

CARLOS ANTONIO BASTOS

**SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DO SISTEMA
IMUNOLÓGICO ATRAVÉS DE SISTEMAS MULTIAGENTES:
UM ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE E DA TERAPÊUTICA
ANTIMICROBIANA NA GLOMERULONEFRITE PÓS-
INFECCIOSA (GNPE) POR *Streptococcus pyogenes***

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
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B327s
2013

Bastos, Carlos Antonio, 1971-

Simulação computacional do sistema imunológico através de sistemas multiagentes: um estudo da resposta imune e da terapêutica antimicrobiana na glomerulonefrite pós-infecciosa (GNPE) por *Streptococcus pyogenes* / Carlos Antonio Bastos. – Viçosa, MG, 2013.

xiii, 105f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Alcione de Paiva Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 101-105

1. Agentes inteligentes (Software) - Planejamento.
 2. Software - Desenvolvimento.
 3. Simulação (Computadores).
 4. Agentes anti-infecciosos.
 5. Glomerulonefrite.
- I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Informática. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação. II. Título.

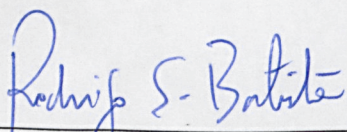
CDD 22. ed. 005.1

CARLOS ANTONIO BASTOS

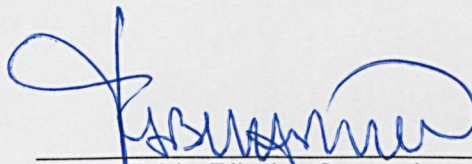
**SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DO SISTEMA IMUNOLÓGICO
ATRAVÉS DE SISTEMAS MULTIAGENTES: UM ESTUDO DA
RESPOSTA IMUNE E DA TERAPÊUTICA ANTIMICROBIANA NA
GLOMERULONEFRITE PÓS- INFECCIOSA (GNPE)
POR *Streptococcus pyogenes***

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."

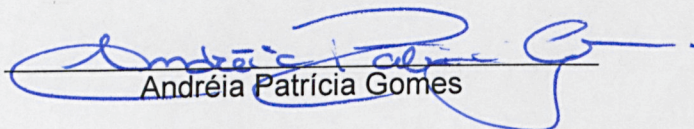
APROVADA: 28 de fevereiro de 2013.



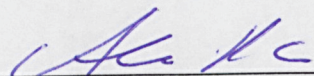
Rodrigo Siqueira Batista
(Co-orientador)



Fabio Ribeiro Cerqueira
(Co-orientador)



Andréia Patrícia Gomes



Alcione de Paiva Oliveira
(Orientador)

Aos meus pais,
João Teixeira Bastos e
Maria da Conceição Teixeira Bastos

À Meire, minha esposa,

Aos meus filhos
Joao Vitor, Júlia e o Lucas que está a caminho.

³³*Buscai em primeiro lugar o Reino de Deus e a sua justiça e todas estas coisas vos serão dadas em acréscimo.*

³⁴*Não vos preocupeis, pois, com o dia de amanhã: o dia de amanhã terá as suas preocupações próprias. A cada dia basta o seu cuidado.*

Matheus 6, 33-34

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por tudo.

Aos meus pais, João Teixeira Bastos e Maria da Conceição Teixeira Bastos, pelo exemplo de vida, de fé e por todo o amor incondicional. São essenciais para essa conquista:

À minha esposa Meire, pelo amor, pela amizade, pelo companheirismo, pela compreensão, pela paciência e principalmente pelo apoio para ter ânimo nos momentos difíceis.

Aos meus filhos João Vitor e Julia pelo amor incondicional e recíproco, pela compreensão e paciência nas minhas ausências. E ao meu terceiro filho, o Lucas, que ainda não conheço, mas já amo muito também. Vocês são a razão da minha vida.

Aos meus irmãos e cunhados, José Antônio e Toty, José Eudes e Maria Inês, Wilson e Eliana, Geraldinho e Vilma, Paulo e Sylvania, Milton e Raquel. Aos sobrinhos Micheli, Camila (*in memoriam*), Renata, Jonatas, Marina, Mateus, Bruna, Bia, Bárbara, Giulia, Giovana, Rafael, Renan, Rai, Stephanie, Nicole e Lavinie. Obrigado pelo apoio, incentivo, pela oração e pela força de sempre, em especial a Bianca por emprestar o seu talento gráfico e ao José Rui, agora sobrinho torto, pelos toques e pela força.

Aos amigos do Encontro de Casais com Cristo, que me incentivaram muito e com quem tenho aprendido cada vez mais a importância da oração e fé na nossa vida.

Aos técnicos e professores do Departamento de Informática (DPI), em especial ao meu orientador Alcione de Paiva Oliveira, meu co-orientador Fabio Ribeiro Cerqueira, ao Jugurta, José Luis e ao Carlos Goulart que foi uma pessoa chave no início do mestrado.

Aos professores e alunos do Departamento de Medicina e Enfermagem (DEM), em especial ao meu co-orientador Rodrigo Siqueira-Batista, à professora Andréia Patrícia Gomes e ao bolsista Emerson, por toda a atenção e auxílio no entendimento do Sistema Imune (SI) e da Glomérulonefrite pós-infecciosa (GNPE) por *Streptococcus pyogenes*.

Aos colegas e amigos do mestrado, com quem nesse período tive a honra de conviver e trocar importantes experiências desde o início. Ao Maurílio (agora colega de trabalho), José Rui, Julio (agora colega de trabalho), Glauber, André Marques, Carlos Eder, João Paulo, Rodolfo, Rodrigo Eiras, Wellington Ribeiro, Dangelo, Gilberto, Paulinho, Felipe.

À Diretoria de Tecnologia da Informação (DTI), onde agradeço o apoio de todos, em especial à Micheliní, Maria Lucia e Maurílio, grandes amigos e incentivadores. Muito obrigado pelo apoio incondicional e conselhos durante o mestrado.

Sem toda essa ajuda, certamente não estaria escrevendo aqui e agora.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIACÕES	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUÇÃO	3
1.1 - O PROBLEMA E SUA IMPORTÂNCIA.....	2
1.2 - HIPÓTESE.....	4
1.3 - OBJETIVOS.....	4
REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 - O SISTEMA IMUNOLÓGICO	5
2.1.1 - <i>imunidade Inata</i>	6
2.1.2 - <i>Imunidade adaptativa ou adquirida</i>	10
2.1.2.1 - Imunidade Adaptativa Humoral	12
2.1.2.2 - Imunidade Adaptativa Celular	16
2.1.3 - <i>O sistema Complemento</i>	20
2.1.3.1 - As vias de ativação e suas proteínas.....	20
2.1.3.2 - Atividades Biológicas do Complemento.....	22
2.2 - BACTÉRIAS	22
2.2.1 - <i>Estrutura química</i>	24
2.2.1.1- Gram-positivas.....	24
2.2.1.2 - Gram-negativas	25
2.2.2 - <i>Microbiota habitual do corpo humano</i>	26
2.2.3 - <i>Infecções bacterianas</i>	27
2.2.3.1 - Efeitos da invasão celular sobre as células do hospedeiro e sobre as bactérias	28
2.2.3.2 - Virulência.....	28
2.2.3.3 - Adesão das bactérias	28
2.2.3.4- Curvas de crescimento	28
2.3 - STREPTOCOCCUS PYOGENES	29
2.3.1- <i>Fatores de virulência</i>	30
2.3.4 - <i>PATOGÊNESE</i>	32
2.3.4.1 - Sequelas pós-infecciosas por <i>Streptococcus pyogenes</i>	33
2.3.4.2 - Diagnóstico bacteriológico.....	33
2.3.4.3 - Diagnóstico sorológico	34
2.3.4.4 - Epidemiologia.....	34
2.3.4.5 - Tratamento e profilaxia	35
2.4 - GLOMERULONEFRITE PÓS-INFECCIOSA POR STREPTOCOCCUS PYOGENES	35

2.5 - MODELANDO O SISTEMA IMUNOLÓGICO	40
2.5.1 <i>Método de Modelagem</i>	40
2.5.1.1. Características do método com sistemas multiagentes (SMA)	41
2.5.2 - <i>Sistemas Multiagentes</i>	42
2.5.3 - <i>Ambiente</i>	43
2.5.4 - <i>Agentes</i>	43
2.5.5.1 Criando modelos baseados em agentes	46
2.5.5.2 - Frameworks	47
2.5.5.2.1 - Repast Symphony	47
2.6 TRABALHOS CORRELATOS	47
PROPOSTA DE MODELO DO SI PARA SIMULAÇÃO DA GNPE	49
3.1 REQUISITOS DO MODELO	49
3.2 FRAMEWORK	50
3.3 - AMBIENTE	50
3.3.1 - <i>Tempo</i>	51
3.3.2 - <i>Espaço</i>	51
3.3.2.1- <i>Projeções</i>	52
3.3.3- <i>Contextos</i>	54
3.3.3.1 Parâmetros	56
3.3.4 <i>Zonas</i>	58
3.3.4.1 <i>AirWayTissue</i>	58
3.3.4.1 <i>KidneyTissue</i>	59
3.3.4.2 <i>Lymphnode</i>	60
3.3.4.3 <i>Circulation</i>	60
3.3.4.4 <i>Bone Marrow</i>	61
3.3.4.5 <i>Thymus</i>	62
3.3.5 <i>Migração entre zonas</i>	63
3.3.6 <i>Difusão de Substâncias</i>	63
3.3.6.1 <i>Citocinas</i>	65
3.3.6.2 <i>Antimicrobiano</i>	66
3.4 AGENTES	67
3.4.1 <i>Granularidade</i>	67
3.4.2 <i>Especificidade</i>	68
3.4.3 <i>Afinidade</i>	68
3.4.4 <i>Tipos de Agentes</i>	70
3.4.4.1- <i>Agent</i>	70
3.4.4.2 - <i>Antigen</i>	71
3.4.4.3 - <i>Antibody</i>	71
3.4.4.4 - <i>Pyogenes</i>	72
3.4.4.5 <i>Portal</i>	73
3.4.4.6 <i>Cell</i>	74
3.4.4.7 <i>Parenchyma Cells</i>	75
3.4.4.8 – <i>NK (natural killer)</i>	76

3.4.4.9 - ThCell	77
3.4.4.10 CTL	78
3.4.4.11 Neutrophil	80
3.4.4.12 APC	81
3.4.4.13 Macrophage Cells	81
3.4.4.14 Dendritic Cells	83
3.4.4.15 B Cells	84
RESULTADOS.....	86
4.1 IMPLEMENTAÇÃO DO MODELO	86
4.2 SIMULAÇÃO DO MODELO	88
4.2.1- Homeostasia	89
4.2.2 PAPEL DOS NEUTRÓFILOS NAS INFECÇÕES	90
4.2.3-EVIDÊNCIA DO DEPÓSITO DE IMUNOCOMPLEXOS NOS GLOMÉRULOS RENAIIS, CARACTERIZANDO A GNPE	91
4.2.4 - Administração de antimicrobianos e redução do risco de emergência da GNPE	94
CONCLUSÕES	100

LISTA DE FIGURAS

2.1 Os principais mecanismos da imunidade inata e adquirida	6
2.2 Captura e apresentação de antígenos	11
2.3 Resposta imunológica adaptativa	12
2.4 Opsonização mediada por anticorpos.....	13
2.5 Funções efetoras dos anticorpos	14
2.6 Ativação dos linfócitos B.....	15
2.7 Ativação dos linfócitos T.....	17
2.8 Funções efetoras dos linfócitos.....	18
2.9 Vias de ativação do Complemento.....	21
2.10 Principais Formas das Bactérias.....	23
2.11 Formas de agrupamento dos cocos.....	23
2.12. Representação esquemática da diferença estrutural entre as bactérias Gram-positivas (A) e Gram-negativas (B)	25
2.13. <i>Streptococcus pyogenes</i>	30
2.14 Glomérulos (a) hipertrofia e Glomerulonefrite Aguda (B) Normais.....	38
2.15 Modelo geral de um agente reativo com estado	44
2.16 Ilustração da topologia do tipo de autômato celular.....	46
3.1 Ilustração da estrutura do espaço definido por uma projeção do tipo Grid	53
3.2 Vizinhança de Moore	53
3.3 Ilustração de um espaço toroidal	54
3.4 Imagem da zona <i>AirWayTissue</i> , implementada.....	59
3.5 Imagem da zona <i>KidneyTissue</i> , implementada	60
3.6 Tolerância Central do Linfócito B.....	61
3.7 Tolerância Central do Linfócito T	62
3.8 Representação do gradiente de dispersão das citocinas.....	65
3.9 Classes de Agentes e sua organização	67
3.10A Exemplo de Sequência de Bits	69
3.10B Ilustração do cálculo do Grau de Afinidade	69
3.11 Regras do agente Antibody	72
3.12 Regras do agente Pyogenes.....	73
3.13 Regras do agente PC.....	76
3.14 Regras do agente NK.	77
3.15 Regras do agente ThCell.....	78
3.16 Regras do agente CTL.....	79
3.17 Regras do agente Neutrophil.....	81
3.18 Regras do agente Macrophage	82
3.19 Regras do agente Dendritic.....	83
3.20 Regras do agente BCell.....	85
4.1 Ferramenta implementada: <i>AutoSimmune</i> . Visão geral da zona <i>AirTissue</i>	86
4.2A/B Detalhes da zona <i>AirWayTissue</i> em momento de infecção	87
4.3 <i>Kidney Tissue</i> – Detalhe de momento de infecção.....	88
4.4 (a) Homeostasia do sistema – Zona <i>AirWayTissue</i>	89
4.4 (b) Homeostasia do sistema – Zona <i>KidneyTissue</i>	89
4.5 (a) Infecção bacteriana –vias aéreas superiores (Com neutrófilos).....	90
4.5 (b) Infecção bacteriana –vias aéreas superiores (Sem Neutrófilos).....	91
4.6 (a) <i>AirWayTissue</i> - Evolução da infecção.....	92
4.6 (b) <i>AirWayTissue</i> – SI executa Imunidade Adaptativa.....	93
4.6 (c) - glomérulos renais – processo inflamatório (Glomerulonefrite).....	93
4.7 <i>AirWayTissue</i> – Evidencia do não acometimento de GNPE como consequência da aplicação de antimicrobiano e rápida redução das bactérias.....	97
4.8 <i>KidneyTissue</i> – Sem ocorrência de GNPE.....	97
4.9 <i>AirWayTissue</i> – sem aplicação de antimicrobiano.....	97
4.10 <i>AirWayTissue</i> – com aplicação de antimicrobiano.....	98
4.11 <i>KidneyTissue</i> sem aplicação de antimicrobiano.....	98
4.12 <i>KidneyTissue</i> com aplicação de antimicrobiano.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Distribuição e composição da microbiota do trato gastrointestinal.....	27
Tabela 3.1 - Parâmetros do modelo.....	56
Tabela 4.1 - Parametros Pyogenes	92
Tabela 4.2 - Parametros para teste	95

LISTA DE ABREVIACÕES

- AC - Autômato Celular
- APC - Células apresentadoras de antígenos, do Inglês antigen presenting cell
- B - Linfócito B
- BCR - Receptor PRR do linfócito B
- CAS - Sistema Adaptativo Complexo, do Inglês Complex Adaptative System
- CD - Do Inglês, cluster of differentiation
- CTL - Linfócito T citolítico
- IAD - Inteligência Artificial Distribuída
- MHC I - complexo de histocompatibilidade principal classe I, do Inglês class I major histocompatibility complex
- MHC - II complexo de histocompatibilidade principal classe II, do Inglês class II major histocompatibility complex
- NK - Célula exterminadora natural, do Inglês Natural Killer
- PAMP - Padrão molecular associado a patógenos, do Inglês pathogen associated molecular pattern
- PRR - Receptor de reconhecimento de padrão, do Inglês pattern recognition receptor
- SI - Sistema Imunológico
- SAI - Sistema Imunológico Artificial
- SMA - Sistema Multiagente
- TCR - Receptor PRR do linfócito T
- Th - Linfócito T auxiliar, do Inglês T helper

RESUMO

BASTOS, Carlos Antonio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013, **Simulação computacional do Sistema Imunológico através de sistemas multiagentes: um estudo da resposta imune e da terapêutica antimicrobiana na glomerulonefrite pós-infecciosa (GNPE) por *Streptococcus pyogenes***. Orientador: Alcione de Paiva Oliveira. Co-orientadores: Rodrigo Siqueira Batista e Fábio Ribeiro Cerqueira.

Os sofisticados mecanismos do Sistema Imunológico (SI) têm o objetivo de manter a homeostase ante os milhões de microrganismos com os quais o *Homo sapiens sapiens* convive diariamente. O SI é considerado um domínio de grande complexidade, merecendo, por conseguinte, díspares enfoques de pesquisas, dentre os quais a simulação computacional. Essa abordagem é interessante tanto para medicina – a qual teria possibilidade de conhecer novas possibilidades de tratamento de doenças –, quanto para informática, que compreendendo o SI, poderia utilizar os processos desvendados como inspiração de algoritmos avançados para solução de problemas computacionais que se mostrem mais complexos. A proposta deste trabalho é criar um modelo de experimentação computacional para evidenciar o papel da resposta imune e da terapia antimicrobiana na glomerulonefrite pós-infecciosa (GNPE) por *Streptococcus pyogenes*. Para isso, busca-se identificar os requisitos para a extensão do modelo *AutoSimmune* para simular os fenômenos envolvidos na instalação da GNPE. Adicionamos funcionalidades na ferramenta *AutoSimmune* para simulação do SI, implementando o modelo proposto. Incluímos, dentre outros, dois ambientes – os rins e as vias aéreas superiores – além dos neutrófilos. Empregou-se a abordagem dos sistemas multiagentes (MAS), baseada em agentes autônomos, e o modelo foi implementado utilizando o framework Repast Symphony, assim como na ferramenta original. Os testes realizados evidenciaram o funcionamento coerente do modelo em relação ao desenvolvimento da GNPE, enfermidade que tem como característica fisiopatológica principal a deposição de imunocomplexos nos glomérulos renais. Através dos testes também se conseguiu simular a administração de antimicrobianos, evidenciando redução do risco de ocorrência de GNPE e a possibilidade de ulterior investigação do papel da resposta imune e dos antimicrobianos em processos infecciosos nas pesquisas vindouras do grupo.

ABSTRACT

BASTOS, Carlos Antonio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013, **Computer simulation of the immune system through multi-agent systems: a study of the immune response and antimicrobial therapy in post-infectious glomerulonephritis (APSGN) by *Streptococcus pyogenes***. Adviser: Alcione de Paiva Oliveira. Co-advisers: Rodrigo Siqueira Batista and Fábio Ribeiro Cerqueira.

The Sophisticated homeostasis mechanisms of the immune system are designed to protect us against the millions of microorganisms with which Homo sapiens sapiens lives daily. The Immune System is considered an area of great complexity, deserving therefore a diversity of research approaches, among which the computer simulation. This approach is interesting both for medicine, which would have the possibility of meeting new possibilities for treatment of diseases, and for computer science, which, once gaining a better understanding of Immune System processes, would have inspiration for the construction of algorithms to solve complex problems. The purpose of this work is to create a model of computational experiments to demonstrate the role of the immune response and antimicrobial therapy in post-infectious glomerulonephritis (APSGN) by *Streptococcus pyogenes*. For this, we attempt to identify the requirements for the extension of *AutoSimmune* model to simulate the phenomena involved in the installation of APSGN. We added functionality in *AutoSimmune* tool for simulation of the immune system, implementing the proposed model. We included among others, two environments - the kidneys and upper airways - besides neutrophils. We used the approach of multi-agent systems (MAS) based on autonomous agents, and the model was implemented using Repast Symphony framework, as well as the original tool. In our experiments, we could also simulate the administration of antimicrobials, showing the consequent reduction of the risk to APSGN occurrence. This also opened the possibility of future investigation for the role of antimicrobials in infectious processes.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O sistema imune (SI) humano evoluiu o longo de milhões de anos para desenvolver sofisticados mecanismos de manutenção da homeostase com o objetivo de proteger a integridade orgânica do hospedeiro em relação aos *microrganismos* e seus fatores de virulência (FAUCI *et al.*, 2009).

Os *microrganismos* estão onipresentes no ar que se respira, na alimentação e em todas as superfícies epiteliais. Via de regra, as doenças infecciosas ocorrem quando esses *microrganismos* – e/ou outros agentes não presentes usualmente em espécimes do *Homo sapiens sapiens* – conseguem lesar essas superfícies e penetrar em sua intimidade orgânica.

Vivendo em um ambiente povoado com uma quantidade incontável de agentes infecciosos de diversas formas e tamanhos, e é surpreendente que não haja infecções a maior parte do tempo. Isso ocorre porque os seres humanos desenvolveram uma série de mecanismos de resposta que garantem a manutenção da homeostasia, quando da relação humano/agentes patogênicos que podem levar a morte. Esses mecanismos, chamados de resposta imune, são complexos e envolvem ação sinérgica, porém controlada, sendo capazes de estabelecer um estado de imunidade contra infecções (CALICH & VAZ, 2009). Todo o intrincado processo se organiza em uma rede de interações, atinentes ao SI.

O conhecimento do SI é fundamental para a biologia e para a medicina, tendo em vista o entendimento dos processos fisiológicos que permitem ao organismo reconhecer a si mesmo (o *próprio*) e somente responder ao estranho (*não próprio*). Nessa tarefa, deve-se estabelecer uma ausência de reatividade aos próprios componentes (tolerância imunológica) e a capacidade de reatividade ao estranho (resposta imune) de modo a não causar danos aos próprios tecidos, e também eliminando ou contendo o crescimento de patógenos de naturezas distintas (por exemplo, vírus e bactérias), além de impedindo ou controlando o crescimento de células próprias alteradas, como é o caso das células tumorais. Muitas vezes, entretanto, os mecanismos de tolerância são imperfeitos e dão origem às chamadas doenças autoimunes; além disso, respostas imunes inadequadas podem causar lesão tecidual e desenvolvimento de enfermidades ao invés de proteção (CALICH & VAZ, 2009). Nessa tarefa, a importância do SI para os seres humanos é claramente ilustrada pela observação clínica de indivíduos que, por apresentarem alguma deficiência em sua resposta imune, tornam-se sujeitos a infecções graves (ABBAS &

LICHTMAN, 2003). Segundo (CALICH & VAZ, 2009), o conhecimento da estrutura, função e regulação do SI é fundamental para o entendimento da etiopatogenia de muitas moléstias, por exemplo, infecciosas, e para o desenvolvimento de processos que permitam a sua regulação.

Além da destacada relevância médica e biológica, o estudo do SI, bem como de outros sistemas biológicos, tornou-se fundamental para o avanço da computação, já que é preciso lidar com problemas cada vez mais complexos e dinâmicos. De fato, para tentar resolver essas novas questões, complexas e dinâmicas, surgiram inovadoras abordagens computacionais utilizando sistemas biológicos como inspiração, os sistemas bio-inspirados. O SI está entre esses sistemas biológicos utilizados como inspiração. Quando, então, se criam sistemas computacionais baseados em metáforas do SI, eles recebem o nome de Sistemas Imunes Artificiais. Tais sistemas se inspiram em funções, princípios e modelos do SI biológico que podem ser aplicados a muitos problemas, como aprendizagem de máquina, detecção de anomalias, mineração de dados, segurança computacional, comportamento adaptativo, tolerância a falhas e reconhecimento de padrões (POSSI, 2012).

O SI é um dos assuntos mais desafiadores da biologia. Também é uma das melhores fontes de inspiração para novas soluções computacionais. Dessa forma, seu melhor entendimento é de grande importância. No entanto, devido a sua biocomplexidade, o estudo desse sistema requer outras abordagens, dentre elas aquela através de simulações utilizando sistemas multiagentes. Trata-se, então, de uma via de mão dupla, na qual as áreas mencionadas – medicina/biologia e informática – se influenciam mutuamente na composição de um campo genuinamente interdisciplinar.

1.1 - O problema e sua importância

O SI é formado por diversos conjuntos de substâncias, células, tecidos e órgãos, os quais funcionam em conjunto com outros sistemas (como o neural e endócrino) para manter o estado interno estável (CALISH & VAZ, 2009; SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2008). A principal função do SI é proteger os corpos dos vertebrados de agentes infecciosos (tais como vírus, bactérias, e outros), comumente conhecidos como patógenos. O SI permite ao organismo reconhecer a si mesmo (o próprio) e somente responder ao estranho (não próprio), assim garantem a homeostasia.

Segundo LI *et al.*, (2009), é imprescindível que se façam modelos do SI para aprender as funções de cada componente e os mecanismos internos desse sistema, permitindo que seja utilizado todo potencial do SI na biologia, e na criação de aplicações computacionais bio-inspiradas em suas muitas propriedades úteis.

De acordo com os mesmos autores, para a biologia, modelos do SI são capazes de simular, com certa exatidão, alguns mecanismos responsáveis por várias doenças. Existem muitas hipóteses sobre como o SI reage às infecções por diferentes agentes etiológicos, mas resta a questão sobre a eficácia destas hipóteses em descrever os fenômenos observados. Os modelos computacionais do SI podem ajudar no entendimento dos seus mecanismos e ainda verificar suas hipóteses. Além disso, esse novo entendimento pode ser empregado como inspiração para desenvolvimento de novos medicamentos. Destaque-se, também, que os modelos computacionais do SI não só são mais baratos do que realizar estudos *in-vivo*, com também são mais rápidos (LI *et al.*, 2009). Segundo esses mesmos autores, as vantagens em se modelar o SI para computação são entender melhor os algoritmos bio-inspirados e a utilização destes algoritmos no aprimoramento de sistemas inteligentes e adaptativos. Já segundo WOOLDRIDGE (2009), a capacidade de certos sistemas naturais, ou biológicos, em especial o SI, vai muito além de qualquer estratégia tecnológica existente na atualidade. Sendo assim, elucidar e aplicar um conjunto geral de princípios que governam o comportamento destes sistemas naturais pode levar ao desenvolvimento de novas formas de computação.

No caso do presente trabalho, em particular, o objetivo maior com a simulação computacional é o avanço da compreensão dos mecanismos fisiopatológicos implicados na glomerulonefrite pós-infecciosa (GNPE) por *Streptococcus pyogenes*. Trata-se de uma doença inflamatória aguda, pós-infecciosa, envolvendo os glomérulos renais. Patologicamente, apresenta-se com lesões proliferativas difusas (KUMAR *et al.*, 2005), as quais aparecem uma a quatro semanas depois de infecções – nas vias aéreas superiores ou na pele – pela bactéria *Streptococcus pyogenes*, um coco gram-positivo, de gênero *Streptococcus*, β -hemolítico do grupo A. A doença se manifesta por hematúria, edema e hipertensão arterial sistêmica, podendo haver evolução para insuficiência renal aguda. A síndrome nefrítica por GNPE atinge, com maior frequência, crianças de seis a dez anos, destacando-se a mediação imunológica por imunocomplexos (IC) (KUMAR *et al.*, 2005; BISNO, 2000).

O padrão epidemiológico da GNPE tem sofrido relevantes mudanças nas últimas três décadas, tornando-se rara em nações desenvolvidas. Entretanto, ainda continua ocorrendo nos países em desenvolvimento nos quais a incidência se situa entre 9.5 a 28.5 novos casos por 100.000 indivíduos por ano (RODRIGUEZ & MUSSER, 2008). Na Europa central tem-se observado o quase desaparecimento da enfermidade, a qual hoje acomete mais a população idosa. Ainda sim, a GNPE é relativamente comum nas comunidades rurais, aborígenes e de menor desenvolvimento socioeconômico, atingindo até 21% (4.6-51.6%) das crianças admitidas com falência renal nos hospitais (RODRIGUEZ & MEZZANO, 2005).

No Brasil MACIEL *et al.*, (2003) buscaram dados sobre a prevalência de *S. pyogenes*, descrevendo a ocorrência de colonização pelo agente como um achado usual na faixa etária entre três e 16 anos em portadores de tonsilite persistente, os quais são suscetíveis à infecção e às suas complicações. Na sua investigação com grupo amostral de 735 escolares da cidade de Recife, foi constatada uma prevalência de 0,8% do agente em portadores assintomáticos.

Numa perspectiva global, avalia-se que dos 472.000 casos por ano de GNPE, cerca de 456.000 estão em países subdesenvolvidos (RODRIGUEZ & MUSSER, 2008; MONTSENY *et al.*, 1995).

É nesse contexto que se apresenta este trabalho: uma abordagem *in-silico* de estudo, estendendo o *AutoSimmune* (POSSI, 2012), a partir da utilização de um sistema multiagente para a simulação do comportamento de uma nova parte do *SI*, para um estudo de caso visando evidenciar o papel da resposta imune e da terapia antimicrobiana na glomerulonefrite pós-infecciosa por *Streptococcus pyogenes*.

1.2 - Hipótese

Pode-se simular, com sistemas multiagentes, o comportamento do *SI* humano em um nível de abstração suficiente para aumentar a compreensão deste sistema e auxiliar a medicina na pesquisa sobre o papel da resposta imune e do uso de antimicrobianos na etiologia da glomerulonefrite pós-infecciosa por *Streptococcus pyogenes*.

1.3 - Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é propor um modelo computacional baseado em agentes de um *SI* artificial e evidenciar o papel da resposta imune e também do efeito da terapia antimicrobiana na etiologia da glomerulonefrite pós-infecciosa (GNPE) por *Streptococcus pyogenes*. Os objetivos específicos são:

- Reunir e revisar a literatura acerca do *SI* humano, enfocando principalmente a resposta imune sobre a glomerulonefrite pós-infecciosa (GNPE) por *Streptococcus pyogenes*;
- Identificar os requisitos para a extensão do modelo do sistema *AutoSimmune* (POSSI, 2012), os quais permitam simulação dos fenômenos envolvidos nos processos da glomerulonefrite;
- Propor extensão para modelo de *SI* artificial do *AutoSimmune* (POSSI, 2012);
- Adicionar funcionalidades à ferramenta *AutoSimmune* para simulação do *SI*, implementando o modelo proposto;
- Evidenciar, através de estudos de caso, a viabilidade do modelo proposto, utilizando a ferramenta desenvolvida.

CAPITULO 2

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 - O sistema imunológico

Todo organismo vivo encontra-se em íntima interação com os mais distintos componentes do ambiente. Tal é o caso do *H. sapiens sapiens*, o qual possui sistema imune “equipado” com uma rede de mecanismos que protegem de infecções por microrganismos e metazoários, os quais poderiam de alguma maneira, estabelecer-se no organismo, no intuito de garantir a sobrevivência (SUNSHINE *et al.*, 2000). O SI é, então, o principal mecanismo de resposta biológica, especialmente nos vertebrados (CALICH & VAZ, 2009). É um sistema muito complexo, formado por diversos conjuntos de substâncias, células, tecidos e órgãos que compõem o chamado sistema linfóide (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2008), com alto paralelismo, distribuição, organização e adaptação (LI *et al.*, 2009). Sua principal atribuição é responder aos microrganismos e aos metazoários infecciosos, bem como de substâncias estranhas, as quais possam causar algum dano ao corpo.

Para cumprir esta tarefa, o SI conta com dois tipos de respostas imunológicas (Figura 2.1), ou seja, duas abordagens para manter homeostase: a resposta imunológica inata ou não específica, mediada pelo SI inato, sendo mais rápida e efetiva; e a resposta imunológica adaptativa, mediada pelo SI adaptativo, sendo mais lenta, mas mais duradoura (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2008). Isso ocorre, pois as células do SI inato estão disponíveis o tempo todo no organismo, desde o nascimento do indivíduo (WOOLDRIDGE, 1999). Trata-se de um sistema constituído por vários fatores que são relativamente não-específicos, capazes de responder a uma ampla variedade de agentes, sem exigir prévia exposição aos mesmos. Já a resposta imune adaptativa é capaz de desenvolver uma memória imunológica, reconhecendo o mesmo estímulo antigênico em um momento posterior, evitando o restabelecimento da infecção, tornando-a mais branda em sua expressão clínica e patológica. Deste modo, a resposta imune adaptativa se aperfeiçoa a cada encontro com um antígeno (WOOLDRIDGE, 1999). Neste domínio se destaca também o *sistema complemento*, o qual representa um efetor das imunidades inata e adquirida. Ele atua em uma grande variedade de reações do organismo hospedeiro, inflamatórias, homeostáticas e imunes (SUNSHINE *et al.*, 2000).

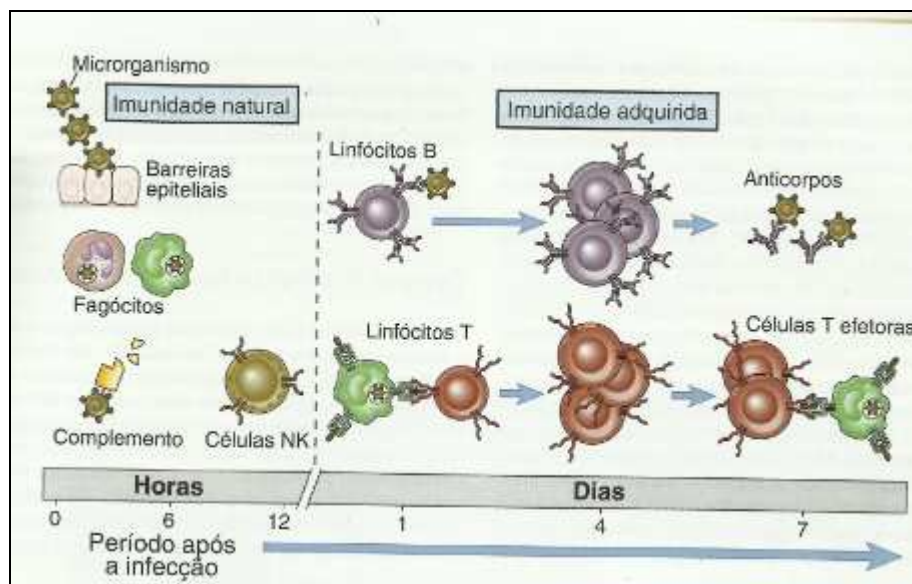


Figura 2.1. Os principais mecanismos da imunidade inata e adquirida.
Fonte: (ABBAS *et al.*, 2008)

2.1.1 - imunidade Inata

A *imunidade inata* é composta, primeiramente, pelas barreiras fisiológicas e químicas do corpo, tais como a pele, os cílios, as mucosas, as enzimas do sistema digestivo, dentre outras. FLOREANO & MATTIUSI (2008) definem a imunidade inata como sendo o conjunto de mecanismos de resposta que não se alteram durante a vida do organismo hospedeiro. A maioria dos organismos e substâncias estranhas não é capaz de penetrar na pele intacta, mas pode adentrar se houver alguma lesão (SUNSHINE *et al.*, 2000). Um importante mecanismo inato envolvido na proteção em diferentes áreas somáticas – dentre as quais os tratos respiratórios e gastrointestinais –, diz respeito ao simples fato das superfícies dessas áreas estarem recobertas com muco. Os pêlos do nariz e o reflexo da tosse são também atuantes na prevenção de infecções no trato respiratório.

Quando algum antígeno ultrapassa o *sistema de integridade das mucosas* (KARKOW *et al.*, 2010), entra em cena a imunidade celular inata e a imunidade humoral inata. Os macrófagos e os neutrófilos são células centrais na primeira. Na medula óssea, células precursoras da linhagem mielóide se diferenciam nas linhagens granulocítica e monocítica, amadurecem e ganham a corrente sanguínea.

Os neutrófilos originam-se da linhagem granulocítica e são produzidos em grande número na medula óssea. Parte dos neutrófilos maduros fica na medula óssea como reserva; outra parte vai para circulação. Eles têm vida média curta sobrevivendo apenas algumas horas, sendo capazes de migrar rapidamente para tecidos inflamados ou infectados onde ficam ativos por um tempo um pouco maior, depois morrem por apoptose e são fagocitados pelos macrófagos. Para passar do sangue para os tecidos, “espremem-se” entre duas células endoteliais adjacentes sem danificar o endotélio. São as primeiras

células do sangue a migrar para o foco infeccioso. Por essa eficiência são considerados a primeira linha de resposta do organismo às infecções. Após fagocitar e lisar os *microrganismos*, os neutrófilos morrem no local, ao contrário dos macrófagos. Algumas bactérias (piogênicas) induzem uma migração massiva de neutrófilos, e a morte de um grande número dessas células no tecido, é responsável pela formação do que chamamos de pus. A função dessas células no controle de infecções é tão importante, que indivíduos cujos neutrófilos apresentam defeitos na atividade fagocitária têm infecções recorrentes, as quais podem levá-los a morte (ABBAS *et al.*, 2008).

Os macrófagos também se originam de células precursoras da medula óssea que se diferenciam em pró-monócitos. Estes vão para o sangue, onde são chamados de monócitos; daí, migram para os diferentes tecidos onde se transformam em macrófagos. Essas células, ao contrário dos neutrófilos, sobrevivem nos tecidos por longo tempo. Dependendo do tecido onde se instalam, os macrófagos adquirem funções e características fenotípicas distintas. São chamados de um modo geral de células do sistema mononuclear fagocitário e se encontram no tecido conjuntivo de vários órgãos, como baço, linfonodos, fígado (células de Kupffer); em cavidades corporais, como a sinovial, peritoneal e pleural, nas mucosas gastrointestinal e respiratória (macrófagos alveolares), no cérebro (micróglia) e nos ossos (osteoclastos) (ABBAS *et al.*, 2008).

Na infecção, o número de macrófagos no tecido afetado aumenta muito em virtude da migração de monócitos do sangue para o local. Essa migração se dá mais tardiamente do que a realizada pelos neutrófilos. Além de fagocitar e lisar microrganismos, os macrófagos removem células mortas, restos celulares e resíduos provenientes de tecidos lesados, sendo essenciais para o reparo tecidual. Além dessas funções, tais células estabelecem um elo entre as imunidades inata e adaptativa, pois eles têm a capacidade de fagocitar, processar e apresentar os antígenos de forma tal que estes possam ser reconhecidos pelos linfócitos. Essa capacidade dos macrófagos é fundamental para iniciar a resposta imune adquirida. A ação dessas células inicia-se com o reconhecimento de moléculas na membrana de microrganismos seguido da fagocitose ou internalização dos mesmos, quando são acionados vários mecanismos que levam à destruição destes (CALISH & VAZ, 2009).

Os macrófagos possuem na sua membrana “sensores” de microrganismos, e de outras estruturas não próprias, conhecidos como receptores. Esses receptores reconhecem padrões moleculares relacionados aos patógenos, os PAMP (*pathogen associated molecular paterhns*), e ausentes nas células do hospedeiro, e por isso são chamados de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs, *Patterns Recognition Receptors*) (CALICH & VAZ, 2009), assim são capazes de reconhecer antígenos, ou seja, moléculas específicas reconhecíveis pelo PRR, que estão intimamente ligadas com

patógenos (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012a). O reconhecimento de microrganismos por receptores em macrófagos leva à ativação de sinais intracelulares que são fundamentais para que essas células iniciem o processo de fagocitose e produzam substâncias microbicidas e inflamatórias. Diferentes classes de microrganismos expressam diferentes PAMP que são reconhecidos por diferentes receptores presentes em fagócitos. Esses receptores da imunidade inata reconhecem padrões moleculares, ao contrário dos receptores da imunidade adquirida, que exibem especificidade muito mais restrita. Um desses receptores é o *receptor para manose (MR, manose receptor)* que liga carboidratos como manana ou manose terminal de glicoconjugados de microrganismos (células humanas não têm resíduos de manose terminais em proteínas e polissacarídeos da membrana celular). Outro receptor que reconhece polissacarídeos é *decatina-1*, que reconhece β -glucanas, presentes na superfície de alguns *microrganismos*. Hoje se sabe que existem muitos outros receptores semelhantes ao de manose que reconhecem outros grupos de carboidratos. Cada um desses receptores tem o potencial de reconhecer diferenças sutis na estrutura desses compostos expressos na superfície de *microrganismos*. Outro grupo de receptores chamados *receptores de scavenger* (“lixeiro”) reconhece estruturas presentes em células apoptóticas ou necróticas, favorecendo assim a remoção de células mortas ou alteradas. Existe ainda um grupo de *receptores semelhantes ao toll (TLR, toll like receptors)*, que são altamente conservados entre espécies. Em espécies de mosca, por exemplo, foi descrita a emissão de um sinal que leva à produção de peptídeos antimicrobianos importantes na resposta às infecções. Nos vertebrados, diferentes tipos de TLRs reconhecem distintos produtos microbianos. No *H. sapiens sapiens* foram descobertos até o momento 10 receptores funcionais pertencentes à família de receptores *toll*. O TLR4 foi o primeiro a ser identificado em vertebrados e reconhece lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas. O LPS associa-se à proteína de membrana CD14 que atua em conjunto com o TLR4 para iniciar a sinalização intracelular. O LPS, também reconhecido como endotoxina, é extremamente potente para ativar macrófagos e outras células e é responsável pelo choque séptico (ROITT & DELVER, 2006).

O TLR2 reconhece peptidoglicanos de bactérias gram-positivas e parede de leveduras (Zimosan), e o TLR5 reconhece flagelina, componente comum em várias bactérias móveis que possuem flagelos. Nos vertebrados, a ativação dos TLR resulta na ativação dos fatores de transcrição $\text{NF}\kappa\beta$ e de AP-1, que ativam genes para síntese de citocinas e de moléculas de adesão. Dessa maneira são produzidas diferentes citocinas e moléculas microbicidas, dependendo do TLR acionado, e como consequência serão induzidos diferentes padrões de ativação de acordo com o microrganismo. Esses TLR

agem não só em combinação uns com outros, mas também com outros receptores da imunidade inata.

Uma nova família de receptores para padrões moleculares foi descrita mais recentemente, são chamados NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*), localizando-se no citoplasma dos fagócitos onde atuam como sensores de antígenos de bactérias intracelulares induzindo a ativação de $\text{NF}\kappa\beta$ e da caspase-1, culminando na apoptose dos macrófagos. No caso de patógenos intracelulares de macrófagos, este pode ser um dos mecanismos que contribui para o controle da infecção (CALICH & VAZ, 2009).

Outro relevante mecanismo de lise de microrganismos, atinente à resposta imune inata, diz respeito à ativação do sistema complemento, o qual é constituído por substâncias presentes pelo sangue que tendem a se ligar as superfícies celulares, iniciando uma reação em cascata que culmina na morte ou lise da célula. Entretanto, células saudáveis, que provavelmente não foram infectadas, são capazes de produzir moléculas reguladoras que cessam a reação e ficam livres da destruição pelo sistema complemento.

As células que participam da resposta imune inata secretam substâncias chamadas de citocinas, as quais sinalizam para as demais células do SI que o organismo necessita responder a um evento infeccioso, marcando aquela região como uma zona de perigo (*danger zone*). Acontece, nesse momento, um conjunto de alterações bioquímicas, vasculares e celulares que recebe o nome de reação inflamatória. É importante lembrar que a inflamação ocorre sempre que há dano ou lesão, independentemente da presença de um agente infeccioso, ainda que haja resposta inflamatória em situações não-infecciosas. No caso do evento deflagrador ser de origem infecciosa, o microrganismo precisa ser eliminado para que a integridade seja restabelecida. Pode-se dizer que quase todas as infecções são inflamatórias (com exceção de alguns agentes, como prions e vírus latentes), mas nem toda inflamação é infecciosa.

