

Um Protocolo de Sincronização entre Nanomáquinas para Nanorredes Multiusuário

Ligia F. Borges¹, Michael Taynnan Barros³, Michele Nogueira^{1,2}

¹Núcleo de Redes sem Fio e Redes Avançadas (NR2)
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

²Departamento de Ciência da Computação
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

³School of Computer Science and Electronic Engineering
University of Essex, UK

lfborges@inf.ufpr.br, m.barros@essex.ac.uk, michele@dcc.ufmg.br

Abstract. *Nanonetworks comprise multiple nanomachines operating in the same way to perform coordinated tasks, such as detecting types of cancer and smart drug delivery in the body. Molecular communication (MC) uses molecules as information carriers between hybrid nanomachines. Synchronization is a critical issue, as multi-user interference causes errors or failures in communication, besides severe computational and communication limitations, being essentially unidirectional. This article presents the first synchronization protocol between nanomachines for cell signaling-based MC considering multi-user communication. The protocol signaling occurs by pulse resonance. The results show that the proposed protocol converges with low cost of messages.*

Resumo. *As nanorredes compreendem múltiplas nanomáquinas operando no mesmo meio para realizar tarefas coordenadas, tais como a detecção de células tumorais e a entrega automatizada de fármacos no corpo. A comunicação molecular utiliza moléculas como portadoras de informação entre nanomáquinas híbridas. A sincronização é uma questão crítica, pois a interferência multiusuário causa erros ou falhas na comunicação, além das severas limitações computacionais e na comunicação, sendo essencialmente unidirecional. Este artigo apresenta o primeiro protocolo de sincronização entre nanomáquinas considerando uma comunicação multiusuário baseada em sinalização celular. A sinalização do protocolo ocorre por ressonância de pulsos. Os resultados de simulação indicam que o protocolo proposto converge com um baixo número de mensagens.*

1. Introdução

As nanorredes são promissoras para alavancar novas aplicações na medicina com resultados notáveis, incluindo o uso de nanomáquinas para monitorar o colesterol, a detecção da presença de agentes infecciosos no corpo ou a detecção de câncer [Akyildiz et al. 2019]. A comunidade científica vem adotando diferentes métodos embasados na comunicação natural e os abstrai em modelos a fim de projetar nanorredes seguindo o paradigma da comunicação molecular (CM). Este trabalho foca na CM por sinalização celular, em que uma comunicação célula-a-célula é mediada por junções comunicantes (canais que ligam

células adjacentes) após um conjunto de reações químicas que liberam uma determinada concentração de moléculas. A sinalização celular apresenta vantagens como o fato de ser bioinspirada e utilizar moléculas naturalmente presentes em tecidos vivos para a comunicação de dados entre nanodispositivos [Akyildiz et al. 2015]. As nanorredes baseadas em sinalização celular realizam tarefas diretamente no tecido. Um exemplo são as abordagens que fazem o uso das comunicações moleculares para a detecção de tumores. Dispositivos implantáveis com receptores moleculares sintéticos melhoraram a eficiência e a precisão da detecção do câncer ao identificar a presença de moléculas associadas ao tumor na comunicação natural [Stephenson-Brown et al. 2015].

Individualmente, os nanodispositivos executam somente funções muito simples e atuam em um espaço muito curto. Uma forma de contornar essas limitações é viabilizar uma nanorede, o que permite o trabalho coordenado e a realização de tarefas mais complexas. Embora a comunicação molecular de usuário simples (um único transmissor e receptor) tenha sido amplamente estudada para tecidos celulares, projetar sistemas de comunicação celular multiusuários (múltiplos transmissores e receptores) representa o progresso esperado para essas redes e de extrema relevância, mas ainda dependem do avanço de vários fatores, como, por exemplo, a sincronização entre as nanomáquinas. Nas nanorredes, a interferência multiusuário (resultante das moléculas emitidas por outros transmissores) causa erros ou falhas na comunicação, sendo primordial uma sincronização entre as nanomáquinas para mitigar essas falhas. Contudo, os métodos de sincronização das redes convencionais não são diretamente aplicados em nanorredes devido às restrições computacionais dos nanodispositivos e às características específicas do ambiente.

A literatura atual foca em abordagens de usuário simples e principalmente na modelagem do canal de comunicação, moléculas, junções comunicantes, reações químicas, diferentes tecidos celulares, formas de ruídos, entre outros elementos da comunicação natural, que são indispensáveis para simular o comportamento da comunicação sintética nesses tecidos [Nakano et al. 2007, Barros et al. 2021]. Para as nanorredes baseadas em difusão livre (*i.e.*, diferente canal de comunicação em que as moléculas são suspensas em um fluido como a corrente sanguínea e se movem randomicamente na ausência de reações químicas) foram propostas técnicas de sincronização temporal [Tung and Mitra 2019], sincronização de símbolos [Jamali et al. 2017] e técnicas para mitigar a interferência em que um receptor libera moléculas para inibir o envio de moléculas de informação nos transmissores [Moore and Nakano 2013]. Essas propostas foram desenvolvidas para assumir a troca bidirecional de mensagens. Porém, esta premissa não é realista para os canais de sinalização celular, pois estes são essencialmente unidirecionais.

Este artigo apresenta o primeiro protocolo de sincronização para nanorredes multiusuários baseadas em canais de sinalização celular. O protocolo parte da premissa de que existe na rede uma nanomáquina desempenhando o papel de nó principal. Este libera por *broadcast* sinais *beacons* reconhecidos como requisições de sincronização entre as nanomáquinas da rede. Cada nanomáquina registra, de forma independente, os tempos de recebimento dos sinais e estima o atraso a fim de ajustar seu temporizador interno. Cada nanomáquina tem um temporizador interno vinculado a um oscilador que gera a liberação de moléculas por tipo/concentração de acordo com o símbolo a ser enviado. O protocolo considera a diversidade de moléculas naturais, sendo a base para a técnica aplicada de modulação binária com prevenção de erro. A modulação binária usa concentrações de

dois tipos distintos de moléculas como transportadoras de informação individuais para codificar os dados (ou seja, um tipo de molécula para bit-1 e outro tipo para bit-0).

