordenar e categorizar os fenômenos observados e estimar intuitivamente o resultado dos mecanismos reguladores (Albert, et al., 2008).

Modelos de redes booleanas foram apresentadas pela primeira vez por Kauffman e Thomas (Glass et al., 1973; Thomas, 1973), e têm sido aplicados com sucesso na modelagem de redes de sinalização e regulação de genes em uma variedade de sistemas biológicos (Li et al., 2006; Giacomantonio et al., 2010; Schlatter et al., 2009; Albert et al., 2003; Saez-Rodriguez et al., 2007; Samaga et al., 2009; Morris et al., 2010; Steve et al., 2008), para analisar redes de sinalização humana associadas a doenças para prever mecanismos de patogênese e potenciais alvos terapêuticos (Zang et al., 2008; Saadatpour et al., 2011; Schlatter et al., 2011; Thakar et al., 2007; Thakar et al., 2010; Walsh et al., 2011). Além disso, também estão sendo usados para construir modelos de redes biológicas que podem ser integradas em modelos de múltiplas escalas, que integram diferentes escalas e fenômenos em um sistema ou processos biológicos (Wynn et al., 2013). Na literatura, foram desenvolvidos modelos multiescala de crescimento do câncer que explicam os fatores celulares, genéticos e ambientais que regulam o crescimento do tumor (Ribba et al., 2006; Jiang, Y. et al., 2005).

Em conformidade com Karlebach (2008), essenciais para estes modelos são as ferramentas computacionais, que podem responder a várias questões: qual é a gama completa de comportamentos que este sistema exibe sob diferentes condições? Quais mudanças são esperadas na dinâmica do sistema se certas partes pararem de funcionar? Eles permitem que os usuários obtenham um entendimento básico das diferentes funcionalidades de uma determinada rede sob diferentes condições, e decifrar a estrutura e a dinâmica dessas redes é o primeiro passo para entender o comportamento geral da célula (Akutsu et al., 1999).

Estes modelos podem ser síncronos ou assíncronos, que são duas das formas de atualização da rede booleana. Em uma rede booleana síncrona, todos os nós atualizam seus valores de expressão simultaneamente em pontos de tempo consecutivos (Zheng et al., 2013). Assume-se que tanto o processo de expressão quanto o de inibição gênica aconteçam em intervalos regulares e ao mesmo tempo. No entanto, na realidade, os genes não atualizam seus valores todos de maneira simultânea, sendo esta uma crítica aos modelos síncronos de RRGs (Covert, 2015). Para tentar modelar melhor esta diferença de tempo entre expressão e inibição, Harvey e Bossomaier definiram redes booleanas assíncronas, nas quais um único nó aleatório é selecionado a cada momento e atualizado (Harvey et al., 1997). Por conta

disto, pode parecer que os modelos assíncronos representam de forma mais realista as redes biológicas, porém devido à sua complexidade, os algoritmos para identificar atratores de rede ainda são baseados principalmente nos modelos síncronos (Zheng et al., 2013). Ambas as opções de simulação foram utilizadas neste trabalho, pois são úteis para análises computacionais e têm seu valor. Por exemplo, na área de reprogramação celular *in silico*, vários trabalhos foram realizados com simulação booleana feita de forma síncrona, determinando atratores e considerando reprogramação nesta forma de atualização, produzindo resultados que podem ser verificados biologicamente (Kriete & Roland, 2013; Zañudo & Albert, 2015; Crespo et al., 2013).

Na simulação booleana de RRGs, tanto síncrona como assíncrona, um estado da rede evolui com o tempo e se estabiliza em um atrator. Assim, um atrator representa o comportamento a longo prazo dos genes ou proteínas nas redes reguladoras (Shmulevich e Aitchison, 2009). Todos os detectados neste trabalho são atratores complexos. A computação dos atratores nas redes booleanas é fundamental para entender as RRGs e processos celulares coordenados, como o ciclo celular, diferenciação celular (Zheng et al., 2013), resistência à antibióticos e fenótipos de virulência de organismos.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Este trabalho tem como objetivo geral desenvolver modelo booleano da RRGV da *Pseudomonas aeruginosa* CCBH 4851, determinar seus atratores na simulação síncrona e assíncrona, e mapear seus fenótipos de virulência.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Identificar com base na literatura os fenótipos de virulência da CCBH 4851;
- Montar rede booleana de RRGV da CCBH 4851;
- Identificar os genes específicos responsáveis pela regulação positiva ou negativa dos fenótipos de virulência;
- Verificar quais destes genes estão ativos nos atratores, ou seja, quais fenótipos estão presentes.

### 3. Metodologia:

#### 3.1. Montando a RRGV da *P.aeruginosa* CCBH 4851:

Balasubramanian et al., 2012, descreveu uma rede de virulência da *P.aeruginosa* PAO1 e fenótipos de virulência associados. Esta cepa foi sequenciada em 2000 por Stover et al., e foi usada como genoma de referência para a ortologia da RRG da CCBH 4851 feita por Medeiros Filho, 2018.

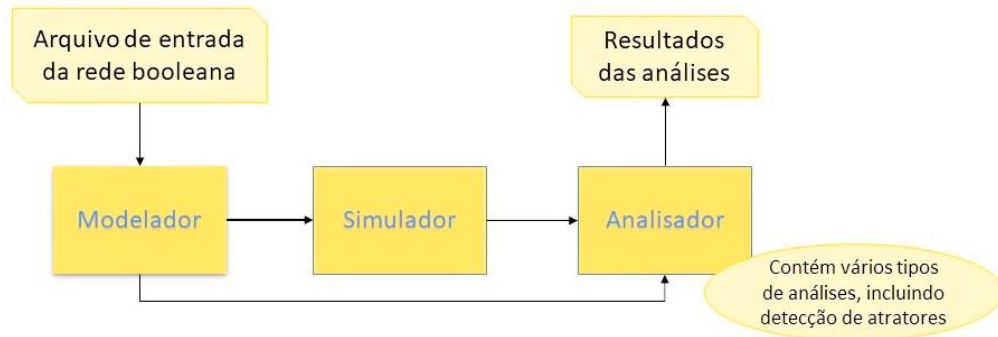
A RRGV da CCBH 4851 é composta por genes contidos na rede de virulência da PAO1 em comum com os da RRG da CCBH 4851 feita por Medeiros Filho. A RRGV da CCBH 4851 contém 96 nós/genes ao todo, sendo 83 deles genes de virulência e 13 genes associados, ou seja, genes da CCBH 4851 que interagem com os 83 de virulência.

Os fenótipos de virulência dos 83 genes em comum entre as redes foram anotados, juntamente com os genes reguladores positivos e negativos de cada um deles. São 11 fenótipos de virulência agudos e 7 de virulência crônicos anotados. O objetivo é observar o estado destes genes reguladores dos fenótipos nos atratores. Destes 18, 5 agudos e 2 crônicos encontram-se expressos nos atratores.

Em seguida, o modelo de regras booleanas da RRGV da CCBH 4851 (Anexo 1) foi construído nos moldes do software ASSA-PBN (Mizera et al., 2017) na forma de um modelo discreto, que é o mais simples capaz de descrever o comportamento biológico e propriedades sistêmicas de um sistema regulatório e mostrou-se muito eficaz para esses fins (Santos et al., 2018). O seu *pipeline* (Fig. 5) consiste em um modelador, um simulador e um analisador. De acordo com Mizera et al., 2017, a função principal do modelador é carregar um determinado arquivo de entrada de rede booleana e criar sua representação interna na memória; do simulador é de produzir gráficos de trajetórias do modelo carregado / gerado (não faz parte das análises deste trabalho); e do analisador é de fornecer várias funcionalidades para a análise dos modelos, incluindo determinísticas e probabilísticas para identificação dos seus atratores.

Vários pacotes de software estão disponíveis para visualização e análise de rede, incluindo *Boolnet* (Müssel et al., 2010), *ATLANTIS* (Shah et al., 2018) e

*Cytoscape* (Shannon et al., 2003), muito bons para redes pequenas. Porém, devido à natural complexidade da RRG da *P. aeruginosa*, foi utilizado o ASSA-PBN por apresentar resultados melhores ao analisar redes de maior porte.



**Figura 5:** *Workflow* no ASSA-PBN. Os arquivos de entrada neste trabalho são arquivos de definição do modelo booleano. Adaptado de Mizera et al. (2017).

Segundo o manual do ASSA-PBN (Yuan, 2018), o programa permite detectar atratores em maneiras de atualização síncrona e assíncrona, denominada no programa de ROG (*Random Selection of One Gene*). As regras booleanas, descritas no próximo item, são as mesmas para ambas as formas de atualização, sendo necessário apenas especificar o tipo no início do arquivo de entrada que contém as regras. Identificar atratores é importante pois eles representam o estado estável da bactéria. Além disso, atratores estão intimamente ligados com evolução do organismo, já que a bactéria evolui ao longo do tempo, permitindo, portanto, considerar cada ponto de evolução como um atrator (Sorrell et al., 2009).

### 3.2. Construção das regras booleanas e definição de atratores:

No modelo booleano da RRGV, cada nó é caracterizado por um valor lógico, ou seja, um estado Verdadeiro (valor 1, representando genes ativados) ou Falso (valor 0, genes inibidos), como mencionado no item 1.3.2. À medida que o tempo passa, o estado de cada nó é determinado pelos estados dos nós vizinhos (Saadatpour e Albert, 2013). Esta relação pode ser representada por funções lógicas usando os operadores NOT, AND e OR. O operador NOT representa relações inibitórias, o OR representa a regulação de um nó por vários reguladores que atuam de forma isolada

entre si, e o AND é usado quando a regulação deste nó depende de vários reguladores concomitantemente.

Esta representação retorna um valor Verdadeiro ou Falso, ou seja, o estado do nó pode permanecer igual ou mudar dependendo das interações. Assim, uma rede com N nós terá  $2^N$  estados possíveis.

O ASSA-PBN usa a seguinte representação para os operadores lógicos: “|” para (OR), “&” para (AND) e “!” para (NOT). Por exemplo, suponha-se que a regra de ativação do gene *fleQ* seja “ $fleQ = rpoD \& ( ! ( vfr | algZ ) )$ ”. Logo, *fleQ* só estará ativo na rede se o gene *rpoN* estiver presente e os genes *vfr* ou *algZ* **não** estiverem ativos.

