

Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Exatas / Faculdade de Engenharia
Programa de Pósgraduação em Modelagem Computacional

Bárbara de Melo Quintela

Acoplamento de Modelos Computacionais de Doenças Infecciosas

Juiz de Fora

2015

Bárbara de Melo Quintela

Acoplamento de Modelos Computacionais de Doenças Infecciosas

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Modelagem Computacional, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Modelagem Computacional.

Orientador: D.Sc. Marcelo Lobosco

Coorientadores: D.Sc. Rodrigo Weber dos Santos

Ph.D. Alan S. Perelson

Juiz de Fora

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Modelo Latex do CDC da
UFJF com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Quintela, Bárbara de Melo.

Acoplamento de Modelos Computacionais de Doenças Infecciosas /
Bárbara de Melo Quintela. – 2015.

107 f. : il.

Orientador: D.Sc. Marcelo Lobosco

Coorientadores: D.Sc. Rodrigo Weber dos Santos

Ph.D. Alan S. Perelson

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de
Ciências Exatas / Faculdade de Engenharia. Programa de Pósgraduação
em Modelagem Computacional, 2015.

1. Métodos Numéricos Aplicados. 2. Biologia Computacional. 3.
Doenças Infecciosas. I. Lobosco, Marcelo, orient. II. Santos, Rodrigo Weber
dos, Perelson, Alan, coorient. III. Título.

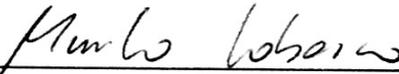
Bárbara de Melo Quintela

Acoplamento de Modelos Computacionais de Doenças Infecciosas

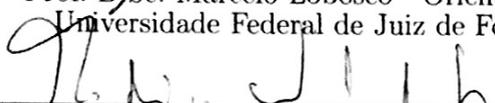
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Modelagem Computacional, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Modelagem Computacional.

Aprovada em 20 de Março de 2015.

BANCA EXAMINADORA



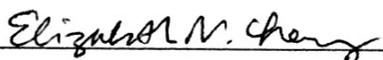
Prof. D.Sc. Marcelo Lobosco - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora



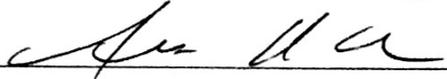
Prof. D.Sc. Rodrigo Weber dos Santos - Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora



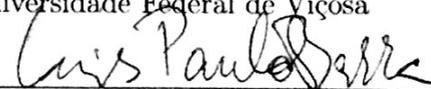
Prof. Ph.D. Alan Stuart Perelson- Coorientador
Los Alamos National Laboratory



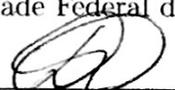
Profa. Ph.D. Elizabeth Maura Cherry
Rochester Institute of Technology



Prof. D.Sc. Alcione de Paiva Oliveira
Universidade Federal de Viçosa



Prof. D.Sc. Luis Paulo da Silva Barra
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profa. D.Sc. Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt
Universidade Federal de Juiz de Fora

*Dedico este trabalho aos meus pais Beto (in memoriam) e Bete
e à minha irmã, Bia.*

Agradecimentos

Em tudo dai graças pois essa é a vontade de Deus para convosco
(Tessalonicenses 5:18)

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Modelagem Computacional (PPGMC) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e agências brasileiras de fomento à pesquisa CAPES e CNPq por garantirem os recursos necessários para que o trabalho pudesse ser realizado no Brasil e no exterior através do programa de doutorado sanduíche (Processo PDSE 99999.002789/2014-00) que permitiu que eu tivesse acesso não somente à dados experimentais mas também que tivesse oportunidade de trabalhar como pesquisadora visitante em um laboratório de pesquisa na área de biologia e biofísica teórica.

Ao Centro de Estudos Não Lineares (CNLS) do Laboratório Nacional de Los Alamos (LANL) que me receberam nos Estados Unidos e também disponibilizaram todos os recursos necessários enquanto eu trabalhava como pesquisadora visitante.

Agradeço ao orientador Marcelo Lobosco pelo constante exemplo e incentivo e por não medir esforços em ajudar na construção desse trabalho. Aos coorientadores Rodrigo Weber dos Santos e Alan S. Perelson pela confiança e contribuições indispensáveis. Sem as contribuições das especialidades de cada um não teria sido possível desenvolver esse trabalho multidisciplinar.

Aos membros da banca examinadora pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Aos demais professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Modelagem Computacional da UFJF pela disposição em ajudar. De forma especial ao Professor Luís Paulo S. Barra, por todo apoio enquanto coordenador do programa.

Aos pesquisadores do LANL, Ruy Ribeiro, Jessica Conway e James Mac Hyman, pela colaboração e a todos os funcionários e colegas do T-6 e do CNLS, que não lerão esse texto em português mas que com certeza tornaram mais leve a distância de casa.

Aos colegas do PPGMC pela amizade e por ajudarem a manter o equilíbrio entre trabalho e descontração. Ao colega Alexandre B. Pigozzo por sua pesquisa em modelagem matemática da resposta inata que foi utilizada neste trabalho e por toda a ajuda quando comecei a estudar os modelos do sistema imune.

À minha família e amigos pela compreensão nas ausências. Especialmente aos meus pais que fizeram todo o possível para que eu tivesse mais oportunidades do que eles tiveram. Minha irmã, Bia, pela amizade. Ao tio-padrinho Edson por todo apoio e incentivo sem o qual não teria ido tão longe. Ao tio Manoel que sempre plantou e ainda planta muitas ideias na minha mente curiosa.

Ao Gustavo, meu companheiro de todas as horas, pelo constante incentivo e por todo apoio emocional durante essa jornada! É impossível medir o quanto sua ajuda foi importante para que eu pudesse seguir em frente concluindo esse trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O desenvolvimento de modelos matemáticos da resposta imunológica permite que os mecanismos desse sistema de defesa possam ser melhor compreendidos. O objetivo principal deste trabalho é a representação de diferentes escalas da interação entre patógeno e hospedeiro durante infecção e tratamento para auxiliar o estudo desses elementos através do estabelecimento do acoplamento de modelos matemáticos distintos. São apresentados dois exemplos de acoplamento. No primeiro um modelo em que o processo de inflamação local no pulmão é descrito por Equações Diferenciais Parciais (EDP) enquanto um sistema de Equações Diferenciais Ordinárias (EDO) é utilizado para representar a resposta sistêmica. A simulação de diferentes cenários permite a análise da dinâmica de diversas células do sistema imune na presença de um patógeno (bactéria). Foi mostrado através da análise de resultados qualitativos do acoplamento de modelos que a ação da resposta sistêmica é essencial para eliminação das bactérias. No segundo exemplo, um conjunto de equações diferenciais ordinárias representando uma infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é acoplado a um sistema de equações diferenciais parciais que foi desenvolvido para representar a dinâmica intracelular. Esse exemplo permitiu o estudo da replicação do HCV sob efeito de terapia com uso de drogas do tipo DAAs (*Direct Acting Anti-virus*) e foi validado comparando-se a dados experimentais. Os resultados reforçam que a partir dessas representações utilizando acoplamentos de modelos computacionais novas análises matemáticas e simulações de outros cenários podem ser realizadas em um espaço de tempo razoável, auxiliando o estudo do complexo sistema imune e o desenvolvimento de tratamento de infecções.

Palavras-chave: Métodos Numéricos Aplicados. Biologia Computacional. Doenças Infecciosas.

ABSTRACT

The development of mathematical models of the immune response allows a better understanding of the multifaceted mechanisms of this defense system. The main purpose of this work is to represent different scales and aspects of the host-pathogen interaction during infection and treatment by the coupling of distinct mathematical models. Two examples are defined. On the first example the local tissue inflammation processes are described by Partial Differential Equations (PDEs) whereas a system of Ordinary Differential Equations (ODEs) is used as a model for the systemic response. The simulation of distinct scenarios allows the analysis of the dynamics of different immune cells in the presence of a bacteria. It was shown with the qualitative analysis of the results of the coupled model that the systemic response is essential to eliminate the bacteria. In the second example a set of ordinary differential equations representing infection of the hepatitis C virus (HCV) is coupled to a set of partial differential equations that was developed to represent intracellular dynamics. That example allowed the study of HCV replication under therapy using direct acting antiviral drugs (DAAs) and was validated comparing to experimental data. The results support that with the coupling of computational models, other mathematical analysis and simulations could be performed, in a reasonable time frame, aiding to the study of the complex immune system and the development of treatment to infections.

Key-words: Applied Numerical Methods. Computational Biology. Infectious Diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Órgãos do sistema imune.	14
Figura 2 – Bactéria <i>S. aureus</i>	15
Figura 3 – Vírus da hepatite C e seu genoma.	16
Figura 4 – Esquema com ciclo de vida do vírus da hepatite C.	16
Figura 5 – Esquemas dos dois exemplos de acoplamento.	20
Figura 6 – Exemplos de diversos patógenos que podem afetar o organismo humano.	22
Figura 7 – Células do sistema imune inato que realizam fagocitose.	24
Figura 8 – Micrografia eletrônica colorida de uma célula do tipo NK. Adaptado de Gage e Redfern (2013).	25
Figura 9 – Representação de um linfócito B e seus receptores.	27
Figura 10 – Esquema representando um anticorpo geral do tipo IgG. Adaptado de Sompayrac (2008).	28
Figura 11 – Linfócitos T efetores (verde) se ligam a antígenos em uma célula cancerosa. Micrografia eletrônica adaptada de Green e Ariyan (2014).	29
Figura 12 – Esquema representativo do linfócito T e seu receptor.	29
Figura 13 – As células do sistema imune e partículas invasoras entram nos linfonodos através dos vasos linfáticos. Adaptado de NIH (2007).	30
Figura 14 – Célula dendrítica apresentando antígeno a um linfócito. Adaptado de Thompson (2014).	31
Figura 15 – Modelo básico de infecção viral. Adaptado da referência Perelson (2002).	39
Figura 16 – Esquema representativo do modelo do sistema inato simplificado.	43
Figura 17 – Esquema representativo do modelo da resposta imune adquirida simplificado.	45
Figura 18 – Ativação de macrófagos.	49
Figura 19 – Apresentação de antígenos.	49
Figura 20 – Osonização do antígeno.	49
Figura 21 – Impacto da variação dos parâmetros na população de antígenos.	57
Figura 22 – Impacto da variação dos parâmetros na população de antígenos ao longo de 30 dias desde o início da infecção.	58
Figura 23 – Modelo intracelular linear com duas equações.	64
Figura 24 – Crescimento exponencial de RNA do vírus da hepatite C. Idade representa o tempo desde o início da infecção.	64
Figura 25 – Distribuição de RNA viral por 20 dias após a infecção.	65
Figura 26 – Análise de sensibilidade do modelo intracelular após 72h.	69
Figura 27 – Esquema do modelo multi-escala acoplado de infecção e tratamento.	70
Figura 28 – Análise de sensibilidade dos parâmetros do modelo acoplado 48h após início de terapia.	72

Figura 29 – Comportamento dos antígenos.	75
Figura 30 – Concentração média de antígenos no tecido na ausência de resposta imune.	76
Figura 31 – Os resultados mostram a média de antígenos no tecido contidos apenas pela resposta inata.	76
Figura 32 – Esquema representando a posição dos vasos sanguíneos nas extremidades do domínio simulado.	77
Figura 33 – Difusão de antígenos por 30 dias.	78
Figura 34 – Macrófagos no tecido durante 30 dias de simulação.	78
Figura 35 – Esquema representando o posicionamento dos capilares linfáticos no domínio cúbico com 10 mm de lado.	79
Figura 36 – Concentração média de macrófagos ativados no tecido e concentração de macrófagos ativados no linfonodo mais próximo.	79
Figura 37 – Presença de anticorpos no tecido e no LN em aproximadamente 20 dias de simulação da presença de um antígeno.	80
Figura 38 – Concentrações dos linfócitos T, B e células do Plasma no LN.	81
Figura 39 – Anticorpos no tecido.	81
Figura 40 – Difusão e eliminação dos antígenos no tecido.	82
Figura 41 – Esquema do modelo complexo desenvolvido por Binder <i>et al</i> , 2013 . . .	84
Figura 42 – Replicação do RNA viral.	84
Figura 43 – Comparação de previsão do modelo ao experimento com deficiência na replicação.	85
Figura 44 – Comparação do modelo a experimentos de infecção.	86
Figura 45 – Exportação do RNA do HCV.	87
Figura 46 – Resultado do ajuste de parâmetros.	89
Figura 47 – Dinâmicas do RNA viral após ajuste de parâmetros.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Análise de sensibilidade - parâmetros escolhidos, descrição e valor máximo da diferença entre a solução com parâmetros base e modificando apenas um parâmetro por vez.	55
Tabela 2	–	Valores adotados na discretização.	60
Tabela 3	–	Valores, unidades e significado biológico para os parâmetros do modelo de replicação de RNA intracelular.	65
Tabela 4	–	Conjuntos de parâmetros do modelo para validação através da comparação ao experimento de transfecção (BINDER <i>et al.</i> , 2013).	85
Tabela 5	–	Conjuntos de parâmetros base do modelo para validação através da comparação ao experimento de transfecção (BINDER <i>et al.</i> , 2013).	88
Tabela 6	–	Conjunto de parâmetros ajustados para as simulações de experimentos <i>in vivo</i> com o modelo acoplado. São mostrados apenas os parâmetros que permitimos que variassem. Fixamos os parâmetros $\alpha = 30d^{-1}$ e $\kappa_t = \kappa_c = 1d^{-1}$	88
Tabela 7	–	Valores iniciais das variáveis do modelo acoplado.	107
Tabela 8	–	Coefficientes de difusão.	107
Tabela 9	–	Outros coeficientes utilizados.	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- S. aureus* Staphylococcus aureus, página 17
- APC Célula Apresentadora de Antígenos, página 32
- BCR Receptor de Célula B, página 30
- EDO Equação Diferencial Ordinária, página 22
- EDP Equação Diferencial Parcial, página 22
- HCV Vírus da Hepatite C, página 19
- HCVcc Cultura de células do vírus da hepatite C, página 20
- IFN Interferon, página 29
- LN Linfonodos ou nódulos linfáticos, página 33
- LPS Lipopolissacarídeo, página 29
- MHC Complexo de histocompatibilidade Maior, página 32
- NK Natural Killer, página 27
- RNA Ácido Ribonucleico, página 19
- SI Sistema Imune, página 17
- TCR Receptor de Célula T, página 32
- TNF Tumor Necrosis Factor, citocina, página 29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	DEFINIÇÃO DO PROBLEMA	13
1.1.1	Infecção por <i>S. aureus</i> após Influenza	14
1.1.2	Infecção pelo Vírus da Hepatite C	15
1.2	JUSTIFICATIVA	17
1.3	HIPÓTESE	18
1.4	OBJETIVO	19
1.5	ORGANIZAÇÃO DO TEXTO	19
2	PATÓGENOS E IMUNIDADE	21
2.0.1	PRINCIPAIS INVASORES	21
2.1	IMUNIDADE INATA	23
2.1.1	Sistema do Complemento	23
2.1.2	Fagócitos	23
2.1.3	<i>Natural Killer</i>	25
2.2	IMUNIDADE ADQUIRIDA	26
2.2.1	Linfócitos B	26
2.2.2	Anticorpos	27
2.2.3	Linfócitos T	28
2.3	APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS	29
2.3.1	Sistema Linfático	29
2.3.2	Captura dos Antígenos e Apresentação	30
3	MODELAGEM DO SISTEMA IMUNE: REVISÃO DA LITE- RATURA	33
3.1	REPRESENTAÇÕES DO SISTEMA IMUNE	33
3.1.1	Modelos baseados em agentes	33
3.1.2	Modelos com autômatos celulares	35
3.1.3	Modelos com Equações Diferenciais	36
3.1.3.1	Modelos utilizando dinâmica de sistemas	36
3.1.3.2	Equações Diferenciais ordinárias	36
3.1.3.3	Equações Diferenciais Parciais	37
3.1.3.4	Equações Diferenciais com Atraso	37
3.2	INTEGRAÇÃO DAS RESPOSTAS INATA E ADAPTATIVA	38
3.3	MODELOS DE INFECÇÃO VIRAL	39
3.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO	40