A avaliação do protocolo de sincronização considera o contexto de um tecido celular astrócito 3D, i.e., uma das células mais abundantes do sistema nervoso central. Nas simulações, as reações celulares são desencadeadas por um algoritmo estocástico [Gillespie 1977] acoplado ao processo de difusão intercelular (entre células) e integra o modelo das junções comunicantes de Kilinc e Akan [Kilinc and Akan 2013] para simular o comportamento que permite a comunicação entre pares de células. A difusão molecular segue o modelo matemático de [Nakano et al. 2007] que captura a dinâmica espaço-temporal da sinalização intercelular, utilizando a diferença entre a concentração de moléculas entre as células. A análise permitiu avaliar o protocolo de sincronização considerando as características do ambiente celular que impactam diretamente na forma como as mensagens *beacons* são propagadas. Os resultados da simulação indicam que as nanomáquinas convergem com um baixo custo de número de mensagens.

Este artigo procede da seguinte forma. A Seção 2 discute os trabalhos relacionados. A Seção 3 descreve o protocolo de sincronização para nanorredes multiusuário proposto neste trabalho. A Seção 4 detalha a metodologia de avaliação e discute os resultados obtidos. A Seção 5 apresenta as conclusões e trabalhos futuros.

2. Trabalhos Relacionados

As pesquisas em nanorredes focam em geral na modelagem do canal de comunicação e nas fontes de ruídos que podem gerar interferência [Nakano et al. 2007, Barros et al. 2015, Borges et al. 2020a]. Em [Nakano et al. 2007], os autores aplicaram abordagens provenientes da área de teoria da informação para propor um modelo de capacidade de canal em que a molécula de Ca^{2+} é utilizada como portadora de informação. Em [Barros et al. 2015], os autores modelaram e investigaram o ruído gerado pela deformação do tecido na CM baseada em sinalização de Ca^{2+} considerando três tipos distintos de tecidos celulares (astrócitos, epitelial e muscular liso). Em [Borges et al. 2020a], os autores investigaram o ruído intracelular (dentro da célula) e como o ruído intercelular (entre células) gera a interferência em uma comunicação molecular multiportadora.

Essas análises tiveram um papel fundamental para a caracterização da comunicação molecular. Entretanto, uma das principais limitações é que os sistemas existentes de comunicação molecular baseados em sinalização celular focam em um único transmissor e receptor e, conseqüentemente, não existem análises para a interferência multiusuário gerada nessa comunicação assim como técnicas para lidar com esse problema. Contudo, os sistemas de comunicação multiusuários são dependentes de técnicas de sincronização (ex. sincronização de tempo/relógio e sincronização de símbolo) a fim de mitigar erros e interferências na comunicação. As nanorredes com múltiplas nanomáquinas transmissoras e receptoras igualmente requerem técnicas de sincronização adequadas a fim de mitigar interferências multiusuários, erros ou falhas na comunicação.

Devido às limitações computacionais das nanomáquinas, alguns trabalhos propõem sincronizar as nanomáquinas por ressonância do pulso ao invés de sincronizar o relógio. Em [Jamali et al. 2017], são utilizadas duas moléculas diferentes, uma para a sincronização de símbolos e outra para a codificação dos dados. As nanomáquinas não armazenam as moléculas de sincronização, mas sintetizam o tipo correspondente de

molécula sempre que um intervalo de tempo é necessário para a transferência de bits. Em [Moore and Nakano 2013], os autores propuseram a sincronização de nanomáquinas por moléculas inibidoras. Estas moléculas são liberadas por uma nanomáquina que inibe a liberação de moléculas de informação de outras nanomáquinas transmissoras da rede. Quando a concentração de moléculas de informação cai abaixo de um certo limiar, essas moléculas podem ser liberadas novamente. Em [Lin et al. 2015, Tung and Mitra 2019], um algoritmo de sincronização de relógio que utiliza uma estimativa de máxima verossimilhança entre duas nanomáquinas é proposto. Nesses trabalhos, a sincronização ocorre com um mecanismo de troca de mensagens bidirecional entre as duas nanomáquinas que trocam seu tempo de atraso de propagação.

Os modelos existentes de sincronização trazem ideias iniciais para a construção das nanorredes multiusuário. Contudo não são apropriados para a sinalização celular que possui características específicas de propagação (ou seja, reação-difusão através de canais intercelulares), área de atuação (identificação e tratamento de patologias diretamente no tecido celular) e entidades de rede (*i.e.*, nanomáquinas baseadas em células). Para a sinalização celular, o protocolo de sincronização deve considerar a característica unidirecional da comunicação que restringe técnicas baseadas em troca de mensagens bidirecionais e as restrições computacionais das nanomáquinas.

3. Protocolo de Sincronização para Nanorredes Multiusuário

Esta seção descreve o protocolo de sincronização para nanorredes multiusuário proposto neste trabalho. Para o completo entendimento do protocolo e premissas seguidas, a Subseção 3.1 apresenta primeiramente o modelo de rede e do sistema de comunicação molecular com suas entidades, técnica de codificação, e as etapas da sinalização através das moléculas de IP_3 e Ca^{2+} em células astrócitos, que são a base do sistema de comunicação. A Subseção 3.2 detalha o protocolo de sincronização entre nanomáquinas considerando como objetivo final a mitigação de interferência multiusuário.

3.1. Modelo da nanorede e da sinalização celular

A Figura 1 ilustra um cenário geral da Internet das bionano-coisas composta por diferentes nanorredes baseadas em células artificiais que traduzem a informação codificada em moléculas e uma interface bio-cibernética definida como o conjunto de processos necessários para traduzir as informações bioquímicas das nanorredes para a Internet, que é em sua essência embasada em circuitos elétricos e comunicações eletromagnéticas. Cada nanorede é composta por múltiplas nanomáquinas transmissoras e receptoras distribuídas em um tecido celular. As nanorredes transmitem seus dados para uma interface bio-cibernética, que, por sua vez, traduz e envia essas informações para um dispositivo com maior capacidade computacional para que possam ser processadas e então monitoradas por um profissional de saúde. Seguindo o estágio atual de pesquisa para o desenvolvimento da comunicação em nanoescala, este artigo propõe um protocolo de sincronização para nanorredes multiusuário baseadas em sinalização celular. O principal objetivo consiste em promover a implementação de um sistema de comunicação no qual diversas nanomáquinas se comuniquem independentemente e de maneira controlada de modo que a interferência seja mínima. Por causa da limitação computacional das nanomáquinas, esquemas de sincronização serão mediados por uma infraestrutura centralizada no qual um nó principal servirá de ponto de controle para toda a rede.