Na RRGV da CCBH 4851, foram identificados 18 nós de entrada. Para detecção de atratores, houve a necessidade de estabelecer todos os 18 como “*true*”, ou seja, como ativos na rede e como autoreguladores (valores de expressão iguais a 1). Caso contrário, a análise de atratores ainda funcionaria, porém a quantidade de atratores gerados seria imensa. Além disso, o tempo de simulação seria muito longo, pois o programa iria considerar todas as possibilidades possíveis de cada um destes 18 nós serem 0/1. Portanto, para acelerar o processo de simulação e evitar uma quantidade exponencialmente maior de atratores, os valores de expressão dos nós de entrada, neste caso, foram fixados como *true*, pois não houve tempo de definir estes valores em função de uma determinada condição biológica. Outra análise possível seria definir alguns dos 18 nós como *true* (iguais a 1), outros como *false* (iguais a 0). Tudo depende da condição a ser simulada.

A detecção de atratores é implementada usando operações eficientes de diagrama de decisão binária (BDD), que é uma estrutura de dados simbólica compactada e eficiente (Mizera et al., 2017). Este BDD é baseado no conceito de componente fortemente conectado (SCC) (Mizera et al., 2017; Yuan et al., 2017; Kwiatkowska et al., 2011), sendo assim capaz de lidar com redes booleanas maiores e mais realista eficientemente. Segundo Mizera et al. (2017), a ideia dos métodos é a seguinte: uma rede booleana é decomposta em sub-redes, chamadas blocos, de acordo com os SCCs na estrutura da rede. Então, a detecção dos atratores é realizada em cada um dos blocos; finalmente, os atratores da rede original são recuperados com os atratores nos blocos. Como a detecção do atrator é realizada em blocos, a velocidade de detecção é muito mais rápida que a da rede maior original.



### 3.3. Associação dos fenótipos com atratores:

Balasubramanian et al., 2012, descreveu os fenótipos de virulência em infecção aguda e crônica presentes na rede de virulência da *P.aeruginosa* PAO1, estando associados aos seus genes reguladores. Após a etapa anterior de desenvolver a RRGV, foi realizado um mapeamento nela para averiguar quais genes estão associados na regulação de cada fenótipo.

Em seguida, foi observado o estado de seus reguladores na RRGV para averiguar a presença ou ausência do fenótipo de virulência. Uma regra lógica inibidora dominante foi aplicada para tal, com base na lógica descrita por Crespo et al., 2013. Ou seja, se nenhum de seus inibidores e pelo menos um de seus ativadores estiver ativo, então um gene se torna ativo; caso contrário, o gene é inativo.

#### 4. Resultados

Os 18 nós de entrada da RRGV que foram fixados em *true* na simulação síncrona e assíncrona estão na Tabela 2.

**Tabela 2.** Nós de entrada da RRGV da *P.aeruginosa* CCBH 4851.

Nós de entrada	
<b>phoP</b>	algW
<b>cbrB</b>	aR
<b>gacS</b>	cD
<b>rpoD</b>	lexA
<b>vfr</b>	bexR
<b>vqs</b>	PA4851_11910
<b>gacA</b>	PA4851_11915
<b>cysB</b>	qscR
<b>hiD</b>	rpoN

A sequência de todos nós, incluindo os que não são de entrada nos atratores detectados são:

1) <i>fleQ</i>	14) <i>toxA</i>	27) <i>pqsD</i>	37) <i>cupB1</i>
2) <i>pelA</i>	15) <i>prpL</i>	28) <i>lasR</i>	38) <i>cupC1</i>
3) <i>pelB</i>	16) <i>anr</i>	29) <i>rhIR</i>	39) <i>algR</i>
4) <i>fur</i>	17) <i>dnr</i>	30) <i>rpoS</i>	40) <i>algD</i>
5) <i>tpbA</i>	18) <i>hcnA</i>	31) <i>pprB</i>	41) <i>alg44</i>
6) <i>pelC</i>	19) <i>hcnB</i>	32) <i>exsA</i>	42) <i>algZ</i>
7) <i>pelD</i>	20) <i>hcnC</i>	33) PA4851_	43) <i>algC</i>
8) <i>pelE</i>	21) <i>narL</i>	02645	44) <i>algB</i>
9) <i>pelF</i>	22) <i>ptxS</i>	34) PA4851_	45) <i>algU</i>
10) <i>pelG</i>	23) <i>ptxR</i>	06725	46) <i>mexR</i>
11) <i>pchR</i>	24) <i>pqsA</i>	35) PA4851_	47) <i>mexT</i>
12) <i>pvdS</i>	25) <i>pqsB</i>	24455	48) <i>oprD</i>
13) <i>toxR</i>	26) <i>pqsC</i>	36) <i>cupA1</i>	49) <i>pqsE</i>

50) <i>mucA</i>	62) <i>psIA</i>	74)PA4851_	86) <i>cysB</i>
51) <i>mucB</i>	63) <i>psIB</i>	21320	87) <i>himAD</i>
52) <i>mvfR</i>	64) <i>psIC</i>	75) <i>sodB</i>	88) <i>algW</i>
53) <i>dksA</i>	65) <i>psID</i>	76) <i>pmrA</i>	89) <i>ampR</i>
54) <i>phoQ</i>	66) <i>psIE</i>	77) <i>algQ</i>	90) <i>mucD</i>
55) <i>recA</i>	67) <i>psIF</i>	78) <i>psrA</i>	91) <i>lexA</i>
56) <i>aprA</i>	68) <i>psIG</i>	79) <i>phoP</i>	92) <i>bexR</i>
57) <i>rsaL</i>	69) <i>psIH</i>	80) <i>cbrB</i>	93)PA4851_
58)PA4851_	70) <i>psII</i>	81) <i>gacS</i>	11910
12250	71) <i>psIJ</i>	82) <i>rpoD</i>	94)PA4851_
59) <i>pqsF</i>	72) <i>psIK</i>	83) <i>vfr</i>	11915
60) <i>pqsG</i>	73) <i>psIL</i>	84) <i>vqsM</i>	95) <i>qscR</i>
61) <i>pqsH</i>		85) <i>gacA</i>	96) <i>rpo</i>

#### 4.1. Atratores síncronos:

São 6 atratores, todos de dois estados, como explicado a seguir.

Com relação aos estados iniciais mencionados acima, os atratores detectados no modo síncrono são:

===== atrator #1 : 2 estados =====

1) 0 – 0	13) 0 – 0	25) 1 – 1	37) 0 – 0
2) 0 – 0	14) 1 – 1	26) 1 – 1	38) 0 – 0
3) 0 – 0	15) 0 – 0	27) 1 – 1	39) 0 – 0
4) 1 – 1	16) 1 – 1	28) 1 – 1	40) 1 – 1
5) 1 – 1	17) 1 – 1	29) 1 – 1	41) 1 – 1
6) 0 – 0	18) 1 – 1	30) 0 – 0	42) 0 – 0
7) 0 – 0	19) 1 – 1	31) 0 – 0	43) 0 – 0
8) 0 – 0	20) 1 – 1	32) 1 – 1	44) 1 – 1
9) 0 – 0	21) 1 – 1	33) 1 – 1	45) 0 – 0
10) 0 – 0	22) 1 – 1	34) 1 – 1	46) 1 – 1
11) 0 – 0	23) 1 – 1	35) 1 – 1	47) 0 – 0
12) 0 – 0	24) 1 – 1	36) 0 – 0	48) 1 – 1

49) 1 – 1	61) 1 – 1	73) 1 – 1	85) 1 – 1
50) 0 – 0	62) 1 – 1	74) 0 – 0	86) 1 – 1
51) 0 – 0	63) 1 – 1	75) 1 – 1	87) 1 – 1
52) 0 – 0	64) 1 – 1	76) 0 – 0	88) 1 – 1
53) 0 – 0	65) 1 – 1	77) 1 – 0	89) 1 – 1
54) 1 – 1	66) 1 – 1	78) 0 – 1	90) 1 – 1
55) 0 – 0	67) 1 – 1	79) 1 – 1	91) 1 – 1
56) 1 – 1	68) 1 – 1	80) 1 – 1	92) 1 – 1
57) 0 – 0	69) 1 – 1	81) 1 – 1	93) 1 – 1
58) 1 – 1	70) 1 – 1	82) 1 – 1	94) 1 – 1
59) 1 – 1	71) 1 – 1	83) 1 – 1	95) 1 – 1
60) 1 – 1	72) 1 – 1	84) 1 – 1	96) 1 – 1

Supondo que o estado A seja uma configuração de 0/1 representada acima pelos números antes do traço “-”, e o estado B seja outra configuração representada acima pelos números após o traço “-”, um atrator de 2 estados significa que a rede pula do estado A para o B e do B para o A, sendo esta alternância um *loop* infinito. Por exemplo, o nó *fleQ* (“1”) nunca vai alterar o valor de expressão de 0 neste atrator, pois as posições em ambos estados acima são 0 (“0 – 0”). Já o gene *fur* (“4”) nunca terá valor de expressão diferente de 1 neste atrator (“1 – 1”).

Os nós em vermelho são os únicos que apresentam mudança entre os dois estados (*algQ* e *psrA*, dos números 77 e 78 respectivamente).

===== atrator #2 : 2 estados =====

1)0 – 0	7)0 – 0	13) 0 – 0	19) 1 – 1
2)0 – 0	8)0 – 0	14) 1 – 1	20) 1 – 1
3)0 – 0	9)0 – 0	15) 0 – 0	21) 1 – 1
4)1 – 1	10) 0 – 0	16) 1 – 1	22) 1 – 0
5)1 – 1	11) 0 – 0	17) 1 – 1	23) 1 – 1
6)0 – 0	12) 0 – 0	18) 1 – 1	24) 1 – 1

25) 1 – 1	43) 0 – 0	61) 1 – 1	79) 1 – 1
26) 1 – 1	44) 1 – 1	62) 1 – 1	80) 1 – 1
27) 1 – 1	45) 0 – 0	63) 1 – 1	81) 1 – 1
28) 1 – 1	46) 1 – 1	64) 1 – 1	82) 1 – 1
29) 1 – 1	47) 0 – 0	65) 1 – 1	83) 1 – 1
30) 0 – 0	48) 1 – 1	66) 1 – 1	84) 1 – 1
31) 0 – 0	49) 1 – 1	67) 1 – 1	85) 1 – 1
32) 1 – 1	50) 0 – 0	68) 1 – 1	86) 1 – 1
33) 1 – 1	51) 0 – 0	69) 1 – 1	87) 1 – 1
34) 1 – 1	52) 0 – 0	70) 1 – 1	88) 1 – 1
35) 0 – 0	53) 0 – 0	71) 1 – 1	89) 1 – 1
36) 1 – 1	54) 1 – 1	72) 1 – 1	90) 1 – 1
37) 1 – 1	55) 0 – 0	73) 1 – 1	91) 1 – 1
38) 1 – 1	56) 1 – 1	74) 0 – 0	92) 1 – 1
39) 0 – 0	57) 0 – 0	75) 1 – 1	93) 1 – 1
40) 1 – 1	58) 1 – 1	76) 0 – 0	94) 1 – 1
41) 1 – 1	59) 1 – 1	77) 1 – 0	95) 1 – 1
42) 0 – 0	60) 1 – 1	78) 0 – 1	96) 1 – 1

No segundo atrator, três nós alternam em *loop* entre os estados: *ptxS* (nó de número 22), *algQ* (77) e *psrA* (78).