4	MÉTODOS	42
4.1	BACTÉRIA (<i>S. aureus</i>)	42
4.1.1	Modelo da Resposta Inata	42
4.1.2	Modelo da Resposta Adquirida	45
4.1.3	Acoplamento dos Modelos (<i>S. aureus</i>)	48
4.1.3.1	Análise de Sensibilidade do Modelo Acoplado	54
4.1.4	Implementação Computacional do Acoplamento (<i>S. aureus</i>)	58
4.2	VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)	60
4.2.1	Modelo Intracelular do HCV com filamentos de RNA positivo e negativo	61
4.2.1.1	Análise de Estabilidade Linear	65
4.2.2	Modelo Intracelular do HCV com Tradução e Replicação de RNA	66
4.2.2.1	Análise de Estabilidade Linear do Modelo Intracelular	67
4.2.2.2	Análise de Sensibilidade do Modelo Intracelular	69
4.2.3	Acoplamento de modelos (HCV)	70
4.2.3.1	Análise de sensibilidade do modelo acoplado	72
4.2.4	Implementação Computacional do Acoplamento (HCV)	73
5	RESULTADOS DO ACOPLAMENTO (<i>S. aureus</i>)	75
5.1	COMPORTAMENTO DO ANTÍGENO	75
5.2	IMUNIDADE INATA	76
5.3	IMUNIDADES INATA E ADQUIRIDA - ACOPLAMENTO	78
6	RESULTADOS DO ACOPLAMENTO (HCV)	83
6.1	VALIDAÇÃO DO MODELO INTRACELULAR - EXPERIMENTO DE TRANSFEÇÃO	83
6.2	VALIDAÇÃO DO MODELO INTRACELULAR - INFECÇÃO	85
6.3	EFEITO DA TERAPIA - SIMULANDO O MODELO ACOPLADO	86
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS	91
7.1	INTRODUÇÃO	91
7.2	SÍNTESE	91
7.3	LIMITAÇÕES DA PESQUISA	94
7.4	RECOMENDAÇÕES E TRABALHOS FUTUROS	95
	REFERÊNCIAS	96
	APÊNDICE A – PARÂMETROS	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO DO PROBLEMA

As doenças infecciosas são a segunda causa de morte após as doenças cardíacas e a principal causa de morte em crianças e adolescentes no mundo (WHO, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2004). A maior parte das doenças infecciosas que afeta os seres humanos são causadas por micro-organismos chamados patógenos. Os patógenos podem ser extremamente diversos, podendo ser classificados de forma geral em 4 tipos: bactérias, vírus, fungos e parasitas (PARHAM, 2014; CASADEVALL; PIROFSKI, 2000).

Um dos sistemas mais importantes presente nas mais diversas e distintas formas de vida é o sistema imunológico (ou sistema imune), Seu papel primário é o de identificar e eliminar uma ampla gama de patógenos, nos protegendo da morte por infecções (MARCHUK, 1997; PERELSON; WEISBUCH, 1997).

Em mamíferos, o sistema imunológico é composto por uma vasta e complexa rede de moléculas, células, tecidos e órgãos especializados em defender o organismo contra doenças (Figura 1). Para alcançar este objetivo, o sistema imunológico, após identificar o patógeno, cria uma rede de defesa com o objetivo de eliminar o invasor. Cabe também ao sistema imunológico eliminar as células do próprio organismo que possam se comportar de forma anormal, que por exemplo, originariam tumores, caso não fossem eliminadas. O sistema imunológico é ainda responsável pelo processo de eliminação de células mortas e renovação de algumas das estruturas do organismo (SOMPAYRAC, 2008).

A compreensão da interação dos patógenos com o sistema imune permite o desenvolvimento de terapias e vacinas (ABBAS; LICHTMAN, 2010; SOMPAYRAC, 2008). Entretanto, a sua grande complexidade e a interação entre seus muitos componentes, em níveis distintos, tornam a tarefa extremamente complicada. Uma ferramenta que tem sido de grande auxílio para o entendimento do funcionamento deste sistema é a modelagem matemática. Através do uso de modelos matemáticos, pesquisadores da área de imunologia podem realizar experimentos *in silico* e testar hipóteses em um curto período de tempo através de análises do comportamento do modelo, ajudando no direcionamento de estudos *in vitro* e *in vivo* (CELADA; SEIDEN, 1992; PERELSON, 2002; DEEM, 2005; KIM; LEVY; LEE, 2009; NAMAS *et al.*, 2013).

Dois exemplos de doenças infecciosas são tratadas neste trabalho: pneumonia causada pela bactéria *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) após uma infecção causada pelo vírus da Influenza; e a infecção causada pelo vírus da hepatite C. Um resumo com as principais características dessas doenças infecciosas e uma justificativa para o desenvolvimento de modelos matemáticos dessas doenças são apresentados a seguir.

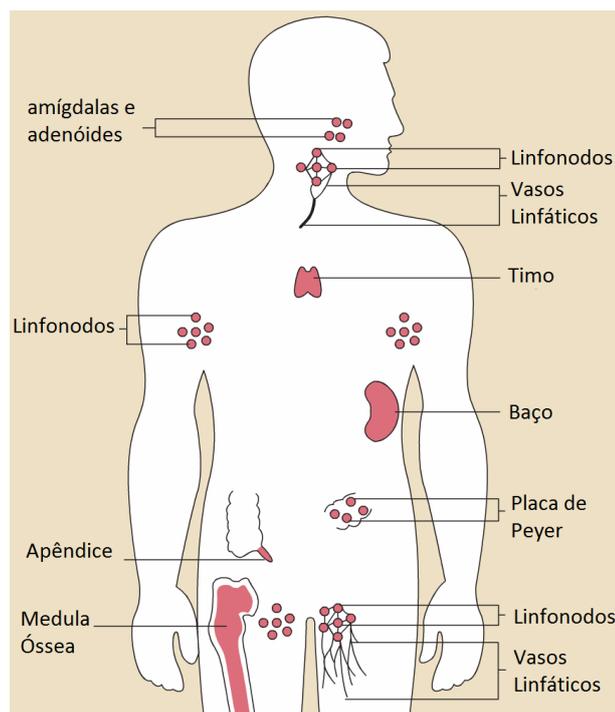


Figura 1 – Órgãos do sistema imune espalhados pelo corpo humano. A figura mostra vários elementos envolvidos na defesa do corpo humano a invasores. Adaptado de NIH (2007)

1.1.1 Infecção por *S. aureus* após Influenza

A pneumonia adquirida na comunidade, ou seja, fora do ambiente hospitalar, é causada entre 1 % a 10 % das vezes pela bactéria *Staphylococcus pneumoniae* e 55 % pela bactéria *S. aureus* (SANTOS; NASCIMENTO; GUERRA, 2008; MCCABE *et al.*, 2009; KALLEN *et al.*, 2009). *S. aureus* é uma bactéria do tipo gram-positiva com diâmetros de 0.5 a 1.5 μm (HARRIS; FOSTER; RICHARDS, 2002) que pode atuar tanto como comensal colonizando a pele humana, narinas e trato gastro intestinal, quanto como um patógeno quando ultrapassa as barreiras físicas, podendo causar pneumonia e septicemia com altas taxas de mortalidade (Figura 2) (CHMEL; PERSON; TECSON-TUMANG, 1981; LOWY, 1998; JENKINS *et al.*, 2014). Devido a relatos de aumento na incidência e gravidade de infecções por *Staphylococcus* nos últimos anos há um maior interesse em compreender as interações dessa bactéria com as diferentes células do corpo humano (PIRES *et al.*, 2014).

S. aureus é o maior causador de infecções hospitalares e geralmente difícil de tratar devido a resistência que desenvolve a medicamentos antimicrobianos (KLEIN; SMITH; LAXMINARAYAN, 2007). A infecção por *S. aureus* após uma gripe (Influenza) é uma das principais causas de morte e os mecanismos ainda não são completamente conhecidos (WANG *et al.*, 2015). O estudo de Michailova *et al.* (2000) mostra aspectos da interação do *S. aureus* com macrófagos nos alvéolos pulmonares e reforça que uma determinada

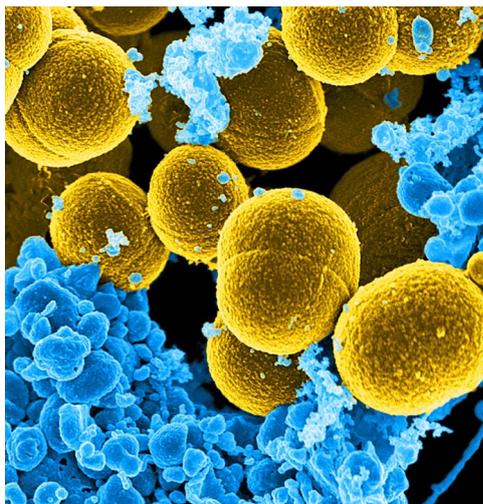


Figura 2 – *Staphylococcus aureus*, esféricas e de cor mostarda, escapando de células brancas do sangue (coloridas artificialmente de azul). Eletromicrografia colorida digitalmente da referência DeLeo (2008), com aumento de 20.000x.

quantidade de células de defesa é necessária para eliminação do patógeno.

Modelos animais foram desenvolvidos para o estudo desse patógeno (MIZGERD; SKERRETT, 2008) e outros especificamente para a coinfeção com o vírus da gripe (MADHI; KLUGMAN; GROUP, 2004; LEE *et al.*, 2010; IVERSON *et al.*, 2011). Além disso, o desenvolvimento de modelos *in vitro* 3D do pulmão podem auxiliar no estudo e descoberta de novos medicamentos (HUANG; WISZNIEWSKI; CONSTANT, 2011).

Modelos matemáticos também são utilizados para estudo de coinfeção de pneumonia com o vírus da gripe, principalmente considerando a bactéria *S. pneumonia* (SMITH; MCCULLERS; ADLER, 2011; SMITH *et al.*, 2013; CALBO; GARAU, 2009) e, poucos consideram *S. aureus* (LEE *et al.*, 2010; MARCHUK, 1997). Não encontramos até o momento um modelo matemático que represente uma infecção por *S. aureus* após Influenza no tecido pulmonar acoplado a uma resposta inata com a ação de macrófagos como células apresentadoras e a ativação de uma resposta sistêmica com produção de anticorpos.

1.1.2 Infecção pelo Vírus da Hepatite C

O vírus da Hepatite C (HCV) possui uma molécula de RNA linear de filamento único orientada positivamente com aproximadamente 9600 nucleotídeos em seu genoma que codifica 3 proteínas estruturais e 7 não estruturais (Figura 3). Foi classificado no gênero *Hepacivirus* e família *Flaviridae* (APPEL *et al.*, 2006; GASTAMINZA *et al.*, 2008).

A infecção causada pelo HCV afeta de forma crônica aproximadamente 170 milhões de pessoas no mundo e é a principal causa de cirrose e câncer no fígado (WHO, 2014; GREMION; CERNY, 2005). Por muitos anos essa infecção não era completamente compreendida devido a dificuldade de desenvolver um sistema de cultura do HCV *in vitro*.

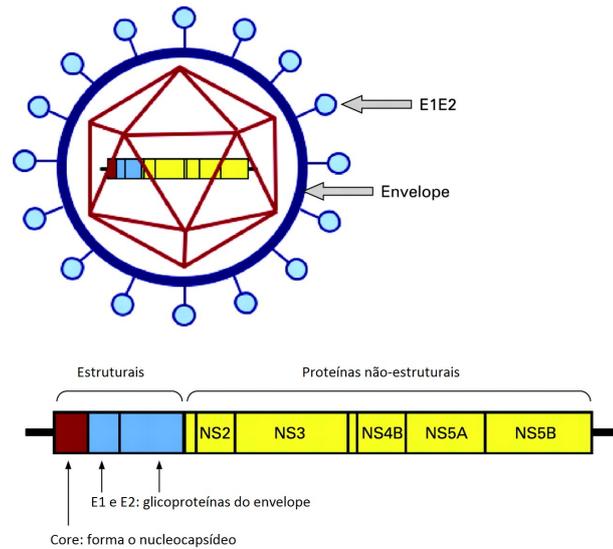
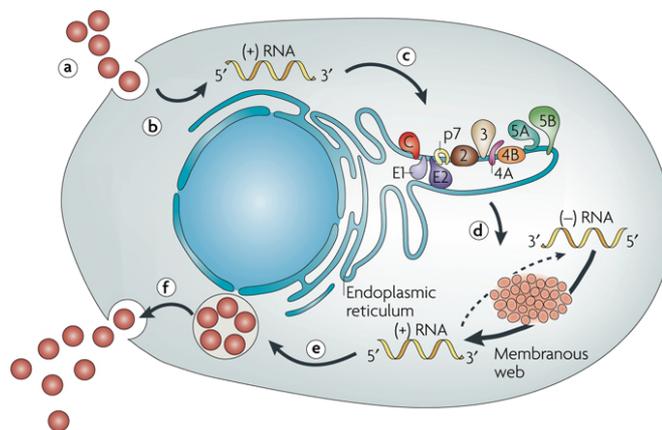


Figura 3 – Vírus da hepatite C e seu genoma. Esse vírus apresenta um único filamento de RNA em um nucleocapsídeo icosaédrico. No genoma estão codificadas as proteínas estruturais e não-estruturais que formam o vírus. Adaptado de Timpe e McKeating (2008).

No entanto, o desenvolvimento recente de um sistema de cultura de células infectadas com HCV (HCVcc) permite melhor investigação de processos que governam o ciclo de vida do HCV (APPEL *et al.*, 2006; ELLIOT; ARMSTRONG; MCLAUCHLAN, 2009; AFZAL *et al.*, 2014). Além disso, novas formas de distinguir e quantificar o material genético têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas (CRAGGS *et al.*, 2001; BESSAUD *et al.*, 2001).

O HCV infecta principalmente as células do fígado, hepatócitos, e a Figura 4 mostra o ciclo de vida do HCV dentro de uma célula infectada.



Nature Reviews | Microbiology

Figura 4 – Internalização, replicação e exportação do HCV. Internalização do vírus na célula (a); liberação do material genético no citoplasma (b); tradução mediada por IRES e processamento da poli proteína (c); replicação do RNA (d); montagem de um virion (e); maturação e exportação do virion (f). IRES, *internal ribosome entry site*. Adaptado de Moradpour, Penin e Rice (2007).

Após a entrada do vírus na célula, o material genético (RNA positivo) é liberado e traduzido no citoplasma. O genoma do HCV codifica uma poliproteína a partir da qual todas as proteínas necessárias para a replicação de novos vírus são sintetizadas. As proteínas formam complexos de replicação junto com uma cópia de RNA negativo que é inicialmente replicado e utilizado como um template para a replicação de novos RNA positivos (Figura 3) (QUINKERT; BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2005).

As novas cópias de RNA positivo que foram replicadas podem ser utilizadas para serem novamente traduzidas, replicadas, criando novos complexos de replicação ou montadas em partículas virais para serem exportadas, sendo que essa decisão não é claramente conhecida (APPEL *et al.*, 2006; ELLIOT; ARMSTRONG; MCLAUCHLAN, 2009; BISCEGLIE, 2010). A replicação não depende somente de proteínas mas também de fatores do hospedeiro (SCHELLER *et al.*, 2009; JANGRA; YI; LEMON, 2010).