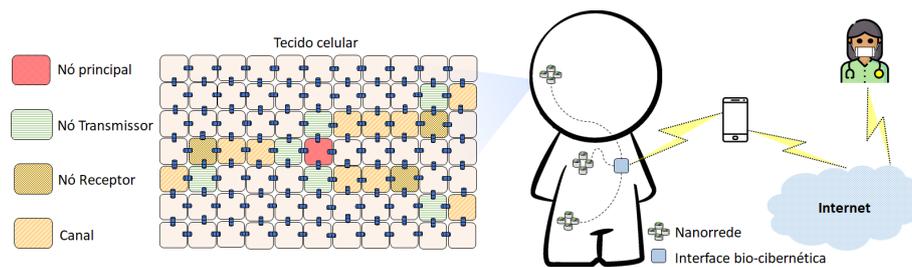


Figura 1. Visão geral da Internet das bionano-coisas composta por diferentes nanorredes baseadas em células artificiais e uma interface bio-cibernética

O modelo de rede tratado neste trabalho foca na comunicação intracelular fundada em caminhos de sinalização, i.e., cadeias de reações químicas que processam sinais de informações moduladas por características químicas, ex. concentração de moléculas, tipo e estado de energia, para propagá-las de uma fonte (nanomáquina ou nó transmissor – Tx) para um destino (nanomáquina ou nó receptor – Rx). Assim, neste trabalho, assume-se um sistema de comunicação composta por múltiplos pares de nós transmissores e receptores, canal de comunicação e nó principal (P).

O **nó Tx** é uma nanomáquina baseada em célula capaz de codificar dados por concentrações de dois tipos de moléculas de informação (íons cálcio - Ca^{2+} e inositol trifosfato - IP_3). Os nós transmissores da rede são responsáveis pela sincronização dos temporizadores internos após a execução dos procedimentos de sincronização de nanomáquinas explicados nas próximas subseções.

O **nó Rx** é uma nanomáquina baseada em célula que recebe as moléculas e decodifica os dados por elas transportados. O nó Rx mede a concentração de moléculas no citosol (i.e., o líquido que preenche o citoplasma celular). Dentro da célula, existe um conjunto de decodificadores responsáveis pela adesão distribuída das moléculas e pela quantificação da concentração das moléculas recebidas. A interferência multiusuário resulta da emissão de moléculas por outros transmissores e a interferência entre símbolos (ISI) ocorre quando parte do sinal transmitido excede a faixa inicialmente alocada devido às constantes flutuações nas concentrações moleculares.

A codificação segue a modulação On-off Keying (OOK) para transmitir moléculas do tipo $M1$ em períodos de bit 1 e transmitir moléculas $M2$ em períodos de bit 0. Estas nanomáquinas podem ser geradas por células artificiais que combinam elementos estruturais biológicos e sintéticos, ou células geneticamente modificadas por meio de biologia sintética, onde funcionalidades específicas podem ser integradas às células [Akyildiz et al. 2019]. Para obter uma transmissão com prevenção de erros por ISI, utilizam-se canais com apagamento binário. O Rx ou recebe o símbolo (bit) ou recebe uma mensagem de que o bit não foi entregue (ou seja, apagado). Como o Tx envia um bit com apenas um dos dois símbolos (ou seja, bit 0 ou bit 1), quando o Rx recebe um bit, sabe-se que este foi, de fato, o bit enviado.

O **canal** consiste em um conjunto de células astrócitos. O modelo do canal considera os estágios de sinalização intracelular e intercelular de Ca^{2+} e IP_3 conforme descrito posteriormente. Dentro da célula (sinalização intracelular), existem várias reações químicas para regular a concentração de moléculas. A comunicação entre células (sinalização intercelular) ocorre quando as junções comunicantes nas células se abrem e as moléculas se propagam através do citosol de uma célula para outra.

O **nó principal (P)** consiste em uma nanomáquina que apresenta diferentes recursos das demais nanomáquinas da rede, como um temporizador para enviar periodicamente mensagens de controle, um componente capaz de realizar a micro estimulação celular que gera a abertura dos canais intercelulares (eletroporação) [Frandsen et al. 2020] e canais que controlam a liberação de moléculas por concentração e tipo. Esses canais podem ser desenvolvidos utilizando a técnica de microfiltração [Akdeniz and Egan 2021]. Cada nó Tx da rede detecta moléculas de controle do nó P. O nó P envia por *broadcasting beacons* de controle como a requisição de sincronização e liberação para transmitir após a fase de sincronização.

A comunicação entre nanomáquinas tratadas neste trabalho ocorre por sinalização celular, i.e., um tipo de comunicação comumente encontrada em células astrócitos, epiteliais e do tecido muscular liso. Neste caso, utilizou-se os astrócitos, i.e. células gliais integrantes do tecido nervoso junto com os neurônios e constituem aproximadamente metade das células do cérebro humano. Estudos demonstram que os astrócitos suportam a propagação de diferentes moléculas como cálcio (Ca^{2+}) e inositol trifosfato (IP_3) por distâncias relativamente longas [Khakh 2015], por isto este trabalho aplica a comunicação sintética molecular no contexto dessas células e moléculas. O modelo analítico da célula astrócito segue três dimensões (3D). A distribuição das células na área segue uma organização em grade, onde $c_{i,j,k}$ ($i = 1, \dots, I; j = 1, \dots, J$ e $k = 1, \dots, K$) indicam a posição de uma determinada célula. Cada célula apresenta reações intracelulares/intercelulares e N tipos de moléculas $\{M_1, \dots, M_N\}$. A propagação de moléculas é mediada por junções comunicantes que conectam as células. As células podem se conectar a no máximo seis outras células vizinhas. As conexões entre as células consideradas neste trabalho seguem o estudo das topologias encontradas em astrócitos [Lallouette et al. 2014].

O modelo da comunicação molecular segue a reação-difusão química estocástica (ODE) do algoritmo de Gillespie [Gillespie 1977]. Este algoritmo produz a variabilidade precisa das reações químicas e serve para estudar os efeitos dos ruídos causados pelo comportamento estocástico da comunicação molecular natural [Nakano and Liu 2010]. O modelo matemático da sinalização celular seguido neste trabalho é baseado em observações experimentais de [Lavrentovich and Hemkin 2008]. A Figura 2 apresenta o diagrama de blocos das etapas de sinalização. Os cinco principais blocos envolvidos neste processo são: estimulação, amplificação, armazenamento, liberação e difusão. A etapa de estimulação começa com a entrada de componentes estimuladores na célula para que ocorra a amplificação de moléculas. A produção de IP_3 ocorre pela estimulação da proteína fosfolipases C (PLC) e a amplificação de Ca^{2+} ocorre via estimulação de IP_3 . Quando a molécula de IP_3 se liga ao retículo endoplasmático (i.e., estruturas membranosas compostas de sacos achatados e localizados no citosol da célula) ocorre a liberação de cálcio do retículo endoplasmático para o citosol da célula.