===== atrator #3 : 2 estados =====

1)0 – 0	4)1 – 1	7)0 – 0	10) 0 – 0
2)0 – 0	5)1 – 1	8)0 – 0	11) 0 – 0
3)0 – 0	6)0 – 0	9)0 – 0	12) 0 – 0

13) 0 – 0	34) 1 – 1	55) 0 – 0	76) 0 – 0
14) 1 – 1	35) 1 – 1	56) 1 – 1	77) 1 – 0
15) 0 – 0	36) 0 – 0	57) 0 – 0	78) 0 – 1
16) 0 – 0	37) 0 – 0	58) 1 – 1	79) 1 – 1
17) 0 – 0	38) 0 – 0	59) 1 – 1	80) 1 – 1
18) 1 – 1	39) 0 – 0	60) 1 – 1	81) 1 – 1
19) 1 – 1	40) 1 – 1	61) 1 – 1	82) 1 – 1
20) 1 – 1	41) 1 – 1	62) 1 – 1	83) 1 – 1
21) 0 – 0	42) 0 – 0	63) 1 – 1	84) 1 – 1
22) 1 – 1	43) 0 – 0	64) 1 – 1	85) 1 – 1
23) 1 – 1	44) 1 – 1	65) 1 – 1	86) 1 – 1
24) 1 – 1	45) 0 – 0	66) 1 – 1	87) 1 – 1
25) 1 – 1	46) 1 – 1	67) 1 – 1	88) 1 – 1
26) 1 – 1	47) 0 – 0	68) 1 – 1	89) 1 – 1
27) 1 – 1	48) 1 – 1	69) 1 – 1	90) 1 – 1
28) 1 – 1	49) 1 – 1	70) 1 – 1	91) 1 – 1
29) 1 – 1	50) 0 – 0	71) 1 – 1	92) 1 – 1
30) 0 – 0	51) 0 – 0	72) 1 – 1	93) 1 – 1
31) 0 – 0	52) 0 – 0	73) 1 – 1	94) 1 – 1
32) 1 – 1	53) 0 – 0	74) 0 – 0	95) 1 – 1
33) 1 – 1	54) 1 – 1	75) 1 – 1	96) 1 – 1

O terceiro atrator possui os nós *algQ* (77) e *psrA* (78) alternando novamente entre os estados de rede.

===== atrator #4 : 2 estados =====

1)0 - 0	24) 1 - 1	47) 0 - 0	70) 1 - 1
2)0 - 0	25) 1 - 1	48) 1 - 1	71) 1 - 1
3)0 - 0	26) 1 - 1	49) 1 - 1	72) 1 - 1
4)1 - 1	27) 1 - 1	50) 0 - 0	73) 1 - 1
5)1 - 1	28) 1 - 1	51) 0 - 0	74) 0 - 0
6)0 - 0	29) 1 - 1	52) 0 - 0	75) 1 - 1
7)0 - 0	30) 0 - 0	53) 0 - 0	76) 0 - 0
8)0 - 0	31) 0 - 0	54) 1 - 1	77) 1 - 0
9)0 - 0	32) 1 - 1	55) 0 - 0	78) 0 - 1
10) 0 - 0	33) 1 - 1	56) 1 - 1	79) 1 - 1
11) 0 - 0	34) 1 - 1	57) 0 - 0	80) 1 - 1
12) 0 - 0	35) 0 - 0	58) 1 - 1	81) 1 - 1
13) 0 - 0	36) 1 - 1	59) 1 - 1	82) 1 - 1
14) 1 - 1	37) 1 - 1	60) 1 - 1	83) 1 - 1
15) 0 - 0	38) 1 - 1	61) 1 - 1	84) 1 - 1
16) 1 - 1	39) 0 - 0	62) 1 - 1	85) 1 - 1
17) 1 - 1	40) 1 - 1	63) 1 - 1	86) 1 - 1
18) 1 - 1	41) 1 - 1	64) 1 - 1	87) 1 - 1
19) 1 - 1	42) 0 - 0	65) 1 - 1	88) 1 - 1
20) 1 - 1	43) 0 - 0	66) 1 - 1	89) 1 - 1
21) 1 - 1	44) 1 - 1	67) 1 - 1	90) 1 - 1
22) 0 - 1	45) 0 - 0	68) 1 - 1	91) 1 - 1
23) 1 - 1	46) 1 - 1	69) 1 - 1	92) 1 - 1

93) 1 – 1

94) 1 – 1

95) 1 – 1

96) 1 – 1

O quarto atrator detectado no modo de atualização síncrono apresenta *ptxS* (22), *algQ* (77) e *psrA* (78) em *loop* entre os estados.

===== atrator #5 : 2 estados =====

1) 0 – 0

21) 0 – 0

41) 1 – 1

61) 1 – 1

2) 0 – 0

22) 1 - 0

42) 0 – 0

62) 1 – 1

3) 0 – 0

23) 1 – 1

43) 0 – 0

63) 1 – 1

4) 1 – 1

24) 1 – 1

44) 1 – 1

64) 1 – 1

5) 1 – 1

25) 1 – 1

45) 0 – 0

65) 1 – 1

6) 0 – 0

26) 1 – 1

46) 1 – 1

66) 1 – 1

7) 0 – 0

27) 1 – 1

47) 0 – 0

67) 1 – 1

8) 0 – 0

28) 1 – 1

48) 1 – 1

68) 1 – 1

9) 0 – 0

29) 1 – 1

49) 1 – 1

69) 1 – 1

10) 0 – 0

30) 0 – 0

50) 0 – 0

70) 1 – 1

11) 0 – 0

31) 0 – 0

51) 0 – 0

71) 1 – 1

12) 0 – 0

32) 1 – 1

52) 0 – 0

72) 1 – 1

13) 0 – 0

33) 1 – 1

53) 0 – 0

73) 1 – 1

14) 1 – 1

34) 1 – 1

54) 1 – 1

74) 0 – 0

15) 0 – 0

35) 0 – 0

55) 0 – 0

75) 1 – 1

16) 0 – 0

36) 1 – 1

56) 1 – 1

76) 0 – 0

17) 0 – 0

37) 1 – 1

57) 0 – 0

77) 1 – 0

18) 1 – 1

38) 1 – 1

58) 1 – 1

78) 0 – 1

19) 1 – 1

39) 0 – 0

59) 1 – 1

79) 1 – 1

20) 1 – 1

40) 1 – 1

60) 1 – 1

80) 1 – 1



81) 1 – 1	85) 1 – 1	89) 1 – 1	93) 1 – 1
82) 1 – 1	86) 1 – 1	90) 1 – 1	94) 1 – 1
83) 1 – 1	87) 1 – 1	91) 1 – 1	95) 1 – 1
84) 1 – 1	88) 1 – 1	92) 1 – 1	96) 1 – 1

Novamente, *ptxS* (22), *algQ* (77) e *psrA* (78) alternam em *loop* entre dois estados no atrator 5.

===== atrator #6 : 2 estados =====

1)0 – 0	18) 1 – 1	35) 0 – 0	52) 0 – 0
2)0 – 0	19) 1 – 1	36) 1 – 1	53) 0 – 0
3)0 – 0	20) 1 – 1	37) 1 – 1	54) 1 – 1
4)1 – 1	21) 0 – 0	38) 1 – 1	55) 0 – 0
5)1 – 1	22) 0 – 1	39) 0 – 0	56) 1 – 1
6)0 – 0	23) 1 – 1	40) 1 – 1	57) 0 – 0
7)0 – 0	24) 1 – 1	41) 1 – 1	58) 1 – 1
8)0 – 0	25) 1 – 1	42) 0 – 0	59) 1 – 1
9)0 – 0	26) 1 – 1	43) 0 – 0	60) 1 – 1
10) 0 – 0	27) 1 – 1	44) 1 – 1	61) 1 – 1
11) 0 – 0	28) 1 – 1	45) 0 – 0	62) 1 – 1
12) 0 – 0	29) 1 – 1	46) 1 – 1	63) 1 – 1
13) 0 – 0	30) 0 – 0	47) 0 – 0	64) 1 – 1
14) 1 – 1	31) 0 – 0	48) 1 – 1	65) 1 – 1
15) 0 – 0	32) 1 – 1	49) 1 – 1	66) 1 – 1
16) 0 – 0	33) 1 – 1	50) 0 – 0	67) 1 – 1
17) 0 – 0	34) 1 – 1	51) 0 – 0	68) 1 – 1

69) 1 – 1	76) 0 – 0	83) 1 – 1	90) 1 – 1
70) 1 – 1	77) 1 – 0	84) 1 – 1	91) 1 – 1
71) 1 – 1	78) 0 – 1	85) 1 – 1	92) 1 – 1
72) 1 – 1	79) 1 – 1	86) 1 – 1	93) 1 – 1
73) 1 – 1	80) 1 – 1	87) 1 – 1	94) 1 – 1
74) 0 – 0	81) 1 – 1	88) 1 – 1	95) 1 – 1
75) 1 – 1	82) 1 – 1	89) 1 – 1	96) 1 – 1

O sexto e último atrator detectado na simulação síncrona tem *ptxS* (22), *algQ* (77) e *psrA* (78) em *loop* entre os estados.

