

FLÁVIO OLIVEIRA DE SOUSA

**A UTILIZAÇÃO DO SISTEMA IMUNE ARTIFICIAL PARA
INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOLÓGICOS DA SEPSE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S725u
2014

Sousa, Flávio Oliveira de, 1978-
A utilização do sistema imune artificial para investigação
dos mecanismos imunológicos da sepse / Flávio Oliveira de
Sousa. – Viçosa, MG, 2014.
iv, 84f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Alcione de Paiva Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.79-84.

1. Sepse. 2. Sistema imunológico. 3. Simulação por
computador. 4. AutoSimmune. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Informática. Programa de
Pós-graduação em Ciência da Computação. II. Título.

CDD 22. ed. 616.944

FLÁVIO OLIVEIRA DE SOUSA

SUMÁRIO

RESUMO.....

ABSTRACT.....

1. INTRODUÇÃO GERAL.....

A UTILIZAÇÃO DO SISTEMA IMUNE ARTIFICIAL PARA INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOLÓGICOS DA SEPSE

1.1. OBJETIVOS.....

1.2. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....

2. ARTIGOS.....

2.1. Artigo I: Sistema Imune Artificial.....

2.2. Artigo II: Tipos de Redes Neurais.....

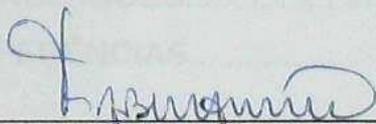
2.3. Artigo III: Modelos de Redes Neurais.....

2.4. Artigo IV: Imunologia da Sepsis: Investigação por Rede de Computação.....

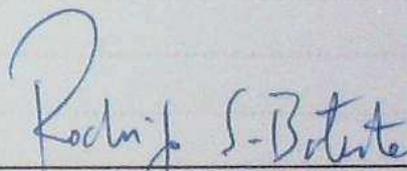
2.5. Artigo V: Mecanismos de Ativação de Linfócitos em um Sistema Imune Artificial.....

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

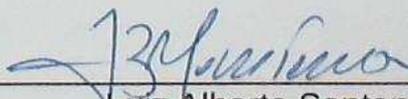
APROVADA: 22 de setembro de 2014.



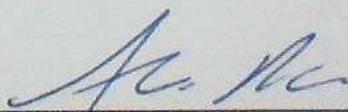
Fábio Ribeiro Cerqueira
(Coorientador)



Rodrigo Siqueira Batista



Luiz Alberto Santana



Alcione de Paiva Oliveira
(Orientador)

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1.INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. O problema e sua importância.....	1
1.2. Hipótese	2
1.3. Objetivos.....	3
1.4. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	3
2.ARTIGOS.....	6
2.1. Artigo I: Sistema Imune Artificial	7
2.2. Artigo II: The artificial neutrophil and a proposal of an in silico research of the immune response in human bacterial diseases	25
2.3. Artigo III: Macrófago artificial e a modelagem computacional do sistema imune humano para a investigação da fisiopatologia da sepse: perspectivas.....	38
2.4. Artigo IV: Imunologia da sepse: Investigação por meio de simulação computacional com sistemas multiagentes	55
2.5. Artigo V: Predicting the occurrence of sepsis by in silico simulation.....	61
3.CONCLUSÕES.....	77
4.REFERÊNCIAS.....	79

RESUMO

SOUSA, Flávio Oliveira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2014. **A utilização do sistema imune artificial para investigação dos mecanismos imunológicos da sepse.** Orientador: Alcione de Paiva Oliveira. Coorientadores: Fábio Ribeiro Cerqueira e Andreia Patrícia Gomes.

Tendo em vista a importância das enfermidades humanas, o presente trabalho apresenta um estudo para a investigação in silico da sepse. Através de uma coletânea de artigos são apresentados os conceitos iniciais que permearam o trabalho tanto sobre o aspecto da imunologia e da doença quanto sobre os aspectos das ferramentas computacionais que permitem o desenvolvimento de alternativas de pesquisas imunológicas. O artigo “Sistema Imune Artificial” apresenta uma revisão teórica da interseção entre imunologia e estratégias in silico. Os artigos “The artificial neutrophil and a proposal of an in silico research of the immune response in human bacterial diseases” e “Macrófago artificial e a modelagem computacional do sistema imune humano para a investigação da fisiopatologia da sepse” apresentam os requisitos para a simulação computacional do neutrófilo e do macrófago. O artigo “Imunologia da sepse: Investigação por meio de Simulação Computacional com Sistemas Multiagentes” apresenta o AutoSimune e argumenta as estratégias no desenvolvimento do modelo na elucidação dos mecanismos da sepse e o artigo “Predicting the occurrence of sepsis by in silico simulation” apresenta a implementação do modelo e os resultados obtidos que envolvem um aumento de fagócitos (especialmente neutrófilos), aumento da temperatura e presença de bactérias na circulação, todos compatíveis com a literatura, evidenciando assim a possibilidade da utilização do modelo no incremento do conhecimento sobre a doença.

ABSTRACT

SOUSA, Flávio Oliveira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2014. **The use of artificial immune system for investigation of the mechanisms of sepsis.** Adviser: Alcione de Paiva Oliveira. Co-Advisors: Fábio Ribeiro Cerqueira and Andreia Patrícia Gomes.

Given the importance of human diseases, this paper presents a study for the investigation in silico of the sepsis. Through a collection of articles we present the initial concepts which conducted the research on both the aspect of immunology and disease and the aspects of computational tools that enable the development of alternative immunological research. The article "Artificial Immune System" presents a theoretical review of the intersection of immunology and strategies in silico. The articles "The artificial neutrophil and the proposal of an in silico research of the immune response in human bacterial diseases" and "Artificial Macrophage and computational modeling of the human immune system to investigate the pathophysiology of sepsis" present the requirements for the neutrophil and macrophage computer simulation. The article "Sepsis Immunology: research through Computational Simulation with Multi-Agent Systems" presents the Auto Simmune and argues strategies in developing the model in elucidating the mechanisms of sepsis and the article "Predicting the occurrence of sepsis by in silico simulation" shows the model implementation and results which involve an increase in phagocyte (especially neutrophil), temperature raise and the presence of bacteria in the circulation, all compatible with the literature, thus pointing to the possibility of using the model in improving knowledge about the disease.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A imunidade tem sido definida como resistências a doenças infecciosas (ABBAS *et al.*, 2003) ou como a reação contra substâncias estranhas, incluindo - mas não limitado - a organismos infecciosos (PINCHUK, 2001). O conjunto de células, tecidos e moléculas que provêm essa resistência é chamado de sistema imune e a reação coordenada desse sistema contra infecções é chamada de resposta imunológica (ABBAS *et al.*, 2003). A imunologia é então, o estudo do sistema imune e de suas respostas imunológicas contra agentes infecciosos (ABBAS *et al.*, 2003).

O desenvolvimento de vacinas, a obtenção de sucesso nos transplantes de órgãos, o aprimoramento do tratamento de doenças como o câncer são exemplos de alguns dos grandes benefícios que podem ser alcançados através dos esforços da imunologia.

Além disso, problemas de engenharia – especialmente da computação – cada vez mais complexos e dinâmicos buscam soluções que podem ser inspiradas nas lições adquiridas destes sistemas biológicos. Tais sistemas ficaram conhecidos como sistemas bio-inspirados e constituem uma via de mão dupla para a criação de conhecimento tendo em vista que na medida em que são inspirados por sistemas biológicos também incrementam o conhecimento de tais sistemas.

No âmbito do sistema biológico humano, a sepse é uma das principais causas de óbito nas unidades de terapia intensiva (UTI), provocando milhares de mortes anualmente, no mundo. Aqui propomos a utilização destes sistemas *in silico* – através sistemas multiagentes - no incremento da compreensão dos mecanismos envolvidos nesta doença.

1.1. O problema e sua importância

O conceito de sepse abrange as situações nas quais se estabelece síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês systemic inflammatory response syndrome) desencadeada por infecção suspeita ou confirmada (Siqueira-Batista *et*

al., 2011). Trata-se de uma das mais importantes complicações infecciosas da medicina contemporânea, tanto por sua incidência, quanto por sua gravidade e pelo grande potencial de evolução para o óbito (CARVALHO; TROTTA, 2013),(MARTIN, 2006),(HOTCHKISS; KARL, 2003). Do ponto de vista clínico, a apresentação da sepse se relaciona às múltiplas possibilidades de interação entre homem e microrganismos (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011) em contextos nos quais se expressa a ruptura do complexo equilíbrio dos mecanismos pró e anti-inflamatórios que desorganizam a resposta inflamatória nos enfermos vitimados pela doença (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012a).

Segundo (Angus *et al.*, 2001) - estudo feito nos EUA - A incidência de sepse grave foi de três casos por mil habitantes, superando a da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e a dos principais tipos de câncer. Os achados relativos aos países membros da União Europeia não diferem muito deste panorama, estimando-se a ocorrência de 150.000 óbitos/ano devido à sepse. No Brasil, os aspectos epidemiológicos da sepse também têm sido investigados e identificou-se uma densidade de incidência de sepse de 57,9 por 1000 pacientes-dia. (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011). Em números absolutos, 1,5 milhão de indivíduos nos Estados Unidos da América e outros 1,5 milhão de pessoas na Europa, desenvolvem sepse grave e/ou choque séptico anualmente. Estima-se ainda que a taxa de óbito gire em torno de 35 a 50% (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011).

Esse grande número de casos fatais tem alavancado substancialmente as investigações com o propósito de compreender os intrincados mecanismos patogênicos desta doença (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012a).

1.2. Hipótese

A simulação computacional do sistema imune, a partir de uma versão estendida do *AutoSimune*, permite a investigação *in silico* dos complexos mecanismos implicados no desenvolvimento da sepse, constituindo importante domínio de pesquisa para a ampliação da compreensão da fisiopatologia dessa importante condição mórbida.

1.3. Objetivos

Estender o *AutoSimmune* - sistema imune artificial proposto por (POSSI, 2012) e colaboradores - com o escopo de permitir a investigação *in silico* da sepse, utilizando um sistema multi-agente.

Especificamente, pretende-se :

- Estender o modelo (através de máquinas de estado) para permitir a simulação da sepse utilizando as informações adquiridas através de levantamento bibliográfico.
- Implementar o modelo estendendo o simulador *AutoSimmune*.
- Evidenciar os resultados obtidos da simulação através de comparação com o comportamento biológico descrito na literatura.
- Efetuar testes através de modificações das variáveis na tentativa de elucidar alguns mecanismos ainda não totalmente compreendidos da sepse.
- Propor hipóteses a serem testadas na tentativa de elucidar os mecanismos da doença.

Como contribuição, este trabalho irá apresentar uma ferramenta para o estudo da sepse, que poderá auxiliar num melhor entendimento dos mecanismos da doença, de modo rápido e seguro. Ademais, pretende-se ampliar o entendimento da utilização dos sistemas multiagentes, e do uso de metáforas do sistema imune biológico nos sistemas computacionais bio-inspirados, com a finalidade de resolução de problemas na área de ciência da computação.

1.4. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação foi elaborada de acordo com um dos formatos recomendados pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação da UFV. A dissertação está organizada como uma coletânea de artigos produzidos durante o curso de mestrado.

O presente capítulo - Capítulo 1 - é uma introdução à organização da pesquisa e do trabalho incluindo hipótese, objetivos e apresentando os demais capítulos.

O Capítulo 2 inclui cinco artigos que formam o escopo da dissertação. O Artigo I apresenta uma revisão teórica que culmina na identificação das principais estratégias *in silico* do sistema imune. O Artigo II e o Artigo III apresentam os requisitos para a simulação computacional do neutrófilo e do macrófago. O artigo IV argumenta as estratégias no desenvolvimento de um modelo que utiliza sistemas multiagentes na elucidação dos mecanismos da sepse e o Artigo V apresenta a implementação do modelo, os resultados obtidos e o que eles representam no estudo da doença.

O capítulo 3 apresenta as conclusões finais, destacando os resultados obtidos e os avanços alcançados. Além disso, são apresentadas algumas oportunidades de pesquisa que podem proporcionar a elaboração de trabalhos futuros para fazer avançar os conhecimentos gerados tanto em biologia quanto na computação.

Todas as referências bibliográficas dos artigos e da dissertação foram organizadas no final do trabalho no capítulo 4.

A seguir estão relacionadas as referências completas dos artigos que compõem esta dissertação:

Referências dos artigos do *Capítulo 2*:

- SOUSA, F. O.; GOMES, A. P.; OLIVEIRA, A. P.; POSSI, M. A.; CERQUEIRA, F. R.; SANTANA, L. A.; BASTOS, C. A.; FARAGO, W. C.; FERREIRA, R. S.; SIQUEIRA-BATISTA, R. **Sistema Imune Artificial**. In: Geller M. Scientia Immunis. Rio de Janeiro: Rubio, 2013.
- SIQUEIRA-BATISTA, R.; SOUSA, F. O.; GOMES, A. P.; OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA, I. S.; FARAGO, W. C.; BASTOS, C. A.; POSSI, M. A.; SANTANA, L. A.; CERQUEIRA, F. R. **The artificial neutrophil and a proposal of an *in silico* research of the immune response**. In: human bacterial diseases. *Abakós*, 2(2), 79-91.
- GOMES, A. P.; SOUSA, F. O.; OLIVEIRA, A. P.; MOREIRA, B. S. V.; FREITAS, R.B.; CERQUEIRA, F. R.; POSSI, M. A.; BASTOS, C. A.; SANTANA, L. A.; SIQUEIRA-BATISTA, R. **Macrófago artificial e a modelagem computacional do sistema imune humano para a investigação da fisiopatologia da sepse: perspectivas**. Artigo a ser

submetido

- DE SOUSA, F. O.; DE PAIVA OLIVEIRA, A.; GOMES, A. P.; BASTOS, C. A.; POSSI, M. D. A., SANTANA; L. A., CERQUEIRA, F. R.; OLIVEIRA, M. G. A.; SIQUEIRA-BATISTA, R. **Imunologia da Sepse: Investigação por meio de Simulação Computacional com Sistemas Multiagentes**. In: XIII Workshop de Informática Médica (WIM), 2013, pag: 1143-1146
- DE SOUSA, F. O.; DE PAIVA OLIVEIRA, A.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; SANTANA, L. A.; CERQUEIRA, F. R. **Predicting the occurrence of sepsis by *in silico* simulation**. In: 13th Mexican International Conference on Artificial Intelligence, MICA I 2014

2. ARTIGOS

Este capítulo apresenta uma coletânea de cinco artigos resultantes da pesquisa que deu origem a essa dissertação. Tais artigos foram organizados de forma a apresentar de forma sequencial tanto a revisão bibliográfica (sobre a forma do primeiro artigo) quanto a evolução do projeto que culminou com a presente dissertação.

O Artigo I – Sistema Imune Artificial – apresenta uma revisão bibliográfica sobre o sistema imune, sistemas multiagentes e das principais estratégias utilizadas na simulação computacional do sistema imune. Apresenta também o *AutoSimune* que é o simulador escolhido para simular a sepse e seus mecanismos.

O Artigo II – The artificial neutrophil and a proposal of an *in silico* research of the immune response in human bacterial diseases – apresenta os requisitos para a simulação computacional do neutrófilo no *AutoSimune*. Através desta análise foi possível desenvolver um modelo utilizando máquinas de estados descrevendo o comportamento dessa célula, permitindo assim o desenvolvimento de estudos sobre seu papel na sepse.

O Artigo III – Macrófago artificial e a modelagem computacional do sistema imune humano para a investigação da fisiopatologia da sepse: perspectivas - apresenta os requisitos para a simulação computacional do macrófago no *AutoSimune* com objetivos similares ao do Artigo II. Estas duas estruturas celulares desempenham importante papel na simulação da sepse.

O artigo IV - Imunologia da sepse: investigação por meio de simulação computacional com sistemas multiagentes - argumenta as estratégias no desenvolvimento de um modelo que utiliza sistemas multiagentes na elucidação dos mecanismos da sepse.

E o Artigo V - Predicting the occurrence of sepsis by *in silico* simulation – apresenta os resultados da conclusão da implementação do projeto desde a apresentação dos requisitos e implementação do modelo até os resultados obtidos comparando-os com o apresentado na literatura dos estudos do sistema imune.

2.1. Artigo I: Sistema Imune Artificial

Sousa FO, Gomes AP, Oliveira AP, Possi MA, Cerqueira FR, Santana LA, Bastos CA, Farago WC, Ferreira RS, Siqueira-Batista R

In: Geller M. Scientia Immunus. Rio de Janeiro: Rubio, 2014-2015.

1. INTRODUÇÃO

O sistema imunológico (SI) pode ser caracterizado como um conjunto constituído por células e mediadores que atuam de modo integrado e coordenado, sendo capaz de reconhecer e responder aos elementos identificados como *não-próprios* ao hospedeiro. A função primordial do SI é a manutenção da homeostase – através de uma rede de cooperação que integra todos os órgãos e tecidos do corpo –, respondendo às demandas geradoras de desequilíbrio, sejam externas (microrganismos, produtos químicos, radiações, e outros) ou internas (mutações, alterações metabólicas, e outras) (SIQUEIRA-BATISTA, 2008). Suas ações dependem de intrincados e complexos mecanismos de interação, os quais desempenham múltiplas funções frente a um estímulo antigênico, a partir da expressão e liberação de moléculas responsáveis por interações, modulações e regulação intrínsecas ao sistema.

Nos últimos 50 anos houve uma grande expansão nos conhecimentos acerca do funcionamento do SI, mormente após o advento das técnicas de biologia molecular. Sem embargo, ainda que se entendam muitos dos seus componentes, o SI permanece incompreendido em grande medida, provavelmente pela ausência de um arcabouço teórico mais refinado, tal qual o discutido por (VAZ;FARIA, 1993):

"[...] há uma ignorância central, usualmente omitida na apresentação da Imunologia. Os mecanismos básicos de operação do sistema imune não são conhecidos, embora conheçamos minuciosamente a maioria de seus componentes e subcomponentes." (VAZ; FARIA, 1993)

A carência de uma teoria geral para explicar o SI refere-se, em última análise, à ausência de um modelo capaz de mimetizar e quantificar os fenômenos de ordem biológica. Algumas boas tentativas têm sido feitas, mas ainda distantes de alcançar maior êxito. No particular da imunologia, permanece hegemônica uma perspectiva de compreensão dos processos em termos de ataque-defesa (SIQUEIRA-BATISTA, 2008, 2009) caracterizando uma genuína metáfora belicista — que atravessa o pensamento biomédico —, provavelmente incapaz de fornecer informações mais intrincadas da complexidade dos fenômenos:

“Quando dizemos que o sistema imune nos defende, identificando e eliminando materiais estranhos, em meio aos componentes do corpo, estamos usando, deliberadamente ou não, uma metáfora. Não existe uma entidade inteligente planejando e desenvolvendo estratégias defensivas contra invasores antigênicos no meio do sistema imune. As modificações, que o sistema atravessa, surgem como decorrências inevitáveis de sua estrutura celular e molecular. Tais mudanças estruturais ocorrem como se o corpo se defendesse e, usualmente, resultam na eliminação de materiais estranhos sem causar danos excessivos à estrutura do organismo. Mas elas não derivam de um planejamento da defesa. A defesa não é intencional.” (VAZ; FARIA, 1993)

Ao que parece, este é um dos nós que tem dificultado o alcance de uma visão mais diáfana sobre o funcionamento do SI, o que tem implicações sobre o entendimento de várias condições mórbidas que acometem seres humanos, destacando-se as enfermidades autoimunes, as neoplasias e as doenças infecciosas – dentre as quais a sepse.

O sistema imunológico vem sendo tradicionalmente estudado – em situações fisiológicas e patológicas – em modelos experimentais e em material oriundo de pacientes (seres humanos e animais), procedimentos científicos que têm auxiliado o entendimento de vários dos seus aspectos. Entretanto, limitações técnicas e éticas são óbices para a implementação de díspares ensaios, o que tem aberto perspectivas para o desenvolvimento de novos métodos de pesquisa. Nessa esfera, torna-se significativa a modelagem computacional do sistema imune, o que descreve múltiplas abordagens para o desenvolvimento de simuladores. Com tal estratégia

tem sido possível simular o comportamento do SI – com destaque para as múltiplas interações entre células e mediadores – aspecto importante para se compreender de forma mais acurada os princípios básicos do seu funcionamento. Apresentar atualidades e perspectivas na área de modelagem computacional do SI – o sistema imune artificial – é o escopo do presente ensaio.

2. SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DO SISTEMA IMUNE

A abordagem computacional de problemas no domínio biológico tem sido denominada pela pesquisa *in silico*. Destaca-se, nesse âmbito, a existência de um grande interesse no desenvolvimento de ferramentas de pesquisa *in silico*, as quais podem ser associadas aos métodos de pesquisa tradicionais (FOLCIK *et al.*, 2007). Além de mais baratos, os modelos *in silico* são mais rápidos que os estudos *in vivo* e *in vitro* (BENOIST; MATHIS, 2001). Os modelos *in silico* podem ajudar os pesquisadores a entender os mecanismos do SI e verificar suas hipóteses. Além disso, podem utilizar o conhecimento adquirido para desenvolver novos métodos de diagnóstico e abordagens terapêuticas, além das investigações de prognóstico.

Experimentos *in silico* tornam-se também relevantes em termos dos problemas éticos e bioéticos que podem sobrevir das pesquisas, tanto em relação a experimentação com seres humanos, quanto com animais (REGO *et al.*, 2009). Ademais, simulações de ambientes biológicos podem evitar a exposição a riscos desnecessários, preservando ou atenuando os malefícios oriundos de pesquisas. Desde esta perspectiva, o uso da experimentação *in silico* representa uma fecunda parceria entre a ciência da computação e a ciência biomédica, a qual é capaz de permitir a verificação de comportamentos de relação e a testagem preliminar de hipóteses sem a exposição de pessoas e animais a riscos, o que garante o compromisso ético, além de proporcionar um melhor cuidado em saúde.

Existem duas modalidades computacionais para a modelagem do sistema imunológico: A abordagem *top-down* e a abordagem *bottom-up*. (LI *et al.*, 2009). A primeira resolve os problemas por meio de um grande número de agentes. Esta abordagem não enfatiza as entidades microscópicas explicitamente, mas estima o

comportamento no nível macroscópico, exemplificado pela equação diferencial ordinária (ODE).

A abordagem *bottom-up* enfatiza o nível microscópico e requer maior poder computacional para simular um grande número de entidades significativas do mundo real. A complexidade computacional cresce exponencialmente com o número de entidades no modelo. No entanto, a partir do modelo construído pela abordagem *bottom-up*, podemos observar as interações entre as entidades especificamente e estudar como as mesmas contribuem para o surgimento da propriedade global; isso significa que é possível obter uma representação precisa de uma abordagem *bottom-up* ao custo de alta complexidade computacional. Os sistemas multiagentes – descritos a seguir – são exemplos de sistemas deste tipo.

3. Estratégias de modelagem computacional

Dentre as abordagens descritas na literatura para a simulação do SI, descrevem-se especialmente as equações diferenciais ordinárias (EDO), os autômatos celulares e os sistemas multiagentes (SMA).

Os modelos baseados em EDO são todos de base populacional, e a espacialidade e a topologia que tanto dependem de interações individuais são ignoradas. O principal problema das EDO abrange as dificuldades para a descrição correta dos fenômenos observados pelos comportamentos macroscópicos (nível de sistema), que são emergências resultantes da interação local entre as entidades. Seus méritos são a baixa carga de processamento e uma maior facilidade de projeto e implementação. Ao mesmo tempo, o modelo permite-nos analisar o sistema em detalhe (LI *et al.*, 2009).

Os autômatos celulares (AC) permitem representar vários tipos de comportamentos complexos através da utilização de um grande número de células e suas interações dentro de regras apropriadas. As principais limitações deste modelo é que ele não permite a modelagem (e interação) de células distintas e não há difusão celular no modelo (LI *et al.*, 2009).