As áreas de armazenamento (*pools*) incluem a concentração de Ca^{2+} no citosol, a concentração de Ca^{2+} no retículo endoplasmático, e a concentração de IP_3 no citosol. A difusão compreende a propagação de moléculas de IP_3 e Ca^{2+} de uma célula para outra através das junções comunicantes. O modelo estocástico calcula os valores de cada concentração de moléculas dos *pools* P1 e P2 ao longo do tempo e executa as reações descritas no diagrama (Figura 2). Sendo P1 o fluxo do IP_3 ou Ca^{2+} do citosol para espaço extracelular (i.e., difusão) e P2 a difusão de Ca^{2+} do retículo endoplasmático para o

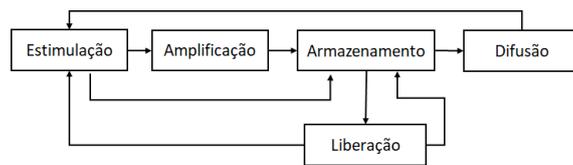


Figura 2. Diagrama de blocos da sinalização celular em astrócitos

citossol. Uma junção comunicante é formada por duas partículas cilíndricas (conexônios), uma em cada par de célula. Cada conexônio é composto de seis proteínas conexinas. As junções comunicantes possuem propriedades biofísicas que permitem ou impedem o movimento de moléculas entre células [Decrock et al. 2013]. Dessa forma, uma corrente gerada em qualquer célula poder fluir ao longo da junção comunicante e estimular outra célula a realizar uma determinada ação. Um modelo estocástico do comportamento de junções comunicantes foi introduzido em [Baigent et al. 1997] e é seguido neste trabalho.

O modelo do comportamento das junções comunicantes considera canais com abertura sensível à tensão e assumem dois estados de condutância para cada conexônio: aberto com alta condutância e fechado com baixa condutância. Assim, consideram-se as probabilidades das três combinações de estados de cada conexônio: (i) ambos canais estão em um estado de alta condutância; (ii) o primeiro conexônio está em um estado de alta condutância e o segundo (*i.e.*, localizado na célula adjacente) em estado de baixa condutividade; (iii) o primeiro conexônio está em um estado de baixa condutância e o outro está em um estado de alta condutância. As equações matemáticas que descrevem os processos de sinalização celular descritos acima são apresentadas em [Borges et al. 2020b].

Na sinalização celular a comunicação é unidirecional o que restringe técnicas de sincronização baseadas em troca de mensagens bidirecionais entre nanomáquinas [Lin et al. 2015, Luo et al. 2016]. Sendo assim, os nós da rede não são capazes de informar aos demais nós seus tempos de transmissão, intenção de transmitir ou a ocorrência de colisões. Outra característica está no fato de que os nós transmissores não conseguem escutar a rede, apenas as suas células adjacentes (*i.e.*, nos astrócitos até seis células conectadas diretamente ao transmissor por junções comunicantes), dessa forma técnicas de sincronização baseadas em escuta do canal (ex. um transmissor escuta quando outro está transmitindo e atrasa seu relógio) também não são viáveis para esse tipo de sistema.

3.2. Protocolo de sincronização

Esta seção detalha o protocolo de sincronização entre nanomáquinas considerando as restrições impostas pelo ambiente molecular e as limitações computacionais das nanomáquinas. Sabe-se que no estágio atual de desenvolvimento, não pode-se assumir que cada nó possui acesso ao Tempo Universal Coordenado (UTC, do inglês *Coordinated Universal Time*) e, conseqüentemente, as técnicas de sincronização de relógio convencionais não se aplicam. O processo de sincronização do protocolo é iniciado pelo nó principal (P) e segue (i) a fase de requisição de sincronização; e (ii) a fase de ajuste do temporizador interno, descritas a seguir.

O nó P não é eleito ou selecionado. Um nó é principal pelo fato de possuir recursos adicionais como dispositivos de eletroporação para realizar a estimulação celular que gera a abertura de canais intercelulares selecionados, um dispositivo com alguma referência global de tempo para enviar periodicamente mensagens de controle e canais de

microfiltração para direcionar a liberação de moléculas. Na fase 1, o nó P transmite *beacons* liberando uma determinada concentração de moléculas de cálcio predefinida para essa fase. Não há necessidade de codificar nenhuma informação de tempo nas moléculas, os nós transmissores identificam os *beacons* pela concentração observada (Fig.3a). Os *beacons* seguem valores estáticos de comprimento de *time slot* t_{sb} (*i.e.*, período de tempo durante o qual o nó P emite uma determinada concentração de moléculas). Cada Tx tem um temporizador interno (t_i) e um intervalo de tempo reservado para a transmissão de dados t_s . No estado inicial, os temporizadores internos não estão sincronizados (*i.e.*, estado S_{f0}). Ao receber um *beacon* de requisição de sincronização (b_{reqS}) do nó P, os nós Tx mudam do estado S_{f0} para S_{f1} (Fig.3b). Neste estado, cada Tx ativa seu t_i e um contador para cronometrar quantas unidades de tempo são contabilizadas até o recebimento do próximo *beacon* (b_{stopS}) que sinaliza o fim da Fase 1. Nesta etapa, todos os nós transmissores da rede registram em uma variável (t_{del_h}) o tempo de recebimento entre os *beacons*.