#### 4.2. Atratores assíncronos:

São 4 atratores detectados no total, sendo representados aqui de maneira diferente da do modo síncrono. Os estados abaixo estão contraídos. O “\*” significa todas as possibilidades de um nó ser 0 ou 1, então um atrator de quatro estados terá dois “\*” na rede, representando: 0-0, 0-1, 1-0 e 1-1. Já o de oito estados terá três “\*”, retratando: 0-0-0, 0-0-1, 0-1-0, 1-0-0, 1-1-0, 1-0-1, 0-1-1, 1-1-1.

Com relação aos estados iniciais mencionados no início do capítulo, os atratores são:

===== atrator #1 : 4 estados =====

1) 0	7) 0	13) 0	19) 1
2) 0	8) 0	14) 1	20) 1
3) 0	9) 0	15) 0	21) 1
4) 1	10) 0	16) 1	22) 1
5) 1	11) 0	17) 1	23) 1
6) 0	12) 0	18) 1	24) 1

25) 1	43) 0	61) 1	79) 1
26) 1	44) 1	62) 1	80) 1
27) 1	45) 0	63) 1	81) 1
28) 1	46) 1	64) 1	82) 1
29) 1	47) 0	65) 1	83) 1
30) 0	48) 1	66) 1	84) 1
31) 0	49) 1	67) 1	85) 1
32) 1	50) 0	68) 1	86) 1
33) 1	51) 0	69) 1	87) 1
34) 1	52) 0	70) 1	88) 1
35) 1	53) 0	71) 1	89) 1
36) 0	54) 1	72) 1	90) 1
37) 0	55) 0	73) 1	91) 1
38) 0	56) 1	74) 0	92) 1
39) 0	57) 0	75) 1	93) 1
40) 1	58) 1	76) 0	94) 1
41) 1	59) 1	77) *	95) 1
42) 0	60) 1	78) *	96) 1

Os genes *algQ* (77) e *psrA* (78) alternam entre quatro estados neste atrator.

===== atrator #2 : 8 estados =====

1) 0	4) 1	7) 0	10) 0
2) 0	5) 1	8) 0	11) 0
3) 0	6) 0	9) 0	12) 0

13) 0	34) 1	55) 0	76) 0
14) 1	35) 0	56) 1	77) *
15) 0	36) 1	57) 0	78) *
16) 0	37) 1	58) 1	79) 1
17) 0	38) 1	59) 1	80) 1
18) 1	39) 0	60) 1	81) 1
19) 1	40) 1	61) 1	82) 1
20) 1	41) 1	62) 1	83) 1
21) 0	42) 0	63) 1	84) 1
22) *	43) 0	64) 1	85) 1
23) 1	44) 1	65) 1	86) 1
24) 1	45) 0	66) 1	87) 1
25) 1	46) 1	67) 1	88) 1
26) 1	47) 0	68) 1	89) 1
27) 1	48) 1	69) 1	90) 1
28) 1	49) 1	70) 1	91) 1
29) 1	50) 0	71) 1	92) 1
30) 0	51) 0	72) 1	93) 1
31) 0	52) 0	73) 1	94) 1
32) 1	53) 0	74) 0	95) 1
33) 1	54) 1	75) 1	96) 1

Os nós *ptxS* (22), *algQ* (77) e *psrA* (78) alternam entre os oito estados neste atrator.

===== atrator #3 : 8 estados =====

1) 0	24) 1	47) 0	70) 1
2) 0	25) 1	48) 1	71) 1
3) 0	26) 1	49) 1	72) 1
4) 1	27) 1	50) 0	73) 1
5) 1	28) 1	51) 0	74) 0
6) 0	29) 1	52) 0	75) 1
7) 0	30) 0	53) 0	76) 0
8) 0	31) 0	54) 1	77) *
9) 0	32) 1	55) 0	78) *
10) 0	33) 1	56) 1	79) 1
11) 0	34) 1	57) 0	80) 1
12) 0	35) 0	58) 1	81) 1
13) 0	36) 1	59) 1	82) 1
14) 1	37) 1	60) 1	83) 1
15) 0	38) 1	61) 1	84) 1
16) 1	39) 0	62) 1	85) 1
17) 1	40) 1	63) 1	86) 1
18) 1	41) 1	64) 1	87) 1
19) 1	42) 0	65) 1	88) 1
20) 1	43) 0	66) 1	89) 1
21) 1	44) 1	67) 1	90) 1
22) *	45) 0	68) 1	91) 1
23) 1	46) 1	69) 1	92) 1

93) 1	94) 1	95) 1	96) 1
-------	-------	-------	-------

Alternando entre os 8 estados, há *ptxS* (22), *algQ* (77) e *psrA* (78).

===== atrator #4 : 4 estados =====

1) 0	21) 0	41) 1	61) 1
2) 0	22) 1	42) 0	62) 1
3) 0	23) 1	43) 0	63) 1
4) 1	24) 1	44) 1	64) 1
5) 1	25) 1	45) 0	65) 1
6) 0	26) 1	46) 1	66) 1
7) 0	27) 1	47) 0	67) 1
8) 0	28) 1	48) 1	68) 1
9) 0	29) 1	49) 1	69) 1
10) 0	30) 0	50) 0	70) 1
11) 0	31) 0	51) 0	71) 1
12) 0	32) 1	52) 0	72) 1
13) 0	33) 1	53) 0	73) 1
14) 1	34) 1	54) 1	74) 0
15) 0	35) 1	55) 0	75) 1
16) 0	36) 0	56) 1	76) 0
17) 0	37) 0	57) 0	77) *
18) 1	38) 0	58) 1	78) *
19) 1	39) 0	59) 1	79) 1
20) 1	40) 1	60) 1	80) 1

81) 1	85) 1	89) 1	93) 1
82) 1	86) 1	90) 1	94) 1
83) 1	87) 1	91) 1	95) 1
84) 1	88) 1	92) 1	96) 1

Novamente, os nós *algQ* (77) e *psrA* (78) alternam entre quatro estados.

#### 4.3. Fenótipos de virulência:

A Tabela 3 descreve os fenótipos encontrados na RRGV da CCBH 4851, e seus respectivos reguladores positivos (ativadores) e negativos (inibidores).

**Tabela 3.** Fenótipos de virulência da RRGV e seus reguladores positivos e negativos. Baseado nos fenótipos descritos na rede de virulência de Balasubramanian et al.,2012.

Azul claro, fenótipos de virulência agudos   Azul escuro, fenótipos de virulência crônicos		
Fenótipo	Regulador positivo	Regulador Negativo
Mobilidade de contração ( <i>twitching</i> )	<i>algZ, algR, phoP</i>	Nenhum
Regulon de estresse/esforço	<i>rpoS</i>	Nenhum
Pyochelin	<i>pchR</i>	Nenhum
Pyoverdine	<i>pvdS</i>	Nenhum
PrpL (endoprotease)	<i>pvdS</i>	Nenhum
ToxA	<i>pvdS</i>	Nenhum
Fatores de virulência regulados pelo sensor de quorum (QS)	<i>mvfR, pqs, lasR, rhIR</i>	Nenhum
Sistema de secreção tipo 3 (T3SS)	<i>vfr</i>	<i>cupB, cupC, cupA, AlgR</i>
Sistema de secreção tipo 2 (T2SS)	<i>vfr, phoP</i>	Nenhum
Pili do tipo 4 (TFP)	<i>vfr</i>	Nenhum
Elastase	Nenhum	<i>mexT</i>
Formação de biofilme	<i>cupB, cupC, cupA, pel, psl, phoP, Alginato, TFP</i>	<i>fur, ampR</i>
Regulon Fur	Nenhum	<i>fur</i>
Resistência a betalactâmicos	<i>ampR</i>	Nenhum
Alginato	<i>algD, algC</i>	<i>algZ, phoP</i>
Sistema de secreção tipo 6 (T6SS) loci HSI-II, III	<i>mvfR, lasR</i>	Nenhum
Sistema de secreção tipo 6 (T6SS) loci HSI-I	Nenhum	<i>mvfR, lasR</i>
Resistência a fluoroquinolona	<i>mexT</i>	Nenhum

Observa-se que nos:

- Fenótipos de virulência aguda:
  - A Mobilidade de contração (*twitching*) está presente em todos os atratores pois *phoP* (79) é um dos nós de entrada;

- Fatores de virulência associados à fator de quórum estão presentes em todos os atratores pois os ativadores *pqs* (24, 25, 26, 27, 49, 59, 60, 61), *lasR* (28) e *rhlL* (29) estão presentes (apresentam valor de expressão 1) em todos eles. Este fenótipo não possui nenhum inibidor;
- O Sistema de Secreção do tipo 3 (T3SS) está presente no primeiro e terceiro atratores síncronos, e no primeiro e quarto atratores assíncronos. Isto ocorre devido aos seus inibidores *cupA* (36), *cupB* (37) e *cupC* (38) estarem inativos nestes atratores (valor de expressão 0);
- O Sistema de Secreção do tipo 2 (T2SS) está presente pois não apresenta nenhum inibidor e seus ativadores *phoP* (79, nó de entrada) e *vfr* (83) estão ativos em todos os atratores;
- Pili do tipo 4 (TFP) está presente devido à *vfr* estar ativo em todos os atratores, e à ausência de inibidores;
- Fenótipos de virulência crônica:
  - Resistência à beta-lactâmicos está presente em todos os atratores, pois não possui inibidor e *ampR* (89), seu regulador positivo, está ativo em todos;
  - Sistema de secreção tipo 6 (T6SS) loci HSI-II e III está presente em todos os atratores, por conta de não possuir inibidor, e por seu regulador positivo *lasR* (28) estar ativos em todos.

Os fenótipos de virulência da CCBH 4851 que não foram citados acima estão fora da RRGV, seja por um inibidor estar presente (vide Formação de Biofilme) ou por ativadores estarem ausentes nos casos em que o fenótipo não possui inibidores (vide Resistência a fluoroquinolona).



## 5. Discussão

### 5.1. Atratores:

Nota-se que em todos os atratores, os nós comportam-se de maneira muito parecida. Cada atrator é um conjunto de dois estados. Logo, se na rede houver um único gene com uma única variação de 1 – 0, por exemplo, ele faz parte de estados de rede diferentes. Supondo os dois atratores de 8 estados na simulação assíncrona; mesmo que os nós que apresentam mudança de estados sejam os mesmos (*ptxS*, *algQ* e *psrA*), os atratores são diferentes, pois os conjuntos de 0/1 dos nós restantes apresentam diferenças em algum lugar deles.