Os sistemas multiagentes (SMA) (POSSI *et al.*, 2011), (POSSI, 2012) têm sido

muito empregados para simular comportamentos emergentes de sistemas complexos – incluindo o SI (Possi 2012, Li *et al.*, 2009) –, à medida em que descrevem com mais precisão as interações reais entre as entidades do sistema. Cada agente – com seus próprios estados e regras – representa uma entidade do sistema real. Na modelagem utilizando SMA, o sistema é construído “*definindo os aspectos individuais, relacionados aos agentes, de tal forma que ocorra a emergência dos aspectos coletivos*” (HÜBNER *et al.*, 2011). Destaque-se, igualmente, que o uso de SMA permite-nos “*explorar a emergência de funções macroscópicas complexas e determinísticas a partir de interações microscópicas estocásticas*” (LI *et al.*, 2009), o que nos habilita a investigar hipóteses de como as células – e os mediadores – interagem entre si, e de como comportamentos emergem dessas interações. Embora SMA seja o melhor método para modelar a complexidade do sistema, necessita de grande poder computacional nos cálculos com grandes quantidades de agentes, o que pode limitar suas aplicações (LI *et al.*, 2009). A Figura 1 ilustra como o agente interage com o ambiente alterando seus estados e regras.

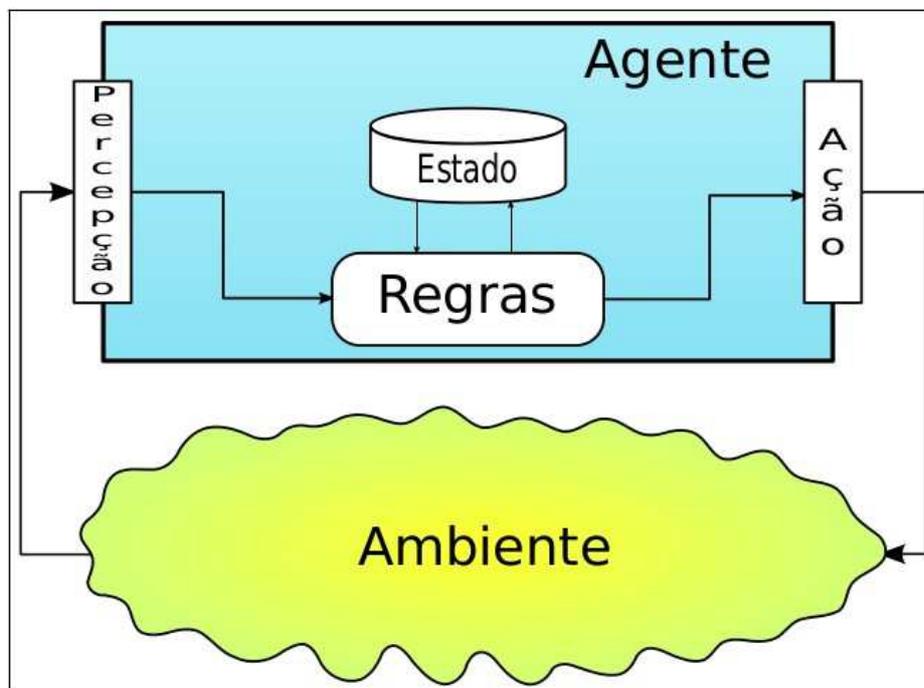


Figura 1 - Modelo geral de um agente reativo com estado. Fonte (adaptado

Com base nessas breves considerações, o desenvolvimento de modelos do SI – especialmente com o emprego de SMA – pode ser considerado extremamente útil para abranger as funções de cada um de seus componentes e mecanismos, de modo que se possa utilizar todo o seu potencial na medicina, além de permitir a implementação de aplicações computacionais bio-inspiradas, as quais se mostram muito úteis para a solução de problemas em informática (LI *et al.*, 2009). Deste modo, modelar o SI serve tanto para sua melhor compreensão, como também para usar novos conhecimentos e hipóteses como inspiração no desenvolvimento de soluções para problemas de outras áreas, como a computação e a engenharia (LI *et al.*, 2009). Conhecer melhor as funções do SI – e como se dão suas interações microscópicas e não lineares em nível molecular e celular – pode prover diretrizes para a construção de métodos computacionais distribuídos, paralelos e adaptativos (LI *et al.*, 2009).

Os principais trabalhos ligados à simulação do sistema imunológico encontrados na literatura são:

(1) O *ImmSim* cujo modelo é baseado em duas entidades básicas: as entidades celulares (os linfócitos, por exemplo) e as entidades moleculares (citocinas, por exemplo). Esse modelo foi descrito por Celada e Seiden (apud RAPIN *et al.*, 2010), em 1992. Como o código-fonte do sistema foi liberado sob a licença GPL, várias outros sistemas foram originados dele, como a versão em C ANSI, chamada *C-ImmSim* (RAPIN *et al.*, 2010), e a versão que utiliza programação paralela, chamada de *ParImm*;

(2) O *Simmune* é uma plataforma para simulações imunológicas que se baseia em partículas, em uma rede tri-dimensional, sendo que tudo são partículas, inclusive as citocinas. As células são agentes reativos puros, que agem somente em resposta a estímulos;

(3) O *BIS* – também conhecido como “The Basic Immune Simulator ” (FOLCIK *et al.*, 2007) – é um modelo baseado em agentes para estudar as interações entre células da imunidade inata e as células da imunidade adaptativa. Possui três

espaços virtuais onde tipos básicos de células interagem. Tem sido utilizado tanto para uso educacional, como para pesquisas envolvendo temas como hipersensibilidade e câncer (RAPIN *et al.*, 2010); e

(4) O *AutoSimunne* – construído por Possi e colaboradores na Universidade Federal de Viçosa – inspirado no BIS e que será descrito a seguir (POSSI, 2012).

4. O *AutoSimunne*

O *AutoSimmune* é um modelo computacional baseado em SMA, construído com o framework Repast Simphony (POSSI *et al.*, 2010, 2011), (POSSI, 2012), OLIVEIRA *et al.*, 2012). No modelo, as áreas do organismo onde as células irão desempenhar os seus papéis são representadas por zonas. A principal zona do modelo é a *Tissue* que representa uma fatia microscópica de um tecido parenquimatoso genérico onde as células do organismo têm seu primeiro contato com o patógeno, e onde também ocorre a infecção. Há ainda a área *Lymphnode* que representa o linfonodo, na qual os antígenos são apresentados aos linfócitos e onde estes se proliferam assim que o reconhecem. A zona *Circulation* representa a circulação linfática e sanguínea e a *BoneMarrow* representa uma medula óssea abstrata criada pela necessidade de se representar os mecanismos relacionados à tolerância central das células B e responsável por gerar os agentes que representam os mesmos, com especificidades aleatórias e testadas através dos seus mecanismos da tolerância central. Por fim, o *Thymus* é a área responsável por gerar os agentes que representam os linfócitos T helper (ThCell) e T citotóxico (CTL), com especificidades aleatórias e testadas através dos mecanismos da tolerância central do linfócito T. A Figura 2 demonstra como é a representação visual da projeção das zonas supra citadas. A Figura 3 ilustra os diferentes tipos de topologia de agentes – como eles são organizados no ambiente. No caso do *AutoSimmune* utilizamos a topologia automato celular (b).

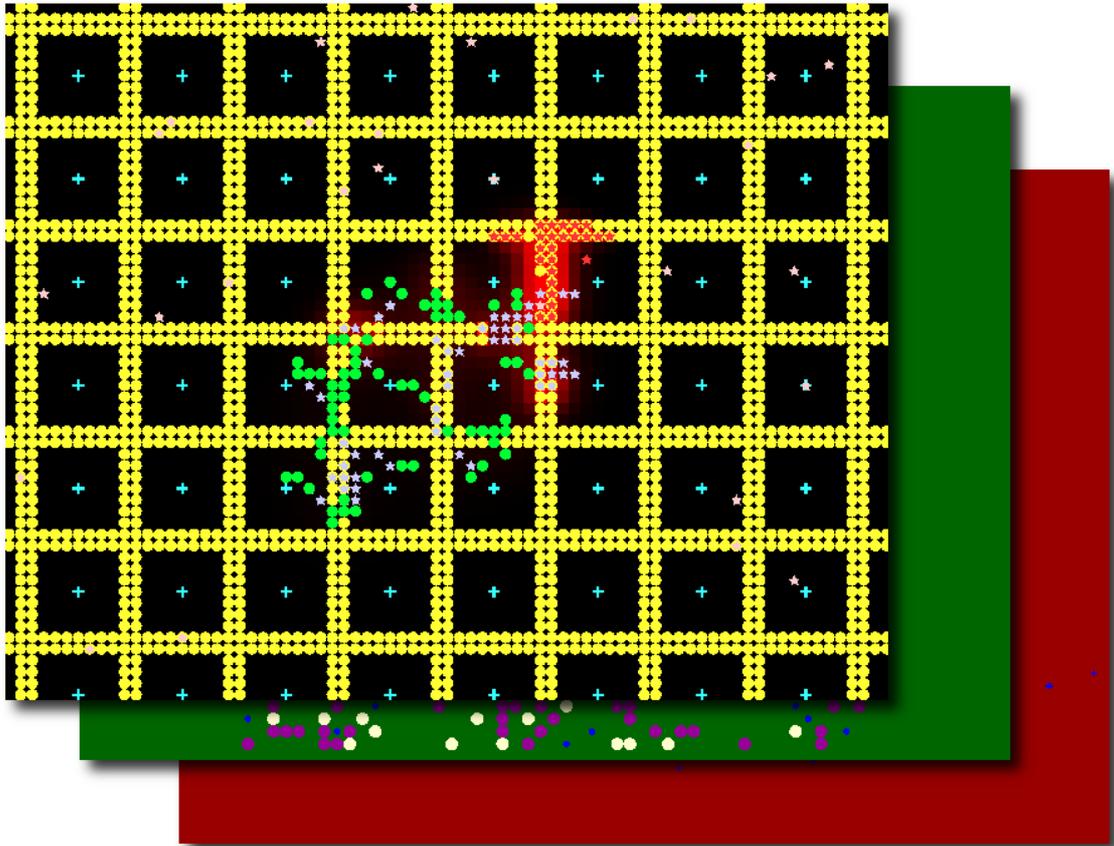


Figura 2 – Imagem do *AutoSimmune* ilustrando as projeções. Em vermelho a zona *Circulation* representando a circulação sanguínea. Em verde *Lymphnode* representando o linfonodo. A zona *Tissue* é mostrada em primeiro plano e representa os tecidos.

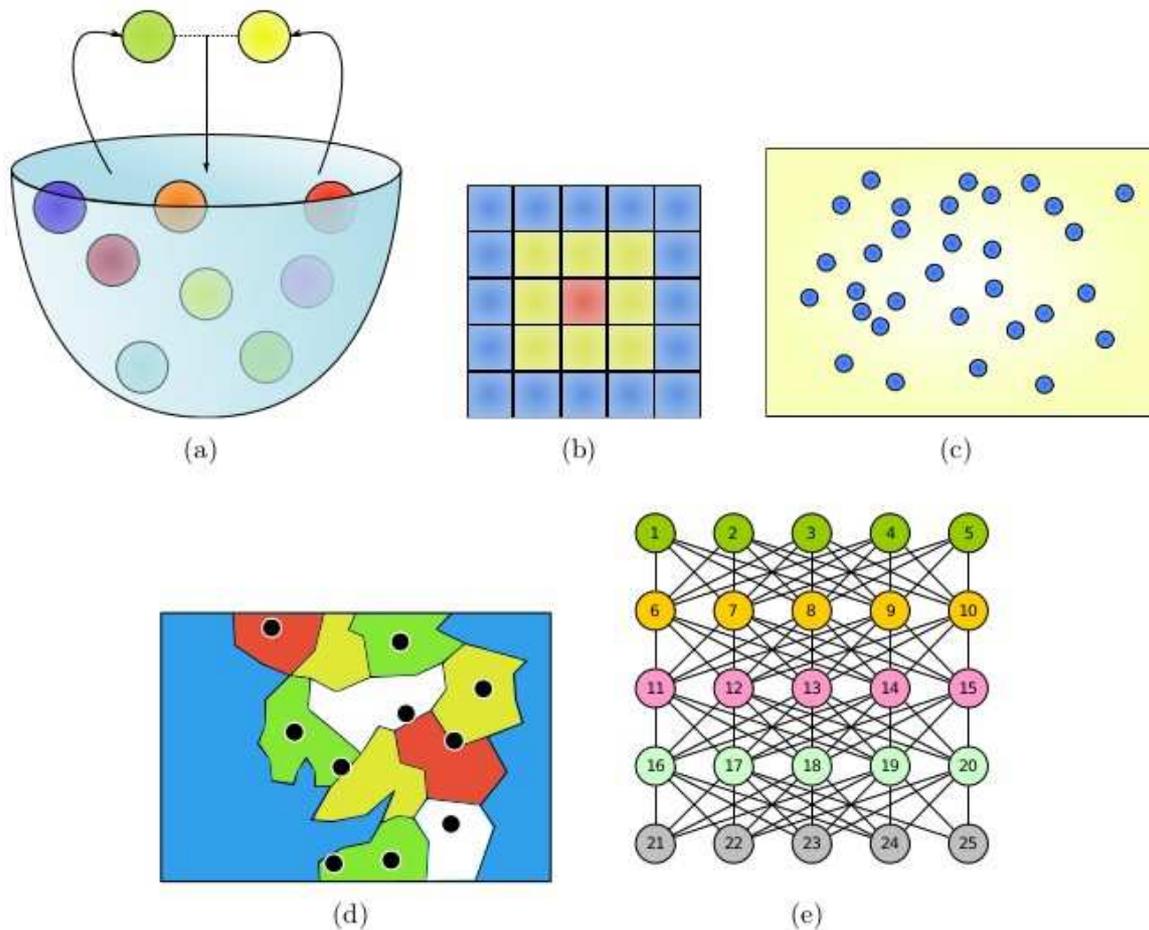


Figura 3 - Ilustração das diferentes topologias dos agentes. Em (a), a topologia do tipo sopa, onde os agentes não têm uma relação espacial definida. Em (b), a topologia do tipo autômato celular, onde cada agente permanece em uma célula. Em vermelho, a posição do agente, em amarelo, sua vizinhança de Moore. Em (c), a topologia do tipo espaço euclidiano, onde cada agente tem uma posição em um espaço contínuo; Em (d), a topologia do tipo GIS, em que as posições dos agentes representam posições geográficas no mundo real; Em (e), a topologia do tipo grafo, ou network, onde cada agente possui a informação sobre com quem pode interagir, não sendo necessariamente alguém próximo, no sentido espacial. Fonte (adaptado): (MACAL; NORTH, 2009, p. 94).

Toda a comunicação entre as células é realizada através de mediadores químicos (Figura 4), chamados de citocinas. Dentre estas, existem as substâncias que amplificam a resposta inflamatória (pró-inflamatórias, geralmente sinalizadas

com 1 no final do nome como ck1, pk1 e outras) e as substâncias que suprimem essa resposta (anti-inflamatórias, sinalizadas com 2, no final).

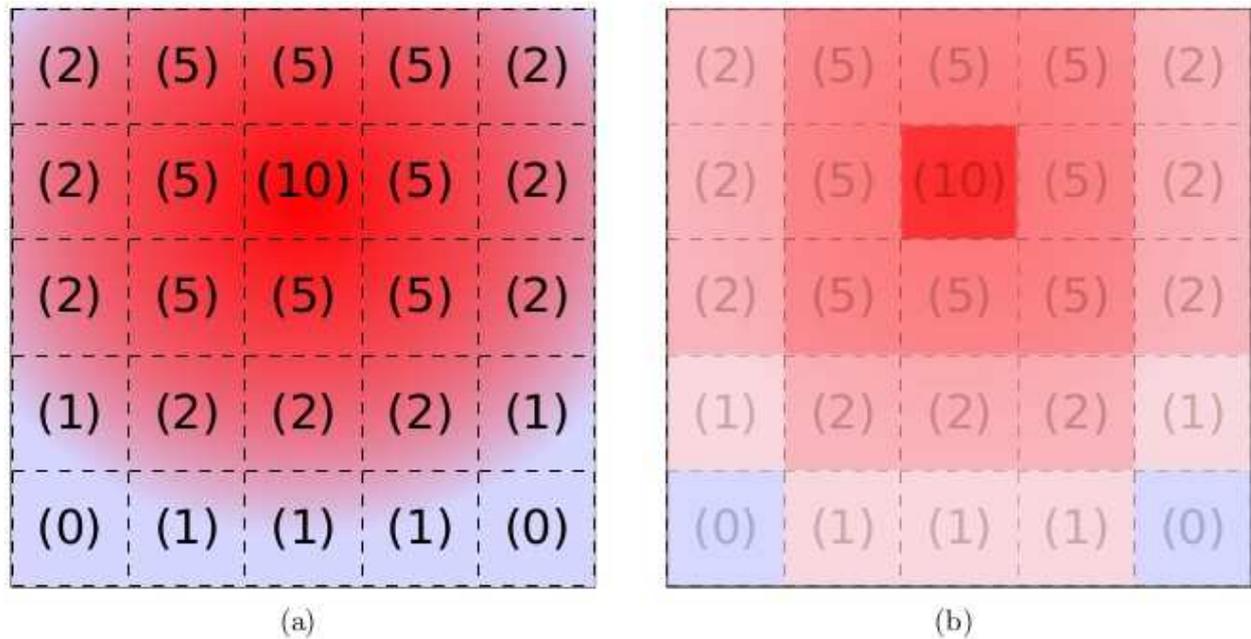


Figura 4 - Ilustração da representação do gradiente de dispersão das citocinas através das camadas de dados. Em (a), a distribuição contínua da substância, como acontece no mundo real. Em (b), a discretização do gradiente, mostrando como os agentes o veem.

Todos os agentes que foram inseridos no modelo são descritos enquanto classes (no contexto de programação orientada a objetos) e representam blocos de código cujo comportamento depende das interações com outros agentes, modificando seu estado. Tudo aquilo que estiver incluído no modelo e for um antígeno, ou contiver antígenos, será modelado como um agente. Alguns agentes descritos no modelo são *Antigen*: representa um antígeno; *Antibody*: criado pelos agentes Bcell e quando ativado representa uma molécula de anticorpo; *Vírus*: representa os patógenos que estão infectando o organismo, circulando aleatoriamente até encontrar e infectar uma célula hospedeira, inserindo o seu padrão na célula, destacando-se que esta, após um período de latência, começa a produzir réplicas do Virus; *PC*: representa as células do tecido parenquimatoso de um órgão abstrato, no qual os patógenos do modelo, após infectá-las, conseguem

se reproduzir; *NK*: a principal função desse agente é eliminar células infectadas que permitem a reprodução do vírus, enquanto a imunidade adaptativa se organiza. Em outras palavras, o NK mata a célula estressada (célula infectada que sinaliza com substâncias pró-inflamatórias); *ThCell*: representa os linfócitos T *helper*, provendo estímulos necessários para ativação dos agentes BCell e Macrophage; *CTL*: representa os linfócitos T citolíticos, os quais eliminam depósitos de infecção ao reconhecer o antígeno apresentado pelo MHC I (complexo de histocompatibilidade principal classe I) eliminando a célula infectada; *Macrophage*: representa os macrófagos, principal célula da imunidade celular inata - também importante como célula apresentadora de antígenos (APC); *Dendritic*: representa as células dendríticas, principal célula apresentadora de antígenos do modelo, que buscam sinais de perigo (danger signals) e, caso os encontre, capturam os antígenos presentes no local e os apresentam aos linfócitos da imunidade adaptativa; *Bcell*: representam os linfócitos B, a principal célula da imunidade adaptativa humoral. A Figura 5 ilustra a organização hierárquica dos agentes.

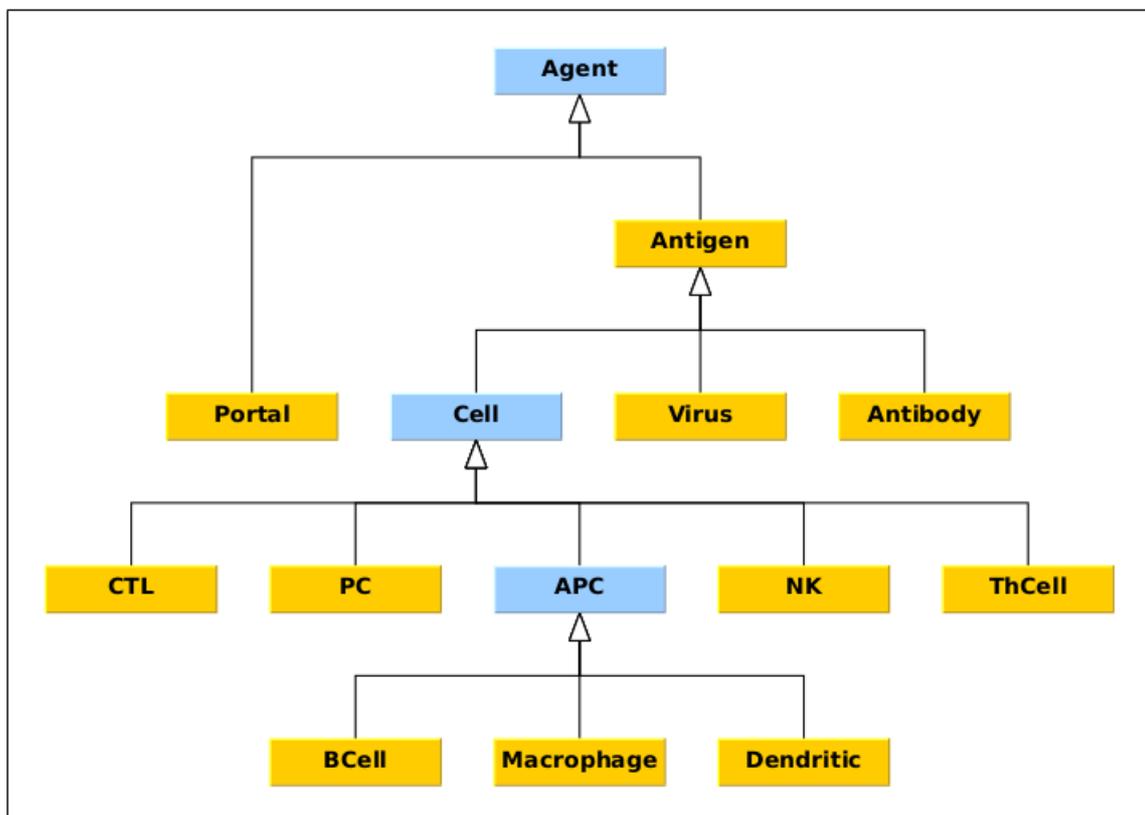


Figura 5 - Classes de agentes e a organização destas resultante do nível de granularidade escolhido.

Testes iniciais realizados para investigação de eventos de autoimunidade demonstraram que o modelo apresenta um comportamento coerente com a literatura biomédica atual, em especial em relação à especificidade (POSSI, 2012). A seguir, serão apresentadas duas das linhas de investigação – atinentes ao *AutoSimmune* – dos autores do presente artigo: (1) as desordens autoimunes e (2) as doenças infecciosas.

5. Investigação computacional da Autoimunidade

O *AutoSimmune* nasceu com uma vocação para o estudo das doenças autoimunes (POSSI, 2012), em que as principais hipóteses testadas para a causa de tais doenças foram:

Hipótese 1: Linfócitos autorreativos são gerados devido a defeitos genéticos, possivelmente nos genes do MHC, que afetaram o mecanismo de tolerância central. Esses linfócitos autorreativos reconhecem autoantígenos apresentados por APC (células apresentadoras de antígenos), que podem ter capturado tais autoantígenos em uma *danger zone* (causada por um patógeno). O linfócito ativado responde ao tecido; A conclusão deste trabalho à respeito desse resultado é que, apesar de ser possível, o SI trabalha no intuito de manter as probabilidades de um evento ocorrer sempre a seu favor. Neste caso, a probabilidade de uma célula APC capturar um autoantígeno em uma *danger zone*, e conseguir encontrar um linfócito autorreativo específico para o autoantígeno parece ser muito pequena. Além disso, (BENOIST; MATHIS, 2001) afirmam que, embora isto ainda esteja longe de ser provado (e daí a motivação deste trabalho), a hipótese do “mimetismo molecular tem sido a explicação favorita para explicar a tendência de infecções microbianas precipitarem reações autoimunes” (BENOIST; MATHIS, 2001).