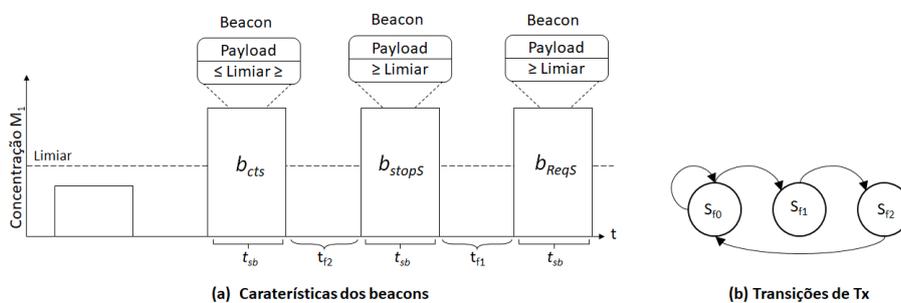


Figura 3. Características dos beacons e estados de transições para os nós Tx

A fase 2 compreende o ajuste do temporizador interno e é realizada por cada nó transmissor da rede independentemente. Como as moléculas de informação se propagam passando por cada célula do canal com um certo atraso de propagação, que também depende da distância entre o nó P e o nó Tx da rede, um método de estimativa de atraso é adotado no protocolo de sincronização. Este método utiliza como base os valores obtidos na Fase 1 da etapa de sincronização de nanomáquinas para definir em quanto t_i precisa ser ajustado. Sendo assim, o tempo necessário (*i.e.*, atraso) para as mensagens *beacons* do nó P chegarem em um determinado transmissor (t_{del_h}) é o tempo utilizado por este nó para ajustar o seu temporizador interno (t_i) em k unidades de tempo. Sendo k a soma do comprimento do intervalo de tempo reservado para a transmissão com o atraso de propagação de moléculas $k = t_s + t_{del_h}$. Ao final da Fase 2, os nós Tx assumem o estado S_{f2} indicando que seus t_i estão sincronizados (Figura 3b). A Figura 4 exemplifica o funcionamento do protocolo de sincronização considerando um tecido celular em que as nanomáquinas estão distribuídas seguindo uma topologia em grade (Figura 4a). Assume-se que os transmissores estão localizados em uma célula próxima ou adjacente a um receptor do sistema anterior (*i.e.*, pares de transmissores e receptores conectados à uma distância de aproximadamente oito células que fazem o papel de canal).

A Figura 4b representa o nó P e a forma como a rede cresce a partir deste nó considerando apenas uma das seis direções possíveis no tecido 3D ($Tx_1, Tx_{1.2}, \dots, Tx_{1.n}$). O Tx_1 é o único nó conectado ao nó P. Tx_1 é o nó transmissor de referência de $Tx_{1.2}$ que por sua vez é o nó de referência de $Tx_{1.3}$ e assim por diante. No início da sincronização, o nó P envia os *beacons* da Fase 1, as mensagens são propagadas em todas as direções passando por cada célula do canal. Os *beacons* são compostos por concentra-

ções de moléculas de cálcio e são diferenciadas das mensagens da etapa de codificação por seus valores de concentração molecular. Os limiares de concentração predefinidos para os *beacons* da Fase 1 são similares e possuem valores de amplitude superiores para que possam alcançar por *broadcast* todos os nós Tx da rede (Figura 3a). Dessa forma, quando a concentração da molécula do tipo M_1 (*i.e.* cálcio) for maior ou igual ao limiar predefinido (*i.e.*, B_{F1} if $M_1 \geq \text{limiar}$) o nó Tx identifica que este é um *beacon* da Fase 1 e altera o seu estado de acordo com o estado anterior (*i.e.*, (i) Estado Sf_0 , (ii) Estado Sf_1 , e (iii) Estado Sf_2). Os *beacons* b_{reqS} e b_{stopS} possuem o mesmo comprimento de *time slot* (t_{sb}) reservado para a sua transmissão e são enviados respeitando uma janela de intervalo (t_{f1}) definida de acordo com o tempo necessário para a síntese de moléculas nos nós Tx. Conforme a distância entre o nó P e um nó Tx aumenta, maior é o tempo de atraso de propagação entre os *beacons* b_{reqS} e b_{stopS} . Considerando o exemplo apresentado na Figura 4b, o instante de tempo para o limiar de concentração ser identificado no nó $Tx_{1.2}$ é considerado como o instante de tempo de recebimento da mensagem *beacon*. O atraso de propagação é denotado por t_{del_h} , onde $h \in \{P, Tx_{1.2}\}$. Na fase 2, o nó $Tx_{1.2}$ infere seu temporizador conforme a equação $k = t_s + t_{del_{Tx_{1.2}}}$, que indica quantas unidades de tempo o nó $Tx_{1.2}$ deve aguardar antes de iniciar a transmissão. Como o valor de k do nó $Tx_{1.2}$ é maior que o valor de k no seu nó transmissor de referência, ele só iniciará a transmissão quando o nó Tx_1 terminar a comunicação de dados com o seu respectivo receptor.

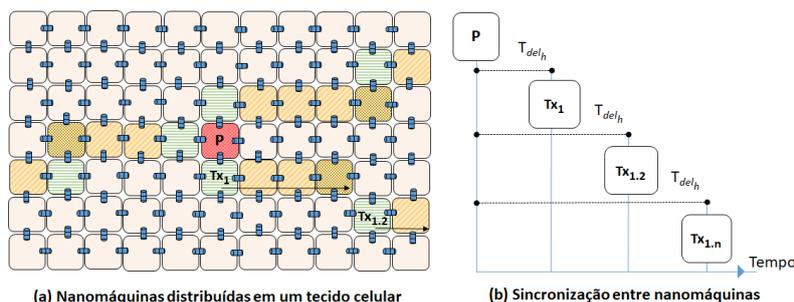


Figura 4. Sincronização entre nanomáquinas

Após a etapa de sincronização, o nó P envia mensagens do tipo CTS (*clear to send* – “pode enviar”) para o controle de acesso ao meio. Não existe a necessidade de codificar dados nas mensagens CTS, os nós transmissores que estão sincronizados identificam essas mensagens pela concentração observada. Dessa forma, quando a concentração da molécula do tipo M_1 (*i.e.* cálcio) estiver contida no intervalo predefinido (b_{cts} if $\text{conc} \in R/\{tx_{m1} \geq x \leq tx_{m1}\}$), cada nó Tx no estado Sf_2 reconhece essa mensagem como sendo o beacon b_{cts} . As mensagens CTS são direcionadas no canal utilizando o recurso de eletroporação para estimular apenas as junções comunicantes de uma determinada direção e canais de micro filtração para enviar as moléculas de controle somente para os canais selecionados. Esse recurso é utilizado para evitar que as nanomáquinas transmissoras próximas ou conectadas ao nó P produzam interferência multiusuário entre si. Sendo assim não existe a necessidade de esperar todas as nanomáquinas de uma direção transmitir antes de liberar a direção oposta. Ao receber a mensagem CTS, todas as nanomáquinas Tx de uma determinada direção ativam os seus temporizadores e iniciam a contagem regressiva para iniciar a codificação e transmissão de dados.