Os atratores encontrados dependem dos valores dos nós de entrada. Se utilizarmos um conjunto diferente de valores 0/1 para os nós de entrada provavelmente encontraremos atratores diferentes.

Como mencionado, três genes alternam entre estados de rede nos atratores:

- *ptxS*, que codifica a proteína PtxS e modula a síntese da exotoxina A (Colmer e Hamood, 1998), uma molécula participante da infecção por *P.aeruginosa* altamente específica e tóxica;
- *algQ*, identificado como sendo necessário para a mucoide, além de ativar a síntese de alginatos (Ambrosi et al., 2005). A produção de alginatos por *P.aeruginosa* não é constitutiva, mas é desencadeada por estresses (Schlichtman et al., 1994). O alginato confere um típico fenótipo mucoide que isola as bactérias das defesas do hospedeiro (Govan & Deretic, 1996; Hasset et al., 2002);
- *psrA*, que codifica para PsrA, que por sua vez, controla indiretamente a produção de PQS (*Pseudomona quinolone signal*), cuja presença regula múltiplos fatores de virulência e está entrelaçada à cascata de sinalização de sensor de quorum, na qual atua como regulador (Wade et al., 2005).

Com os fenótipos de virulência associados com os atratores da RRGV da *P.aeruginosa* CCBH4851, há a possibilidade de induzir a bactéria a um estado em que nenhum fenótipo esteja ativado, anulando assim, a virulência. Voltando ao exemplo

de reprogramação celular, considere-se uma célula tronco que se diferencia para uma muscular. Ao ser célula tronco, ela estava em um atrator específico; ao se diferenciar, entrou em outro atrator. Há a possibilidade de induzir uma célula muscular a uma de outro tipo, como neuronal, pela variação da expressão de alguns genes, induzindo-os de um atrator  $x$  para um  $y$ . Para tal, é necessário apenas conhecer os atratores para manipulá-los, e capacidade computacional.

## 5.2. Fenótipos

Os fenótipos de virulência presentes na RRGV da CCBH 4851 estão elucidados abaixo:

- *Twitching*: ou contrações musculares, são usadas pela *P.aeruginosa* e outros patógenos bacterianos como uma forma de motilidade associada à superfície que envolve a extensão, amarração e retração de pili polar do tipo IV (Bakaletz et al., 2005; Whitchurch & Mattick, 1994). Trabalhos demonstraram que a motilidade contrátil é necessária para a apoptose induzida por *P. aeruginosa* de células epiteliais das vias aéreas (Alarcon et al., 2009);
- Sensor de quórum: um mecanismo que regula a expressão de muitos fatores de virulência da *P.aeruginosa* (DeKlievit & Iglewski, 1999). É uma forma de comunicação intercelular que permite às bactérias coordenar a expressão gênica em resposta à densidade celular (Luen-Luen et al., 2007). Ele permite que as bactérias reconheçam a densidade populacional detectando e medindo o acúmulo de pequenas moléculas sinalizadoras específicas que são secretadas pelos membros da colônia (Michalska & Wolf, 2015);
- O sistema de secreção do tipo III (T3SS): Células bacterianas comunicam-se entre si e com o ambiente através de sistemas de secreção, para obter o nutriente, secretar proteínas tóxicas para o ambiente externo ou atuar diretamente em alvos de eucariotos (Chen et al., 2015). Foram encontrados sete tipos de sistemas de secreções, até o momento (T1SS-T7SS) (Chen et al., 2015). O T3SS é uma estrutura especializada semelhante à agulha que fornece toxinas efetivas diretamente das bactérias para o citosol do hospedeiro de uma maneira altamente regulada

(Hauser, 2009). Este sistema é ativado em contato com membranas celulares eucarióticas, interfere na transdução de sinais e causa morte celular ou alterações na resposta imune do hospedeiro (Galle et al., 2012);

- O sistema de secreção do tipo II (T2SS): dos 7 sistemas de secreção, sabe-se que T2SS e T3SS secretam a maioria das toxinas conhecidas (Jyot et al., 2010). O T2SS regula pelo menos 12 diferentes exoproteínas, incluindo toxinas e enzimas degradativas (Bleves et al., 2010). Este sistema é regulado por sensor de quorum e desempenha um papel importante na virulência global desta bactéria (Kipniss et al., 2006);

- Pili do tipo IV: são apêndices motorizados tipo fibra, uma adesina, da *P.aeruginosa* para detectar o contato inicial com as superfícies de forma mecânica, desencadeando a uma cascata de sinalização que resulta na expressão de centenas de genes associados à patogenicidade e à motilidade da contração específica da superfície (Gallan & Collmer, 1999). Assim, as bactérias usam pili não apenas para se unir e movimentar, mas também para detectar características mecânicas de seu ambiente e regular processos celulares de estilos de vida associados à superfície, promovendo assim uma adesão à superfície de longo prazo que pode estimular virulência adicional e vias de indução de biofilme (Persat et al., 2015);

- Resistência à beta-lactâmicos: Os mecanismos de resistência estão relacionados com a penetração do fármaco na parede celular, sua inativação pelas beta-lactamases (mediadas por cromossomos ou plasmídeos) localizadas no espaço periplasmático, sua afinidade pelas proteínas de ligação à penicilina, ou uma combinação desses fatores. (Gillet, 1982). A permeabilidade da membrana externa tem sido proposta como um importante fator contribuinte na resistência intrínseca dessa espécie (Zimmermann, 1980), além da formação de biofilme (Godfrey & Bryan, 1984);

- O sistema de secreção do tipo VI (T6SS): um dos sistemas de secreção descobertos mais recentemente (Pukatzki et al., 2006; Mougous et al., 2006)., presente em uma ampla gama de bactérias Gram-negativas. O T6SS fornece toxinas aos seus patógenos vizinhos, faz a translocação dos efetores da proteína para as células hospedeiras, e participa da formação de biofilme de *P. aeruginosa* (Chen et

al., 2015). Na *P. aeruginosa*, há três *loci* homólogos de T6SS: HSI-I, HSI-II e HSI-III e, apesar de haver apenas conhecimento parcial sobre eles, é conhecido que os três são regulados diferencialmente por sensor de quórum (Lesic et al., 2009), e que possuem distintas histórias evolutivas, sugerindo que eles foram adquiridos por transferência horizontal (Chen et al., 2015).

## 6. Conclusão

- O presente trabalho é o primeiro passo de muitos possíveis para simulação de atratores e análise da correlação com diversos fatores, não apenas de virulência, tanto no modo síncrono quanto no assíncrono;
- Observa-se que, apesar de os esquemas de atualizações da RRGV da CCBH 4851 serem aleatórios no modo de atualização assíncrono, foi possível caracterizar claramente atratores bem definidos;
- Os fenótipos associados aos atratores participam de vários mecanismos complexos da *P.aeruginosa* e possuem diversas funções, mas nota-se que todas estão relacionadas;
- Há como modelar matematicamente a indução entre estados diferentes da *P.aeruginosa* CCBH 4851, abrindo uma via de novas análises de alvos terapêuticos;
- Todo este trabalho é uma primeira aproximação que pode ser melhorada ao longo do avanço do projeto, que continuará em andamento.

## 7. Referências

- AKUTSU, T., MIYANO, S. & KUHARA, S. **Identification of genetic networks from a small number of gene expression patterns under the Boolean network model.** Pac Symp. Biocomput., 17–28 (1999);
- ALARCON, I.; EVANS, D. J.; FLEISZIG, S. M. J. **The Role of Twitching Motility in *Pseudomonas aeruginosa* Exit from and Translocation of Corneal Epithelial Cells.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 May ; 50(5): 2237–2244. doi:10.1167/iovs.08-2785;
- ALBERT, I.; THAKAR, J.; LI, S.; ZHANG, R.; ALBERT, R. **Boolean network simulations for life scientists.** Source Code for Biology and Medicine 2008, 3:16 doi:10.1186/1751-0473-3-16;
- ALBERT, R.; OTHMER, H. G. **The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the segment polarity genes in *Drosophila melanogaster*.** Journal of Theoretical Biology 223 (2003) 1–18; DOI:10.1016/S0022-5193(03)00035-3;
- AMBROSI, C.; TIBURZI, F.; IMPERI, F.; PUTIGNANI, L.; VISCA, P. **Involvement of AlgQ in Transcriptional Regulation of Pyoverdine Genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.** Journal Of Bacteriology (2005), p. 5097–5107; Vol. 187, No. 15; doi:10.1128/JB.187.15.5097–5107.2005;
- ARRUDA, E. A. G. **Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (1998). 31 (3): 503-504;
- AZEVEDO, S. M. M. **Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos** - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. USP, 2014;
- BAKALETZ LO, BAKER BD, JURCISEK JA, ET AL. **Demonstration of type IV pilus expression and a twitching phenotype by *Haemophilus influenzae*.** Infect Immun 2005;73:1635–1643;
- BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; KUMARI, H.; MATHEE, K. **A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa***

**virulence.** Nucleic Acids Research (2013), Vol. 41, No.1 (1–20)  
doi:10.1093/nar/gks1039;

BARLOW, M. **What Antimicrobial Resistance Has Taught Us About Horizontal Gene Transfer.** Methods in Molecular Biology, vol 532, Humana Press, 2009.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9_23);

BHAGIRATH, A. Y.; LI, Y.; SOMAYAJULA, D.; DADASHI, M.; BADR, S.; DUAN, K. **Cystic fibrosis lung environment and Pseudomonas aeruginosa infection.** BMC Pulmonary Medicine (2016); 16: 174. DOI: 10.1186/s12890-016-0339-5;

BLEVES S, VIARRE V, SALACHA R, MICHEL GP, FILLOUX A, VOULHOUX R. **Protein secretion systems in Pseudomonas aeruginosa: a wealth of pathogenic weapons.** Int. J. Med. Microbiol. (2010) 300:534–543.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.005>.