Ainda não existe uma vacina aprovada para a infecção pelo HCV e o tratamento atual utiliza uma combinação de interferon peguilado, que age como um inibidor da replicação, junto com ribavirina, que potencializa a ação do interferon (GOUTAGNY; INCHAUSPE, 2009). Este tratamento permanece inadequado para um número significativo de pacientes e uma alternativa recente, os agentes antivirais de ação direta, que tem como alvo pequenas moléculas, se encontram em várias fases de desenvolvimento (GOUTAGNY; INCHAUSPE, 2009; LIANG; GHANY, 2013), sendo que algumas já foram aprovadas para uso.

Diversos modelos matemáticos têm sido utilizados para auxiliar na compreensão da dinâmica do HCV (AVENDAÑO *et al.*, 2001; DIXIT, 2008; DAHARI *et al.*, 2009a; RIBEIRO *et al.*, 2012) e valiosas contribuições podem ser obtidas através dessa modelagem (CHATERJEE; GUEDJ; PERELSON, 2012). O efeito do tratamento também foi representado no contexto da infecção por HCV em modelos que incluem terapias com interferon- α (DAHARI *et al.*, 2009b) e em combinação com ribavirina (BANERJEE; KEVAL; GAKKHAR, 2013) e ainda terapias com os novos antivirais de ação direta (GUEDJ; NEUMANN, 2010; GUEDJ; PERELSON, 2011; GUEDJ *et al.*, 2013; RONG *et al.*, 2013).

No entanto, até o presente momento não encontramos um modelo matemático que represente múltiplas escalas da infecção do HCV incluindo efeitos de tratamento e replicação de ambos os filamentos de RNA dentro da célula.

1.2 JUSTIFICATIVA

Dada a complexidade do sistema imune, e sua interação com patógenos, a compreensão de seu funcionamento é essencial para a busca por melhoras na saúde humana (MIRSKY *et al.*, 2011). Os experimentos com animais são largamente utilizados para analisar o comportamento do sistema imune. Entretanto, a relevância desses experimen-

tos relacionados aos humanos já foi questionada pelas diferenças biológicas que são muitas entre as espécies. Com isso, os modelos computacionais mostram grande potencial para simulações complementando outros tipos de experimentos (MIAO *et al.*, 2010).

Vários modelos computacionais têm sido propostos com a intenção de melhor compreender o funcionamento do sistema imune humano (HETHCOTE, 2000; PERELSON, 2002), cada um deles focando um determinado aspecto devido a complexidade de se avaliar o sistema como um todo (AGRAWAL; LINDERMAN, 1996; BOER, 1988; AN; LEE, 2001; BERNASCHI; CASTIGLIONE, 2001; WARRENDER, 2004; BARROZO; YANG, 2006; FLOWER; TIMMIS, 2010; DONG *et al.*, 2010). Um longo caminho deve ser percorrido até que possamos desenvolver um simulador com tamanho grau de sofisticação, capaz de integrar diferentes aspectos do sistema imune, porém os primeiros passos precisam ser dados.

1.3 HIPÓTESE

Uma questão científica que emerge a partir desse cenário é a seguinte: Como relacionar informações em diferentes escalas espaciais e temporais da resposta imune disponíveis atualmente, obtidas através de experimentos *in vitro* e *in vivo* em um modelo numérico?

Este trabalho assume que é possível relacionar informações de diferentes escalas espaciais e temporais da resposta imune através do acoplamento de modelos matemáticos computacionais, que compartilhem pelo menos uma variável comum, propondo dois exemplos de acoplamentos distintos:

1. No primeiro exemplo de acoplamento é realizada uma prova de conceito apresentando um modelo em que o processo de inflamação local no pulmão é descrito por Equações Diferenciais Parciais (EDP), acoplado a um sistema de Equações Diferenciais Ordinárias (EDO) que representa a resposta sistêmica. A simulação de diferentes cenários permite a análise da dinâmica de diversas células e moléculas do sistema imune na presença de um patógeno. O acoplamento entre os dois modelos visa criar um elo entre o comportamento do sistema imunológico na escala de um tecido, quando um patógeno é identificado, e seus efeitos globais, em especial nos nódulos linfáticos localizados próximos ao local infectado. Até a presente data, não conhecemos outros trabalhos na literatura que explorem tal acoplamento no âmbito da modelagem numérica (publicado (QUINTELA; SANTOS; LOBOSCO, 2014)).
2. No segundo exemplo, um conjunto de EDO que representa uma infecção pelo HCV é acoplado a um sistema de equações diferenciais parciais baseadas no tempo desde a infecção, que foi desenvolvido para representar a dinâmica de replicação intracelular do vírus. O vírus extracelular pode ser eliminado do plasma por células do sistema

imune e sua replicação dentro da célula, e posterior liberação de novos vírus, pode ser bloqueada por tratamento. Este acoplamento foi validado comparando-se a dois experimentos distintos *in vitro* (QUINTELA *et al.*, em preparação.).

Existem várias formas de acoplar modelos em múltiplas escalas e compartimentos, e não estamos propondo uma abordagem específica. Dessa forma, a contribuição científica da tese é a apresentação de dois exemplos distintos de representação matemática do acoplamento de diferentes aspectos do sistema imune e discutimos as diferenças e escolhas para cada um deles. Iremos nos referir a cada exemplo pelo nome do patógeno causador da infecção, *S. aureus* ou HCV.

As Figuras 5(a) e 5(b) descrevem um esquema com os passos dados para cada acoplamento, destacando em vermelho o que foi desenvolvido nesta tese. No primeiro exemplo (Figura 5(a)) um modelo pré-existente de equações diferenciais ordinárias que representa a resposta específica no linfonodo (MARCHUK, 1997) foi compartimentalizado e outro modelo foi utilizado para representar a dinâmica no tecido (PIGOZZO *et al.*, 2012). Os compartimentos foram acoplados considerando o fluxo entre eles.

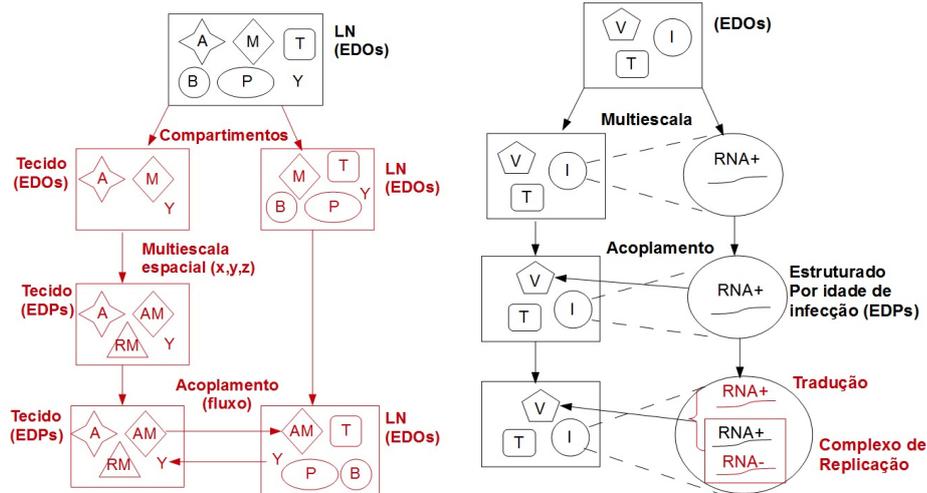
Por outro lado, no segundo exemplo (Figura 5(b)) duas escalas foram acopladas no mesmo compartimento (RONG *et al.*, 2013). Um modelo de equações diferenciais ordinárias que representa uma infecção por vírus (PERELSON, 2002) foi estendido para uma abordagem multi-escala considerando produção de RNA dentro das células infectadas (DAHARI *et al.*, 2009b). Uma abordagem baseada na idade da infecção foi utilizada para representar que a morte de uma célula infectada e a produção de mais vírus não são constantes e dependem do tempo de infecção (RONG *et al.*, 2013). A representação intracelular foi estendida para considerar tradução de filamentos positivos de RNA e ambos os filamentos dentro do complexo de replicação.

1.4 OBJETIVO

O objetivo geral do presente trabalho é demonstrar que a hipótese é verdadeira oferecendo exemplos de modelos matemáticos acoplados que auxiliam na compreensão de uma determinada doença infecciosa e do papel da resposta imune para apoiar o desenvolvimento de melhores tratamentos e vacinas contra o patógeno causador da respectiva doença.

1.5 ORGANIZAÇÃO DO TEXTO

O texto está organizado de forma a primeiramente formalizar os conceitos fundamentais relacionados aos fenômenos biológicos tratados (Capítulo 2). Em seguida, no Capítulo 3 é apresentada uma revisão da literatura abordando os modelos que foram desenvolvidos até o presente momento e apresentando a correlação com o trabalho atual.



(a) Acoplamento *S. aureus*. Símbolos: A - antígeno, M - macrófagos, T - linfócitos T, B - linfócitos B, P - células do plasma, Y - anticorpos. RM e AM representam macrófagos em repouso e ativados, respectivamente. LN representa o linfonodo.

(b) Acoplamento HCV. Símbolos: V - carga viral, T - células alvo, I - células infectadas, RNA+ - filamento positivo de RNA. Um novo estado do RNA positivo foi adicionado ao modelo intracelular para representar a etapa de tradução e uma representação para o filamento negativo foi adicionada para representar o complexo de replicação.

Figura 5 – Esquemas representativos dos passos realizados para os dois exemplos de acoplamento de modelos matemáticos. As etapas que foram desenvolvidas nessa tese estão destacadas em vermelho.

O capítulo 4 descreve precisamente os métodos utilizados e modelos desenvolvidos. Em seguida, são apresentados resultados do acoplamento de modelos de infecção e resposta imune à bactéria *S. aureus* (Capítulo 5), e do modelo de infecção pelo vírus da hepatite C (Capítulo 6). As considerações finais, apontando as contribuições do trabalho ao estado da arte, as limitações da solução e expectativa de trabalhos futuros estão descritas no último capítulo (7).

2 PATÓGENOS E IMUNIDADE

Este capítulo apresenta os conceitos biológicos necessários para a compreensão dos modelos tratados neste trabalho. Existe uma vasta bibliografia detalhando cada processo biológico e não faz parte dos objetivos deste capítulo detalhar cada processo. No entanto, espera-se contextualizar os modelos desenvolvidos oferecendo uma base para melhor compreensão da proposta de trabalho. Serão tratados os principais elementos e processos físicos a serem representados pelos modelos computacionais descrito ao longo do trabalho.

Segundo Abbas e Litchman (2010), a ação de resistir a doenças infecciosas é definida como imunidade e o conjunto composto por células, tecidos e moléculas que trabalham para essa defesa é chamado de **sistema imunológico**. O termo **resposta imunológica** é empregado para definir a ação desses entes contra os micro-organismos infecciosos (ABBAS; LICHTMAN, 2010).

O conjunto de células, tecidos e moléculas envolvidos na resposta imunológica pode ser dividido em: imunidade inata e imunidade adquirida (ABBAS; LICHTMAN, 2010). Segue abaixo uma breve descrição dos invasores estudados e principais características da resposta imunológica.

2.0.1 PRINCIPAIS INVASORES

Os micro-organismos podem ter comportamentos diversos podendo atuar como comensais ou causadores de doenças (PARHAM, 2014). Os organismos invasores chamados comensais estabelecem uma relação alimentar harmônica, se beneficiando de seu hospedeiro sem causar-lhe prejuízo. Esses organismos ajudam na digestão humana, processando alimentos e produzindo vitaminas. Podem atuar também ajudando na prevenção de doenças ao inibir a proliferação de outros micro-organismos causadores de doenças pela competição por espaço (PARHAM, 2014).

Elementos causadores de doenças como os vírus, bactérias, fungos e parasitas são chamados de patógenos (PARHAM, 2014; ALBERTS; JOHNSON; LEWIS, 2002). Existem patógenos das mais diversas formas que colonizam variadas partes do corpo humano (Figura 6), e quando se aproveitam de um organismo com defesas baixas são chamados patógenos oportunistas (PARHAM, 2014).

Diferentes patógenos utilizam mecanismos distintos para infectar um hospedeiro. A maioria das bactérias, por exemplo, vivem nos espaços entre as células e após serem reconhecidas passam a ser alvos dos anticorpos (2.2.2) que enviam sinais para as células fagocíticas (2.1.2) eliminarem esses micro-organismos (NIH, 2007).

Já os vírus e alguns tipos de bactérias e parasitas devem entrar nas células para

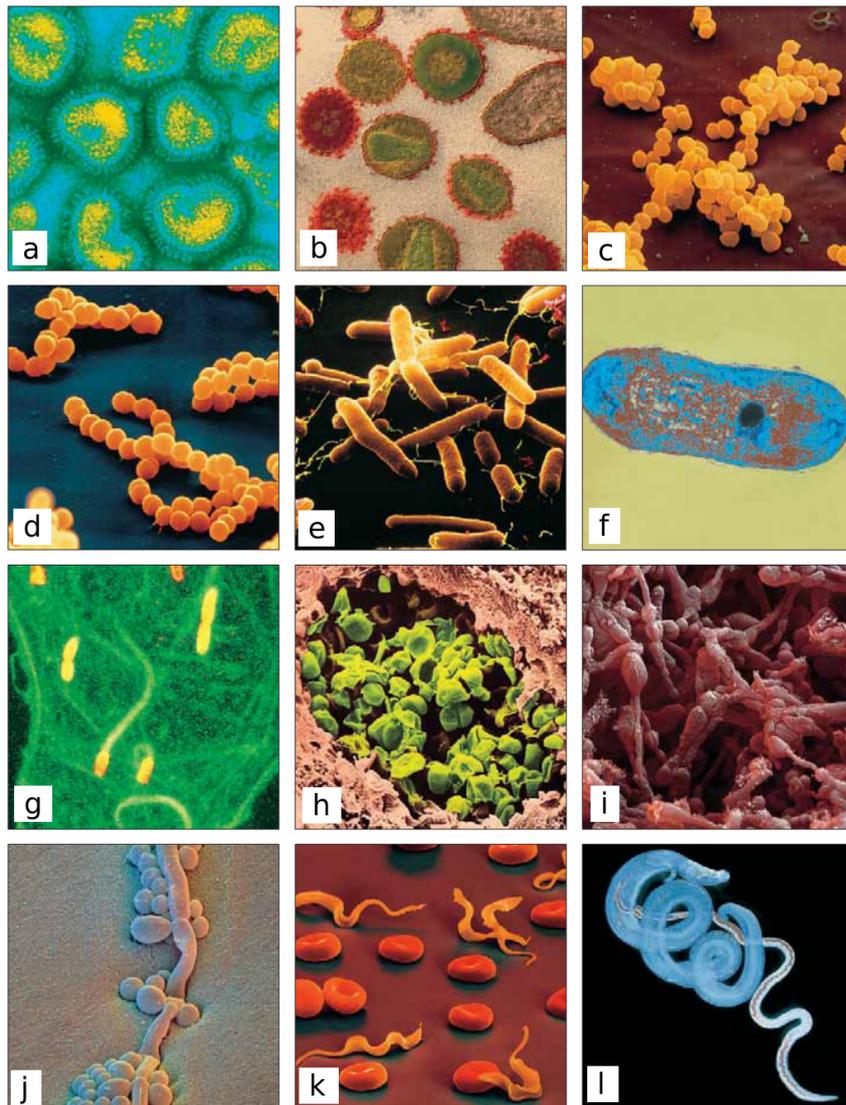


Figura 6 – Exemplos de diversos patógenos que podem afetar o organismo humano. (a) Vírus da imunodeficiência humana (HIV), causador da AIDS. (b) Vírus causador da gripe (Influenza). (c) *S. aureus*, bactéria que coloniza a pele, causa comum de acne, intoxicação alimentar e pneumonia. (d) *Streptococcus pyogenes*, bactéria causadora da febre escarlate e infecções de ouvido. (e) *Salmonella enteritidis*, bactéria causadora de intoxicação alimentar. (f) *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria causadora da tuberculose. (g) Em verde uma célula humana contendo *Listeria monocytogenes* (em amarelo), bactéria que pode contaminar alimentos processados, causando listeriose em mulheres grávidas e indivíduos com imunidade baixa. (h) *Pneumocystis carinii*, fungo oportunista que infecta pacientes com AIDS e outros indivíduos com imunidade baixa. (i) *Epidermophyton floccosum*, fungo que causa micose. (j) *Candida albicans*, fungo comum no corpo humano que pode causar sapinho e outras infecções sistêmicas mais graves. (k) *Trypanosoma brucei* (em laranja), protozoário que causa a doença do sono africana. (l) *Schistosoma mansoni*, platelminto que causa esquistossomose. Todas as imagens são micrografias eletrônicas coloridas artificialmente com exceção da (i) que é uma micrografia de luz. Adaptado de Parham (2014).

sobreviverem, e requerem, portanto, uma forma distinta de defesa. As células do hospedeiro infectadas exibem partes dos micróbios na sua superfície, sinalizando para células efetoras, como alguns linfócitos T, para que destruam a célula infectada. Os anticorpos também podem ajudar se ligando aos vírus antes que eles tenham a chance de infectar uma célula (NIH, 2007). A parte dos patógenos que é reconhecida pelas células do sistema imune como um invasor e causam o início da produção de anticorpos é chamada de antígeno (SOMPAYRAC, 2008).