Essa resposta inflamatória, além de amplificar a ação do SI, foca suas atividades na região afetada, recrutando outras células para o local da lesão, acumulando e ativando células fagocitárias, o que contribui para eliminação de microrganismos. Quando estes últimos não são lisados no local, os antígenos dos mesmos ou as células que os fagocitaram podem ser drenados pelos vasos linfáticos até o linfonodo mais próximo. Este é um local importante para o encontro entre os linfócitos e antígenos, os quais são reconhecidos e devidamente processados e apresentados pelos macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos ou APC (*antigen presenting cells*), aspecto fundamental para o início da resposta imune específica (WOOLDRIDGE, 1999). Trata-se, pois, de um importante papel do SI inato: a mobilização (ou ativação) do SI adaptativo.

Embora seja bastante eficiente, o SI inato possui suas limitações, sendo que a principal delas está no fato de que suas respostas estarem relacionadas ao reconhecimento dos PAMP. Tal reconhecimento está codificado no DNA do indivíduo e não pode ser mudado durante a vida do mesmo. Isso tem duas implicações: primeiro, o número de PAMP reconhecidas não pode ser muito alto, pois caso fosse, o espaço do DNA necessário para codificar tal informação seria muito elevado, sendo inviável evolutivamente (ABBAS *et al.*, 2008); ainda segundo esses mesmos autores, novos antígenos podem surgir (e existem) que não estão incluídos na lista das PAMP. Isso tudo faz necessário a existência de outra resposta imunológica flexível, que possa adaptar seu comportamento para combater antígenos desconhecidos previamente. Essa necessidade fez com que surgisse o SI adaptativo, responsável pela resposta imune adaptativa e, conseqüentemente, a imunidade adquirida.

2.1.2 - Imunidade adaptativa ou adquirida

Ao contrário da imunidade inata, um atributo de muitos organismos vivos, o SI adaptativo ou a imunidade adquirida é uma forma de imunidade mais especializada. Esta se desenvolveu tardiamente na evolução e é encontrada somente nos vertebrados.

As principais propriedades do SI adaptativo, e que o diferenciam do SI inato, são a especificidade para antígenos estruturalmente distintos e a memória atinente às exposições anteriores (ABBAS & LICHTMAN, 2003). Ademais, o SI adaptativo tem grande capacidade de adaptação durante a vida do organismo. Como o próprio nome diz, a imunidade adaptativa ou adquirida é uma conseqüência do contato com uma substância estranha, a qual penetra no organismo, ativa uma cadeia de eventos que induzem uma resposta imune com especificidade contra essa substância. As principais células do SI adaptativo são os linfócitos T (gerados no timo) e os linfócitos B (gerados na medula óssea, em inglês *bone marrow*). Cada um desses linfócitos é responsável por uma dimensão da imunidade adaptativa: a imunidade humoral adaptativa é mediada por moléculas conhecidas como anticorpos, que são secretadas na corrente sanguínea pelos linfócitos B com especificidade contra substâncias estranhas. Os anticorpos são secretados na circulação e nos fluídos das mucosas, ligando-se aos microrganismos, impedindo que estes continuem a infecção. No entanto, os anticorpos não têm acesso aos microrganismos intracelulares. A resposta a tais agentes dependerá da imunidade celular adaptativa, a qual é mediada pelos linfócitos T devido aos seus receptores (TCR). Estes linfócitos não sintetizam anticorpos, mas desempenham várias funções efetoras quando as APC – as células apresentadoras de antígenos – carregam antígenos aos órgãos linfóides secundários. A imunidade adquirida mediada por linfócitos T é chamada imunidade celular ou imunidade mediada por células (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2008). Os linfócitos T CD4⁺ ou *Th (helper)* ativam macrófagos para lisar microrganismos

ingeridos. Já os linfócitos T CD8⁺ ou CTL (citolíticos ou citotóxicos) destroem qualquer tipo de células hospedeiras que estejam abrigando microrganismos infecciosos no citoplasma (POSSI *et al.*, 2012).

As APC são células especiais, que são capazes de capturar antígenos em qualquer lugar do organismo, mesmo os mais distantes, e levá-los até os linfonodos, onde os mesmos são apresentados aos linfócitos (Figura 2.2) (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

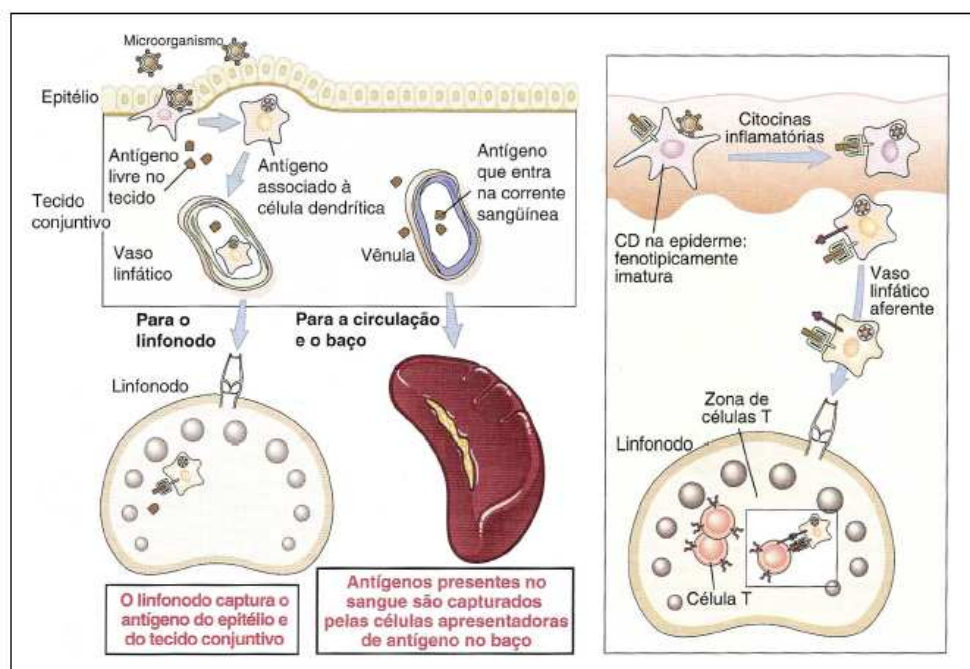


Figura 2.2: Captura e apresentação de antígenos.
Fonte: (ABBAS & LICHTMAN, 2007)

Já ativados, os linfócitos começam a proliferar, resultando em um aumento muito grande no número de linfócitos específicos para o antígeno que desencadeou a reação. Esse processo é chamado de expansão clonal. Para se ter uma ideia da amplitude desse processo, os autores ABBAS & LICHTMAN (2007) destacam que o número de um linfócito CTL específico para um determinado antígeno no organismo saudável é de aproximadamente 1 para 10^6 . Após o desencadeamento da resposta imunológica para uma infecção viral, por exemplo, até 20% de todos os linfócitos CTL do organismo serão linfócitos específicos para o vírus causador da infecção, o que significa que os clones específicos para o patógeno em questão aumentaram sua população em mais de 10000 vezes (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

Os linfócitos ativados, depois da expansão clonal, são distribuídos pelo organismo, e são atraídos principalmente pelas áreas na qual está ocorrendo a inflamação (quimiotaxia) (ABBAS & LICHTMAN, 2007). Uma vez no sítio de infecção, eles atuam eliminando os (ou estimulando a eliminação dos) patógenos e outras estruturas que apresentarem os antígenos que desencadearam a resposta imunológica.

À medida que os patógenos vão sendo eliminados, as APC passam a apresentar menos antígenos, assim, menos linfócitos vão sendo ativados, e os que já foram ativados, caso atinjam um limite de eliminações, ou caso fiquem muito tempo sem serem “reativados”, sofrem apoptose, e são eliminados. Dessa forma, habitualmente uma a duas semanas após a infecção ter sido erradicada, toda a resposta imunológica já regrediu, e não há mais sinais de que tudo isso ocorreu, a não ser por um grupo especiais de células: os linfócitos de memória (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

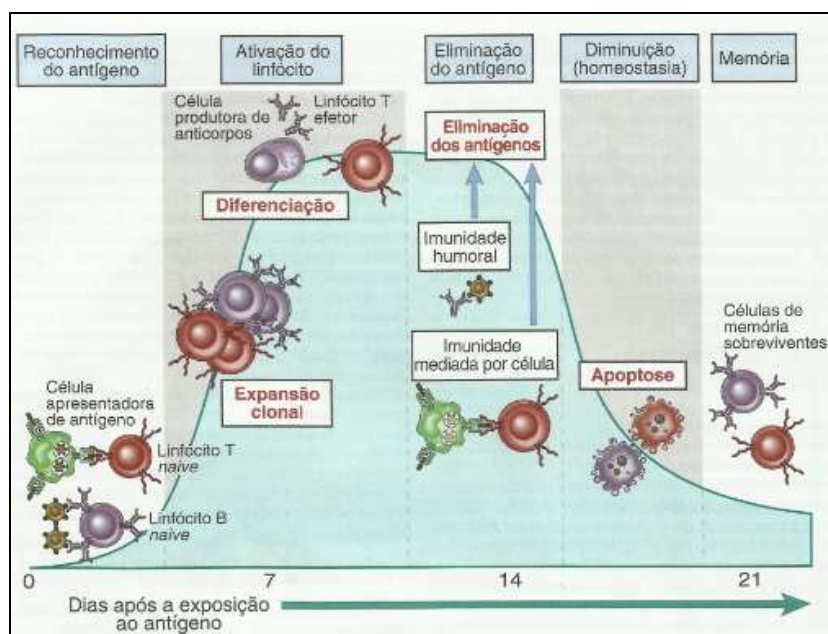


Figura2.3 - Resposta imunológica adaptativa.

Fonte: (ABBAS *et al.*, 2008)

Todos esses mecanismos ocorrem de forma sincronizada e distribuída em relação aos antígenos que desencadearam a reação. Essa sequência de eventos (veja Figura 2.3) é bem definida no SI adaptativo, e segundo ABBAS E LICHTMAN (2007) consistem em:

- [1]. reconhecimento do antígeno;
- [2]. ativação dos linfócitos;
- [3]. eliminação do antígeno;
- [4]. declínio;
- [5]. memória.

A resposta imune adaptativa apresenta um braço humoral e um braço celular como será comentado em seguida.

2.1.2.1 - Imunidade Adaptativa Humoral

A imunidade adaptativa humoral é o braço do SI adaptativo responsável pela resposta às infecções causadas por patógenos extracelulares. Também é sua função eliminar as toxinas que os patógenos possam produzir (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

A principal célula envolvida neste tipo de imunidade é o linfócito B. Como dito anteriormente, o linfócito B é a única célula capaz de produzir anticorpos. Segundo

ABBAS & LICHTMAN (2007), este tipo de imunidade, além de responder aos patógenos extracelulares, possui grande importância também por identificar e se contrapor aos agentes infecciosos que não são reconhecidos pela imunidade celular.

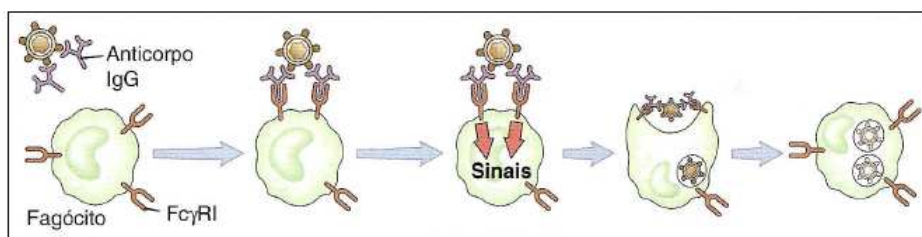


Figura 2.4. Opsonização mediada por anticorpos.
Fonte: (ABBAS & LICHTMAN, 2007)

Quando um patógeno possui cápsulas de polissacarídeos, por exemplo, e ocultam suas PAMP, eles conseguem escapar dos mecanismos da imunidade celular inata e adaptativa. Por exemplo, os macrófagos não conseguem fagocitar esse tipo de patógeno, e os receptores dos linfócitos T não reconhecem esse tipo de antígeno. Contudo, os linfócitos B são capazes de produzir anticorpos que reconhecem, além dos antígenos proteicos (reconhecidos pelos linfócitos T), os polissacarídeos e lipídicos. Ao serem detectados pela imunidade humoral do SI adaptativo, os linfócitos B produzem anticorpos específicos para o agente infeccioso em questão. Esses anticorpos percorrem todo organismo através da circulação, e quando encontram o patógeno, se ligam em sua superfície, impedindo-o que se conecte a outras estruturas – i.e., neutralizando-o, e marcando-o para fagocitose –, em um processo chamado de opsonização (ver Figura 2.4). Note que os anticorpos têm um papel semelhante ao do sistema complemento nesse ponto.

Por este motivo, os anticorpos são considerados o principal mecanismo efetor da imunidade adaptativa humoral. Observe-se na Figura 2.5 as principais funções efetoras dos anticorpos. Como já mencionado, os anticorpos são produzidos pelos linfócitos B, e eles têm a mesma especificidade que elas. Assim, os linfócitos B só produzem anticorpos quando têm contato com um antígeno para o qual são específicos. Uma célula B ativada pode produzir até quatro mil células produtoras de anticorpos (plasmócitos), e estas podem produzir até 1012 partículas de anticorpos por dia. (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

Diferentemente dos linfócitos T, as células B não precisam que os antígenos sejam apresentados a elas por APC, elas possuem receptores especiais (BCR), que nada mais são do que anticorpos ligados à membrana do linfócito B, que são capazes de reconhecer os antígenos. Após reconhecerem o antígeno, o linfócito B se torna ativado. No entanto, dependendo da natureza do antígeno, só o seu reconhecimento não é o suficiente para que esse linfócito comece a produzir anticorpos: em alguns casos, os linfócitos B ainda necessitam de co-estimuladores oriundos dos linfócitos T ativados. Por

este motivo, diz-se que os linfócitos B possuem dois tipos de ativação: dependentes de T ou independentes de T. A Figura 2.6 ilustra o processo de ativação do linfócito B.

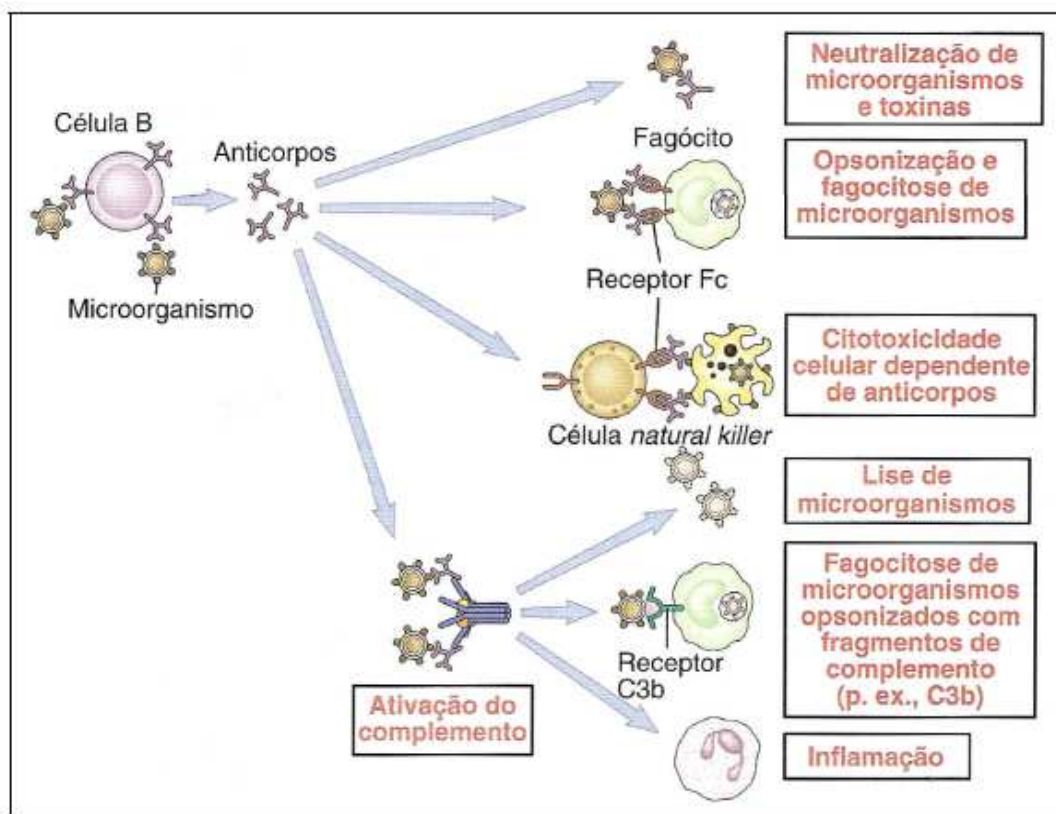


Figura 2.5. Funções efetoras dos anticorpos.
Fonte: (ABBAS & LICHTMAN, 2007)

Na ativação dependente de T, os antígenos normalmente são proteínas. Nestes contextos, as APC capturam os antígenos, apresenta-os aos linfócitos T que, caso ativados, vão de encontro aos linfócitos B, ligando-se a eles e os co-estimulando, para que comecem a produzir anticorpos. Essa interação (como todas as descritas na imunidade adaptativa) é antígeno-específica, ou seja, o linfócito T só ativa os linfócitos B que também sejam específicos para o antígeno em questão.

Já na ativação independente de T, os antígenos normalmente não são reconhecidos pelos linfócitos T. Eles são capturados pelos linfócitos B no linfonodo e fagocitados. Já no seu interior, eles são processados. A presença de moléculas de complemento aderidas ao antígeno fagocitado servem de sinal para os linfócitos B (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

Os linfócitos B também são APC, e possuem MHC-II, cujo objetivo é apresentação de antígenos. Assim, quando encontram os linfócitos T, são capazes de apresentar os antígenos capturados a estes. Os linfócitos T não irão reconhecer a mesma parte do antígeno que os linfócitos B reconheceram, mas podem reconhecer outras partes, que ficaram expostas depois do processamento. Caso isso ocorra, os linfócitos B são

ativados, diferenciam-se em células secretoras de anticorpos (plasmócitos) e podem migrar para os locais de infecção, ou permanecer no linfonodo (linfócito B germinativo). Os anticorpos produzidos são levados pela circulação, e circulam por todo o organismo.

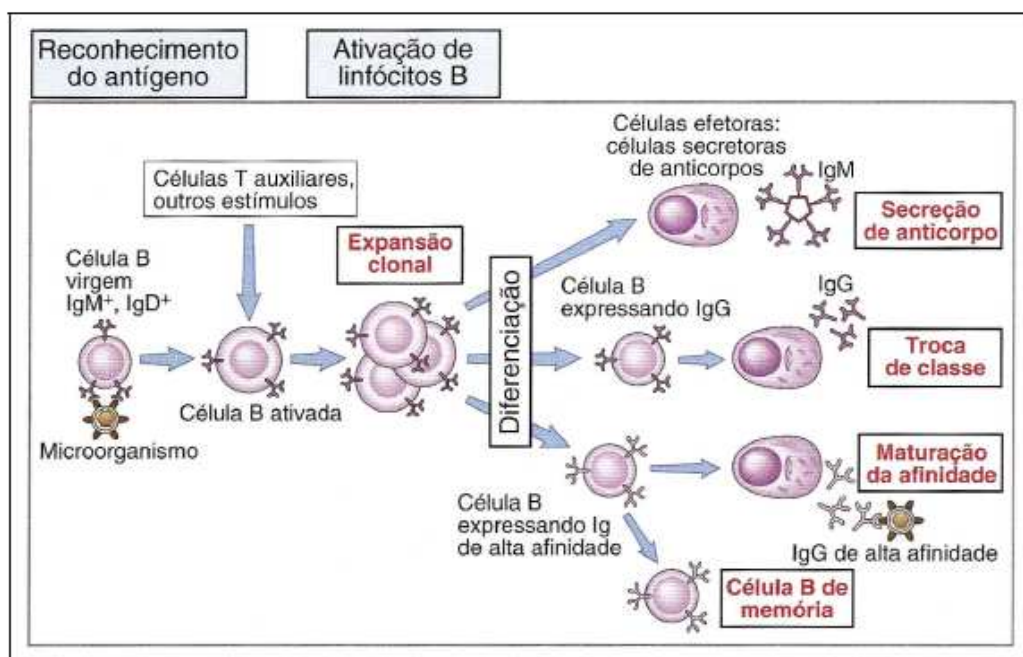


Figura 2.6. Ativação dos linfócitos B.
Fonte: (ABBAS & LICHTMAN, 2007, p. 136)

À medida que os patógenos vão sendo neutralizados, os estímulos antigênicos vão cessando, e a resposta entra em declínio. Outro mecanismo utilizado pela célula B para o declínio da atividade imunológica é o reconhecimento dos chamados imunocomplexos, que são antígenos ligados a anticorpos. Quando uma célula B detecta um antígeno já ligado a um anticorpo, é estimulada de forma negativa, a não mais produzir anticorpos. Esse processo é chamado de *feedback* de anticorpo, e sua função é indicar à imunidade humoral quando uma quantidade suficiente de anticorpos já foi produzida (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

Outras células, chamadas de células secretoras de anticorpos de longa duração, migram para a medula óssea onde podem viver muitos anos, e continuam a secretar pequenas quantidades de anticorpos. Caso haja necessidade (outra infecção), o patógeno já irá se encontrar com anticorpos prontos para neutralizá-lo. Já os linfócitos B de memória sobrevivem ao declínio e podem viver também por muitos anos. Estes não secretam anticorpos, mas ficam esperando por um novo contato com o antígeno para o qual são específicos e, caso encontrem, se diferenciam rapidamente em células secretoras de anticorpos. Um dos objetivos da vacinação é estimular a geração destes dois tipos de células para os patógenos da vacina (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

2.1.2.2 - Imunidade Adaptativa Celular

A imunidade adaptativa celular é o braço do SI adaptativo responsável por combater as infecções causadas por patógenos intracelulares (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

Os patógenos, por sua vez, podem se tornar intracelulares de duas formas distintas: primeiro, sendo propositalmente fagocitados por macrófagos, mas conseguindo resistir aos mecanismos de eliminação no seu interior, podendo até escapar para dentro do seu citoplasma; e, em segundo lugar, alguns patógenos conseguem aderir à membrana de algumas células e então infectá-las (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

A principal célula responsável pela imunidade adaptativa celular é o linfócito T (ROITT & DELVER, 2006). Como visto, a ativação deste linfócito possui fases distintas, que começa com o reconhecimento do antígeno apresentado pelas APC, sua subsequente ativação, ação contra os patógenos e eliminação, como parte do declínio da resposta imunológica. A Figura 2.7 ilustra esse processo.

Na fase de reconhecimento, uma célula APC que migrou para o linfonodo se liga ao linfócito T apresentando os antígenos que ela capturou. Como dito anteriormente, a célula APC precisa estar ativada para que consiga estimular a ativação dos linfócitos T. Os receptores das células Th reconhecem antígenos apresentados pelo MHC-II, enquanto os receptores das células CTL reconhecem apenas antígenos apresentados pelo MHC-I.

As APC podem apresentar antígenos tanto através do MHC-II quanto pelo MHC-I (no caso de antígenos presentes no citoplasma da mesma) (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2008). Mas como a APC é capaz de capturar antígenos de patógenos intracelulares? Segundo ABBAS E LICHTMAN (2007), as APC são capazes de fagocitar as células infectadas por inteiro, e processá-las, extraindo as informações sobre os patógenos que estavam presentes nelas, e então, apresentar os antígenos.

Após serem ativados, os linfócitos começam a expansão clonal, aumentando muito o número de células específicas para o antígeno que desencadeou a resposta. Durante esse processo, as células também sofrem diferenciação. Nesse processo, os linfócitos, antes células de reconhecimento de antígeno, se transformam em células efetoras, e ativam seus mecanismos de combate (Figura 2.8). Apesar de alguns permanecerem no linfonodo, os linfócitos ativados tendem a migrar para o local da infecção. Os linfócitos T e CTL possuem mecanismos efetores bem distintos, que serão discutidos a seguir.

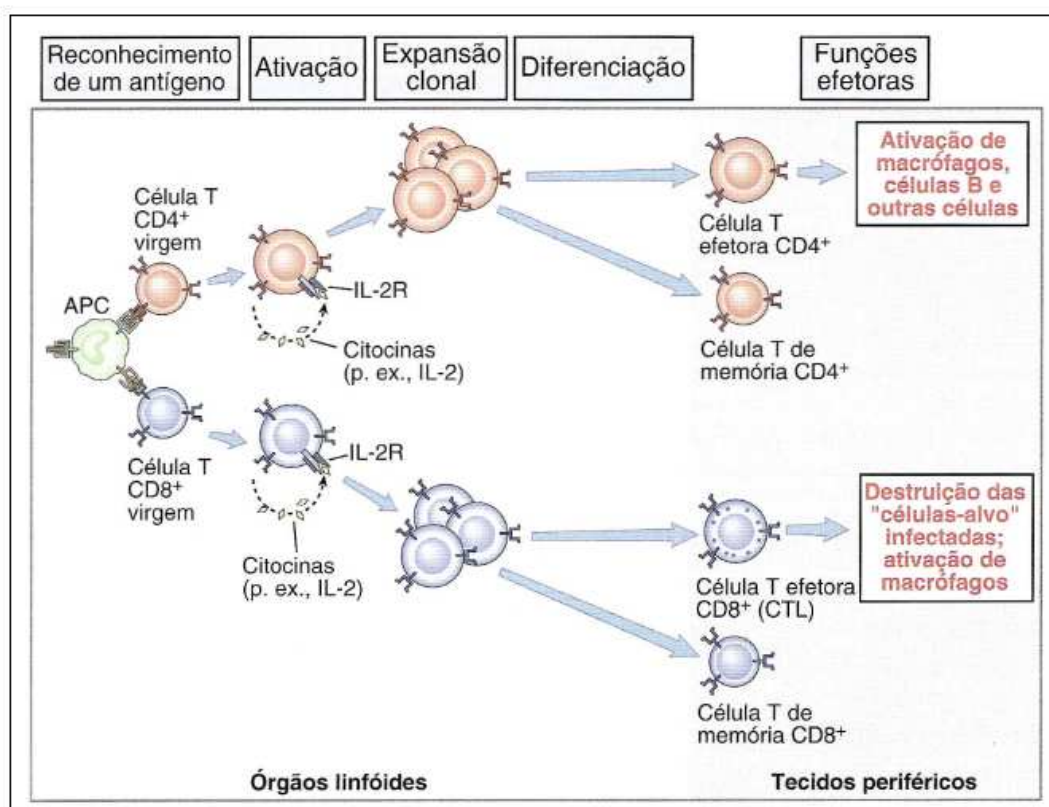


Figura 2.7. Ativação dos linfócitos T.

Fonte: (ABBAS & LICHTMAN, 2007, p. 93)

A principal função dos linfócitos Th é estimular as demais células, e guiar o avanço da resposta imunológica. Por este motivo, seu principal mecanismo efetor é a expressão aumentada de algumas moléculas sinalizadoras em sua superfície e a liberação de citocinas.

Esses linfócitos atuam principalmente estimulando os macrófagos (a produzirem mais substâncias microbicidas para que ele destrua os patógenos que fagocitou) e as APC (fornecendo um “*feedback*” que prolonga a vida da APC, afinal ela está sendo útil). Eles também estimulam os linfócitos B (estimulando a produção de anticorpos), como foi visto anteriormente.

Já os linfócitos T CD8⁺ ativados se diferenciam em CTL (linfócitos T citotóxicos), que produzem substâncias capazes de matar outras células. Esses linfócitos migram para os locais de infecção, onde são capazes de reconhecer antígenos apresentados pelas células do tecido, através do MHC-I. Caso as células estejam apresentando antígenos para os quais o CTL tem afinidade, há liberação de substâncias por esta última, eliminando a célula infectada. É interessante notar que alguns patógenos desenvolveram estratégias para, após infectar uma célula, inibir a apresentação de antígenos através do MHC-I; no entanto, as células NK reconhecem células que não estão expressando o complexo MHC-I, e as destroem. Uma parte dos linfócitos T ativados se diferencia em células T de memória. Essas células sobrevivem à erradicação da infecção

e ao declínio da resposta imunológica, não sofrendo apoptose como outras células, tendo um período de vida bastante longo, podendo chegar a muitos anos. Elas podem ser encontradas nos tecidos linfóides, nas mucosas e na circulação (ABBAS & LICHTMAN, 2007), no entanto, não produzem mais citocinas, nem destroem células infectadas.

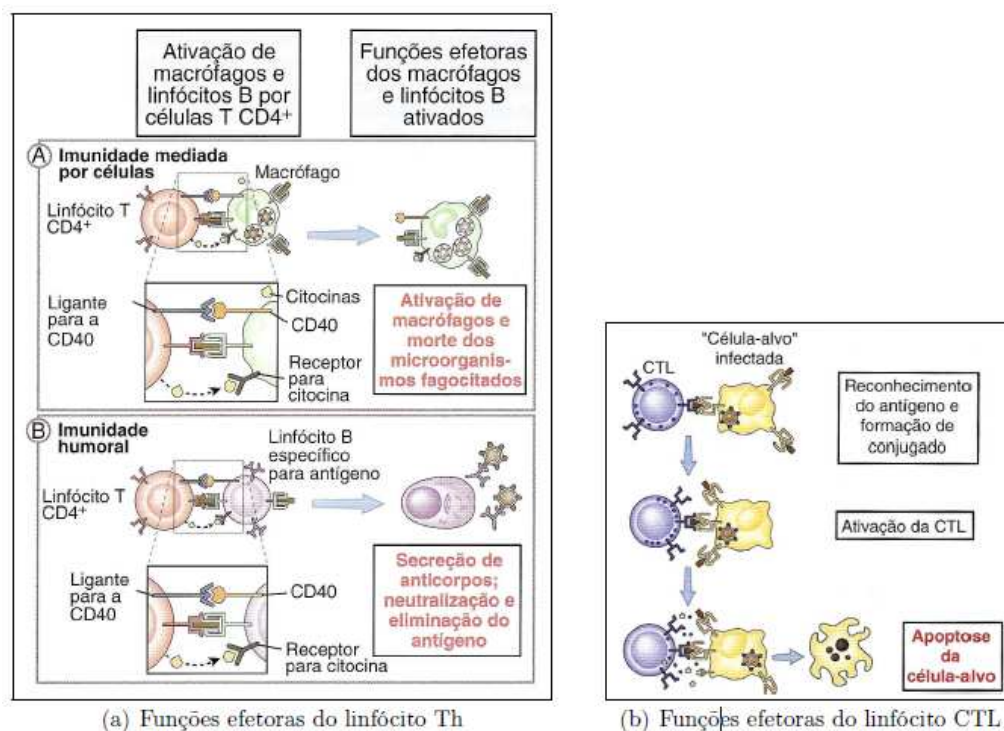


Figura 2.8. Funções efetoras dos linfócitos.

Fonte: (ABBAS & LICHTMAN, 2007, p. 105, 129)

Um primeiro grupo de células – as chamadas de células de memória central – permanecem nos órgãos linfóides e podem desencadear uma expansão clonal rapidamente caso encontrem com o antígeno que as originou. Outro grupo – denominado células de memória efetoras –, localizam-se nas mucosas, e podem reagir rapidamente contra antígenos que reaparecerem nestes locais (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

Os PRR dos linfócitos não têm um alvo definido, como no caso da imunidade inata, em que as PAMP são o alvo. No lugar disso, os linfócitos são gerados com PRR aleatórios. É isso que permite ao sistema imune adaptativo reconhecer microrganismos novos, que passaram pela imunidade inata. No entanto, como os PRR dos linfócitos são gerados ao acaso, existe a possibilidade destes terem afinidade com tecidos do próprio organismo, sendo assim chamado de autorreativos, o que poderia gerar danos ao organismo, fato conhecido como *autoimunidade*. Para evitar esse tipo de problema, o sistema imune adaptativo possui estratégias rígidas de geração e ativação de linfócitos, para impedir que estes não reajam contra o próprio organismo. Estes mecanismos são a tolerância central, composta pela seleção positiva e negativa, e a tolerância periférica.

A tolerância central ocorre na geração dos linfócitos. Os linfócitos B são gerados na medula óssea e os linfócitos T no timo. Durante seu processo de maturação, eles são

expostos a vários estímulos e sua continuidade neste processo depende de suas reações. Por exemplo, na seleção positiva, os linfócitos são expostos a antígenos: os que se ligam a estes continuam. Já os que não se ligam, mostram-se inúteis, e são destruídos. Já na seleção negativa é o inverso: os linfócitos são apresentados a antígenos do próprio corpo: os que se ligam fortemente, mostram-se autorreativos e são destruídos.

Uma vez maduros, os linfócitos migram para suas principais regiões de atuação: os linfonodos. Nos linfonodos circula a linfa, um fluído presente no epitélio e nos tecidos conjuntivos. Esse fluído é drenado de várias regiões do corpo e passam pelos linfonodos. A linfa traz consigo células especiais, chamadas de células dendríticas. A função destas células é fagocitar antígenos por todo o corpo – ou seja, são APC – e apresentá-los aos linfonodos. Ademais, possuem em sua superfície moléculas especiais conhecidas como complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II. Os linfócitos T examinam as APC verificando se reconhecem ou não os antígenos apresentados por estas.

Além disso, as células dendríticas trazem consigo a informação sobre se o local onde aquele antígeno foi fagocitado era uma zona de perigo ou não. Essa informação é o que gera a tolerância periférica. Se o linfócito T reconhecer o antígeno apresentado que fora fagocitado em uma zona livre de perigo, então é provável que este linfócito seja reativo a antígenos inofensíveis, talvez pertencentes ao próprio corpo. Neste caso, ou são destruídos, ou modificam seus PRR para reconhecer antígenos diferentes. Já se o linfócito reconhecer um antígeno apresentado pela APC que fora fagocitado em uma zona de perigo, então esse linfócito é ativado e começa a se proliferar e migrar para o local da infecção.

Os linfócitos *Th* ativados estimulam os linfócitos B que, ao encontrarem com o antígeno, se diferenciam em plasmócitos e em células B de memória, e começam a secretar anticorpos específicos para o antígeno que iniciou a reação. Estes mesmos linfócitos *Th* também ativam os macrófagos para que aumentem a taxa de fagocitose e de destruição dos microrganismos fagocitados.

Já os linfócitos CTL ativados inspecionam as células do corpo através do MHC classe I. Toda célula do corpo apresenta em sua superfície o MHC classe I, com exceção das células imunológicas que apresentam antígenos com o MHC classe II. Quando o linfócito CTL inspeciona o MHC classe I das células do corpo, ele consegue ter uma ideia do que está acontecendo dentro da célula, e se ela está abrigando microrganismos, por exemplo. Se este for o caso, o linfócito CTL mata a célula. Este também é o mecanismo de destruição de células com mal funcionamento, como as células cancerosas. Normalmente elas apresentam alterações no MHC, levando os linfócitos CTL a destruí-las.

Quando os linfócitos foram ativados, eles deixaram os linfonodos e foram ao encontro do local da infecção, seja qual for esse local no corpo. Entretanto, enquanto a infecção vai sendo controlada, os estímulos que ativaram os linfócitos vão diminuindo gradualmente, sendo privados de fatores de sobrevivência. Isso os leva à apoptose (morte celular programada). A resposta desaparece de uma a duas semanas após a erradicação da infecção, e o único sinal de que ocorreu uma resposta imunológica são os linfócitos de memória que sobrevivem.

Nos tecidos linfóides periféricos, encontram-se populações distintas de linfócitos B, diferenciáveis pelas moléculas expressas na superfície celular. Por exemplo, linfócitos B de memória são diferentes dos linfócitos B *naïve* pela presença na sua membrana, de outras classes de Ig que não IgM ou IgD expressas nas células *naïve*.

Como visto, toda vez que um linfócito é ativado, durante sua proliferação, surgem versões dele, chamadas de linfócitos de memória, que têm como objetivo manter a informação sobre essa primeira resposta ao antígeno, chamada de resposta imunológica primária. Caso haja uma segunda exposição pelo mesmo antígeno ocorrerá a chamada resposta imunológica secundária, mais rápida, ampla e capaz de eliminar o antígeno de forma mais eficiente do que a resposta primária. Esse mecanismo de memória otimiza a habilidade do sistema imune em combater infecções persistentes e recorrentes, pois cada encontro com o microrganismo gera mais células de memória e ativa células de memória já existentes.

2.1.3 - O sistema Complemento

O sistema complemento serve como um efetor das imunidades inata e adquirida. O complemento envolve mais de trinta proteínas circulantes e fixadas à membrana para atuar em uma grande variedade de respostas do hospedeiro, reações inflamatórias, homeostáticas e imunes. A capacidade do complemento de eliminar determinadas bactérias é que levou a sua descoberta. Os primeiros nove componentes do complemento foram caracterizados como proteínas individuais e receberam as designações de C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9. Como se sabe atualmente, essas proteínas constituem via clássica da ativação do complemento, assim denominada por ter sido a primeira a ser investigada. No final dos anos 80, as proteínas da via alternativa foram purificadas e foi possível reconstruir a via funcional alternativa utilizando somente componentes purificados. A seqüência conhecida de ativação para via alternativa foi C3b (CALICH & VAZ, 2009).

2.1.3.1 - As vias de ativação e suas proteínas

A ativação do complemento pode ser considerada como um processo em três etapas: 1) reconhecimento, 2) ativação enzimática e 3) expressão das atividades biológicas. Cada via apresenta proteínas e enzimas exclusivas para as duas primeiras

etapas, mas as atividades resultantes são as mesmas para as três (Figura 2.9). É importante lembrar que a ativação do complemento é um processo dinâmico com várias etapas interativas entre os componentes de diferentes vias e com o plasma ou com outros sistemas enzimáticos derivados das células. Embora alguns compostos ativem uma via, outros podem envolver vias diferentes, incluindo mecanismos externos ao sistema complemento. As vias de ativação são: *Via clássica*, *Via da Lectina*, *Via Alternativa* e *Via Terminal* (CALICH & VAZ, 2009).

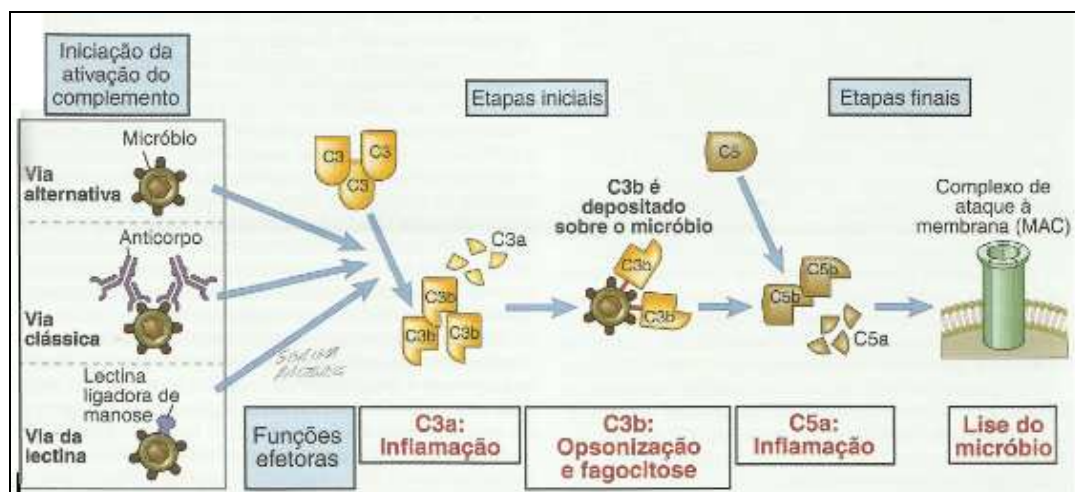


Figura 2.9. Vias de ativação do complemento.

Fonte: (ABBAS *et al.*, 2008, p. 43)

A **Via Clássica** de ativação ocorre quando C1(C1q-r₂S₂) liga-se a uma substância ativadora como um complexo antígeno-anticorpo (CALICH & VAZ, 2009). A ligação do C1q às imunoglobulinas se dá através das ligações iônicas e hidrofóbicas entre as regiões das cabeças globulares do C1q e a região Fc da imunoglobulina, sendo, desta forma, afetada pela força iônica (elevando a força iônica acima dos níveis fisiológicos ocorrerá a dissociação da interação, enquanto o decréscimo desta promove a ligação mais forte). Entre as imunoglobulinas do *H. sapiens sapiens*, a ordem decrescente da capacidade de ligar C1 é IgM>IgG3>IgG1>>IgG2. IgA, IgE e IgD não se ligam ou ativam C1. A via lectina é considerada similar à via clássica: MBL liga-se aos resíduos ou outra substância e passa por uma mudança conformacional semelhante à de C1q. A via alternativa é ativada inicialmente se houver presença da pré-formada C3b, ou de uma forma de C3 variavelmente conhecida como “C3 semelhante à C3b” ou “C3.H₂O”. A ligação de C3b ao carboidrato acceptor ou a moléculas de proteína foi considerada aleatória por longos períodos, mas experimentos recentes mostraram que há um número limitado de resíduos ao qual o toliéster se liga. Em função da curta meia vida do C3b, ele fica depositado nas superfícies e tende a estar localizado em grupos ao redor da enzima ativadora, e alguns se ligarão ao C4b ou C3b da própria enzima. Por último, na via terminal, a clivagem de C5 produz dois fragmentos: C5a apresenta propriedades de potentes anafilatoxinas e é altamente quimiotática para neutrófilos e outras células inflamatórias, e C5b forma núcleo

para formação de ataque a membrana (MAC), consistindo em componentes do complemento C5b-9, MAC pode levar à lise ou à formação do complexo terminal do complemento de fase líquida.

2.1.3.2 - Atividades Biológicas do Complemento

O sistema complemento apresenta várias funções que protegem o hospedeiro. A primeira delas é a sua capacidade de eliminar microrganismos diretamente ou aumentar sua ingestão e lise por células fagocíticas. Todas as três vias estão envolvidas em iniciar a eliminação bacteriana e opsonização, mas a via alternativa é a mais eficiente neste último processo. Indivíduos que não apresentam uma das proteínas da via alternativa (P, D, B), componentes tardios (C3-C9) ou uma das proteínas controle (H ou I) tendem a adquirir infecções graves com organismos piogênicos. Eles são particularmente suscetíveis a infecções por espécies do gênero de *Neisseria*, sobretudo *Neisseria meningitidis*. Deficiências nos componentes da via clássica (C1, C4, C2) estão também associadas ao aumento do risco de infecção, embora não tão fortemente comparado ao anterior. Bactérias associadas a infecções recorrentes nestes pacientes incluem, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Staphylococcus aureus*, mas não estão limitadas somente a elas. As deficiências em complementos são relativamente raras (1 em 10000 pessoas) e não estão sempre associadas a doença, já que indivíduos deficientes em complemento são diagnosticados somente após um membro da família ter sido identificado (CALICH & VAZ, 2009).