Hipótese 2: Linfócitos autorreativos são gerados devido a defeitos genéticos, possivelmente nos genes do MHC, que afetaram o mecanismo de tolerância central. Esses linfócitos auto-reativos reconhecem antígenos, apresentados por APC, de

patógenos que têm um padrão molecular muito parecido ao padrão de um auto-antígeno do corpo, ativando o linfócito que age no tecido do organismo (ABBAS *et al.*, 2008). Analisando a progressão do número de agentes durante a simulação, foi possível notar que, realmente, os linfócitos autorreativos foram ativados, migraram para o tecido, onde, além de responderem as células infectadas, atuam também nas células saudáveis, configurando assim uma doença autoimune. Como discutido anteriormente, era esperado que esse comportamento emergisse. Foi observado, igualmente, que ao lisar as células saudáveis, os linfócitos CTL ainda recebiam estímulos para continuar ativos, o que gerava um processo de autoalimentação, fazendo com que a resposta imunológica autoimune perdurasse por um tempo maior, mesmo depois que os patógenos foram eliminados.

Os testes realizados com a ferramenta evidenciaram o funcionamento coerente do modelo, em especial, em relação à autoimunidade, cujo teste foi capaz de simular a principal hipótese que relaciona a autoimunidade às doenças autoimunes: o mimetismo molecular. Entretanto, a evolução do simulador exige a modelagem de vários tipos de células e substâncias, voltadas para o tipo de situação que se deseja estudar. Uma das células que possuem papel fundamental em processos inflamatórios e alérgicos é o mastócito, o qual é originado de células mesenquimatosas, habitando vários tipos de tecidos. Portanto, um modelo de simulação apropriado para estudo de reações do sistema imunológico e para o estudo de teorias sobre autoimunidade deve possuir uma representação adequada do comportamento dessa célula. O agente que simula o mastócito foi integrado e adaptado ao simulador *AutoSimune*, de modo a emular o comportamento da célula real e permitir uma análise dos processos e condições mórbidas relacionadas com sua ação (DA SILVA *et al.*, 2012). Uma vez que no organismo humano tais células ocorrem nos tecidos, no simulador os agentes que as representam ocorrem na zona que representa o tecido. Quando estão no estado ativo, eles se movimentam de maneira aleatória em busca de um anticorpo do tipo IgE e, caso observem determinada concentração de enzima bacteriana, liberam substâncias pró-inflamatórias, abrigadas sob a denominação MK1 (FOLCIK *et al.*, 2007). Caso interajam com o anticorpo IgE, passam para o estado sensibilizado, que representa

o mastócito com IgE ligado a seu receptor Fc. O agente mastócito, ainda nesse estado, é capaz de identificar atividade enzimática bacteriana e liberar MK1, também movendo-se aleatoriamente. Caso encontre um alérgeno que se ligue ao anticorpo, o mastócito degranula passando para o estado inativo e então, esgotado o seu tempo de vida, realiza apoptose (Figura 6) (DA SILVA *et al.*, 2012).

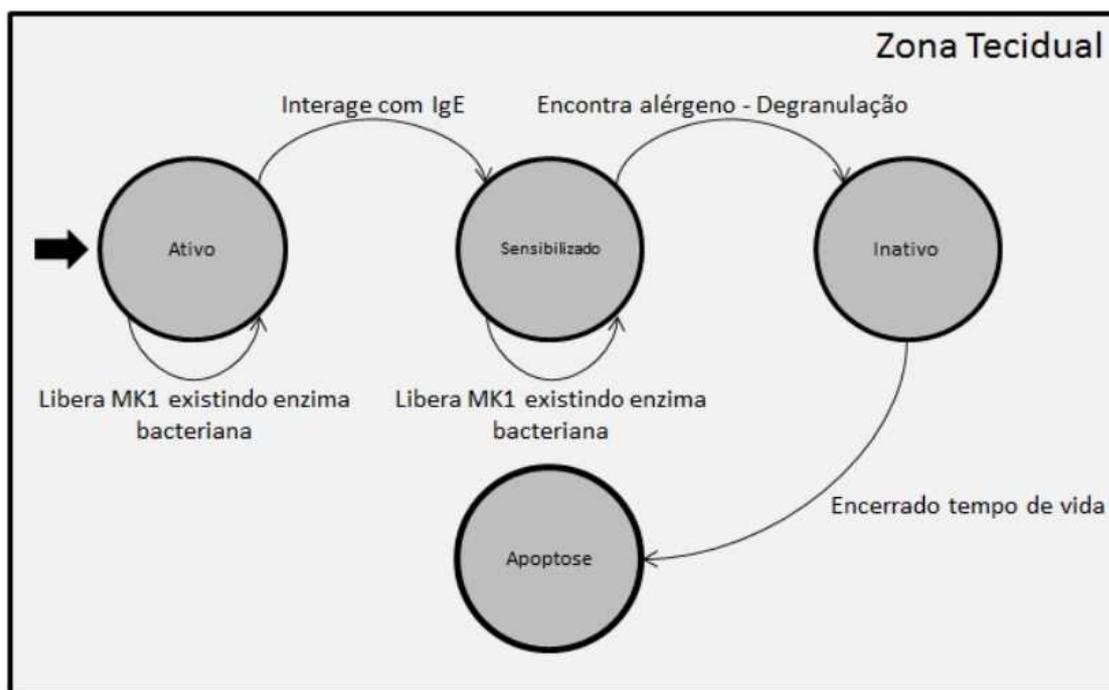


Figura 6 - Estados do agente mastócito.

O objetivo da incorporação deste agente é ampliar a capacidade do simulador, principalmente em sua habilidade de simular entidades nosológicas associadas às infecções (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Os resultados da simulação mostram que os aspectos comportamentais gerais do agente mastócito correspondem ao que está descrito na literatura, mostrando que o mastócito possui um papel fundamental na eficácia da resposta do sistema imune. Simulações mais amplas serão realizadas para atestar a adequação do modelo em variadas situações (DA SILVA *et al.*, 2012).

Ainda dentro deste tópico pode-se citar, também, trabalhos relacionados que estão sendo desenvolvidos visando modelar os eventos autoimunes atinentes à

glomerulonefrite pós-infecciosa (consequente à infecção por *Streptococcus pyogenes*) e à moléstia de Chagas (BASTOS *et al.* 2013).

6. Investigação computacional dos processos infecciosos

Neste momento, a proposta está centrada no mapeamento dos principais aspectos da resposta imune na sepse (OLIVEIRA *et al.*, 2012), (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012), para testagem *in-silico* das hipóteses sobre esta condição mórbida. Este estudo está focado no mapeamento dos principais aspectos da imunidade na sepse para bactérias gram negativas para testagem *in silico* de hipóteses fisiopatológicas e terapêuticas – especialmente em termos do uso de antimicrobianos – em relação a este estado mórbido. A existência de células T reguladoras (Treg) que modulam a resposta imunológica tem implicações clínicas havendo, portanto, um grande interesse em mostrar como a atividade das populações de células T CD4+CD25+ podem tornar-se maior para diminuir as respostas imunes não desejadas, e como podem ser reduzidas para promover respostas desejáveis (CALICH *et al.*, 2001). Ao observar que o aumento numérico dos TReg circulantes (*in vivo*) no sangue periférico em pacientes sépticos está associado à diminuição da resposta proliferativa, a quantificação das Treg pode representar um marcador biológico simples e valioso da anergia dos linfócitos. Portanto, é também muito importante o desenvolvimento de novos marcadores que permitam identificar mais facilmente células Treg, o que contribuiria de forma mais eficaz para o estabelecimento do diagnóstico de pacientes com sepse.

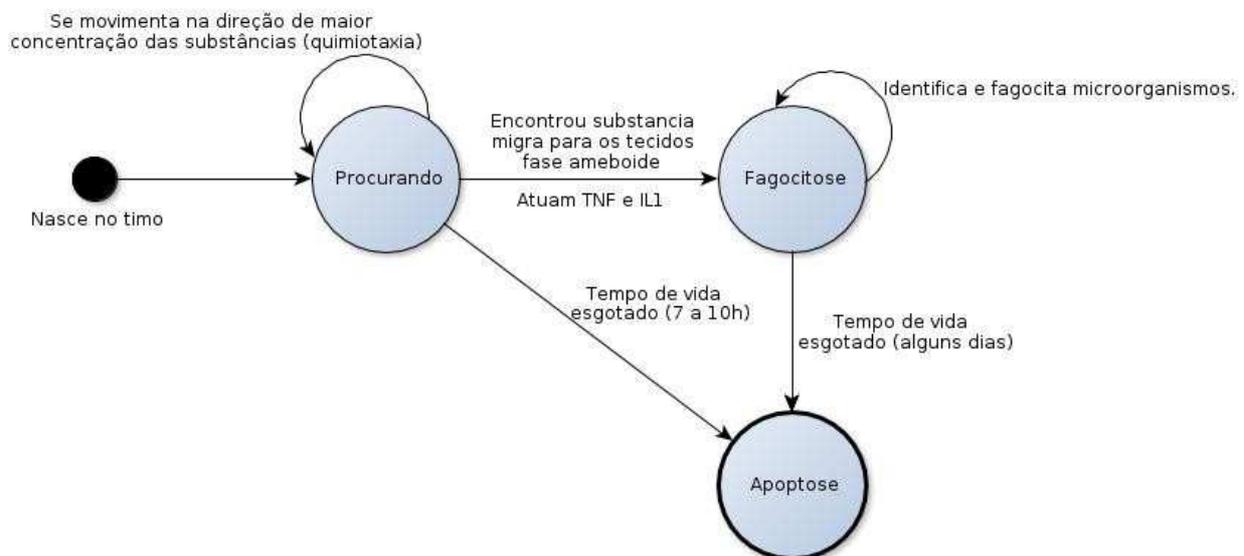


Figura 7 – proposta inicial para o modelo do neutrófilo.

Através dos testes *in silico* espera-se promover a emergência de comportamentos que possam contribuir para a compreensão de mecanismos que permitam viabilizar possíveis perspectivas de avanços no tratamento e na identificação de marcadores que possibilitem um diagnóstico precoce dos casos de sepse. Ademais, tal contribuição permite o aumento da complexidade do simulador tornando-o cada vez mais próximo do real, permitindo assim a criação de um modelo capaz de contribuir efetivamente na criação de conhecimento e conseqüentemente de soluções com grande impacto na área da saúde relacionada ao combate a doenças autoimunes.

Na moléstia de Chagas – mal que atinge cerca de 17 milhões de pessoas em toda a América Latina (MONCAYO, 2003) – inúmeros trabalhos foram realizados ao longo dos anos com o objetivo de um maior entendimento da interação T cruzi hospedeiro e o envolvimento da resposta imune inata e secundária. Este estudo *in silico* tem buscado compreender de forma mais detalhada os aspectos ligados à função do macrófago na fase aguda da doença, mecanismo de sobrevivência e escape do *T. cruzi* ao macrófago e o resultado de seu estímulo sobre outros componentes do SI (Alcione de Paiva Oliveira, dados a serem publicados).

Uma terceira frente de investigação *in silico* das enfermidades infecciosas diz respeito às infecções por germes do gênero *Streptococcus*, especialmente o papel da imunidade humoral e da terapia antimicrobiana na glomerulonefrite pós-infecciosa por *Streptococcus pyogenes* (GNPE). Nesse sentido, tem-se buscado a identificação dos requisitos para a extensão do sistema *AutoSimmune* (POSSI, 2012) para simular os fenômenos envolvidos na instalação da GNPE, com a inclusão de funcionalidades do modelo. Já foram incluídos, dentre outros, dois ambientes – os rins e as vias aéreas superiores – além de um ajuste mais fino no agente *neutrófilo*. Os testes iniciais realizados com a ferramenta evidenciaram o funcionamento coerente do modelo, em especial, em relação ao desenvolvimento da GNPE, enfermidade que tem como característica fisiopatológica principal a deposição de imunocomplexos nos glomérulos renais. Através dos ensaios foi possível simular a administração de antimicrobianos, evidenciando redução do risco de ocorrência de GNPE e a possibilidade ulterior de investigação do papel dos antimicrobianos em processos infecciosos nas pesquisas vindouras do grupo (BASTOS *et al.* 2013).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os softwares de simulação do sistema imunológico têm auxiliado na compreensão e investigação dos processos sistêmicos envolvidos na resposta imunológica. Espera-se, portanto, que mais experimentos *in silico*, especialmente simuladores, possam surgir especializando-se ou realizando linhas diferentes de investigação e que a evolução de tais sistemas possa trazer contribuições valiosas ao estudo da imunologia. Alguns avanços já vêm sendo feitos e outros estão sendo estudados a fim de tornar o sistema cada vez mais robusto e preciso em seus resultados e enfrentar os desafios decorrentes da complexidade dos problemas tratados. O aumento da granularidade do sistema modelando um maior número de células e substâncias; a expansão dos mecanismos celulares com maior nível de detalhes; o aumento da capacidade computacional utilizando técnicas computacionais - como clusterização -; ou até mesmo a construção de um sistema que não dependesse de um framework, como o Repast Symphony, para processar

as simulações com maior controle e menor custo computacional; são alguns dos objetivos visando a evolução do *AutoSimmune* cuja implementação atual já demonstra grande coerência com o descrito na literatura.

8. CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

A. P. Gomes, F. O. de Sousa e R. Siqueira-Batista conceberam a estrutura primeira desse capítulo. Ato contínuo, F. O. Sousa, M. A. Possi, C. A. Bastos e W. C. Farago trabalharam na elaboração do texto, sob a orientação de A. P. Gomes, A. P. Oliveira, F. R. Cerqueira, L. A. Santana, R. S. Ferreira e R. Siqueira-Batista. Todos os autores procederam a revisão final do capítulo.

9. Referências

As referências deste e dos demais artigos são disponibilizadas no capítulo 5 - referências bibliográficas - no final desta dissertação.

2.2. Artigo II: The artificial neutrophil and a proposal of an *in silico* research of the immune response in human bacterial diseases

Rodrigo Siqueira-Batista, Flávio Oliveira de Sousa, Andréia Patrícia Gomes, Alcione de Paiva Oliveira, Izabella Soares de Oliveira, Willian Farago, Carlos Antônio Bastos, Maurílio de Araújo Possi, Luiz Alberto Santana, Fábio Ribeiro Cerqueira

Departamento de Informática, Universidade Federal de Viçosa (UFV) CEP 36570-000 – Viçosa – MG – Brasil Departamento de Medicina e Enfermagem, Universidade Federal de Viçosa (UFV) CEP 36570-000 – Viçosa – MG – Brasil {alcione, andreiapgomes, carlosantoniobastos, flavio7co, maurilio.possi, frcerqueira, izabellasoaresdeoliveira , willianfarago }@gmail.com, luizsantana@ufv.br, rsiqueirabatista@yahoo.com.br

Resumo. *As doenças por bactérias são condições extremamente importantes na medicina humana, tanto por seu impacto epidemiológico, quanto pela gravidade assumida por alguns desses processos infecciosos. Neste contexto cabe destaque para a sepse bacteriana e a meningoencefalite bacteriana aguda, condições mórbidas capazes de levar o enfermo ao óbito em curto intervalo de tempo. Os neutrófilos são células extremamente importantes na interação homem / bactérias, ainda que muitos aspectos da atuação dessas células permaneçam aguardando elucidação. O presente artigo apresenta os requisitos para a simulação computacional do neutrófilo no sistema AutoSimmune e alguns dados preliminares de atuação dessa célula na glomerulonefrite pós-estreptocócica, importante doença humana que acomete os rins. Estima-se que os resultados preliminares apresentados sustentem o desenvolvimento ulterior de estudos *in silico* sobre o papel dessa célula nas enfermidades bacterianas.*

Palavras-chave: sistema imunológico. neutrófilos. bactérias. informática.

informática médica.

Abstract. *Bacterial diseases are important conditions in human medicine. First, because of the epidemiological impact, and, second, due to the gravity of some of these infectious processes. It is worth to highlight bacterial sepsis and acute bacterial meningoenzephalitis which are morbid conditions that can lead to death in a short period of time. In this context, neutrophils are extremely important cells in the interaction man / bacteria although many aspects of the performance of these cells remain awaiting elucidation. This paper presents the requirements for computational simulation of neutrophils in the AutoSimune system and some preliminary description of the activity of this kind of cell in post-streptococcal glomerulonephritis, a major human disease that affects the kidneys. The preliminary results presented here is the support for further development of in silico studies on the role of neutrophils in bacterial diseases .*

Keywords: bacteria. immune system. medical informatics. Neutrophils. multi-agent systems.

1 INTRODUCTION

Bacterial diseases have great clinical importance and significant magnitude in the com text of infectious diseases, lying among the main causes of illness and death in the contemporary world (BUCHALLA *et al.*, 2003), (LUNA, 2002). As a result, the investigation of morbid conditions caused by bacteria has to incorporate research strategies aimed at (i) pathophysiological understanding (BAXT *et al.*, 2013) – with emphasis on inflammatory events as well as the innate and adaptive immune response – (ii) diagnosis, (iii) treatment and (iv) prevention and control. At the same time, bioethical issues have to be taken into account for studies involving living beings, mainly humans. Risks and needs must be clearly identified for conducting research that follows best suited bioethical standards .

From this perspective of ethical aspects, the use of *in silico* experimentation to

study the immune response to infectious agents (BASTOS, 2012), (POSSI, 2012), may broaden the understanding of the intricate mechanisms of pathogenic interaction (in this case, bacteria/*Homo sapiens sapiens*). This may contribute for expanding the set of hypotheses investigated (that, otherwise, would be tested only *in vitro* and/or *in vivo*), with less time and cost, in addition to avoiding ethical issues. *In silico* studies, therefore, might be an important research approach in conjunction with biological and clinical methods (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012a).

The scope of this article is to present a delineation to simulate the neutrophil behavior – which is an essential cell in bacterial infections response (CRISS; SEIFERT, 2012), (RIGBY; DELEO, 2012) – in a computer simulator of the immune system (IS) called *AutoSimune* (POSSI, 2012) which was designed and implemented using a multi-agent approach.

2 NEUTROPHILS AND IMMUNE RESPONSE TO BACTERIAL INFECTIONS

Neutrophils (Figure 1), also called polymorphonuclear leukocytes, are among the most numerous leukocyte cells present in the blood and play a fundamental role in immune and inflammatory responses in humans. At the beginning of an inflammatory process, such cells are the first elements to pass through the walls of blood vessels and reach the site of inflammation. They are morphologically distinguished by the multi-lobed nucleus and abundant granules present in the cytoplasm (ABBAS *et al.*, 2008), (GARCIA, 2010), (GREER, 2009), (DE TOLEDO, 2007).

Originated from pluripotent stem cells, neutrophils are produced in the bone marrow, in a process called hematopoiesis. Cells that belong to the group of myeloblasts give rise sequentially to promyelocytes, myelocytes, metamyelocytes, and rods. Then, the cells of the latter kind finally differentiate into neutrophils.

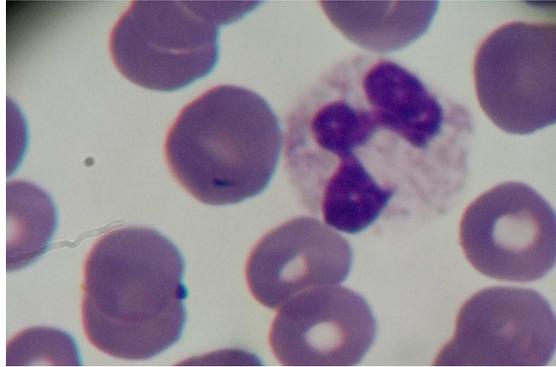


Figure 1 - Neutrophils in the blood. Photographic documentation of the Laboratório de Métodos Epidemiológicos e Computacionais em Saúde (L-MECS), Universidade Federal de Viçosa .

Mature neutrophils present many types of beads, among which four are well defined (GAUT *et al.*, 2001), (GARCIA, 2010):

- (a) the azurophil granules, also called primary, formed during the promyelocytic stage, are able to fuse with phagocytic vesicles. Components such as lysozyme – that degrade bacterial peptidoglycan – and myeloperoxidase – potent bactericidal oxidant, whose green color is characteristic of purulent exudate rich in neutrophils – are also present;
- (b) specific, or secondary, granules arise during development in the bone marrow and are intended for release to extracellular space. Their components have antibacterial action. Apolactoferrin, for instance, binds to iron and prevents bacteria to capture this element for growth;
- (c) the gelatinase, or tertiary, granules resemble specific granules. However, contain less amount of anti-microbial agents in their composition;
- (d) the secretory vesicles contain receptors of membranes that will be incorporated to the neutrophil surface.

The response of polymorphonuclear leukocytes to infection depends on an appropriate molecular signal. Bacteria present on their cell surface pathogen-associated molecular patterns – PAMPs – which are structures that can be lipopolysaccharide, lipoteichoic acid, peptidoglycan, and lipoproteins, among others (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011). PAMPs are identified by neutrophils (and also by

macrophages and dendritic cells) through pattern recognition receptors (PRRs), notably the Toll-like receptors that are part of a large group of ten different receptors. This interaction initiates immune response, as the PAMPs-PRRs connections trigger molecular mechanisms leading to the production of inflammatory cytokines and adhesion molecules that promote the expansion of recruitment of neutrophils and macrophages to the site (FERRAZ *et al.*, 2011). The migration of neutrophils is accomplished by selectins and integrins with activation and adhesion to endothelial cells that emit microscopically visible pseudopods which allow migration into the tissue (GREER, 2009), (CRUVINEL, 2010).

Neutrophils are key participants in the innate immune response and they have an important role in the early stages of inflammatory reactions through their quick migration to sites of infection which is mediated by chemotactic cleavage products of complement fractions – C3a and C5a – releasing of tumor necrosis factor (TNF), interleukin 1 (IL-1), and chemokines. These are the main cytokines related to recruitment of these cells.

Polymorphonuclear leukocytes persist for a long period at the site of inflammation, acting also in the intake and degradation of components of the inflammatory process (ABBAS *et al.*, 2008), (GREER, 2009). Digestion of bacteria occurs with morphological change of these microorganisms – after phagocytosis – with subsequent release of bacterial fragments in the surrounding medium. The elimination of the organism depends on the generation of reactive oxygen metabolites and release of microbicidal substances (DE TOLEDO, 2007), (NORDENFELT; TAPPER, 2011).

The oxidizing agents are considered central in the response mechanism that involves neutrophils. During a bacterial infection neutrophils activate their intracellular antimicrobial system in an environment in which various substances act on the pathogen by different pathways such as: (i) oxygen dependent – performed by the systems myeloperoxidase-independent, myeloperoxidase-mediated, hydrogen peroxide (H₂O₂), and superoxide – or (ii) oxygen independent – implemented by acids, lysozyme, lactoferrin and defensin (DE TOLEDO, 2007), (GREER, 2009). Some of these constituents act in breach of the bacterial membrane – such as

defensins and lysozyme – and others can interfere with iron-dependent metabolic pathways, such as lactoferrin. Recent studies have shown that polymorphonuclear leukocytes may also act in the formation of neutrophilic extracellular traps that are composed by nuclear components and granular substances capable of destroying extracellular bacteria and eliminating virulence factors (CRUVINEL, 2010).

The main mechanisms for removing tissue of neutrophilic cells recruited to areas of inflammation are apoptosis and phagocytosis by macrophages (BRATTON; HENSON, 2011). The apoptotic process is accompanied by morphological changes with particular attention to the formation of pyknotic nuclei. It is essential that neutrophils remain intact so to prevent the leakage of potentially toxic contents to the tissues before being phagocytosed by macrophages (CRUVINEL, 2010), (DE TOLEDO, 2007), (GREER, 2009). It has been recently described the mechanism of autophagy in neutrophils that may lead to apoptosis. The participation in the tissue clearance of these cells remains under investigation (VON GUNTEN; SIMON, 2007), (HOTCHKISS *et al.*, 2009), (BRATTON; HENSON, 2011).

It is noteworthy that the number of neutrophils is notoriously increased in bacterial infectious processes – by augmented production and release by bone marrow – which constitute laboratory markers of the occurrence of such infections. It is fundamental to understand the neutrophils interactions with microorganisms – particularly bacteria – in order to unravel the complex mosaic of diseases caused by bacterial infections.

3 IMMUNE RESEARCH USING MULTIAGENT SYSTEMS

Multiagent systems (MAS) have been used in computational methods for simulation and comprehension of complex systems, such as IS. In the MAS approach, only the basic entities that make up the system and their relations need to be modeled and implemented, on the assumption that the collective complex behavior will emerge from the interactions between the basic entities. Some MAS dedicated to the investigation of the IS have been proposed, including (i) BIS – The *Basic Immune Simulator* (FOLCIK *et al.*, 2007) – developed to study the interactions

between innate immunity cells and the adaptive immunity cells, and (ii) *AutoSimmune* – designed by Possi and colleagues (POSSI, 2012), (SILVA *et al.*, 2012), inspired by BIS – originally designed for researching autoimmune events.