A interação entre patógenos e hospedeiros faz com que a dinâmica entre eles possa alterar constantemente, como, por exemplo, com relação a gripe, embora os sintomas sejam severos como febres e fortes dores, muitas variantes do vírus da gripe não oferecem perigo à população saudável, que geralmente se recuperam em poucos dias. No entanto, patógenos desconhecidos à população humana geralmente causam alta mortalidade entre os infectados, por exemplo, o vírus do Ebola que apresentou taxas de até 90 % de mortalidade em 2014 (PARHAM, 2014; ZAWILINSKA; KOSZ-VNENCHAK, 2014).

2.1 IMUNIDADE INATA

Também chamada de imunidade natural ou nativa, existe nos organismos saudáveis e funciona como uma barreira inicial a invasores externos que conseguem entrar no tecido do hospedeiro (ABBAS; LICHTMAN, 2010). É formada basicamente por proteínas plasmáticas ou do complemento, células que realizam fagocitose e outras células chamadas *Natural Killer* (NK) (ABBAS; LICHTMAN, 2010; SOMPAYRAC, 2008).

2.1.1 Sistema do Complemento

O sistema do complemento (ou sistema complemento) é composto por cerca de vinte proteínas distintas que trabalham juntas para destruir e sinalizar aos outros elementos do sistema imune que está ocorrendo uma invasão. Este sistema do complemento existe inclusive nos ouriços do mar que evoluíram há cerca de 700 milhões de anos, sendo considerado um sistema de defesa bem antigo (SOMPAYRAC, 2008).

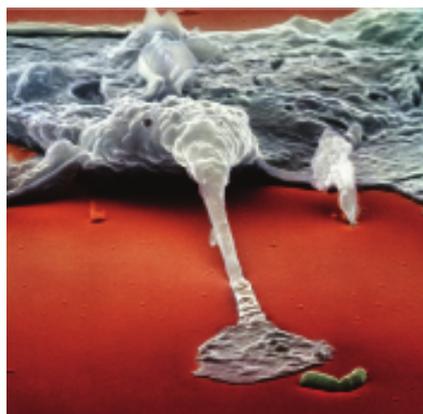
2.1.2 Fagócitos

A fagocitose pode ser definida como o processo biológico no qual uma célula *engole* outra. As células que realizam a fagocitose são chamadas de fagócitos. Os principais fagócitos que fazem parte do sistema imune inato são os neutrófilos e os monócitos (Figuras 7(a) e 7(b), respectivamente). Ambas são células sanguíneas produzidas na medula óssea vermelha e recrutadas para o local da infecção onde têm como principais funções reconhecer e realizar a fagocitose dos organismos invasores (ABBAS; LICHTMAN, 2010).

A partir do momento que um fagócito identifica um corpo estranho, ele desenvolve alongamentos (chamados de pseudópodes) que englobam o corpo estranho em uma espécie de vesícula. Essa vesícula se funde a outra vesícula, chamada lisossomo, que contém elementos tóxicos capazes de digerir células e corpos estranhos. Esse processo é um refinamento da estratégia que vem sendo utilizada pelas amebas para se alimentarem há bilhões de anos (SOMPAYRAC, 2008).



(a) Micrografia eletrônica colorida de um neutrófilo engolfando o fungo *Candida albicans*. Adaptado de Library (2013).



(b) Monócito diferenciado em macrófago se alongando para fagocitar uma bactéria. Adaptado de Sompayrac (2008)

Figura 7 – Células do sistema imune inato que realizam fagocitose.

Neutrófilos também chamados de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), são as células brancas mais abundantes no sangue, possuem diâmetro entre 12 e 15 μm e em resposta à infecções tem sua produção na medula rapidamente aumentada. Sua produção é estimulada por moléculas chamadas citocinas que são produzidas por várias células em resposta a uma infecção. De forma geral, os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao local da infecção, ingerem os patógenos e morrem em poucas horas (ABBAS; LICHTMAN, 2010). A morte dos neutrófilos está programada para ocorrer em torno de cinco dias. Esse processo de morte natural programada é chamado de apoptose. O principal motivo se deve ao fato dos neutrófilos entrarem no tecido prontos para eliminar qualquer invasor e com isso acabam causando dano ao tecido saudável também. Dessa forma, eles circulam pelo sangue em um estado inativo e, quando ocorre uma infecção, as células epiteliais começam a expressar moléculas que aderem aos neutrófilos fazendo com que eles entrem no tecido somente quando está ocorrendo uma infecção (SOMPAYRAC, 2008).

Monócitos existem em menor quantidade em relação aos neutrófilos, mas, ao contrário destes, os monócitos sobrevivem por mais tempo. Nos tecidos, essas células se diferenciam em células chamadas macrófagos que possuem aproximadamente 21

μm de diâmetro (ABBAS; LICHTMAN, 2010). Os macrófagos estão presentes sob a pele, nos pulmões, intestinos e qualquer outra região do corpo que possa estar em contato com o meio externo para oferecer uma barreira de proteção inicial. Estas células existem basicamente em três estados:

- i. em *repouso*, nos tecidos onde funcionam basicamente limpando resíduos gerados pela renovação celular constante;
- ii. *ativados*, quando recebem sinal de que houve uma invasão. Um sinal bastante estudado é o contato com a citocina interferon gamma (IFN- γ) que é produzida principalmente por células *T-helper* e células NK. Neste estado, funcionam como células apresentadoras de antígenos;
- iii. *hiperativados*, quando recebem um sinal direto de um invasor. Um exemplo de sinal direto é o contato com a molécula lipopolissacarídeo (LPS) que faz parte da membrana celular externa de bactérias do tipo Gram-negativas. Neste estado o macrófago aumenta seu tamanho e sua taxa de fagocitose e produz uma citocina (*tumor necrosis factor* - TNF) que é capaz de eliminar células tumorais e células infectadas por vírus e ajuda a ativar outras células (SOMPAYRAC, 2008).

A Figura 7(a) mostra um macrófago se alongando para fagocitar uma bactéria.

2.1.3 *Natural Killer*

As células *Natural Killer* (NK) (Figura 8) representam cerca de 10% das células brancas do sangue (linfócitos) e órgãos linfóides periféricos. Geralmente se encontram no sangue e entram nos tecidos quando há sinalização de que está ocorrendo uma invasão (ABBAS; LICHTMAN, 2010; SOMPAYRAC, 2008).

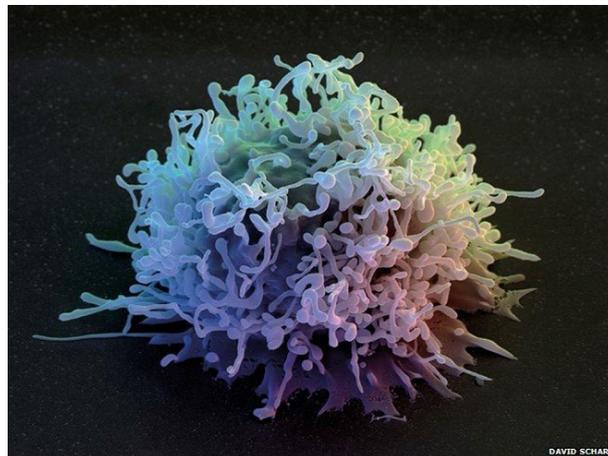


Figura 8 – Micrografia eletrônica colorida de uma célula do tipo NK. Adaptado de Gage e Redfern (2013).

Assim como os macrófagos, também existem em estados diferentes. Quando em repouso, podem produzir citocinas (TNF- γ , citocina que ativa os macrófagos) e eliminar células infectadas, mas quando estão ativadas produzem citocinas em quantidade maior e são ainda mais eficientes. A forma que as células NK utilizam para eliminar outras células consiste em induzi-las a cometer “suicídio” (apoptose - semelhante à morte programada do neutrófilo). A partir da identificação de que uma determinada célula possui algum problema, a NK pode aderir a essa célula liberando proteínas ou expressando receptores de superfície que disparam o processo de “suicídio” da célula (ABBAS; LICHTMAN, 2010; SOMPAYRAC, 2008).

2.2 IMUNIDADE ADQUIRIDA

Após quebrada a barreira inicial da pele e da resposta inata, há uma terceira linha de defesa chamada de imunidade adquirida, específica ou adaptativa. Surgiu há aproximadamente 200 milhões de anos com a evolução dos peixes e nos humanos alcançou seu formato mais elaborado. Esse sistema permite a sobrevivência da vida humana pois é capaz de reconhecer e se adaptar a diversos invasores (SOMPAYRAC, 2008).

A imunidade adquirida precisa ser ativada por células da imunidade inata a partir da presença de invasores, e funciona adaptando-se para oferecer uma resposta para cada tipo distinto de invasor. As principais células componentes da resposta adquirida são os linfócitos T e linfócitos B e a sua ativação ocorre pelo contato direto com o invasor ou através da apresentação de antígenos reconhecidos por células de imunidade inata (BRODSKY; GUAGLIARDI, 1991; ABBAS; LICHTMAN, 2010).

A seguir uma breve descrição dos principais elementos da imunidade adquirida:

2.2.1 Linfócitos B

Assim como outras células do sangue, são produzidos na medula óssea. Nos primeiros dias de vida, essas células selecionam segmentos de código genético das duas proteínas que formarão seus receptores, e então esses receptores assumem suas posições na superfície externa da membrana celular (ALBERTS; JOHNSON; LEWIS, 2002). Um esquema do linfócito B maduro pode ser visto na Figura 9.

Cada linfócito B produz e expressa apenas um tipo de receptor em sua membrana. Como os receptores são formados a partir de combinações genéticas gerando uma grande diversidade de linfócitos B distintos, pode-se dizer que os linfócitos B são capazes de reconhecer praticamente qualquer molécula orgânica existente (ALBERTS; JOHNSON; LEWIS, 2002; SOMPAYRAC, 2008).

Quando um receptor de linfócito B, **BCR** (*B Cell Receptor* em inglês) reconhece seu antígeno respectivo, denominamos a região do antígeno que foi reconhecida de epítipo.

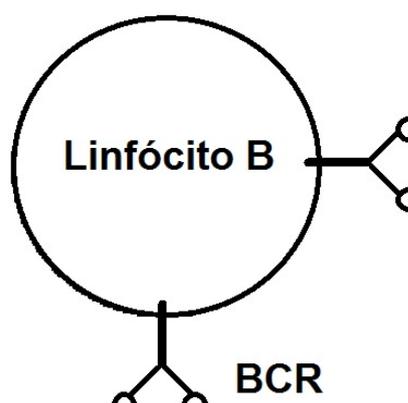


Figura 9 – Representação de um linfócito B e seus receptores.

Esse reconhecimento só gera uma sinalização se dois ou mais epítopos forem reconhecidos ao mesmo tempo, o que é chamado de ligação cruzada (SOMPAYRAC, 2008; ABBAS; LICHTMAN, 2010). Entretanto, somente essa sinalização não é suficiente para a ativação do linfócito B, que precisa de um segundo sinal que pode ser obtido pelas proteínas do sistema do complemento. Existe outra forma de ativação dos linfócitos B que depende da secreção de citocinas pelos linfócitos T que já foram ativados e funcionam como um segundo sinal para ativação dos linfócitos B (ABBAS; LICHTMAN, 2010).

Após a ativação, os linfócitos B escolhem entre duas opções:

- tornarem-se células do plasma, que basicamente produzem anticorpos específicos. Nesse caso, geralmente os linfócitos B migram para o baço ou retornam à medula óssea, se proliferam e iniciam a produção e liberação de anticorpos específicos ao invasor que foi reconhecido;
- tornarem-se células de memória que lembram da primeira exposição ao patógeno e ajudam na defesa contra futuras exposições (SOMPAYRAC, 2008).

2.2.2 Anticorpos

Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) possuem a mesma especificidade do BCR do linfócito B que o produz e têm como principal função a neutralização de toxinas dos invasores. Um anticorpo de forma geral é formado por quatro cadeias de aminoácidos, sendo duas pesadas e duas leves, formando um Y como representado na Figura 10.

Quando um linfócito B é ativado, inicialmente, sua principal função passa a ser produzir anticorpos padrão IgM (Imunoglobulina M). No entanto, existem várias classes de anticorpos dadas pela variação na porção Fc da sua cadeia pesada (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM). Depois de maduros, os linfócitos B podem mudar a classe dos anticorpos produzidos (SOMPAYRAC, 2008).

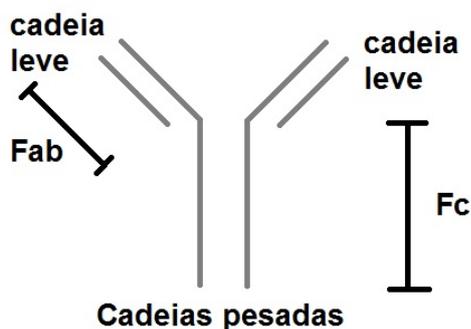


Figura 10 – Esquema representando um anticorpo geral do tipo IgG. Adaptado de Sompayrac (2008).

Os anticorpos são capazes de bloquear os efeitos nocivos dos invasores ao se ligarem a eles. Eles se ligam de forma a revestir os invasores, marcando-os para serem fagocitados, processo que é chamado de **opsonização** (SOMPAYRAC, 2008).

2.2.3 Linfócitos T

Os linfócitos T (Figura 11) também são células do sangue e, assim como os linfócitos B, possuem receptores para reconhecer antígenos. No entanto, os linfócitos T reconhecem apenas peptídeos que estejam ligados ao MHC de células ditas apresentadoras de antígenos ou **APC** (em inglês *Antigen Presenting Cells*) (ABBAS; LICHTMAN, 2010).

MHC ou complexo de histocompatibilidade maior é uma proteína presente na membrana de todas as células nucleadas e funciona como um sinalizador do que está acontecendo do lado de dentro da célula (ABBAS; LICHTMAN, 2010). As células que reconhecem essa informação são os linfócitos T específicos. Existem dois tipos: MHC de classe I (MHC-I) que é identificado pelos linfócitos T citotóxicos CD8+ e MHC de classe II (MHC-II) reconhecidos por linfócitos T *helper* CD4+ (LIU; ROCHE, 2015).

Outra diferença entre os linfócitos B e T é que os receptores do linfócito T, **TCRs** (em inglês *T Cell Receptors*), não são secretados como ocorre com os linfócitos B que secretam os anticorpos (ABBAS; LICHTMAN, 2010).