Além da eliminação dos complexos imunes, o complemento auxilia na limpeza dos tecidos mortos e de substâncias estranhas. A ativação do complemento em um local inflamatório por membranas alteradas pela oxidação, atividade enzimática ou expressão de neoantígenos leva à deposição de C4b e C3b, que podem interagir com CR1 e CR3 em células fagocíticas. As membranas subcelulares da mitocôndria, retículo endoplasmático ou outras organelas ativam diretamente as vias clássicas e alternativas, tornando-as reconhecidas por células fagocíticas que apresentam receptores para C3.

2.2 - Bactérias

As bactérias de importância médica podem apresentar formas esféricas – comumente chamadas de cocos –, cilíndricas – ou bacilos – e espiraladas (Figura 2.10). Os cocos podem ser ovais, alongados ou achatados em uma das extremidades. Quando as bactérias em forma de cocos se dividem, as células podem permanecer unidas aos pares (diplococos), cadeias (estreptococos) e cachos (estafilococos) (Figura 2.11). Menos frequentes são aqueles cocos que se dividem em dois ou três planos e permanecem unidos em grupos cúbicos de oito indivíduos (sarcinas).

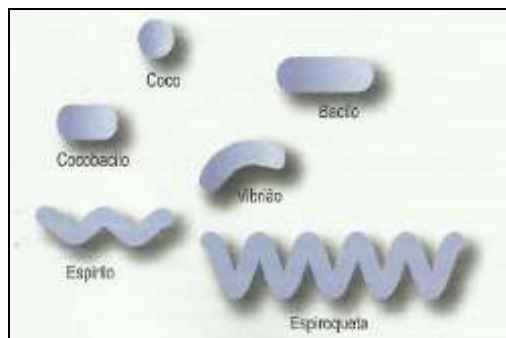


Figura 2.10. Principais formas das bactérias
Fonte: (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008)

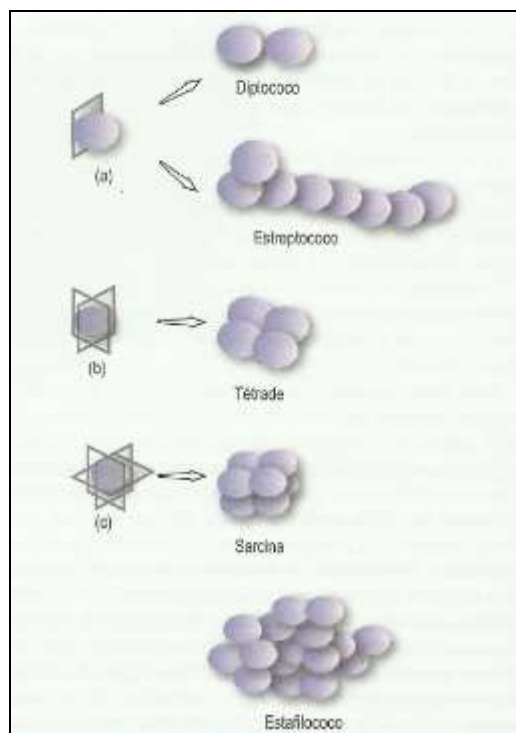


Figura 2.11. Formas de agrupamento dos cocos.
Fonte: (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008)

A forma das bactérias é uma característica genética e geralmente as bactérias são monomórficas, isto é, tem uma única forma (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Algumas condições ambientais e de cultivo podem fazer com que os organismos apresentem formas ou arranjos diferentes. Uma vez que os microrganismos são transparentes, é frequente o uso de corantes para melhor visualização da forma e do tipo de arranjo. Os métodos de coloração mais empregados são os de Gram e de Ziehl-Neelsen.

O termo Gram tem origem no nome de Christian Gram, pesquisador dinamarquês que, em 1884, desenvolveu, de maneira empírica, o método de coloração que passou a ter seu nome e que permite dividir as bactérias em dois grandes grupos: gram-positivas e gram-negativas. O método de Gram consiste, essencialmente, no tratamento sucessivo de um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com os seguintes reagentes: cristal violeta, lugol, álcool e fucsina. Toda bactéria, absorve de maneira idêntica o cristal violeta e o lugol, adquirindo a cor roxa devido ao complexo formado pelas duas substâncias na parede celular. Entretanto, ao serem tratadas pelo álcool, apresentam comportamentos diferentes: as Gram-positivas mantêm a cor violeta-lugol, enquanto as gram-negativas tornam-se descoradas. Ao receber a fucsina, somente as gram-negativas se deixam corar, ficando da cor avermelhada do corante (GOMES *et al.*, 2012). Assim, examinando-se o esfregaço bacteriano corado pelo método de Gram, as bactérias gram-positivas tem a cor roxa, enquanto as gram-negativas tem a cor avermelhada (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

2.2.1 - Estrutura química

Como mostra à Figura 2.12, as paredes das bactérias gram-negativas e gram-positivas apresentam diferenças marcantes. Bactérias gram-positivas tem a parede mais espessa, no entanto, apresenta somente um tipo de macromolécula. Já as gram-negativas possuem paredes compostas de várias camadas que diferem na sua composição química e, conseqüentemente, é mais complexa que as gram-positivas. O conhecimento das diferenças entre as paredes de bactérias gram-positivas e gram-negativas é da mais alta relevância para o estudo dos mecanismos de ação dos antimicrobianos e quimioterápicos e de patogenicidade, dentre outros, relacionados diretamente à composição química e estrutura da parede bacteriana (TAVARES, 2009).

2.2.1.1- Gram-positivas

Nas bactérias gram-positivas, 70 a 75% da parede são compostos de peptidoglicano. Encontram-se, igualmente, proteínas e ácidos teicóicos que podem representar até 50% da massa seca da parede. O termo ácido teicóico inclui todos os polímeros formados por resíduos de glicerol ou ribitol unidos por ligações fosfodiéster, sejam eles encontrados na parede, sejam encontrados na membrana plasmática da célula. Todavia, os ácidos teicoicos tem sido divididos em dois tipos: ácidos teicoicos de parede ligados ao peptidoglicano e ácidos lipoteicóicos (LTA) que, apesar de serem encontrados ao longo da parede, encontram-se intimamente ligados à fração lipídica da membrana plasmática (Fig 2.12A) (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

As propriedades dos ácidos teicoicos são (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008):

(a) facilitar a ligação e a regulação da entrada e saída de cátions na célula, graças ao grupo fosfato que confere uma carga negativa à molécula que se encontra voltada para o lado externo;

(b) regular a atividade das *autolisinas* durante o processo de divisão celular. Quando uma célula bacteriana se prepara para se dividir, ocorre o crescimento da parede celular e enzimas denominadas *autolisinas* atuam sobre o peptidoglicano no sentido de romper seus componentes em pontos específicos, permitindo assim a inserção de novas subunidades. Além disso, atuam na regulação dessas *autolisinas*, impedindo que quebras excessivas ocorram, provocando lise celular;

(c) constituir sítios receptores de bacteriófagos;

(d) servir de sitio de ligação com o epitélio do hospedeiro em algumas bactérias patogênicas. Por exemplo, no *Streptococcus pyogenes* o ácido lipoteicóico, juntamente com a proteína M, facilita a ligação da bactéria ao receptor da mucosa respiratória;

(e) constituir, graças à sua localização na célula, importantes antígenos celulares tornando possível a identificação sorológica de muitas bactérias gram-positivas.

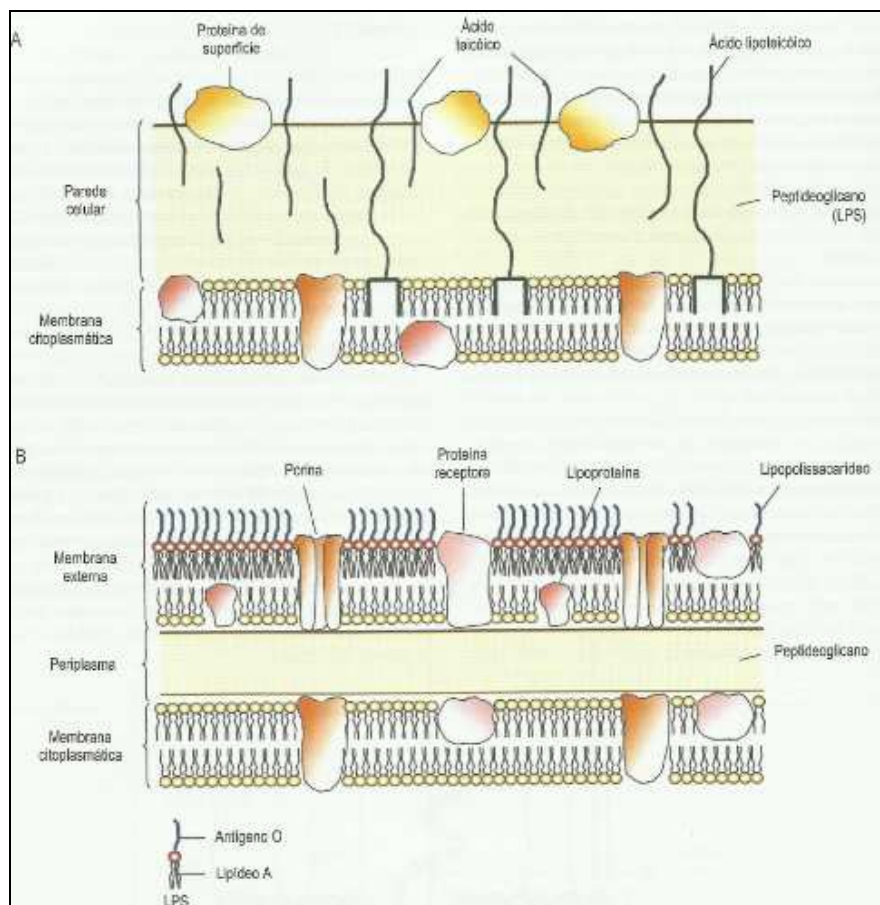


Figura 2.12. Representação esquemática da diferença estrutural entre as bactérias Gram-positivas (A) e Gram-negativas (B).

Fonte: (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008)

2.2.1.2 - Gram-negativas

A parede das bactérias gram-negativas é mais complexa. Ela é formada por uma ou poucas camadas de peptidoglicano e por uma membrana externa. O espaço que separa a membrana citoplasmática da membrana externa é chamado espaço periplasmático (Fig. 2.12B).

O peptidoglicano liga-se à membrana externa por uma lipoproteína e está embebido no gel periplasmático que contém alta concentração de enzimas degradadoras e proteínas de transporte. Devido à menor concentração de peptidoglicano, a parede das bactérias gram-negativas é mais suscetível a quebras quando comparadas a de bactérias Gram-positivas. Os ácidos teicóicos não estão presentes em bactérias gram negativas (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

A membrana externa das bactérias gram-negativas é formada por dupla camada lipídica, uma cama interna de fosfolipídeos, e uma externa contendo lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas. O LPS é constituído de um lipídeo complexo (Lipídeo A), ao qual está

ligado um polissacarídeo chamado antígeno O ou antígeno somático. Os açúcares que formam a cadeia lateral deste polissacarídeo variam entre as espécies e, por isso, são responsáveis pelas características antigênicas em bactérias gram-negativas. O LPS é chamado também de endotoxina, pois é tóxico, provocando muitas respostas fisiológicas, como febre em animais, incluindo o homem (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

A membrana externa das bactérias gram-negativas é um mosaico fluido com um conjunto de proteínas imersas na matriz lipídica. As principais proteínas conhecidas são: (1) Porinas – formam poros que propiciam passagem passiva de solutos; (2) Proteínas da membrana externa (*Outer membrane proteins* – OMPs): estruturalmente diferentes das porinas, também estão envolvidas no transporte de alguns solutos; (3) Lipoproteínas: proteínas com função estrutural, fazendo a ponte entre o peptidoglicano e a camada interna de fosfolípidos da membrana externa. A forte carga positiva proveniente dos polissacarídeos localizados na membrana externa constitui fator importante na evasão destas bactérias à ação fagocitária e ao complemento durante invasão do hospedeiro. Além disso, essa membrana constitui uma barreira adicional à entrada de algumas substâncias como antimicrobianos – por exemplo, penicilina (SIQUEIRA-BATISTA & GOMES, 2010) –, lisozima, detergentes, metais pesados, corantes e outros. Esta camada externa tem uma permeabilidade parcialmente seletiva, graças a existência das porinas, uma vez que nutrientes passam através dela para chegar à membrana citoplasmática (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

2.2.2 - Microbiota habitual do corpo humano

A formação da microbiota habitual – com a qual o *H. sapiens sapiens* convive por toda a vida –, tem início no momento do nascimento, pois, ao passar pelo canal do parto, ele recebe os primeiros componentes de sua microbiota. A microbiota habitual distribui-se pelas partes do corpo que estão em contato com o meio externo, isto é, pele e mucosas. Todavia, tanto no que se refere a quantidade, quanto a qualidade, a microbiota não é uniforme. Na verdade, cada uma das regiões habitadas possui uma microbiota com características próprias (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

A microbiota cutânea se distribui por toda extensão da pele e é mais concentrada, entretanto, nas áreas mais úmidas e quentes como axilas e períneo. A variação da quantidade de bactérias estimadas na pele está entre 10^4 bactérias por área, chegando a 10^6 bactérias nas áreas mais úmidas (KONG & SEGRE, 2012). Predominam na pele as bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*. Menos frequentemente os *Streptococcus* (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

A maioria das bactérias da pele reside na superfície do estrato córneo e na parte superior dos folículos pilosos. Algumas, entretanto, residem mais profundamente. Estas

têm a função de recolonizar a pele quando as bactérias mais superficiais são removidas, por exemplo, após uma lavagem cuidadosa. Esta conduta pode diminuir em cerca de 90% o número total de *microrganismos* existentes na pele. Dentro de oito horas, contudo, o número destes é normalizado (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

A microbiota da cavidade oral é bastante grande e diversificada. Calcula-se que a saliva contém 10^8 bactérias/ml e as placas dentais 10^{11} . Participam da microbiota da cavidade oral numerosos gêneros, tais como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Bacteroides*, *Actinomyces*, *Treponema*, *Mycoplasma*, dentre outros. A microbiota encontrada na faringe é semelhante à da encontrada na cavidade oral (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Essa cavidade oral tem grande importância em odontologia e em medicina. A cárie dentária, as doenças periodontais, actinomicoses e endocardites subagudas são todas doenças causadas por membros da microbiota da cavidade oral.

Quanto ao número de bactérias da microbiota intestinal, é dez vezes maior que o número de células que formam nossos órgãos e tecidos, isto é, 10^{14} bactérias para 10^{13} células humanas (PURCHIARONI *et al.*, 2013; TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). As bactérias da microbiota intestinal são encontradas nos intestinos delgado e grosso de acordo com a tabela 2.1.

Estômago e Duodeno	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i>
Jejuno e íleo	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Fusobacterium</i>
Cólon	<i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus</i>

Tabela 2.1 – Distribuição e composição da microbiota do trato gastrointestinal.

Fonte: (TRABULSI;ALTERTHUM, 2008)

A microbiota da vagina varia com a idade, pH e secreção hormonal. Dependendo do período de vida da mulher, haverá predomínio de *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Escherichia coli*. Já a uretra anterior contém quantidade variável de bactérias, representadas por *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium* spp., *Enterococcus faecalis* e, as vezes *Escherichia coli*.

2.2.3 - Infecções bacterianas

As infecções bacterianas têm tido um papel marcante na história da humanidade. Desde tempos remotos, diversos agentes bacterianos têm sido responsáveis por doenças endêmicas ou epidêmicas que tiveram efeitos devastadores sobre a população humana (TAVARES, 2009). Elas podem ser divididas em dois grandes grupos: exógenas e endógenas. Exógenas são as infecções cujos agentes atingem o hospedeiro a partir de um reservatório ou fonte externa; Endógenas são as infecções causadas por agentes da microbiota habitual do próprio hospedeiro (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Quando a bactéria se instala com sucesso no hospedeiro, ela o infecta, podendo ou não provocar doença. Denomina-se infecção a multiplicação da bactéria ou outro agente microbiano no organismo do hospedeiro; no entanto, a doença só ocorre quando a bactéria expressa seu efeito patogênico e provoca manifestações clínicas (SIQUEIRA-BATISTA & GOMES, 2009). Estas são precedidas de um intervalo de tempo denominado período de incubação, que corresponde ao primeiro ciclo de multiplicação da bactéria no organismo. Esse é o período que a bactéria, sobrepujando os mecanismos de resposta imune do organismo, proliferar-se o suficiente para dar início a manifestações clínicas da doença.

2.2.3.1 - Efeitos da invasão celular sobre as células do hospedeiro e sobre as bactérias

As células do hospedeiro podem responder de várias maneiras à ação patogênica bacteriana. As respostas mais conhecidas incluem a produção de citocinas e prostaglandinas, bem como morte celular que pode ser necrose ou apoptose (morte programada). Quanto às bactérias, os efeitos mais importantes dizem respeito à necessidade de regular a expressão de seus genes de virulência para se adaptarem aos microambientes onde são obrigadas a sobreviver (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

2.2.3.2 - Virulência

Fatores de virulência são estruturas, produtos ou estratégias que contribuem para a bactéria aumentar sua capacidade de causar uma infecção (TAVARES, 2009). Estratégias utilizadas pelas bactérias para contornar ou sobrepujar as respostas inata e adaptativa do organismo (fagocitose, complemento, citocinas, linfócitos citotóxicos e anticorpos), situadas abaixo da pele e mucosas são definidas como *evasinas* (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

2.2.3.3 - Adesão das bactérias

A adesão não é um fenômeno puramente físico (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). De fato, tanto a bactéria como a célula do organismo responde ao processo de adesão. A influência da adesão no comportamento da bactéria tem sido investigada, de modo que já foi demonstrado que vários aspectos do mesmo podem ser modificados. Por exemplo, o crescimento pode ser estimulado ou inibido, a expressão de certas fimbrias é induzida pelo contato da bactéria com a célula e, o mais importante, certas proteínas somente são secretadas depois que a bactéria se adere às células do organismo. Já o organismo do hospedeiro responde produzindo citocinas ou incorporando a bactéria em um processo de fagocitose.

2.2.3.4- Curvas de crescimento

Quando uma bactéria é semeada em um meio líquido de composição apropriada e incubada em temperatura adequada, o seu crescimento segue uma curva definida e

característica. Essa curva pode ser arbitrariamente dividida em quatro fases (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008): (1) fase de lag; (2) fase logarítmica; (3) fase estacionária; (4) fase de declínio.

A **Fase de lag** é considerada um período de adaptação. Em condições favoráveis, a mesma tende a ser menor. Durante o crescimento de uma bactéria num determinado meio, a síntese de muitas enzimas não requeridas para o desenvolvimento naquele meio é parcial ou totalmente reprimida.

A **Fase logarítmica** ou exponencial é aquele período durante o qual a multiplicação é máxima e constante. Bactérias crescem e se reproduzem assexuadamente por fissão binária. Cada duplicação do número de organismos numa cultura representa uma nova geração.

Na **Fase estacionária** a velocidade de multiplicação diminui gradualmente, até que se anule. O número de bactérias presentes, por unidade de volume, permanece constante por um tempo determinado. Durante essa fase, o número de bactérias novas que se formam contrabalança com o número daquelas que estão morrendo. A falta de nutrientes e o acúmulo de materiais tóxicos no meio podem cessar o crescimento de uma cultura.

Na **Fase de declínio** os microrganismos gradualmente diminuem em número até que a cultura se torne estéril, ou seja, todos os microrganismos morrem.

2.3 - *Streptococcus pyogenes*

Também conhecido como *Streptococcus* do grupo A ou GAS (*Group A Streptococci*) é a principal representante dos *Streptococcus* β -hemolíticos, e forma cadeias relativamente longas se cultivada em caldo. As necessidades nutritivas são complexas, mas, de modo geral, crescem bem em ágar sangue e em meios líquidos contendo glicose. O antígeno polissacarídeo específico do *S. pyogenes* (antígeno do Grupo sorológico A de Lancefield) é um polímero constituído de ramnose e Nacetil-D-glicosamina numa proporção 2:1 (TAVARES & MARINHO, 2012).

A espécie *S. pyogenes* tem mostrado, ao longo do tempo, alto poder de adaptação ao *H. sapiens sapiens*, atuando como importante agente etiológico de uma série de manifestações clínicas, dentre as quais predomina o acometimento da orofaringe, assim como sequelas não supurativas, representadas pela febre reumática e a glomerulonefrite pós-infecciosa. No entanto, a frequência e o impacto em termos de morbidade e mortalidade de algumas manifestações clínicas tem variado, ao longo dos anos. Por exemplo, a partir da década de 1980, observou-se o aumento no número de casos e na gravidade de infecções por *S. pyogenes* invasivas, com quadros de fascite necrosante, miosite, bacteremia e sepse, dentre outros. Além disso, em 1987, foi relatada a ocorrência de infecções causadas por *S. pyogenes* cujo quadro clínico era semelhante ao choque

tóxico estafilocócico. Uma serie de critérios posteriormente estabelecidos permitiram definir a síndrome do choque tóxico estreptocócico (*Streptococcal toxic shock syndrome*, STSS; ou *Toxic Shock like syndrome*, TSLS), a qual foi considerada uma nova manifestação clínica associada à infecção por *S. pyogenes* (Figura 2.13). Esta síndrome é caracterizada por hipotensão arteria sistêmica e choque, provocando falência múltipla dos órgãos e, apesar da semelhança com a síndrome do choque tóxico estafilocócico, apresenta taxas de mortalidade superiores, variando entre 20% e 50% (AL-AJMI *et al.*, 2012).

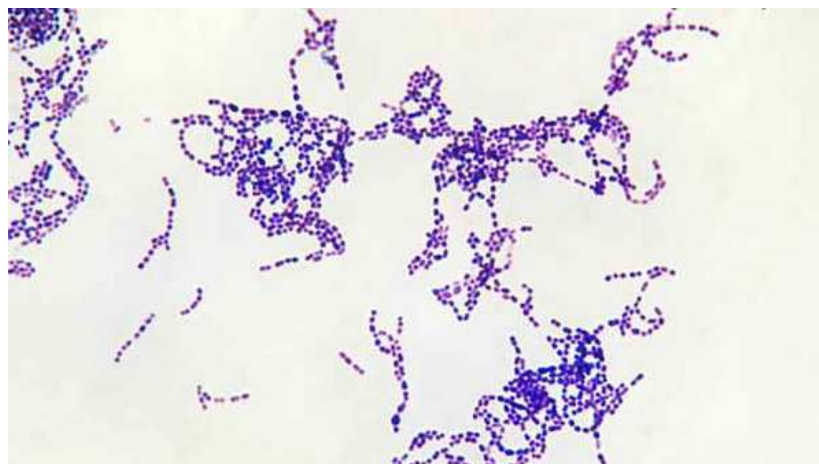


Figura 2.13 - *Streptococcus pyogenes*¹

2.3.1- Fatores de virulência

O *S. pyogenes* possui vários constituintes celulares e produz diversas substâncias que contribuem em maior ou menor grau para a sua virulência:

Cápsula

A menor imunogenicidade do *S. pyogenes* é atribuída a uma cápsula constituída de ácido hialurônico, quimicamente idêntico ao existente no organismo humano que é encontrada na maioria das amostras de *S. pyogenes*. A principal função dessa cápsula é proteger o *S. pyogenes* das células fagocitárias, tendo já sido demonstrado que *Streptococcus* cápsulados dificilmente são fagocitados, enquanto os não cápsulados são facilmente fagocitados e destruídos.

Proteína M - Trata-se de uma proteína fibrilar, com estrutura em forma de dupla hélice ancorada no peptidoglicano da parede e que se estende até a superfície da célula, projetando-se para fora da cápsula. Na prática, devido à variabilidade antigênica da proteína M (mais de 80 tipos), o *S. pyogenes* pode ser classificado em sorotipos. O conhecimento dos tipos M é muito importante para se entender a epidemiologia e patogênese das infecções por *S. pyogenes*. A determinação dos tipos M atualmente é

¹ retirada no dia 12/11/2012 no endereço <http://www.saudefisioterapia.org/wordpress/wp-content/uploads/2011/10/Streptococcus-pyogenes-bacteria-20111019-size-598.jpg>

definida pela análise dos genes *emm* que codificam a proteína M (JOHNSON *et al.*, 2006), sendo detectados cerca de 120 tipos *emm*. Aderência à fibronectina funcionando como adesina, interação com o fibrinogênio mascarando a presença da bactéria no organismo e fixação à porção Fc de anticorpos bloqueando suas interações com fagócitos, são fatores importantes de virulência dessa proteína, tornando-a fortemente antifagocitária.

Proteína F - É considerada uma das principais adesinas do *S. pyogenes*, sendo responsável pela sua adesão à mucosa da faringe. Idêntica à proteína M, essa proteína encontra-se ancorada no peptidoglicano e se projeta pra fora da superfície celular.

Peptidase de C5 - É uma protease que reduz o recrutamento de leucócitos para o local da infecção através da degradação do componente C5a do complemento.

Proteína inibidora do complemento - Secretada pela bactéria, tem a capacidade de inativar o complexo de ataque a membrana (MAC) anulando sua função lítica.

Estreptoquinase, desoxirribonuclease e hialuronidase - São enzimas produzidas pela maioria das amostras do *S. pyogenes*. A estreptoquinase ou fibrinolisinase transforma plasminogênio em plasmina, possibilitando a dissolução de coágulos. A desoxirribonuclease degrada o DNA e a hialuronidase dissolve a substância fundamental do tecido conjuntivo. Não existe comprovação definitiva, mas em virtude de suas atividades, é provável que as três enzimas participem da patogênese das infecções por *S. pyogenes*. Anticorpos para essas três enzimas são encontradas na maioria das pessoas que tiveram infecções por *S. pyogenes*, sendo, inclusive, utilizadas para fins de investigação de estreptococcias pelo agente.

Estreptolisinas - O *S. pyogenes* produz duas hemolisinas: estreptolisina S e estreptolisina O. A primeira aparentemente não é imunogênica, sendo responsável pelo halo de hemólise em torno de colônias de *S. pyogenes*, independente da presença de oxigênio. Além disso, existem evidências recentes que sugerem ser responsável pela morte de fagócitos. A estreptolisina O é antigênica e só é ativa na ausência de oxigênio. A sua capacidade de lisar hemácias, leucócitos e possivelmente outras células contribuem para a virulência do *S. pyogenes*.

Exotoxinas pirogênicas - Conhecidas como SPE (acrônimo de *Streptococcal Pyrogenic Exotoxins*), são toxinas eritrogênicas, que seriam responsáveis pelo eritema da escarlatina. Foram descritas em torno de seis SPE, no entanto três delas, SpeA, SpeB e SpeC são mais frequentes. As duas primeiras se comportam como superantígenos, que induzem a produção de IL-1, IL2, IL-6 e TNF por linfócitos e macrófagos.

Além dos fatores descritos, o *S. pyogenes* contém ou produz outras substâncias que são consideradas fatores de virulência (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008), destacando-se o ácido lipoteicoico que atua como uma adesina e estimularia a produção de citocinas.

2.3.4 - PATOGÊNESE

A maioria das infecções causadas por *S. pyogenes* inicia-se nas vias aéreas superiores (faringe) ou na pele. A infecção da faringe normalmente acontece por meio de transmissão do *S. pyogenes* por meio de gotículas e a adesão ao epitélio da mucosa é a primeira etapa da infecção (TAVARES & MARINHO, 2012). Existe uma tendência a aceitar que as proteínas M e F são consideradas as mais importantes adesinas que participam dessa primeira etapa, ligando-se à fibronectina e outras proteínas da matriz extracelular, uma vez que não há consenso entre pesquisadores quanto às adesinas que participam desse processo, podendo-se considerar que várias outras adesinas participem do processo simultaneamente.

As infecções cutâneas podem ser superficiais ou profundas, e são geralmente adquiridas por contato com os pacientes portadores de piodermites. *Streptococcus pyogenes* se instala na pele quando esta apresenta algum tipo de lesão, seja provocada por picadas de insetos, cirurgias ou outros traumas quaisquer. Com frequência alta, as lesões profundas são acompanhadas de bacteremia e de choque, destacando-se que este último pode ocorrer especialmente quando o *S. pyogenes* produz um dos superantígenos ou toxina pirogênica. A seqüela não supurativa que pode se seguir às infecções cutâneas é a glomerulonefrite difusa aguda (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Qualquer que seja a porta de entrada, *S. pyogenes* somente causa infecção se for capaz de vencer os mecanismos de resposta do organismo, representados pela fagocitose e por anticorpos contra toxinas e fatores de virulência (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Além disso, o microrganismo pode inativar o complemento e ter sua presença mascarada pela cápsula e fibrinogênio fixado pela proteína M. As seqüelas não supurativas – febre reumática e glomerulonefrite pós-infecciosa – são de natureza imunológica.

Faringites - São causadas por vírus e bactérias, sendo mais frequentes as virais. Entre as bacterianas, o *S. pyogenes* causa quase 90% das mesmas (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Com o uso de antimicrobianos, o número de complicações não chega a 3% dos casos.

Piodermites - É uma infecção purulenta da derme, que acomete mais frequente as áreas expostas do corpo, tais como face e membros (superiores e inferiores). Quando existe lesão nessas áreas, a bactéria pode penetrar na derme.

Erisipela - É uma infecção que acomete mais comumente idosos e que geralmente é precedida de infecções respiratórias e cutâneas. É caracterizada por vermelhidão na área afetada, com dor, febre e calafrios.

Fasciite necrosante - É uma doença grave com elevados índices de letalidade. Caracteriza-se como uma infecção do tecido conjuntivo subcutâneo, destruindo tecidos muscular e gorduroso.

Síndromes tóxicas - As mais comuns são a escarlatina e o choque tóxico. Escarlatina é, de modo geral, uma complicação das faringites causadas por amostras de *S. pyogenes* lisogenizadas por fagos que codificam as toxinas pirogênicas SpeA e SpeC. O choque tóxico caracteriza-se por febre, calafrios, mal-estar geral, náuseas, hipotensão arterial sistêmica e choque, promovendo falência múltipla de órgãos e sistemas. As espécimes mais amiúde encontradas no choque tóxico são os sorotipos M1, M3, M12 e M28 e produzem SpeA.

2.3.4.1 - Sequelas pós-infecciosas por *Streptococcus pyogenes*

Febre reumática - Lesões inflamatórias supurativas envolvendo o coração, as articulações, o tecido celular subcutâneo e o sistema nervoso central são a característica desta doença (TAVARES & MARINHO, 2012). O indivíduo que foi acometido por esta doença fica predisposto a outros episódios, em consequência de infecções por *S. pyogenes*, subseqüentes das vias aéreas superiores. A existência de antígenos comuns aos tecidos cardíacos e a certas estruturas da célula estreptocócica (proteína M, membrana citoplasmática) é considerada uma evidência sugerindo tratar-se de uma doença de natureza imunológica (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Glomerulonefrite pós-infecciosa - A presença de vários antígenos comuns ao tecido renal e à estrutura da célula reforça a evidência de tratar-se de uma doença de natureza imunológica. Ela pode aparecer depois da faringite e também das piodermites. A frequência de aparecimento desta condição é variável, dependendo do sorotipo M do *S. pyogenes* causador da infecção prévia. Quando a infecção cutânea é causada por um tipo altamente nefritogênico – como o sorotipo 49 – a frequência pode ser superior a 20% (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). No tópico 2.4 essa entidade nosológica será discutida com mais detalhes.

2.3.4.2 - Diagnóstico bacteriológico

O diagnóstico da infecção bacteriana é feito pelo isolamento e identificação do microrganismo. Este isolamento é obtido em placas contendo ágar sangue, na qual a bactéria forma colônias β-hemolíticas. A maneira mais segura e prática para identificar o *S. pyogenes* é verificar se o agente isolado possui o antígeno do grupo A. *Streptococcus pyogenes* pode ser presuntivamente identificado demonstrando-se que a amostra isolada é

sensível à bacitracina e hidrolisa a pirrolidonil-B-naftilamida (PYR) (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Mais recentemente – baseados no emprego de reagentes específicos para detectar a presença de antígenos do grupo A diretamente em espécimes clínicos – foram desenvolvidos vários ensaios para diagnóstico rápido das infecções pelo *S. pyogenes*. Através de reações de aglutinação em lâmina ou imunoenzimáticas, permite-se diagnósticos em poucos minutos após a coleta (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Tipagem - Existem vários sistemas utilizados para saber o tipo de amostra do *S. pyogenes* envolvido em situação epidemiológica. O sistema clássico tem por base a variabilidade da porção N-terminal da proteína M, o qual permite dividir a espécie em mais de 80 sorotipos detectáveis por técnicas sorológicas, usualmente a precipitação em capilar. Tem havido muitos esforços no sentido de padronizar métodos moleculares que substituam os ensaios sorológicos. Os métodos moleculares tem por base a análise da diversidade dos genes *emm*. Praticamente todos os tipos M conhecidos, bem como novos tipos, podem ser detectados por estas técnicas de tipagem molecular (JOHNSON *et al.*, 2006; TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

2.3.4.3 - Diagnóstico sorológico

Pacientes infectados por *S. pyogenes* produzem anticorpos dirigidos para desoxirribonuclease, estreptolisina O e hialuronidases. A pesquisa de anticorpos anti-estreptolisina O é positiva em cerca de 85% dos pacientes, ao passo que a pesquisa de anticorpos para hialuronidase e desoxirribonuclease é positiva em 95%, e a pesquisa para os três anticorpos é positiva em praticamente todos os pacientes (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Em virtude do aparecimento tardio dos anticorpos, o estudo da resposta sorológica está primariamente indicado para investigação da febre reumática e da glomerulonefrite pós-infecciosa. Em caso de piodermites, o teste sorológico mais indicado é a pesquisa de anti-desoxirribonuclease, já que os níveis de antiestreptolisina O são geralmente baixos porque, provavelmente, a mesma é inativada pelos lipídeos cutâneos (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

O diagnóstico das demais infecções causadas por *S. pyogenes* é geralmente feito somente pelo isolamento e identificação do microrganismo. A ausência de resposta sorológica potente geralmente indica que as manifestações reumatológicas e renais não estão relacionadas a uma infecção pelo *S. pyogenes* (TAVARES & MARINHO, 2012).

2.3.4.4 - Epidemiologia

A faringite estreptocócica é uma das infecções mais frequentes na infância e juventude, tendo maior incidência nos primeiros anos de frequência escolar (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). A transmissão acontece normalmente pelo contato direto entre as pessoas, por meio de gotículas de saliva ou secreção nasal. Nas épocas mais frias a frequência de infecções é maior. As piodermites são mais frequentes em crianças entre

dois e cinco anos, pertencentes a populações que vivem em más condições de higiene. Normalmente nas épocas mais quentes e em regiões tropicais as infecções tem também frequência maior. As possíveis vias de contaminação são o contato direto, e certos vetores como moscas.

2.3.4.5 - Tratamento e profilaxia

Vários antimicrobianos apresentam boa atividade para *S. pyogenes*, mas o de escolha é a penicilina G (SIQUEIRA-BATISTA & GOMES, 2010). Um aspecto importante da terapêutica pela penicilina é o fato de que até agora não ocorreu seleção de amostras resistentes a este antimicrobiano, pelo menos em escala significativa. Para pacientes alérgicos à penicilina, recomenda-se o emprego de eritromicina. Existem relatos documentados em diversas regiões, de ocorrência de amostras resistentes a este último fármaco (TAVARES, 2009). O objetivo da terapêutica da faringite é erradicar a bactéria do organismo e, com isso, fazer a profilaxia da febre reumática (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Não existe ainda nenhuma vacina que possa ser usada para prevenção contra infecções por *S. pyogenes* (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). No entanto, existe um grande esforço no sentido de obter-se essa vacina, e até mesmo alguns resultados já parecem promissores. O antígeno mais empregado nas investigações acerca da imunização para *S. pyogenes* é a proteína M (GUILHERME *et al.*, 2013).

2.4 - Glomerulonefrite pós-infecciosa por *Streptococcus pyogenes*

As bactérias do gênero *Streptococcus* estão entre os agentes mais comuns de doenças humanas, acometendo pessoas de todas as idades (COURA, 2005). Algumas espécies são usualmente pertencentes à microbiota habitual do trato respiratório, gastrointestinal e genital – as quais, em determinados contextos podem causar faringotonsilites, infecções cutâneas, neuroinfecções, sepse, endocardite, pneumonia, as quais estão muito relacionadas a ação direta dos microrganismos. A síndrome do choque-tóxico, a febre reumática e a glomerulonefrite pós-infecciosa (GNPE) por *Streptococcus pyogenes* são síndromes pós-infecciosas importantes de natureza autoimune (BALDY, 1997).

A GNPE é uma doença inflamatória aguda envolvendo os glomérulos renais. Apresenta-se como lesões proliferativas difusas (KUMAR *et al.*, 2005) e aparece uma a quatro semanas depois da faringite (infecções da orofaringe) ou piodermites (infecções cutâneas). A doença se manifesta por hematúria, edema e hipertensão arterial sistêmica, podendo haver evolução para insuficiência renal aguda. A síndrome nefrítica por GNPE atinge, com maior frequência, crianças de seis a dez anos, destacando-se a mediação imunológica por imunocomplexos (IC) (KUMAR *et al.*, 2005; BISNO, 2000). Diversos

antígenos catiônicos como, por exemplo, o NAP1r, SpeB e zSpeB são suspeitos de nefritogenicidade (BISNO & STEVENS, 2000; BATSFORD *et al.*, 2005) – maiores detalhes serão apresentados adiante. Laboratorialmente, encontra-se baixo nível de complemento no soro – devido ao consumo – e elevação de anticorpos anti-*Streptococcus*, a anti-estreptolisina O, o qual ratifica a ocorrência prévia de infecção por esse agente.

O mecanismo de deposição dos IC é confirmado à microscopia óptica onde se observam depósitos imunológicos granulares. O glomérulo apresenta-se aumentado e hiper celular – por infiltração e proliferação –, havendo, nos casos graves, formação de crescentes. O edema das células endoteliais, bem como sua proliferação, leva à obliteração dos lúmens capilares e, também, ao edema intersticial (KUMAR *et al.*, 2005). Mais de 95% dos enfermos se recuperam com terapia conservadora. De todo modo, em casos de proteinúria significativa e prolongada e taxa de filtração glomerular (TGF) anormal, o prognóstico não é bom.

O padrão epidemiológico da GNPE tem sofrido relevantes mudanças nas últimas três décadas, tornando-se condição raramente observada em nações desenvolvidas. Entretanto, ainda continua ocorrendo nos países subdesenvolvidos nos quais a incidência se situa entre 9.5 a 28.5 novos casos por 100,000 indivíduos por ano (RODRIGUEZ & MUSSER, 2008).

Na Europa central tem-se observado o quase desaparecimento da enfermidade, a qual hoje acomete mais a população idosa, a exemplo da Itália, onde a ocorrência em pessoas com mais de 60 anos é de 0.9 pacientes por milhão contra 0.4 enfermos por milhão de habitantes em pessoas com menos de 60 anos (RODRIGUEZ & MUSSER, 2008). (CARAPETS *et al.*, 2005) em um estudo com 11 populações, reportaram que a incidência em crianças – nos países menos desenvolvidos – era da ordem de 24.3 casos por 100.000 pessoas-ano, e, naqueles enfermos com idade superior a 15 anos, dois casos por 100.000 pessoas-ano. Numa perspectiva global avalia-se que dos 472.000 casos por ano de GNPE, de cerca 456.000 estão em países subdesenvolvidos.

No Brasil, Maciel *et al.* (2003) buscaram dados sobre a prevalência de *S. pyogenes* β -hemolítico do grupo A em um grupo amostral de 735 escolares da cidade de Recife. Foi constatada uma prevalência de 0,8% do agente em portadores assintomáticos. Taxa semelhante foi descrita na Suíça em adultos jovens e 6% em escolares (HOFFMAN, 1985), bem como 7% e 18,8% nos escolares dos Estados Unidos e Índia respectivamente (HOFFMAN, 1985; MCMILLAN *et al.*, 1986; KAROI *et al.*, 1982). Destaque-se que até 30% dos casos agudos de faringotonsilites são causados por *S. pyogenes* (MCMILLAN *et al.*, 1986).

A microscopia eletrônica revela os imunocomplexos como depósitos elétrodensos sobre o mesângio, ao longo da membrana basal, ou em ambas as localizações. Uma vez depositados no rim, os imunocomplexos podem ser finalmente degradados, principalmente por neutrófilos infiltrantes e monócitos/macrófagos, células mesangiais e proteases endógenas, e a reação inflamatória pode então remitir. Este curso ocorre quando a exposição ao antígeno desencadeador é limitada e é de curta duração, como na maioria dos casos de glomerulonefrite pos-estreptocócica. Entretanto, se for fornecido suprimento contínuo de antígenos, como pode ser visto no LES ou hepatite viral, ciclos repetidos de formação de imunocomplexos, deposição e lesão poderão ocorrer, levando a um tipo de glomerulonefrite membranosa ou membranoproliferativa mais crônica (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Quanto ao padrão dos depósitos, podem ser discriminados: (i) granular, característico na nefrite por imunocomplexos circulantes e *in situ*; e (ii) linear, característico da doença anti-MBG clássica. Uma vez depositados, os imunocomplexos podem ser degradados por macrófagos/monócitos infiltrados. Assim, a reação inflamatória pode ser contida, como ocorre nos casos de exposição antigênica curta e limitada (ODA *et al.*, 2010; BUROVA *et al.*, 2012).

Os mecanismos patogênicos da doença permanecem em investigação, cabendo ainda destaque para as primeiras hipóteses formuladas, mesmo após o advento da biologia molecular. É praticamente consenso de que a base patológica da lesão se dá pela reação inflamatória local, relacionada à deposição dos imunocomplexos (ODA *et al.*, 2010; BUROVA *et al.*, 2012; ZIPFEL *et al.*, 2006). Destaque-se, segundo Kumar *et al.* (2005), a existência de duas formas de lesões associadas a anticorpos: (i) lesão por anticorpos reagindo *in situ* dentro dos glomérulos, com antígenos glomerulares insolúveis fixos (intrínsecos) ou com moléculas plantadas dentro do glomérulo, e (ii) lesão resultante de deposição de complexos antígeno-anticorpo circulantes no glomérulo. Além disso, há evidências experimentais de anticorpos citotóxicos direcionados contra componentes celulares glomerulares possam causar lesão glomerular. Estas vias não são mutuamente excludentes e, em humanos, podem, todas, contribuir para lesão. Entre os efetores da lesão tem-se:

(1) Neutrófilos e monócitos atraídos por quimiotaxia, resultante da ativação do complemento – principalmente C5a – e ativação mediada pela Fc, tais células liberam proteases – as quais degradam a MBG, espécies reativas de oxigênio, metabólitos do ácido aracdônico, concorrendo para a redução da TGF – e, igualmente, há infiltração de macrófagos, linfócitos T e células NK (*natural killer*);

(2) plaquetas, as quais liberam eicosanóides e fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF);

(3) células glomerulares residentes – mesangiais – também liberam mediadores de inflamação, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, endotelina, os quais, mesmo na ausência de infiltrado imune, podem iniciar a inflamação; e

(4) Componentes quimiotáticos do complemento e a via final do mesmo – o complexo de ataque a membrana (MAC) – o qual causa lise celular e estimula as células mesangiais a produzirem outros mediadores; é relevante destacar que somente a ação do MAC já pode desencadear proteinúria.