AutoSimmune was developed using the framework Repast Symphony – a free and open source system widely used in agent-based modeling (NORTH *et al.*, 2005) – with the bottom- up approach that is a characteristic of reactive MAS. Notice that agents in this case are able to perceive the environment, to act on it, and to store states. Each agent represents an entity of the real system. Additionally, such agents may be heterogeneous, i.e., each one has its own states and rules, being able to interact with others.

In *AutoSimmune* time is discretized. The unit of time is called tick. For each tick, all events scheduled for that moment take place and have to be completed before the start of the next tick. As a result, the state of the environment evolves in a synchronized way.

The agents of *AutoSimmune* represent IS entities, such as cells (B lymphocytes, T lymphocytes, macrophages, mast cells, natural killer cells, and neutrophils), antibodies, antigens (bacteria and viruses), and cytokines: PK1 (representing stress factors released by tissues under injury caused by infection or immune response), MK1 (the set of pro-inflammatory substances in the innate immune response), MK2 (the set of anti-inflammatory substances in the innate immune response), CK1 (referring to the set of pro-inflammatory substances in adaptive immune responses), CK2 (referring to the set of anti-inflammatory substances in the adaptive immune response), NECROSIS (representing the cellular debris derived from necrotic process), and APOPTOSIS (which refers to the remains of cells undergoing apoptosis – i.e. Programmed cell death). Tissue zones were also modeled: Upper airway (Figure 2), kidneys, lymph node, circulation, bone marrow, and thymus.

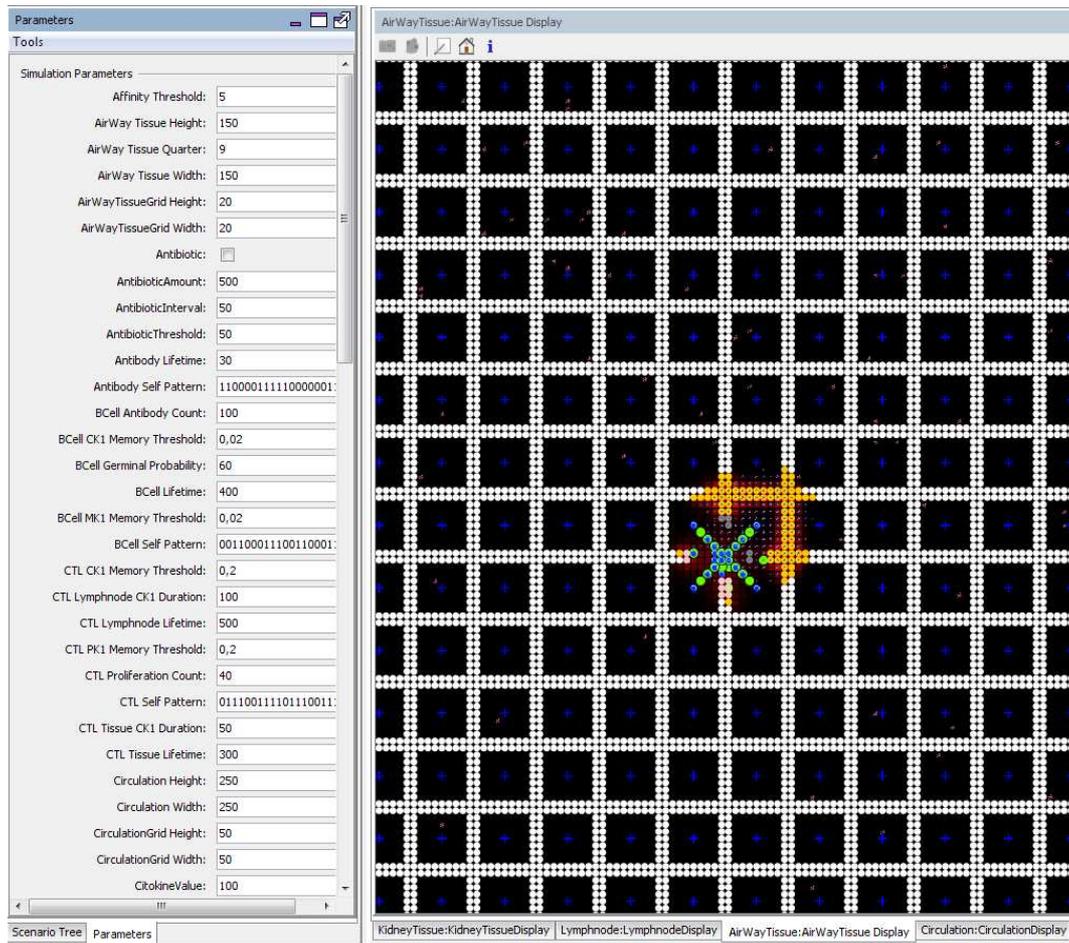


Figure 2 - Picture of AirWayTissue zone implemented in AutoSimmune BASTOS (2012).

AutoSimmune has been used to investigate the role of mast cells in controlling inflammation (SILVA *et al.*, 2012) and to study the immune response in post-infectious glomerulonephritis by bacterium *Streptococcus pyogenes* (BASTOS, 2012). There are, additionally, important investigation propositions using AutoSimmune simulator to the study of Chagas' disease, falciparum malaria, and sepsis (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012b).

4 NEUTROPHILS COMPUTATIONAL MODEL

Neutrophils are represented in *AutoSimmune* by the agent Neutrophil (artificial neutrophils). It simulates what happens in vivo, i.e., microorganisms (bacteria) are

lysed and phagocytosed by neutrophils. This process occurs in the human body by the joint action of oxygen free radicals generated by neutrophils and cytotoxic proteins from cytoplasmic granules (ABBAS *et al.*, 2008).

In *AutoSimmune*, Neutrophil agents, implemented by the class Neutrophil, are inserted in the Bone Marrow zone, implemented by the class BoneMarrow. Notice that the concept of class here is that of Object Oriented Programming. A class, in this case, is a piece of code that defines entities (or objects) of a particular kind in the program. After being inserted in the Bone Marrow zone, Neutrophil agents (or objects) move through the Circulation zone until reaching the Tissue zone through the portals (classes: TissuePortal, CirculationPortal, and LymphnodePortal), which are responsible for making the connections between zones. The artificial neutrophils can reach different areas of the system – such as the AirWayTissue and KidneyTissue zones – when they perceive the presence of the pro-inflammatory cytokine MK1 (which has the role of attracting such agent) simulating the events chemotaxis and diapedesis. When entering a zone, the Neutrophil agent follows the cellular stress signaling substance (PK1), moving around until finding the site of infection. This agent looks for cells that are emitting PK1, and it is also able to identify microorganisms (bacteria), taking into account the molecular affinity (affinityThreshold parameter), represented in the system as a string of contiguous bits present in each agent (Figure 3).

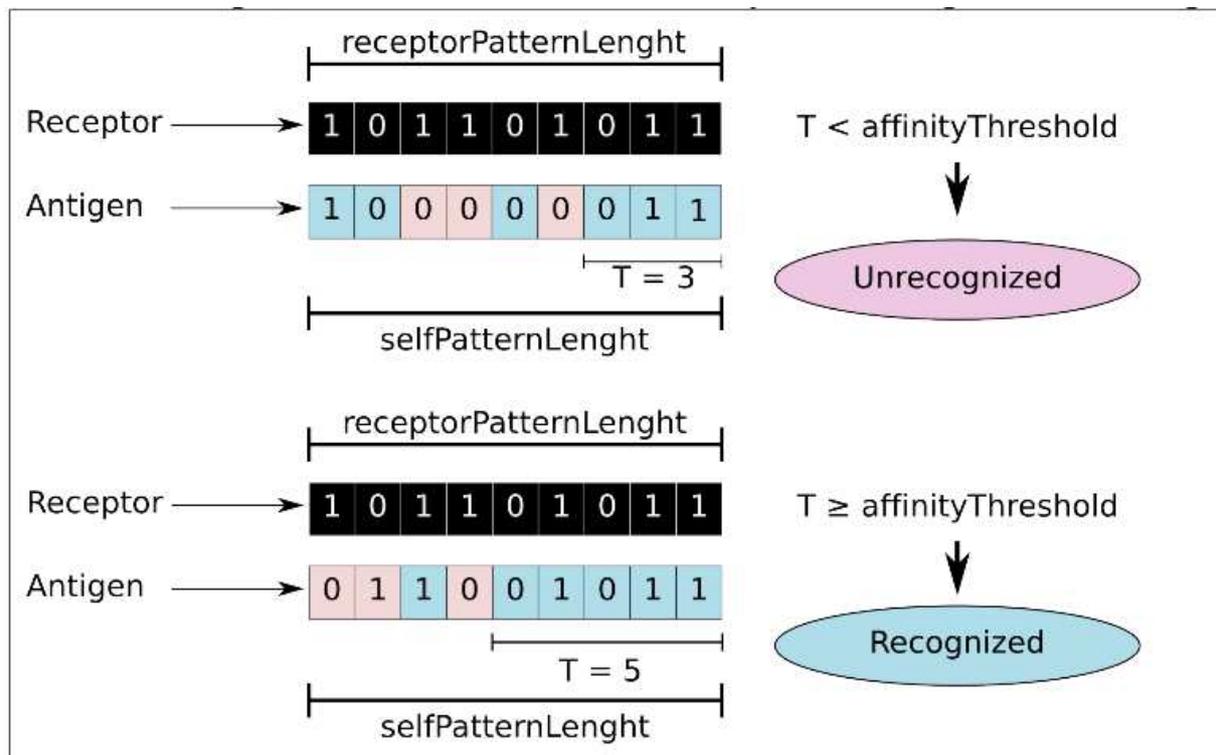


Figure 3 - Illustration of the degree of affinity calculation in AutoSimmune. In this case, the blue bits of the antigen indicate a match to the receptor bits in the same position. Pink indicates a mismatch for the given position. The largest common subsequence T of matching bits is marked as the largest contiguous sequence of blue bits. The sequences do not need to be necessarily aligned. In the example, it is assumed that the affinityThreshold parameter is equal to 4 (POSSI, 2012).

Another important event simulated in AutoSimmune is the inflammatory process as a result of phagocytosis of several entities, such as: Dead cells, pathogens presenting PAMPs, and antigen-antibody complexes, i.e., antibodies bound to any antigen. The artificial elements phagocytosed by neutrophils are destroyed in the simulator. The rules of Neutrophil agent are illustrated in Figure 4 as a finite state machine. Neutrophil agent changes its state – to cell death or apoptosis – when its lifetime ends, simulating what occurs in the human body (BRATTON; HENSON, 2011).

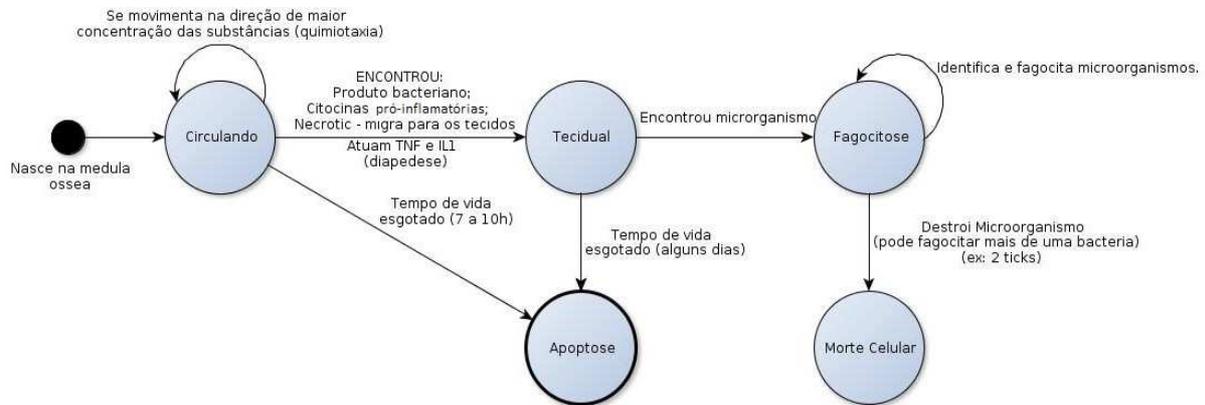


Figure 4 - Rules of the Neutrophil agent in *AutoSimmune*. The black circle means initial state, while a thicker circle line indicates final state

Preliminary experiments with the use of *AutoSimmune* have been described, specially regarding the role of artificial neutrophils. Bastos highlights the significant role of Neutrophil in the immunopathogenesis of post-streptococcal glomerulonephritis (PSGN), a human disease characterized by the presence of proliferative lesions in the renal glomeruli due to an infection in the upper airways or skin by the bacterium *Streptococcus pyogenes*. Simulation of PSGN was performed in *AutoSimmune*, (BASTOS *et al*, 2013). After insertion of *S. pyogenes* in AirWayTissue zone, the innate immune system cells are immediately activated. Thus, natural phagocytes, including neutrophils, initiated phagocytosis of bacteria as well as necrotic cells, sending inflammatory signals to other agents. The adaptive immune response is then activated. Consequently, B cells start producing antibodies that are released into the bloodstream and, according to their specificity, bind to pathogenic bacteria to form immune complexes. These, in turn, when filtered by the kidney are trapped in the glomeruli that end up as targets for neutrophils and macrophages, starting the process of glomerular injury (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Neutrophils play an important role in the immunopathogenesis for acting in the lysis of bacteria (BASTOS *et al*. 2013). According to Bastos and colleagues, in a demonstration of infection with bacterial activity including the presence of neutrophils

(Figure 5), the immune response was faster when compared to the simulation of the same scenario without the presence of these cells (Figure 6).

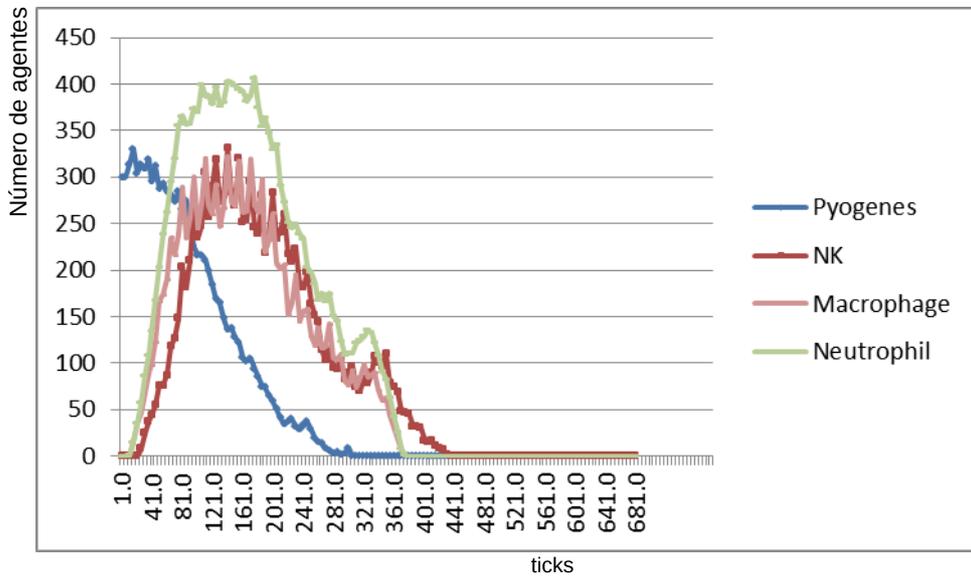


Figure 5. Bacterial infection of the upper airways (with neutrophils) .

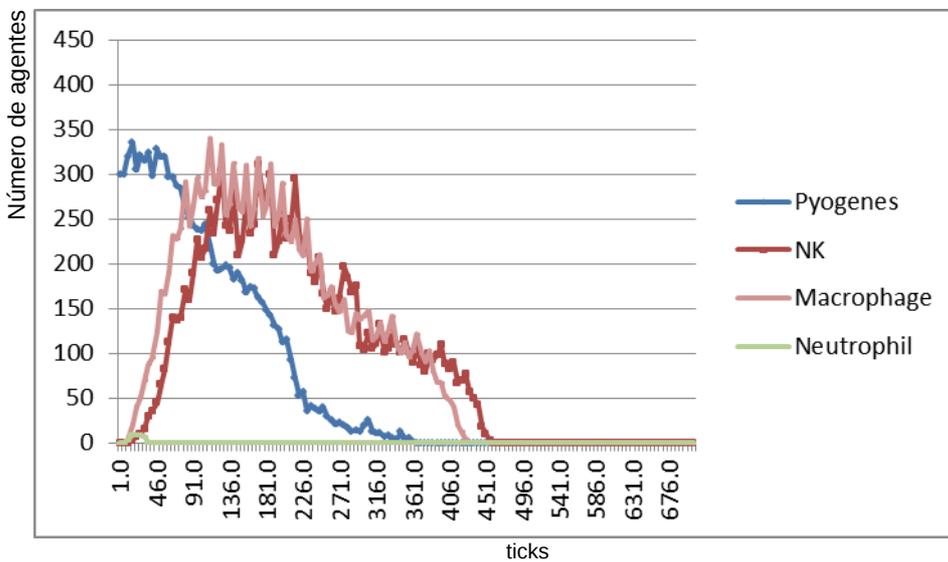


Figure 6. Bacterial infection of the upper airways (without neutrophils) ;

When analyzing Figure 5, one can realize the great performance of Neutrophils in the inflammatory process triggered by *S. pyogenes* (Agent Pyogenes), highlighting that the disappearance of bacteria occurs several ticks before when Neutrophils are

present.

5 CONCLUSION

A computational investigation of the immune system might lead to new hypotheses, allowing the conduction of preliminary tests before the use of *in vitro* and *in vivo* experiments, whose early design was presented in this brief manuscript – could allow the preparation of more accurate and conclusive experiments and analyses, for what we point two key benefits: (i) The deepening of studies in immunology and (ii) the advance of bioinspired algorithms that have been the basis of several computational solutions for all sort of complex problems, including the field of public health. .

REFERÊNCIAS

As referências deste e dos demais artigos são disponibilizadas no capítulo 5 - referências bibliográficas - no final desta dissertação.

2.3. Artigo III: Macrófago artificial e a modelagem computacional do sistema imune humano para a investigação da fisiopatologia da sepse: perspectivas

Artificial macrophage and the computational modeling of the human immune system to investigate the pathophysiology of sepsis: Perspectives

Andréia Patrícia Gomes, Flávio Oliveira de Sousa, Alcione Oliveira de Paiva, Brenda Silveira Valles Moreira, Rodrigo Barros de Freitas, Fábio Ribeiro Cerqueira, Maurilio de Araujo Possi, Carlos Antônio Bastos, Luiz Alberto Santana, Rodrigo Siqueira-Batista

Resumo. *A sepse representa um evento mórbido de extrema importância do ponto de vista clínico e de saúde pública, atingindo milhares de pessoas anualmente, no mundo. De uma perspectiva imunológica, os macrófagos são células extremamente importantes na interação Homo sapiens sapiens/ bactérias, ainda que muitos aspectos da atuação dessas células permaneçam aguardando elucidação. O presente artigo apresenta os requerimentos para a simulação computacional do macrófago no sistema AutoSimmune, permitindo o desenvolvimento de estudos sobre o papel dessa célula na sepse.*

Palavras-chave: sistema imunológico. macrófagos. modelagem computacional. informática. informática médica.

Abstract. *Sepsis represents a morbid event of paramount importance in terms of clinical and public health, affecting thousands of people worldwide each year. From an immunological perspective, macrophages are extremely important in the interaction Homo sapiens sapiens / bacteria, although many aspects of the performance of these cells remain awaiting elucidation. This article presents the requirements for computational simulation of*

macrophages in the AutoSimmune system, allowing the development of studies on the role of this cell in sepsis.

Keywords: immune system. macrophages. computational modeling. informatics. medical informatics.

1 INTRODUÇÃO

A sepse – síndrome de resposta inflamatória sistêmica relacionada à infecção suspeita ou confirmada – mantém ainda grande magnitude e relevância epidemiológica no contexto das doenças infecciosas no mundo. A utilização, mais recentemente, da simulação computacional – experimentação *in silico* – tem auxiliado a compreensão dos intrincados mecanismos patogênicos da interação microrganismo / homem (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2014), visando à ampliação do conhecimento e a construção de hipóteses científicas com um grau de efetividade e resolutividade compatível com a prática médica contemporânea (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012a), além de ser menos dispendiosa e permitir que as questões bioéticas vinculadas à pesquisa com seres humanos não sejam um incontornável problema (BASTOS, 2012), (POSSI, 2012).

Com base nesses pressupostos pretende-se, neste artigo, apresentar os delineamentos para a simulação do macrófago em um sistema computacional multiagente, o *AutoSimmune*.

2 O MACRÓFAGO NA SEPSE

Os macrófagos são células constituintes do sistema mononuclear fagocitário, as quais derivam dos monócitos originários da medula óssea a partir das células-tronco. Contam com a participação de alguns elementos no seu processo de desenvolvimento biológico, com destaque o fator de crescimento GM-CSF e a interleucina 3 (IL-3). Devido à presença dos fatores de crescimento na medula óssea, a célula progenitora sofre proliferação e posteriormente, diferenciação, dando origem a células conhecidas por promonocito. Estes por sua vez, após algumas

divisões, dão origem aos monócitos. Entretanto, para que ocorra a diferenciação das células estaminais, é necessário que os promonocitos expressem em sua superfície, receptores de membrana para citocinas específicas. Os monócitos permanecem na medula óssea por menos de 24 horas. Após este intervalo, ganham a corrente sanguínea e são encaminhados a vários órgãos e tecidos do corpo (CASTILLO *et al.*, 2009). Desta forma, os macrófagos são originados a partir dos monócitos sanguíneos que migraram da circulação para os tecidos, ou da própria proliferação que acontece a partir de precursores locais. Estas células constituem um grupo heterogêneo por possuírem fenótipos diversificados, e podem ser encontrados em diversos tecidos como linfonodos, baço, medula óssea, tecido conjuntivo perivascular, serosas, pulmão, fígado, ossos, sistema nervoso central e sinóvia, além do tecido conjuntivo cutâneo (GREER *et al.*, 2009). O processo de diferenciação de monócitos em macrófagos origina várias mudanças, dentre as quais podem ser citadas (CASTILLO *et al.*, 2009): (1) o aumento do tamanho da célula em 5 a 10 vezes; (2) aumento do número e da complexidade das organelas; (3) início de atividade fagocítica; (4) produção de altas concentrações de enzimas líticas; (5) liberação de mediadores solúveis, os quais são responsáveis pela realização de diferentes funções.

Os macrófagos são células grandes – com diâmetro próximo de 15 a 80 μm – que apresentam forma irregular. Sua motilidade é comparada à dos monócitos no sangue, podendo ser observados na célula, com certa frequência, pseudópodes filiformes. Seu citoplasma é abundante, com coloração azul celeste, contendo vacúolos e grânulos azuis. O núcleo é ovalado, podendo apresentar-se recuado ou alongado, este último, quando corado por meio do método Wright; é possível observar a cromatina com aspecto “esponjosa”, enquanto a membrana nuclear aparece distintamente (GREER *et al.*, 2009).

Os macrófagos participam da imunidade inata, uma vez que ficam a cargo da resposta inicial e natural contra os microrganismos. Esta resposta se dá por meio da fagocitose de corpos estranhos que conseguem penetrar no organismo, os quais são representados pelas bactérias, substâncias e resíduos teciduais (CASTILLO *et al.*, 2009). São células capazes de montar uma resposta ao estímulo químico do

microambiente e de adquirir funções condizentes com as necessidades do tecido em que se encontra. Este processo é conhecido como ativação, e ocorre quando há infecções polimicrobianas, onde os constituintes das bactérias representados pelos lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas, o ácido lipoprotéico (LTA) de bactérias gram-positivas, zymosan (ZYM) de fungos e DNA de bactérias têm a capacidade de se ligarem a diversos receptores *Toll like* (TLR), ativando assim, os macrófagos (ELLABAN; BOLGOS; REMICK, 2004). A interação existente entre os macrófagos e o meio externo ocorre por meio de inúmeros receptores de membranas. Quando estes estão ocupados por substâncias agonistas, induzem profundas modificações no macrófago, fazendo com que a célula migre em direção a uma substância, processo conhecido como quimiotaxia. Há o surgimento de movimentos localizados na membrana em direção aos receptores de contato para que aconteça a adesão, migração e a fagocitose. Por fim, ocorre a síntese de enzimas que são úteis para a atividade antimicrobiana, viabilizando a ativação do macrófago (BRASIL *et al.*, 1999). Seus principais mediadores desencadeantes são as citocinas pró-inflamatórias – representados pelas interleucinas (1, 2, 6, 8 e 12), interferons e fatores de necrose – lipopolissacarídeos (LPS) e fatores estimuladores de colônia – responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos para o local da infecção e pela limpeza da infecção bacteriana. Os mediadores anti-inflamatórios – receptor agonista da IL-1 (IL-1Ra), a IL-10 e o TGF- β – são produzidos em um segundo momento por macrófagos, com o intuito de regular a produção de mediadores inflamatórios (ELLABAN; BOLGOS; REMICK, 2004). As funções desempenhadas pelos macrófagos abarcam os processos de (GREER *et al.*, 2009): (1) promoção ou inibição da inflamação; (2) atuação no reparo e renovação dos tecidos; (3) ação tumoricida e microbicida; (4) participação da resposta inata com a adquirida. São células capazes de produzir mediadores como as prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas, interleucinas 1, 6 e 12, tendo como resultado final a atração de diversas células para o local de inflamação e a efetivação da resposta imune.