O TCR é composto por duas proteínas que podem formar uma combinação $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ (Figura 12). A maioria dos linfócitos T expressa a primeira combinação e apresenta ainda moléculas co-receptoras CD4+ ou CD8+ (SOMPAYRAC, 2008). Como o TCR sozinho não é suficiente para enviar um sinal de ativação para o interior do linfócito T, é necessária a co-estimulação através dessas moléculas co-receptoras (CORTHAY, 2006).

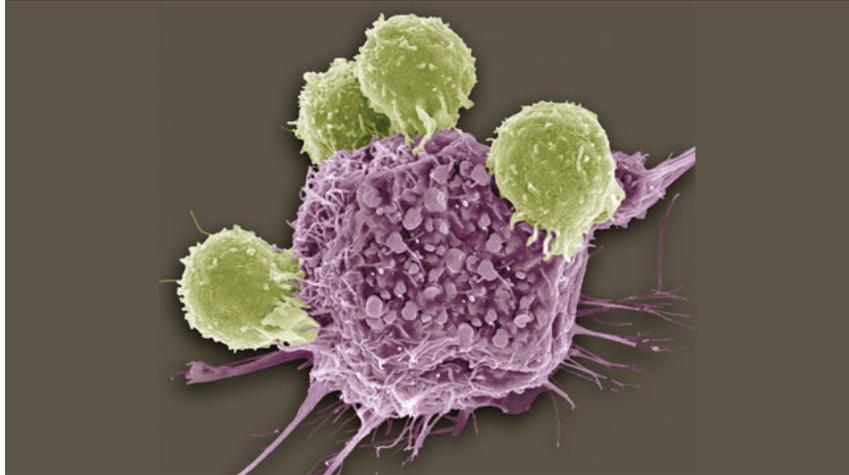


Figura 11 – Linfócitos T efetores (verde) se ligam a antígenos em uma célula cancerosa. Micrografia eletrônica adaptada de Green e Ariyan (2014).

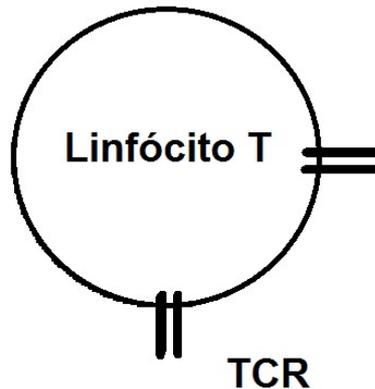


Figura 12 – Esquema representativo do linfócito T e seu receptor.

De forma geral, linfócitos T citotóxicos, ou efetores, expressam CD8+ e ligam-se em MHC classe I (WODARZ; MAY; NOWAK, 2000). Os linfócitos T *helper* desempenham um importante papel regulatório na resposta imune, expressam CD4+ e ligam-se em MHC classe II (AGRAWAL; LINDERMAN, 1996).

2.3 APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS

2.3.1 Sistema Linfático

O sistema linfático é formado pela medula óssea, timo, baço, linfonodos e os vasos linfáticos. Suas principais funções são drenar os detritos dos tecidos e produzir células do sistema imune (SOMPAYRAC, 2008).

As atividades da imunidade adquirida ocorrem nos chamados órgãos linfóides secundários (linfonodos e baço). Existem vários linfonodos (LN) distribuídos pelo corpo interligados pelos vasos linfáticos (Figura 13) e eles atuam drenando o líquido com par-

tículas que vieram dos tecidos. Dentro dos linfonodos ficam alojados linfócitos B e T à espera de APC.

Os linfócitos permanecem circulando por todos os linfonodos para aumentar a probabilidade de serem ativados caso seja necessário (SOMPAYRAC, 2008; PARHAM, 2014). Portanto, os linfonodos são essenciais para o início da resposta adquirida por serem o local onde ocorre apresentação de antígenos. As células que atuam na resposta inata são drenadas para os linfonodos e apresentam antígenos para os linfócitos até que algum deles os reconheça e inicie a resposta adquirida (NIH, 2007).

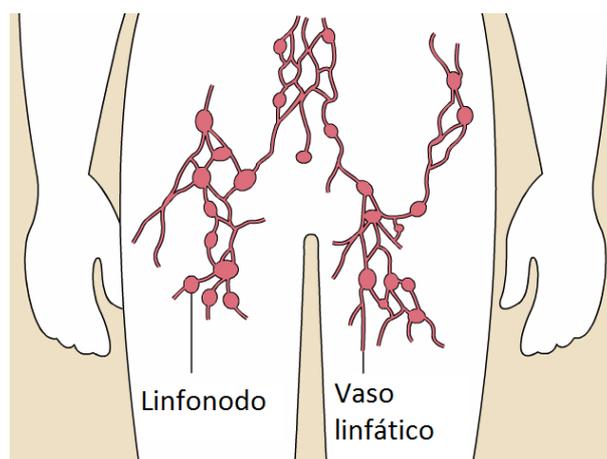


Figura 13 – As células do sistema imune e partículas invasoras entram nos linfonodos através dos vasos linfáticos. Adaptado de NIH (2007).

2.3.2 Captura dos Antígenos e Apresentação

A apresentação de antígenos, ou sinapse imunológica, é o processo que dispara a imunidade adquirida (BROMLEY *et al.*, 2001; CREUSOT; MITCHISON; TERAZZINI, 2002; DAVIS; DUSTIN, 2004). Após o reconhecimento das células e moléculas da imunidade inata de que está ocorrendo uma invasão, algumas células assumem o papel de APC (principalmente macrófagos e células dendríticas) e viajam até o linfonodo mais próximo da infecção através dos vasos linfáticos levando em seu MHC de classe II uma parte do antígeno para apresentar aos linfócitos T (BRODSKY; GUAGLIARDI, 1991; F; M, 2002). Com o reconhecimento pelo TCR, o linfócito T secreta citocinas que estimulam a proliferação de mais linfócitos T específicos para aquele antígeno que foi reconhecido (GRAKOUÏ *et al.*, 1999). Esse aumento de linfócitos específicos é denominado **expansão clonal**. A partir dessa ativação dos linfócitos T, estes podem se diferenciar em:

- i. linfócitos T efetores ou citotóxicos que migram para o tecido;
- ii. linfócitos T *helper*, permanecendo no linfonodo para ajudar na ativação de linfócitos B;

- iii. linfócitos T de memória, são capazes de se ativar mais rapidamente ao reconhecerem o mesmo antígeno novamente (ABBAS; LICHTMAN, 2010).

Células Dendríticas

As células dendríticas são produzidas na medula óssea e se diferenciam de acordo com a presença de determinadas citocinas (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). Estas células estão presentes nos epitélios, assim como os macrófagos, e na pele também são chamadas de células de Langerhans. Inicialmente são consideradas “imaturas” porque ainda não são capazes de atuar como APC estimulando as células T. As células dendríticas ao se encontrarem com um patógeno podem realizar endocitose¹, que pode ser mediada pelos receptores de membrana que elas expressam ou pinocitose². Junto a produção de citocinas inflamatórias como o TNF pelos macrófagos se tornam *ativadas* e passam a atuar como APC (MELLMAN; STEINMAN, 2001; ABBAS; LICHTMAN, 2010).

Ao se tornarem *ativadas*, as células dendríticas perdem adesão ao epitélio onde estavam localizadas e começam a expressar receptores de superfície específicos para as citocinas quimioatrativas (quimiocinas) produzidas nas zonas de células T dos linfonodos. Dessa forma as células dendríticas são direcionadas para os linfonodos através dos vasos linfáticos onde vão se encontrar com os linfócitos (Figura 14).

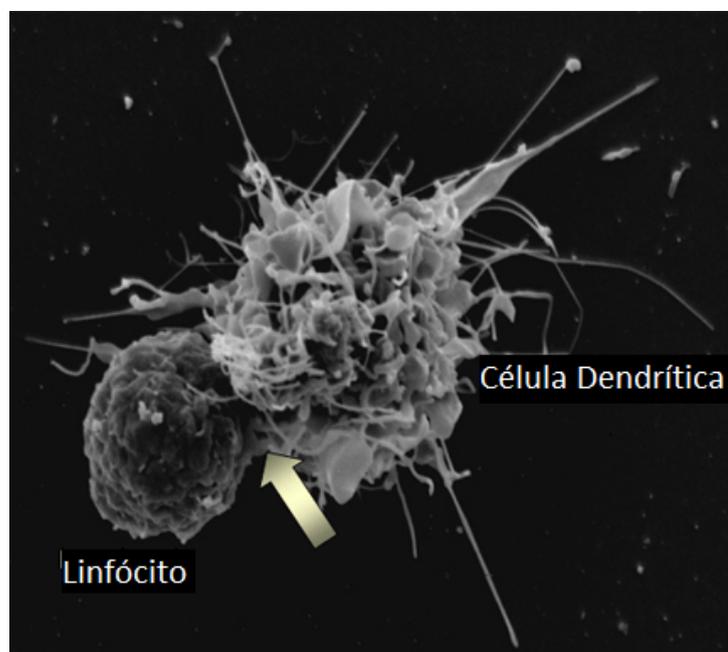


Figura 14 – Célula dendrítica apresentando antígeno a um linfócito. Adaptado de Thompson (2014).

- ¹ Endocitose é o processo pelo qual as células absorvem material extracelular através da membrana.
- ² Pinocitose é o processo pelo qual a célula engloba pequenas partículas extracelulares através de canaliculos que se aprofundam na célula.

Ao migrarem para o linfonodo, se tornam células dendríticas *maduras* capazes de estimular as células T. No linfonodo aguardam o linfócito específico capaz de reconhecer o antígeno que está apresentando (ABBAS; LICHTMAN, 2010).

3 MODELAGEM DO SISTEMA IMUNE: REVISÃO DA LITERATURA

O objetivo deste capítulo é apresentar uma revisão da literatura no que diz respeito à modelagem computacional da resposta imune à doenças infecciosas. Existem várias abordagens e serão descritos os trabalhos que apresentem alguma relação com o presente trabalho. Entre as abordagens estão: modelos baseados em agentes, modelos com autômatos celulares, modelos com equações diferenciais e modelos que utilizam mais de uma abordagem ao mesmo tempo.

3.1 REPRESENTAÇÕES DO SISTEMA IMUNE

Por muitos anos imunidades inata e adquirida foram estudadas como áreas independentes e não relacionadas. Estudiosos da imunidade adquirida estavam preocupados em estudar a produção de anticorpos pelas células B e o reconhecimento das células T, enquanto imunologistas do sistema inato estavam interessados nos mediadores celulares e humorais do sistema inato (FLOWER; TIMMIS, 2010). No entanto, as complexas interações entre ambos têm se tornado mais evidentes e hoje sabe-se que algumas células, como por exemplo os macrófagos e as células dendríticas, são a chave entre os sistemas inato e adaptativo (ROBINS, 2007).

Entre as primeiras formas de representação do sistema imune encontram-se os modelos baseados no conceito de rede imunológica do funcionamento do sistema imune adaptativo, como por exemplo o trabalho proposto por Boer (1988). Este é um modelo de equações diferenciais que considera que os linfócitos T e B são capazes não somente de reconhecer um antígeno, mas também de reconhecer a si mesmos, configurando uma simetria e apresenta a interação com um antígeno, que cresce exponencialmente, em função de um parâmetro representando a afinidade de ocorrência. Outro exemplo é o trabalho de Parisi (1990) que apresenta um modelo de equações diferenciais representando o efeito de estímulo ou supressão de determinados anticorpos.

Perelson e Weisbuch (1997) apresentam uma excelente introdução aos modelos existentes e comentam diferentes tipos de modelos matemáticos que utilizam equações diferenciais ou autômatos celulares até a data de publicação. Assim como Narang *et al.* (2012) que apresentam o estado da arte em representação do sistema imune até 2012.

Outros modelos recentes para representação do sistema imune são apresentados nas subseções a seguir.

3.1.1 Modelos baseados em agentes

A computação baseada em agentes pode ser aplicada nas mais diversas áreas no domínio científico (JENNINGS, 1999; NIAZI; HUSSAIN, 2011). Em um modelo baseado

em agentes, cada variável do problema pode ser representada por uma entidade autônoma - um agente - e, na resposta imune, os agentes podem representar tanto as células quanto as moléculas envolvidas, configurando portanto, um modelo que se mostra bastante apropriado para estudar imunologia (GRILO; CAETANO; ROSA, 2000; JACOB; LITORCO; LEE, 2004; TAY; JHAVAR, 2005; KALITA *et al.*, 2006; DONG *et al.*, 2010).

An e colaboradores desenvolveram uma série de modelos do sistema imune baseados em agentes (AN; LEE, 2001; VODOVOTZ *et al.*, 2004). Em seu trabalho, apresentam uma ferramenta para simular a resposta imune baseada em agentes. O modelo representa a ação dos neutrófilos e células mononucleares a partir de um cenário de inflamação nos capilares considerando um domínio bidimensional sem fluxo direcional. Esse trabalho reforça a ideia de que esse tipo de modelo não tem como objetivo prever o comportamento de um determinado paciente, mas sim ajudar a identificar os possíveis pontos críticos da resposta inflamatória, assim como no presente trabalho.

Vodovotz *et al.* (2004) apresentam um modelo do sistema imune que faz a integração de agentes e EDO. Em seus trabalhos (VODOVOTZ *et al.*, 2004; VODOVOTZ *et al.*, 2005), incluem ainda um modelo de EDO para simular diversos casos da sepse e apresentam uma evolução dos modelos desenvolvidos. Iniciaram o desenvolvimento utilizando apenas um modelo de agentes e passaram a incluir as equações para possibilitar uma análise matemática do modelo. Este também é um dos motivos da escolha por representações utilizando equações diferenciais no presente trabalho. As simulações incluem o combate ao patógeno e o dano causado ao tecido. São consideradas as presenças de citocinas e células T.

Outros trabalhos semelhantes são o de Dong *et al.* (2010), que apresenta um modelo da resposta inflamatória aguda em que os agentes são as moléculas envolvidas; Guo, Sloot e Tay (2008), que considera células e moléculas como agentes; Folcik *et al.* (2011), que considera apenas as células como agentes e Possi *et al.* (2011) que utiliza agentes para estudar doenças autoimunes.

Kirschner (2010) desenvolveu um modelo baseado em agentes para representar uma infecção no tecido pulmonar simulando a formação de um granuloma, estrutura microscópica semelhante a um grânulo que facilita a identificação de algumas doenças crônicas. Ainda no mesmo trabalho apresentou outros dois modelos utilizando equações diferenciais ordinárias: (1) apresentação de antígenos no nível molecular (considera o complexo MHC de classe II) (2) e um modelo epidemiológico da tuberculose considerando a susceptibilidade genética. Tal abordagem configura, portanto, um cenário multi-escala de representação do sistema imune que difere da presente proposta por não apresentar uma integração entre os modelos, que são independentes um do outro.

3.1.2 Modelos com autômatos celulares

Os autômatos celulares são sistemas computacionais geralmente discretos no tempo e no espaço cuja evolução é descrita por interações entre os vizinhos que dependem do estado de cada autômato (WOLFRAM, 1986; WOLFRAM, 2002; CELADA; SEIDEN, 1992).

Alguns modelos utilizam autômatos celulares para estudar a evolução do HIV na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (SANTOS; COUTINHO, 2001; SLOOT; CHEN; BOUCHER, 2002). Santos e Coutinho (2001) definiu um modelo com três fases: (1) resposta primária, (2) período de latência clínica e (3) surgimento da AIDS. Já Slood, Chen e Boucher (2002) complementou essa representação considerando também o tratamento da síndrome em quatro fases (aguda, crônica, respostas do tratamento e surgimento da AIDS) mostrando que mesmo com o tratamento chegam ao mesmo estado de equilíbrio.