Todos os mediadores produzidos pelos infiltrados, a citar a proteína quimioatrativa de monócitos 1 e a CCL5, os fatores de crescimento PDGF e TGF- β e fator de crescimento de fibroblastos são relacionados à proliferação de células mesangiais e a deposição de matriz extracelular e hialinização (KUMAR *et al.*, 2005).

Após iniciadas as lesões, emergem mecanismos que culminam com a progressão. Inicia-se com a mudança adaptativa, caracterizada por hipertrofia compensatória (Figura 2.14A), dos glomérulos remanescentes. Qualquer moléstia renal que destrua os néfrons a uma taxa de TGF de 30% a 50% da normal, progredirá, paulatinamente, para insuficiência renal terminal (KUMAR *et al.*, 2005; UCHIDA *et al.*, 2011).

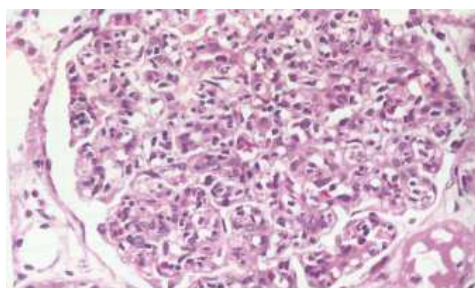


Figura 2.14A – Glomerulonefrite Aguda
Fonte (KUMAR *et al.*, 2005)

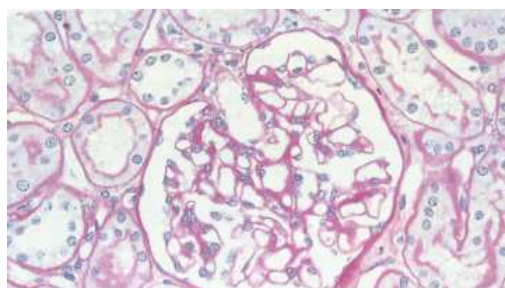


Figura 2.14B – Glomérulos normais
Fonte: (KUMAR *et al.*, 2005)

Na busca pelos antígenos bacterianos que seriam os principais responsáveis ou desencadeadores da GNPE, a ativação de complemento é, reconhecidamente, uma característica chave na imunopatogenia da doença, destacando díspares mecanismos pelos quais a mesma ocorre. As proteínas ligantes de imunoglobulina na superfície bacteriana acoplam-se ao C4BP (proteína ligante de C4) interferindo na via clássica de ativação; há o predomínio de ativação pela via alternativa e, também, há a via da lectina iniciada pelo reconhecimento de resíduos de glicosamina da parede bacteriana pelo ligante a manose. No processo patogênico, muito também se discute a respeito dos mecanismos imunes celulares. (RASTALDI *et al.*, 1996) relacionaram a intensidade do infiltrado macrofagocítico intraglomerular e túbulo intersticial com a expressão de adesinas e, igualmente, com a proteinúria. Igualmente, tem-se observado, durante o curso da inflamação, a existência de níveis circulantes aumentados de IL-6, IL-8, TNF- α , de proteína quimiotática de monócitos e de produtos celulares (SOTO *et al.*, 1997).

É extensa a pesquisa por antígenos de *S. pyogenes* capazes de mimetizar estruturas glomerulares. Kefalides *et al.* (1986) descreveram anticorpos contra laminina e colágeno em alguns enfermos. Ademais, sabe-se que epítomos da proteína M12 são compartilhados pela membrana basal glomerular, vimentina e proteínas mesangiais. (KRAUS & BEACHEY, 1988) identificaram epítomos com potencialidade autoimune.

As moléculas provavelmente implicadas na imunopatogenia da GNPE são, conforme anteriormente mencionado, a *proteína M*, a *estreptoquinase*, a *NAPlr* (Nephritis-Associated Streptococcal Plasmin Receptor) e a *SpeB* (*Streptococcal pyrogenic exotoxin B*).

A *proteína M* é um importante fator de virulência anti-fagocitose, para a distinção de mais de 150 tipos distintos de *Streptococcus* do grupo A. Na atualidade reconhece-se como possuidores de maior potencial nefritogênico os peptídeos M 1, 2, 4, 12, 25, 49, 55 57,60. A proteína M pode ser localizada nos glomérulos destacando-se que a lesão destes pode ser induzida por injeções repetidas de proteína M pura ou em combinação com fibrinogênio (RODRÍGUEZ-ITURBE & BATISFORD, 2007). Burova *et al.* (2012) e Zipfel *et al.* (2006) observaram, com experimentação animal, o efeito da proteína ligante de IgGfc, partícipe da família das proteínas M. Na linhagem M22, usada no referido ensaio, observou-se que a supressão de um dos genes que codificava duas variáveis dessa ligante de IgG mantinha a nefritogenicidade do agente, mas que a supressão de ambos genes aniquilava seu potencial.

Sabe-se que a *estreptoquinase* atua como conversora de plasminogênio em plasmina, o que poderia causar degradação da matriz extracelular diretamente – por exemplo, da fibronectina e da laminina – ativação de metaloproteínases, colagenases, complemento e de fatores coagulação. Todo esse contexto etiopatogênico desencadeia injúria local e predispõe a deposição dos imunocomplexos (CASTELLINO, 1997; GRELLA & CASTELLINO, 1997).

O *NAPlr* (*Nephritis-Associated Streptococcal Plasmin Receptor*) é uma estrutura homóloga ao GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), a qual tem capacidade de ligação à plasmina, mantendo a atividade proteolítica desta última, impedindo a ação inibitória fisiológica da alfa₂-antiplasmina (ODA *et al.*, 2008). Embora compartilhe a característica de ativador da plasmina com a *Streptococcal pyrogenic exotoxin B*, suas sequências de aminoácidos, propriedades estruturais e funcionais são bem diferentes, sendo também o *NAPlr* isolado do citoplasma do agente e a *SpeB* do meio externo.

A exotoxina *SpeB* (*Streptococcal pyrogenic exotoxin B*) é uma cisteína proteínase catiônica, derivada do zimogênio zSpeB – é produzida *in vivo* pelo

Streptococcus durante o curso da infecção, comportando-se como receptor ligante de plasmina. Avaliação feita por Bastford *et al.* (2005) de NAPlr e SpeB, no soro e biópsia de pacientes de países e continentes distintos, revelou depósitos de SpeB in 12 das 17 biopsias e anticorpos anti-SpeB em todos os soros investigados. Outro mecanismo de ação da SpeB, descrito por Wei *et al.*, (2005) mostrou atividade moduladora sobre proteínas estreptocócicas – de *S. pyogenes* – regulatórias do complemento, FH e FH-1, usadas na evasão do sistema inume (THURMAN *et al.*, 2006; VERNON *et al.*, 2012).

Até então, adota-se a deposição de imunocomplexos como o ponto de partida para a doença e o recrutamento dos variados mecanismos de lesão. A melhor sugestão diagnóstica ainda é dada por títulos elevados de anticorpos contra SpeB/zSpeB ou NAPlr.

2.5 - Modelando o Sistema Imunológico

A intenção da presente investigação é utilizar o modelo *AutoSimmune* proposto inicialmente por Possi *et al.* (2010), adicionando ao mesmo os componentes necessários para simular os processos envolvidos na glomerulonefrite pós-infecciosa, bem como aqueles necessários para demonstrar o papel da imunidade humoral nesta condição mórbida.

De acordo com Li *et al.* (2009), modelar o SI, ou mesmo parte dele, não é uma tarefa fácil, uma vez que o mesmo possui uma grande quantidade de interações não-lineares entre suas células e tem habilidades como emergência de comportamento, co-evolução, agregação, variedade, e auto-organização em um ambiente dinâmico (LI *et al.*, 2009). Com estas características, classificou-se o SI como um Sistema Adaptativo Complexo (CAS, do inglês *Complex Adaptive System*) (MACAL & NORTH, 2009; LI *et al.*, 2009). Pela complexidade do SI, normalmente apenas alguns mecanismos, células, tecidos e substâncias, que são relevantes ao que se pretende estudar, são incluídos no modelo. Estes limites de abstração serão discutidos em seções posteriores.

2.5.1 Método de Modelagem

Os métodos de modelagem de sistemas CAS podem ser divididos, segundo sua abordagem de construção do modelo, em métodos que utilizam a abordagem *top-down* e métodos que utilizam a abordagem *bottom-up* (LI *et al.*, 2009).

Segundo Li *et al.* (2009), a abordagem *top-down* soluciona o problema criando um modelo com um grande número de entidades, não dando ênfase às entidades microscópicas, mas sim estimando seus comportamentos em um nível macroscópico. Já a abordagem *bottom-up* dá ênfase às interações a nível microscópico, podendo-se observar as interações entre entidades específicas e estudar como cada entidade contribui, com o seu comportamento microscópico, para a emergência do comportamento global do sistema. Por simular um grande número de entidades e seus comportamentos, conclui o

autor, esta abordagem é capaz de fornecer uma representação mais precisa, mas com um custo computacional elevado, tanto em termos de tempo, quanto de memória.

Possi (2012) fez um comparativo entre os métodos de modelagem, optando por modelar com sistemas multiagentes. Presentemente não se fará a mesma comparação, entendendo que tais delineamentos podem ser consultados no trabalho apresentado por Possi *et al* (2012). A seguir serão ponderadas algumas características do método com sistemas multiagentes.

2.5.1.1. Características do método com sistemas multiagentes (SMA)

Os modelos baseados em agentes têm sido muito utilizados para simular, entender e prever comportamentos emergentes de sistemas CAS, incluindo o SI (LI *et al.*, 2009). Tais ferramentas utilizam uma abordagem *bottom-up* em sua construção, e nelas cada agente representa uma entidade do sistema real, sendo que estes agentes podem ser heterogêneos, no sentido de que cada um possa ter seus próprios estados e regras, podendo interagir com os demais agentes. Desta forma, as simulações baseadas em agentes descrevem com maior precisão as interações reais entre as entidades do sistema do que os outros modelos, como, por exemplo, aqueles baseados em autômatos celulares (Li *et al.*, 2009).

Na modelagem utilizando multiagentes com a abordagem *bottom-up*, o sistema é construído “*definindo os aspectos individuais, relacionados aos agentes, de tal forma que ocorra a emergência dos aspectos coletivos*”, desta forma, “*a interação e organização são definidos do ponto de vista dos agentes*” (HÜBNER *et al.*, 2004, p. 2). Ainda segundo os autores, “*o objetivo dos sistemas multiagentes passa a ser então a definição de modelos genéricos de agentes, e regras de interações e organizações*” (HÜBNER *et al.*, 2004, p. 2). Ademais, dentre as vantagens do uso de modelos baseados em agentes, destaca-se a possibilidade de “*explorar a emergência de funções macroscópicas complexas e determinísticas a partir de interações microscópicas estocásticas*” (LI *et al.*, 2009, p. 80). Por este motivo, é possível verificar hipóteses de como células interagem entre si, e de como comportamentos emergem dessas interações.

Os modelos utilizando SMA são adaptativos e evolutivos, permitindo a adição ou a eliminação de agentes, e mudanças em sua organização, para que o modelo seja utilizado para propósitos diferentes (Hübner *et al.*, 2004). Além disso, os SMA são uma metáfora natural para a modelagem de sistemas complexos e distribuídos, assim como o SI (LI *et al.*, 2009), onde o controle, o conhecimento e os recursos estão distribuídos. Os agentes são, igualmente, concebidos independentemente do problema a ser resolvido, ou seja, o mesmo agente que representa um linfócito T pode ser utilizado em um sistema de teste de vacinas, ou em um sistema de estudo de doenças auto-imunes. Nesse âmbito, as regras de comportamento do linfócito são as mesmas. Entretanto, a principal desvantagem

do uso de modelos baseados em agentes é o fato da grande demanda de poder computacional – de velocidade de processamento e de memória – que estes modelos têm, devido ao grande número de agentes que utilizam, às vezes com regras complexas de comportamento, e aos cálculos necessários para a simulação do ambiente, como difusão de substâncias, no caso dos modelos do SI (LI *et al.*, 2009).

Existem algumas condições que indicam se o uso de SMA na modelagem de problemas é a mais apropriada, dentre elas (WOOLDRIDGE, 2001):

- Quando o ambiente é altamente dinâmico, incerto ou complexo;

- Quando os agentes são uma metáfora natural para as entidades que serão modeladas;
- Quando os dados, o controle ou o conhecimento para resolver o problema (perícia) estão distribuídos entre as entidades.

O SI é dinâmico, incerto e complexo (FOLCIK *et al.*, 2007; SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2008; RAPIN *et al.*, 2010; POSSI *et al.*, 2012), sendo que os dados (especificidade), o conhecimento (qual estratégia melhor para cada tipo de patógeno), e o controle (regulação) para eliminar/controlar a infecção está distribuído entre as células e as substâncias, as quais são como agentes, observando o ambiente e efetuando suas ações, em colaboração com os demais. Portanto, pode-se concluir que o SI atende às condições para simulação em sistemas multiagentes. Assim, utilizar-se-á o modelo baseado em agentes para demonstrar o papel da imunidade humoral na GNPE, i.e., será um SMA.

2.5.2 - Sistemas Multiagentes

A Inteligência Artificial Distribuída (IAD) desenvolveu-se fortemente na década de 1980, sendo hoje um dos campos de pesquisa e aplicação mais promissores do ponto de vista tecnológico (WEISS, 1999). Esse campo tem como característica sua alta multidisciplinaridade, trazendo consigo conhecimentos de várias outras disciplinas, como Ciência da Computação e Inteligência Artificial (IA), Filosofia, Sociologia, Economia, Etologia e Biologia (HÜBNER *et al.*, 2004; WEISS, 1999). Os Sistemas Multiagentes (SMA) – que são compostos por entidades computacionais inteligentes e autônomas, chamadas de agentes – são a principal ferramenta da IAD.

Os SMA são formados por um número de entidades autônomas que interagem entre si em um ambiente, cooperando mutuamente para resolverem um problema cuja solução está além da capacidade individual de cada componente (WOOLDRIDGE, 2001; HÜBNER *et al.*, 2004; WEISS, 1999), situando-se no comportamento emergente do sistema (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012a).

2.5.3 - Ambiente

Possi (2012) descreveu o ambiente como o meio, o contexto, no qual os agentes estão inseridos. É um minimundo, ressaltando-se que agente assume que não existe nada além daquele universo. Wooldridge (2001) apresentou as principais propriedades de um ambiente e suas classificações, como:

(1) **Acessível versus Inacessível:** um ambiente acessível é aquele do qual se pode obter informações completas, precisas e atuais sobre o seu estado. A maioria dos ambientes não são acessíveis. No espaço, por exemplo, a informação sobre a posição de estrelas tem um atraso na escala de anos-luz.

(2) **Determinístico versus Não determinístico:** em um ambiente determinístico, uma ação qualquer tem um único e garantido efeito, i.e., uma ação determina o próximo estado do ambiente.

(3) **Estático versus Dinâmico:** em um ambiente estático, pode-se assumir que seu estado irá continuar imutável até que algum agente o modifique. Por outro lado, um ambiente dinâmico pode ter seu estado alterado por outros processos que estejam atuando sobre ele.

(4) **Discreto versus Contínuo:** um ambiente é dito discreto se existe um número finito de estados que ele possa assumir, mesmo que seja um número muito grande. Já um ambiente contínuo pode assumir um número infinito de estados.

Ao construir um SMA, é fundamental que se defina em que tipo de ambiente os agentes estarão inseridos, a fim de se definir que tipo de informação eles poderão obter do meio (POSSI, 2012).

2.5.4 - Agentes

Embora não haja consenso sobre a definição do termo “agente autônomo”, para este trabalho, será empregada a definição de um agente autônomo como um sistema computacional, situado em um ambiente, capaz de percebê-lo e tomar ações baseadas nessa percepção, através de suas regras internas de comportamento. Segundo Hübner *et al.* (2004), Wooldridge (2001) e Possi (2012), existem dois tipos de arquiteturas para agentes em um SMA: os agentes cognitivos (ou deliberativos) e os agentes reativos. Os SMA baseados em agentes cognitivos normalmente possuem poucos agentes, e estes são sistemas sofisticados e computacionalmente complexos, por isso tê-los em grande quantidade no SMA seria inviável por causa do grande custo computacional (HÜBNER *et al.*, 2004). Esse tipo de agente possui uma representação explícita de conhecimento sobre o ambiente e os demais agentes, possuem memória e mecanismos de raciocínio lógico, que permitem a eles planejar suas ações. Além disso, esse tipo de agente pode se comunicar diretamente com os demais. A arquitetura mais difundida na construção de

agentes cognitivos é a chamada BDI (crenças, desejos e intenções, do Inglês, *belief, desire and intention*) (WOOLDRIDGE, 2001; HÜBNER *et al.*, 2004).

Já os SMA baseados em agentes reativos surgiram da ideia de que um comportamento inteligente em um sistema emerge da interação entre um grande número de agentes muito simples, que não precisam especificamente ter representações explícitas de conhecimento ou mesmo algum tipo de mecanismo de raciocínio lógico (WOOLDRIDGE, 2001; HÜBNER *et al.*, 2004, POSSI *et al.*, 2012). Desta forma, os agentes reativos “*têm comportamentos que podem ser descritos como autômatos finitos simples, possuindo um conjunto de regras que mapeiam percepções do ambiente diretamente em ações sobre estes, em um tipo de esquema estímulo-resposta*” (HÜBNER *et al.*, 2004, p. 6).

Possi (2012) descreveu que os agentes reativos têm dois conceitos principais:

(i) **percepção**: o agente é capaz de perceber alterações no ambiente;

(ii) **ação**: as alterações no ambiente são provenientes das ações que os agentes realizam constantemente no mesmo, sendo que normalmente os agentes não têm controle total do ambiente, mas podem apenas influenciá-lo de alguma forma;

Um subtipo dos agentes reativos são os agentes reativos com estado (WOOLDRIDGE, 2001), que, além de serem reativos – i.e., agirem de acordo com o que observam no ambiente –, são capazes de armazenar o seu estado, sendo que sua ação passa a ser uma função da sequência de estados e de sua percepção do ambiente. Portanto, suas decisões sofrem influência do seu histórico de ações. A Figura 2.15 ilustra a arquitetura desse tipo de agente.

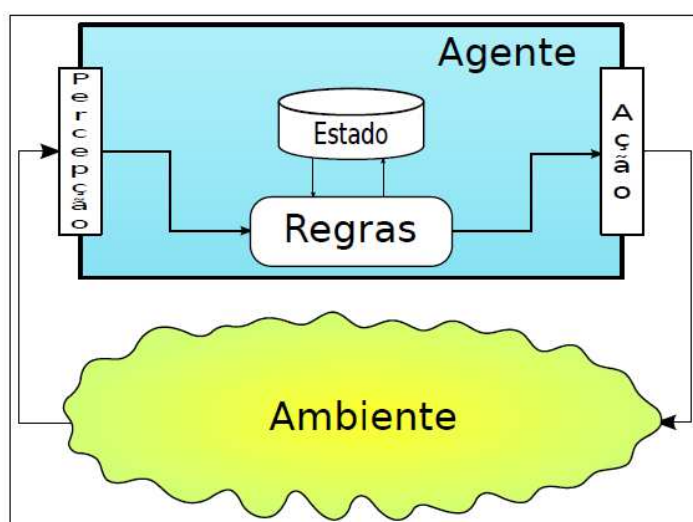


Figura 2.15. Modelo geral de um agente reativo com estado.

Fonte (adaptado): (WOOLDRIDGE, 2001, p. 36)

Possi (2012) descreveu que as principais vantagens do uso de agentes reativos são a simplicidade na modelagem do agente e a economia de recursos de tempo e de

computação, justamente por não terem os mecanismos dos agentes cognitivos. No entanto, Wooldridge (2001) alerta para as dificuldades em se criar SMA reativos, tais como:

(1) Os agentes reativos precisam ter informações disponíveis no seu ambiente para tomar sua decisão;

(2) Esses sistemas se baseiam no fato de que o comportamento inteligente emerge das relações entre os comportamentos entre os agentes. No entanto, às vezes essas interações não são bem compreendidas, fazendo com que, para se alcançar o comportamento global desejado, seja necessário utilizar o método de experimentação, tentativa e erro para desenvolver os agentes. Essa segunda desvantagem é justamente o caso da modelagem do SI, onde as interações nem sempre são bem conhecidas.

Baseado no fato de os agentes reativos com estado serem, analogamente, mais próximos das células biológicas do que os agentes deliberativos, Possi (2012) utilizou – assim como também será empregado na presente investigação – a principal motivação do uso dessa abordagem está no fato do mundo estar se tornando um ambiente cada vez mais complexo e com isso os sistemas que precisam ser analisados e modelados também estão mais complexos (POSSI, 2012). Nesse contexto, ferramentas de modelagem convencionais não são mais viáveis como eram anteriormente. Além disso, o poder computacional está avançando rapidamente, permitindo que modelos baseados em agentes, que antes eram inviáveis, possam agora ser utilizados (MACAL & NORTH, 2009).

A modelagem baseada em agentes representa uma nova abordagem de pesquisa, a qual tem ganhado força nos últimos 20 anos, sendo chamada por alguns de “terceira maneira de se fazer ciência” (MACAL & NORTH, 2009, p. 86). Trata-se da utilização do conceito de agentes inteligentes, para construir modelos abstratos de sistemas a serem estudados, onde os agentes interagem, continuamente, através no âmbito da simulação. Esse tipo de modelagem tem ligação direta com os Sistemas Adaptativos Complexos (CAS), se preocupando com a questão sobre como comportamentos complexos emergem da interação de agentes inteligentes (MACAL & NORTH, 2009; POSSI, 2012). O conceito de CAS, segundo Macal e North (2009), surgiu originalmente com a finalidade de investigar a adaptação e emergência dos sistemas biológicos. Os autores afirmam também que ao desenvolver um modelo baseado em agentes, está-se desenvolvendo modelagem de um CAS.

Possi (2012) conclui que, dessa forma, a ideia principal da modelagem utilizando agentes baseia-se no fato de que sistemas naturais aparentam exibir uma inteligência coletiva, emergente, de regras simples, executadas por suas entidades, baseadas em

informações locais, permitindo a esses sistemas naturais, não só sobreviver, mas também se adaptar ao seu ambiente, otimizando seu comportamento com o passar do tempo (MACAL & NORTH, 2009). Essa também é a ideia fundamental na qual se baseiam os sistemas bio-inspirados.

2.5.5.1 Criando modelos baseados em agentes

A primeira etapa no desenvolvimento diz respeito à identificação dos agentes e suas classes (MACAL & NORTH, 2009). Isso é feito definindo-se o nível de granularidade, i.e., o nível de abstração do modelo, de forma que se consiga o nível mais grosso possível, mas que ainda mantenha os detalhes necessários para que o modelo apresente o comportamento desejado (FOLCIK *et al.*, 2007). Uma vez que os agentes tenham sido identificados, suas regras são estabelecidas. Para tanto, é necessário que se tenha uma base teórica sobre o comportamento esperado dos agentes, de onde serão extraídas suas regras (POSSI, 2012).

Definidos os agentes e suas regras, devem-se definir os mecanismos que irão controlar seus relacionamentos, definindo como, com quem e quando os agentes irão interagir. Segundo Macal & North (2009), essa tarefa é crucial, sendo mais importante definir bem as relações e interações dos agentes, do que definir os próprios agentes e suas regras.

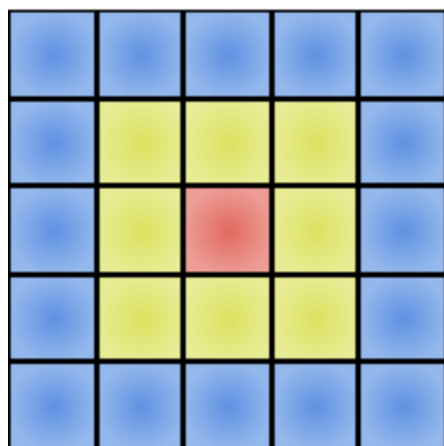


Figura 2.16. Ilustração da topologia do tipo de autômato celular, onde cada agente permanece em uma célula. Em vermelho, a posição do agente, e em amarelo, sua Vizinhança de Moore.

Fonte (adaptado): (MACAL & NORTH, 2009; POSSI, 2012)

Possi (2012) descreveu e ilustrou, em seu trabalho, diferentes topologias dos agentes, ponderando que a primeira tarefa para definir os relacionamentos dos agentes está em caracterizar qual agente poderá conectar-se a outro. Este autor utilizou, em sua pesquisa, a topologia Autômato Celular, ilustrada na Figura 2.16; nesta topologia, os agentes estão contidos em uma estrutura de grade, onde cada agente ocupa uma célula (mas uma célula pode ser ocupada por vários agentes) e onde os agentes em posições ao seu redor são chamados de vizinhos. De um modo geral, não importa qual topologia é usada; o relevante é garantir aos agentes a possibilidade de interagir localmente, com um número limitado de agentes, em um período de tempo limitado, obedecendo às condições

do modelo, evitando que os agentes possam interagir com todos os outros agentes ao mesmo tempo (MACAL & NORTH, 2009). Não serão apresentados detalhes sobre outras topologias, sugerindo-se a leitura do trabalho Possi (2012) para maiores detalhes.

2.5.5.2 - Frameworks

O framework escolhido para a implementação do modelo foi o *Repast* na plataforma *Repast Symphony*, em sua versão 1.2.0, visto que o objetivo deste trabalho é ampliar funcionalidades do modelo *AutoSimmune*, apresentado em (POSSI, 2012), que optou por utilizar esta mesma plataforma. POSSI (2012) descreveu que, entre os vários motivos da escolha, estão (i) o fato do *Repast* prover os mecanismos necessários para a implementação e simulação do modelo do SI baseado em agentes (COLLIER, 2010; MACAL & NORTH, 2009) e (2) o fato do BIS, apresentado em Folcik *et al.*, (2007) também utilizar o framework *Repast*. Deve ser destacado que o BIS foi utilizado como inspiração para o *AutoSimmune*.

2.5.5.2.1 - *Repast Symphony*

De acordo com Possi (2012), Collier (2010), Macal e North (2009), o framework *Repast*, acrônimo de *Recursive Porous Agent Simulation Toolkit*, foi desenvolvido utilizando puramente a linguagem Java e, por este motivo, pode ser utilizado em diversas plataformas, como Microsoft Windows e o GNU Linux. Foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores do laboratório Argonne National Laboratory, da Universidade de Chicago. Este framework é gratuito e de código aberto, usado amplamente em modelagem baseada em agentes (NORTH *et al.*, 2005; POSSI, 2012). Possui diversas plataformas, entre elas: *RepastJ*, *Repast Symphony* ou *RepastS*, *RepastPy*, *Repast.NET* e a *Repast HLC*, para desenvolvimento de modelos de larga-escala, distribuídos em clusters de computação (POSSI, 2012).

Esse framework provê diversos mecanismos facilitadores à modelagem dos agentes, suas regras e relações (POSSI, 2012). Os agentes são criados em uma interface visual, onde podem ser organizados em seus ambientes. Também é possível criar diversos parâmetros a serem utilizados pelos agentes, e que podem ter seus valores definidos durante a simulação.

2.6 Trabalhos Correlatos

Há díspares trabalhos relacionados ao *AutoSimmune*, dentre eles: (i) *ImmSim* (RAPIN *et al.*, 2010); (ii) *Simmune* que é uma plataforma para simulações imunológicas; e (iii) BIS também conhecido como “The Basic Immune Simulator” (FOLCIK *et al.*, 2007). Este último serviu de inspiração para modelagem do *AutoSimmune* descrito por Possi (2012). O *AutoSimmune* foi desenvolvido com o objetivo inicial de estudar a autoimunidade, e, neste trabalho, o autor modelou mecanismos como cálculo de

afinidade, geração de diversidade, conjunto de antígenos próprios, tolerância, entre outros, os quais são essenciais para a simulações de fenômenos relacionados à autoimunidade, além de modelar o conceito de especificidade (e os mecanismos relacionados), baseado na ideia de representar esta especificidade através de uma cadeia de bits, como descrito nos trabalhos publicados por Floreano e Mattiussi (2008) e Celada e Seiden *apud* RAPIN *et al.*, (2010).

Capítulo 3

PROPOSTA DE MODELO DO SI PARA SIMULAÇÃO DA GNPE

Neste capítulo será mostrado o modelo do SI proposto – *AutoSimmune*, descrito por Possi (2012) –, com vistas à implementação de novas funcionalidades a ferramenta de simulação *in silico* do SI. É válido ressaltar que serão descritos apenas os itens novos do modelo para demonstrar o papel da resposta imune na glomerulonefrite. Comportamentos resultantes das interações dos agentes, como memória, especificidade, declínio da resposta da imunidade humoral na glomerulonefrite, não foram modelados explicitamente; outrossim, são consequência das regras internas de cada agente e de suas interações entre eles próprios e com o ambiente.

3.1 Requisitos do modelo

Como o objetivo do modelo é permitir o estudo do papel da resposta imune na GNPE, Os requisitos são os mecanismos que possivelmente são as causas dessa etiologia, tais como descritos na literatura.

Consoante ao anteriormente comentado, a GNPE é uma doença inflamatória aguda que envolve os glomérulos renais. Apresenta-se como lesões proliferativas difusas (KUMAR *et al.*, 2005) e aparece uma a quatro semanas depois da faringite (infecções da orofaringe) ou piodermites (infecções cutâneas). A condição mórbida se desenvolve a partir a mediação imunológica por imunocomplexos (IC). Diversos antígenos catiônicos – como por exemplo do NAP1r, SpeB, zSpeB – são suspeitos de nefritogenicidade (BISNO, 2000; BATSFORD & STEVENS, 2000). Laboratorialmente, encontra-se baixo nível de complemento no soro devido ao consumo e elevação de anticorpos anti-*Streptococcus* – mormente a anti-estreptolisina O –, o qual ratifica a ocorrência prévia de infecção por esse agente.

O mecanismo de IC é confirmado à microscopia óptica observam-se depósitos imunológicos granulares (KUMAR *et al.*, 2005). O glomérulo apresenta-se aumentado e hiper celular, por infiltração e proliferação celular. Visto isto, foram identificados alguns requisitos:

- Inicialmente, deve existir uma infecção por *Streptococcus pyogenes* nas vias aéreas superiores ou na pele. No curso dessa infecção, antígenos do *S. pyogenes* são liberados.
- Já na infecção, algum mecanismo deve calcular a afinidade entre o patógeno e o tecido do hospedeiro no qual o mesmo pretende infectar. O termo infectar

deve ser entendido como *aderir ao hospedeiro e começar o processo de multiplicação*. Tendo sucesso na infecção a imunidade adaptativa entra em ação, incluindo a imunidade adaptativa humoral, a qual é mediada por anticorpos secretados, originados nos linfócitos B. A partir de então esses anticorpos devem se ligar aos antígenos do *S. pyogenes*, caso os encontre e tenham afinidade, com objetivo de neutralizar e eliminar esses *microrganismos*. Esses complexos antígeno-anticorpo (imunocomplexos) devem seguir pela circulação sanguínea até que, finalmente, sejam depositados nos rins. A deposição de imunocomplexos deve causar uma reação inflamatória em nível renal e, para o modelo atender à fisiopatologia em termos biológicos, a mesma resulta da infiltração de macrófagos e de neutrófilos nos glomérulos renais.

- Outra necessidade apontada é a inclusão no sistema de um agente *antimicrobiano*, o qual que deve ser capaz de lisar as bactérias (*S. pyogenes*) em multiplicação no hospedeiro. Aqui se torna necessária a testagem do limite de tolerância do patógeno ao fármaco. A intenção seria eliminar a bactéria e impedir que sejam liberados mais antígenos que ocasionarão a GNPE.

3.2 Framework

O modelo apresentado por este trabalho foi desenvolvido utilizando o framework *Repast Symphony*, em sua versão 1.2.0, para a plataforma Linux, embora o modelo tenha sido portado para a plataforma Microsoft Windows sem maiores problemas. Deve ser destacado que, segundo Possi (2012), as definições de espaço e tempo, bem como as representações de células, substâncias e tecidos, dentre outros, foram concebidas já prevendo a utilização do framework em questão, por uma questão de praticidade. No entanto, nada impede que tal modelo seja utilizado como base para a construção de adaptações que sejam compatíveis com outros frameworks e/ou plataformas, uma vez que os conceitos imunológicos e biológicos por trás do modelo não dependem da tecnologia utilizada para representá-los (POSSI, 2012).

3.3 - Ambiente

POSSI (2012) definiu o ambiente modelado, pela perspectiva dos agentes, como sendo: **(1) Inacessível**: os agentes não têm informação sobre o ambiente como um todo, apenas informação local, e.g., de sua vizinhança; **(2) Não-determinístico**: um agente não pode prever o próximo estado do ambiente baseado apenas em sua ação; as ações de outros agentes, assim como ações externas (passagem do tempo, difusão de substâncias, por exemplo) podem interferir no próximo estado do ambiente; **(3) Dinâmico**: o ambiente pode modificar seu estado, mesmo se o agente escolher não tomar nenhuma ação; **(4)**

Discreto: é fato que o número de estados que este ambiente pode assumir é muito alto, dado o número de agentes, de posições possíveis, de estados possíveis, de substâncias e dispersões possíveis, dentre outros. No entanto, não é um número infinito de estados, por tanto, trata-se de um ambiente discreto.

3.3.1 - Tempo

O transcorrer do tempo é modelado utilizando o conceito de unidade de tempo discreta disponibilizado pelo framework, chamado de *tick* (POSSI, 2012).

Cada agente agenda um método próprio, chamado no modelo de *step*, utilizando o recurso *annotations*¹, para ser executado pelo framework quando possível. Ao anotar o método, o agente informa quando o método deve começar a ser chamado e o intervalo de cada chamada, ou seja, em qual tick o método deve começar a ser chamado e de quantos em quantos ticks ele deve ser chamado novamente (POSSI, 2012). Segundo Possi (2012), Os ticks são intervalos de tempos necessários para a transição de um estado do ambiente para o próximo. Portanto, todos os eventos agendados devem ser executados e concluídos para que só então o próximo tick possa ocorrer, criando assim um sincronismo na simulação. Desta maneira, durante um tick, todos os agentes vão modificar suas posições, liberar substâncias, analisar sua vizinhança, baseados nas informações do tick anterior. Só quando todos tiverem realizado suas ações é que o tick termina e suas informações são atualizadas. Isso faz com que, na visão do agente, tudo esteja ocorrendo concorrentemente.

Possi (2012) descreveu que a duração real de cada tick varia muito em função do poder de processamento da máquina que estiver simulando o modelo, mas não é tão relevante – a não ser para fins de otimização – estudar esse tempo. Por outro lado, a abstração do tick em uma unidade de tempo real no modelo tem grande relevância para a pesquisa em questão. Em outras palavras, definir se um tick no modelo representa (ou simula) uma hora, um dia, ou um mês no mundo real, é muito importante.

3.3.2 - Espaço

Segundo Possi (2012), o conceito de espaço, ou topografia dos agentes, é modelado utilizando os recursos espaciais do framework, dentre eles, o conceito de projeção. No *Repast*, os agentes ficam imersos no ambiente, como que em uma “sopa” de agentes: eles não têm uma relação espacial uns com os outros. Essa relação espacial é obtida através do uso de projeções.

¹ *Annotations:* são uma forma sintática especial da linguagem de programação Java que permite adicionar informações, como propriedades especiais, a algumas outras formas sintáticas, como os métodos.

3.3.2.1- Projeções

Existem diversos tipos de projeções pré-definidas no Repast, entre as quais está a projeção em espaço Euclidiano (espaço contínuo), a projeção em network (grafo) e a projeção em forma de autômato celular, chamada no framework de Grid. Como também visto, o tipo de projeção escolhida deve levar em conta que tipo de relação que se deseja representar. Por exemplo, ao se utilizar uma projeção do tipo network, os agentes têm a informação de “quem está conectado a mim”. Já quando é utilizada uma projeção do tipo autômato celular, os agentes têm a informação de “onde estou” ou “quem está próximo a mim” (POSSI, 2012).

No modelo em questão, deseja-se representar a relação espacial propriamente dita, i.e., a coordenada de um determinado agente e sua distância em relação a outros agentes. Por analogia, o tipo de projeção que parece ser o mais viável seria o espaço Euclidiano, i.e., uma representação espacial contínua 2D, onde os agentes teriam coordenadas cartesianas reais (x ; y) indicando sua posição no espaço. No entanto, essa representação torna tarefas como difusão de substâncias, definição da relação de vizinhos – dentre outras –, muito custosas computacionalmente, por tratar um espaço contínuo (POSSI, 2012). Por este motivo, optou-se por utilizar um espaço discreto, a projeção Grid, no qual as linhas verticais e horizontais formam células espaciais bem definidas às quais estão vinculadas coordenadas espaciais i e j , definindo a coluna (i) e a linha (j) onde a célula espacial se encontra. A Figura 3.1 ilustra a estrutura de uma projeção do tipo Grid (POSSI, 2012)

Através desse tipo de projeção, cada agente passa a ter uma posição (i ; j). A movimentação do agente é feita alterando-se sua posição, para uma posição em sua Vizinhança de Moore (Figura 3.2). Dessa forma, um agente não consegue “pular” posições: ele precisa percorrer um caminho até chegar a posição desejada. Na Figura 3.2 está ilustrada a estrutura da Vizinhança de Moore.

Em uma estrutura de células bidimensional na forma de grade, a Vizinhança de Moore (de raio igual a um) compreende as oito células vizinhas à uma célula central. Seu nome é em homenagem à Edward F. Moore, um pioneiro no estudo dos autômatos celulares. Na Figura, em amarelo, está o agente na célula central. As células em vermelho formam a Vizinhança de Moore de raio 1, e são as possíveis posições para as quais ele pode se movimentar durante o tick (POSSI,2012).

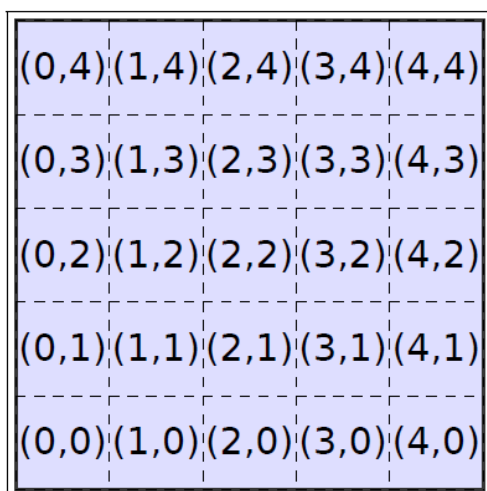


Figura 3.1. Ilustração da estrutura do espaço definido por uma projeção do tipo Grid. Fonte: Possi (2012).

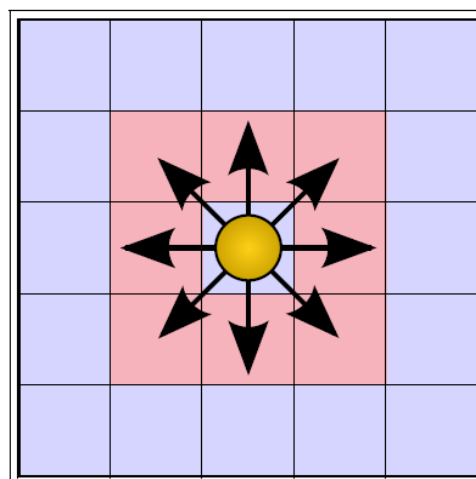


Figura 3.2. Vizinhança de Moore. Fonte: Possi (2012).

Essas projeções têm um tamanho definido, i.e., uma largura (W) e uma altura (H). Desta forma, a posição $P(i, j)$ de um agente pode ser definida como:

$$P(i, j) = \{i \in \mathbb{N} : 0 \leq i < W, j \in \mathbb{N} : 0 \leq j < H\}$$

Quando um agente tenta se mover para uma posição que esteja fora desses limites, o framework permite duas opções: não mover, ou simular um espaço toroidal, e.g., se um agente está na posição $P(W-1, j)$ e tenta se mover para a posição $P(W, j)$, ele é transportado para a posição $P(0, j)$. Da mesma forma com as coordenadas das linhas. Em outras palavras, ao passar pela borda da direita, por exemplo, o agente aparece na mesma linha, só que na borda da esquerda (POSSI, 2012).

Como foi observado que o espaço simulado (cerca de $1,21\text{mm}^2$) é pequeno comparado ao espaço livre que uma célula possui em um organismo real, com o intuito de tentar simular um espaço maior e mais próximo da realidade, se cogitou aumentar o tamanho do espaço, mas foi evidenciado que isso seria computacionalmente caro. Ao invés disso, foi definido que seria usada a segunda opção do framework, utilizando um espaço toroidal (Figura 3.3) para representar o espaço. Evidentemente, o espaço no organismo não é infinito, e esse não é o propósito desta escolha. Pelo contrário, o que se tenta é simular um espaço que pareça maior aos olhos do agente, mais perto assim da realidade (POSSI, 2012)

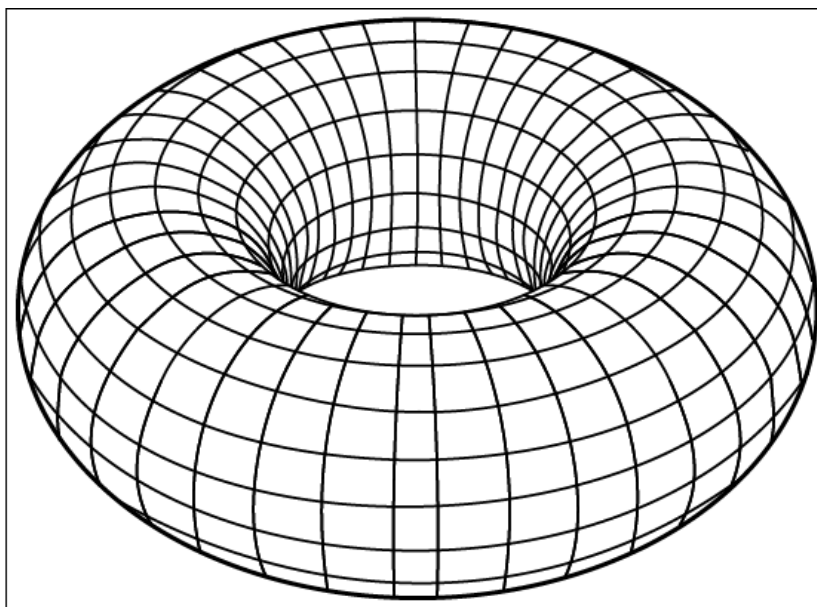


Figura 3.3. Ilustração de um espaço toroidal. Fonte: Possi (2012).

Além disso, quando um agente tenta se mover para uma posição onde já existe outro agente, foi definido que é permitido que eles ocupem o mesmo espaço. Dessa forma, tenta-se simular um espaço 3D, onde as células possam passar “por cima” ou “por baixo” uma das outras. Em outras palavras, é como observar um espaço 3D “de cima”, em uma projeção paralela ou ortogonal (POSSI, 2012)

3.3.3- Contextos

A funcionalidade do framework mais próxima do conceito de ambiente em SMA é chamada de *Context* (POSSI, 2012). Segundo Collier (2010), o contexto é o conceito principal do framework, fornecendo uma estrutura de dados que permite a organização dos agentes, tanto do ponto de vista do modelo, quanto do ponto de vista do *software*.