Quando há infecção bacteriana em local previamente estéril, os macrófagos tem a função de detectar tal patógeno e desencadear a resposta inflamatória. Após a

fagocitose do patógeno, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias – IL-1 β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral α (TNF- α) – que, por sua vez, recrutarão células constituintes da resposta inflamatória (*i.e.*, neutrófilos) objetivando o combate local do agressor (KUROSAWA *et al.*, 2011). Durante o processo de fagocitose de microrganismos, os macrófagos processam e apresentam os antígenos em sua superfície, facilitando o reconhecimento pelos linfócitos T auxiliares. Estes, por sua vez, sintetizam linfocinas ativadoras de linfócitos B, estimulando a produção e liberação de anticorpos específicos aos antígenos apresentados pelos macrófagos. Esses anticorpos ligam-se aos antígenos dos microrganismos ou das células infectadas por vírus, atraindo com maior avidez outros macrófagos para fagocitá-los (CASTILLO *et al.*, 2009).

Essa característica pró-inflamatória dos macrófagos é conhecida como *ativação clássica* ou M1. Em contrapartida, após o início da fase de resolução deste processo, os macrófagos adquirem um estado de ação anti-inflamatória, no qual há um aumento da expressão das citocinas IL-10 e TNF- β , além de iniciarem um processo de reparação tecidual – característica denominada como *ativação alternativa* ou M2 (LIU *et al.*, 2014). Nos macrófagos inflamatórios M1, o efeito da polarização fica a cargo da célula Th1 ou célula *natural killer* derivada de IFN-gama, juntamente com o TNF- α ou por LPS ou GM-CSF. Citam-se como características dessas células: (1) a capacidade de exibição de pró-inflamatórios ativados; (2) envolvimento na proteção do hospedeiro e na imunidade antitumoral; (3) capacidade de expressar vários receptores de reconhecimento de patógenos; e (4) capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). Já os macrófagos com fenótipo M2, em contrapartida, são estimulados pela IL-4 e IL-13, oriundas de células Th2 ou pelo fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). Estes macrófagos estão envolvidos na supressão imunitária e na cicatrização de feridas, justificando assim, seu reconhecimento como macrófagos de cicatrização (GORDON, 2003). Essa dualidade funcional do macrófago é nomeada *plasticidade*, destacando-se seu papel fundamental no contexto e evolução da sepse (BISWAS *et al.*, 2012).

Durante o período inicial da síndrome da resposta inflamatória sistêmica

(SIRS), o processo infeccioso desencadeia um aumento de neutrófilos e monócitos circulantes em estado de hiper-reatividade (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2014). Como consequência disso, há um aumento importante de citocinas que podem levar a graves consequências como dano vascular e falência orgânica – consequências graves que comumente acometem o paciente com sepse. Os principais mediadores inflamatórios liberados são representados pelas moléculas de adesão (selectinas, integrinas e imunoglobulinas); o óxido nítrico (NO); os produtos do metabolismo do ácido aracdônico como o troboxano A2, prosaglandinas e os lecotrienos; e o fator de ativação plaquetária (PAF) (BRASIL, 1999). No entanto, devido à permanência dos macrófagos em um ambiente hiperestimulante, essas células adquirem um caráter irresponsivo às endotoxinas – fenômeno denominado *tolerância às endotoxinas* – respondendo com a ativação macrofágica tipo M2. Essa ativação impede que as células endotoxina-tolerantes produzam citocinas pró-inflamatórias, levando o indivíduo com sepse a entrar em estado de imunossupressão e morte (BISWAS *et al.*, 2012).

3 INVESTIGAÇÃO IMUNOLÓGICA UTILIZANDO SISTEMAS MULTIAGENTES

O avanço das tecnologias de computação permitiu o surgimento de uma nova técnica de experimentação, mais rápida, menos custosa e sem as questões éticas envolvidas nas experimentações *in vitro* e *in vivo*: trata-se a experimentação *in silico*.

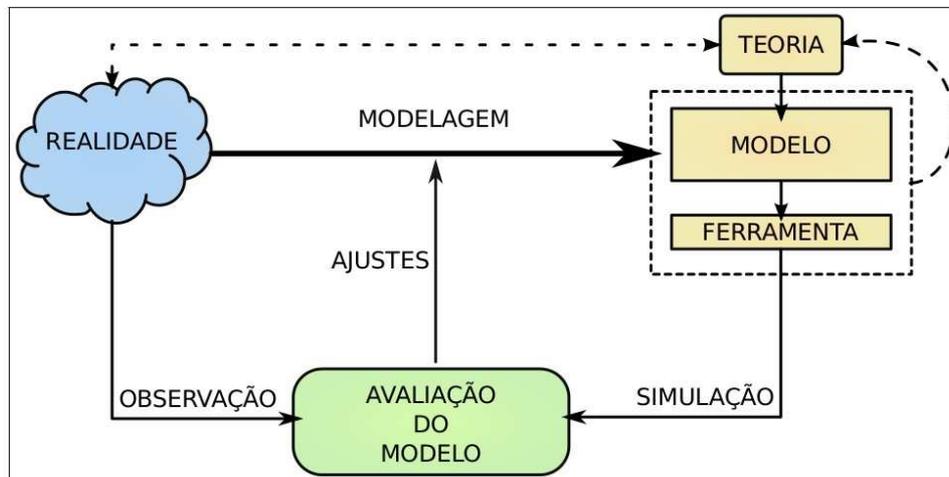


Figura 1. Processo de experimentação *in-silico*. Fonte: (adaptado) (DROGOUL; FERBER, 1992, p. 2).

Nessa modalidade de investigação, o que se tem é um modelo inicial construído à luz do conhecimento existente e a partir da observação dos fenômenos a serem estudados. Então, utilizando-se uma ferramenta de simulação, várias hipóteses são testadas; os resultados dessas simulações são então comparados com observações experimentais do fenômeno real, validando ou indicando a necessidade de ajustes no modelo, os quais podem ainda fornecer pistas para aprimoramentos na teoria científica sobre o fenômeno estudado. Esse processo é ilustrado na Figura 1. Uma vez que o modelo tenha sido validado, ele pode ser utilizado para aproximar, com certa precisão, o comportamento do fenômeno real, podendo ser utilizado no teste de hipóteses de soluções para díspares problemas.

Os Sistemas Multiagentes (SMA) são uma possível metodologia para a construção do modelo a ser simulado e têm sido utilizados para a pesquisa em ambiente computacional dos comportamentos emergentes de sistemas complexos – tais como o sistema imunológico (SI) – uma vez que exigem apenas que sejam modeladas as entidades básicas que formam o sistema e suas relações, na suposição que o comportamento coletivo irá emergir da interação dos eventos individuais. Alguns SMA voltados para a investigação do SI foram propostos. Dentre eles o BIS – *The Basic Immune Simulator* (FOLCIK *et al.*, 2007) – desenvolvido para

estudar as interações entre células da imunidade inata e as células da imunidade adaptativa e o *AutoSimmune*, proposto por Possi (POSSI, 2012), inspirado no BIS, mas tendo como foco primeiro a investigação da autoimunidade. proposto por Possi (POSSI, 2012), inspirado no BIS, mas tendo como foco primeiro a investigação da autoimunidade.

O *AutoSimmune* utiliza, como ferramenta de simulação, o framework Repast Symphony¹, destacando-se que os agentes, nesse modelo, são reativos com estado, sendo capazes de perceber o ambiente – e demais agentes – e reagir aos estímulos recebidos, com base em suas regras e estado internos. Cada agente diz respeito a uma entidade do sistema real, sendo que tais agentes podem ser heterogêneos, cada um com seus próprios estados e regras. Atualmente já foram modeladas zonas de tecido (vias aéreas superiores e rins), linfonodo, circulação, medula óssea e timo, além dos agentes para os antígenos, anticorpos, citocinas (Tabelas 1 e 2; Figura 2), vírus e células do sistema imunológico.

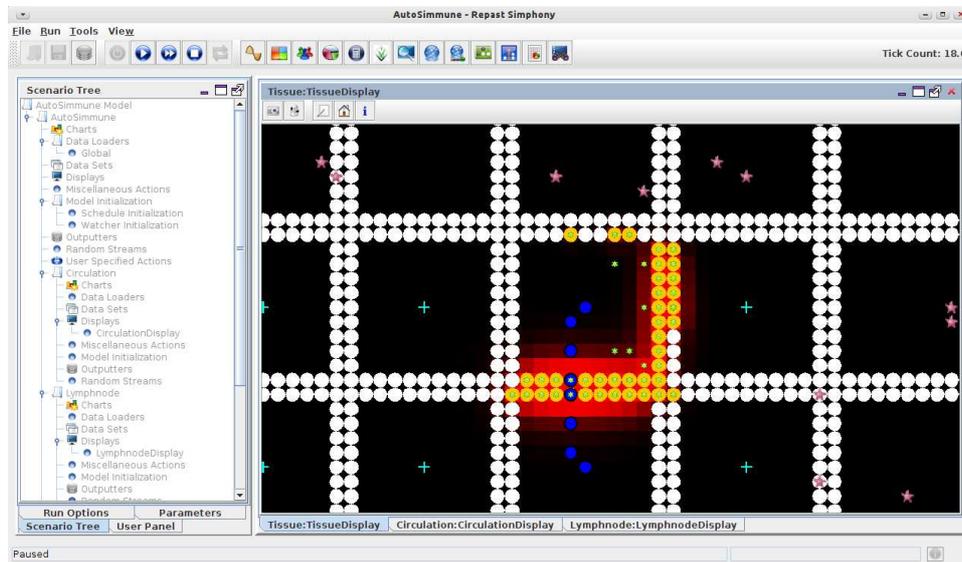


Figura 2. Simulação do *AutoSimmune* no Repast Symphony. Detalhe da zona *Tissue*, com suas células parenquimatosas (em branco), vírus (em verde), macrófagos (em azul), gradientes de concentração da substância PK1 (em vermelho), células dendríticas (em formato de estrela) e vasos sanguíneos e

¹http://repast.sourceforge.net/repast_simphony.php

linfáticos (em formato de cruz). Fonte: POSSI (2012).

As zonas simulam o espaço discreto, dividido em posições (x, y), no qual os agentes se locomovem, onde estes podem liberar citoninas ou aferir sua concentração ao seu redor, podendo também interagir com outros agentes com os quais faça contato. Estes agentes, por sua vez, modelam tudo que seja um antígeno em potencial, desde moléculas, até patógenos como vírus e bactérias. Quanto às citocinas (Tabelas 1 e 2), são modeladas como camadas sobrepostas à zona onde estão circulando, informando a concentração de determinada citocina em cada posição (x, y) da zona no instante de tempo de aferição. Gráficamente, a ferramenta de simulação permite a visualização das zonas, agentes e substâncias, em tempo real, como ilustrado na Figura 2.

Tabela 1- Citocinas pró-inflamatórias no AutoSimune.

SIGLA	SUBSTÂNCIA A BASE	REPRESENTAÇÃO	SUBSTÂNCIAS REPRESENTADAS
PK1	Parenchymal-kine 1	Fatores de estresse liberados por tecidos que estão sofrendo danos em razão da infecção ou da resposta imunológica.	Proteínas de choque-térmico (HSP), ácido úrico, e outras; além de quimiocinas como CX3CL1, CCL3, CCL5 e CCL6.
MK1	Mono-kine 1	Conjunto de substâncias pró-inflamatórias presentes nas respostas imunológicas inatas.	IL-12, IL-8, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 e CXCL11 .
CK1	Cytokine 1	Conjunto de substâncias pró-inflamatórias presentes nas respostas imunológicas adaptativas.	INF-, IL-2 e TNF-.
NECROSIS	Necrosis factors	Restos mortais de células que sofreram necrose, i.e., morreram por algum processo traumático, e não por morte celular programada.	

Fonte: Adaptado a partir de Folcik, et al. (2007) e de Possi (2012).

Tabela 2 - Citocinas anti-inflamatórias no AutoSimune.

SIGLA	SUBSTÂNCIA A BASE	REPRESENTAÇÃO	SUBSTÂNCIAS REPRESENTADAS
MK2	Mono-kinase 2	Conjunto de substâncias anti-inflamatórias presentes nas respostas imunológicas inatas.	IL-10, CCL1, CCL17, CCL22, CCL11, CCL24, CCL26
CK2	Cytokine 2	Conjunto de substâncias anti-inflamatórias presentes nas respostas imunológicas adaptativas.	TGF- β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e INF-
APOPITOSIS	Apoptotic bodies	Restos mortais de células que sofreram morte celular programada, ou apoptose	

Fonte: Adaptado a partir de Folcik, et al. (2007) e de Possi (2012).

A Figura 3 ilustra como as camadas de dados são utilizadas para simular a difusão das substâncias nas zonas.

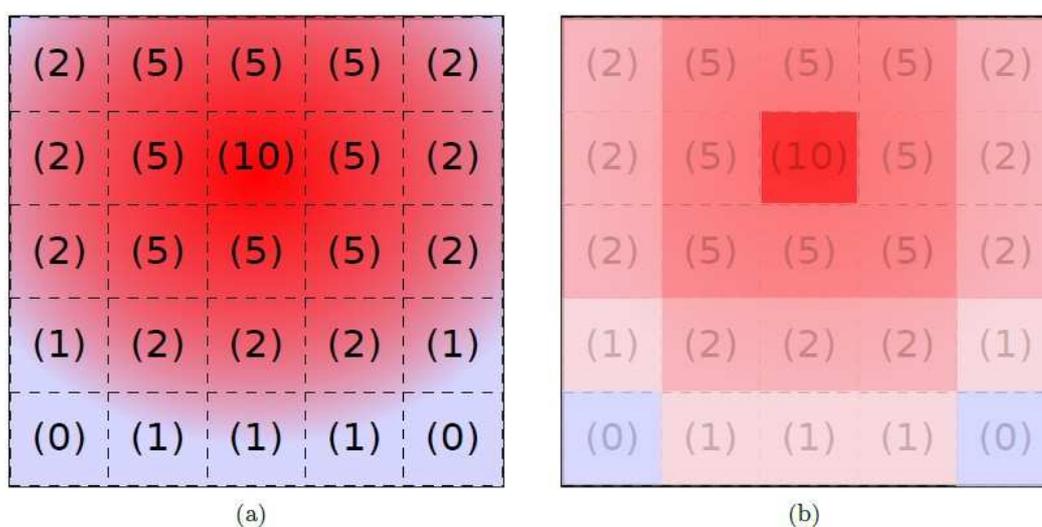


Figura 3. Ilustração da representação do gradiente de dispersão das citocinas através das camadas de dados. Em (a), a distribuição contínua da substância,

como acontece no mundo real, está ilustrado o gradiente contínuo e suas concentrações médias em cada célula. Pode-se notar que a liberação dessa substância ocorreu na célula onde sua concentração é igual a 10 unidades. Já em (b) é mostrado a discretização do gradiente, mostrando como os agentes veem a distribuição da substância. Reproduzido de POSSI (2012).

Adicionalmente à autoimunidade, o *AutoSimmune* também vem sendo utilizado para investigar o papel da resposta imune na glomerulonefrite pós-infecciosa pela bactéria *Streptococcus pyogenes* (BASTOS, 2012), do mastócito no controle da inflamação (SILVA *et al.*, 2012), além da proposição teórica de aplicação para o estudo da tripanossomíase americana e da sepse (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012b).

4 O MACRÓFAGO ARTIFICIAL

No *AutoSimmune*, o macrófago é representado pelo agente *Macrophage*, definido pela classe homônima. A Figura 4 mostra um recorte do diagrama de classes do *AutoSimmune*, mostrando, resumidamente por questões de espaço, como a classe *Macrophage* se relaciona com as demais classes do modelo.



Figura 4. Recorte do diagrama de classes do *AutoSimmune*, destacando a classe *Macrophage*.

O agente macrófago é inserido na zona *Tissue* através dos portais (*TissuePortal*, *CirculationPortal*, *LymphnodePortal*) quando estes detectam a presença das substâncias PK1 (fatores de estresse celular), CK1, MK1 (substâncias pró-inflamatórias das respostas inatas e adaptativas respectivamente) e NECROSIS (restos mortais de células), que possuem o papel de atração sobre o agente, simulando a diapedese (POSSI, 2012). Uma vez no sítio de infecção, encontrando-

se com as supracitadas substâncias com uma concentração acima de um limite especificado em parâmetros da simulação, o *Macrophage* torna-se ativo, produzindo a substância MK1 e fagocitando antígenos, detritos de células mortas e imunocomplexos, podendo apresentar os antígenos destes à linfócitos T *helper*, já que o agente *Macrophage* estende a classe abstrata *APC*, que define a classe das células apresentadoras de antígenos.

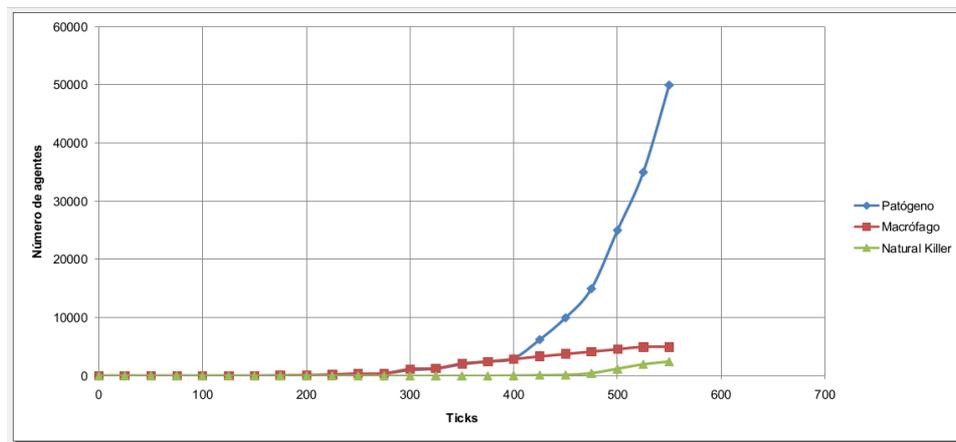


Figura 5. Resposta inata a uma infecção de um patógeno PAMP-negativo.

Fonte: POSSI *et al* (2011, p. 10)

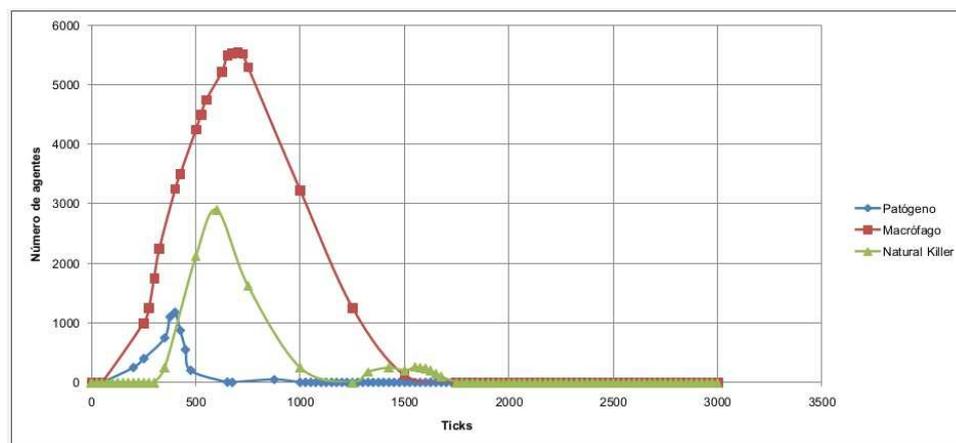


Figura 6. Resposta inata a uma infecção de um patógeno PAMP-positivo.

Fonte: (POSSI *et al.*, 2011, p. 10)

As Figuras 5 e 6 mostram os primeiros testes realizados com o *AutoSimune*,

evidenciando o comportamento dos agentes *Macrophage*, coerente com a literatura na resposta primária PAMP-dependente (PAMP = padrões moleculares associados aos patógenos) a agentes infecciosos. Na Figura 5, o agente infeccioso não possuía um padrão antigênico pertencente ao conjunto PAMP reconhecido pelo agente *Macrophage*, fazendo com que este não se ativasse. Já na Figura 6, com o patógeno PAMP-positivo, o *Macrophage* foi ativado, proliferando-se, liberando a citocina MK1 para recrutar mais agentes para o local, e aumentando a fagocitose, eliminando a infecção e limpando o sítio para facilitar a regeneração tecidual (POSSI, *et al.*, 2011). Nesses testes, a resposta adaptativa estava desabilitada.

Apesar de mostrar um comportamento coerente, o agente *Macrophage* não possui implementada as regras e estados necessários para a modelagem da regulação da resposta imune, essencial para a simulação da sepse, uma vez que o *AutoSimmune* baseia-se apenas na hipótese de que o declínio da resposta imunológica acontece devido à ausência de antígenos que a estimule (POSSI, 2012). Por este motivo, torna-se necessário estender o agente *Macrophage*, incluindo o estado "M2" (macrófago anti-inflamatório) e a produção da substância que representa as citocinas anti-inflamatórias, a MK2.

A Figura 7 mostra a máquina de estados descrevendo as regras do agente que representa o novo modelo proposto para o macrófago, ilustrando o que vem sendo implementado como extensão do *AutoSimmune* para simulação deste tipo de célula concernente à resposta imune na ocorrência de enfermidades como a sepse.

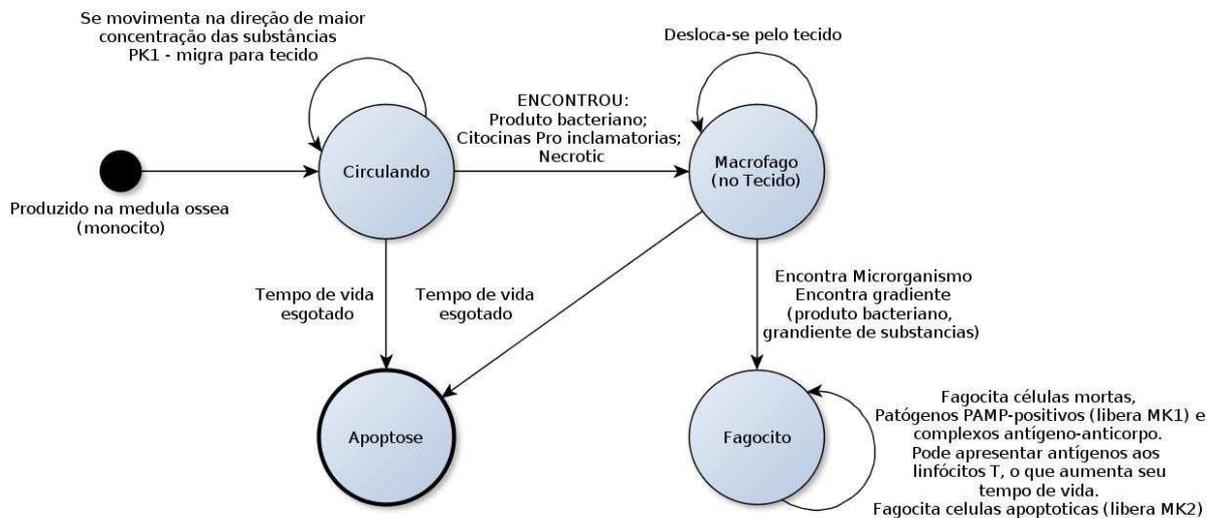


Figura 7 - Regras do agente *Macrophage* para simulação da sepse. Ilustração elaborada pelos autores, a partir das regras do *AutoSimmune*.