O modelo mais conhecido na representação do sistema imune utilizando autômatos celulares é o de Celada e Seiden (1992) que deu origem a uma série de outros trabalhos como, por exemplo:

IMMSIM Puzone *et al.* (2002) incorpora características como a apresentação de antígenos e seleção clonal, que também fazem parte do presente trabalho. No entanto, apresenta interface gráfica e considera ainda outras características que não são consideradas na presente proposta, como restrição por complexo MHC, maturação da resposta e memória.

C-IMMSIM Castiglione e Bernaschi (2004) pode ser considerado tanto como um modelo com autômato celular quanto como um modelo baseado em agentes. É uma continuação do projeto IMMSIM Celada e Seiden (1992), Puzone *et al.* (2002) e considera células e moléculas do sistema imune de um animal vertebrado. As interações representadas são a fagocitose, o processo de ativação, a opsonização, a ação de infecção do vírus e a morte de células que foram infectadas pelo vírus por células citotóxicas. Dentre esses processos, somente o último não é ainda representado pelo presente trabalho. Outra similaridade com a presente proposta é que esse modelo também representa a resposta em regiões anatômicas distintas (medula, timo e linfonodo).

ParImm Bernaschi e Castiglione (2001) é uma versão paralela do simulador IMMSIM que permite simular tanto a resposta celular quanto a humoral e todas as fases da simulação são executadas em paralelo.

SIMMUNE Meier-Schellersheim e Mack (2008) também foi baseado no IMMSIM. Apresenta as células T em três estados: T *naive*, T *killer* e T *helper*. Até o momento

representamos apenas o estado *T helper* que é suficiente para representar a ativação da resposta. No entanto pretende-se estender o modelo proposto no presente trabalho representando também os outros estados.

3.1.3 Modelos com Equações Diferenciais

As Equações Diferenciais tem sido aplicadas na modelagem de diversos fenômenos físicos, são bastante utilizadas para representar a resposta imune sob diferentes aspectos (PERELSON; WEISBUCH, 1997) e são a forma de representação escolhida para o acoplamento proposto no presente trabalho.

Serão apresentados nesta seção os modelos utilizando equações diferenciais ordinárias (EDO), equações diferenciais parciais (EDP) e equações diferenciais com atraso (*Delay Differential Equations* - DDE). Este trabalho utiliza a abreviatura em inglês *DDE* para equações diferenciais com atraso.

3.1.3.1 Modelos utilizando dinâmica de sistemas

A representação utilizando dinâmica de sistemas surgiu para facilitar a compreensão de problemas complexos em diversas áreas (FORRESTER, 1961; FORRESTER, 1969). Alguns trabalhos utilizam dinâmica de sistemas para representação da resposta imune. Entre eles, Wakeland, Macovsky e An (2007) utilizou um modelo de dinâmica de sistemas acoplado a um modelo baseado em agentes para representar uma infecção local.

Knop *et al.* (2012) desenvolveu um modelo para representação da resposta imune inata considerando a presença do LPS. Utilizando uma ferramenta de dinâmica de sistemas, Jynacore (KNOP, 2009), criou uma representação das principais células e moléculas da resposta imune inata humana (KNOP *et al.*, 2012).

3.1.3.2 Equações Diferenciais ordinárias

As equações diferenciais ordinárias (EDO) são equações que dependem de apenas uma variável (BOYCE; DIPRIMA, 2001). São utilizadas para representar, por exemplo, a variação de concentração de uma determinada substância em um ponto específico no tempo.

Entre as diversas representações nos sistemas biológicos, encontra-se um modelo simples para movimento direcionado em um meio unidimensional apresentado por Tranquillo e Lauffenberger, 1987 *apud* Keener e Sneyd (2009), que apresenta um modelo de quimiotaxia para células brancas do sangue.

Um modelo simplificado mais recente (REED *et al.*, 2011) apresenta a interação entre uma bactéria e uma célula fagocítica e inclui análise de estabilidade do modelo proposto. Outro modelo da resposta imune que apresenta uma análise do comportamento

matemático das equações é o apresentado por Barrozo e Yang (2006). Neste trabalho, são apresentadas as dinâmicas do micro-organismo invasor e das células do sistema imune, bem como o equilíbrio ou homeostase das células B e T com produção constante agindo tanto para evitar diminuição quanto aumento ilimitado das células (BARROZO; YANG, 2006).

Miao *et al.* (2010) desenvolveram um modelo que considera a resposta inata nos primeiros cinco dias e a presença da resposta adaptativa a partir do sexto dia até o dia 14 após a infecção pelo vírus da *influenza*. Essa representação considera uma simplificação do seu modelo, excluindo os termos que representam os linfócitos apenas nos cinco primeiros dias, e a partir disso continua a simulação com o modelo completo.

Outro modelo recente que utiliza EDO (MARINO *et al.*, 2010) considera uma representação com dois compartimentos: (1) pulmão, onde ocorre a dinâmica dos macrófagos, sua infecção e morte e (2) linfonodo, onde ocorre a dinâmica dos linfócitos. Os macrófagos são representados de forma semelhante nos dois compartimentos e a dinâmica espacial da inflamação local não é considerada.

3.1.3.3 Equações Diferenciais Parciais

As equações diferenciais parciais (EDP) são equações diferenciais que dependem de mais de uma variável (BOYCE; DIPRIMA, 2001) e podem ser utilizadas, por exemplo, para representar concentrações de uma determinada substância variando no tempo e também no espaço.

O trabalho de Su *et al.* (2009) utiliza equações diferenciais parciais para representar os principais aspectos da resposta imune: (a) reconhecimento de antígenos; (b) resposta imune inata; (c) resposta imune adaptativa; (d) eliminação dos antígenos e solução da resposta imune, e (e) equilíbrio do sistema imune no caso de infecção crônica e formação de granuloma.

O presente trabalho difere do trabalho de Su *et al.* (2009) por não definir um modelo de equações diferenciais parciais, mas por propor o acoplamento de um modelo da resposta inata a um modelo da resposta adaptativa e avaliar os cenários possíveis para um determinado antígeno. Os modelos não precisam necessariamente utilizar a mesma abordagem, por exemplo, pode-se representar a resposta inata utilizando EDP e a resposta adquirida usando EDO (Capítulo 4).

3.1.3.4 Equações Diferenciais com Atraso

As equações diferenciais com atraso (do inglês *Delayed Differential Equations*, DDEs) são uma classe de equações diferenciais que consideram um intervalo de tempo para a ocorrência de um fenômeno (FORDE, 2005). Podem ser definidas como equações

diferenciais ordinárias em que a derivada de alguma incógnita em um determinado instante de tempo depende dos seus valores em instantes de tempo anteriores (KUANG, 2012). Um exemplo do formato de equações com atraso pode ser visto na Equação 3.1 abaixo:

$$\frac{dx}{dt} = f(x(t), x(t - \tau)). \quad (3.1)$$

em que $f(x)$ representa a concentração da variável x no tempo e τ representa um intervalo de tempo, ou atraso.

Recentemente vários modelos de resposta a vírus e bactérias têm surgido utilizando equações com atraso (MARCHUK, 1997; KIM; LEE; LEVY, 2007; PUGLIESI; GANDOLFI, 2008; WU *et al.*, 2008; PENNISI, 2012). Essas equações se mostram bastante interessantes para representar alguns processos biológicos, como por exemplo a expansão clonal das células T, por considerarem o intervalo de tempo para ocorrer o processo.

Em Kim, Lee e Levy (2007) os autores avaliam a regulação da resposta imune e consideram células regulatórias (CD4+ e CD8+), células saudáveis e células infectadas utilizando DDEs.

Pugliesi e Gandolfi (2008) desenvolveram um modelo simples com apenas duas equações (DDEs) representando uma infecção aguda ou crônica. Este trabalho apresenta ainda uma série de análises do comportamento do modelo (PUGLIESI; GANDOLFI, 2008).

DEDiscover (WU *et al.*, 2008) é uma ferramenta de modelagem baseada em equações diferenciais ordinárias e com atraso possibilitando a representação de características da resposta imune. Essa ferramenta possui interface com diagramas e exemplos de modelos para *influenza* e HIV (WU *et al.*, 2008).

Lee *et al.* (2009) consideram a evolução da resposta adaptativa ao vírus da *influenza* e comparam diferentes formas de ativação dos linfócitos B - diretamente pelo vírus ou pela apresentação por outras células. Representam as equações agrupadas em dois compartimentos representando as ações que ocorrem no pulmão e ações que ocorrem no linfonodo.

3.2 INTEGRAÇÃO DAS RESPOSTAS INATA E ADAPTATIVA

O processo de apresentação de antígenos foi representado no nível molecular utilizando EDO apresentadas por Agrawal e Linderman (AGRAWAL; LINDERMAN, 1996).

Kirschner *et al.* (2007) afirmam apresentar o primeiro modelo para representar a resposta imune dependente da apresentação de antígenos em detalhes. É utilizada uma abordagem para integrar informações de diferentes escalas biológicas e temporais para gerar uma representação da apresentação de antígenos via MHC classe II. Este trabalho difere da presente proposta pois aqui consideramos as interações celulares apenas no nível

das células, dependendo de suas concentrações, e não avaliamos quantitativamente o MHC II.

Wakeland, Macovsky e An (2007) adaptam um modelo preexistente baseado em agentes (AN; LEE, 2001), um modelo de equações diferenciais (CLERMONT *et al.*, 2004) e desenvolvem um modelo baseado em dinâmica de sistemas para complementar a resposta imune. Este trabalho reforça os benefícios de utilizar diferentes abordagens no desenvolvimento de modelos por aproveitar as vantagens de cada uma delas. O acoplamento de modelos que propõe, no entanto, difere do proposto neste trabalho por não considerar a evolução espacial da resposta inata no tecido afetado (no modelo de EDO) e por utilizar um modelo de agentes que considera espaço bidimensional e não tridimensional.

3.3 MODELOS DE INFECÇÃO VIRAL

Diversos modelos matemáticos foram desenvolvidos para auxiliar na compreensão das dinâmicas de infecções virais como do vírus causador da AIDS (MIAO *et al.*, 2010; PERELSON, 2002) da Hepatite C (AVENDAÑO *et al.*, 2001; DIXIT, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2012) e Ebola (ZAWILINSKA; KOSZ-VNENCHAK, 2014) com valiosas contribuições (CHATERJEE; GUEDJ; PERELSON, 2012).

Um modelo básico que tem sido utilizado para estudo de infecções causadas por vírus como HIV, HCV e HBV, é mostrado na Figura 15. Esse modelo considera um conjunto de células alvo, suscetíveis à infecção, T, que através da interação com os vírus, V, tornam-se infectadas, I. Assume-se que as células infectadas produzem vírus a uma taxa ρ e morrem com taxa δ . A ação do sistema imune pode ser representada pela limpeza dos vírus no plasma com taxa c (PERELSON, 2002).

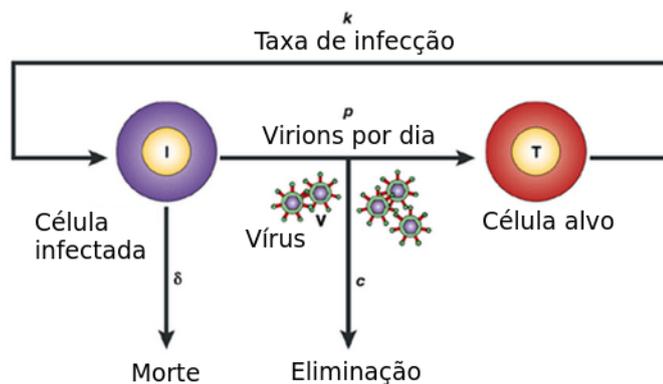


Figura 15 – Modelo básico de infecção viral. Adaptado da referência Perelson (2002).

Os efeitos de terapia para o vírus da hepatite C foram estudados através de uma modificação desse modelo básico para representar a possibilidade de bloquear a infecção de novas células e a liberação de novos vírus pelas células infectadas (DAHARI *et al.*, 2009a).

No entanto, a compreensão das ações dos medicamentos requer o estudo da dinâmica do vírus da hepatite C dentro da célula (Figura 4).

Guedj and Neumann (2010) estenderam o modelo básico de infecção viral incluindo uma nova dimensão para representar o complexo de replicação do material genético do vírus da hepatite C dentro da célula infectada utilizando equações diferenciais ordinárias. Consideraram todas as taxas constantes e representaram os dois filamentos de RNA viral, negativo e positivo, que chamaram, respectivamente, de unidades de replicação e unidades genômicas. Em seu trabalho estudaram efeito de terapia para bloquear a replicação do RNA viral positivo (GUEDJ; NEUMANN, 2010).

Uma abordagem estruturada pela idade da infecção foi apresentada por Nelson *et al.* (2004) para dinâmica do HIV dentro do hospedeiro e foi utilizada também para representar as dinâmicas do HCV (NELSON *et al.*, 2004; GUEDJ *et al.*, 2013; RONG *et al.*, 2013). Modelos baseados na idade do indivíduo são utilizados para estudar epidemiologia de doenças infecciosas, como HIV (THIEME; CASTILLO-CHAVEZ, 1993) e hepatite C (MARTCHEVA; CASTILLO-CHAVEZ, 2003) e também de doenças causadas por bactéria como a tuberculose (CASTILLO-CHAVEZ; FENG, 1997; THIEME; CASTILLO-CHAVEZ, 2002).

Uma das vantagens de utilizar esse tipo de modelagem para populações é a possibilidade de considerar que indivíduos com diferentes idades podem possuir comportamentos distintos (LI; BRAUER, 2008). Utilizar essa abordagem na dinâmica dos vírus no hospedeiro permite uma representação realística da biologia da infecção, onde a produção de novos vírus não ocorre de forma constante, mas aumenta com o acúmulo de complexos de replicação em células infectadas por mais tempo, além de permitir que o decaimento das células infectadas também varie com a idade (NELSON *et al.*, 2004).

Guedj e Neumann (2010) utilizaram a abordagem baseada em idade para representar o modelo multi-escala de infecção e tratamento do vírus da hepatite C em que na escala intracelular apenas um filamento de RNA viral positivo foi considerado para estudar os efeitos de um medicamento contra HCV (daclatasvir). Rong *et al.* (2013) utilizaram o mesmo modelo multi-escala baseado em idade considerando o RNA positivo se replicando dentro da célula infectada para estudar os efeitos de outro medicamento (danoprevir).

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO

Até o presente momento, não foi identificado em nenhum outro trabalho o acoplamento entre modelos da resposta imune inata e da resposta imune adaptativa. Existem vários trabalhos publicados que utilizam mais de uma abordagem na modelagem da resposta imune (CASTIGLIONE; BERNASCHI, 2004; KIRSCHNER *et al.*, 2007; WAKE-

LAND; MACOVSKY; AN, 2007; WU *et al.*, 2008) e que consideram diferentes escalas nesta representação (KIRSCHNER, 2010).

No entanto, o formato proposto neste trabalho é o de representar a resposta inata como um conjunto de equações diferenciais parciais que considera o movimento das células, sua difusão e atração para o local de infecção, liberação de citocinas inflamatórias e posterior migração para o linfonodo, representado por outro conjunto de equações diferenciais (ordinárias). Com essas EDO modelando as concentrações de células e moléculas no linfonodo mais próximo a partir da interação provocada pela apresentação de antígenos, não foi identificado na literatura.

Da mesma forma, ainda não foi encontrado um modelo que apresente a dinâmica intracelular da replicação do RNA viral para infecção por vírus da hepatite C considerando os filamentos positivo e negativo, utilizando uma abordagem multi-escala baseada no tempo desde o início da infecção. Um modelo com essas características permitiria o estudo dos efeitos de medicamentos aprovados recentemente para tratamento da hepatite C, através da compreensão de sua ação nos dois filamentos de RNA viral considerando diferentes tempos de infecção.

O estudo do comportamento do modelo matemático é uma das vantagens de se optar pela representação utilizando equações diferenciais.