Segundo POSSI (2012), dessa forma, o contexto é a estrutura de dados onde os agentes “existem”. O contexto provê ainda inúmeras funcionalidades, tais como:

(1) **Parâmetros:** Os contextos podem ter parâmetros associados a eles. Os agentes podem acessar os parâmetros do contexto onde estão situados. Por exemplo, pode-se ter dois contextos, representando dois planetas, e cada contexto pode ter uma variável chamada “aceleração da gravidade”. Quando o agente acessar o parâmetro “aceleração da gravidade”, este pode ter valores diferentes, dependendo do contexto em que o agente se encontra.

(2) **Projeções:** Ao criar os agentes e adicioná-los a um contexto, estes ficam livres no espaço, como em uma “sopa de agentes”. O componente responsável por impôr uma estrutura nestes agentes é chamada de *Projection*. Cada contexto pode ter várias projeções associadas a ele, viabilizando a definição de várias estruturas para o mesmo grupo de agentes, ou, em outras palavras, vários pontos de vista sobre eles.

(3) **Sub-contextos:** Os contextos também suportam a adição de sub-contextos. Dessa forma, os sub-contextos herdam todas as características dos seus ancestrais, e podem definir outras novas. Por exemplo, podemos ter um contexto chamado “sistema solar”, e cada planeta poderia ser representado por um sub-contexto deste.

(4) **Camada de Dados:** Em certas situações, um agente precisa de informações, as quais mudam em relação à sua posição e ao seu tempo. Por exemplo, quando um agente simula a liberação de uma substância e o framework simula uma difusão sobre a mesma: a quantidade de substância irá depender do local onde o agente está e de quando ele aferiu essa quantidade. Para atender a esse requisito comum a muitos modelos biológicos, o Repast oferece uma funcionalidade denominada ValueLayers (camada de valores ou dados, em inglês). Os contextos permitem a adição de tais camadas de dados, que podem ser associadas às projeções. Por exemplo, o componente GridValueLayer adiciona uma camada de dados às projeções do tipo Grid, de tal forma que cada agente, além de poder saber a coordenada da sua posição atual, pode saber o valor instantâneo de uma camada de dados associado a sua posição atual.

POSSI (2012) descreveu em seu modelo, seis contextos existentes, utilizados para definir as diversas zonas e níveis de simulação, baseadas no modelo apresentado por Folcik *et al.* (2007). No *AutoSimmune* existem oito contextos distintos e estes contextos foram agrupados em três tipos:

(i) **Contexto principal:** É o contexto-pai, responsável por gerenciar os demais contextos; representa, de forma muito abstrata, o organismo;

(ii) **Zonas Reais:** São contextos que representam as zonas propriamente ditas, e que são apresentados visualmente durante a simulação;

(iii) **Zonas Virtuais:** São contextos que representam zonas que têm uma função cuja visualização não é relevante, não têm significado, ou simplesmente não podem ser exibidas. Por isto, estes contextos não possuem visualização durante a simulação.

Os contextos são classes Java, que herdam da classe DefaultContext integrante do framework (POSSI, 2012)

A classe responsável por implementar o contexto principal é chamada de Global. O contexto principal também tem a tarefa de criar os demais contextos, por isso, além de herdar da classe supracitada, ele implementa a interface ContextBuilder, cujo método build é responsável por construir o modelo assim que a simulação é iniciada. Os demais contextos (as zonas) são também classes Java que herdam de uma classe abstrata auxiliar, chamada Environment, que por sua vez estende a classe DefaultContext (POSSI, 2012)

No total, então, existe um contexto principal, quatro contextos de zonas reais, e dois contextos de zonas virtuais.

3.3.3.1 Parâmetros

Os contextos possuem uma funcionalidade que permite ao modelo utilizar parâmetros. Tal funcionalidade aumenta muito a usabilidade da ferramenta uma vez que permite que o usuário altere parâmetros do modelo através da interface gráfica e sem a necessidade de alterar o código-fonte da aplicação (POSSI, 2012)

Rótulo	ID	Tipo	Valor Padrão
Evaporation Rate	evaporationRate	FLOAT	0.92
Difusion Constant	difusionConstant	FLOAT	0.5
Tissue Width	tissueWidth	INTEGER	150
Tissue Height	tissueHeight	INTEGER	150
Dendritic Cells Count	dendriticCellsCount	INTEGER	200
Dendritic Self Pattern	dendriticSelfPattern	STRING	00000000000000000011
Antibody Lifetime	antibodyLifetime	INTEGER	30
Virus Self Pattern	virusSelfPattern	STRING	01010101010101010101
Self Pattern Lenght	selfPatternLenght	INTEGER	20
Receptor Pattern Lenght	receptorPatternLenght	INTEGER	5
Affinity Threshold	affinityThreshold	INTEGER	5
Virus Target Pattern	virusTargetPattern	STRING	00000000001111111111
Virus Virulency	virusVirulency	INTEGER	1
Virus Latency	virusLatency	INTEGER	10
Tissue Quarter	tissueQuarter	INTEGER	9
PC Self Pattern	pcSelfPattern	STRING	00000000001111111111
PC Stress Threshold	pCStressThreshold	INTEGER	5
PC Stress Max Time	pCStressMaxTime	INTEGER	25
NK Self Pattern	nKSelfPattern	STRING	00000111110000011111
NK Kill Limit	nKKillLimit	INTEGER	2
NK NoKill Timeout	nKNoKillTimeout	INTEGER	20
NK Lifetime	nKLifetime	INTEGER	30
NK CK1 Duration	nKCK1Duration	INTEGER	10
Th Self Pattern	thSelfPattern	STRING	11110000111100001111
Th Lifetime	thLifetime	INTEGER	500
Th CK1 Duration	thCK1Duration	INTEGER	50
Th Proliferation Count	thProliferationCount	INTEGER	5
Th CK1 Memory Threshold	thCK1MemoryThreshold	INTEGER	1
Th Memory Proliferation Count	thMemoryProliferationCount	INTEGER	10
CTL Self Pattern	cTLSelfPattern	STRING	01110011110111001111
CTL Tissue Lifetime	cTLTissueLifetime	INTEGER	300
CTL Lymphnode Lifetime	cTLLymphnodeLifetime	INTEGER	500
CTL Tissue CK1 Duration	cTLTissueCK1Duration	INTEGER	50
CTL Lymphnode CK1 Duration	cTLLymphnodeCK1Duration	INTEGER	100
CTL CK1 Memory Threshold	cTLCK1MemoryThreshold	FLOAT	0.2
CTL PK1 Memory Threshold	cTLPK1MemoryThreshold	FLOAT	0.2
CTL Proliferation Count	cTLProliferationCount	INTEGER	40

Dendritic Lymphnode Lifetime	dendriticLymphnodeLifetime	INTEGER	200
Dendritic PK1 Activation Threshold	dendriticPK1ActivationThreshold	FLOAT	0.5
Dendritic MK1 Activation Threshold	dendriticMK1ActivationThreshold	FLOAT	0.5
Dendritic Tissue MK1 Duration	dendriticTissueMK1Duration	INTEGER	30
Dendritic Lymphnode MK1 Duration	dendriticLymphnodeMK1Duration	INTEGER	20
Macrophage Self Pattern	macrophageSelfPattern	STRING	00011100011100011100
Macrophage Lifetime	macrophageLifetime	INTEGER	20
Macrophage MK1 Duration	macrophageMK1Duration	INTEGER	20
BCell Self Pattern	bCellSelfPattern	STRING	00110001110011000111
BCell Germinal Probability	bCellGerminalProbability	INTEGER	60
BCell MK1 Memory Threshold	bCellMK1MemoryThreshold	FLOAT	0.02
BCell CK1 Memory Threshold	bCellCK1MemoryThreshold	FLOAT	0.02
BCell Lifetime	bCellLifetime	INTEGER	400
BCell Antibody Count	bCellAntibodyCount	INTEGER	40
Citokine Value	citokineValue	FLOAT	100
Circulation Width	circulationWidth	INTEGER	250
Circulation Height	circulationHeight	INTEGER	250
Lymphnode Width	lymphnodeWidth	INTEGER	50
Lymphnode Height	lymphnodeHeight	INTEGER	50
Portal Macrophage To Send	portalMacrophageToSend	INTEGER	5
Portal NK To Send	portalNKToSend	INTEGER	5
Portal MK1 Threshold	portalMK1Threshold	FLOAT	1
Portal PK1 Threshold	portalPK1Threshold	FLOAT	1
Antibody Self Pattern	antibodySelfPattern	STRING	11000011111000000111
Pyogenes Self Pattern	pyogenesSelfPattern	STRING	01010101010101010101
Pyogenes Target Pattern	pyogenesTargetPattern	STRING	00000000001111111111
Pyogenes Virulency	pyogenesVirulency	INTEGER	1
Pyogenes Latency	pyogenesLatency	INTEGER	10
Kidney Tissue Width	kidney Tissue Width	INTEGER	150
<i>KidneyTissue</i> Height	<i>KidneyTissue</i> Height	INTEGER	150
<i>KidneyTissue</i> Quarter	<i>KidneyTissue</i> Quarter	INTEGER	10
<i>AirWay</i> Tissue Width	<i>AirWayTissue</i> Width	INTEGER	150
<i>AirWay</i> Tissue Height	<i>AirWayTissue</i> Height	INTEGER	150
<i>AirWay</i> Tissue Quarter	<i>AirWayTissue</i> Quarter	INTEGER	10
Antibiotic	Antibiotic	BOOLEAN	false
AntibioticInterval	antibioticInterval	INTEGER	50
AntibioticAmount	antibioticAmount	INTEGER	500
AntibioticThreshold	antibioticThreshold	FLOAT	50
Neutrophil Self Pattern	NeutrophilSelfPattern	STRING	00011110011110011110
Neutrophil MK1 Duration	NeutrophilMK1Duration	INTEGER	20
Neutrophil Lifetime	NeutrophilLifetime	INTEGER	20
Portal Neutrophil to Send	portalNeutrophilToSend	INTEGER	20
Pyogenes Initial	pyogenesInitial	INTEGER	100

Quando um parâmetro é criado, ele é exibido na interface gráfica e pode ter seu valor ajustado antes de se iniciar a simulação. Por outro lado, no código-fonte da aplicação, é possível recuperar o valor desses parâmetros facilmente para utilizá-lo na implementação do modelo. Esses parâmetros são definidos por um rótulo, que irá identificá-lo na interface gráfica, um identificador, que irá identificá-lo no código-fonte, um tipo, que irá definir o tipo de dados que ele armazena, e um valor padrão, que será utilizado caso o usuário não especifique outro valor (POSSI, 2012). A Tabela 3.1 contém a lista de todos os parâmetros utilizados no modelo, assim como seus valores padrões.

3.3.4 Zonas

O modelo apresentado neste trabalho também apresenta seis zonas distintas (FOLCIK *et al.*, 2007; POSSI (2012)). No framework, as zonas são definidas como um contexto, com suas variáveis, uma projeção do tipo Grid, e quantas camadas de dados forem necessárias para representar as substâncias presentes nelas.

Em relação ao modelo, as zonas representam áreas do organismo nas quais as células irão desempenhar os seus papéis. Cada zona possui um tamanho específico, os agentes que podem estar nela, assim como um conjunto inicial de agentes; as substâncias que podem circular por ela, dentre outros. O tamanho de cada zona é definido empiricamente como o menor possível, para não sacrificar o desempenho do sistema e, igualmente, para não comprometer a simulação de suas funções e a interação dos agentes (POSSI, 2012).

Com relação ao modelo apresentado por Possi (2012), foi retirado do presente modelo a Zona *Tissue* e incluída duas novas Zonas: (1) *AirWayTissue*, representando as vias aéreas superiores ou tonsilas, e (2) *KidneyTissue*, representando os rins. As zonas já definidas no modelo e matidas foram: *Lymphnode*, *Circulation*, *AirWayTissue*, *KidneyTissue*, *BoneMarrow* e *Thymus*. A seguir, estas zonas serão descritas em maiores detalhes.

3.3.4.1 *AirWayTissue*

A zona *AirWayTissue* é implementada pela classe *AirWayTissue*. Ela é baseada na “Zona 1” – definida por Folcik *et al.* (2007) e Possi (2012) – representando uma fatia microscópica de um tecido parenquimatoso genérico (FOLCIK *et al.*, 2007), onde as células do organismo têm seu primeiro contato com o *Streptococcus pyogenes*. O patógeno se instala e infecta o hospedeiro, podendo ou não provocar a doença. No período de incubação ou multiplicação inicial é que a bactéria, sobrepunando a resposta do organismo, se prolifera o suficiente para dar início às manifestações clínicas da doença.

Os principais agentes (ou células) presentes nesta zona são as células parenquimatosas, representadas pelos agentes PC, as quais formam uma estrutura de quarteirões que preenche todo o espaço da zona, representando a organização do tecido, como em um órgão. Essa estrutura está ilustrada na Figura 3.4.

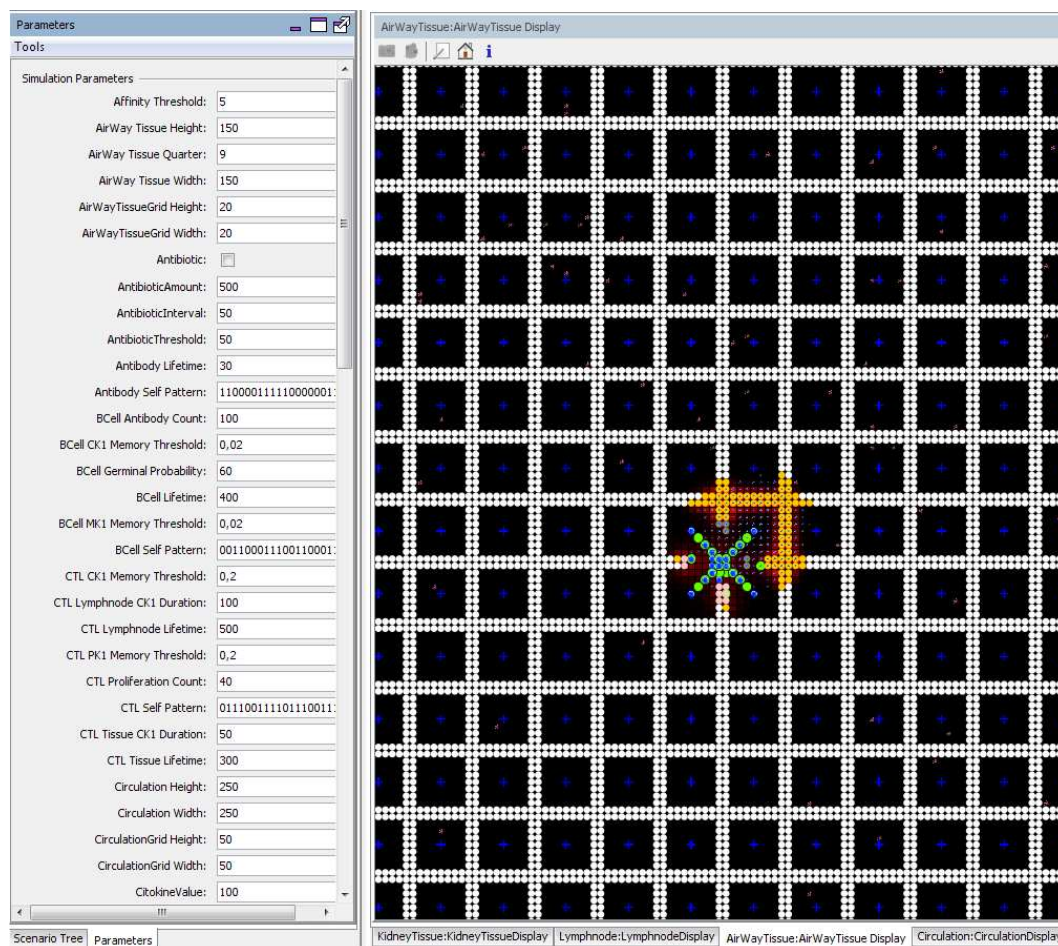


Figura 3.4. Imagem da zona *AirWayTissue*, implementada.

Suas dimensões são definidas pelos parâmetros do contexto *AirWayTissueWidth* e *AirWayTissueHeight*.

Segundo Possi (2012), ao se considerar que uma célula possui 0,01mm de diâmetro em média e supondo que os parâmetros que definem o tamanho da zona *AirWayTissue* estejam ajustados para o seu valor padrão que é de 110 unidades, essa zona representaria uma área de tecido de cerca de 1,21mm².

3.3.4.1 *KidneyTissue*

A zona *KidneyTissue* é implementada pela classe *KidneyTissue*. Ela é baseada também na “Zona 1” – definida por Folcik *et al.* (2007) – representando uma fatia microscópica de um tecido renal ou glomérulos. Neste tecido é que a GNPE se estabelece (KUMAR *et al.*, 2005; BISNO, 2000). Essa doença somente ocorrerá no nosso modelo, caso tenha ocorrido infecção anterior na zona *AirWayTissue*, na qual as células do organismo têm seu primeiro contato com o patógeno, e onde também ocorre a infecção.

Os principais agentes (ou células) presentes nesta zona são as células parenquimatosas, representadas pelos agentes PC, assim como a zona *AirWayTissue*. Essa estrutura está ilustrada na Figura 3.5.

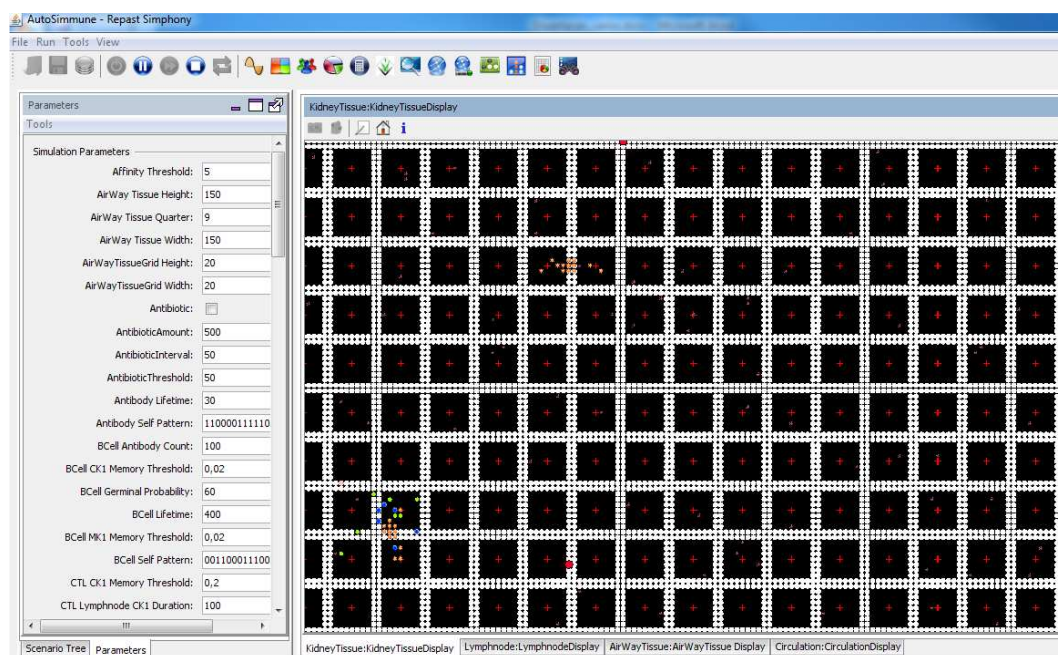


Figura 3.5. Imagem da zona *KidneyTissue*, implementada.

Suas dimensões são definidas pelos parâmetros do contexto *KidneyTissueWidth* e *KidneyTissueHeight*.

Da mesma forma que se considera o diâmetro das células da Zona *AirWayTissue*, também aqui será considerado que essa zona representaria uma área de tecido de cerca de $1,21\text{mm}^2$.

3.3.4.2 Lymphnode

De acordo com Possi (2012), a zona Lymphnode é implementada pela classe Lymphnode. Ela é baseada na “Zona 2”, definida por Folcik *et al.* (2007), e representa o linfonodo. Segundo Folcik *et al.* (2007), esta zona pode representar também o baço. É nessa zona que se localizam, inicialmente, os linfócitos, onde os antígenos lhes são apresentados e onde eles se proliferam, uma vez que tenham reconhecido o antígeno.

Os principais agentes (ou células) presentes nesta zona são os linfócitos T helper (representados pelos agentes ThCell), os linfócitos T citolíticos (representados pelos agentes CTL) e os linfócitos B (representados pelos agentes BCell). Suas dimensões são definidas pelos parâmetros do contexto *lymphnodeWidth* e *lymphnodeHeight* (POSSI, 2012). Esses parâmetros têm o valor padrão de 50 unidades.

3.3.4.3 Circulation

A zona Circulation é implementada pela classe Circulation. Ela é baseada na “Zona 3”, definida por Folcik *et al.* (2007), e representa a circulação linfática e sanguínea

(POSSI 2012). Segundo Folcik *et al.* (2007), a principal função dessa zona é representar a circulação de células que viajam do Lymphnode para os tecidos. No presente modelo, a circulação tem como destino a *Zona AirWayTissue* e *KidneyTissue*, por um período não conhecido e aleatório de tempo. Dessa maneira, os principais agentes desta zona são os linfócitos que, vindos do Lymphnode, passam pela zona *Circulation* até chegar às Zonas *AirWayTissue* e *KidneyTissue*. Suas dimensões são definidas pelos parâmetros do contexto *circulationWidth* e *circulationHeight*. Esses parâmetros têm o valor padrão de 250 unidades.

3.3.4.4 Bone Marrow

A zona *Bone Marrow* é implementada pela classe *BoneMarrow*. Essa é uma nova zona, que representa uma medula óssea abstrata. Criada pela necessidade de se representar os mecanismos relacionados à tolerância central das células B, uma vez que os agentes agora têm uma representação de especificidade. Esta zona é responsável por gerar os agentes que representam os linfócitos B, com especificidades aleatórias e testadas através dos mecanismos da tolerância central do linfócito B, como representado na figura 3.6 (POSSI, 2012).

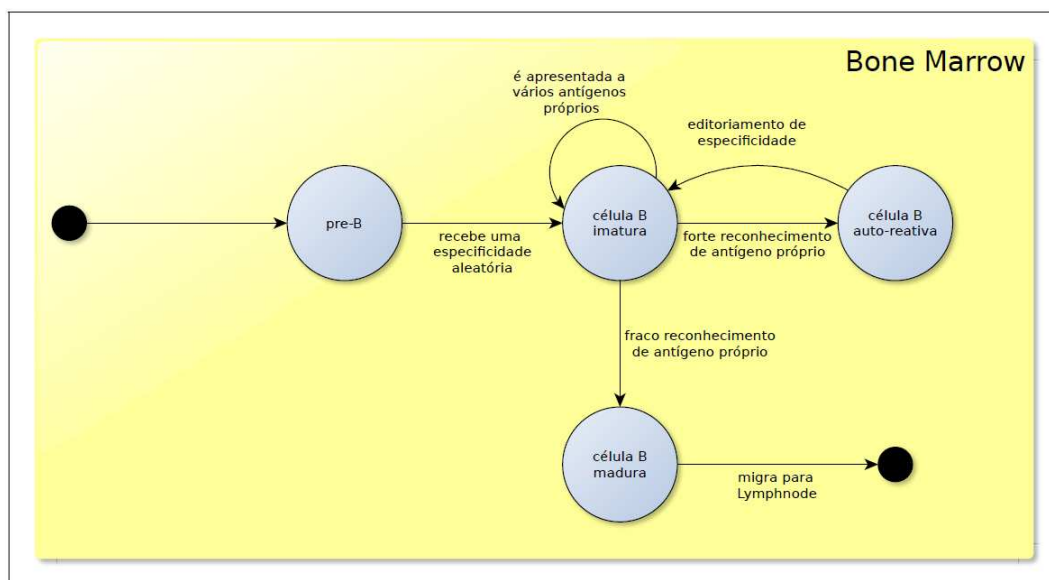


Figura 3.6. Tolerância Central do Linfócito B. Fonte: Possi (2012).

Toda vez que a geração de um linfócito B é necessária, a zona *BoneMarrow* origina um linfócito pré-B, sem especificidade. Esse linfócito recebe uma especificidade aleatória, representando o mecanismo de geração de diversidade, passando a ser um linfócito B imaturo. Após isso, esse linfócito é exposto a autoantígenos, presentes no “banco de dados” de antígenos próprios: caso ele reconheça algum autoantígeno com alta afinidade, o linfócito sofre “editoriamento do receptor” (ABBAS & LICHTMAN, 2007), modificando seu receptor e retornando ao estado de linfócito B imaturo. Caso ele reconheça o antígeno próprio com baixa afinidade, ele passa pela seleção negativa e

segue para os órgãos linfoides. Esta zona é uma zona virtual e, portanto, não possui uma projeção e, conseqüentemente, não possui uma visualização, ou dimensões.

3.3.4.5 Thymus

A zona Thymus é implementada pela classe Thymus. Essa é uma nova zona, que representa o Timo, abstratamente. Criada pela necessidade de se representar os mecanismos relacionados à tolerância central das células T, uma vez que os agentes agora têm uma representação de especificidade. Esta zona é responsável por gerar os agentes que representam os linfócitos T helper (ThCell) e T citolítico (CTL) – também denominado T citotóxico –, com especificidades aleatórias e testadas através dos mecanismos da tolerância central do linfócito T (ilustrado na figura 3.7).

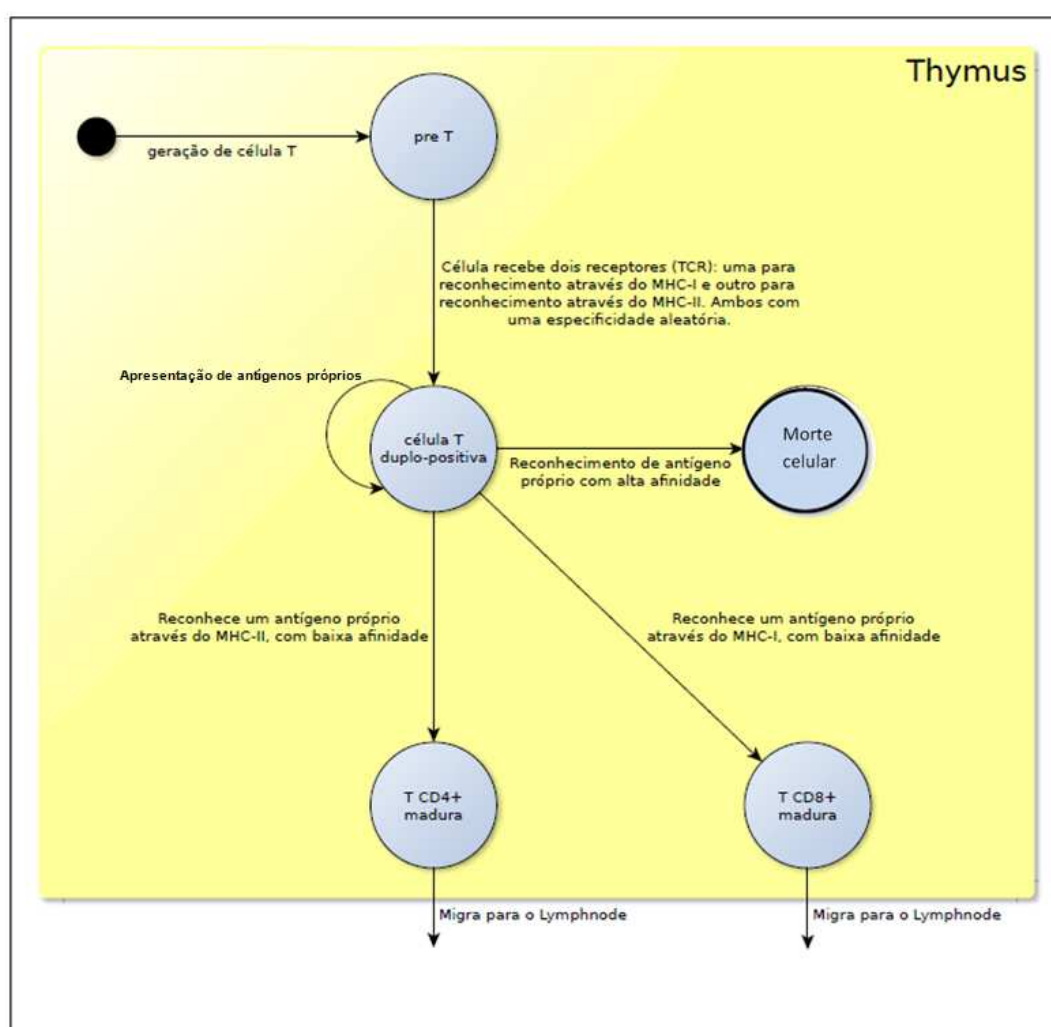


Figura 3.7. Tolerância Central do Linfócito T.

Toda vez que a geração de um linfócito T helper ou T citolítico é necessária, a zona Thymus gera um linfócito pré-T, sem especificidade. Esse linfócito recebe então dois receptores TCR (o CD4+ e o CD8+) e passa a ser um linfócito T duplo-positivo. A partir daí, vários autoantígenos, presentes no “banco de dados” de antígenos próprios, são apresentados a esse linfócito: caso ele reconheça o autoantígeno com alta afinidade, ele é

eliminado; caso ele reconheça o autoantígeno, com baixa afinidade, através do MHC-I, ele se diferencia em um linfócito T citolítico. Já se ele reconhecer o autoantígeno, com baixa afinidade, através do MHC-II, ele se diferencia em um linfócito T helper. Em ambos os últimos casos, o linfócito migra para o Lymphnode.

Esta zona, assim como a *BoneMarrow*, é uma zona virtual, e portanto, não possui uma projeção e, conseqüentemente, não possui uma visualização, ou dimensões.

3.3.5 Migração entre zonas

Como existem seis zonas onde há agentes, é de se esperar que eles, em algum momento, tenham a necessidade de migrar de uma zona para outra. Por exemplo, os linfócitos recém-criados nas zonas *BoneMarrow* e *Thymus* devem migrar para a zona *Lymphnode*. Assim como os linfócitos ativados do *Lymphnode* devem migrar para a zona *Circulation* e, mais tarde, para as zonas *AirWayTissue* ou *KidneyTissue*. Por fim, as células dendríticas que, após capturarem antígenos nas zonas *AirWayTissue* ou *KidneyTissue* – e mediante a detecção de *danger signals* – tendem a migrar para o *Lymphnode* afim de apresentá-los aos linfócitos lá contidos.

Essa migração é realizada e controlada por agentes especiais, chamados Portals, baseados nos agentes “Portals” descritos por Folcik *et al.* (2007). Segundo esses autores, tais agentes representam vasos linfáticos e sanguíneos responsáveis pela circulação das células e substâncias entre as zonas.

Cada zona possui seus próprios portais, que são conectados a portais em outras zonas. Por exemplo, a zona *AirWayTissue* possui os seus portais, implementados pela classe *AirWayTissuePortal* que estende a classe *Portal*. Os portais do tipo *AirWayTissuePortal* podem estar conectados a portais do tipo *CirculationPortal*, por exemplo. Dessa forma, quando um agente alcança um *CirculationPortal*, e este agente atende aos requisitos para passar por ele até a zona *AirWayTissue*, o agente é transportado para a localização de um *AirWayTissuePortal* dentro da zona *AirWayTissue*, simulando a passagem por um vaso sanguíneo.

Assim também acontece com as substâncias que são liberadas em uma zona: quando atingem um portal, este notifica o portal que representa a sua outra extremidade em outra zona, que passa a emitir a mesma substância lá, simulando assim a passagem da substância pelo vaso.

3.3.6 Difusão de Substâncias

Toda a comunicação entre as células é realizada através de mediadores químicos, chamados citocinas. Essas substâncias, quando liberadas pelas células, sofrem um processo de difusão, espalhando-se pelos arredores do local onde foram liberadas,

diminuindo sua concentração; ademais, as mesmas sofrem também um processo de decaimento, diminuindo sua quantidade com o tempo (POSSI, 2012).

Para simular esse tipo de fenômeno, o framework provê um componente denominado ValueLayer. Este componente é uma interface, sendo implementada por diversos outros, dentre eles, o GridValueLayer. O GridValueLayer nada mais é do que uma camada abstrata de dados que, no momento de sua criação, é associada a uma projeção do tipo Grid. É possível associar várias camadas de dados à mesma projeção. Dessa forma, um agente pode saber qual a concentração de dada substância, naquele instante de tempo, na posição $(i; j)$. Para cada substância, o agente irá selecionar os dados da camada específica para ela. Para associar uma camada de dados a uma zona, basta invocar o método do modelo denominado createCitokineLayer. Para liberar uma certa quantidade de citocina em uma posição $(i; j)$ basta invocar o método releaseCitokine. E para recuperar o valor da citocina em uma dada substância, basta invocar o método getCitokineValue. Todo GridValueLayer tem associado a ele um componente denominado ValueLayerDiffuser. Esse componente é responsável por simular a difusão e decaimento da substância, formando assim um gradiente de concentração. A cada tick, todas as camadas de dados têm seus valores atualizados (POSSI, 2012).

Segundo Possi (2012) a difusão das substâncias é calculada de acordo com a Equação (3.2).

$$V_{\text{novo}} = E \times (V_{\text{atual}} + D \times (V_{\text{vizinhos}} - V_{\text{atual}})) \quad (3.2)$$

Onde:

E: constante de decaimento;

D: constante de difusão;

V_{novo} : valor da concentração atualizado na posição atual;

V_{atual} : valor da concentração antigo (do tick anterior) na posição atual;

V_{vizinhos} : valor da concentração antigo (do tick anterior) nas posições da Vizinhança de Moore, ao redor da posição atual.

Deste modo, os cálculos são feitos para todas as posições, e seus resultados são guardados em uma matriz auxiliar. Assim que todas as posições tiverem seus novos valores calculados na matriz auxiliar, os dados são copiados para a camada de dados, sobrescrevendo os valores antigos. Somente quando todas as camadas tiverem seus valores atualizados (e os agentes executarem suas tarefas agendadas) é que o próximo tick ocorre (POSSI, 2012).

A Figura 3.8 ilustra como as camadas de dados são utilizadas para simular a difusão das substâncias nas zonas. Em 3.8(a) está ilustrado o gradiente contínuo, como é no mundo real 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 3.8(b) é mostrado a discretização do gradiente, mostrando como os agentes veem a distribuição da substância.

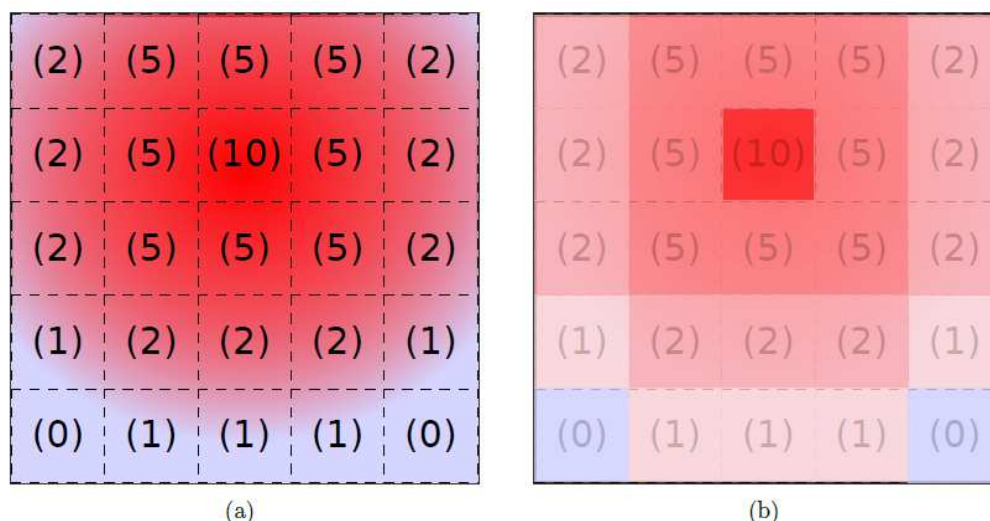


Figura 3.8. Ilustração da representação do gradiente de dispersão das citocinas através das camadas de dados. Em (a), a distribuição contínua da substância, como acontece no mundo real. Em (b), a discretização do gradiente, mostrando como os agentes o veem. Fonte: Possi (2012).

3.3.6.1 Citocinas

As substâncias que foram incluídas no modelo são representações abstratas das substâncias existentes no mundo real e são baseadas em um subconjunto das substâncias existentes no modelo descrito por Folcik *et al.* (2007). Segundo Possi (2012), a regra geral para definir as substâncias no modelo – como descrito por Folcik *et al.* (2007) – foi criar substâncias abstratas que representem as substâncias reais agrupadas por funcionalidades, as quais, por sua vez, foram abstraídas por Folcik *et al.* (2007) em duas: as substâncias que amplificam a resposta inflamatória (pró-inflamatórias) e as substâncias que suprimem essa resposta (anti-inflamatórias). Folcik *et al.* (2007) adotou uma regra de nomenclatura nas substâncias: quando um nome de substância termina com o numeral 1, se trata de uma substância pró-inflamatória; já se o nome da mesma termina com o numeral 2, então trata-se de uma substância anti-inflamatória. Optou-se por utilizar a mesma regra e, portanto, serão descritas as substâncias que estão presentes no modelo proposto por Possi (2012).

As substâncias pró-inflamatórias incluídas no modelo são:

PK1 – Baseada na substância “Parenchymal-kine 1” (PK1), descrita por Folcik *et al.* (2007), representa fatores de estresse liberados por tecidos que estão sofrendo danos em razão da infecção ou da resposta imunológica. Segundo os autores, essa substância representa fatores de estresse como as proteínas de choque-térmico (HSP), ácido úrico, e outras; além de quimiocinas como CX3CL1, CCL3, CCL5 e CCL6 (FOLCIK *et al.*, 2007);

MK1 – Baseada na substância “Mono-kine 1” (MK1), descrita por Folcik *et al.* (2007), representa o conjunto de substâncias pró-inflamatórias presentes nas respostas imunológicas inatas. Essa substância representa IL-12, IL-8, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 e CXCL11 (FOLCIK *et al.*, 2007);

CK1 – Baseada na substância “Cytokine 1 ” (CK1), descrita por Folcik *et al.* (2007), representa o conjunto de substâncias pró-inflamatórias presentes nas respostas imunológicas adaptativas. Segundo Folcik *et al.* (2007), essa substância representa as substâncias INF-, IL-2 e TNF- (FOLCIK *et al.*, 2007);

NECROSIS – Baseada na substância “Necrosis factors”, representa os restos mortais de células que sofreram necrose, i.e., morreram por algum processo traumático, e não por morte celular programada (FOLCIK *et al.*, 2007).

Já as substâncias anti-inflamatórias incluídas no modelo são:

MK2 – Baseada na substância Mono-kine 2 (MK2), descrita por Folcik *et al.* (2007), representa o conjunto de substâncias anti-inflamatórias presentes nas respostas imunológicas inatas. Segundo Folcik *et al.* (2007), essa substância representa as substâncias IL-10, CCL1, CCL17, CCL22, CCL11, CCL24, CCL26 (FOLCIK *et al.*, 2007);

CK2 – Baseada na substância “Cytokine 2 ” (CK2), descrita por Folcik *et al.* (2007), representa o conjunto de substâncias anti-inflamatórias presentes nas respostas imunológicas adaptativas. Segundo Folcik *et al.* (2007), essa substância representa as substâncias TGF-, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e INF- (FOLCIK *et al.*, 2007);

APOPTOSIS – Baseada na substância “Apoptotic bodies”, descrita por Folcik *et al.* (2007), representa os restos mortais de células que sofreram morte celular programada, ou apoptose (FOLCIK *et al.*, 2007).

3.3.6.2 Antimicrobiano

Antimicrobiano foi incluído no modelo como uma substância, sendo uma representação abstrata dos antimicrobianos existentes no mundo real. Vários antimicrobianos apresentam boa atividade contra o *S. pyogenes*, mas o de escolha é a penicilina G (TAVARES, 2009). Um aspecto importante da terapêutica com penicilina é o fato de que até agora não ocorreu seleção de amostras resistentes a este antimicrobiano, pelo menos em escala significativa. O objetivo da terapêutica da faringite é erradicar a bactéria do organismo.

Para facilitar a utilização, foram incluídos parâmetros, assim não foi preciso alterar o código no momento em que queremos simular a difusão de antimicrobianos.

Antibiotic: Essa opção, uma vez marcada nos parâmetros, indica que serão utilizados antimicrobianos na simulação.

AntibioticThershold: representa a quantidade de antimicrobiano que a bactéria suporta, inspirada na ideia de concentração inibitória mínima. Caso exista uma concentração maior que esse valor e a bactéria for atingida, ela morre.

AntibioticInterval: simula o intervalo de aplicação do antimicrobiano, em ticks.

AntibioticAmount: Representa a quantidade de antimicrobiano que é aplicada a cada intervalo definido pelo parâmetro anterior.

3.4 Agentes

Nesta seção serão descritos os agentes do modelo e suas funções. Por questão de praticidade, os agentes serão comentados como classes do sistema – para facilitar o entendimento –, por representar algo mais tangível ao desenvolvedor que por ventura estiver utilizando este trabalho.

3.4.1 Granularidade

Como o objetivo deste trabalho é criar um modelo estendendo o *AutoSimmune* descrito em Possi (2012), optou-se por adotar o nível de granularidade “antigen-as-agent” ou “hasSpecificity-as-agent”, i.e., tudo aquilo que estiver incluído no modelo e for um antígeno, ou contiver antígenos, será modelado como um agente. Em outras palavras, todo componente que puder ser reconhecido por um receptor de reconhecimento de padrões será considerado um agente. Maiores detalhes podem ser consultador em Possi (2012).

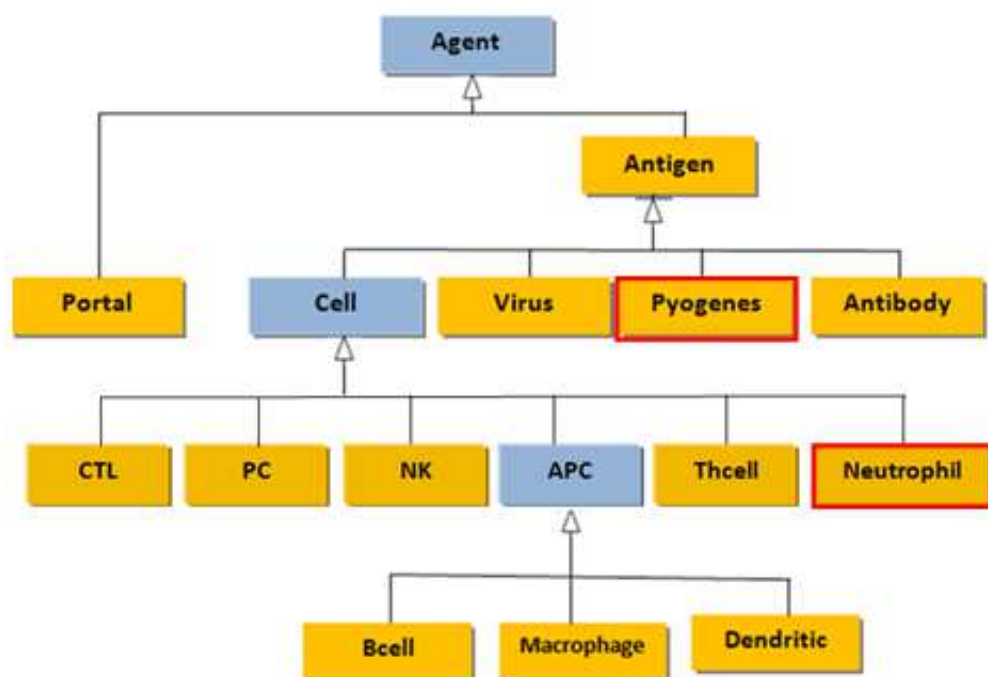


Figura 3.9. Classes de Agentes e a sua organização resultante do nível de granularidade escolhido. As demais substâncias como as citocinas e outras moléculas, cuja especificidade não seja relevante, foram modeladas como substâncias, utilizando a camada de dados.