BORNHOLDT, S. **Boolean network models of cellular regulation: prospects and limitations.** J. R. Soc. Interface (2008) 5, S85–S94;  
DOI:10.1098/rsif.2008.0132.focus;

BRAZHNIK, P.; DE LA FUENTE, A.; & MENDES, P. **Gene Networks: How to Put the Function in Genomics.** In Trends in Biotechnology (2002), 20(11), 6;

BURKE, P. **Representation of Whole Cells using Complex Networks.** Dissertação de mestrado, UNIFESP (2016); DOI: 10.13140/RG.2.2.29133.44000;

COLMER, J. A.; HAMOOD, A. N. **Characterization of ptxS, a Pseudomonas aeruginosa gene which interferes with the effect of the exotoxin A positive regulatory gene, ptxR.** Mol Gen Genet (1998) 258: 250–259;

COMPUTER VISION RESEARCH GROUP – USP; <http://escience.ime.usp.br/vision/>;  
acessado em 7 de maio de 2018;

COVERT, M. W. **Fundamentals of Systems Biology: From Synthetic Circuits to Whole-cell Models.** CRC Press (2015);

COSTA, L. F.; RODRIGUES, F. A.; CRISTINO, A. S. **Complex networks: The key to systems biology.** Genetics and Molecular Biology (2008), 31, 3, 591-601;

CRESPO, I.; PERUMAL, T. M.; JURKOWSKI, W.; DEL SOL, A. **Detecting cellular reprogramming determinants by differential stability analysis of gene regulatory networks.** BMC Systems Biology (2013), 7:140.

<http://www.biomedcentral.com/1752-0509/7/140>;

DANA S. WADE, M. WORTH CALFEE, EDSON R. ROCHA, ELIZABETH A. LING, ELANA ENGSTROM, JAMES P. COLEMAN, AND EVERETT C. PESCI. **Regulation of Pseudomonas Quinolone Signal Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*.** J Bacteriol. 2005 Jul; 187(13): 4372–4380. doi: 10.1128/JB.187.13.4372-4380.2005;

DAS, S.; CARAGEA, D., WELCH, S. M.; HSU, H. W. **Handbook of Research on Computational Methodologies in Gene Regulatory Networks.** Medical Information Science Reference (2010); ISBN 978-1-60566-686-0 (ebook);

DAVID-EMLYN, P.; SHEN, M. M. **From blastocyst to gastrula: gene regulatory networks of embryonic stem cells and early mouse embryogenesis.**

Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 369 (2014). DOI: 10.1098/rstb.2013.0542;

DEKIEVIT, T. R.; IGLEWSKI, B. H. **Quorum sensing and virulence in *Pseudomonas*.** Sci. Med. (1999) 6:42–50;

DHEILLY, A.; SOUM-SOUTÉRA, E.; KLEIN, G. L.; BAZIRE, A.; COMPÈRE, C.; HARAS, D.; DUFOUR, A. **Antibiofilm Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain 3J6.** Applied and Environmental Microbiology, Vol 76, No 11, p. 3452–3461, June 2010. doi:10.1128/AEM.02632-09;

e-SANTÈ – BLOG DO FARMACÊUTICO, <http://blogdofarmaceutico.com.br/entenda-o-que-sao-antibioticos-beta-lactamicos/>, acessado em 22 de junho de 2018;

GALÁN, J. E.; COLLMER, A. **Type III secretion machines: Bacterial devices for protein delivery into host cells.** Science (1999) 284(5418):1322–1328;

GALLE, M.; CARPENTIER, I.; BEYAERT, R. **Structure and Function of the Type III Secretion System of *Pseudomonas Aeruginosa*.** Current Protein and Peptide Science, 2012, 13, 831-842;



- GARG, A.; DI CARA, A.; XENARIOS, I.; MENDOZA, L.; DE MICHELI, G. **Synchronous versus asynchronous modeling of gene regulatory networks.** *Bioinformatics* (2008) 24: 1917;
- GARG, A.; MOHANRAM, K.; MICHELI, G. D.; XENARIOS, I. **Implicit Methods for Qualitative Modeling of Gene Regulatory Networks. Gene Regulatory Networks: Methods and Protocols.** *Methods in Molecular Biology*, vol. 786, Chapter 22, 397-443, (2012). DOI 10.1007/978-1-61779-292-2\_22;
- GIACOMANTONIO, C. E.; GOODHILL, G. J. **A Boolean Model of the Gene Regulatory Network Underlying Mammalian Cortical Area Development.** *PLoS Comput Biol* 6(9): e1000936 (2010). DOI:10.1371/journal.pcbi.1000936;
- GILLETT, A. P. **Antibiotics against *Pseudomonas*.** *J. Antimicrob. Chemother.* 9 (1982); (Suppl. B):41-48.;
- GLASS, L. & KAUFFMAN, S. A. **The logical analysis of continuous, non-linear biochemical control networks.** *J. Theor. Biol.* 39, 103–129 (1973);
- GODFREY, A. J.; BRYAN, L. E. **Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to New r-Lactamase-Resistant ,3-Lactams.** *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Oct. (1984), p. 485-488;
- GOVAN, J. R. W.; DERETIC, V. **Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*.** *Microbiol. Rev.* 60:539–574 (1996);
- HARVEY, I.; BOSSOMAIER, T. **Time out of joint: Attractors in asynchronous random boolean networks.** *Proceedings of the Fourth European Conference on Artificial Life.* MIT Press (1997), Cambridge, 67–75;
- HASSETT, D. J.; CUPPOLETTI, J.; TRAPNELL, B.; LYMAR, S. V.; ROWE, J. J.; YOON, S. S.; HILLIARD, G. M.; PARVATIYAR, K.; KAMANI, M. C.; WOZNIAK, D. J.; HWANG, S. H.; MCDERMOTT, T. R.; OCHSNER, U. A. **Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets.** *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2002) 54:1425–1443;

HASSETT, D. J.; SUTTON, M. D.; SCHURR, M. J.; HERR, A. B.; CALDWELL, C. C.; MATU, J. O. **Pseudomonas aeruginosa hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways.** Trends Microbiol. (2009) Mar;17(3):130-8. doi: 10.1016/j.tim.2008.12.003;

HAUSER, A. R. **Pseudomonas aeruginosa: So Many Virulence Factors, So Little Time.** Critical Care Medicine (2011), September; 39(9): 2193–2194. doi:10.1097/CCM.0b013e318221742d;

HAUSER, A. R. **The Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by Injection.** Nat Rev Microbiol. (2009) September ; 7(9): 654–665. doi:10.1038/nrmicro2199;

HERMSEN, E. D.; SULLIVAN, C. J.; ROTSCHAFER, J. C. **Polymyxins: pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical applications.** Infect Dis Clin North Am. 2003; 17(3); 545-62;

HOGARDT, M.; HEESEMANN, J. **Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung.** Curr Top Microbiol Immunol. (2013), 358:91-118. doi: 10.1007/82\_2011\_199;

HOGARDT, M.; HOBOTH, C.; SCHMOLDT, S.; HENKE, C.; BADER, L.; HEESEMANN, J. **Stage-Specific Adaptation of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* Isolates during Chronic Pulmonary Infection in Patients with Cystic Fibrosis.** J Infect Dis. (2007) Jan 1;195(1):70-80. DOI: 10.1086/509821;

JIANG, Y.; PJESIVAC-GRBOVIC, J.; CANTRELL, C.; FREYER, J. P. **A Multiscale Model for Avascular Tumor Growth.** Biophysical Journal Volume 89 December (2005) 3884–3894; DOI: 10.1529/biophysj.105.060640;

JYOT, J.; BALLOY, V.; JOUVION, G.; VERMA, A.; TOUQUI, L.; HUERRE, M.; CHIGNARD, M.; RAMPHAL, R. **Type II Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: In Vivo Evidence of a Significant Role in Death Due to Lung Infection.** The Journal of Infectious Diseases 2011;203:1369–77. DOI: 10.1093/infdis/jir045;

KARLEBACH, G.; SHAMIR, R. **Modelling and analysis of gene regulatory networks.** Nature Reviews - Molecular Cell Biology (2008), volume 9, 770-780;

KAUFFMAN, S. **Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets**. J. of Theoretical Biology 22 (1969); 437–467;

KAUFMANN, K.; MUELLER-ROEBER, B. **Plant Gene Regulatory Networks: Methods and Protocols**. **Methods in Molecular Biology**, vol 1629, Humana Press, Chapter 19, page 299. 2017. DOI 10.1007/978-1-4939-7125-1;

KIPNIS E, SAWA T, WIENER-KRONISH J. **Targeting mechanisms of**

KRIETE, A.; ROLAND, E. **Computational Systems Biology 2nd Edition From Molecular Mechanisms to Disease**. Academic Press Elsevier, Chapter 12 (2013);

KWIATKOWSKA, M.; PARKER, D.; QU, H. **Incremental quantitative verification for Markov decision processes**. Proc. 41st IEEE/IFIP International Conference on Dependable Systems & Networks, IEEE (2011) 359–370;

LI, S.; ASSMANN, S. M.; ALBERT, R. **Predicting essential components of signal transduction networks: A dynamic model of guard cell abscisic acid signaling**. PLoS Biol 4(10): e312 (2006). DOI: 10.1371/journal.pbio.0040312;

LUEN-LUEN, L.; MALONE, J. E.; IGLEWSKI, B. H. **Regulation of the Pseudomonas aeruginosa Quorum-Sensing Regulator VqsR**. Journal Of Bacteriology (2007), p. 4367–4374 Vol. 189, No. 12 doi:10.1128/JB.00007-07;

MATERNA, S. C.; OLIVERI, P. **A protocol for unraveling gene regulatory networks**. Nat. Protoc., 3(12):1876–1887 (2008). DOI: nprot.2008.187[pii]\$\\backslash\$r10.1038/nprot.2008.187;

MENDES, C. A. C.; BURDMANN, E. A. **Polimixinas - revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade**. Rev Assoc Med Bras 2009; 55(6): 752-9;

MICHALSKA, M.; WOLF, P. **Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing**. Front Microbiol. (2015); 6: 963. doi: 10.3389/fmicb.2015.00963;

MIZERA, A.; PANG, J.; SU, C.; YUAN, Q. **ASSA-PBN: A Toolbox for Probabilistic Boolean Networks**. Journal Of LaTeX Class Files, Vol. XX, No. X (2017), doi 10.1109/Tcbb.2017.2773477;

MIZERA, A.; QU, H.; PANG, J.; YUAN, Q. **A new decomposition method for attractor detection in large synchronous Boolean networks**. Proc. 3rd

Symposium on Dependable Software Engineering. Volume 10606 of LNCS., Springer (2017) 232–249;