A modulação binária usa concentrações de dois tipos de moléculas de informação para distinguir o bit-0 do bit-1 em um canal com pagamento binário. São considerados

valores de concentração positivos para cada molécula com base em um limite predefinido e qualquer valor acima dele e menor que a concentração utilizada nas mensagens de controle (*range*) é considerado como sendo o bit 1 (Ca^{2+}) ou o bit 0 (IP_3), de acordo com a molécula cuja concentração foi medida. O uso de moléculas diferentes para representar cada bit é utilizado para reduzir a probabilidade de interferência entre símbolos *i.e.*, moléculas geradas pelo comportamento estocástico das reações químicas ou que entram na célula devido ao comportamento estocástico dos canais. Tx decide qual molécula enviar dependendo do bit de transmissão enviado anteriormente e do bit corrente. No entanto, o intervalo de tempo reservado para a transmissão de dados (t_s) deve satisfazer o tamanho do comprimento do bloco $l = 3$ bits (*i.e.*, comprimento da mensagem em bits). Um intervalo de tempo (t_b) é reservado para a liberação de cada símbolo (ou seja, intervalo de tempo de bit) com base no tempo de propagação. O processo de decodificação ocorre do lado do receptor e é baseado na detecção de concentração de moléculas (Eq. 1).

$$RX\text{decode}(s) = \begin{cases} 1 & \text{if } M_1(s) \{X \in R/r_{m1} \geq x \leq r_{m1}\} \\ 0 & \text{if } M_2(s) \{X \in R/r_{m2} \geq x \leq r_{m2}\} \end{cases} \quad (1)$$

Para determinar o bit do símbolo recebido o detector identifica se a concentração atingiu o valor do intervalo de concentração predefinido por tipo de molécula durante o tempo reservado para a duração de cada símbolo.

4. Avaliação de Desempenho

Esta seção descreve a metodologia empregada para analisar por simulação numérica o protocolo de sincronização proposto. As simulações aplicam valores de parâmetros provenientes de experimentações [Lavrentovich and Hemkin 2008, Venance et al. 1997, Goldbeter et al. 1990, Baigent et al. 1997, Höfer et al. 2002]. A metodologia de avaliação seguiu os trabalhos da literatura [Nakano and Liu 2010, Barros et al. 2015, Lin et al. 2015, Tung and Mitra 2019, Borges et al. 2020a].

4.1. Descrição do ambiente de avaliação

O modelo estocástico calcula os valores de cada concentração de moléculas das áreas de armazenamento ao longo do tempo e executa as reações químicas necessárias para a estimulação, amplificação, armazenamento, liberação e difusão de moléculas que compreendem a sinalização intracelular e intercelular conforme descrito na Subsec. 3.1. Para determinar a concentração de moléculas de cada *pool* ao longo do tempo, as simulações seguem um modelo estocástico baseado no algoritmo de Gillespie [Gillespie 1977]. Este algoritmo é executado para selecionar aleatoriamente uma célula e uma reação interna em cada período de tempo. A execução de cada uma das reações requer um processo de agendamento dividido em duas fases: (*i*) selecionar uma reação e (*ii*) selecionar o valor de acréscimo de tempo. A escolha da reação segue o processo de seleção da roleta, selecionando os eventos probabilisticamente. Contudo, o processo deve satisfazer o intervalo de tempo para as reações e o tempo máximo de simulação. O resultado de executar uma reação química é a mudança dos valores dos *pools* ($P1/P2$), *i.e.*, de acordo com a equação diferencial, uma constante mudará o valor do conjunto conforme o resultado positivo ou negativo da reação executada.

Para avaliar o desempenho do protocolo foi analisado o tempo de convergência, ou seja, o tempo que leva para todos os nós sincronizarem (ou atingir o tempo de equilíbrio). Esta métrica é um dos principais indicadores de desempenho para os protocolos

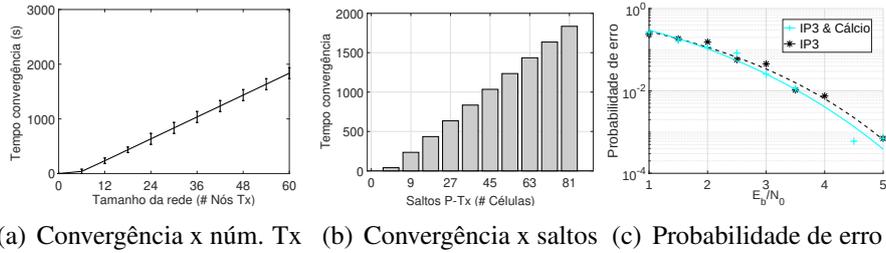
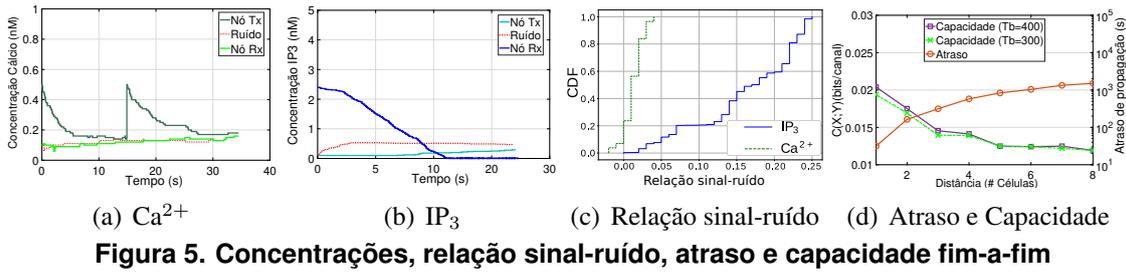
de sincronização. Considerou-se o tamanho da rede de sessenta pares de nós Tx/Rx com um incremento de seis pares de nós em cada cenário. A distância entre o transmissor e o receptor é de 8 células (canal). Para definir os limiares de concentrações de moléculas para as etapas de sincronização e codificação de dados, assim como os *slots* de tempo (de duração T_b) para a transmissão de símbolo único, foram investigados: (i) a oscilação da concentração espaço-temporal de moléculas de Ca^{2+} e IP_3 no Tx e no Rx, (ii) a relação sinal-ruído com base no estudo preliminar [Borges et al. 2020a], (iii) a capacidade em bits versus T_b (baseada em entropia de Shannon) em relação a distâncias variáveis, e (iv) o atraso de propagação.