A Figura 3.9 expõe as classes representando quais elementos foram modelados como agentes e a organização, como resultado do nível de granularidade escolhido. Em azul estão as classes abstratas e, em amarelo, as classes concretas. Estão com borda vermelha os novos agentes que foram incluídos no modelo.

3.4.2 Especificidade

O termo especificidade refere-se ao fato das respostas imunológicas adaptativas serem específicas para o patógeno invasor (POSSI, 2012). Mais ainda, refere-se ao fato dos linfócitos terem receptores específicos para diferentes antígenos. Dessa forma, assume-se no modelo que especificidade refere-se ao fato dos agentes terem um padrão (um antígeno) como alvo de suas ações, e como gatilho para sua ativação.

Assim, temos dois conceitos bem definidos no modelo: Antígeno é o padrão que identifica qualquer instância da classe `Antigen`, ou de uma classe que estenda a classe `Antigen`; especificidade é o padrão dos receptores dos linfócitos e dos anticorpos, o padrão para o qual eles são específicos, ou o padrão capaz de ativá-los. Neste ponto, há um conceito ainda a definir: o padrão. No mundo real, esse padrão é o padrão molecular relacionado ao patógeno, sua estrutura e a sua sequência de aminoácidos. Já no modelo, será utilizado um padrão abstrato, como sugerido por Floreano e Mattiussi (2008), representado por uma estrutura formada por uma sequência de símbolos binários 0 e 1 (bits), conhecida como string de bits (Figura 3.10A). Essa estrutura é implementada pela classe `Pattern`. Todo agente que descende da classe `Antigen` possui um padrão próprio, uma instância da classe `Pattern`, chamado de `self`. Da mesma forma, os linfócitos têm um `Pattern` que representa a sua especificidade, chamado de `target` (POSSI, 2012)

Todo agente que descende da classe `Cell`, quando criado, adiciona o seu padrão `self` a um banco de dados de antígeno próprios, chamando de conjunto `SELF`. É este conjunto que é apresentado aos linfócitos durante a tolerância central (POSSI, 2012)

3.4.3 Afinidade

A afinidade é a propriedade que define a tendência entre as substâncias de interagirem (POSSI, 2012). Mais especificamente, na imunologia, a afinidade é a força com a qual um antígeno é reconhecido por um receptor (FLOREANO; MATTIUSSI, 2008). Da mesma forma, no modelo, a afinidade é definida com o grau de similaridade entre os padrões apresentados pelo antígeno e pelo seu receptor: quanto maior esse grau, maior será a afinidade. Será utilizada uma sequência de bits para representar os padrões moleculares. Mas, como calcular o grau de afinidade entre dois padrões formados por sequências de bits? Para isso será utilizado o método sugerido por Floreano e Mattiussi (2008), chamado de “comprimento da maior subsequência comum”, em uma tradução livre de *longest common substring length*, cujo objetivo é calcular, dados dois padrões de sequências de bits A e B, o tamanho da maior subsequência de símbolos contíguos que esteja contida em A e em B simultaneamente, na mesma ordem.

O grau de afinidade entre dois padrões então é definido como o comprimento da maior subsequência comum aos dois padrões. Para tanto, foi necessário a criação de três novos parâmetros no modelo: o primeiro é o `affinityThreshold`, que define o

comprimento mínimo que precisa ser superado para que seja considerado que os dois padrões se reconhecem. O segundo parâmetro é o `receptorPatternLength`, que define o comprimento padrão das sequências de bits usadas para representar a especificidade dos receptores. Finalmente, o terceiro parâmetro é o `selfPatternLength`, que define o comprimento padrão das sequências de bits usadas para representar os antígenos. A Figura 3.10B ilustra o funcionamento do mecanismo de cálculo do grau de afinidade.

Como já dito, esses padrões estão em todos os agentes que estendem a classe `Antigen`, representando o fato de todos esses agentes poderem ser reconhecidos por algum receptor. Já os agentes que estendem a classe `Cell` possuem o método `MHCI`, capaz de apresentar o padrão `self` do agente, e, no caso de células infectadas, o padrão do patógeno que as infectou. Esse método representa o complexo de histocompatibilidade principal classe I (POSSI, 2012).

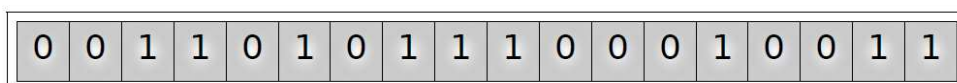


Figura 3.10^a. Exemplo de uma sequência de bits. Fonte: Possi (2012).

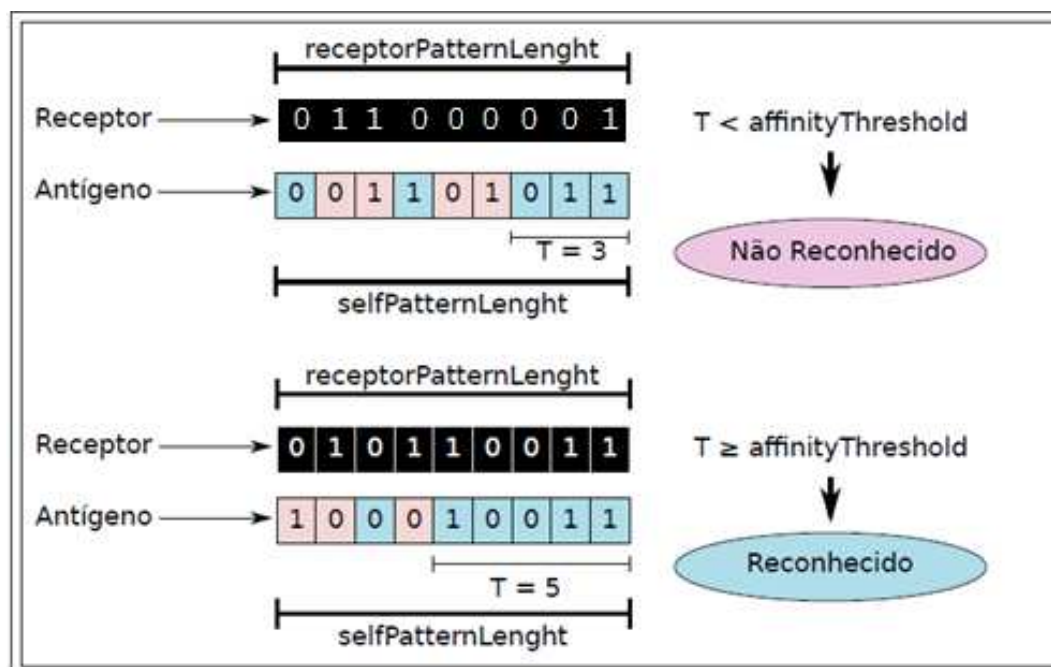


Figura 3.10B. Ilustração do cálculo do Grau de Afinidade.

Conforme ilustrado na figura 3.10B, os símbolos da seqüência de bits do antígeno em azul indicam que eles são iguais aos símbolos da seqüência de bits do receptor de mesma posição. Os símbolos vermelhos indicam que são diferentes. A maior subseqüência de símbolos comuns pode ser definida, na ilustração, como a maior seqüência de símbolos azuis contíguos. As seqüências não precisam, necessariamente, estarem alinhadas. No exemplo, supõe-se que o parâmetro `affinityThreshold` seja igual a 4 (POSSI, 2012).

Os agentes que estendem a classe APC, por sua vez, possuem o método MHCII, capaz de apresentar o padrão self de agentes que foram fagocitados (POSSI, 2012). Esse método representa o complexo de histocompatibilidade principal classe II. Por outro lado, os linfócitos CTL, ThCell e BCell têm receptores e, conseqüentemente, uma especificidade. Eles utilizam o cálculo do grau de afinidade para detectar se seus receptores reconhecem ou não o antígeno que está sendo apresentado por um agente APC. Outros agentes que utilizam o cálculo do grau de afinidade, mas responsáveis pela imunidade inata, são o Macrophage e o NK. Eles utilizam esse cálculo para detectarem substâncias reconhecidas como PAMP e para inspecionar o MHCI das células respectivamente. Já sobre as PAMP, elas são representadas por um conjunto de padrões que foram reservados e incluídos em um banco de dados de antígenos de PAMP, chamado de conjunto PAMP, um conjunto semelhante ao conjunto SELF.

3.4.4 Tipos de Agentes

Os diferentes tipos de agentes, oriundos do processo de modelagem e do nível de granularidade escolhido, estão ilustrados na Figura 3.8. Todos esses agentes são definidos como classes da linguagem Java. Os agentes foram modelados como agentes reativos com estado, por ser o tipo de agente cujo comportamento mais se assemelha ao comportamento real das células no organismo vivo (POSSI, 2012). As regras de comportamento dos agentes são baseadas na literatura específica sobre imunologia – em especial, nos trabalhos Abbas e Lichtman (2007), Roitt e Delver (2006) – e também no modelo definido por Folcik *et al.* (2007). Essas regras foram extraídas da literatura, e os comportamentos foram descritos em máquinas de estado finito, como sugerido por Wooldridge (2001), Weiß (1999) e Folcik *et al.* (2007). Posteriormente, essas máquinas de estado foram implementadas na forma de código-fonte Java, criando-se assim as classes Java que representam os agentes. Cada agente possui um método principal, chamado arbitrariamente (ou tradicionalmente) de *step*. Como já mencionado, este método possui anotações que agendam a sua execução a cada tick da simulação, simulando assim a ação dos agentes: a cada tick, o agente percebe o ambiente, e reage, segundo as suas regras pré-definidas.

3.4.4.1- Agent

A classe abstrata Agent é a representação básica do agente, em sua forma mais simples (POSSI, 2012). Todo agente precisa estender essa classe para ser aceito pelos contextos (ambientes). Os principais atributos do agente são:

(i) **zone** – Atributo do tipo Environment, responsável por armazenar o ambiente (espaço, zona) na qual o agente está situado;

(ii) **x** – Atributo do tipo Integer, responsável por armazenar a coordenada x relativa à posição do agente no espaço definido pela projeção;

(iii) **y** – Atributo do tipo Integer, responsável por armazenar a coordenada y relativa à posição do agente no espaço definido pela projeção;

(iv) **ticks** – Número de ticks de idade do agente. Muitos agentes têm um tempo de vida limitado, definido por parâmetros específicos. Os agentes utilizam esse atributo para saber sua idade,

Os principais métodos do agente são:

(1) **randomWalk** – Faz com que o agente ande aleatoriamente pelo espaço, sempre 1 unidade por tick, dentro da Vizinhança de Moore;

(2) **getNeighbors** – Método que retorna todos os agentes que estão na Vizinhança de Moore do agente;

(3) **getSpecificNeighbors** – Método que retorna todos os agentes, do tipo especificado nos parâmetros do método, que estão na Vizinhança de Moore do agente. Esse método utiliza, por padrão, uma Vizinhança de Moore de raio 1. No entanto, é possível especificar um raio diferente. Isso é necessário para representar a Vizinhança de Moore nos agentes Dendritic;

(4) **step** – Método abstrato, que deve ser implementado pelas classes que herdam da classe Agent. Responsável por executar o comportamento dos agentes, baseado em suas regras;

(5) **die** – Método responsável pela exclusão do agente do contexto, e consequentemente, do modelo.

3.4.4.2 - Antigen

A classe Antigen é uma classe concreta, pois se pensou na possibilidade de ser necessário representar antígenos livres na circulação. Sua principal característica é ter um atributo do tipo Pattern, chamado self (ou antigen), que representa o padrão molecular do agente. Ele possui um método chamado `getPattern` que informa qual é o padrão antigênico de qualquer agente que estenda essa classe.

Toda classe que estenda a classe Antigen também representa um antígeno. É válido ressaltar que antígeno é qualquer estrutura que possa ser reconhecida por um receptor de reconhecimento de padrões (POSSI 2012).

3.4.4.3 - Antibody

A classe Antibody é definida como uma classe concreta, que representa as moléculas de anticorpo (POSSI, 2012). São criados pelos agentes BCell, quando ativados. Possui um atributo do tipo Pattern – chamado `target` –, que representa a especificidade do anticorpo. Suas regras estão ilustradas na Figura 3.11.

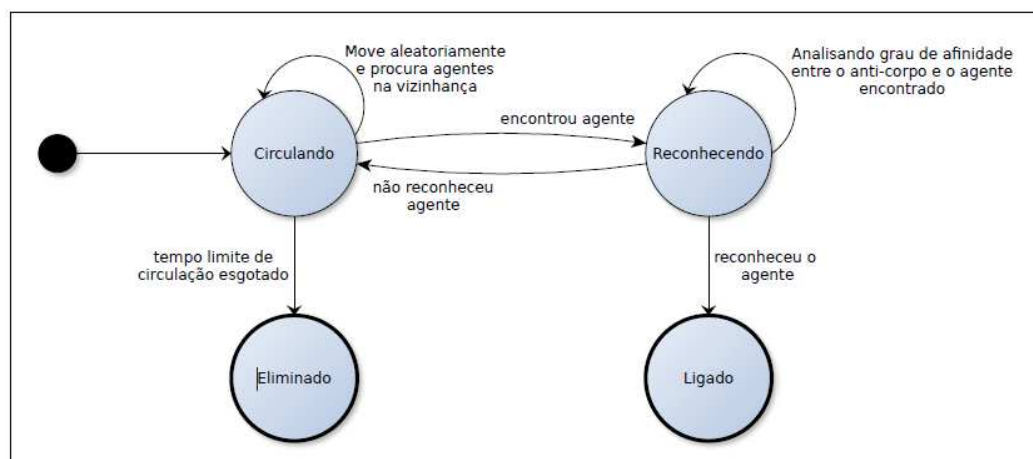


Figura 3.11. Regras do agente antibody. Fonte: Possi (2012).

3.4.4.4 - Pyogenes

A classe Pyogenes é uma classe concreta, que representa as bactérias *Streptococcus pyogenes* que estão infectando o organismo. Ele possui um atributo do tipo Pattern, o qual diz respeito ao seu padrão antigênico. Além desse, possui outro atributo do tipo Pattern – também chamado de target –, que define o padrão molecular para o qual o pyogenes têm afinidade, e irá tentar infectar.

Esse agente tem um comportamento similar a de uma bactéria extracelular *Streptococcus pyogenes* real e, por isso, recebeu esse nome: ele circula aleatoriamente, até encontrar uma célula hospedeira (que possua um padrão self reconhecido pelo padrão target do Pyogenes). Quando a encontra, tenta aderir à célula do hospedeiro e proliferar. O patógeno irá obter sucesso nesse processo caso a célula já não esteja com outra bactéria aderida. Essa regra foi criada apenas para não permitir que uma célula seja “alvo” de mais de uma bactéria, o que seria, no modelo, um desperdício de agentes.

Quando a bactéria se instala com sucesso no hospedeiro, ela o infecta, podendo ou não provocar doença (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Denomina-se infecção a multiplicação da bactéria ou outro agente microbiano no organismo do hospedeiro; no entanto, a doença só ocorre quando a bactéria expressa seu efeito patogênico e provoca manifestações clínicas. A manifestação clínica das doenças infecciosas – incluindo as bacterianas – é precedida de um intervalo de tempo denominado período de incubação, o qual corresponde ao primeiro ciclo de multiplicação da bactéria no organismo. Esse é o período que o patógeno, vencendo as defesas do organismo, prolifera-se o suficiente para dar início às manifestações clínicas da doença.

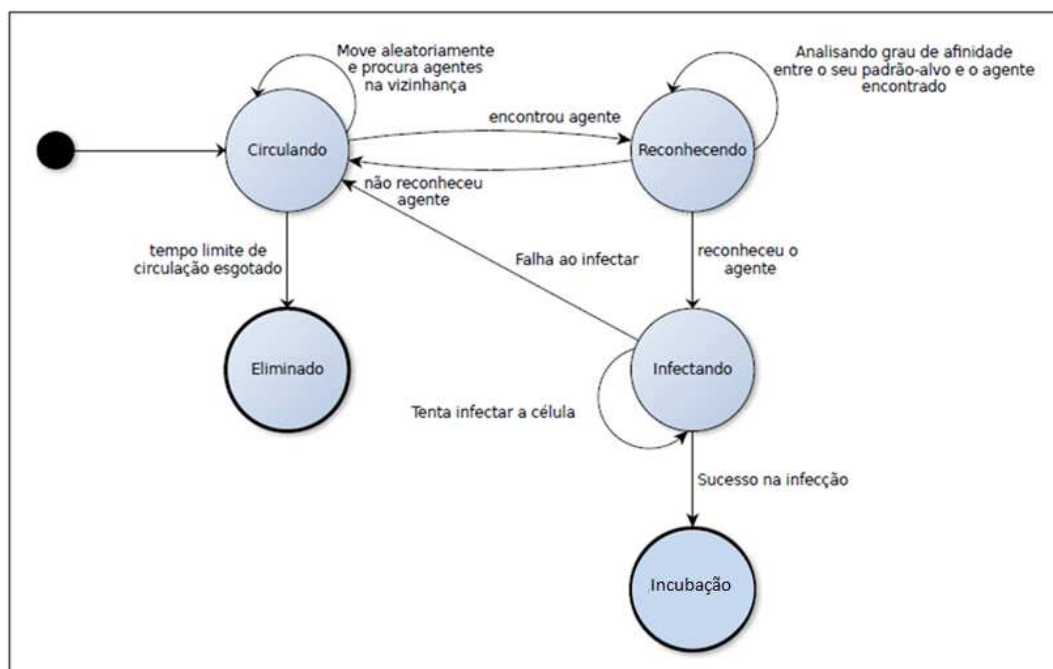


Figura 3.12. Regras do agente Pyogenes.

As regras do agente Pyogenes estão ilustradas na Figura 3.12. Adicionalmente, o agente Pyogenes possui um método chamado `ReplicaPyogenes`, que realiza replicação desta bactéria enquanto ela está no “período de incubação”, fazendo com que a bactéria prolifere. Aqui teria início às manifestações clínicas da doença, caso tenha proliferado o suficiente.

3.4.4.5 Portal

Os agentes do tipo Portal foram criados – baseados nos agentes Portal do modelo descrito por Folcik *et al.* (2007) – para simular a migração dos agentes entre as díspares zonas. O Portal representa os vasos sanguíneos e linfáticos, e sua circulação (FOLCIK *et al.*, 2007). A classe Portal é estendida por outras quatro classes, dependendo da zona em que o portal está situado. São elas:

(i) **AirWayTissuePortal**: responsável por representar os vasos sanguíneos e linfáticos que irrigam os tecidos das vias aéreas superiores. São conectados a portais presentes na zona Circulation. Esses portais são responsáveis por criar os agentes *Macrophage*, *Neutrophilus* e *NK*, em resposta à detecção de níveis altos da citocina PK1 (sinal de estresse das células teciduais das vias aéreas superiores), representando a quimiotaxia dessas células em função da presença desses sinais químicos (FOLCIK *et al.*, 2007); esses portais também são responsáveis por adicionar antimicrobianos no modelo, caso o parâmetro esteja marcado para inclusão de antimicrobianos.

(ii) **KidneyTissuePortal**: responsável por representar os vasos sanguíneos e linfáticos que irrigam os tecidos dos rins. São conectados à portais presentes na zona Circulation. Esses portais também são responsáveis por criar os agentes *Macrophage*, *Neutrophilus* e *NK*, em resposta à detecção de níveis altos da citocina PK1 (sinal de

estresse das células teciduais dos rins), representando a quimiotaxia dessas células em função da presença desses sinais químicos (FOLCIK *et al.*, 2007);

(iii) **CirculationPortal**: responsável por representar os vasos sanguíneos e linfáticos que capturam as células na circulação e às conduzem ao sítio de infecção. Alguns estão conectados aos portais da zona *AirWayTissue*, outros aos portais das zonas *KidneyTissue* e levam agentes para lá. Já outros, estão conectados aos portais da zona *Lymphnode*, e trazem os linfócitos de lá;

(iv) **LymphnodePortal**: responsável por representar os vasos sanguíneos e linfáticos que irrigam os linfonodos e o baço. (FOLCIK *et al.*, 2007). Estão conectados a portais da zona *Circulation*, para onde levam os linfócitos, quando ativados, e os anticorpos. As únicas exceções são os agentes *Dendritic*, que são levados instantaneamente das zonas *AirWayTissue* e *KidneyTissue* para a zona *Lymphnode*, quando ativadas, justamente por ser o caminho contrário que todos os outros agentes fazem, i.e., eles vão das zonas *AirWayTissue* ou *KidneyTissue* para o *Lymphnode*, enquanto os demais vêm do *Lymphnode* para a *AirWayTissue* ou *KidneyTissue*. Assim como também os linfócitos, recém-criados nas zonas *BoneMarrow* e *Thymus*, que não utilizam portais para migrarem para a zona *Lymphnode*, uma vez que essa migração acontece no primeiro tick de simulação, quando todos os linfócitos são gerados, não fazendo sentido utilizar a migração para isso.

3.4.4.6 Cell

A classe *Cell*, como o próprio nome já diz, é usada para modelar todos os agentes que representam células nucleadas. Dessa forma, todo agente que representa uma célula nucleada deve estender essa classe (POSSI, 2012). Sua principal tarefa é definir as funções utilitárias que todo agente célula deverá utilizar. Além disso, essa célula define o método *MHCI*, que representa a apresentação de peptídeos, sendo gerados no interior da célula, através do complexo de histocompatibilidade principal classe I, presente em todas as células nucleadas do organismo (POSSI, 2012). Os principais métodos que essa classe define são (POSSI, 2012):

(1) **getCitokineValue**: este método retorna a quantidade de uma dada substância (uma citocina, por exemplo), na posição atual do agente;

(2) **releaseCitokine**: este método libera uma quantidade de citocina pré-estabelecida por um parâmetro (*CitokineValue*) do modelo na posição atual do agente. Essa substância passa então a sofrer difusão;

(3) **followCitokineByGradient**: este método faz com que o agente (ou a célula, no caso) se mova na direção crescente do gradiente, i.e., seguindo o gradiente de concentração no sentido em que a concentração da substância está aumentando;

(4) **MHCI**: este método representa o complexo de histocompatibilidade principal classe I, informando os padrões que são produzidos pela célula, i.e., o próprio padrão self da célula em questão, e o padrão do vírus ou bactéria, caso a célula esteja infectada;

(5) **necrosis**: este método representa a morte da célula por processo traumático, i.e., necrose. Executa ainda algumas tarefas como liberar a substância NECROSIS, que representa os restos mortais da célula. Este método não remove o agente da simulação;

(6) **apoptosis**: este método representa a morte celular programada da célula, i.e., apoptose. Após executar algumas tarefas, como liberar a substância APOPTOSIS, que representa a sinalização de uma morte celular programada, invoca o método die da classe Agent, removendo-o da simulação.

Todos os agentes que serão descritos a seguir derivam da classe Cell.

3.4.4.7 Parenchyma Cells

Os agentes definidos pela classe Parenchyma Cells (PC) representam as células do tecido parenquimatoso de um órgão abstrato, cuja função é manter sua estrutura de grade. Esse agente é baseado no agente PC, definido por Folcik *et al.* (2007). Para facilitar o modelo, esses agentes também representam os glomérulos no porta *KidneyTissue*. Esses agentes são criados inicialmente na criação das zonas *AirWayTissue* e *KidneyTissue*. Eles são posicionados de maneira a formar uma estrutura bem definida, representando a funcionalidade dessas células em um órgão abstrato. Essa estrutura está ilustrada na Figura 3.4. São também o alvo dos patógenos no modelo, onde eles, após infectá-las, conseguem se reproduzir.

As regras comportamentais desses agentes estão descritas na Figura 3.13. Como descrito no diagrama, inicialmente, permanecem em seu estado normal, quando verificam se suas células vizinhas (ou que deveriam ser suas vizinhas) estão funcionais. Caso não estejam, o agente cria clones seus, que vão para as posições onde deveria haver células, para manter a estrutura. Essa função representa a regeneração do tecido. Caso alguma célula seja lisada, o seu conteúdo exposto pela lise, representado pela substância NECROSIS, pode “danificar” as células vizinhas, fazendo com que passem para um estado de estresse, liberando a substância PK1. Quando a substância NECROSIS dissipa, ou quando a célula consegue se recuperar dos danos, o agente volta para seu estado normal (POSSI, 2012).

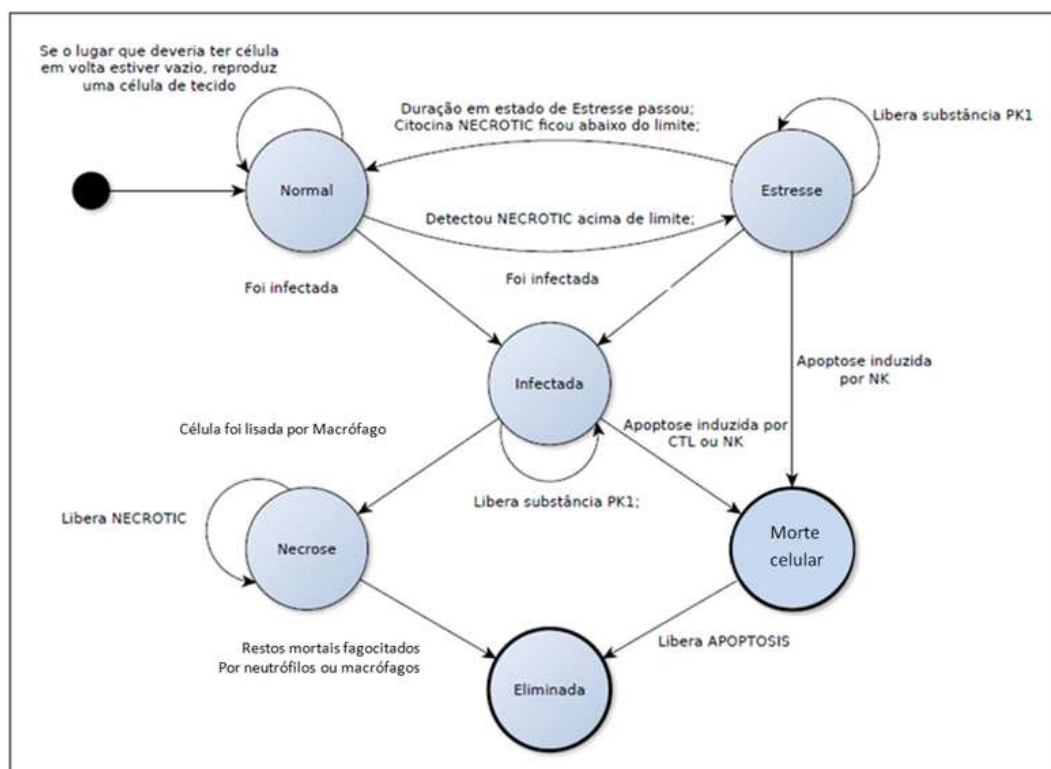


Figura 3.13. Regras do agente PC. Fonte: Possi (2012).

Quando um Pyogenes logra sucesso em alcançar a célula e infectá-la, ela passa para o estado infectado. Neste estado, a célula libera a substância PK1, sinalizando ainda seu estado de estresse. Após ser infectada, podem acontecer duas situações: a célula pode ser eliminada por um linfócito T citolítico (CTL), por uma célula NK, ou fagocitada por um Macrophage ou Dendritic. Caso isso não ocorra, e o Pyogenes vença o seu “período de incubação” – definido pelo parâmetro *pyogenesLatency* – a célula sofre lise, passa para o estado de necrose, e novos pyogenes que se multiplicaram se desprendem da mesma. A quantidade de novas bactérias geradas pelo pyogenes que aderiu a uma célula é definida pelo parâmetro *pyogenesVirulency*.

Tanto no estado de apoptose, quanto no estado de necrose, o agente PC continua no modelo, representando os restos mortais da célula. Em certo momento, esses restos mortais são limpos pelo Macrophage e aí, então, o agente PC é eliminado da simulação, para dar espaço a outro, gerado pelos agentes PC da vizinhança.

3.4.4.8 – NK (*natural killer*)

O agente NK representa a célula NK (*natural killer*), sendo baseado no agente “NK”, definido no modelo descrito por Folcik *et al.* (2007). A principal função desse agente é eliminar os depósitos de infecção, i.e., células infectadas, enquanto a imunidade adaptativa se prepara. Embora a presença do complexo de histocompatibilidade principal classe I seja capaz de inibir sua ação, em meios pró-inflamatórios essa inibição é ignorada, e o NK mata a célula estressada (Folcik *et al.*, 2007; POSSI,2012).

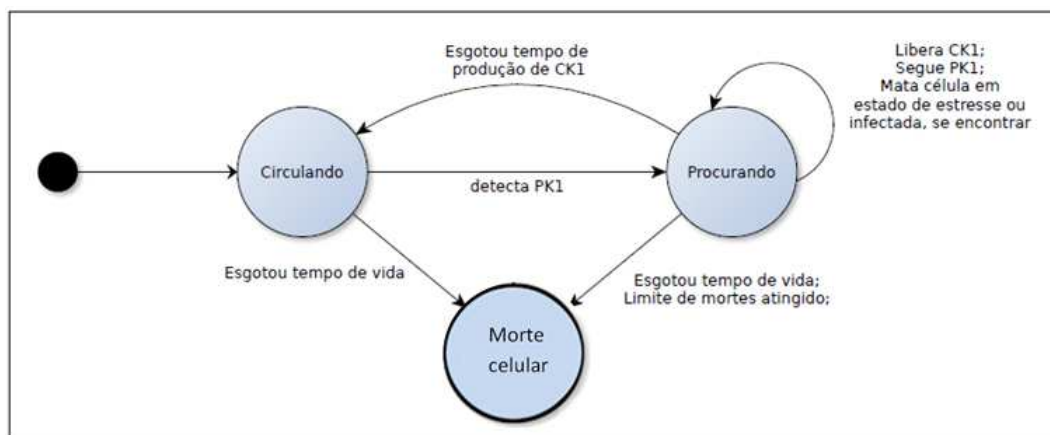


Figura 3.14. Regras do agente NK. Fonte: Possi (2012).

As regras do agente NK estão descritas na Figura 3.14. Esse agente é introduzido na simulação tanto na zona *KidneyTissue*, quanto na zona *AirWayTissue*, e isso acontece quando o agente *KidneyTissuePortal* ou o agente *AirWayTissuePortal* percebem a presença da citocina pró-inflamatória MK1, simulando assim a quimiotaxia dessas células. Ao chegar ao local da inflamação, inicialmente ficam circulando pelo tecido. Ao detectarem a presença da substância PK1, o agente passa a procurar por células que estejam emitindo PK1, i.e., células estressadas e/ou infectadas. Ao encontrar uma célula que esteja nessas condições, e houver grande concentração de MK1 no local, então o NK mata a célula. Quando seu tempo de vida termina, ou quando ele extermina um número limite de células, o agente NK evolui para morte celular (POSSI, 2012).

3.4.4.9 - ThCell

O agente ThCell representa os linfócitos T helper, sendo baseado nos agentes “T”, definidos no modelo descrito por Folcik *et al.* (2007). No AutoSimmune, tal agente recebeu grandes modificações para que fosse possível simular sua especificidade (POSSI, 2012). A principal função desse agente é prover os estímulos necessários para ativação dos agentes BCell e, mais tarde, dos agentes Macrophage.

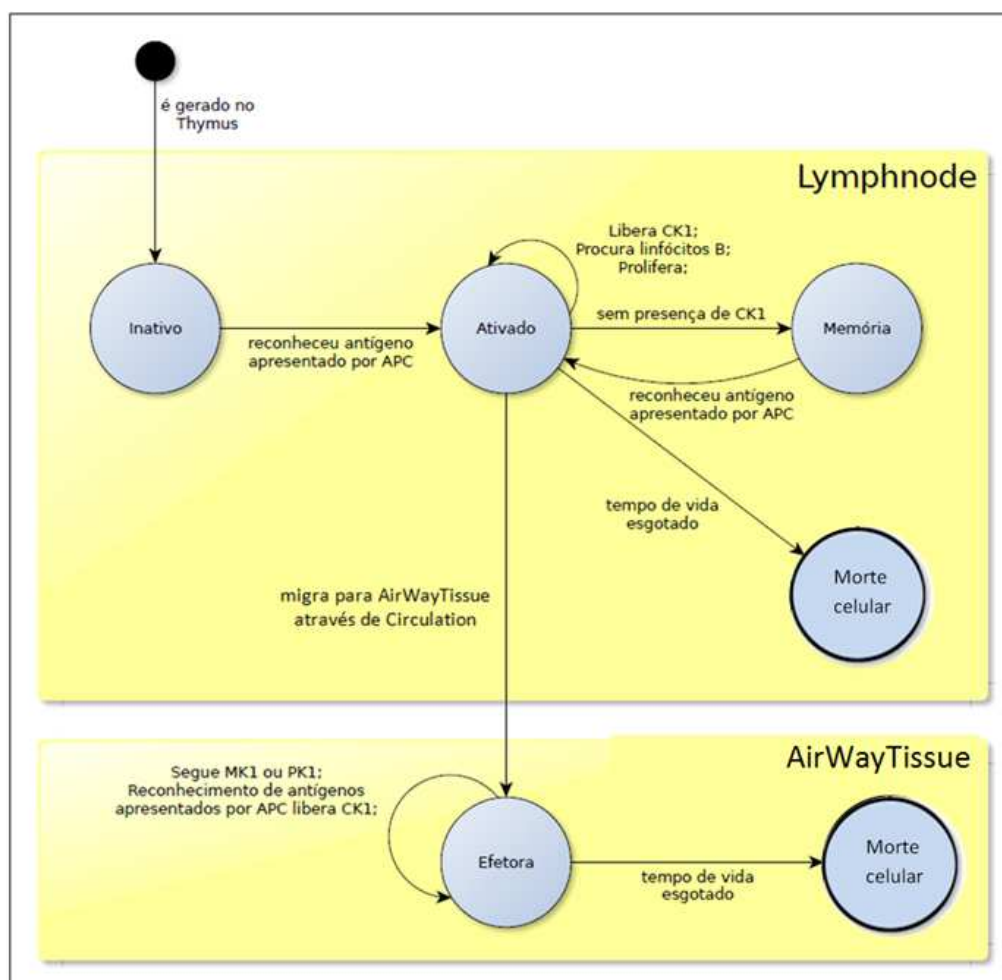
Esse agente é gerado na zona Thymus, onde recebe sua especificidade (geração de diversidade) e é testado para garantir que não seja auto-reativo (POSSI *et al.*, 2012). As regras do agente ThCell estão descritas na Figura 3.15. Ao chegar no Lymphnode – após ter sido gerado no Thymus – fica inativo, aguardando o contato com algum agente APC. Quando esse contato acontece – e o agente APC apresenta seu antígeno através do MHCII – o ThCell tenta reconhecê-lo. Em caso positivo, ele passa para o estado ativado.

Quando ativado, esse agente libera a citocina CK1, prolifera, criando clones de si mesmo, que irão migrar para a zona *AirWayTissue*, e se movimenta pelo Lymphnode à procura de linfócitos B, para ativá-los. Nesse estágio, cada novo reconhecimento de antígeno prolonga sua vida. Caso o nível de CK1 fique abaixo do limite, ele se torna uma célula de memória, capaz de responder rapidamente caso um agente APC a reative. Se,

apesar da alta concentração de CK1, ele não reconhecer novamente algum antígeno, o seu tempo de vida se esgota, e ele sofre apoptose. Já na zona *AirWayTissue*, esse agente segue as citocinas MK1 e PK1, à procura do sítio de infecção. Ao reconhecer o antígeno apresentado por uma APC – no caso, um Macrophage –, seu tempo de vida é estendido e inicia-se novamente a liberação de CK1. Caso isso não ocorra, ele sofre apoptose.

3.4.4.10 CTL

O agente CTL representa os linfócitos T citotóxicos – citolíticos –, sendo baseado nos agentes “CTL” definidos no modelo descrito por Folcik *et al.* (2007), com adição de várias modificações para que possa ser possível representar sua especificidade. A principal função desse agente é – assim como o agente NK – eliminar focos de infecção. Os agentes NK eliminam as células cujo mecanismo de apresentação de antígenos pelo MHCI foi bloqueado pelo patógeno, enquanto o agente CTL precisa reconhecer o antígeno apresentado pelo MHCI para que elimine a célula infectada. É válido ressaltar que, como descrito por Folcik *et al.* (2007), a célula NK é capaz de ignorar a apresentação do MHC-I em situações pró-inflamatórias, eliminando a célula em estado de estresse mesmo assim (POSSI, 2012).



Fig

ura 3.15. Regras do agente ThCell. Fonte (adaptado): Possi (2012).

O agente CTL é gerado na zona Thymus, onde recebe sua especificidade (geração de diversidade) e é testado para garantir que não seja autorreativo (tolerância central).

As regras do agente CTL estão descritas na Figura 3.16. Ao chegar ao Lymphnode, após ter sido gerado no Thymus, o agente CTL fica inativo, aguardando o contato com uma célula APC. Quando a encontra, ele tenta reconhecer o antígeno apresentado por ela, simulando assim o mecanismo denominado por apresentação cruzada (ou *cross-priming* em Inglês) (ABBAS & LICHTMAN, 2007; FOLCIK *et al.*, 2007).

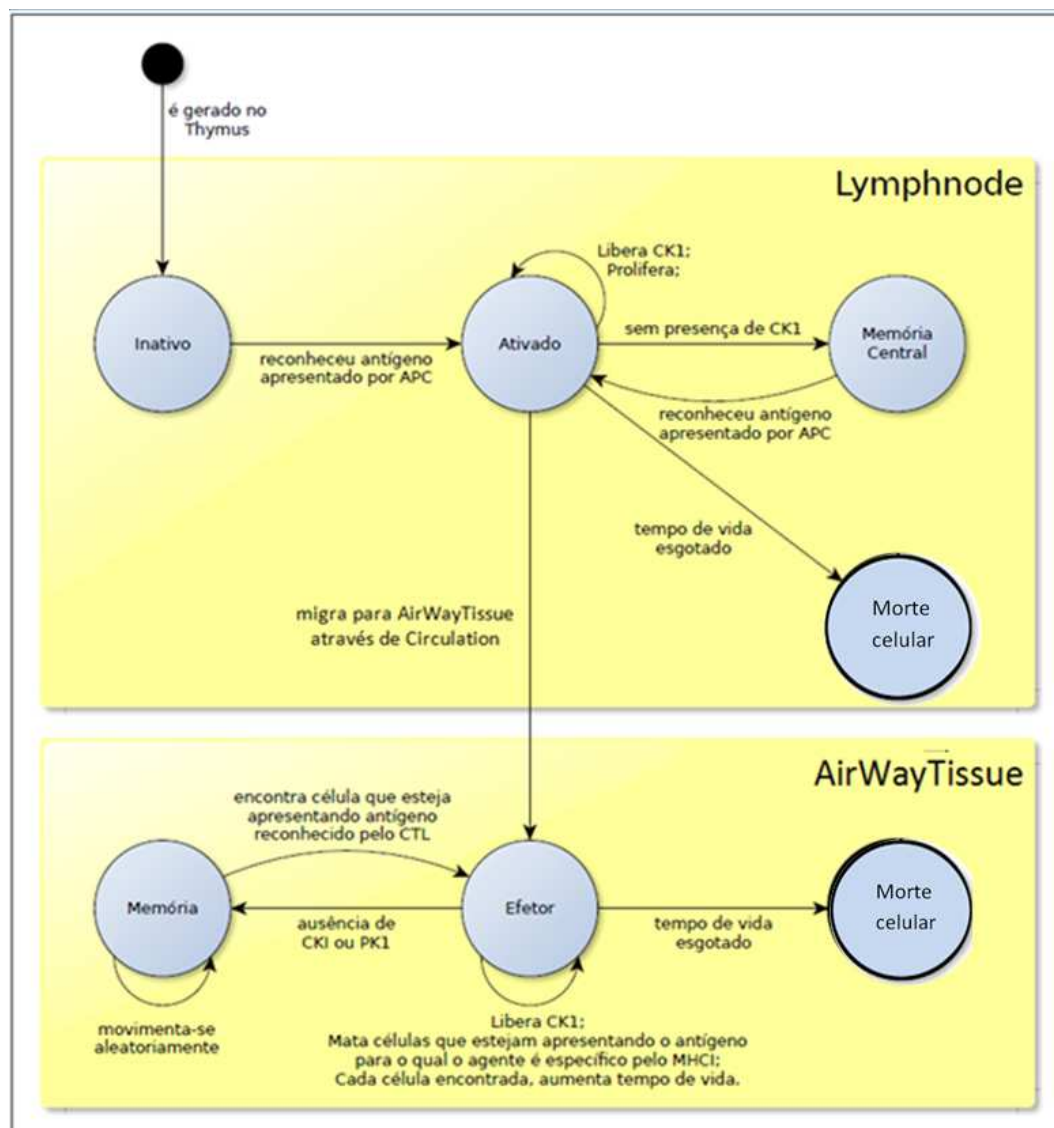


Figura 3.16. Regras do agente CTL. Fonte: Possi (2012).

Caso o CTL reconheça o antígeno, ele se torna ativado, e produz clones de si mesmo, que irão migrar para a zona *AirWayTissue*. Também inicia a produção da citocina CK1. A partir daí, passa a andar aleatoriamente pelo Lymphnode a fim de aumentar suas chances de contato com outra célula APC. Caso ocorra, gera novos clones e inicia produção de CK1 novamente. Caso ele fique um dado tempo, definido como um

parâmetro do modelo, sem encontrar uma APC e sem sentir mais a presença de CK1, o agente torna-se uma célula de memória, que poderá ser ativada rapidamente por um novo reconhecimento de um antígeno apresentado por uma APC. Já se ele, mesmo na presença de CK1, não encontrar nenhuma APC da qual reconheça um antígeno, ele sofre apoptose. Já no *AirWayTissue*, o CTL torna-se um linfócito efetor, seguindo o PK1, examinando o MHCI das células e, caso reconheça algum antígeno, matando-as. Na ausência de citocinas inflamatórias, como PK1 e CK1, torna-se uma célula de memória, e passa a andar livremente pelo tecido, mas ainda examinando os antígenos apresentados pelo MHCI. Caso reconheça algum, retorna imediatamente para o estado efetor. Se, por outro lado, na presença de citocinas inflamatórias, esse agente não reconhecer o antígeno apresentado por nenhuma célula em um dado período de tempo, evoluirá para morte celular, pois isso demonstra que, embora ainda haja infecção, o agente está sendo inútil (POSSI, 2012).