No estado tecidual, o agente passa do estado *circulando* (monócito) para o estado *macrófago*, no qual ele identifica e fagocita microrganismos, levando em conta a afinidade – representada por uma cadeia de bits contíguos presente em cada agente (BASTOS, 2012). No estado de *fagócito*, quando o macrófago fagocita células necróticas ou bactérias, produz a citocina pró-inflamatória (MK1). Já quando fagocita células apoptóticas (outros macrófagos ou neutrófilos) produz a substância anti-inflamatória (MK2).

Quando seu tempo de vida termina, o agente *Macrophage* altera seu estado para morte celular, o que inclui os casos de apoptose, simulando o que ocorre no organismo do *H. sapiens sapiens* (ABBAS *et al.*, 2008).

Estudos recentes a partir da utilização do *AutoSimmune* tem gerado dados iniciais, principalmente no que se refere ao papel do macrófago. Desta forma, Bastos (2012) conseguiu demonstrar o comportamento do macrófago na imonopatogênese da glomerulonefrite pós-estreptocócia (GNPE), enfermidade que atinge o homem e se caracteriza por lesões proliferativas nos glomérulos renais como consequência de uma infecção nas vias aéreas superiores ou cutâneas pelo agente infeccioso *S. pyogenes* (BASTOS *et al.*, 2013).

Inicialmente, para que pudesse ser simulada a GNPE, foi identificado o quantitativo de bactérias necessário para que ocorresse a infecção nas vias aéreas (*AirWayTissue*). Mediante isto, há a ativação da resposta imune inata, com a ação direta dos fagócitos naturais, incluindo os macrófagos (Figura 8) que tem a função de iniciar a fagocitose das bactérias, das células necróticas e de emitir sinais inflamatórios aos demais agentes.

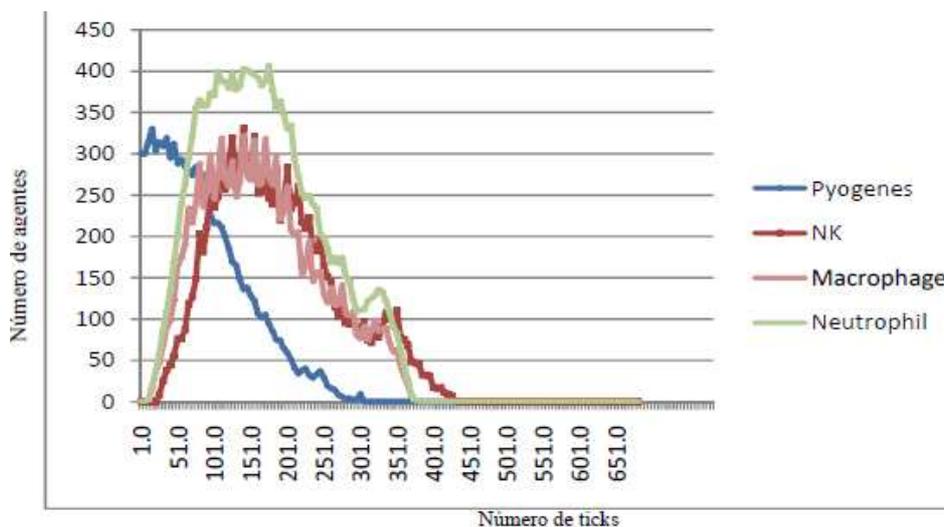


Figura 8 – Infecção bacteriana nas vias aéreas superiores com a presença de macrófagos. Fonte: BASTOS (2012)

Após a ativação da resposta imune adaptativa, os anticorpos originados a partir das células B são direcionados à corrente sanguínea, que, de acordo com sua especificidade, acabam se ligando às bactérias patogênicas, originando os imunocomplexos. Entretanto, quando os imunocomplexos são filtrados pelos rins, ficam retidos nos glomérulos incitando neutrófilos e macrófagos a iniciarem o processo de inflamação, que resulta na lesão glomerular, desencadeando a GNPE (BASTOS *et al.*, 2013).

Um dos aspectos significativos descrito por (POSSI, 2012), diz respeito ao papel das interações entre macrófagos e células NK para a eliminação de patógenos, os quais foram modelados com as seguintes características de: (1) infectar as células; (2) ter um período de incubação; (3) reproduzir e matar a célula

após deixá-la. Desta forma, na primeira simulação, haviam células NK para que estas pudessem desenvolver seu papel durante a infecção (Figura 9).

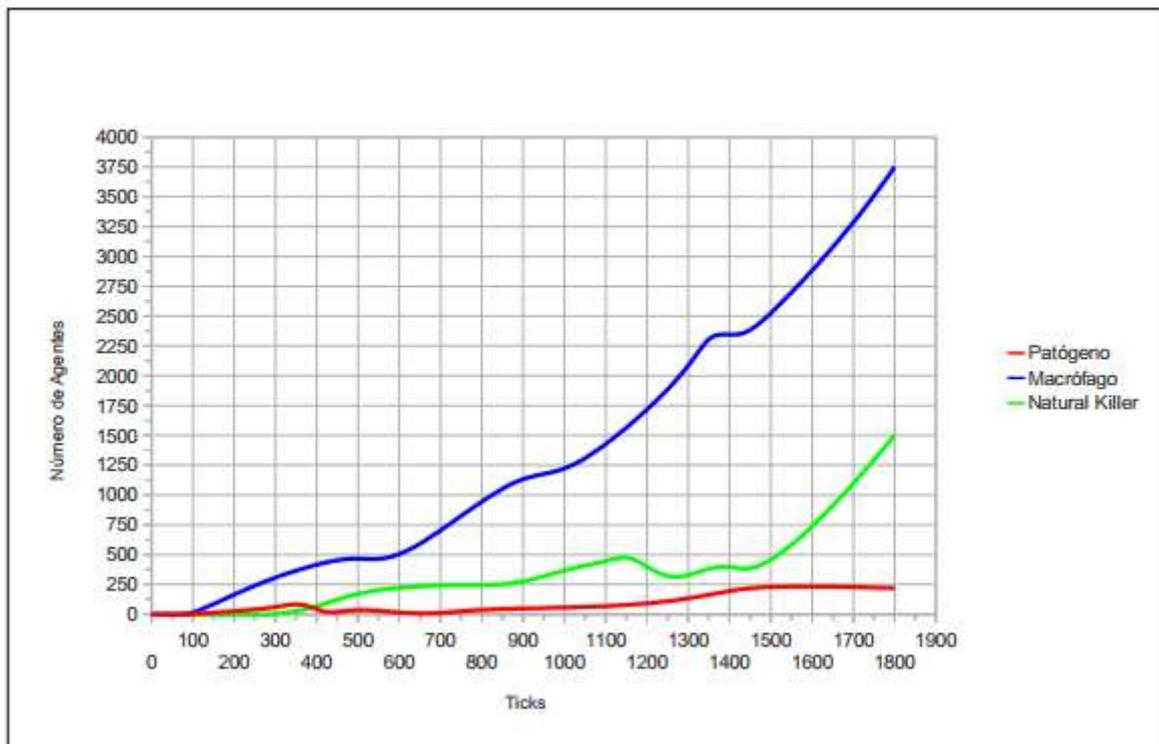


Figura 9 – Evolução da Infecção com a atuação da NK. FONTE: POSSI *et al* (2011).

Na Figura 9 é possível perceber que as células *Macrophage* deram início à resposta ao processo infeccioso recrutando as células *NK*, as quais foram capazes de controlar a replicação do agente – cujo paralelo seria a redução da carga viral (curva em vermelho) –, quando comparado ao aumento do número de células *NK* (curva em verde) (POSSI *et al.*, 2011). Contudo, a resposta imunológica inata não foi completamente competente para que houvesse a eliminação completa do vírus. (JANEWAY *et al.*, 2001) conseguiram resultados similares em sua investigação, na medida em que as células *NK* apenas controlaram a replicação viral, não sendo capazes de eliminá-la. Complementarmente ao seu estudo, concluiu que para que haja a eliminação completa é necessária a ativação subsequente dos linfócitos T citolíticos (CTL). Deste modo, (POSSI *et al.*, 2011) considera como positivo o

resultado da simulação, confirmando que o modelo desempenhou um comportamento esperado em relação ao domínio biológico.

5 CONCLUSÕES

A investigação computacional do sistema imunológico pode originar novas hipóteses – além de permitir a realização de testes preliminares antes da utilização de experiências *in vitro* e *in vivo* – contribuindo para o conhecimento sobre a fisiopatologia das doenças humanas. Nesse contexto, as investigações *in silico* sobre o papel dos macrófagos na sepse – proposição do *macrófago artificial*, cujos primeiros delineamentos foram apresentados nessa breve comunicação – permitirão que sejam desenvolvidas análises e experimentos mais apurados e conclusivos, para o que será decisivo (i) o aprofundamento dos estudos na área de imunologia e patogênese das enfermidades infecciosas e (ii) o aprimoramento do modelo – *AutoSimune* – em termos computacionais, o qual poderá trazer benefícios também para a área de informática no que tange a sistemas bio-inspirados.

REFERÊNCIAS

As referências deste e dos demais artigos são disponibilizadas no capítulo 5 - referências bibliográficas - no final desta dissertação.

2.4. Artigo IV: Imunologia da sepse: Investigação por meio de simulação computacional com sistemas multiagentes

Flávio Oliveira de Sousa, Alcione de Paiva Oliveira, Andreia Patrícia Gomes, Carlos Antônio Bastos, Maurílio de A. Possi, Luiz A. Santana, Fábio Ribeiro Cerqueira, Maria Goreti de A. Oliveira, Rodrigo Siqueira-Batista

Departamento de Informática, Universidade Federal de Viçosa (UFV) CEP 36570-000 – Viçosa – MG – Brasil Departamento de Medicina e Enfermagem, Universidade Federal de Viçosa (UFV) CEP 36570-000 – Viçosa – MG – Brasil {alcione, andreiapgomes, carlosantoniobastos, flavio7co@gmail.com, maurilio.possi, [frcerqueira](mailto:frcerqueira@gmail.com)}@gmail.com, {luizsantana, [malmeida](mailto:malmeida@ufv.br)}@ufv.br, rsiqueirabatista@yahoo.com.br

Abstract. *From the public health and clinical point of view, sepsis is an extremely important infectious complication and its pathophysiology mechanisms are not fully elucidated. This article argues that multiagent systems are suitable to help elucidate the problem and that it is possible to carry out simulations that can be used in the observation of emergent behaviors, enabling a better understanding of the disease.*

Resumo. *Do ponto de vista da clínica e da saúde pública a sepse é uma complicação infecciosa extremamente importante e seus mecanismos fisiopatológicos não estão completamente elucidados. O presente artigo argumenta que sistemas multiagentes são adequados para ajudar elucidar o problema e que é possível fazer simulações que podem ser utilizadas na observação de comportamentos emergentes, permitindo uma melhor compreensão da enfermidade.*

1. Introdução

O conceito de sepse abrange as situações nas quais se estabelece síndrome

de resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês systemic inflammatory response syndrome) desencadeada por infecção suspeita ou confirmada (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011).

Trata-se de uma das mais importantes complicações infecciosas da medicina contemporânea, tanto por sua incidência, quanto por sua gravidade e pelo grande potencial de evolução para o óbito. Do ponto de vista clínico, a apresentação da sepse se relaciona às múltiplas possibilidades de interação entre *Homo sapiens sapiens* e microrganismos, mormente quando há ruptura do complexo equilíbrio dos mecanismos pró e anti-inflamatórios que desorganizam a resposta orgânica – homeostase – nos enfermos vitimados pela doença (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012a). A sepse é uma das principais causas de óbito nas unidades de terapia intensiva (UTI), provocando milhares de mortes, todos os anos, no mundo. Tal impacto epidemiológico tem alavancado, substantivamente, as investigações – *in vivo*, *in vitro* e, mais recentemente, *in silico* –, com o propósito de compreender os intrincados mecanismos patogênicos da condição mórbida (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012a). Esta última, a experimentação *in silico* – simulação computacional – tem a vantagem de ser pouco onerosa, não ter implicações éticas substantivas e de poder testar e fornecer hipóteses para as outras modalidades de investigação (BASTOS, 2012). O escopo da presente comunicação é apresentar a aplicabilidade dos sistemas multiagentes para investigação da imunologia *in silico* da sepse.

2. Investigação da Imunologia da Sepse por meio de Sistemas Multiagentes

Sistemas multiagentes (SMA) têm sido muito empregados para simular comportamentos emergentes de sistemas complexos – tais como o sistema imunológico (SI) –, uma vez exige apenas que sejam modeladas as entidades básicas que formam o sistema e suas relações, na suposição que o comportamento coletivo irá emergir da interação dos indivíduos. Alguns sistemas multiagentes voltados para a investigação do SI foram propostos. Dentre eles o *AutoSimunne*, proposto por Possi (POSSI *et al.*, 2011) que tem como foco principal original a

investigação da autoimunidade. Segundo Possi, o *AutoSimmune* foi desenvolvido utilizando o framework Repast Simphony com a abordagem *bottom-up* característica dos SMA reativos. Neste modelo os agentes são capazes de perceber o ambiente, agir e armazenar estados. Cada agente representa uma entidade do sistema real, sendo que estes agentes podem ser heterogêneos, cada um com seus próprios estados e regras, podendo interagir com os demais. Atualmente já foram modeladas zonas de tecido, linfonodo, circulação, medula óssea e timo, além dos agentes para os antígenos, anticorpos, vírus e células. Foi igualmente modelada a difusão de substâncias (citocinas) por meio de uma camada de dados. Além dos estudos sobre a autoimunidade, o *AutoSimmune* também foi utilizado para investigar o papel do mastócito no controle da inflamação (SILVA *et al.*, 2012) e da imunidade na glomerulonefrite pós-infecciosa pela bactéria *Streptococcus pyogenes* (BASTOS, 2012), além da proposição teórica de aplicação para o estudo da sepse (SIQUEIRA BATISTA *et al.*, 2012b).

3. A sepse

O desenvolvimento da sepse depende das relações estabelecidas entre o microrganismo e o hospedeiro. As proteínas e endotoxinas das bactérias são transferidas aos receptores existentes na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos.

Após esta fase de reconhecimento, sucedem-se vários eventos de ativação celular e produção de citocinas, cujo resultado é a SIRS. Ocorre, neste contexto, a produção e secreção de inúmeras citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucinas 1 (IL-1), 2 (IL-2), 6 (IL-6), 8 (IL-8), 12 (IL-12), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e TNF- β (fator de necrose tumoral beta), eventos considerados cruciais no desenvolvimento de sepse (AZIZ *et al.*, 2013). Alguns enfermos evoluem para o óbito precocemente, em decorrência de intensa reação inflamatória sistêmica. Citocinas anti-inflamatórias – como as interleucinas 4 (IL-4), 5 (IL-5), 10 (IL-10), 11 (IL-11) e 13 (IL-13) – também são produzidas possibilitando o desenvolvimento de anergia e provocando um contexto de imunossupressão, a síndrome da resposta

anti-inflamatória compensatória (CARS). A regulação deste equilíbrio pró/anti-inflamatório é complexa. Destaca-se a atuação dos monócitos/macrófagos como ativadores da resposta imune adaptativa, pois ao fagocitarem células necróticas ou bactérias, os macrófagos induzem os linfócitos na liberação de substâncias pró-inflamatórias, como interferon alfa (INF- α), interferon delta (INF- δ) e IL-2. A produção pelos fagócitos de IL-4 e IL-10, por outro lado, alentecem a resposta pró-inflamatória. Tem sido também demonstrado que disfunções na atuação dos neutrófilos são um dos fatores responsáveis pela instalação de quadros de maior gravidade. Nesta complexa teia fisiopatogênica, o TNF- α tem um papel relevante, ao estimular os leucócitos e as células endoteliais a liberarem outras citocinas (bem como mais TNF- α), a expressar moléculas de adesão na superfície celular. Além disso, a interação entre TNF- α e IL-1 – por estimulação recíproca – faculta o desenvolvimento de um estado pró-coagulante. Distúrbios vasculares podem ser também produzidos diretamente pelas endotoxinas na indução da vasodilatação potencializando a ativação/agregação de neutrófilos (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011)

4. Requisitos para simulação da sepse

Observado o nível de granularidade do simulador *AutoSimmune* e, portanto, focando as análises no nível celular, pode-se propor, através da alteração do modelo, sua adequação à pesquisa *in silico* da sepse. Além da inserção do agente neutrófilo (etapa já cumprida) e da adequação do macrófago – pela importância já descrita – a inserção das substâncias pró-inflamatórias IL1, IL2, TNF- α , das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, do IFN- γ (interferon gama) e a criação do agente bactéria (etapa já cumprida para cocos gram-positivos, mas ainda em desenvolvimento para bastonetes gram-negativos), associado ao restante do modelo já implementado irão permitir simulação dos mecanismos anti e pró-inflamatórios e fornecer indicadores de sepse – leucitose por exemplo – compatíveis com a literatura. Mecanismos como a vasodilatação também poderão ser simulados. A Figura 1 mostra a proposta da máquina de estados para o agente neutrófilo, já

incluído no *AutoSimmune*.

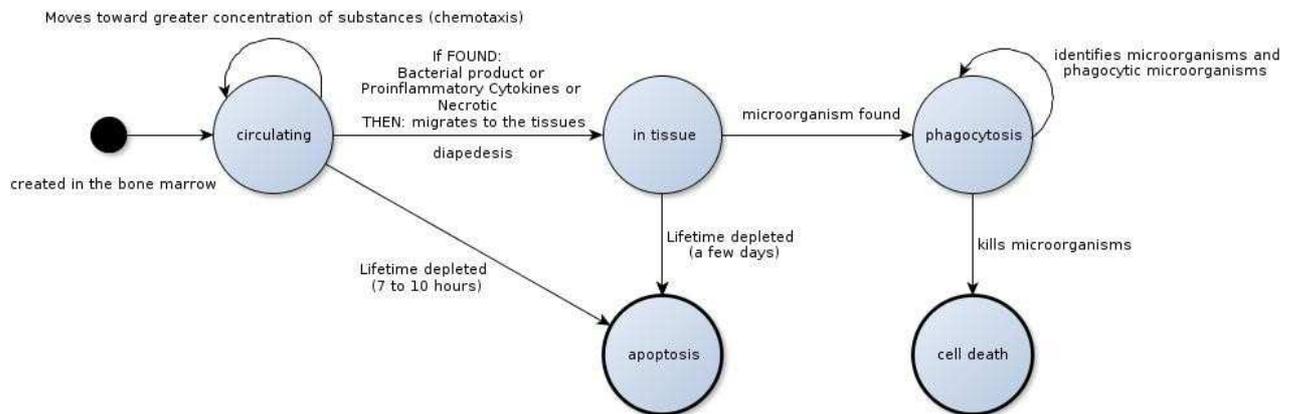


Figura 1 - Regras do agente *Neutrophil* para simulação da sepse. Ilustração elaborada pelos autores, a partir das regras do *AutoSimmune*.

A investigação sobre o linfócito Treg (células T CD4+ CD25+) também vem sendo realizada em paralelo, pois há indícios de que tal célula – especialização da célula T CD4+ (T helper) – pode ter um papel relevante na sepse, tendo em vista que ela possui significativa participação na regulação do sistema imunológico humano (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012a). Assim o agente Treg poderá também ser incluído no modelo, o que representa mais uma variável de teste para a elucidação dos mecanismos que envolvem a doença. Uma vez implementadas as alterações no *AutoSimmune* e após os testes de adequação e validação o simulador permitirá que sejam efetuados experimentos como: (i) variação de quantidade de inóculo, (ii) variação de quantidade de neutrófilos, (iii) diminuição ou aumento de quantidade de substâncias e (iv) aumento ou diminuição de vasodilatação, dentre inúmeros outros testes possíveis.

5. Conclusões

A possibilidade de realização de experimentos *in silico* pode culminar na geração de novas hipóteses ou conhecimentos que aliados a outras análises – como a investigação transcriptômica e proteômica – poderá constituir ferramenta

importante no entendimento dos mecanismos que envolvem a sepse. Ademais, permitirá que soluções ou hipóteses possam ser previamente testadas antes da utilização de experiências *in vitro* e *in vivo*. À medida que o simulador é estendido ele se torna mais complexo exigindo assim maior poder computacional; entretanto, tal poder computacional continua em expansão e técnicas como programação paralela garantem sua melhor utilização. Desta forma, o aprimoramento do modelo – *AutoSimune* – é natural e desejável, pois permitirá que sejam realizadas análises e experimentos mais apurados e conclusivos.

References

As referências deste e dos demais artigos são disponibilizadas no capítulo 5 - referências bibliográficas - no final desta dissertação.

2.5. Artigo V: Predicting the occurrence of sepsis by *in silico* simulation

Flávio Oliveira de Sousa, Alcione Oliveira de Paiva, Luiz Alberto Santana, Fábio Ribeiro Cerqueira, Rodrigo Siqueira-Batista, Andréia Patrícia Gomes

Departamento de Medicina e Enfermagem, Universidade Federal de Viçosa (UFV) CEP 36570-000 – Viçosa – MG – Brasil 2Departamento de Informática, Universidade Federal de Viçosa (UFV) CEP 36570-000 – Viçosa – MG – Brasil{flavio7co, alcione, andreiapgomes, frcerqueira}@gmail.com, luizsantana@ufv.br, rsiqueirabatista@yahoo.com.br

Abstract. *From public health and clinical point of view, sepsis is a life-threatening complication and its mechanisms are still not fully understood. This article claims that multiagent systems are suitable to help elucidating this disease and that it is possible to carry out simulations that can be used in the observation of emergent behaviors, enabling a better understanding of the disease. We present the requirements for the computational simulation of sepsis in the AutoSimmune system well as the simulation results. Our experiments with more aggressive pathogens are compatible with characteristics of sepsis because simultaneous symptoms such as fever, bacteria in the blood and Leukocytosis are presented by our system which is in agreement with the current literature.*

Keywords. *in silico simulation; sepsis prediction; multiagent system.*

1 Introduction

From public health and clinical point of view, sepsis is a life-threatening infectious complication and its mechanisms are still not fully understood. Sepsis has great relevance in terms of public health not only because of the high incidence of

cases but also due to the high mortality rate pointed in several studies (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011). Three million people in the United States and Europe are estimated to develop severe sepsis and/or septic shock every year and about 35% to 50% come to death (GOGOS *et al.*, 2010). This is therefore a major cause of death in intensive care units (ICU), causing thousands of deaths annually worldwide.

In sepsis, systemic inflammatory response, triggered by suspected or confirmed infection syndrome, occurs the balance rupture between pro and anti-inflammatory mediators (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011)(MARTIN, 2006) (HOTCHKISS; KARL, 2003). Then, one can reach a state of intense "immunologic dissonance", called MARS (mixed antagonistic response syndrome), where it occurs SIRS (systemic inflammatory response syndrome) and CARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome) (PEREZ, 2009). This context is proposed as the core for explaining the evolution of sepsis (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011). The process of disruption of this complex balance of pro and anti-inflammatory mechanisms disorganizes homeostasis in patients suffering of sepsis(CECCON *et al.*, 2006)(SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012a).

As a consequence, researches *in vitro*, *in vivo*, and more recently *in silico* (using computational modeling) have been conducted with the aim of contributing to a better understanding of the pathophysiology of sepsis. In the case of sepsis, there are factors, such as bioethical aspects, that hinder research *in vitro* and *in vivo*. For this reason, Computational simulations have aided the understanding in pathogen/man interaction playing an important role in the expansion of knowledge and the construction of scientific hypotheses with a degree of effectiveness consistent with contemporary medical practice (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012a) (VODOVOTZ; BILLIAR, 2013) (SONG *et al.*, 2012).

According to Li *et al.* (LI *et al.*, 2009), computational models are not only cheaper than *in vivo* studies, but they are also faster and able to assist in a better understanding of bio-inspired algorithms and the use of these algorithms in improving intelligent and adaptive systems.

The objective of this paper is to present the results obtained in the simulation of Sepsis in a multi-agent system simulator termed AutoSimmune. Next, we introduce

the systemic aspects of sepsis that ensure the suitability of the use of multi-agent systems (MAS) in the simulation of this disease. Section 3 describes the general characteristics of the simulator. Section 4 presents the necessary additions to the simulator for simulating the occurrence of sepsis. Section 5 presents the simulation results. Finally, Section 6 presents the conclusions of this work.