4.2. Resultados

As Figuras 5a e 5b apresentam os resultados da simulação numérica em Python para a concentração espaço-temporal que traz uma visão sobre os padrões de propagação em um tecido celular 3D (astrócito). Para as duas moléculas, a concentração inicial do Tx é 2×10^3 nM e 500 nM para o Rx. A amplitude é $2.5 \mu\text{m}$ para o IP_3 e $0.6 \mu\text{m}$ para o Ca^{2+} medido pelo nível máximo de moléculas. A distância é de 8 células. Diferentes padrões são observados para cada molécula. Uma observação significativa é o fato do IP_3 propagar mais rápido e sofrer maior degradação no Rx. O Ca^{2+} apresenta uma concentração máxima de 0.5 nM no transmissor e de 0.18 nM no receptor (Fig. 5a). A concentração máxima do IP_3 no transmissor é de 2.5 nM e de 0.35 nM no receptor (Fig. 5b). Contudo os níveis de concentração no Rx podem ser maiores em decorrência de ruídos devido às constantes e aleatórias flutuações das concentrações moleculares de IP_3 e Ca^{2+} . Conforme pode ser observado, com o ruído, a molécula de Ca^{2+} atinge uma concentração de 0.20 nM enquanto o IP_3 a concentração de 0.5 nM.

A Figura 5d apresenta os resultados para o atraso de propagação e a capacidade fim-a-fim versus t_b em relação a distância em número de células. A concentração inicial do cálcio no Tx é de 2000 nM e de 100000nM no Rx a frequência de oscilação é 1kHz. Para medir de forma justa a quantidade de moléculas que são transmitidas, bem como o tempo que percorrido em uma certa distância de um tecido celular, propõe-se medir a quantidade de moléculas transmitidas em comparação com a quantidade de moléculas recebidas ao longo do tempo. O atraso de propagação é maior quando a distância é superior a três, isso ocorre devido ao processo de regeneração de cálcio no astrócito que começa a produzir e liberar novas molécula atrasando o pulso inicial. As características do tecido também influenciam no atraso, os astrócitos são as células gliais que possuem as maiores dimensões resultando em maior tempo de propagação. A análise da capacidade versus T_b indica que alterar o valor de T_b tem pouca variação considerando a distância. Contudo aumentar o T_b aumenta levemente a capacidade de informação uma vez que os efeitos do bit transmitido no próximo é minimizado. Isso faz com que seja possível transmitir mais informações por mais tempo quando o atraso de propagação é alto.

Considerando os resultados de atraso e capacidade obtidos, definiu-se os intervalos de tempo. Para a codificação de dados o T_b é 300 e para o protocolo de sincronização o t_{s_b} é 50 (*beacons*) com intervalos de $t_{f_1} = 10\text{s}$ e $t_{f_2} = 40\text{s}$. Para a codificação os *time-slot* são maiores para evitar o ISI e menores para a sincronização pois não são necessários codificar dados nas mensagens *beacons* e o atraso de propagação é reduzido. Com base nos resultados da concentração espaço-temporal, definiu-se os limiares de concentração para o processo de decodificação nos nós receptores, para o Ca^{2+} *i.e.*, Bit-1 if $M_1 X \in$



$R/\{0.15\text{nM} \geq x \leq 0.25\text{nM}\}$ e para a molécula IP_3 *i.e.*, Bit-0 if $M_2 X \in R/\{0.18 \text{ nM} \geq x \leq 1 \text{ nM}\}$. As mensagens *beacons* utilizadas na etapa de sincronização são identificadas nos nó transmissores pelo limiar de concentração B_{F1} if $M_1 \geq 0.3 \text{ nM}$. Os *beacons* CTS são identificadas nos Tx sincronizados pelo intervalo de concentração B_{cts} if $\text{conc} \in R/\{0.4 \text{ nM} \geq x \leq 0.6 \text{ nM}\}$. Os valores de concentração foram definidos de acordo com padrões encontrados em células saudáveis. Estudos *in vitro* analisaram o comportamento de células após a eletroporação de cálcio. Os resultados indicaram que as células normais são menos sensíveis à eletroporação. Além disso, na maioria dos estudos *in vivo*, foram necessários 168 mM de cálcio injetado em um volume equivalente a 50% do volume do tumor para ocorrer a morte de celular [Frandsen et al. 2020].

A Figura 6a apresenta os resultados para o tempo médio de convergência (*i.e.*, período decorrido até que os nós estejam sincronizados) em relação a diferentes tamanhos de rede. Conforme pode ser observado, quanto maior é o tamanho da rede (*i.e.*, número de nós transmissores) mais lento é o processo de sincronização. Contudo isso não está necessariamente associado à quantidade de nós que precisam ser sincronizados, mas sim ao tempo necessário para a ressonância do pulso de *beacons* que são dependentes das características do canal de comunicação molecular. Embora os valores de tempo para convergência sejam maiores quando comparados aos sistemas convencionais eles são congruentes para os sistemas de sinalização celular e respeitam o tempo natural de propagação e síntese de moléculas.

A Figura 6b apresenta os resultados para o tempo de convergência em relação ao número de saltos. São considerados os nós transmissores de apenas uma das seis direções possíveis no tecido 3D e o número de saltos refere-se a quantidade de células que o sinal precisa percorrer. Os resultados mostram que a distância entre o nó P e o nó Tx desempenha um papel importante no protocolo de sincronização, quanto maior a distância mais lenta é convergência. A rede com seis nós transmissores apresenta o menor intervalo de tempo para convergir, isso é explicado pelo fato de que no primeiro salto as nanomáquinas transmissoras estão conectadas diretamente ao nó P. Como a troca de mensagens de sincronização é realizada essencialmente por *broadcast* do nó P para os nós Tx e não requer a troca de mensagens direcionais, é reduzida a quantidade de mensagens de controle que suportam o protocolo permitindo as nanomáquinas convergirem com baixo custo.