MIZERA, A., PANG, J., QU, H., YUAN, Q. **Taming asynchrony for attractor detection in large Boolean networks** (technical report) (2017)

<https://arxiv.org/abs/1704.06530>;

MORRIS, M. K.; SAEZ-RODRIGUEZ, J.; SORGER, P. K.; LAUFFENBURGE, D. A. **Logic-Based Models for the Analysis of Cell Signaling Networks**. *Biochemistry* (2010), 49, 3216–3224; DOI: 10.1021/bi902202q;

MOUGOUS JD, CUFF ME, RAUNSER S, SHEN A, ZHOU M, GIFFORD CA, et al. **A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus**. *Science* (2006);312(5779):1526–30;

MUIMHNEACHÁIN, E. O.; REEN, F. J.; O’GARA, F.; MCGLACKEN, G. P. **Analogues of *Pseudomonas aeruginosa* signaling molecules to tackle infections**. *Org. Biomol. Chem.*, 2018, 16, 169;

MÜSSEL, C.; HOPFENSITZ, M.; KESTLER; H. A. **BoolNet—an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks**, *Bioinformatics* (2010), Volume 26, Issue 10, Pages 1378–1380, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq124>;

MYMED INFORM, <http://pt.mymedinform.com/>, acessado em 7 de maio de 2018;

NEIVA, L. B. M.; FONSECA, C. D.; WATANABE, M.; VATTIMO, M. F. F. **Polymyxin B: dose and time dependent nephrotoxicity effect in vitro**. *Acta Paul Enferm.* 2013; 26(1):57-62;

European Comission – CORDIS: Community Research and Development Information Service. **New EU project AEROPATH takes on 'superbugs'** (2008); [https://cordis.europa.eu/news/rcn/30104\\_en.html](https://cordis.europa.eu/news/rcn/30104_en.html); consultado em 7 de maio de 2018;

OLIVER, A.; MENA, **A Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance**. *Clin Microbiol Infect.* (2010) Jul;16(7):798-808. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03250.x;

PALSSON, B. O. **Systems Biology Constraint-based Reconstruction and Analysis**. Cambridge University Press, 2015;

PERSAT, A.; INCLAN, Y. I.; ENGEL, J. N.; STONE, H. A.; GITAI, Z. **Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*.**

PNAS (2015) vol. 112 | no. 24 | 7563–7568

[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1502025112](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1502025112);

POLIXIL B (sulfato de polimixina B equivalente a 500.000 UI de polimixina B base).

Pó Liófilo Injetável. Quimica Haller Ltda. Bula de remédio;

POLLACK, M. **The Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*.** Reviews Of Infectious Diseases; Vol. 6, Supplement 3; September-October (1984);

PUKATZKI S, MA AT, STURTEVANT D, KRASTINS B, SARRACINO D, NELSON WC, et al. **Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system.** Proc Natl Acad Sci USA (2006);103(5):1528–33;

RIBBA, B.; COLLIN, T.; SCHNELL, S. **A multiscale mathematical model of cancer, and its use in analyzing irradiation therapies.** Theor Biol Med Model. (2006); 3: 7. DOI: 10.1186/1742-4682-3-7;

SAADATPOUR A, WANG R-S, LIAO A, LIU X, LOUGHRAN TP, ALBERT I, ET AL. **Dynamical and Structural Analysis of a T Cell Survival Network Identifies Novel Candidate Therapeutic Targets for Large Granular Lymphocyte Leukemia.** PLoS Comput Biol 7(11): e1002267 (2011); <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002267>;

SAADATPOUR, A.; ALBERT, R. **Methods - Modeling Gene Expression** (2013), Elsevier; volume 62, issue 1, pages 3-12;  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.10.012>;

SAEZ-RODRIGUEZ, J.; SIMEONI, L.; LINDQUIST, J. A.; HEMENWAY, R.; BOMMARDT, U.; ARNDT, B.; et al. **A Logical Model Provides Insights into T Cell Receptor Signaling.** PLoS Comput Biol 3(8): e163 (2007);  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030163>;

SAMAGA, R.; SAEZ-RODRIGUEZ, J.; ALEXOPOULOS, L. G.; SORGER, P. K.; KLAMT, S. **The Logic of EGFR/ErbB Signaling: Theoretical Properties and Analysis of High-Throughput Data.** PLoS Comput Biol 5(8): e1000438 (2009);  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000438>;

- SANTOS, M. T.; NASCIMENTO, A. P. B.; FILHO, F. M.; SILVA, F. A. B. **Modeling Gene Transcriptional Regulation: A Primer**. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature (2018), Theoretical and Applied Aspects of Systems Biology, Computational Biology 27, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74974-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74974-7_2);
- SCHLATTER, R.; PHILIPPI, N.; WANGORSCH, G.; PICK, R.; SAWODNY, O.; BORNER, C.; TIMMER, J.; EDERERAND, M.; DANDEKAR, T. **Integration of Boolean models exemplified on hepatocyte signal transduction**. Briefings In Bioinformatics. Vol 13. No 3. 365-376; DOI:10.1093/bib/bbr065;
- SCHLATTER, R.; SCHMICH, K.; AVALOS VIZCARRA, I.; SCHEURICH, P.; SAUTER, T. **ON/OFF and Beyond - A Boolean Model of Apoptosis**. PLoS Comput Biol 5(12): e1000595 (2009); DOI:10.1371/journal.pcbi.1000595;
- SCHLICHTMAN, D.; KAVANAUGH-BLACK, A.; SHANKAR, A.; CHAKRABARTY, A. M. **Energy Metabolism and Alginate Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Role of the Tricarboxylic Acid Cycle**. JOURNAL OF BACTERIOLOGY (1994), p. 6023-6029 Vol. 176, No. 19;
- SHAH, O. S.; CHAUDHARY, M. F. A.; AWAN, H. A.; FATIMA, F.; ARSHAD, Z.; AMINA, B.; AHMED, M.; HAMEED, H.; FURQAN, M.; KHALID, S.; CHAUDHARY, A. F. S. U. **ATLANTIS - Attractor Landscape Analysis Toolbox for Cell Fate Discovery and Reprogramming**. Scientific Reports | (2018) 8:3554 | DOI:10.1038/s41598-018-22031-3;
- SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. **Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks**. Genome Research (2003) Nov; 13(11):2498-504; DOI: 10.1101/gr.1239303;
- SHMULEVICH, I.; AITCHISON, J. D. **Deterministic And Stochastic Models Of Genetic Regulatory Networks**. Methods Enzymol. (2009); 467: 335–356; DOI:10.1016/S0076-6879(09)67013-0;
- SILVEIRA, M.; ALBANO, R.; ASENSI, M.; & ASSEF, A. P. C. (2014). **The draft genome sequence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain CCBH4851, a nosocomial isolate belonging to clone SP (ST277) that is prevalent in Brazil**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 109(8), 1086-1087;

SKARIYACHAN, S.; SRIDHAR, V. S.; PACKIRISAMY, S.; KUMARGOWDA, S. T.; CHALLAPILLI, S. B. **Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal.** *Folia Microbiologica*, 1-20, published online: 19 January 2018. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0585-4>;

SONG, J.; RUAN, Q.; QI, J.; GAO, M.; WANG, Y. **The Mechanism of Resistance of *Pseudomonas Aeruginosa* to [3-1actam Antibiotics and Clinical Significance.** *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Med Sci]* 22 (4): 339-342, (2002);

SORRELL, I.; WHITE, A.; PEDERSEN, A. B.; HAILS, R. S.; BOOTS, M. **The evolution of covert, silent infection as a parasite strategy.** *Proc. R. Soc. B* (2009); DOI: 10.1098/rspb.2008.1915;

STEFANI, S.; CAMPANA, S.; CARIANI, L.; CARNOVALE, V.; COLOMBO, C.; DEL MAR LLEÓ, M.; IULA, V. D.; MINICUCCI, L.; MORELLI, P.; PIZZAMIGLIO, G.; TACCETTI, G. **Relevance of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis.** *International Journal of Medical Microbiology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.07.004>;

STEVEN WATTERSON, S.; MARSHALL, S.; GHAZAL, P. **Logic models of pathway biology.** *Drug Discovery Today* (2008), volume 13; DOI:10.1016/j.drudis.2008.03.019;

STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P.; HICKEY, M. J.; BRINKMAN, F. S.; HUFNAGLE, W. O.; KOWALIK, D. J.; LAGROU, M.; GARBER, R. L.; GOLTRY, L.; TOLENTINO, E.; WESTBROCK-WADMAN, S.; YUAN, Y.; BRODY, L. L.; COULTER, S. N.; FOLGER, K. R.; KAS, A.; LARBIG, K.; LIM, R.; SMITH, K.; SPENCER, D.; WONG, G. K.; WU, Z.; PAULSEN, I. T.; REIZER, J.; SAIER, M. H.; HANCOCK, R. E.; LORY, S.; OLSON, M. V. **Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen.** *Nature* (2000) Aug 31;406(6799):959-64. DOI: 10.1038/35023079;

SUBRAMANIAN, K.; GADGIL, C. *IET Syst. Biol.* 4 (2010) 169–176;

THAKAR J, PILIONE M, KIRIMANJESWARA G, HARVILL ET, ALBERT R. **Modeling Systems-Level Regulation of Host Immune Responses**. PLoS Comput Biol 3(6): e109 (2007); <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030109>;

THAKAR, J.; ALBERT, R. **Boolean models of within-host immune interactions**. Current Opinion in Microbiology (2010), 13:377–381; DOI: 10.1016/j.mib.2010.04.003;

The Pseudomonas Genome Data Base: <http://pseudomonas.com/>

THOMAS, R. **Boolean formalization of genetic control circuits**. J. Theor. Biol. 42, 563–585 (1973);

TODAR, K. **Todar's online textbook of bacteriology**. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology (2008); <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>; consultado em 7 de maio de 2018;

WALSH, E. R.; THAKAR, J.; STOKES, K.; HUANG, F.; ALBERT, R.; AUGUST, A. **Computational and Experimental Analysis Reveals a Requirement for Eosinophil-Derived IL-13 for the Development of Allergic Airway Responses in C57BL/6 Mice**. J Immunol March 1, 2011, 186 (5) 2936-2949; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001148>;

WANG, R. S.; MARON, B. A.; LOSCALZO, J. **Systems Medicine: Evolution of Systems Biology From Bench To Bedside**. Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. (2015); 7(4): 141–161; DOI:10.1002/wsbm.1297;