4 MÉTODOS

Como a proposta do presente trabalho é obter uma representação de diferentes aspectos da resposta imune a doenças infecciosas através do acoplamento de modelos computacionais, faz-se necessária a apresentação dos modelos envolvidos. Dois exemplos de acoplamento foram desenvolvidos: (1) modelo espaço-temporal de infecção da bactéria *S. aureus* no pulmão afetado pelo vírus da gripe; (2) modelo multi-escala das dinâmicas do vírus da hepatite C (HCV) baseado no tempo de infecção. Nos dois casos foram acoplados modelos de Equações Diferenciais (EDO e EDP).

4.1 BACTÉRIA (*S. aureus*)

Nesta seção são descritos: (a) uma simplificação de um modelo do sistema imune inato (PIGOZZO *et al.*, 2011) que representa o comportamento das células que formam a primeira defesa contra um antígeno (LPS). Este modelo considera aspectos como concentração das células e seu deslocamento no tecido; (b) uma simplificação de um modelo da resposta adquirida formada após a chegada de uma bactéria (*S. aureus*) aos alvéolos pulmonares, considerando apenas a variação nas concentrações das populações de células de defesa específica nos linfonodos (MARCHUK, 1997). Ambos os modelos foram simplificados e adaptados para representar uma resposta imune a um antígeno que se multiplica e se difunde no tecido. Será apresentado o acoplamento entre os dois modelos e os métodos que foram empregados neste desenvolvimento.

4.1.1 Modelo da Resposta Inata

A resposta imune inata humana foi representada por Pigozzo *et al.* (2011) considerando as interações entre uma das principais células de defesa da resposta inata (macrófagos) e um lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana celular de bactérias do tipo gram-negativas.

Neste modelo, os macrófagos atuam reconhecendo a presença do invasor, movimentando-se em direção ao mesmo e realizando a fagocitose (processo descrito na Subseção 2.1.2). Após o contato com o antígeno, o macrófago deixa seu estado inicial e se torna um macrófago *ativado*. Um macrófago ativado se torna mais hábil e passa a atuar também como um sinalizador de que algo estranho está acontecendo, liberando citocinas pró-inflamatórias e aumentando a expressão de MHC-II (HANADA; YOSHIMURA, 2002; HEYDTMANN, 2009; SOMPAYRAC, 2008). Esse processo está representado na Figura 16.

O modelo escolhido (PIGOZZO *et al.*, 2011) foi estendido para representar outra função dos macrófagos que é a de célula apresentadora de antígenos (APC) que migra para o linfonodo (LN) mais próximo, exibindo parte do antígeno que reconheceu. A

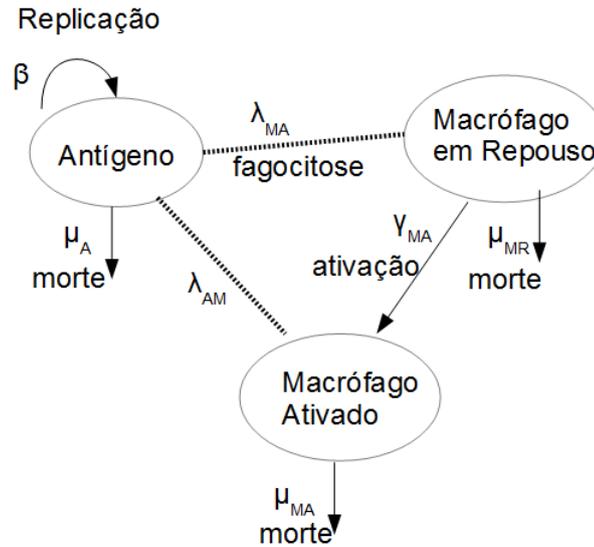


Figura 16 – Esquema representativo do modelo do sistema inato simplificado. Percebendo antígenos no tecido, os macrófagos no estado de repouso tornam-se ativados e ambos realizam fagocitose a taxas distintas.

apresentação de antígenos ou sinapse imunológica é uma característica da ligação entre a resposta inata e adaptativa e, portanto, foi adicionada para o acoplamento entre os modelos.

Modelo matemático da resposta inata no tecido

As equações diferenciais parciais do modelo original podem ser encontradas na dissertação de mestrado de Pigozzo (2011) e, portanto não serão detalhadas no escopo deste trabalho. Apresentaremos, no entanto, as variáveis do modelo de Pigozzo *et al.* (2011) que foram utilizadas para o acoplamento de modelos, que são as seguintes:

- Antígenos, $A(\vec{x}, t)$
- Macrófagos em repouso, $M_R(\vec{x}, t)$
- Macrófagos ativados, $M_A(\vec{x}, t)$

em que $\vec{x} = (x, y, z) \in \Omega$ e $t \in [0, T]$. Os modelos acoplados serão descritos na subseção 4.1.3.

As equações apresentadas representam a entrada de antígenos no tecido e seu reconhecimento inicial por células do tipo macrófago em estado repouso que se ativam com o contato. Não foram considerados nessa simplificação outras células de defesa inata como os neutrófilos. Outra característica presente no modelo escolhido (PIGOZZO *et al.*, 2011) é a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células de defesa.

Neste primeiro momento essas simplificações foram adotadas para focar no acoplamento entre os dois modelos. Os modelos acoplados se encontram na subseção 4.1.3.

Antígeno, $A(\vec{x}, t)$

A Equação (4.1) modela o comportamento do antígeno. O primeiro termo da Equação (4.1) indica que o antígeno pode se replicar a uma taxa β . O segundo termo mostra que o antígeno sofre morte natural a uma taxa μ_A . A fagocitose dada pelo encontro com macrófagos está representada nos termos 3 e 4 em que λ_{MA} é a taxa na qual macrófagos inicialmente em repouso fagocitam os antígenos e λ_{AM} é a taxa de destruição dos antígenos por macrófagos ativados.

$$\begin{cases} \frac{\partial}{\partial t} A(\vec{x}, t) = \beta A(\vec{x}, t) - \mu_A A(\vec{x}, t) - \lambda_{MA} M_R(\vec{x}, t) A(\vec{x}, t) \\ \quad - \lambda_{AM} A(\vec{x}, t) M_A(\vec{x}, t) + D_A \Delta A(\vec{x}, t), \\ A(x_0, y_0, z_0, 0) = A_0(\vec{x}), \nabla A(\vec{x}, t) \cdot \vec{\eta} = 0, \text{ em } \partial\Omega. \end{cases} \quad (4.1)$$

O último termo da Equação (4.1) representa a difusão do antígeno no tecido em que D_A é o coeficiente de difusão do antígeno e Ω representa o domínio tridimensional e $\vec{\eta}$ é a normal do contorno do domínio ($\partial\Omega$).

Macrófagos, $M_R(\vec{x}, t)$, $M_A(\vec{x}, t)$

Neste modelo, os macrófagos são representados em dois estados distintos: repouso (M_R) e ativados (M_A). Inicialmente, existem somente macrófagos em repouso no tecido. Após o contato com antígenos, estes se tornam ativados e passam a realizar fagocitose mais rapidamente.

A Equação (4.2) representa a concentração dos macrófagos em repouso no tecido. O primeiro termo representa a morte natural com taxa μ_{MR} . O segundo termo representa a ativação após o contato com o antígeno ($A(\vec{x}, t)$) considerando uma taxa γ_{MA} . O último termo representa a difusão dos macrófagos em repouso com coeficiente D_{MR} .

$$\begin{cases} \frac{\partial}{\partial t} M_R(\vec{x}, t) = -\mu_{MR} M_R(\vec{x}, t) - \gamma_{MA} M_R(\vec{x}, t) A(\vec{x}, t) + D_{MR} \Delta M_R(\vec{x}, t), \\ M_R(\vec{x}, 0) = MR_0(\vec{x}), \nabla M_R(\vec{x}, t) \cdot \vec{\eta} = 0, \text{ em } \partial\Omega \end{cases} \quad (4.2)$$

Já a Equação (4.3), representa a concentração de macrófagos ativados no tecido após o reconhecimento de antígenos. Novamente, o primeiro termo modela o decaimento natural com taxa μ_{MA} , o segundo termo modela a ativação com taxa γ_{MA} , e o terceiro termo da Equação (4.3) representa a difusão dos macrófagos ativados com coeficiente D_{MA} . No instante inicial não existem macrófagos ativados no tecido.

$$\begin{cases} \frac{\partial}{\partial t} M_A(\vec{x}, t) = -\mu_{MA} M_A(\vec{x}, t) + \gamma_{MA} M_R(\vec{x}, t) A(\vec{x}, t) + D_{MA} \Delta M_A(\vec{x}, t), \\ M_A(\vec{x}, 0) = MA_0(\vec{x}), \nabla M_A(\vec{x}, t) \cdot \vec{\eta} = 0, \text{ em } \partial\Omega. \end{cases} \quad (4.3)$$

4.1.2 Modelo da Resposta Adquirida

A resposta imune adquirida foi representada pela atuação das células B produzindo anticorpos específicos para combater o invasor identificado na apresentação. Neste modelo, são consideradas as concentrações de células nos LNs mais próximos ao local da inflamação, onde ocorre a apresentação de antígenos, e dos anticorpos produzidos que migram para o local da inflamação seguindo o gradiente de concentração dos antígenos reconhecidos. São representados os estágios de expansão clonal do linfócito T e transformação dos linfócitos B em células do plasma, especialistas na produção em massa de anticorpos específicos para o antígeno reconhecido (Subseção 2.2).

A Figura 17 mostra uma representação do modelo da resposta adquirida.

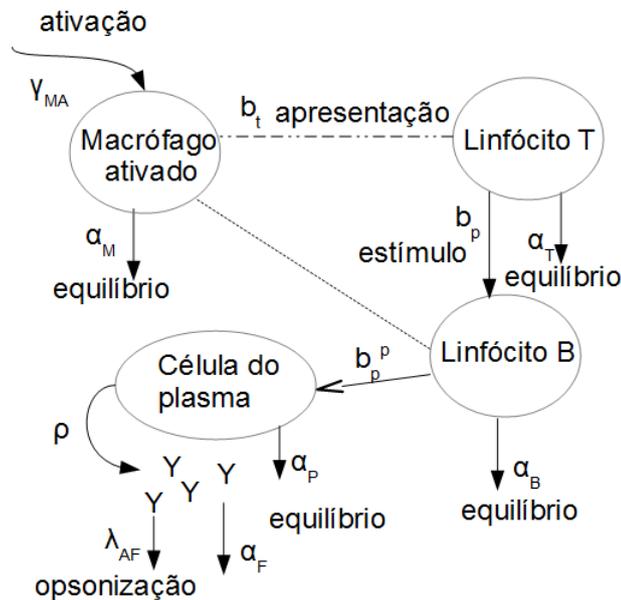


Figura 17 – Esquema representativo do modelo da resposta imune adquirida simplificado. Macrófagos já ativados migram para o LN e apresentam os antígenos para os linfócitos. A ativação dos linfócitos B os transformam em células do plasma que produzem anticorpos em massa.

Modelo matemático da resposta adquirida no linfonodo

Originalmente, algumas das equações do modelo utilizado para representar a resposta adquirida (MARCHUK, 1997) foram representadas considerando o atraso (DDE) e estas foram simplificadas para serem representadas como EDO por simplificar a implementação dos métodos de resolução. As equações originais bem como os parâmetros utilizados como referência podem ser encontrados em Marchuk (1997). Serão apresentadas a seguir as equações simplificadas do modelo original. Nesta simplificação, além de não considerar o atraso, não estamos considerando o dano causado ao tecido que pode ser incorporado ao modelo local futuramente para que seja possível gerar uma visualização

espacial deste dano (EDP). No modelo da referência Marchuk (1997) o antígeno representado é a bactéria *S. aureus* e os parâmetros foram estimados de forma a representar as dinâmicas das células de defesa específica em um linfonodo durante uma infecção no pulmão afetado pela ação do vírus da gripe.

Neste trabalho serão apresentadas as equações que representam as seguintes variáveis:

- Antígenos, $A(t)$
- Macrófagos ativados, $M_A(t)$
- Linfócitos T, $T(t)$
- Linfócitos B, $B(t)$
- Células do Plasma, $P(t)$
- Anticorpos, $F(t)$

em que $t \in [0, T]$.

As equações modificadas com a explicação das alterações realizadas para o acoplamento se encontram na subseção 4.1.3.

Antígeno, $A(t)$

No modelo da referência (MARCHUK, 1997) o antígeno é considerado como uma bactéria que se multiplica a uma taxa β e é consumida pela fagocitose a uma taxa λ_{AM} . Há ainda o consumo devido a opsonização da bactéria com taxa λ_{AF} . A Equação (4.4) retrata esse comportamento.

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}A(t) = \beta A(t) - \lambda_{AM}A(t)M(t) - \lambda_{AF}A(t)F(t), \\ A(t_0) = A_0. \end{cases} \quad (4.4)$$

em que M representa as células fagocíticas (macrófagos) e F representa os anticorpos.

Macrófagos, $M(t)$

Os macrófagos são representados nesse modelo como células que realizam fagocitose dos antígenos e se ativam com esse encontro. A Equação (4.5) representa os macrófagos e sua ativação com o contato com os antígenos, que ocorre a uma taxa γ_{MA} e possui decaimento natural de α_M .

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}M(t) = \gamma_{MA}M(t)A(t) - \alpha_M M(t), \\ M(t_0) = M_0. \end{cases} \quad (4.5)$$

Linfócitos T, $T(t)$

Os linfócitos T-*helper* são estimulados pelos macrófagos ativados no LN e desempenham um papel importante no estímulo dos linfócitos-B para se tornarem células do plasma - especialistas em produção de anticorpos específicos.

O primeiro termo da Equação (4.6) representa a ativação de células Th que se diferenciam e expandem sua população no LN. A taxa para ocorrência dessa ativação é b_T e o número de descendentes produzidos em cada divisão celular é dado pelo coeficiente ρ_T .

O segundo termo da Equação (4.6) representa o quanto de linfócitos-T são necessários para estimular os linfócitos-B com taxa b_p . O último termo controla a concentração de células T para que se mantenha um equilíbrio. O coeficiente α_T representa a taxa de decaimento natural dos linfócitos para manutenção do equilíbrio.

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}T(t) = b_T T(t)M(t) (\rho_T - 1) - b_p M(t)T(t)B(t) + \alpha_T (T^* - T(t)) , \\ T(t_0) = T^* . \end{cases} \quad (4.6)$$

em que T^* é o valor da concentração de células T-*helper* no estado de equilíbrio.

Linfócitos B, $B(t)$

Após o estímulo dos linfócitos B pelas células T e macrófagos, elas se proliferam e se transformam em células do plasma. A proliferação está representada pelo primeiro termo da Equação (4.7) em que b_p^b é a taxa para estímulo das células B e ρ_B é o número de novas células produzidas.

O segundo termo representa a manutenção da homeostase na ausência de estímulo antigênico e o coeficiente α_B representa uma taxa de decaimento natural das células B caso seja maior que a concentração necessária para a manutenção do equilíbrio.

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}B(t) = b_p^b (\rho_B T(t)M(t) - T(t)M(t)B(t)) + \alpha_B (B^* - B(t)) , \\ B(t_0) = B^* . \end{cases} \quad (4.7)$$

em que B^* é a concentração de células B no estado de equilíbrio.

Células do Plasma, $P(t)$

As células do plasma são produzidas pelo estímulo das células B pelas células T e macrófagos. São responsáveis pela produção em massa de anticorpos específicos ao antígeno que foi apresentado.

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}P = b_p^p (\rho_P T(t)M(t)B(t)) + \alpha_P (P^* - P(t)) , \\ P(t_0) = P^* . \end{cases} \quad (4.8)$$

O primeiro termo da Equação (4.8) descreve a geração e maturação das células do plasma, em que b_p^p é a taxa de estímulo das células do plasma e ρ_P é o número de novas células do plasma. O último termo representa a manutenção do equilíbrio, em que P^* é a concentração de P no estado de equilíbrio e α_P representa a taxa de decaimento natural de células do plasma para manutenção do equilíbrio.