2 Agent Oriented Computational Modeling of the Human IS

Human immune system (IS) has evolved over millions of years to develop sophisticated mechanisms for maintaining homeostasis in order to protect the organic integrity of the host in relation to microorganisms and their virulence factors (BASTOS *et al.*, 2013). Sometimes, however, imperfections in tolerance mechanisms give rise to so-called autoimmune diseases. Furthermore, inappropriate immune responses can cause tissue damage and development of diseases rather than protection (CALICH *et al.*, 2001). Knowledge of the structure, function and regulation of IS is key to understanding the pathogenesis of many diseases and the development procedures that allows its regulation (CALICH *et al.*, 2001).

In addition to the specific characteristics of IS, general systems theory, proposed by Bertalanffy (BERTALANFFY, 1973), lists some of the common characteristics of complex systems that are perfectly matched to IS. These characteristics indicate the scale of the challenge of understanding a systemic event, revealing, through a careful analysis what are the best approaches to be used. Such analyzes converge to the understanding of these systems as bottom-up systems where complex behavior emerges from the iterations of its most basic elements. Given these characteristics, agent oriented systems are perfectly matched to create systems that simulate these problems. In them, the agents that reside on a lower level on the scale start producing behavior that lies on a scale above them: ants create colonies; citizens create communities; simple pattern-recognition software learns how to recommend new books. The movement of low-level rules to higher-level sophistication is what is called *emergent behavior* (JOHNSON, 2003). However, currently there are some limitations that restrict the use of multi-agent

systems. The main one is to maintain a system capable of handling millions of agents that communicate continuously, as is the case of IS. Current research seeks to allow the use of GPU to ensure the scalability of such systems (RICHMOND; ROMANO, 2011).

3 The AutoSimmune Simulator

AutoSimmune is an immune system simulator with original focus on autoimmunity. In its basic version it simulates the bone marrow, thymus, lymph nodes, blood circulation and parenchymal tissue region. The regions are simulated as a discrete space in a form of a two-dimensional grid in which each agent has a position (i,j) . More than one agent can occupy the same position, which somehow simulates a 3D space. The movement of the agent is done by changing its position to a new position in the *Moore neighborhood*². Thus, an agent cannot “jump” positions, i.e., it needs to move one position at a time. In such a structure in the form of two-dimensional grid, the *Moore neighborhood* (of radius one) comprises the eight neighboring position to a central position. If allowed in their specification, an agent can move from one region to another by means of special elements called portals, as proposed in (FOLCIK *et al.*, 2007). The simulation of substances such as cytokines are performed by means of layers of data provided by the framework *repass*, called *ValueLayer*. Substances, as they are released by cells, undergo a process of diffusion, spreading in the surroundings of the site in which they were released, decreasing its concentration, and also undergo a process of decay, decreasing its amount with time (POSSI *et al.*, 2012). *ValueLayer* is an abstract layer of data that, at the time of its creation, is associated with a region of the grid. Combination of multiple layers of data at the same grid is possible. Thus, an agent can know the concentration of a given substance at that time instant at position (i,j) .

Passage of time is modeled using the concept of discrete time unit called *tick* provided by the framework. Each agent defines when to start to be called and the interval of each call. *Ticks* are the time intervals necessary for the transition from a state of the environment to the next. Therefore, all events scheduled to be executed

² <http://mathworld.wolfram.com/MooreNeighborhood.html>

must be completed before the next round occurs. Thus, during a *tick*, all agents scheduled for the given time will change their positions, release substance and analyze its neighborhood, based on information from the previous *tick*. Only when every agent has made its actions the *tick* ends and the information is updated (POSSI *et al.*, 2012).

In the simulator, the affinity (which is the recognition strength of an antigen by a receptor) is simulated by the number of matching bits between two bit sequences: one belonging to a cell receptor and another belonging to the antigen. The greater the length of the matching, the greater the affinity. For the calculation of the affinity we used the method suggested by (DARIO; MATTIUSI, 2008), called the “length of the longest common subsequence”, whose goal is to compute, given two patterns of bit sequences A and B, the size of the largest contiguous subsequence of bits that are contained in A and B simultaneously, in the same order.

AutoSimmune have been successfully used to simulate various biological phenomena related to the human immune system, such as the development of autoimmunity (POSSI *et al.*, 2012); verifying the role of mast cells in infections (DA SILVA *et al.*, 2012) and to study the immune response in the post-infectious glomerulonephritis (GnPE) by *Streptococcus pyogenes* (BASTOS *et al.*, 2013)

4 Simulation of Sepsis

Given the granularity of the simulator, we focused our modeling at the cellular level by adding the necessary elements for the simulation of sepsis. For this, it is necessary to identify and model the main cells and mechanisms that play a predominant role in the simulation of sepsis. They are bacteria, neutrophil, macrophage and their interactions, including interactions outside the Tissue zone, such as blood circulation. These elements worked as important markers of diagnosis in cases of sepsis. Moreover it was necessary to insert the Neutrophil agent and to adapt the Macrophage agent to simulate the behaviour related with pro inflammatory substances (denoting IL1, IL2 and TNF-a), and anti-inflammatory. The Bacterium

agent was also modified to respond to anti and pro-inflammatory mechanisms and provide indicators of sepsis compatible with literature.

4.1 The computational model of neutrophil

Neutrophils are the most numerous cells contained in blood, distinguished morphologically by a nucleus segmented into three to five connected lobules and by abundant granules present in their cytoplasm (ABBAS *et al.*, 2008). Such cells have an increase in bacterial infectious processes, when the production and release by the bone marrow are increased, and are markers of occurrence of such infections, being fundamental to understand their roles and interactions with microorganisms, in order to unravel the complex mosaic of illness by such etiologies (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2014). Neutrophils are represented in the simulator by the agent Neutrophil. The implementation of the agent seeks to reflect aspects of the immune response in the occurrence of diseases such as sepsis. These agents are inserted in the *BoneMarrow* zone and migrate to *Circulation* zone where they circulate randomly or move according to the gradient of concentration of the substance PK1 when they change to the tecdual state, simulating in this way, the chemotaxis of these cells. When Neutrophil agent find and identify a *Bacterium* agent, it phagocytes the latter and then die due to the microorganism destruction process. It can phagocyte more than one bacterium before its own cell death. If the life span expires the agent is eliminated. The states of Neutrophil agent are illustrated in Figure 1 and was presented in a previous article (SOUSA *et al.*, 2013).

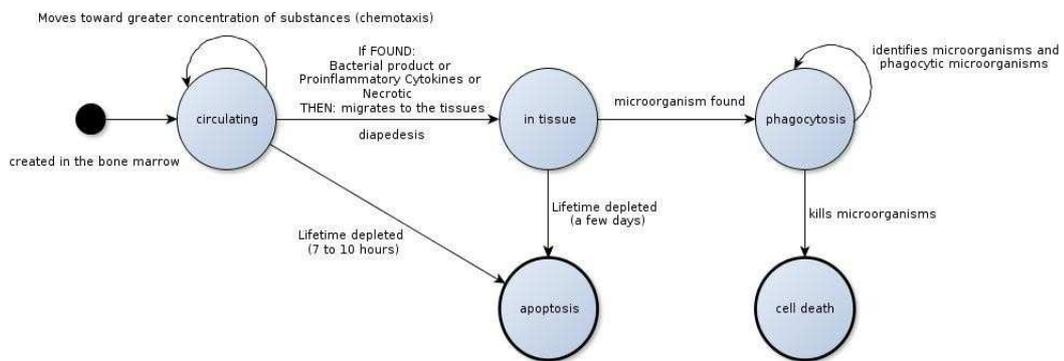


Fig. 1 State diagram of the Neutrophil agent (SOUSA *et al.*, 2013).

When its lifetime expires, the Neutrophil agent changes its State to apoptosis. Upon finding microorganisms or inflammatory substances it goes into proinflammatory state, performing its function of phagocytosis and elimination of bacteria.

4.2 The computational model of macrophage

Macrophages are cells originating from blood monocytes migrating from the circulation into the tissues and from proliferation of precursor on site. They are responsible for phagocytosis of tumor cells opsonized by antibodies, bacteria, and other microorganisms. They produce mediators such as prostaglandins, leukotrienes, platelet activating factor, interleukin 1, 6 and 12, attracting other cells and triggering the immune response. They also participate in regulatory events as well as the interaction of the innate immune response with acquired immunity (JANTSCH *et al.*, 2014). Figure 2 shows a state machine describing the behavior of the agent representing the macrophage. The implemented behavior sought to simulate the immune response in the occurrence of diseases such as sepsis. It is based on Macrophage agent defined by Folcik (FOLCIK *et al.*, 2007) and is created by *TissuePortal* class when it detects the presence of MK1 and are inserted in the *Tissue* zone. Thus, is represented the attraction of macrophages to the site of infection. Upon entering the *Tissue* zone, the agent follows the substance of cellular

stress signaling PK1 to find the site of infection and the presence of the NECROSIS substance. When this occurs the agent switches to the proinflammatory state since it found evidence that the cells are actually being damaged. Once in this state, it begins to produce pro-inflammatory cytokine MK1, simulating the function of macrophages in initiating the inflammatory process by recruiting other elements of immunity.

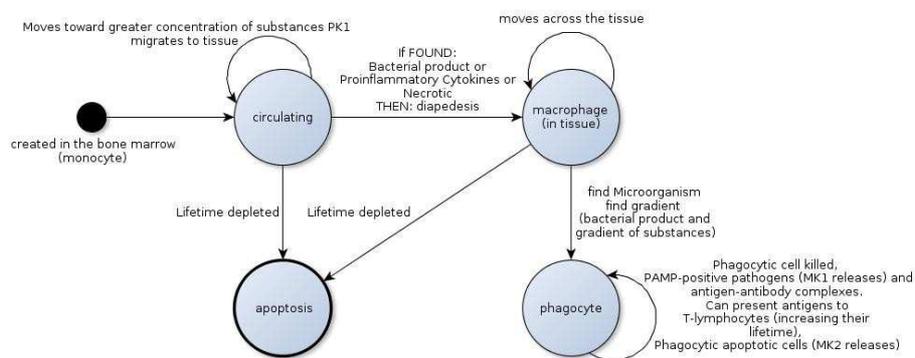


Fig. 2. State diagram of the macrophage agent.

When it is in a proinflammatory state, macrophage can also phagocytose dead cells, PAMP-positive pathogens, and antigen-antibody complexes, i.e., antibodies bound to any antigen marking them for phagocytosis. When the macrophage phagocytoses any element, it renders it, extracting its antigens and presenting it to the main histocompatibility complex class II (MHC II). At that point, it goes to the activated state.

When they encounter T lymphocytes that recognize the antigen that it is presenting, the macrophage receives survival factors (increasing its activated life time) and also provides survival factors for the lymphocyte that recognized it. Macrophage have a limited lifespan in both pro-inflammatory state and in the activated state. If it does not get surviving factors to extend that time, it undergoes a process of programmed cell death, apoptosis, and is eliminated from the simulation.

Macrophage anti-inflammatory states were not modelled, because the model is based only on the hypothesis that the decline in immune response happens due to

the absence of antigen stimulation. On the other hand, there are other studies cited in the model described by Folcik (FOLCIK *et al.*, 2007), pointing to the existence of suppressor T cells or regulatory, which would be responsible for the decline and suppression of the immune response.

4.3 The computational model of bacteria

The *Bacterium* agent simulates a generic bacterium and is inserted in the *Tissue* zone where it randomly moves until be found by an agent that it can connect with. Following recognition and connection, if the agent represents a cell that has the target pattern (cell tissue) and if the cell is no longer infected, then the bacterium attaches to the cell and multiplies. When the multiplication process occurs, the cell is lysed. If the bacterium could not recognize the agent as a target or if the cell is already infected, the bacterium agent starts again to move randomly in the tissue. If the lifetime of the bacterium runs out it is eliminated. *Bacterium* can also bump into a portal and, in this case, may fall into the bloodstream. In the circulation *Bacterium* do not multiply, however, they can return to tissue through a portal. Figure 3 displays the state machine of the *Bacterium* agent.

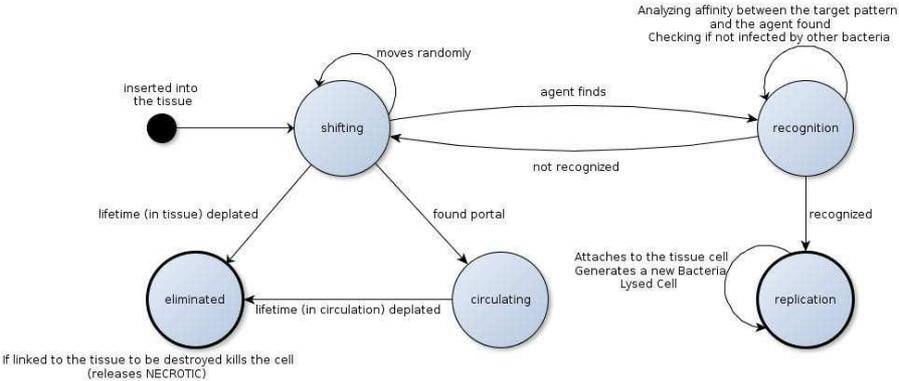


Fig. 3. State diagram of the Bacterium agent.

5 Related Works

Some works can be found on *in silico* studies of sepsis (VODOVOTZ; BILLIAR, 2013). They bring a general review of the subject and the computational tools available, such analyzes (e.g. proteomics) made by computer and the use of data mining on datasets collected in hospitals.

In (WU *et al.*, 2013) was proposed an agent-based simulation model combined with systemic dynamic mathematical model to execute a simulation of the initial stage of a typical sepsis episode, often leading to severe sepsis or septic shocks. Based on the computational studies, the simulated behavior of the agent-based model conforms to the mechanisms described by the system dynamics mathematical models established in previous research. They used the NetLogo framework for the model implementation. They used a generic agent such as phagocyte and pathogen as well as mediator substances modeled as agents. Our approach uses more specific agents and does not model substances as agents.

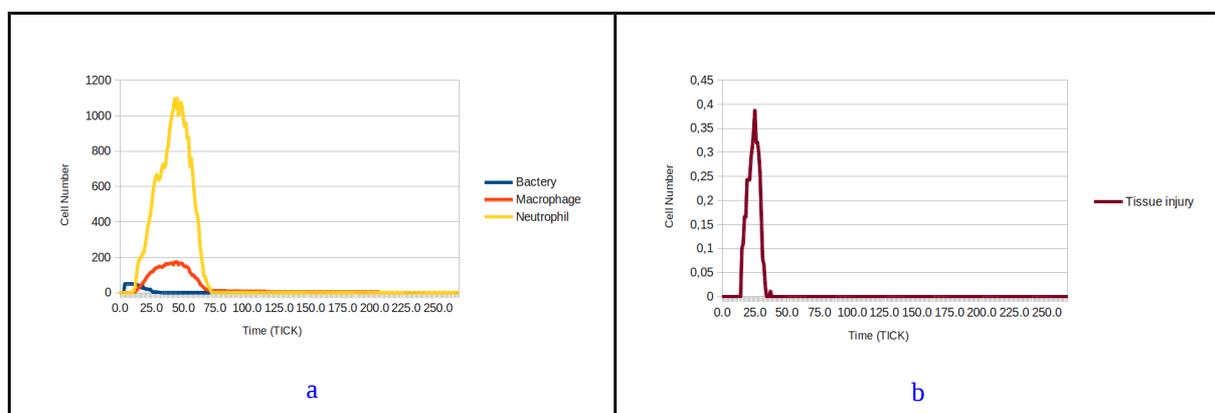
The article (SHI *et al.*, 2014) made a comparison between two models: a system dynamics mathematical model (SDMM) and a multiagent based model (MABM), which model and simulate the human's innate immune responses of sepsis. When comparing the results of the two models, the paper concludes that the models based on multiagent systems are the most realistic approaches to simulate the progression of sepsis. The results between the MAS and mathematical models differ because of the stochastic nature of the immune response. SMA model sought to maintain the same characteristics of the hypothetical scenarios of acute response at the interface between the blood vessels and cells within tissues. Our work uses the MAS approach and the interactions among cells of immune system and the pathogen, mediated by pro and anti-inflammatory substances, in order to elucidate through computer simulations some of the complex mechanisms of sepsis. Although our simulation involves a larger number of immune cells and use slightly different mechanisms for simulating zones (e.g. tissue and circulation), we do not use the same level of detail of mediator as in (SHI *et al.*, 2014). Instead, we include generic pro-and anti-inflammatory substances because we believe that the work of

subdividing such substances and describing their role in the system must be done in a more complete and thorough manner to represent the actual role of each of the mediators individually. Nevertheless, both studies are in accordance with the presented results, to understand the effect of these mediators plays an important role in the regulatory mechanisms.

6 Results

The diagnosis is not trivial. According to (LEVY *et al.*, 2003), "The group concluded that few, if any, patients in the early stages of the inflammatory response to sepsis infection is diagnosed by four arbitrary criteria." Instead, one needs to identify a myriad of symptoms. Nevertheless, some diagnostic parameters were given by (LEVY *et al.*, 2003), (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011) and these were used to validate the simulation results. Given the capacity of the simulator and modeled mechanisms, simulations were carried out that generated the charts contained in this section. Such charts relate to the presence of macrophages and neutrophils in the circulation (indicating the presence or absence of leukocytosis), bacteria in the circulation and bacteria in the tissue and tissue damage.

Due to the stochastic characteristic of the simulator, making the emergence of results on the interactions between cells unpredictable, several tests were performed by changing parameters such as virulence, latency and inoculum. Further tests with identical between replicates to confirm the repetition of emergent behavior parameters were performed.



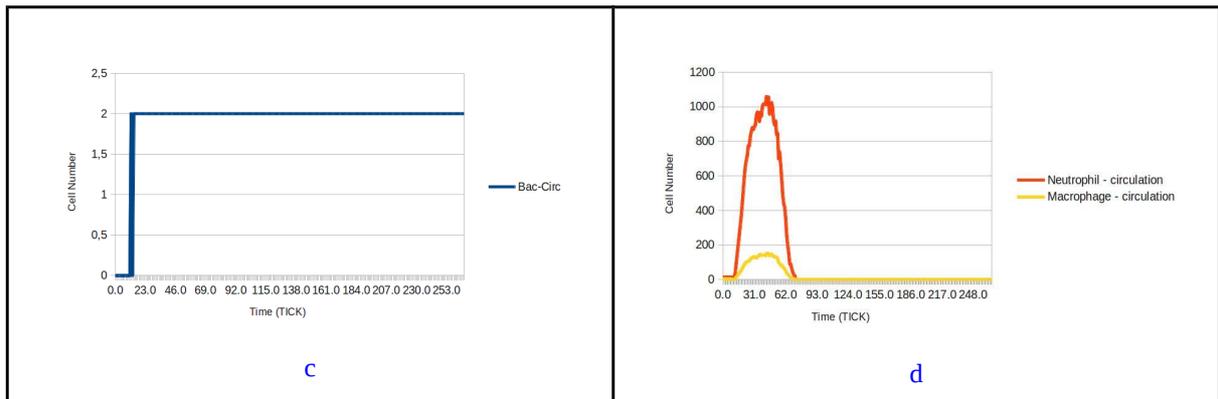


Fig. 4. Control test (default parameters).

Although individual results of the interactions between cells and the response time of the system may vary between tests, tests with identical parameters reproduced the same pattern of macroscopic behavior. The tests were performed by varying parameters *virulency*, *latency* and variation of the *inoculum*. The graphics represent respectively the increase in the number of agents Neutrophil and Macrophage in the Tissue zone, the percentage of tissue damage, the number of agents of type *Bacterium*, *Neutrophil* and *Macrophage* in the *Circulation* zone.

The plots in Figure 4 represent the results with the default parameters of the system. In this case, 50 *Bacterium* agents have been inserted with less virulence and greater latency. As a result, the system triggered a sequence of cellular interactions that led to the results shown in Figure 4.

These results serve as a control test demonstrating how IS's reaction occurs when it can respond appropriately to the pathogen. We have a maximum increase of about 180 *macrophages* and *neutrophils* around 1100. This increase sets back to the default state of the system as soon as the threat (*bacterium*) is controlled. The tissue injury does not reach 0.4% and the system recovers quickly. The number of *bacterium* in the blood is small and in some of the tests they do not migrate to the blood (this occurs randomly).

The plots in Figure 5 feature an intermediate case. 250 *Bacterium* agents have been inserted with intermediate levels of *virulency* and *latency*. In cases like this, often the interactions produce results that culminate in the complete elimination of

Bacterium agents although with greater levels of increase of *neutrophils* and *macrophages* and tissue injury. The graphics feature (considering that the tests were repeated exhaustively) the case in which occurs the recrudescence of the *bacterium* from the *circulation* to the *tissue*. This behavior renders the previous result cycle where Bacterium agents are fought and the system returns to the initial state. If the system is infected again it can fight the infection efficiently.

These results demonstrate a more intense reaction of the immune system to infection. It can respond to the pathogen, but we have a four times greater increase of *neutrophils* and *macrophages*. This increase sets back to the default state of the system as soon as the threat (*bacterium*) is overlooked and regrows in recrudescence. The tissue damage reaches more than 1%, which can represent a small increase in temperature. The number of bacteria in the blood is much bigger than in the previous test which favors the recrudescence and the repetition of the cycle.

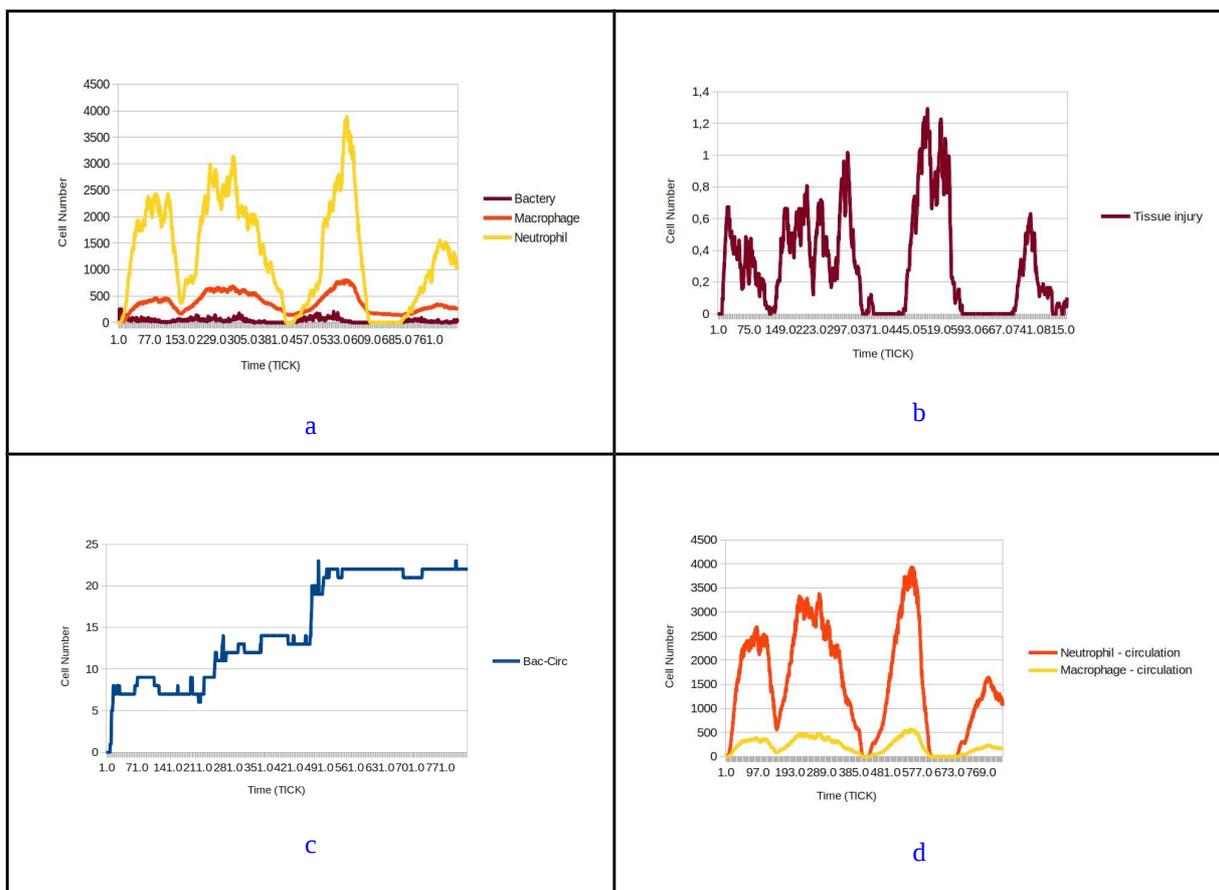


Fig. 5 Intermediate case tests.