WANG, R. S.; SAADATPOUR, A.; ALBERT, R. **Boolean modeling in systems biology: an overview of methodology and applications**. Phys. Biol. 9 (2012); doi:10.1088/1478-3975/9/5/055001;

EHA Consulting Group, Inc. **What is *Pseudomonas aeruginosa*?** (2018); <http://www.ehagroup.com/resources/pathogens/pseudomonas-aeruginosa/>; consultado em 7 de maio de 2018;

WHITCHURCH, C. B.; MATTICK, J. S. **Characterization of a gene, pilU, required for twitching motility but not phage sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa***. Mol Microbiol (1994);13:1079–1091;



WINSOR, G. L.; GRIFFITHS, E. J.; LO, R.; DHILLON B. K.; SHAY, J. A.; BRINKMAN F. S. **Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database.** Nucleic Acids Res. (2016) doi: 10.1093/nar/gkv1227;

WYNN, M. L.; CONSUL, N.; MERAJVER, S. D. **Schnell, S. Logic-based models in systems biology: a predictive and parameter-free network analysis method.** Integr. Biol. (2012); 4(11); DOI:10.1039/c2ib20193c;

WYNN, M. L.; MERAJVER, S. D.; SCHNELL, S. **Unraveling the complex regulatory relationships between metabolism and signal transduction in cancer.** Adv Exp Med Biol (2012); 736: 179–189. doi:10.1007/978-1-4419-7210-1\_9;

YUAN, Q. **User Guide of ASSA-PBN – Version 3.0** (2018). Contido no site <http://satoss.uni.lu/software/ASSA-PBN/>, acessado em 28 de maio de 2018;

YUAN, Q.; QU, H.; PANG, J.; MIZERA, A. **Improving BDD-based attractor detection for synchronous Boolean networks.** Science China Information Sciences 59 (2016);

ZAÑUDO, J. G. T.; ALBERT, R. **Cell Fate Reprogramming by Control of Intracellular Network Dynamics.** PLoS Comput Biol 11(4): e1004193. (2015) doi:10.1371/journal.pcbi.1004193;

ZHANG, R.; SHAH, M. V.; YANG, J.; NYLAND, S. B.; LIU, X.; YUN, J. K.; ALBERT, R.; LOUGHRAN JR, T. P. **Network model of survival signaling in large granular lymphocyte leukemia.** PNAS (2008), 105 (42) 16308-16313; <https://doi.org/10.1073/pnas.0806447105>;

ZHENG, D.; YANG, G.; LI, X.; WANG, Z.; LIU, F.; HE, L. **An Efficient Algorithm for Computing Attractors of Synchronous And Asynchronous Boolean Networks.** PLoS ONE 8 (2013): e60593. doi:10.1371/journal.pone.0060593;

ZIMMERMANN, W. **Penetration of 1-lactam antibiotics into their target enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a highly sensitive mutant with its parent strain.** Antimicrob. Agents Chemother. (1980) 18:94-100.

## 8. Anexo

### 8.1. Anexo 1: arquivo de entrada descrevendo as regras booleanas da RRGV da *P.aeruginosa* da CCBH 4851:

```
type=synchronous
n=96
perturbation=0
nodeNames
fleQ
pelA
pelB
fur
rpoD
tpbA
pelC
pelD
pelE
pelF
pelG
pchR
pvds
toxR
toxA
prpL
anr
dnr
hcnA
hcnB
hcnC
narL
ptxS
ptxR
pqsA
pqsB
pqsC
pqsD
vfr
lasR
rhlR
rpoS
pprB
vqsM
exsA
gacA
PA4851_02645
PA4851_06725
PA4851_24455
cupA1
cupB1
cupC1
algR
algD
cysB
```

himAD  
alg44  
algZ  
algC  
algB  
algW  
algU  
ampR  
mexR  
mexT  
oprD  
pqsE  
mucA  
mucB  
mucD  
mvfR  
dksA  
phoQ  
lexA  
recA  
bexR  
aprA  
PA4851\_11910  
PA4851\_11915  
qscR  
rsaL  
PA4851\_12250  
rpoN  
psrA  
pqsF  
pqsG  
pqsH  
pslA  
pslB  
pslC  
pslD  
pslE  
pslF  
pslG  
pslH  
pslI  
pslJ  
pslK  
pslL  
phoP  
PA4851\_21320  
sodB  
pmrA  
cbrB  
gacS  
algQ  
endNodeNames  
node fleQ  
1.0 : rpoD&!(vfr|algZ|algU)  
endNode  
node pelA

```

1.0 : (!(fleQ|tpbA))
endNode
node pelB
1.0 : (!(fleQ|tpbA))
endNode
node fur
1.0 : (!(fleQ))
endNode
node rpoD
1.0 : rpoD
endNode
node tpbA
1.0 : lasR|phoP&(!(tpbA))
endNode
node pelC
1.0 : !(tpbA))
endNode
node pelD
1.0 : !(tpbA))
endNode
node pelE
1.0 : !(tpbA))
endNode
node pelF
1.0 : !(tpbA))
endNode
node pelG
1.0 : !(tpbA))
endNode
node pchR
1.0 : !(fur|pchR))
endNode
node pvdS
1.0 : lasR&!(fur))
endNode
node toxR
1.0 : pvdS|vfr&!(fur))
endNode
node toxA
1.0 : pvdS|ptxR|vfr&!(fur|toxR))
endNode
node prpL
1.0 : pvdS
endNode
node anr
1.0 : anr|dnr
endNode
node dnr
1.0 : anr&!(pmrA))
endNode
node hcnA
1.0 : anr|lasR|rhIR|gacA&!(algR|mexT))
endNode
node hcnB
1.0 : anr|lasR|rhIR|gacA&!(mexT))
endNode

```

```
node hcnC
1.0 : anr|lasR|rh1R|gacA&!(mexT)
endNode
node narL
1.0 : anr|dnr
endNode
node ptxS
1.0 : PA4851_24455|ptxR&!(ptxS)
endNode
node ptxR
1.0 : rpoD|pvdS|vfr&!(ptxS)
endNode
node pqsA
1.0 : lasR|mvfR|PA4851_11910|PA4851_11915&!(ptxR|rh1R|mexT)
endNode
node pqsB
1.0 : lasR|mvfR&!(ptxR|rh1R|mexT)
endNode
node pqsC
1.0 : lasR|mvfR&!(ptxR|rh1R|mexT)
endNode
node pqsD
1.0 : lasR|mvfR&!(ptxR|rh1R|mexT)
endNode
node vfr
1.0 : vfr
endNode
node lasR
1.0 : vfr|gacA|himAD&!(ampR|algQ)
endNode
node rh1R
1.0 : vfr|lasR|ampR|rpoN&!(algR)
endNode
node rpoS
1.0 : pprB|vqsM&!(rh1R)
endNode
node pprB
1.0 : !(PA4851_12250)
endNode
node vqsM
1.0 : vqsM
endNode
node exsA
1.0 : rpoS|exsA|psrA&!(mexT)
endNode
node gacA
1.0 : gacA
endNode
node PA4851_02645
1.0 : gacA|gacS
endNode
node PA4851_06725
1.0 : gacA|gacS
endNode
node PA4851_24455
1.0 : PA4851_24455
```

```
endNode
node cupA1
1.0 : (!(PA4851_24455))
endNode
node cupB1
1.0 : (!(PA4851_24455))
endNode
node cupC1
1.0 : (!(PA4851_24455))
endNode
node algR
1.0 : algU&(!(phoQ))
endNode
node algD
1.0 : cysB|himAD|algZ|algW
endNode
node cysB
1.0 : cysB
endNode
node himAD
1.0 : himAD
endNode
node alg44
1.0 : algR|cysB|himAD|algZ|algU|rpoN
endNode
node algZ
1.0 : algU&(!(algR|algZ))
endNode
node algC
1.0 : algR
endNode
node algB
1.0 : himAD|algU
endNode
node algW
1.0 : algW
endNode
node algU
1.0 : algW&(!(mucA|mucB|mucD))
endNode
node ampR
1.0 : ampR
endNode
node mexR
1.0 : lasR
endNode
node mexT
1.0 : mexT&(!(mexR))
endNode
node oprD
1.0 : !(mexT)
endNode
node pqeE
1.0 : lasR|mvfR&(!(mexT|rh1R))
endNode
node mucA
```

```
1.0 : algU
endNode
node mucB
1.0 : algU
endNode
node mucD
1.0 : mucD
endNode
node mvfR
1.0 : lasR&(!(rh1R|mvfR))
endNode
node dksA
1.0 : algU
endNode
node phoQ
1.0 : algR|phoP
endNode
node lexA
1.0 : lexA
endNode
node recA
1.0 : (!(lexA))
endNode
node bexR
1.0 : bexR
endNode
node aprA
1.0 : bexR
endNode
node PA4851_11910
1.0 : PA4851_11910
endNode
node PA4851_11915
1.0 : PA4851_11915
endNode
node qscR
1.0 : qscR
endNode
node rsaL
1.0 : lasR&(!(qscR))
endNode
node PA4851_12250
1.0 : lasR|pprB|vqsM
endNode
node rpoN
1.0 : rpoN
endNode
node psrA
1.0 : !(psrA)
endNode
node pqsF
1.0 : lasR
endNode
node pqsG
1.0 : lasR
endNode
```

```
node pqsH
1.0 : lasR
endNode
node pslA
1.0 : lasR
endNode
node pslB
1.0 : lasR
endNode
node pslC
1.0 : lasR
endNode
node pslD
1.0 : lasR
endNode
node pslE
1.0 : lasR
endNode
node pslF
1.0 : lasR
endNode
node pslG
1.0 : lasR
endNode
node pslH
1.0 : lasR
endNode
node pslI
1.0 : lasR
endNode
node pslJ
1.0 : lasR
endNode
node pslK
1.0 : lasR
endNode
node pslL
1.0 : lasR
endNode
node phoP
1.0 : phoP
endNode
node PA4851_21320
1.0 : (! (phoP))
endNode
node sodB
1.0 : phoP
endNode
node pmrA
1.0 : pmrA&(! (phoQ))
endNode
node cbrB
1.0 : cbrB
endNode
node gacS
1.0 : gacS
```



```
endNode  
node algQ  
1.0 : psrA  
endNode
```