A Figura 6c apresenta os resultados para a probabilidade de erro de bit versus a relação sinal-ruído molecular (E_b / N_0). A codificação OOK que utiliza moléculas distintas para discretizar os símbolos (*i.e.*, cálcio para o bit 1 e IP_3 para o bit 0) é comparada com a modulação que utiliza somente a molécula de IP_3 para transmitir moléculas em períodos de bit 1 e não transmitir moléculas em períodos de bit 0 (a concentração é zero). Os resultados foram coletados após a transmissão dos bits 0,1,0. Observou-se que utilizar diferentes moléculas para discretizar os símbolos tem melhor desempenho à medida que E_b/N_0 aumenta no canal e beneficia o sistema de comunicação, pois diminui a probabilidade de erro de bit. Os resultados da relação sinal-ruído (Fig. 5c) apoiam o uso de diferentes tipos de moléculas para diferenciar os símbolos, uma vez que os valores de sobreposição entre as concentrações de moléculas são baixos (menos de 10 %), o que reduz a probabilidade de interferência entre símbolos durante o processo de codificação.

5. Conclusão

Este artigo propõe o primeiro protocolo de sincronização para nanorredes multiusuários baseadas em sinalização celular. O protocolo parte da premissa de que existe na rede uma nanomáquina desempenhando o papel de nó principal. O nó principal envia *beacons* por *broadcast* para todos os nós transmissores da rede. Os nós transmissores registram o tempo de recebimento entre as mensagens e estimam o atraso de propagação. Usando essas informações, as nanomáquinas transmissoras conseguem ajustar os seus temporizadores e alcançar a convergência com um baixo custo de mensagens. Em trabalhos futuros, pretende-se explorar cenários com múltiplos nós principais e técnicas de controle de acesso ao meio.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da UFPR e auxílio financeiro do CNPq processos, #313844/2020-8, #426701/2018-6 e da CAPES, processo #88882.382196/2019-01.

Referências

- Akdeniz, B. C. and Egan, M. (2021). Molecular communication for equilibrium state estimation in biochemical processes on a lab-on-a-chip. *IEEE Trans. on NanoBiosc.*
- Akyildiz, I., Pierobon, M., Balasubramaniam, S., and Koucheryavy, Y. (2015). The internet of bio-nano things. *IEEE Communications Magazine.*
- Akyildiz, I. F., Pierobon, M., and Balasubramaniam, S. (2019). Moving forward with molecular communication: From theory to human health applications [point of view]. *Proceedings of the IEEE.*
- Baigent, S., Stark, J., and Warner, A. (1997). Modelling the effect of gap junction nonlinearities in systems of coupled cells. *Journal of theoretical biology.*
- Barros, M. T., Balasubramaniam, S., and Jennings, B. (2015). Comparative end-to-end analysis of ca 2+-signaling-based molecular communication in biological tissues. *IEEE Transactions on Communications.*
- Barros, M. T., Doan, P., Kandhavelu, M., J. B., and Balasubramaniam, S. (2021). Engineering calcium signaling of astrocytes for neural molecular computing logic gates. *Scientific reports.*
- Borges, L. F., Barros, M. T., and Nogueira, M. (2020a). Modelo de comunicação molecular multiportadora com ruído intracelular e intercelular. In *Anais do XXXVIII Simpósio Brasileiro de Redes de Computadores e Sistemas Distribuídos*, pages 840–853. SBC.

- Borges, L. F., Barros, M. T., and Nogueira, M. (2020b). A Multi-Carrier molecular communication model for astrocyte tissues. In *IEEE International Conference on Communications (ICC): SAC Molecular, Biological, and Multi-Scale Comm.*, Dublin, Ireland.
- Decrock, E., De Bock, M., Wang, N., Gadicherla, A. K., Bol, M., Delvaeye, T., Vandenabeele, P., Vinken, M., Bultynck, G., Krysko, D. V., et al. (2013). Ip3, a small molecule with a powerful message. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*.
- Frandsen, S. K., Vissing, M., and Gehl, J. (2020). A comprehensive review of calcium electroporation—a novel cancer treatment modality. *Cancers*.
- Gillespie, D. T. (1977). Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *J. of physical chemistry*.
- Goldbeter, A., Dupont, G., and Berridge, M. J. (1990). Minimal model for signal-induced ca^{2+} oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Höfer, T., Venance, L., and Giaume, C. (2002). Control and plasticity of intercellular calcium waves in astrocytes: a modeling approach. *J. of Neuroscience*.
- Jamali, V., Ahmadzadeh, A., and Schober, R. (2017). Symbol synchronization for diffusive molecular communication systems. In *2017 IEEE International Conference on Communications (ICC)*, pages 1–7. IEEE.
- Khakh, Baljit S and Sofroniew, M. V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neurosci*.
- Kilinc, D. and Akan, O. B. (2013). An information theoretical analysis of nanoscale molecular gap junction communication channel between cardiomyocytes. *IEEE Trans. on Nanotechnology*.
- Lallouette, J., De Pittà, M., Ben-Jacob, E., and Berry, H. (2014). Sparse short-distance connections enhance calcium wave propagation in a 3d model of astrocyte networks. *Frontiers in Comp. Neurosci*.
- Lavrentovich, M. and Hemkin, S. (2008). A mathematical model of spontaneous calcium (ii) oscillations in astrocytes. *J. of Theoretical Biology*.
- Lin, L., Yang, C., Ma, M., and Ma, S. (2015). Diffusion-based clock synchronization for molecular communication under inverse gaussian distribution. *IEEE Sensors Journal*.
- Luo, Z., Lin, L., and Ma, M. (2016). Offset estimation for clock synchronization in mobile molecular communication system. In *2016 IEEE Wireless Communications and Networking Conference*, pages 1–6. IEEE.
- Moore, M. J. and Nakano, T. (2013). Oscillation and synchronization of molecular machines by the diffusion of inhibitory molecules. *IEEE trans. on nanotec.*
- Nakano, T. and Liu, J.-Q. (2010). Design and analysis of molecular relay channels: An information theoretic approach. *IEEE Trans. on NanoBioscience*.
- Nakano, T., Suda, T., Koujin, T., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2007). Molecular communication through gap junction channels: System design, experiments and modeling. In *Bionetics*, pages 139–146. IEEE.
- Stephenson-Brown, A., Acton, A. L., Preece, J. A., Fossey, J. S., and Mendes, P. M. (2015). Selective glycoprotein detection through covalent templating and allosteric click-imprinting. *Chemical science*.
- Tung, T.-Y. and Mitra, U. (2019). Synchronization error robust transceivers for molecular communication. *IEEE Transactions on Molecular, Biological and Multi-Scale Communications*.
- Venance, L., Stella, N., Glowinski, J., and Giaume, C. (1997). Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. *J. of Neuroscience*.