The plots in Figure 6 presents the worst case. 500 *Bacterium* agents have been inserted with low *latency* and high *virulency* (Gram positive bacteria are more aggressive and is expected to generate a larger immune response, which can lead to sepsis). The system triggered a sequence of cellular interactions that led to the results that can be seen in Figure 6.

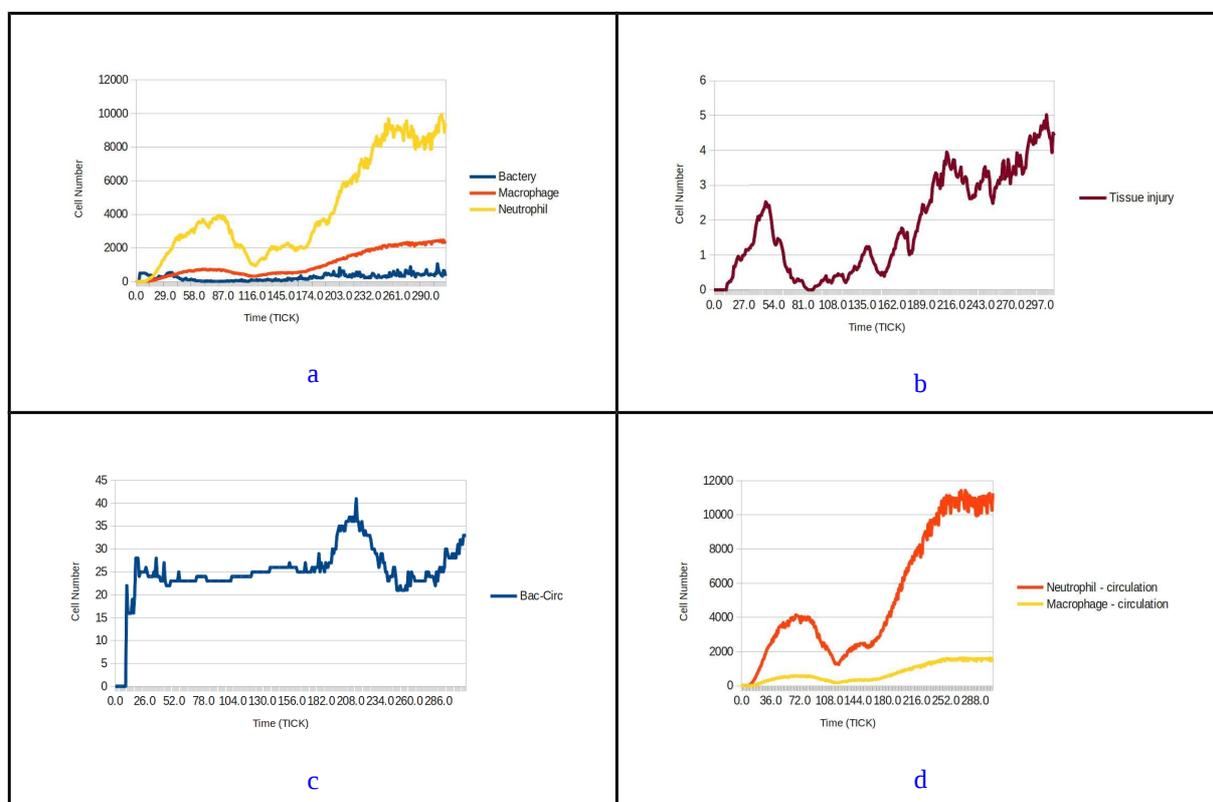


Fig. 6 Critical case tests.

These results demonstrate a critically serious reaction from the system, which is unable to respond to infection in an appropriate manner. It cannot fight the pathological agent efficiently. The increase of *neutrophils* and *macrophages* does not cease or at most stabilizes. This increase does not retreat, generating high levels of phagocytic cells (*macrophages* and *neutrophils*). *Tissue damage* reaches more than 5%, representing an increase of temperature. The number of bacteria in the blood is

large which favors the recrudescence and the repetition of the cycle and along with other indicative highlights the simulation of occurrence of sepsis.

The results presented when using more virulent pathogens are compatible with sepsis by presenting simultaneously variations such as fever, bacteria in the blood and leukocytosis as confirms the literature (LEVY *et al.*, 2003), (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011). Among variations between virulence and latency parameters, the latter was more relevant for triggering a more aggressive immune response probably due to the fact that it triggers mediators faster and with greater frequency, in addition to cause tissue injury in short time, contributing to the symptoms of the disease.

7 Conclusion

Computational investigation of the immune system may lead to new hypotheses as well as conducting preliminary tests before using in vitro and in vivo experiments, contributing to the development of knowledge about the pathophysiology of human diseases. It also allows the deepening of the studies in the area of immunology and the improvement of the model – AutoSimmune – in computational terms.

Extend the model to simulate situations of sepsis is a complex challenge due to the systemic aspect of the disease. However, as our computational procedure is extended to deal with other diseases, including the expansion of cells involved in infectious processes and the expansion of mechanisms as mediator substances, it will allow the model to approach more and more of what happens in the human immune system. Research on the cell T-reg (T CD4+CD25+), for example, is being held in parallel because there is evidence that such a cell can have a decisive role in sepsis, considering that it has a strong role in regulating the human immune system. Therefore, the agent T-reg can also be included in the template, which adds one more test variable to the elucidation of the mechanisms involved in the disease.

References

As referências deste e dos demais artigos são disponibilizadas no capítulo 5 - referências bibliográficas - no final desta dissertação.

3. CONCLUSÕES

A sepse é um desequilíbrio do sistema imunológico e representa grande preocupação no contexto da saúde (ANGUS *et al.*, 2001). A investigação computacional da sepse e do sistema imunológico, auxilia na aquisição de novos conhecimentos e pontos de vista sobre a fisiopatologia das doenças humanas além de permitir a elaboração de novas hipóteses.

Tais estudos *in silico* são cada vez mais utilizados por serem mais baratos e mais rápidos do que os estudos *in vitro* e *in vivo*. Eles também não possuem restrições éticas como as que envolvem os estudos *in vivo*. Tais testes se potencializam ainda mais quando associados a outras análises como a investigação transcriptômica e proteômica.

Os SMA se mostraram adequados para enfrentar o desafio de lidar com a complexidade do sistema imune, especialmente quando se trata do aspecto sistêmico da enfermidade. Outros autores identificaram o potencial dos SMA ao comparar seus resultados com outros modelos como os matemáticos (SHI *et al.*, 2014).

Destaca-se também que os resultados do presente trabalho não é apenas representativo sobre o ponto de vista do simulador desenvolvido. Os modelos resultantes dos estudos e revisões bibliográficas representam uma importante compilação de conhecimentos elucidando através das máquinas de estados o comportamento dessas estruturas biológicas.

Quanto aos objetivos propostos pelo presente trabalho ressalta-se que: com relação às análises realizadas tendo como base a variação da quantidade de patógeno, da virulência e da latência obtivemos resultados compatíveis com a literatura. Destaca-se o grande aumento de fagócitos – neutrófilos e macrófagos -, a febre (através da abstração representada pela lesão tecidual fundamentada pelo estudo de Mackowiak (MACKOWIAK, 2010) e presença de bactérias na circulação (possibilitando a recrudescência). Ressalta-se também a continuidade da resposta imunológica, mesmo desaparecendo o estímulo inicial. Das três variáveis a latência

se mostrou a mais importante, talvez por desencadear mais rapidamente a resposta imunológica destacando ainda mais o importante papel das substâncias mediadoras da resposta imune. Assim um próximo passo da pesquisa seria a divisão dos agentes que representam o conjunto de substâncias pró e anti-inflamatórias nas diversas substâncias que medeiam a resposta imune.

Incorporar no simulador as várias linhas de pesquisa envolvendo as células e patógenos do sistema imune como é o caso do Treg (que também desempenha importante papel na regulação do sistema imune) constitui outro importante desafio devido a necessidade de um grande poder computacional (estudos de utilização de *clusters* já vem sendo feitos). Na medida que o modelo vem sendo estendido ele se aproxima cada vez mais do que acontece no sistema imunológico humano.

Ainda assim vale lembrar que o simulador não substitui os demais estudos, sendo ferramenta auxiliar na pesquisa do sistema imune e suas enfermidades. Entretanto constitui um importante gerador de hipóteses proporcionando análises mais baratas e rápidas.

4. REFERÊNCIAS

- ABAXT, L.A.; GARZA-MAYERS A.C.; GOLDBERG M.B. Bacterial subversion of host innate immune pathways. *Revista Science*, v. 340, n.6133, p.697-701, 10 mai. 2013.
- ABBAS, A.K.; LINCHTMAN, A.H. *Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imune*. Revinter, 2003.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 3.ed. São Paulo: Elsevier, 2008.
- ANGUS, Derek C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine*, v. 29, n. 7, p. 1303-1310, 2001.
- AZIZ, Monowar et al. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. *Journal of leukocyte biology*, v. 93, n. 3, p. 329-342, 2013.
- BASTOS, C. A. Simulação computacional do SI através de sistemas multiagentes: um estudo da resposta imune e da terapêutica antimicrobiana na glomerulonefrite pós-infecciosa (GNPE) por *Streptococcus pyogenes*. [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-graduação em Ciência da Computação. Universidade Federal de Viçosa, 2012.
- BASTOS, C. A. et al. Simulação do sistema imunológico por meio de sistemas multiagentes: um estudo da resposta imune na glomerulonefrite pós-infecciosa (GnPE) por *Streptococcus pyogenes*. In: WIM 2013 - XIII Workshop de Informática Médica - XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Computação, 2013, Maceió.
- BENOIST C.; MATHIS D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for t cell epitope mimicry? *Nature Immunology* 2001; 2(9):797-801.
- BERTALANFFY, L. V. *Teoria geral dos sistemas; tradução de Francisco M. Guimarães*. Petrópolis, Vozes. 1973.
- BISWAS, S. K.; CHITTEZHATH, M.; SHALOVA, I. N.; LIM, J. Y. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunology Research*, v. 53, n. 1-3, p. 11-24, 2012.
- BRASIL, L. A.; GOMES, W. J.; SALOMÃO, R.; FONSECA, J. H. P.; BRANCO, J. N. R.; BUFFOLO, E. Uso de corticóide como inibidor da resposta inflamatória sistêmica induzida pela circulação extracorpórea. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, v. 14, n. 3, p. 254-68. 1999.
- BRATTON, D.L.; HENSON P.M. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Revista Trends in Immunology*, v.32, n.8, p.350-357, ago. 2011.
- BUCHALLA, C. M.; WALDMAN, E. A.; LAURENTI, R. A mortalidade por doenças infecciosas no início e no final do século XX no Município de São Paulo. *Revista*

- Brasileira de Epidemiologia, v.6, n.4, p.335-344, dez. 2003.
- CALICH, V. L. G.; VAZ, C. A. C.; ABRAHAMSOHN, I. D. A.; BARBUTO, J. A. M.; ISAAC, L.; RIZZO, L. V.; ... & JANCAR, S. *Imunologia*. Revinter. 2001
- CARVALHO, P.R.A.; TROTTA E. A. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse, Rio de Janeiro: *J Pediatr*, 79(Supl. 2):S195-S204. 2003
- CASTILLO, A. A.; OCEGUERA, D. C.; HERNÁNDEZ, V.H.; DÍAZ, F.S. Síndrome de activación macrofágica: simulación de uma sepsis generalizada. *Revista Cubana de Pediatría*, v. 81, n. 4, p. 76-85. 2009.
- CECCON, M. E. J.. VAZ, F. A.; DINIZ, E. M.; OKAY, T. S. Interleucina interleucina 6 e proteína c reativa no diagnóstico diagnóstico diagnóstico de sepse tardia no recém-nascido. *Rev Assoc Med Bras*, 52(2), 79-85. 2006.
- CRISS, A.K.; SEIFERT, H.S. A bacterial siren song: intimate interactions between *Neisseria* and neutrophils. *Revista Nature Reviews Microbiology*, v.10, n.3, p.178-190, jan. 2012.
- CRUVINEL, W.M.; MESQUITA-JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; DE SOUZA, A.W.S.; DA SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Sistema imunitário parte I – Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.50, n.4, p.434-461. 2010.
- DA SILVA, C. C.; DE PAIVA OLIVEIRA, A.; DE ARAÚJO POSSI, M.; CERQUEIRA, F. R.; GOMES, A. P.; SANTANA, L. A.; & SIQUEIRA-BATISTA, R. Immune system simulation: Modeling the mast cell. In *Bioinformatics and Biomedicine (BIBM)*, 2012 IEEE International Conference on (pp. 1-4). IEEE. 2012.
- DARIO, Floreano; MATTIUSI, Cláudio. *Bio-inspired artificial intelligence: theories, methods, and technologies*. MIT press, 2008.
- DE TOLEDO, K.A. Da ativação de neutrófilos pela lectina MNCF decorrem transcrição gênica e secreção de mediadores sustentadas em ambiente anti-inflamatório. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP. 2007
- DROGOUL, A.; FERBER, J. Multi-agent simulation as a tool for modeling societies: Application to social differentiation in ant colonies. In: CASTELFRANCHI, C.; WERNER, E. (Ed.). *MAAMAW*. [S.l.]: Springer, 1992. (Lecture Notes in Computer Science), p. 3–23.
- ELLABAN, E.; BOLGOS, G. REMICK, D. Selective macrophage suppression during sepsis. *Cellular Immunology*, v. 231. p. 103-111. 2004.
- FERRAZ, E.G; SILVEIRA, B.B.B.; SARMENTO, V.A.; SANTOS, J.N. Receptores toll-like: ativação e regulação da resposta imune. *Revista Gaúcha de Odontologia*, v.59, n.3, p. 484-490. 2011.
- FOLCIK, V.A.; AN, G.C.; OROSZ, C.G. The basic immune simulator: an agent-based model to study the interactions between innate and adaptive immunity. *Revista Theoretical Biology and Medical Modelling*, v. 4, p. 39, set. 2007.

- GARCIA, V.S.G. Efeitos de flavonoides na captação de HOCl produzido por neutrófilos ativados e modulação do fator de transcrição NF-kB em células THP-1 – análise da relação estrutura-atividade. 2010. 214 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.
- GAUT, J.P.; YEH, G.C.; TRAN, H.D.; BYUN, J.; HENDERSON, J.P.; RICHTER, G.M.; BRENNAN, M.L.; LUSIS, A.J.; BELAAOUAJ, A.; HOTCHKISS, R.S.; HEINECKE, J.W. Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.98, n.21, p.11961-11966, oct. 2001.
- GOGOS, C.; KOTSAKI, A.; PELEKANOU, A.; GIANNIKOPOULOS, G.; VAKI, I.; MARAVITSA, P., ... & SKOURAS, V. Early alterations of the innate and adaptive immune statuses in sepsis according to the type of underlying infection. *Critical Care*, 14(3), 1-12. 2010
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews. Immunology*, v. 3, n. 1, p. 23-35, jan. 2003.
- GREER, J.P.; FOERSTER, J.; RODGERS, G.M.; PARASKEVAS, F.; GLADER, B.; ARBER, D.A.; MEANS-JUNIOR, R.T. *Wintrobe's clinical hematology*. 12. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
- HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New England Journal of Medicine*, 348(2), 138-150. 2003.
- HOTCHKISS, R. S.; STRASSER, A; MCDUNN, J.E.; SWANSON, P.E. Cell death. *New England Journal of Medicine*, n.361, p. 1570-1583. 2009.
- HÜBNER, J.F.; BORDINI, R.H.; VIEIRA, R. Introdução ao desenvolvimento de sistemas multiagentes com Jason. [S.l.], 2004. Disponível em:<<http://www.das.ufsc.br/~jomi/pubs/2004/Hubner-eriPR2004.pdf>>. Acesso em: 20/12/2011.
- JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5ª edição. ed. New York: Garland Science, 2001.
- JANTSCH, J.; BINGER, K. J.; MÜLLER, D. N.; TITZE, J. Macrophages in homeostatic immune function. *Frontiers in physiology*, 5. 2014
- JOHNSON, S. *Emergência: a dinâmica de rede em formigas, cérebros, cidades e softwares*. Zahar. 2003.
- LEVY, M. M.; FINK, M. P.; MARSHALL, J. C.; ABRAHAM, E.; ANGUS, D.; COOK, D.; ... & RAMSAY, G. 2001 sccm/esicm/accp/ats/sis international sepsis definitions conference. *Intensive care medicine*, 29(4), 530-538. 2003.
- LI, X; WANG, Z; LU, T; CHE, X. Modelling immune system: Principles, models, analysis and perspectives. *Journal of Bionic Engineering*; 6(1):77-85. 2009.
- LIU, Y. C.; ZOU, X. B.; CHAI, Y. F.; YAO, Y. M. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Science*, v. 10, n. 5, p. 520-529, 2014.

- LUNA, E. J. A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.5, n.3, p.229-243, Dez. 2002.
- MACKOWIAK, P. A. Temperature regulation and the pathogenesis of fever. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Mandell, Douglas e Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone / Elsevier, 2010. p. 765-778.
- MARTIN, G. Epidemiology studies in critical care. *Critical Care*, 10(2), 136. 2006.
- MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 577–591. 2003.
- NORDENFELT, P.; TAPPER, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, v.90, n.2, p.271-284, ago. 2011.
- NORTH, M. J.; HOWE, T. R.; COLLIER, N. T.; VOS, J. R. The repast symphony development environment. In: *Proceedings of the Agent 2005 Conference on Generative Social Processes, Models, and Mechanisms*. [S.l.: s.n.]. 2005.
- OLIVEIRA, A.P.; POSSI, M.; GOMES, A.P.; SOUSA, F.O.; CERQUEIRA, F.R.; MIYADAHIRA, R.; SIQUEIRA-BATISTA R. Modelagem computacional do sistema imunológico para investigação da sepse. In: *IX Fórum Internacional de Sepse, 2012, São Paulo. Anais do IX Fórum Internacional de Sepse. São Paulo : Latin American Sepsis Study, 2012.*
- PEREZ, M. C. A. *Epidemiologia, diagnóstico, marcadores de imunocompetência e prognóstico da sepse*. Rio de Janeiro: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2009.
- PINCHUK, George. *Schaum's Outline of Immunology*. McGraw Hill Professional, 2001.
- POSSI, M.A.; OLIVEIRA, A.P.; DI IORIO, V.O.; DIAS, C.M.G.C. A agent-based simulation tool of biological immune system: a case study of autoimmune diseases. In: *Brazilian Symposium on Bioinformatics. Búzios, Brazil: [s.n.], 2010.*
- POSSI, M. A.; OLIVEIRA, A. P.; CHAVES, C. M. G.; CERQUEIRA, F. R. ARROYO, J. E. C. An in-silico immune system model for investigating human autoimmune diseases. In: *XXXVII Conferencia Latinoamericana de Informática (XXXVII CLEI). Quito, Equador: [s.n.], 2011.*
- POSSI, M. A. Uma ferramenta para simulação do SI através de sistemas multiagentes: um caso de estudo da autoimunidade. 106 f. *Dissertação (Mestrado) - Departamento de Informática, Universidade Federal de Viçosa. 2012.*
- RAPIN, N.; LUND, O.; BERNASCHI, M.; CASTIGLIONE, F. Computational immunology meets bioinformatics: The use of prediction tools for molecular binding in the simulation of the immune system. *PLoS ONE*, v. 5, n. 4, abr. 2010.
- REGO, S.; PALÁCIOS, M.; SIQUEIRA-BATISTA R. *Bioética para profissionais da saúde*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2009.

- RICHMOND, Paul; ROMANO, Daniela. Template driven agent based modelling and simulation with CUDA, GPU Computing Gems Emerald Edition, Wen-mei Hwu (Editor), Morgan Kaufmann, January 2011, ISBN: 978-0-12-384988-5, pages 313-324. 2011.
- RIGBY, K.M.; DELEO, F.R. Neutrophils in innate host defense against Staphylococcus aureus infections. Seminars of Immunopathology, v.34, n.2, p. 237-259, mar. 2012.
- SHI, Z.; WU, J.; BEN-ARIEH, D. A. Modeling Comparative Study on Sepsis. Proceedings of the 2014 Industrial and Systems Engineering Research Conference Y. Guan and H. Liao, eds.
- SILVA, C. C.; OLIVEIRA, A. P.; POSSI, M. A.; CERQUEIRA, F. R.; GOMES, A. P.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Simulação in-silico do Sistema Imunológico: Modelando o comportamento do Mastócito. In: XII Workshop de Informática Médica (CSBC 2012 -WIM). 2012.
- SIQUEIRA-BATISTA, R.; GELLER, M.; GOMES, A.P.; ESPERIDIÃO-ANTONIO, V.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. O sistema imunológico: atualidades e perspectivas para a prática clínica. J Bras Med; 95:28-34. 2008.
- SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A.P.; ALBUQUERQUE, V.S. et al. Ensino de imunologia na educação médica: lições de Akira Kurosawa. Rev Bras Educ Med;33:186-190. 2009.
- SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; CALIXTO-LIMA, L.; VITORINO, R. R.; ALVAREZ-PEREZ, M. C.; MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; GELLER, M. Sepsis: atualidades e perspectivas. Revista Brasileira de Terapia Intensiva, v. 23, n. 2, p. 207-216, 2011.
- SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; AZEVEDO, S. F. M.; VITORINO, R. R.; MENDONÇA, E. G.; SOUSA, F. O.; OLIVEIRA, A. P.; CERQUEIRA, F. R.; PAULA, S. O.; OLIVEIRA, M. G. A. Linfócitos T CD4+ CD25+ e a regulação do sistema imunológico: perspectivas para o entendimento fisiopatológico da sepse. Revista Brasileira de Terapia Intensiva, v.24, n.3, p. 294-301. 2012a.
- SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; POSSI, M.; OLIVEIRA, A. P.; SOUSA, F. O.; SILVA, C. C.; ROQUE-RINCO, U. G.; SANTANA, L. A.; CERQUEIRA, F. R.; FERREIRA, R. S.; MENDONÇA, E. G.; GELLER, M.; OLIVEIRA, M. G. A. Computational modeling of sepsis: perspectives for *in silico* investigation of antimicrobial therapy. In: ICAR 2012 - II International Conference on Antimicrobial Research, 2012, Lisbon. ICAR 2012 - Book of Abstracts, v. 1. p. 368-368. 2012b.
- SIQUEIRA-BATISTA, R. ; SOUSA, F. O. ; GOMES, A. P. ; OLIVEIRA, A. P. ; OLIVEIRA, I. S. ; FARAGO, W. C. ; BASTOS, C. A. ; POSSI, M. ; SANTANA, L. A. ; CERQUEIRA, F. R. The artificial neutrophil and a proposal of an *in silico* research of the immune response in human bacterial diseases. Abakós, v. 2, p. 79-91, 2014.
- SONG, S. O.; HOGG, J.; PENG, Z. Y.; PARKER, R.; KELLUM, J. A.; CLERMONT, G. Ensemble models of neutrophil trafficking in severe sepsis. PLoS computational

- biology, 8(3), e1002422. 2012.
- SOUSA, F. O. et al. Imunologia da sepse: investigação por meio de simulação computacional com sistemas multiagentes. In: WIM 2013 - XIII Workshop de Informática Médica. Anais do XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Computação, 1123-1126. 2013
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- VAZ, N.M.; FARIA, A.M.C. Guia incompleto de imunobiologia: imunologia como se o organismo importasse, 1a Ed, Belo Horizonte, Coopmed, 1993.
- VENKATARAMAN, R.; KELLUM, J. A. Sepsis: update in the management. Adv Chronic Kidney Dis, v. 20, n. 1, p. 6-1. 2013.
- VODOVOTZ, Y.; BILLIAR, T. R. *In silico* modeling: methods and applications to trauma and sepsis. Critical care medicine, 41(8), 2008-2014. 2013.
- VON GUNTEN, S.; SIMON, H. U. Autophagic-like cell death in neutrophils induced by autoantibodies. Autophagy, n.3, p.67-68. 2007. [PubMed: 17102587] 25.
- WU, John; DAVID, Ben-Arieh; ZHENZHEN, Shi. "An Autonomous Multi—Agent Simulation Model for Acute Inflammatory Response." Investigations Into Living Systems, Artificial Life, and Real-world Solutions: 218. 2013.