3.4.4.11 Neutrophil

O agente Neutrophil representa os neutrófilos. As principais funções desse agente são (i) a manutenção da resposta normal do hospedeiro aos microrganismos – mormente bactérias –, (ii) a remoção restos teciduais e (iii) a ação nos meios extra e intracelular para lisar e degradar microrganismos através de enzimas digestivas presentes nos seus grânulos citoplasmáticos, i.e., eliminação dos depósitos de infecção, ou seja, células infectadas, enquanto a imunidade adaptativa se prepara. Os microrganismos fagocitados e recobertos com complemento e anticorpo específico (opsonização) são mortos por uma combinação de radicais livres de oxigênio gerados por neutrófilos e proteínas citotóxicas derivadas de grânulos citoplasmáticos. Os neutrófilos se originam da medula óssea e são da classe de células sanguíneas leucocitárias, que fazem parte do sistema imunitário do corpo humano, sendo um dos cinco principais tipos de leucócitos (ABBAS *et al.*, 2008).

Esses agentes surgem na classe *AirWayTissuePortal* e também na classe *KidneyTissuePortal* quando percebem a presença da citocina pró-inflamatória MK1, simulando assim a quimiotaxia dessas células. Eles são, deste modo, inseridos respectivamente nas zonas *AirWayTissue* e *KidneyTissue*, representando a atração dos neutrófilos para os sítios de infecção.

As regras do agente Neutrophil estão ilustradas na Figura 3.17. Ao entrar em uma das zonas: *AirWayTissue* ou *KidneyTissue*, o agente segue a substância sinalizadora de estresse celular PK1, circulando até encontrar o sítio de infecção. O agente passa a procurar por células que estejam emitindo PK1, i.e., células estressadas e/ou infectadas. Ele então passa a fagocitar, simulando o processo inflamatório, células mortas, patógenos PAMP-positivos, e complexos antígeno-anticorpo, i.e., anticorpos ligados a algum antígeno, marcando-o para fagocitose.

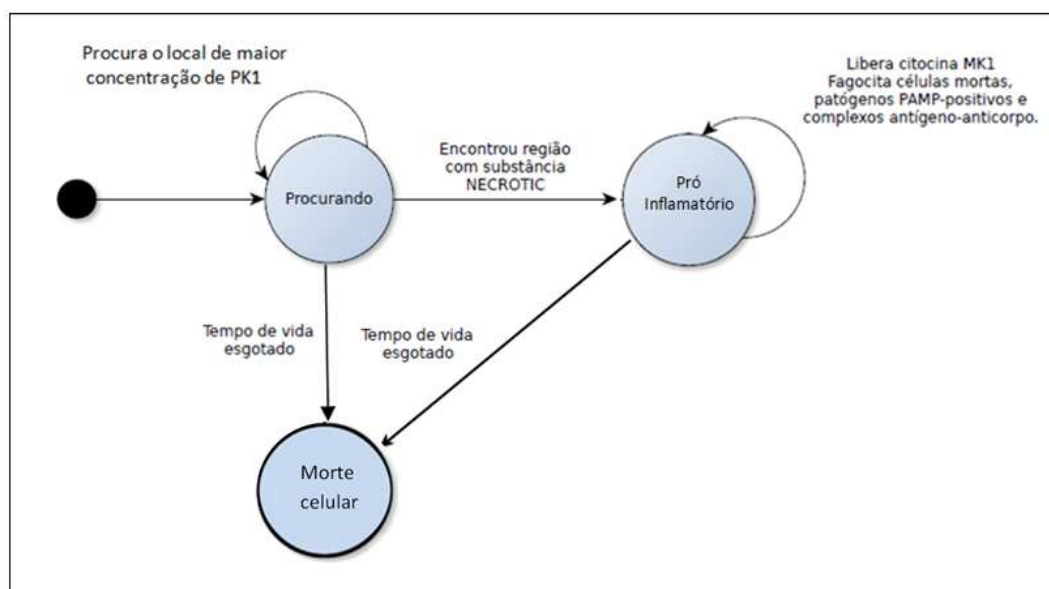


Figura 3.17. Regras do agente Neutrophil.

Quando seu tempo de vida termina, o agente Neutrophil evolui para morte celular simulando o que ocorre na realidade com os neutrófilos. Depois de determinado tempo, caso circule nos tecidos e não encontre as células responsáveis pela infecção, evolui, também, para morte celular (ABBAS *et al.*, 2008).

3.4.4.12 APC

A classe APC (células apresentadoras de antígeno) é uma classe abstrata, que representa o grupo de células APC POSSI (2012). A principal característica desses entes é o poder de capturar, processar e apresentar antígenos através do complexo de histocompatibilidade principal classe II. Todo agente que estenda essa classe precisa implementar o método abstrato MHCII, responsável por apresentar os padrões antigênicos aos linfócitos. Todos os agentes descritos a seguir estendem essa classe e, portanto, têm capacidade de apresentar antígenos.

3.4.4.13 Macrophage Cells

Os agentes definidos pela classe Macrophage representam a principal célula da imunidade inata celular, os macrófagos. Esse agente é baseado no agente Macrophage, definido por Folcik *et al.* (2007). Esses agentes surgem na classe *AirWayTissuePortal* e também na classe *KidneyTissuePortal*, quando estes detectam a presença de MK1. Eles são inseridos respectivamente nas zonas *AirWayTissue* e *KidneyTissue*, representando assim a atração dos macrófagos para os sítios de infecção, assim como descrito para a zona Tissue por Possi (2012).

As regras desse agente estão ilustradas na Figura 3.18. Ao entrar em uma das zonas: *AirWayTissue* ou *KidneyTissue*, o agente segue a substância sinalizadora de estresse celular PK1, até encontrar o sítio de infecção. Ao encontrá-lo, e detectar a

presença da substância NECROSIS, o agente passa para o estado pró-inflamatório, uma vez que identificou evidência de que as células estão realmente sendo danificadas.

Ao entrar nesse estado, ele começa a produzir a citocina pró-inflamatória MK1, simulando a função do macrófago em iniciar o processo inflamatório, recrutando os demais elementos da imunidade. Nesse estado, ele também pode fagocitar células mortas, patógenos PAMP-positivos, e complexos antígeno-anticorpo, i.e., anticorpos ligados a algum antígeno, marcando-o para fagocitose. Ao fagocitar algum elemento, o Macrophage processa-o, extraindo seus antígenos e passa apresentá-los pelo complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHCII).

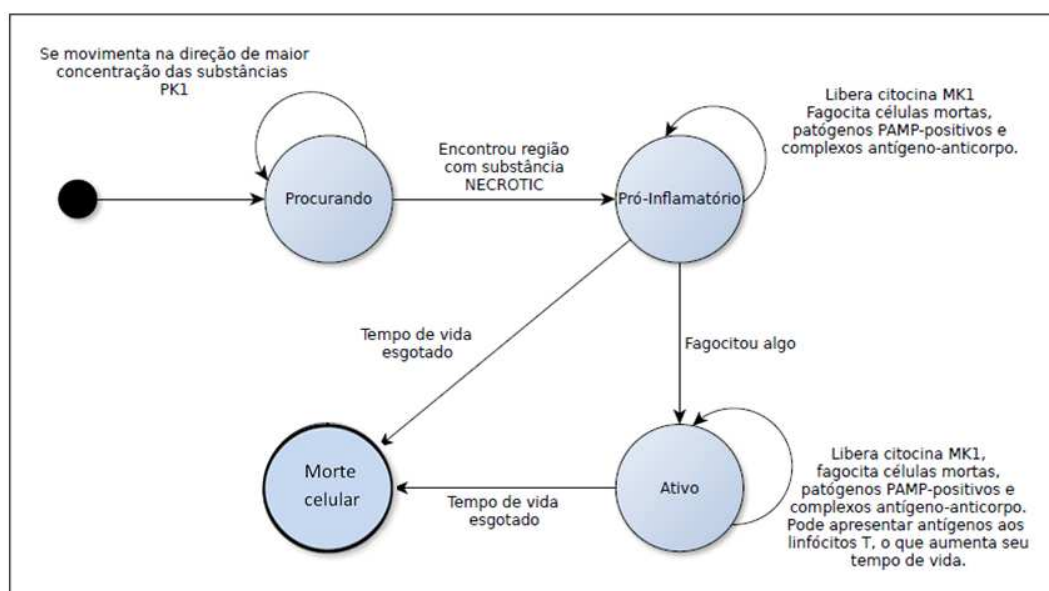


Figura 3.18. Regras do agente Macrophage. Fonte: Possi (2012).

Nesse momento, ele passa para o estado ativado. Quando ele encontra linfócitos T que reconheçam o antígeno que ele está apresentando, ele recebe fatores de sobrevivência, aumentando seu tempo de vida ativado, e fornece fatores de sobrevivência, para que o linfócito que reconheceu o antígeno também tenha seu tempo de vida aumentado.

Tanto no estado pró-inflamatório, quanto no estado ativado, o Macrophage tem um tempo de vida limitado e, se não receber fatores de sobrevivência que estendam este tempo, ele sofre um processo de morte celular e é eliminado da simulação.

Os estados anti-inflamatórios do Macrophage não foram modelados, pois este modelo baseia-se apenas na hipótese de que o declínio da resposta imunológica acontece devido à ausência de antígenos que a estimule. Em contrapartida, existem outros estudos – citados inclusive no modelo descrito por Folcik *et al.* (2007) – que apontam para a existência de células T reguladoras ou supressoras, que seriam responsáveis pelo declínio e supressão da resposta imunológica (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012b).

3.4.4.14 Dendritic Cells

Os agentes definidos pela classe Dendritic representam as células dendríticas, principal célula apresentadora de antígenos do modelo (POSSI, 2012). Esse agente é baseado no agente “DC”, definido no modelo descrito por Folcik *et al.* (2007). A principal função desse agente é buscar, no tecido, sinais de perigo (danger signals), e caso os encontre, capturar os antígenos presentes no local e apresentá-los aos linfócitos. É válido ressaltar que esse agente só fagocita elementos que estejam em danger zones, simulando assim uma tolerância periférica abstrata.

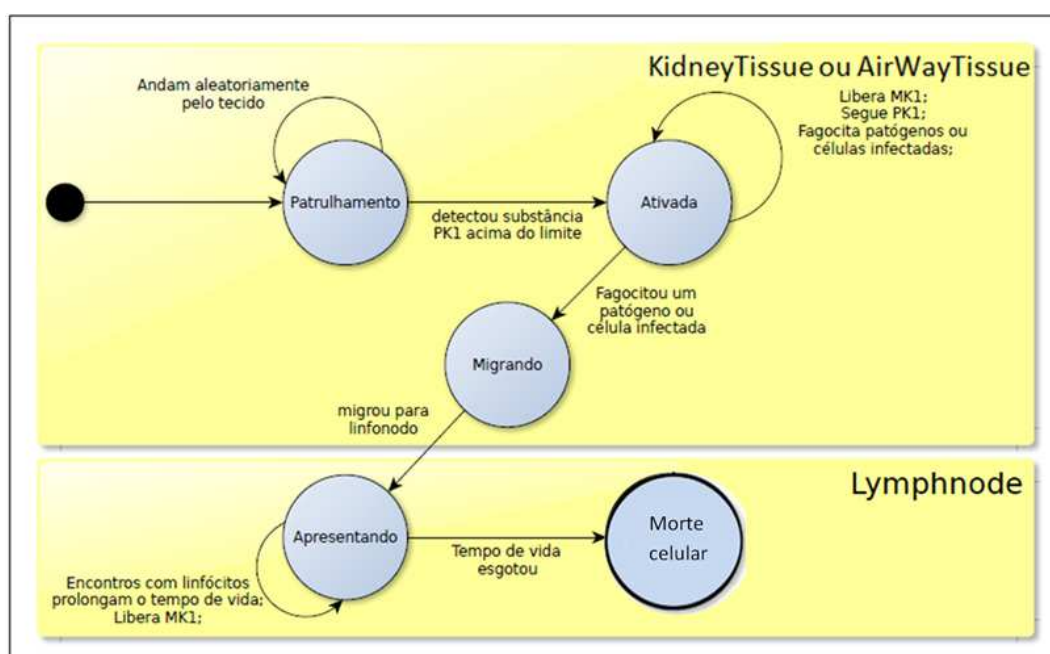


Figura 3.19. Regras do agente Dendritic. Fonte (Adaptado): Possi (2012).

As regras do agente Dendritic estão descritas na Figura 3.19. Elas são as mesmas para as Zonas *AirWayTissue* e *KidneyTissue*. Esse agente é criado inicialmente durante a criação das zonas *AirWayTissue* e *KidneyTissue*, e lá permanece se deslocando aleatoriamente pelos tecidos. Ao detectar a presença da substância sinalizadora de estresse celular, PK1, o agente Dendritic se torna ativado, e passa a concentrar-se no local da infecção capturando antígenos presentes no local (restos mortais de células, células infectadas e patógenos). Após ter fagocitado algum antígeno, começa a migração para o linfonodo (POSSI, 2012).

Ao chegar ao linfonodo, sua função é estar disponível para que os linfócitos façam contato. Como o Dendritic estende a classe APC, ele possui o MHC da classe II, utilizado para apresentar seus antígenos aos linfócitos. A cada apresentação bem sucedida, o tempo de vida do agente no linfonodo é aumentado. Ao fim desse tempo, ele sofre apoptose.

Como descrito por Folcik *et al.* (2007), esse agente tem uma grande capacidade de vasculhar o tecido. Por esse motivo, ele é o único agente que utiliza a Vizinhança de Moore com raio igual a 2, i.e., ao invés de olhar as suas 8 posições vizinhas, ele verifica 24 posições ao seu redor, em busca de antígenos (POSSI, 2012).

3.4.4.15 B Cells

Os agentes definidos pela classe BCell representam os linfócitos B, a principal célula da imunidade adaptativa humoral. Essa classe é baseada no agente B definido no modelo proposto por Folcik *et al.* (2007), mas com grandes modificações, para poder representar sua especificidade e a geração de anticorpos. Esses agentes são gerados na zona BoneMarrow, onde ganham sua especificidade aleatória (geração de diversidade), a qual é testada para se assegurar que não irá reconhecer antígenos próprios (tolerância central). Quando prontos, migram para a zona Lymphnode. Esses agentes também são responsáveis por gerar os agentes Antibody, quando necessário e passando para eles a sua especificidade.

As regras do agente BCell estão descritas na Figura 3.20. Ao chegar ao Lymphnode, esses agentes permanecem inicialmente inativos. Ao reconhecerem um antígeno, que pode estar livre, ou sendo apresentado por um agente APC (como o Dendritic), o agente BCell muda para o estado ativado, quando começa a seguir a citocina CK1. Ao encontrar um agente ThCell ativado e de mesma especificidade, o agente BCell recebe o estímulo necessário para se diferenciar, entrando no estado germinativo, representando o linfócito B germinativo; ou plasma, representando os plasmócitos. Em ambos os casos, o agente BCell realiza sua proliferação, criando clones de si mesmo. O número de clones e a porcentagem com que ele se torna germinativo ou plasma são parâmetros do modelo. Se o BCell se encontra no estado germinativo, então ele produz agentes Antibody, com a mesma especificidade que ele, até que seu tempo de vida tenha se esgotado, e ele passe para o estado de apoptose. No entanto, esse tempo pode ser aumentado caso o agente encontre com agentes APC apresentando o mesmo antígeno que o ativou. Se esses contatos ainda se repetirem certa quantidade de vezes, definida por um parâmetro do modelo, o agente se torna uma célula B de memória.

No estado de memória, esse agente pode ser ativado instantaneamente pela detecção da presença da citocina CK1 no seu meio, ou pelo contato com um agente ThCell ativado, passando diretamente para o estado de plasmócito.

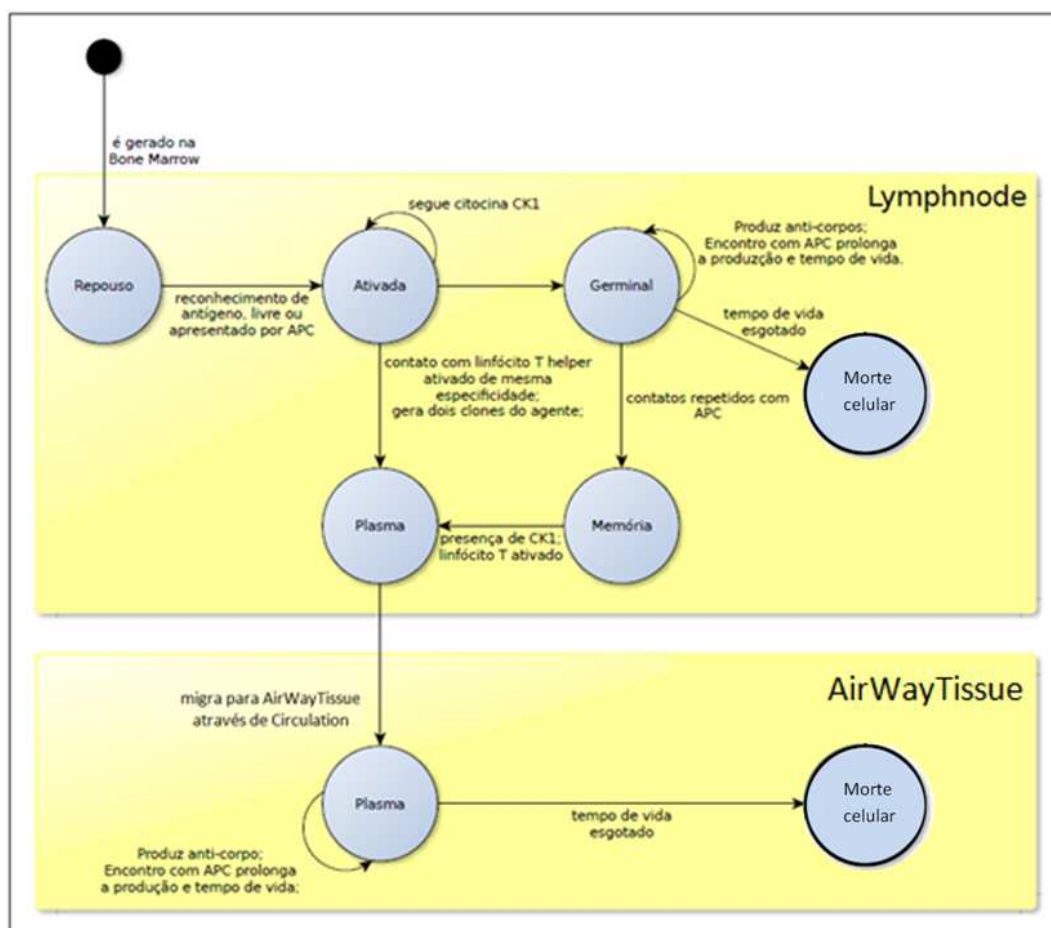


Figura 3.20. Regras do agente BCell. Fonte: Possi (2012).

Já se o agente se encontra no estado plasma, representando os plasmócitos, ele migra até a zona Circulation. Lá, segue os sinais químicos emitidos pelos agentes CirculationPortal até encontrar um que o leve para o sítio de infecção, na zona *AirWayTissue*. Ao chegar lá, começa sua produção de anticorpos, até que seu tempo de vida lá tenha se esgotado.

Capítulo 4

RESULTADOS

4.1 Implementação do modelo

Durante as seções anteriores deste trabalho – como já mencionado – o modelo foi implementado utilizando o framework Repast Symphony, versão 1.2.0. Utilizamos a distribuição para Windows. Essa versão do Repast é disponibilizada como um plug-in para a plataforma de desenvolvimento Eclipse, e está disponível no endereço <http://sourceforge.net/projects/repast/files/Repast%20Symphony/Repast%20Symphony%201.2.0/>

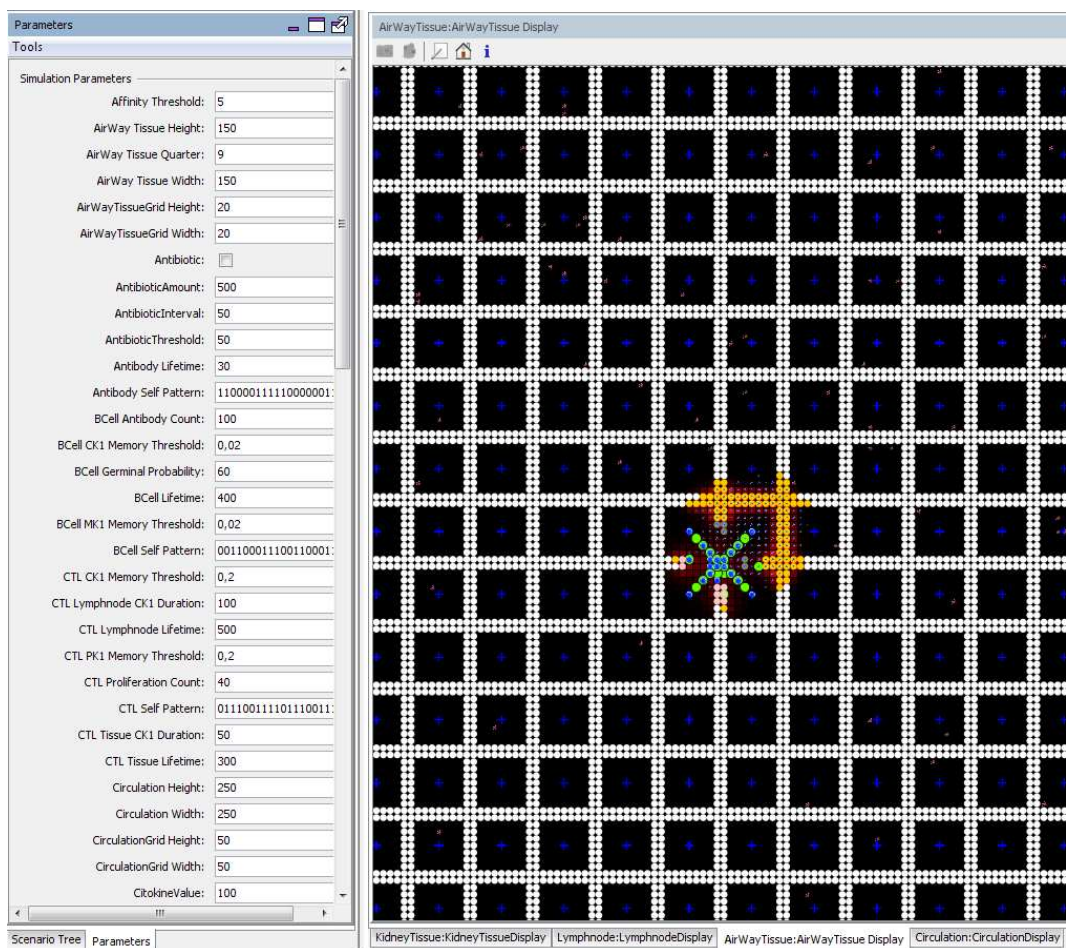


Figura 4.1. Tela inicial de uma simulação na Ferramenta: *AutoSimmune*. zona *AirWayTissue*.

O ambiente de desenvolvimento (IDE) utilizado foi o Eclipse (Eclipse 3.4.1, para Windows), em uma máquina executando o Windows 7 Ultimate de 64 bits, e o Java Development Tool-kit (JDK) para Windows, versão 1.6.0.26. Embora o ambiente de desenvolvimento seja na plataforma Windows, o software resultante, escrito na linguagem Java, pode ser executado na plataforma Linux.

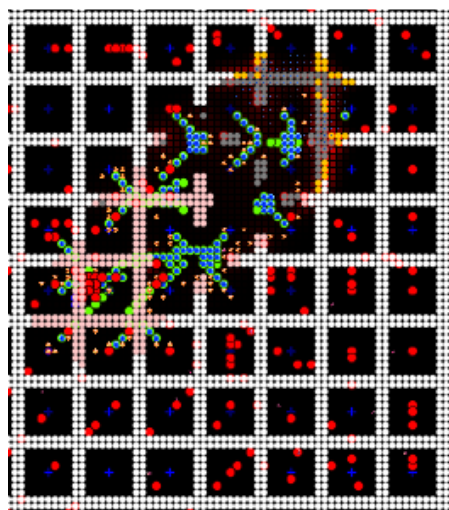


Figura 4.2A – *AirWayTissue* – momento de uma infecção por *Streptococcus pyogenes*.

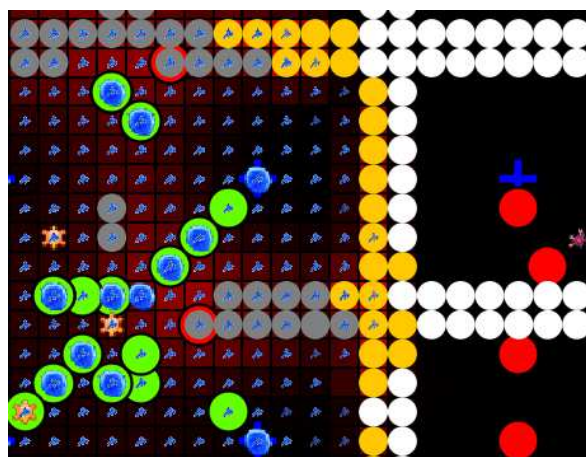


Figura 4.2B – *AirWayTissue* – Visão ampliada do momento de infecção da bactéria *Streptococcus pyogenes* (em azul, aderindo-se a várias células).

A abordagem utilizada na implementação foi a *bottom-up*. Assim, primeiro foram desenvolvidas as classes que fariam a interface com as classes nativas do framework, como a classe *Environment* do modelo, que abstrai o uso das classes *Context*, *Projection* e *ValueLayer* do framework, assim como a classe *Agent* do modelo, que abstrai o uso dos métodos do framework, como *moveTo*, *add* e *remove*, por exemplo. A cada nova classe pronta, o sistema tinha suas novas funcionalidades testadas. Se estivesse tudo funcionando corretamente, novas classes eram adicionadas. Os parâmetros utilizados pelo modelo se utilizam de uma facilidade do framework, que permite que seus valores sejam ajustados através da interface gráfica, aumentando assim a usabilidade da ferramenta.

A Figura 4.1 apresenta a aparência da ferramenta *AutoSimmune* em funcionamento. À esquerda estão as configurações do modelo, que são ajustadas antes do início da simulação. À direita, estão as zonas: a zona selecionada – no momento sendo exibida – é a zona *AirWayTissue*. A estrutura em forma de grade representa a organização estrutural de um órgão abstrato. Podemos ver nesta Figura que iniciou-se uma infecção na simulação. A Figura 4.2A apresenta detalhes da zona *AirWayTissue*: as células PC (em branco) sendo infectadas pelo agente Pyogenes (representado a bactéria *Streptococcus pyogenes*, em cor azul pequena). Em azul também aparecem os macrófagos, iniciando a resposta inflamatória juntamente com os círculos em verde são os neutrófilos. Os círculos em vermelho são os anticorpos. As cruzes que aparecem em azul são os portais. O gradiente vermelho representa a concentração da substância PK1, que sinaliza o estado de estresse das células parenquimatosas. Já em azul claro, em formato de cruz, estão os agentes *TissuePortal*: A Figura 4.2B mostra uma ampliação do *AirWayTissue* sendo infectado. As células PC apresentam-se em algumas cores diferentes: Branco (Normal), Amarelo (estressada), cinza (infectada, morrendo). Temos os círculos em vermelho (anticorpos), círculos verdes (neutrófilos), Figura azul arredondado (Macrófagos) e

pequenas Figuras azuis em maior número são os pyogenes. A Figura 4.3 representa uma visão dos rins (*KidneyTissue*), onde mostra vários pontos onde estão ocorrendo processo inflamatório representando as infiltrações glomerulares. Nesta Figura vemos imunocomplexos (bolas em vermelho), neutrófilos (círculos em verde) e macrófagos (Figuras azuis). Também podemos ver várias células do *KidneyTissue* com cor rosada, representando células regeneradas.

A seguir serão descritos os resultados de simulações de cinco casos e análise dos seus resultados quanto à coerência do comportamento apresentado pelo modelo com o que se espera em termos biológicos, segundo a literatura pesquisada. Os testes foram realizados no ambiente com Windows 7 ultimate 64 bits, com Java SE versão 1.6.0.06, em um computador com processador Core 2 Duo de 2.2 GHz e com 04 GB de memória RAM.

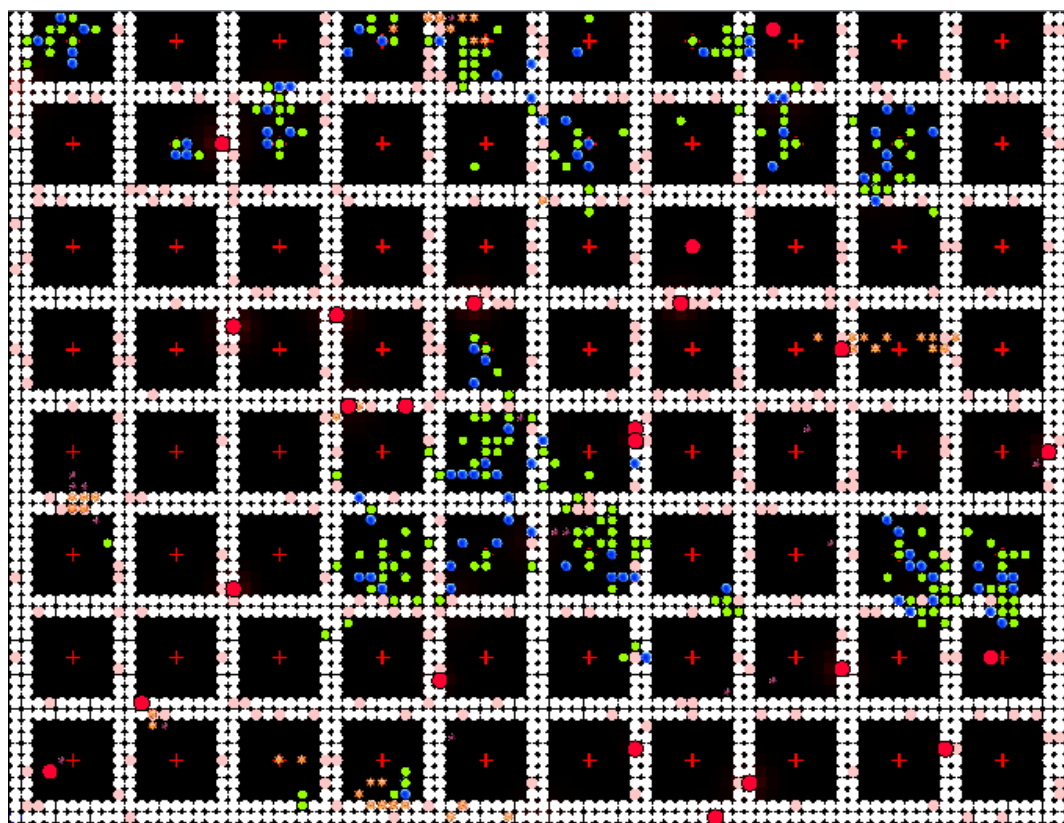


Figura 4.3 – Kidney Tissue – infiltração inflamatória ocorrendo.

4.2 Simulação do modelo

Essa seção do trabalho tem como objetivo evidenciar a viabilidade do modelo como ferramenta para a simulação de processos imunológicos implicados na GNPE. A seguir, serão apresentados alguns testes realizados, utilizando a implementação do modelo.

4.2.1- Homeostasia

Neste teste, propõe-se evidenciar o equilíbrio – ou a homeostasia do modelo –, de forma que, não havendo nenhuma bactéria *Streptococcus pyogenes* plantada nas vias aéreas superiores (*AirWayTissue*), não ocorrerá, conseqüentemente, nenhum estímulo de infecção ou inflamatório. Assim, o número de células continua constante durante todo tempo, tanto no *AirWayTissue*, quanto no *KidneyTissue*, que representa o rim no modelo.

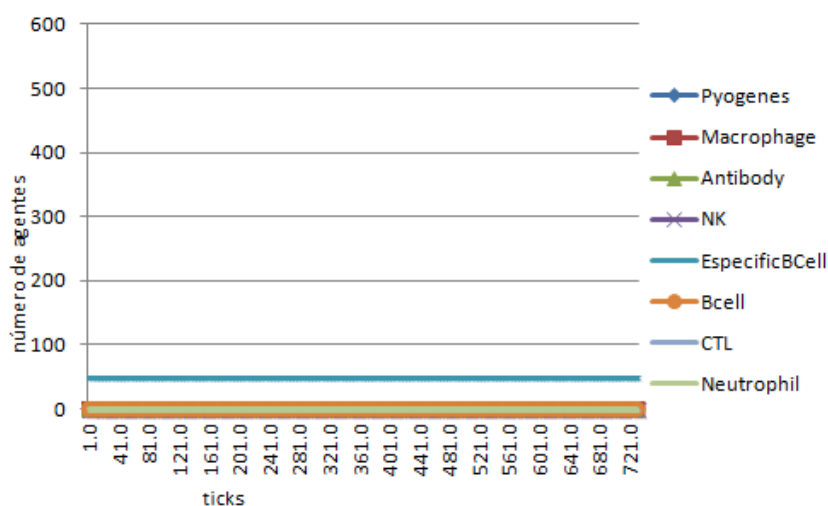


Figura 4.4 (A) - Homeostasia do sistema - zona *AirWayTissue*

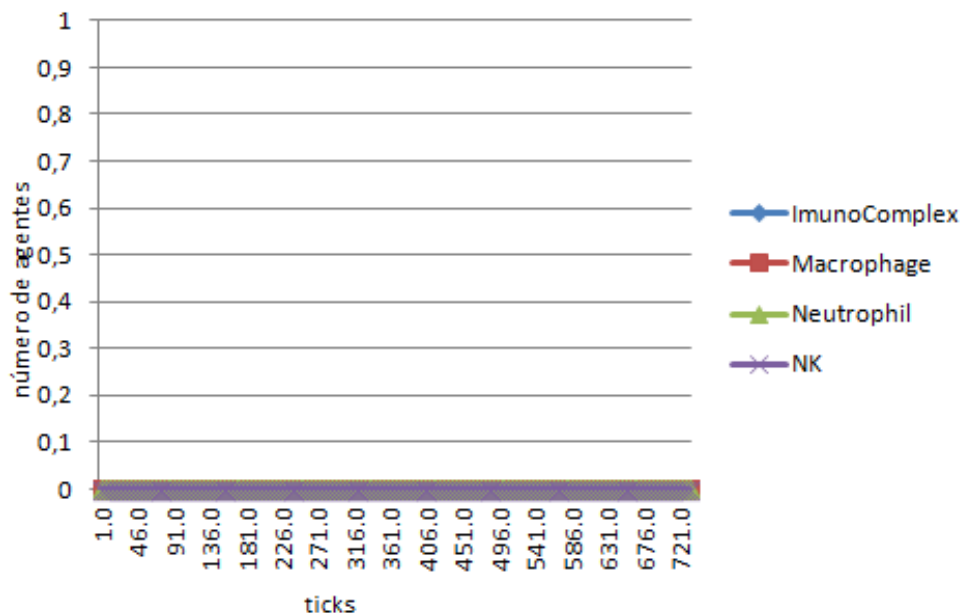


Figura 4.4 (B) - Homeostasia do sistema - zona *KidneyTissue*

As Figura 4.4 (A) e 4.4 (B) ilustram esse comportamento. Em 4.4 (A), representando as vias aéreas superiores, é possível notar que o número de agentes linfócitos, BCell, ThCell, CTL, EspecificBCell, antibody, macrophage e NK mantêm-se constantes na falta de um estímulo antigênico, visto que, Pyogenes está sempre constante e igual a zero. Em 4.4 (B), temos a ilustração dos rins, o *KidneyTissue*, também com o

número de agentes constantes para imunocomplex, Macrophage, Neutrophil e NK. Isto se deve pela ausência de estímulos antigênicos na zona *AirWayTissue*.

4.2.2 Papel dos Neutrófilos nas infecções

As principais funções dos neutrófilos são a manutenção da resposta normal do hospedeiro aos microrganismos e a remoção de restos teciduais e ação nos meios extra e intracelular para lisar e degradar microrganismos através de enzimas digestivas presentes nos seus grânulos citoplasmáticos, enquanto a imunidade adaptativa se prepara. Os microrganismos fagocitados e recobertos com complemento e anticorpo específico (opsonização) são mortos por uma combinação de radicais tóxicos de oxigênio gerados por neutrófilos e proteínas citotóxicas derivadas de grânulos citoplasmáticos.

Na Figura 4.5(A), é mostrado um gráfico exibindo uma infecção por bactéria, e a evolução da resposta imunológica na presença dos neutrófilos. Percebe-se que a resposta imunológica é mais rápida em comparação com a figura 4.5 (B), na qual os neutrófilos não estão presentes.

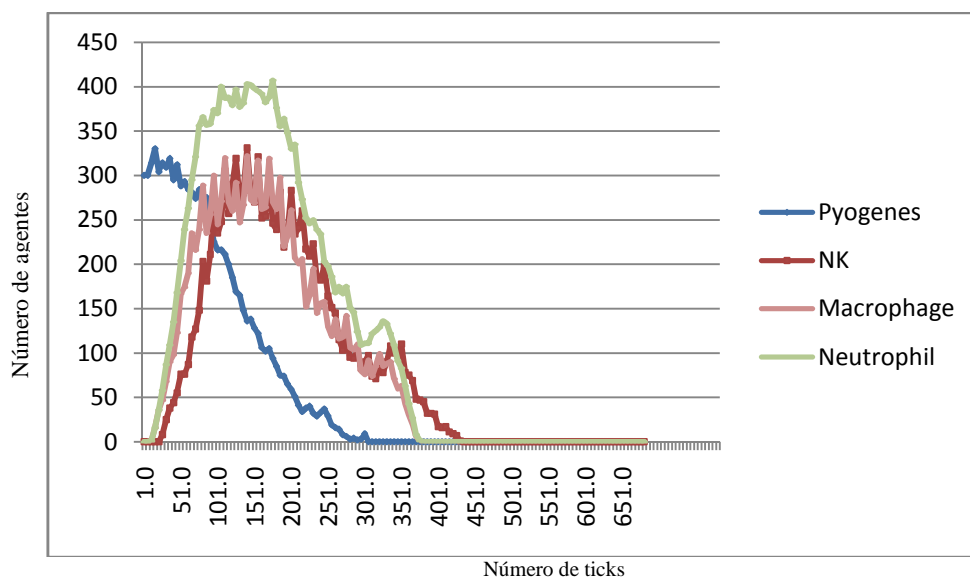


Figura 4.5 (A) Infecção bacteriana nas vias aéreas superiores (com neutrófilos)

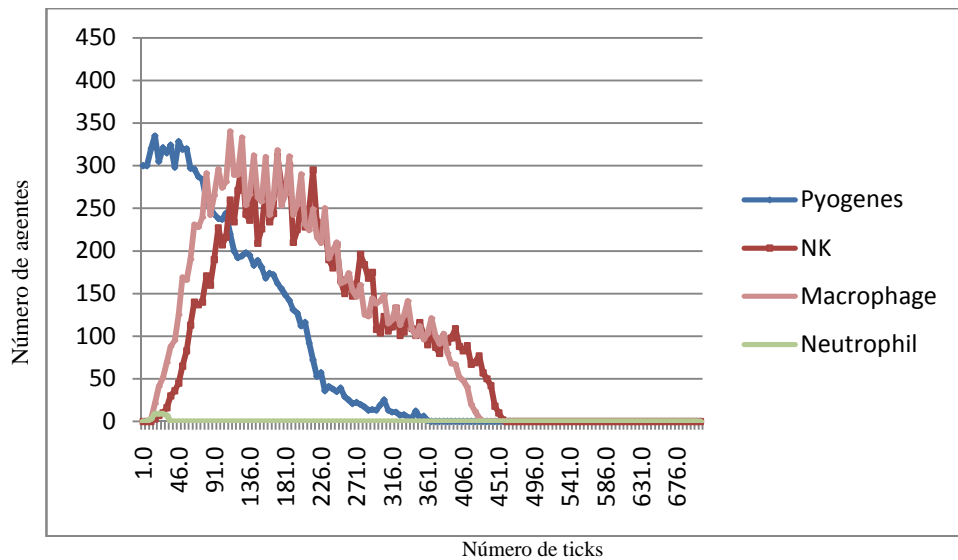


Figura 4.5 (B) Infecção bacteriana nas vias aéreas superiores (sem neutrófilos)

Ao se comparar os gráficos, percebe-se que, com a presença dos neutrófilos, a degradação e diminuição dos agentes Pyogenes terminam em aproximadamente 280 ticks. Com a mesma simulação, agora sem a presença dos neutrófilos, o número de Pyogenes reduz-se a zero em aproximadamente em 340 ticks. Este teste evidencia que, no modelo, à semelhança do que ocorre na realidade biológica, os neutrófilos são fagócitos importantíssimos no SI, atuando na lise de bactérias. Aqui, foi usado um patógeno com um comportamento similar ao da bactéria *Streptococcus pyogenes*, infectando (aderindo), se reproduzindo e matando a célula hospedeira.

4.2.3-Evidência do depósito de imunocomplexos nos Glomérulos renais, caracterizando a GNPE

À microscopia eletrônica são revelados imunocomplexos como depósitos eletrodensos sobre o mesângio, ao longo da membrana basal, ou em ambas as localizações (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Uma vez depositados no rim, os imunocomplexos podem ser finalmente degradados, principalmente por neutrófilos infiltrantes e monócitos/macrófagos, células mesangiais e proteases endógenas. Reitera-se, conforme já comentado, que a GNPE é uma doença mediada imunologicamente (KUMAR *et al.*, 2005). O período latente entre a infecção e o início da nefrite é compatível com o tempo necessário para a produção de anticorpos para um ou mais antígenos estreptocócicos que estão presentes na maioria dos pacientes.

O primeiro passo foi identificar a quantidade de bactérias necessárias para causar infecção nas vias aéreas (*AirWayTissue*) e, após a resposta do SI – com a produção de anticorpos –, causar a deposição de imunocomplexos nos rins. Após vários testes foram

identificados os parâmetros do sistema para que ocorresse o processo inflamatório satisfatório nas células do *KidneyTissue* (rins) devido ao depósito de imunocomplexos.

Feitas as devidas observações, constatou-se que os valores mínimos encontrados que satisfazem o modelo para ocorrência da GNPE são:

$$Pyogenes\ Initial = 300 \quad Pyogenes\ Virulency=2 \quad Pyogenes\ Latency=10$$

Onde:

Pyogenes Initial: representa o número de bactérias para início da simulação;

Pyogenes Virulency: representa a capacidade da bactéria se multiplicar;

Pyogenes Latency: Por quantos ticks ela sobreviverá.

Foram mantidos os demais parâmetros da aplicação como padrão. Podem ser observadas, na tabela abaixo, algumas das diversas simulações feitas:

	<i>Pyogenes Initial</i>	<i>Pyogenes Virulency</i>	<i>Pyogenes Latency</i>
1	100	2	10
2	100	5	15
3	100	10	15
4	100	10	10
5	100	3	10
6	110	4	10
7	110	3	15
8	110	3	10
9	50	2	10
10	0	2	10
11	5	2	10
12	10	2	10
13	30	2	10
14	50	2	10
15	70	2	10
16	200	2	10
17	300	2	10

Tabela 4.1 – Parametros Pyogenes

Observe-se os gráficos abaixo:

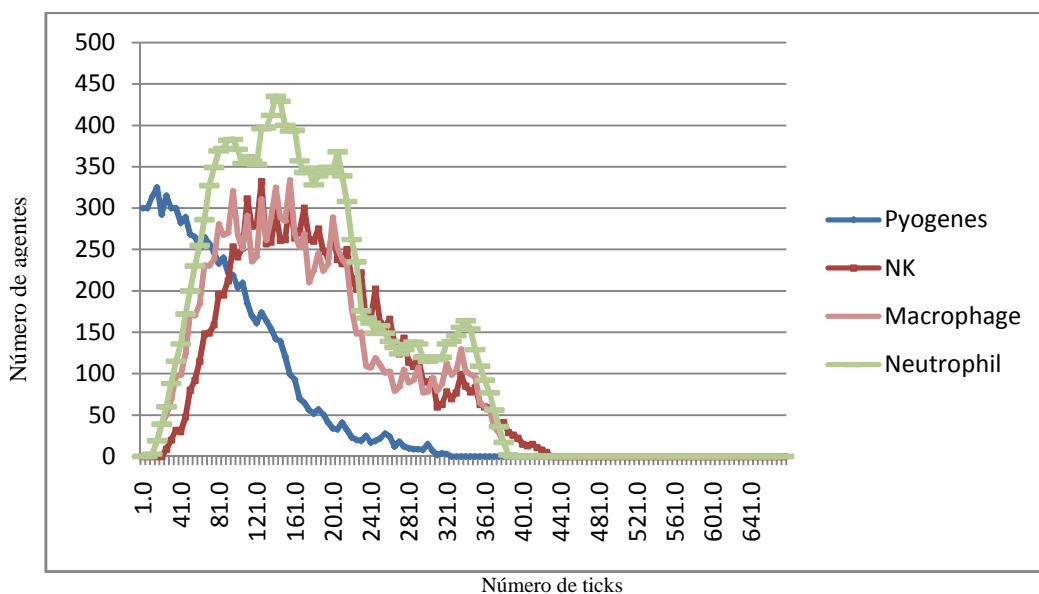
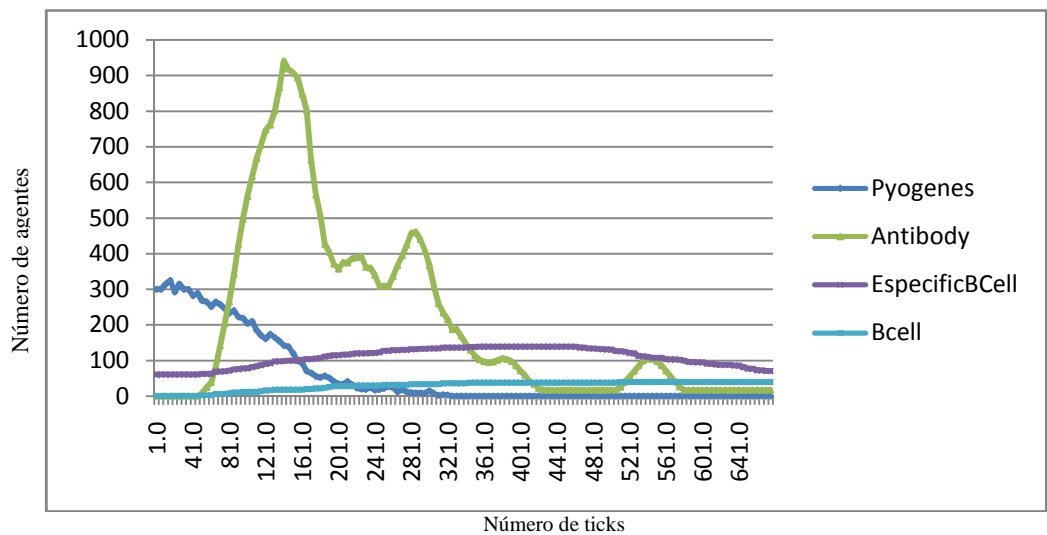


Figura 4.6(A) – *AirWayTissue* – infecção pyogenes – resposta imune inata

A Figura 4.6 (A) ilustra o momento em que os agentes Pyogenes são inseridos no tecido *AirWayTissue* e as reações do SI. Após a entrada das bactérias, o SI inato começa a agir imediatamente; desta feita, células NK, Macrófagos e Neutrófilos começam a

fagocitar as bactérias e a células necróticas, além de emitir sinais inflamatórios aos demais agentes. É iniciada a resposta adaptativa, explicitada na Figura 4.6 (B), a qual mostra um gráfico contendo células B ativadas que começam a produzir anticorpos. Estes vão para circulação sanguínea e, de acordo com sua especificidade, se ligam aos antígenos da bactéria, formando imunocomplexos (complexos antígeno-anticorpo). Ao passarem pelos filtros dos rins, este imunocomplexos se depositam nos glomérulos, como ilustrado no gráfico constante na Figura 4.6 (C). Inicia-se então o processo inflamatório em nível renal, com participação de neutrófilos e de macrófagos, os quais são requeridos (por quimiotaxia) para o local onde o imunocomplexo se fixou. O processo inflamatório em curso provoca lesão nos glomérulos, desencadeando a GNPE.



4.6 (B) – *AirWayTissue* – SI executa a resposta imune adaptativa.

Dentre as propriedades da imunidade inata adaptativa está a especificidade, isto é, somente as células que reconhecem o antígeno invasor se proliferam, evitando assim o gasto de recursos com células que serão inúteis no processo. Deve ser destacado, ainda, que a cada encontro com o patógeno, a resposta imune se torna mais eficiente (memória).

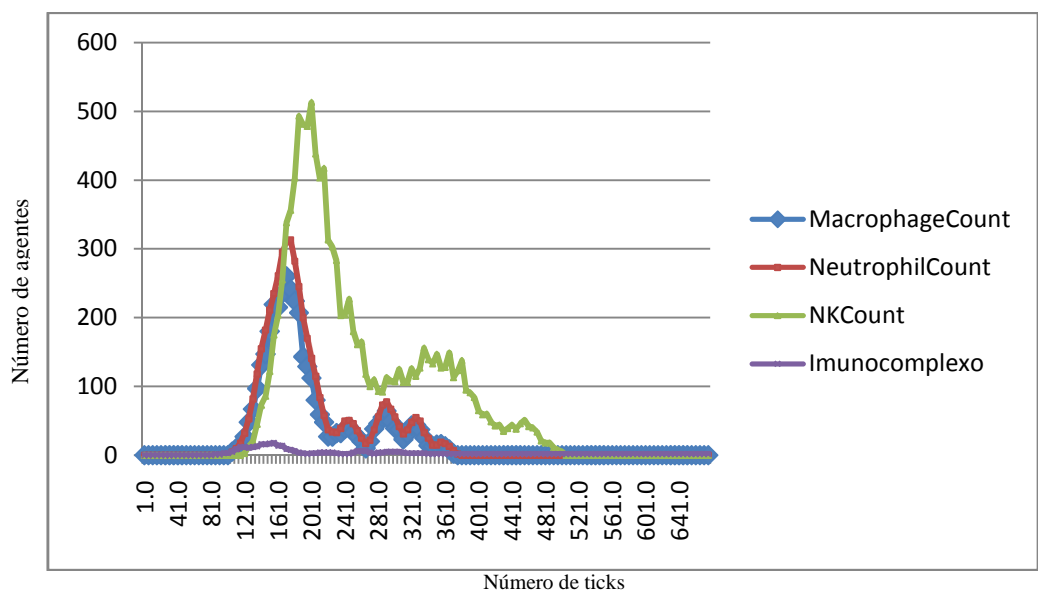


Figura 4.6 (C) – *KidneyTissue* - processo inflamatório (GNPE)

Como visto, é condição essencial para a ocorrência da entidade mórbida que se tenham os imunocomplexos “grudados” nos glomérulos, e isto somente é possível quando ocorre a resposta imune humoral mediada por anticorpos secretados, cujo principal papel fisiológico é a resposta aos *microrganismos* extracelulares e às toxinas microbianas (ABBAS *et al.*, 2008). Os anticorpos específicos se ligarão aos antígenos e o próximo destino é a circulação sanguínea. A partir de então, serão filtrados nos rins, ocasionando o primeiro passo para a GNPE. Desta feita, ratifica-se, preliminarmente, a hipótese sobre o papel da resposta imune nesta doença.

4.2.4 - Administração de antimicrobianos e redução do risco de emergência da GNPE

O objetivo desse teste é evidenciar o comportamento do modelo quando há administração de antimicrobianos. Para fins de conceituação é importante caracterizar que

“Os antimicrobianos são fármacos em uso desde o século passado, empregados para o tratamento das mais diferentes condições infecciosas. Em linhas gerais, são incluídos no grupo dos antimicrobianos, duas classes de compostos:

- *Os antimicrobianos, moléculas produzidas por microrganismos, capazes de agir na lise ou inibição de crescimento de outros microrganismos;*
- *Os quimioterápicos, substâncias químicas sintéticas ou de origem vegetal, que possuem pequena toxicidade para as células normais do hospedeiro e elevado poder lesivo sobre os agentes patogênicos.”*

(SIQUEIRA-BATISTA & GOMES, 2010, p. 2)

“A essência da quimioterapia antimicrobiana é a toxicidade seletiva – matar ou inibir o microrganismo sem afetar o hospedeiro. Os antimicrobianos e os quimioterápicos interferem com diferentes atividades da célula bacteriana, causando sua morte ou somente inibindo o seu crescimento.”

(TRABULSI & ALTERTHUM, 2008, p. 79)

Um antimicrobiano ideal deve, em linhas gerais, exibir toxicidade seletiva, ou seja, deve ser prejudicial para o microrganismo e não para o hospedeiro (BROOKS *et al.*, 2001). Destaca-se, de um modo mais evidente, os seguintes aspectos dos antimicrobianos ideais (SCHECHTER, 1998; SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011):

- *Ação seletiva dirigida aos microrganismos: toxicidade zero para o paciente;*
- *Manutenção da microbiota saprófita inalterada;*
- *Não indução de mecanismos de resistência em patógenos inicialmente sensíveis;*
- *Ação bactericida;*

- *Manutenção da biodisponibilidade em relação à via de administração;*
- *Estabilidade em solução;*
- *Meia-vida prolongada;*
- *Excelente penetração em todos os órgãos, fluidos e tecidos;*
- *Eficácia elevada independentemente das condições locais (p. ex., pH);*
- *Baixo custo.*

(SIQUEIRA-BATISTA & GOMES, 2010, p. 2).

O mecanismo de ação de muitos antimicrobianos não está totalmente elucidado; todavia, são divididos em categorias que se seguem (BROOKS, *et al.*, 2001): (1) inibição de síntese da parede celular; (2) Inibição da função da membrana célula; (3) inibição da síntese de proteínas; (4) inibição da síntese de ácidos nucleicos.

Para o nível de abstração do modelo, não foi especificada qual o mecanismo de ação do antimicrobiano. No entanto, definiram-se os seguintes parâmetros:

- (1) Quantidade de antimicrobiano a ser liberada no tecido (***Antibiotic Amount***);
- (2) Periodicidade de liberação (***AntibioticInterval***);
- (3) Nível de penetração nas bactérias (resistência das bactérias) (***Antibiotic Threshold***).

Para os testes, foram utilizados os parâmetros do agente *Pyogenes*, identificados nos testes anteriores, como mínimos satisfatórios para causar a GNPE.

Pyogenes Initial = 300 Pyogenes Virulency=2 Pyogenes Latency=10

Foram realizados vários testes combinando os três novos parâmetros – ***Antibiotic Amount***, ***AntibioticInterval*** e ***Antibiotic Threshold*** –, com objetivo de identificar os números que indiquem a eficiência na resposta às bactérias, percebendo se haveria ou não desenvolvimento de GNPE nesse contexto. Veja-se a tabela comparativa abaixo e o gráfico resultante:

Tabela de comparação para utilização de antimicrobianos no sistema

A	B	C	D	E	F	G
751	300	2	10	700	10	15
1294	300	2	10	700	25	15
601	300	2	10	700	40	15
411	300	2	10	700	25	15
401	300	2	10	500	25	15
451	300	2	10	500	10	15
621	300	2	10	300	10	15
426	1500	2	10	500	10	15
221	70	2	10	500	10	15

Tabela 4.2 – Parametro para teste antibiotico

Onde: A = Número de ticks em que o teste ficou sendo executado
 B = Pyogenes Initial
 C = Pyogenes Virulency
 D = Pyogenes Latency
 E = Antibiotic Amount
 F = Antibiotic Interval
 G = Antibiotic Threshold

Alterou-se, inicialmente, o parâmetro que define a periodicidade da aplicação do antimicrobiano (*AntibioticInterval*), chegando, em um primeiro momento, aos seguintes valores:

A	B	C	D	E	F	G
1294	300	2	10	700	25	15

Agora, ao se fixar o *AntibioticInterval*(F) em 25 e proceder uma comparação com valores diferentes da quantidade de antimicrobiano a ser liberada – *Antibiotic Amount*(E) – obtiveram-se os seguintes resultados:

A	B	C	D	E	F	G
401	300	2	10	500	25	15

Os dados foram comparados com os anteriores, reduzindo novamente os intervalos de aplicação conforme tabela abaixo:

A	B	C	D	E	F	G
401	300	2	10	500	10	15

Esse grupo de valores obteve um resultado melhor. Finalmente, comparou-se, com uma quantidade de antimicrobiano menor para confirmar os testes:

A	B	C	D	E	F	G
401	300	2	10	300	10	15

Chegou-se, então, à conclusão que os melhores parâmetros para o uso de antimicrobianos com objetivo de evitar o acometimento pela GNPE foram:

A	B	C	D	E	F	G
401	300	2	10	500	10	15

Passou-se a utilizar esses parâmetros nos nossos testes. O Gráfico de utilização ficou assim:

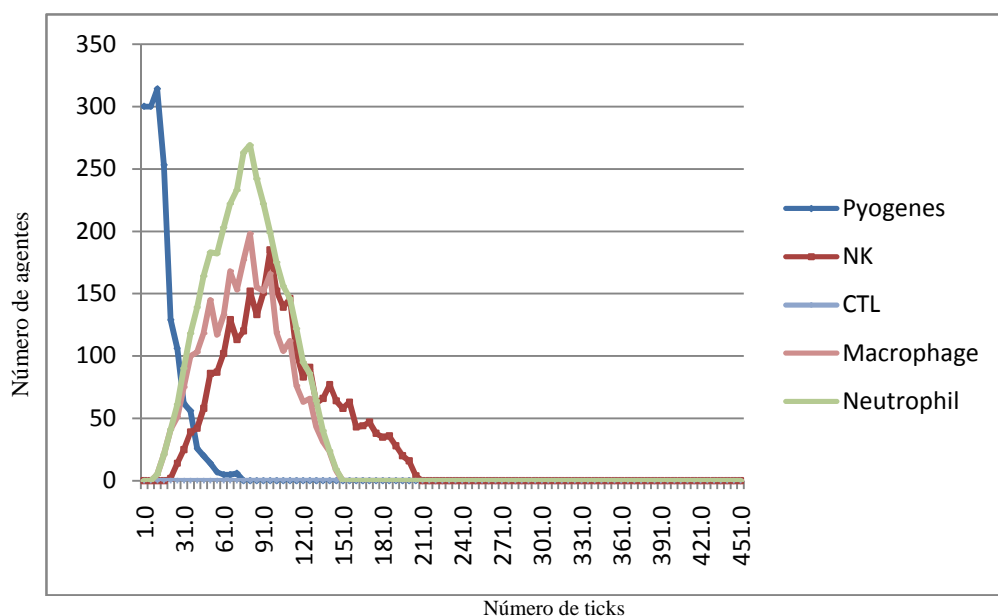


Figura: 4.7 - *AirWayTissue* – com aplicação de antimicrobiano.

Conforme a figura 4.7, visualiza-se a redução rápida do agente Pyogenes, principalmente ao se comparar a figura 4.6 (A), onde não são utilizados antimicrobianos. A consequência dessa redução rápida, é mostrada no gráfico abaixo, que representa o efeito deste mesmo teste, só que na zona *KidneyTissue*.

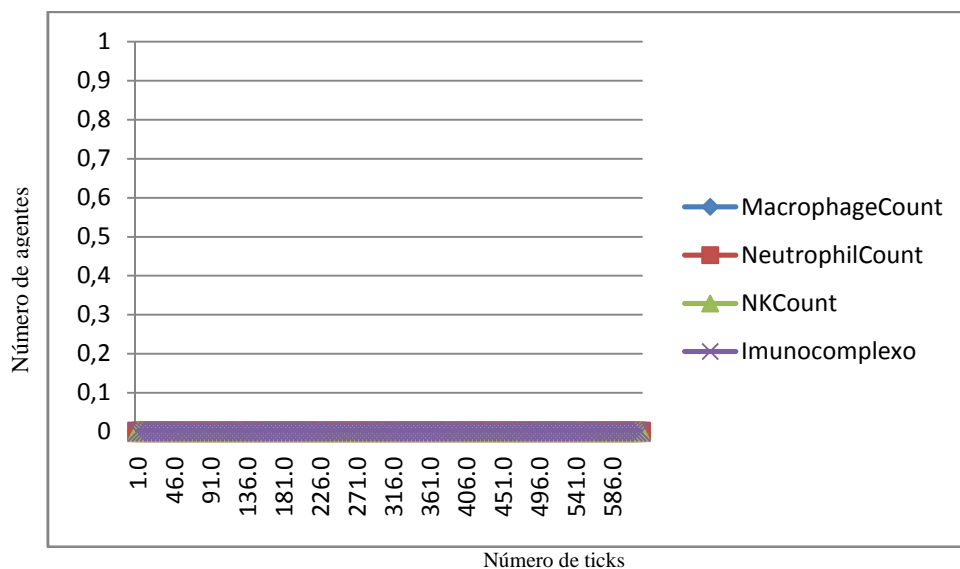


Figura 4.8 *KidneyTissue* – Sem ocorrência de GNPE devido a aplicação de antimicrobianos na zona *AirWayTissue*.

Como pode ser observado na figura 4.8, o número de imunocomplexos, neutrófilos, macrófagos e células NK estão constantes e com valor igual a zero. Constatou-se que não houve retenção de imunocomplexos e, em consequência, não houve reação inflamatória e não ocorreu a doença GNPE.

Realizou-se um novo teste, aumentando o número de bactérias em cinco vezes, ou seja, com 1500 bactérias iniciais. Os resultados comparativos estão a seguir:

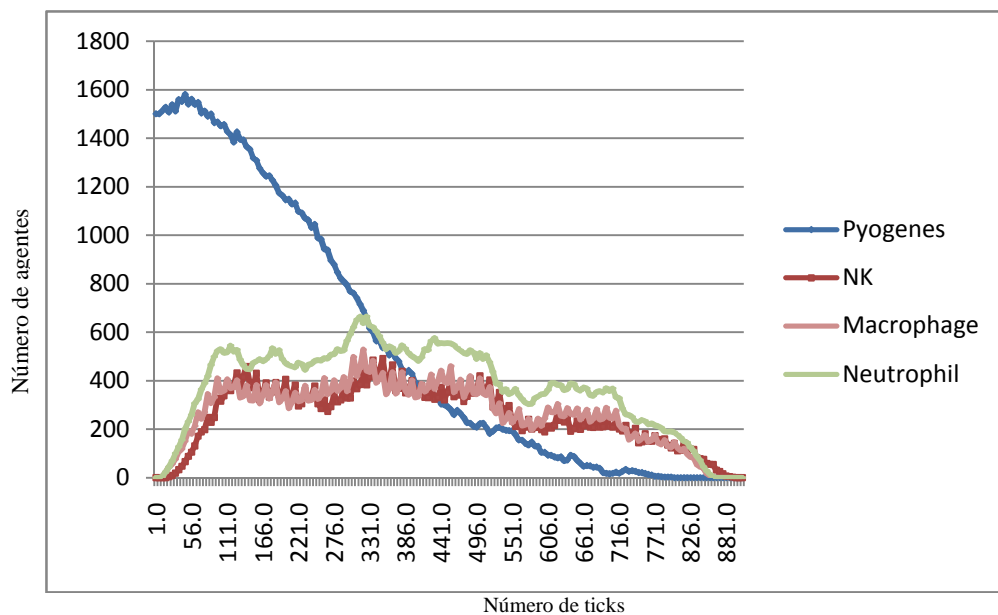


Figura 4.9 - *AirWayTissue* – sem aplicação de antibiotico

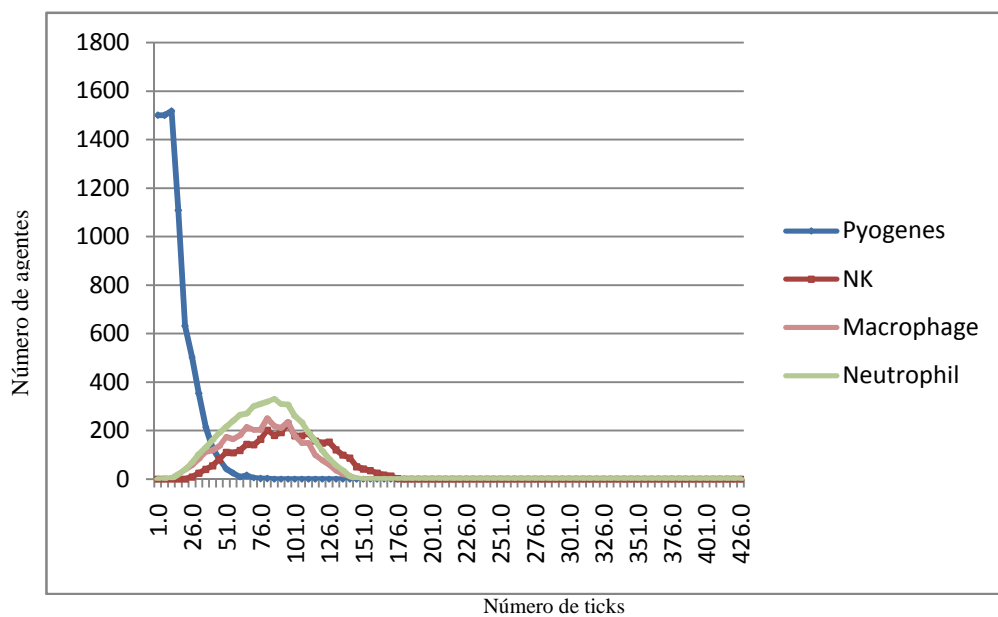


Figura 4.10 *AirWayTissue* – com aplicação de antimicrobiano

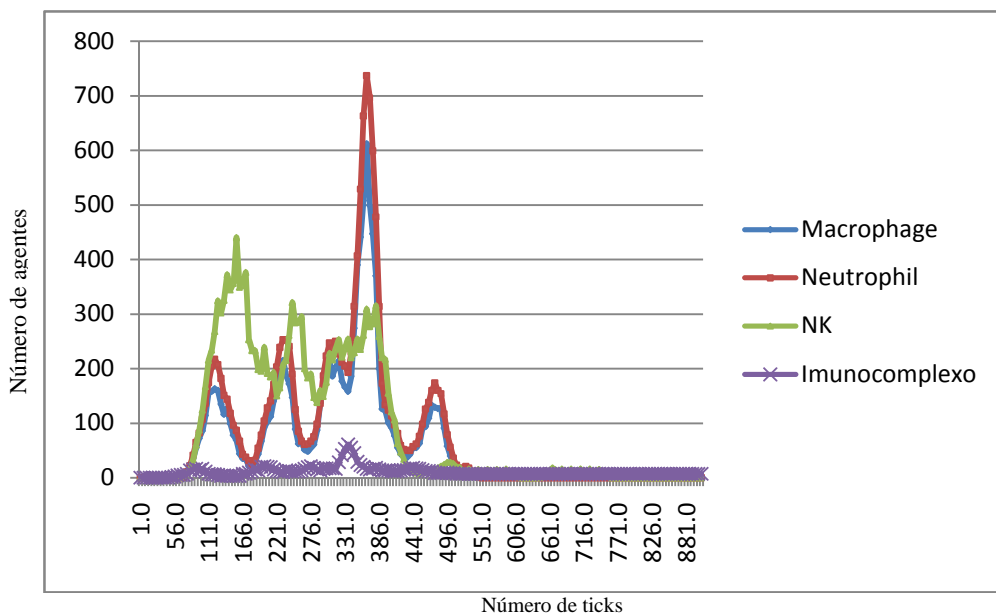


Figura 4.11- *KidneyTissue* sem aplicação de antimicrobiano

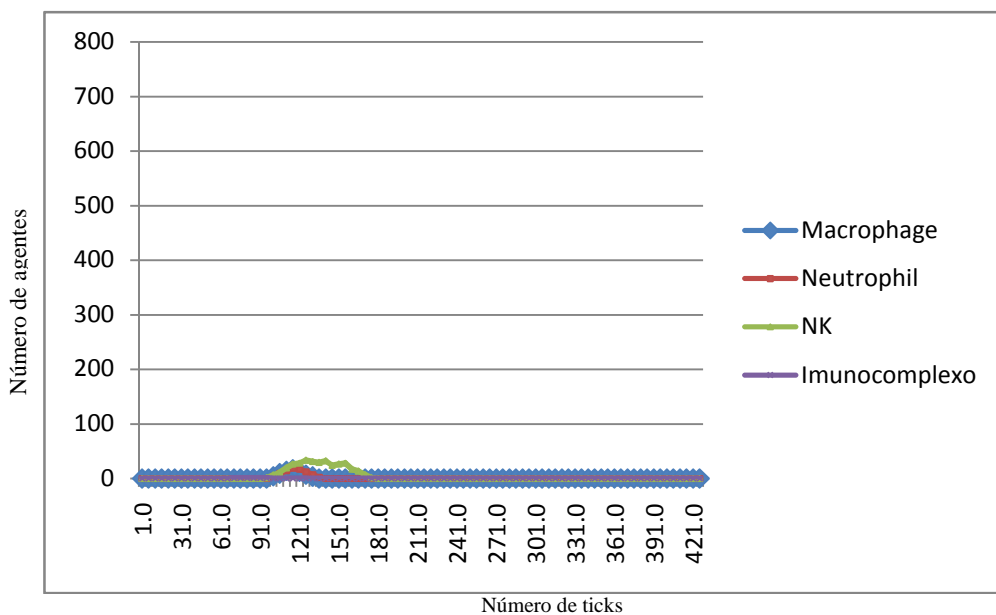


Figura 4.12 *Kidney Tissue* com aplicação de antimicrobiano

Findos os testes, conclui-se que o uso de antimicrobianos pode minimizar a ocorrência de GNPE. Ademais, o teste realizado representa um avanço em termos do *AutoSimune*, na medida em que poderá permitir a investigação do papel dos antimicrobianos em processos infecciosos nas vindouras pesquisas do grupo.

Capítulo 5

CONCLUSÕES

De acordo com a proposta inicial do trabalho, e a partir de estudos e pesquisas realizadas acerca do *SI*, foi proposto um modelo do *SI*, baseado em agentes, que atendeu aos requisitos necessários para a simulação de processos imunopatológicos da glomerulonefrite pós-infecciosas por *Streptococcus pyogenes*.

Os objetivos específicos enunciados no início da investigação foram atingidos. Foram levantados os requisitos necessários para um modelo que permitisse o estudo de processos envolvidos na GNPE, e, o modelo foi implementado na ferramenta Repast Symphony. Estende-se e incluiu-se a funcionalidade na ferramenta chamada *AutoSimmune* (POSSI, 2012). Esta ferramenta foi capaz de apresentar um comportamento coerente com o esperado, segundo a literatura pesquisada.

O modelo apresentado neste trabalho representa um novo ensaio para evidenciar a viabilidade científica da pesquisa envolvendo a modelagem do *SI*, através da proposta de um modelo inicial e de uma ferramenta que o implementasse. Destaca-se que o *AutoSimmune* demonstrou estar no caminho certo, apresentando características descritas como requisito para a simulação da GNPE. Os resultados obtidos pela simulação do modelo trazem evidências interessantes do ponto de vista biológico e clínico, as quais poderão ser melhor investigadas em estudos *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do SI*. São Paulo: Revinter, 2003.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do SI*. 2ª. ed. São Paulo: Elsevier, 2007.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 3ª. ed. São Paulo: Elsevier, 2008.
- AL-AJMI, J. A.; HILL, P.; O' BOYLE, C.; GARCIA, M. L.; MALKAWI, M.; GEORGE, A.; SALEH, F.; LUKOSE, B.; ALI, B. A.; ELSHEIKH, M. Group A Streptococcus Toxic Shock Syndrome: An outbreak report and review of the literature. *J Infect Public Health*, v. 5, n. 6, p. 388-393, 2012.
- BALDY J.L.S.. *Estreptococcias*. In: Veronesi R, Focaccia R. Veronesi Tratado de Infectologia. Atheneu, São Paulo, 1997.
- BASTOS, C. A.; POSSI, M.A.; OLIVEIRA, A. P.; CERQUEIRA, F. R. Presented Poster: *Tool for simulation of the immune system using multi-agent systems to support the research of human autoimmune diseases - an extension for bacteria recognition*. In: X-meeting 2011(AB3C/SolBio), Florianópolis-SC, Brasil, 2011.
- BATSFORD, S.R.; MEZZANO, S.; MIHATSCH, M. *et al*. *Is the nephritogenic antigen in post-streptococcal glomerulonephritis pyrogenic exotoxin B (SPE B) or GAPDH?* *Kidney Int* 2005; 68: 1120–1129.
- BENOIST, C.; MATHIS, D. *Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for t cell epitope mimicry?* *Nature Immunology*, v. 2, n. 9, p. 797–801, Setembro 2001.
- BISNO, A.L. *Nonsuppurative poststreptococcal sequelae: rheumatic fever and glomerulonephritis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas and Bennett's principles and Practices of Infectious Diseases. 5th Edition. Churchill Livingstone, New York, 2000.
- BISNO, A.L.; STEVENS, D.L. *Streptococcus pyogenes*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas and Bennett's principles and Practices of Infectious Diseases. 5th
- BROOKS, Geo. F.; BUTEL, Janet S.; MORSE, Stephen A. *Ernest, Melnick e Adelberg Microbiologia médica*. 22ª Edição. Rio de Janeiro. ISBN 85-86804-37-1.
- BUROVA, L.; PIGAREVSKY, P.; SELIVERSTOVA, V.; GUPALOVA, T.; SCHALÉN, C.; TOTOLIAN, A. *Experimental poststreptococcal glomerulonephritis elicited by IgG Fc-binding M family proteins and blocked by IgG Fc fragment*. *APMIS* 2012; 120: 221–30.
- BUROVA, L.; THERN, A.; PIGAREVSKY, P.; GLADILINA, M.; SELIVERSTOVA, V.; GAVRILOVA, E.; NAGORNEV, V.; SCHALÉN, C.; TOTOLIAN A.; *Role of group A streptococcal IgG-binding proteins in triggering experimental glomerulonephritis in the rabbit*. *APMIS* 2003, 111: 955–962.
- CALISH, V. L. G.; VAZ, C. A. *Imunologia*. Livraria e Editora Revinter, Segunda Edição, 2009
- CARAPETIS, JR.; STEER, A.C., MULLHOLAND, E.K.; WEBER, M.: *The global burden of group A streptococcal diseases*, 2005.

CARVALHO, A. C. P. L. F.; BRAYNER, A.; LOUREIRO, A.; FURTADO, A. L. *Grandes Desafios da Pesquisa em Computação no Brasil – 2006 – 2016*. São Paulo, maio 2006.

CASTELLINO, F.J.; BAJAJ, S.P. *Activation of human plasminogen by equimolar levels of streptokinase*. *J Biol Chem* 1997; 252: 492–498.

CASTRO, L. N. *Engenharia Imunológica: Desenvolvimento e Aplicação de Ferramentas Computacionais Inspiradas em Sistemas Imunológicos Artificiais. Tese (Doutorado) — Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Maio 2001*.

CELADA, F.; SEIDEN, P. E. *A computer model of cellular interactions in the immune system*. *Immunol Today*, v. 13, 1992.

COURA, J. R. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005 2v.:Il.; ISBN 85-277-1093-5.

FLOREANO, D.; MATTIUSI, C. *Bio-inspired artificial intelligence : theories, methods, and technologies*. [S.l.]: MIT Press, 2008. (*Intelligent robotics and autonomous agents series*). ISBN 978-0-262-06271-8.

FOLCIK, V.; AN, G.; OROSZ, C. *The basic immune simulator: an agent-based model to study the interactions between innate and adaptive immunity*. *Theoretical biology & medical modelling*, v. 4, p. 39, 2007.

GOMES, A. P.; BAZZOLLI, D. M. S.; FONTES, G. G.; LIMA, L. M.; OLIVEIRA, M. R.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; SOUZA, V. B. *Laboratório Aplicado à Clínica*. Viçosa: Editora UFV, 2012. 83p.

GOMES, A. P.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; BASTOS, C. A.; POSSI, M. A.; OLIVEIRA, A. P.; SOUSA, F. O.; SILVA, C. C.; SANTOS, E. P.; SANTANA, L. A.; CERQUEIRA, F. R.; FERREIRA, R. S.; MENDONÇA, E. G.; GELLER, M; OLIVEIRA, M. G. A.. *Computational modeling of Streptococcus pyogenes infection: perspectives for in silico investigation of antimicrobial therapy in poststreptococcal glomerulonephritis*. In: II International Conference on Antimicrobial Research – ICAR2012, Lisboa, 2012.

GRASER, R. T.; DILORENZO, T. P.; WANG, F.; CHRISTIANSON, G. J.; CHAPMAN, H. D.; ROOPENIAN, D. C.; NATHENSON, S. G.; SERREZE, D. V. *Identification of a cd8 t cell that can independently mediate autoimmune diabetes development in the complete absence of cd4 t cell helper functions*. *Journal of Immunology*, v. 164, p. 3913–3918, 2000.

GRELLA, D. K.; CASTELINO, F. J. *Activation of human plasminogen by streptokinase. Direct evidence that preformed plasmin is necessary for activation to occur*. *Blood* 1997; 89: 1585–1589.

GUILHERME, L.; FERREIRA, F.M.; KÖHLER, K.F.; POSTOL, E; KALIL, J. A. *Vaccine against Streptococcus pyogenes: The potential to prevent rheumatic fever and rheumatic heart disease*. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2013 Feb;13(1):1-4.

HOFFMANN, S. *The throat carrier rate of group A and other hemolytic streptococci among patients in general practice*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [Sect B]* 1985; 93: 347-51.

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: 20/11/2012.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5ª edição. ed. New York: Garland Science, 2001.

JOHNSON, D. R.; KAPLAN, E. L.; VANGHEEM, A.; FACKLAM, R. R.; BEALL, B. *Characterization of group A streptococci (Streptococcus pyogenes): correlation of M-*

protein and emm-gene type with T-protein agglutination pattern and serum opacity factor. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, Pt 2, p. 157-164, 2006.

KARKOW, F. J.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; ARCURI, M. B.; ALBUQUERQUE, V.; GOMES, A. P. Controvérsias em translocação bacteriana. In: KARKOW, F. J. *Tratado de metabolismo humano*. Rio de Janeiro: Rubio, 2010. p. 323-335.

KEFALIDES, NA; PEGG, NT; OHNO, N. *et al.* Antibodies to basement membrane collagen and to laminin are present in sera from patients with poststreptococcal glomerulonephritis. *J Exp Med* 1986; 163:588–602.

KONG, H. H.; SEGRE, J. A. Skin microbiome: looking back to move forward. *J Invest Dermatol*, v. 132, n. 3 (Pt 2), p. 933-939, 2012.

KRAUS, W.; BEACHEY, EH. Renal autoimmune epitope of group A streptococci specified by M protein tetrapeptide: Ile-Arg-Leu-Arg. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4516–4520

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; Aster JC. *Robbins & Cotran - Patologia Bases Patológicas Das Doenças*. Elsevier, Rio de Janeiro, 2010.

LI, X.; WANG, Z.; LU, T.; CHE, X. Modelling immune system: Principles, models, analysis and perspectives. *Journal of Bionic Engineering*, v. 6, n. 1, p. 77–85, 2009.

MACIEL, A., *et al.* Portadores assintomáticos de infecções por *Streptococcus pyogenes* em duas escolas públicas na cidade do Recife, Pernambuco. *Rev. Bras. Saude Mater. Infant.*, Recife, v. 3, n. 2, June 2003

MACAL, C. M.; NORTH, M. J. Agent-based modeling and simulation. In: *Proceedings of the 2009 Winter Simulation Conference*. [S.l.: s.n.], 2009. p. 86–98.

MONTSENY, J.J.; MEYRIER, A.; KLEINKNECHT, D.; CALLARD, P. The current spectrum of infectious glomerulonephritis: Experience with 76 patients and review of literature. *Medicine (Baltimore)* 74:63-73, 1995.

NORSTRAND, A.; MCSHAN, W.M.; FERRETTI, J.J.; *et al.* Allele substitution of the streptokinase gene reduces the nephritogenic capacity of group A streptococcal strain NZ131. *Infect Immun* 2000; 68: 1019–1025.

ODA, T.; YOSHIZAWA, N.; YAMAKAMI, K.; TAMURA, K.; KUROKI, A.; SUGISAKI, T.; SAWANOBORI, E.; HIGASHIDA, K.; OHTOMO, Y.; HOTTA, O.; KUMAGAI, H.; MIURA, S. Localization of nephritis-associated plasmin receptor in acute poststreptococcal glomerulonephritis. *Human Pathology* (2010) 41, 1276-1285.

ODA, T.; TAMURA, K.; YOSHIZAWA, N.; *et al.* Elevated urinary plasmin activity resistant to alpha2-antiplasmin in acute poststreptococcal glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:2254-9.

POSSI, M. A. *Uma ferramenta para simulação do SI através de sistemas multiagentes: um caso de estudo da autoimunidade*. Dissertação (Mestrado). Departamento de Informática, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, fevereiro 2012.

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.; 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.

PURCHIARONI, F.; TORTORA, A.; GABRIELLI, M.; BERTUCCI, F.; GIGANTE, G.; IANIRO, G.; OJETTI, V.; SCARPELLINI, E.; GASBARRINI, A. The role of intestinal

microbiota and the immune system. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, v. 17, n. 3, p. 323-33, 2013.

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.

RASTALDI, M.P.; FERRARIO, F.; YANG, L.; et al. *Adhesion molecules expression in noncrescentic acute post-streptococcal glomerulonephritis*. *JAm Soc Nephrol* 1996; 7: 2419–2427

RODRIGUEZ-ITURBE B.; MUSSER J. M. *The current state of poststreptococcal glomerulonephritis*. *J Am Soc Nephrol* 19: 1855-1864, 2008.

RODRIGUEZ-ITURBE, B., MEZZANO, S. *Infections and kidney diseases: a continuing global challenge*. In: *El Nahas M (ed.). Kidney Diseases in the Developing World and Ethnic Minorities*. London: Taylor e Francis, 2005 pp. 59-82.

ROITT, I. M.; DELVER, P. J. *Roitt's Essential Immunology*. [S.l.]: Blackwell Science, 2006.

SAWCER, S.; HELLENTHAL, G.; PIRINEN, M.; SPENCER, C. C. A.; DONNELLY, P.; COMPSTON, A. *Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis*. *Nature*, n. 476, p. 214–219, 2011. ISSN 0028-0836.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GELLER, M.; GOMES, A. P.; ESPERIDIÃO ANTONIO, V.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. *O sistema imunológico: atualidades e perspectivas para a prática clínica*. *Jornal Brasileiro de Medicina*, v. 95, p. 28-34, 2008.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P. *Antimicrobianos: guia prático*. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2010. v. 1. 432p.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; SANTANA, L. A.; GELLER, M. . *Clinical use of antimicrobials: an update*. *Revista Brasileira de Medicina (Rio de Janeiro)*, v. 68, p. 154-157, 2011.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; MENDONÇA, E. G.; VITORINO, R. R.; MIYADAHIRA, R.; ALVAREZ-PEREZ, M. C.; OLIVEIRA, M. G. A. *Proteomic updates on sepsis*. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 58, n. 3, p. 376-382, 2012a.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; POSSI, M. A.; OLIVEIRA, A. P., SOUZA, 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: *II International Conference on Antimicrobial Research – ICAR2012*, Lisboa, 2012.

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, p. 294-301, 2012b.

SOTO, H. M.; PARRA, G.; RODRIGUEZ-ITURBE, B. *Circulating levels of cytokines in poststreptococcal glomerulonephritis*. *Clinical Nephrology* 47, p. 6-12, 1997.

TAVARES, W. *Antibióticos e quimioterápicos para o clínico*. 2ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 599p.

TAVARES, W.; MARINHO, L. A. C. *Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2012. 1.1186p.

- TAY, J. C.; JHAVAR, A. Cfiss: WEISS, G. (Ed.). *Multiagent systems: a modern approach to distributed artificial intelligence*. [S.l.]: The MIT Press, 1999.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5^a ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- THURMAN, J.M.; HOLERS, V.M. *The Central Role of the Alternative Complement Pathway in Human Disease*. *J Immunol* 2006; 176:1305-1310.
- UCHIDA, T.; ODA, T., WATANABE, A., IZUMI, T., HIGASHI, K., KUSHIYAMA, T., MIURA, S., KUMAGAI, H. *Clinical and Histologic Resolution of Poststreptococcal Glomerulonephritis With Large Subendothelial Deposits and Kidney Failure*. *American Journal of Kidney Diseases*. Vol 58, Issue 1, 113-117, July 2011
- VERNON, K.A.; JORGE, E.G., HALL, A.E.; FREMEAUX-BACCHI, V., AITMAN, T.J.; COOK, H.T.; HANGARTNER, R.; KOZIELL, A.; PICKERING, M.C. *Acute Presentation and Persistent Glomerulonephritis Following Streptococcal Infection in a Patient With Heterozygous Complement Factor H-Related Protein 5 Deficiency*. *American Journal of Kidney Diseases* - 16 April 2012
- WEI, L.; PANDIRIPALLY, V.; GREGORY, E. *et al*. *Impact of the SpeB protease on binding of the complement regulatory proteins factor H and factor H- like protein 1 by Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 2005; 73: 2040–2050.
- WOOLDRIDGE, M.; JENNINGS, N. R. *Intelligent agents: theory and practice*. *The Knowledge Engineering Review*, v. 2, n. 10, p. 115–152, 1995.
- WOOLDRIDGE, M. J. *An introduction to multiagent systems*. 1. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2001. ISBN 047149691X.
- ZIPFEL, P.F.; HEINEN, S.; JÓZSI, M.; SKERKA, C. *Complement and diseases: Defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases*. *Molecular Immunology* Vol 43, Issues 1–2, January 2006, Pages 97–106