Anticorpos, $F^L(t)$

Os anticorpos liberados pelas células do plasma no LN são representados pela Equação (4.9):

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}F^L(t) = \rho_F P(t) - \lambda_{AF} A(t)F(t) + \alpha_F(F^* - F(t)), \\ F(t_0) = F^*. \end{cases} \quad (4.9)$$

em que o primeiro termo representa a produção de anticorpos pelas células do plasma com taxa ρ_F , o segundo representa o decaimento pela opsonização e o terceiro representa a homeostase do anticorpo.

4.1.3 Acoplamento dos Modelos (*S. aureus*)

Para a integração dos modelos, foi considerado como ponto principal a apresentação de antígenos no linfonodo. Após a identificação de uma invasão, os macrófagos que foram ativados pelo contato com o antígeno são drenados para o LN mais próximo ao local de infecção através dos vasos linfáticos (Figura 18). Chegando ao LN, os macrófagos no estado ativado apresentam o antígeno para os linfócitos e ativam a resposta adquirida (Figura 19). O resultado dessa ativação é a produção em massa de anticorpos específicos, que migram para o local de infecção para opsonizar os antígenos, o que significa que os anticorpos marcam os antígenos para serem mais facilmente fagocitados pelos macrófagos (opsonização), além de impedirem que os antígenos liberem toxinas ou se repliquem (Figura 20).

A produção em massa de anticorpos é um processo lento que depende de uma cascata de ativações dos linfócitos e pode demorar alguns dias para que os primeiros anticorpos apareçam no local onde ocorreu a invasão. Com a chegada dos anticorpos, os antígenos opsonizados são impedidos de realizar qualquer atividade e são eliminados pelos macrófagos.

Equações Modificadas para o Modelo Acoplado

Na sequência são apresentadas as equações diferenciais ordinárias e parciais modificadas para o acoplamento. Os parâmetros utilizados nas simulações desse modelo estão descritos nas Tabelas 7, 8 e 9 no Apêndice A. Os elementos representados no modelo completo acoplado são apresentados de forma resumida abaixo e em detalhe na sequência:

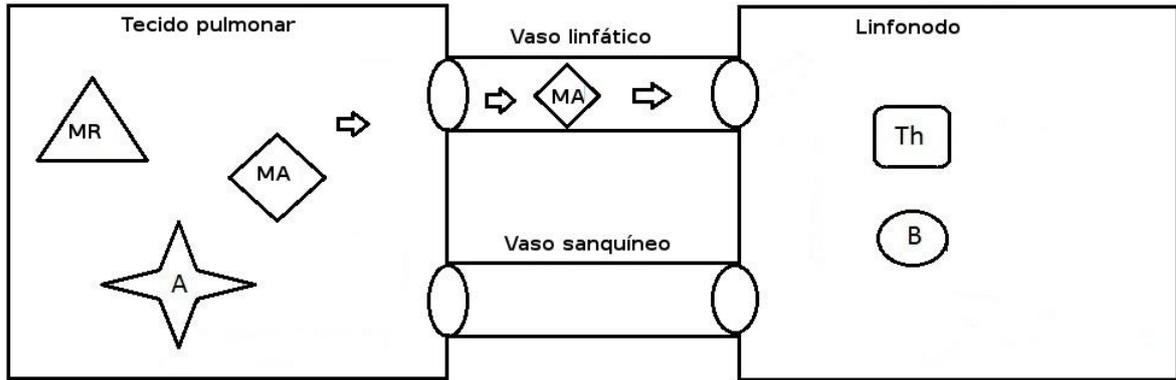


Figura 18 – Ativação de macrófagos. Símbolos: MR - macrófago em repouso, MA - macrófago ativado, A - antígeno, Th - linfócito T *helper* e B - linfócito B. Percebendo a presença de antígenos no tecido, os macrófagos no estado de repouso se ativam e migram para o LN mais próximo.

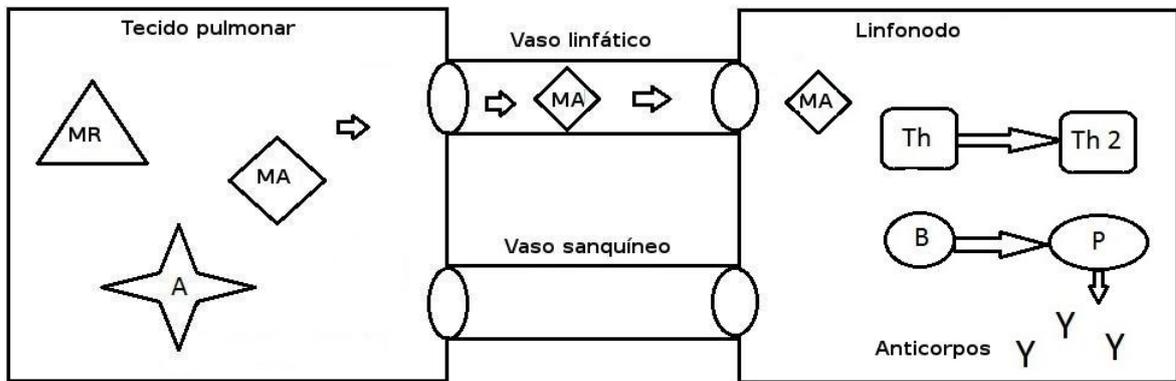


Figura 19 – Apresentação de antígenos. Símbolos: MR - macrófago em repouso, MA - macrófago ativado, A - antígeno, Th - linfócito T *helper*, B - linfócito B, P - células do Plasma e Y - anticorpos. Macrófagos ativados chegam ao LN e disparam uma cadeia de ativação que culmina na produção de anticorpos.

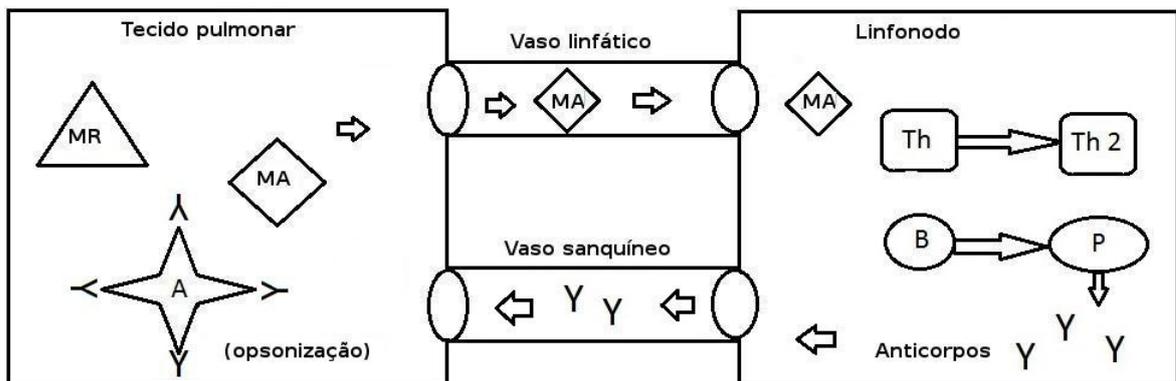


Figura 20 – Osonização do antígeno. Símbolos: MR - macrófago em repouso, MA - macrófago ativado, A - antígeno, Th - linfócito T *helper*, B - linfócito B, P - células do Plasma e Y - anticorpos. Os anticorpos, produzidos para combater o antígeno que foi reconhecido, migram para o local da inflamação através dos vasos sanguíneos e marcam o antígeno para posterior eliminação pelas células da resposta inata.

Variáveis do modelo local da resposta inata (EDP):

- Antígenos, $A(\vec{x}, t)$.
- Macrófagos em repouso, $M_R(\vec{x}, t)$.
- Macrófagos ativados, $M_A(\vec{x}, t)$.
- Anticorpos, $F(\vec{x}, t)$.

Variáveis do modelo sistêmico da resposta adquirida (EDO):

- Macrófagos ativados, $M_A^L(t)$.
- Linfócitos T, $T(t)$.
- Linfócitos B, $B(t)$.
- Células do plasma, $P(t)$.
- Anticorpos, $F^L(t)$.

em que $\vec{x} = (x, y, z) \in \Omega$ e $t \in [0, T]$.

Antígenos, $A(\vec{x}, t)$

A Equação (4.10) modela o comportamento do antígeno que pode se difundir e multiplicar no tecido. O primeiro termo da Equação (4.10) representa que antígeno pode se replicar a uma taxa β com crescimento logístico para representar uma limitação de recursos com número máximo de antígenos por ponto discretizado igual a k_A . O segundo termo representa que o antígeno morre naturalmente com taxa μ_A . A fagocitose dada pelo encontro com macrófagos está representada nos termos 3 e 4 em que λ_{MA} é a taxa na qual macrófagos inicialmente em repouso fagocitam os antígenos e λ_{MA} é a taxa de destruição dos antígenos por macrófagos ativados.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial}{\partial t} A(\vec{x}, t) = \beta \left(1 - \frac{A(\vec{x}, t)}{k_A} \right) A(\vec{x}, t) - \mu_A A(\vec{x}, t) - \lambda_{MA} M_R(\vec{x}, t) A(\vec{x}, t) \\ \quad - \lambda_{AM} A(\vec{x}, t) M_A(\vec{x}, t) - \lambda_{AF|MR} A(\vec{x}, t) F(\vec{x}, t) M_R(\vec{x}, t) \\ \quad - \lambda_{AF|MA} A(\vec{x}, t) F(\vec{x}, t) M_A(\vec{x}, t) + D_A \Delta A(\vec{x}, t), \\ A(x_0, y_0, z_0, 0) = A_0(\vec{x}), \nabla A(\vec{x}, t) \cdot \vec{n} = 0, \text{ em } \partial\Omega. \end{array} \right. \quad (4.10)$$

O processo de opsonização para posterior fagocitose está representado no quinto e sexto termos da Equação (4.10). $\lambda_{AF|MR}$ representa a taxa de fagocitose do antígeno opsonizado por macrófagos em repouso e $\lambda_{AF|MA}$ representa a taxa de fagocitose de antígenos opsonizados por macrófagos ativados. A variável $F(\vec{x}, t)$ não existia no modelo da

resposta inata (PIGOZZO *et al.*, 2011) e foi introduzida com o acoplamento para representar a quantidade de anticorpos presentes no tecido. Essa quantidade é modelada pela Equação (4.20) que é uma parte essencial do presente acoplamento de modelos.

O último termo da Equação (4.10) representa a difusão do antígeno no tecido em que D_A é o coeficiente de difusão do antígeno.

Macrófagos, $M_R(\vec{x}, t)$, $M_A(\vec{x}, t)$, $M_A^T(t)$, $M_A^L(t)$

Neste modelo, os macrófagos são representados em dois estados distintos: repouso (M_R) e ativados (M_A), como já foi utilizado no modelo da resposta imune inata da referência Pigozzo *et al.* (2011). Inicialmente, existem somente macrófagos em repouso no tecido. Após o contato com os antígenos, estes se tornam ativados e passam a desempenhar um papel essencial no início da resposta adquirida. Os macrófagos ativados atuam como APCs, migrando em direção ao LN mais próximo, modificação possível com o acoplamento ao modelo da resposta adquirida.

A Equação (4.11) representa a concentração dos macrófagos em repouso no tecido. O primeiro termo representa a morte natural com taxa μ_{MR} . O segundo termo representa a ativação após o contato com o antígeno ($A(\vec{x}, t)$) considerando uma taxa γ_{MA} . O terceiro termo representa a difusão dos macrófagos em repouso com coeficiente D_{MR} e o último termo representa uma fonte de macrófagos em estado de repouso chegando ao tecido com taxa de migração α_{MR} .

$$\begin{cases} \frac{\partial}{\partial t} M_R(\vec{x}, t) = -\mu_{MR} M_R(\vec{x}, t) - \gamma_{MA} M_R(\vec{x}, t) A(\vec{x}, t) + D_{MR} \Delta M_R(\vec{x}, t) \\ \quad + \alpha_{MR} (M_R^* - M_R(\vec{x}, t)), \\ M_R(\vec{x}, 0) = M_{R_0}(\vec{x}), \nabla M_R(\vec{x}, t) \cdot \vec{\eta} = 0, \text{ em } \partial\Omega. \end{cases} \quad (4.11)$$

Já a Equação (4.12) representa a concentração de macrófagos ativados no tecido após o reconhecimento de antígenos e sua posterior migração para o LN. O primeiro termo modela o decaimento natural com taxa μ_{MA} , o segundo termo modela a ativação com taxa γ_{MA} , e o terceiro termo da Equação (4.12) representa a difusão dos macrófagos ativados com coeficiente D_{MA} .

$$\begin{cases} \frac{\partial}{\partial t} M_A(\vec{x}, t) = -\mu_{MA} M_A(\vec{x}, t) + \gamma_{MA} M_R(\vec{x}, t) A(\vec{x}, t) + D_{MA} \Delta M_A(\vec{x}, t) \\ \quad - \alpha_{MA} (M_A(\vec{x}, t) - M_A^L(t)), \\ M_A(\vec{x}, 0) = M_{A_0}(\vec{x}), \nabla M_A(\vec{x}, t) \cdot \vec{\eta} = 0, \text{ em } \partial\Omega. \end{cases} \quad (4.12)$$

O último termo da Equação (4.12) representa a conexão entre os macrófagos ativados no tecido e a concentração de macrófagos ativados que migram para o LN mais próximo como APCs. Este termo modela o fluxo de M_A migrando do tecido para o LN via vasos linfáticos com taxa α_{MA} e foi inserido com o acoplamento.

M_A^L representa a concentração de macrófagos ativados no linfonodo e está descrita na Equação (4.13). Esta é uma modificação da Equação (4.5) do modelo da referência Marchuk (1997). Esta modificação foi realizada para implementação do acoplamento dos modelos devido à ação dos macrófagos ativados como células apresentadoras de antígenos que migram do tecido para o linfonodo.

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}M_A^L(t) = \alpha_M \left(M_A^T(t) - M_A^L(t) \frac{V_{LN}}{V_{LV}} \right), \\ M_A^L(0) = 0 \end{cases} \quad (4.13)$$

em que V_{LN} é o volume do linfonodo e V_{LV} é o volume das áreas do domínio que estão em contato com os vasos linfáticos que é calculada através da integral abaixo:

$$V_{LV} = \int_{\Omega} \theta_{LV}(\vec{x}) d\Omega, \quad (4.14)$$

em que Ω é o domínio e $\theta_{LV}(\vec{x})$ é uma função que define quais as áreas do domínio estão em contato com os vasos sanguíneos, sendo que para cada ponto do domínio, $\theta_{LV}(\vec{x}_i)$ pode ser igual a 1 caso esteja em contato com um vaso sanguíneo e igual a 0 caso contrário.

A concentração média de macrófagos ativos no tecido (M_A^T) é calculada pela integração dos valores representados pela Equação (4.12) no domínio da simulação. Essa integração está descrita na Equação (4.15), abaixo:

$$M_A^T(t) = \frac{1}{V_{LV}} \int_{\Omega} \theta_{LV}(\vec{x}) M_A(\vec{x}) d\Omega, \quad (4.15)$$

em que Ω representa o domínio e V_{LV} representa o volume das áreas do domínio que estão em contato com os vasos linfáticos, Eq. (4.14).

Assumiu-se nas simulações realizadas que o volume do linfonodo, V_{LN} é aproximadamente igual ao volume das áreas em contato com os vasos linfáticos, V_{LV} .

Linfócitos T, $T(t)$

A Equação (4.6) foi modificada para incluir a concentração dos macrófagos no LN dada pela Equação (4.13). A alteração realizada na representação dos linfócitos T foi a utilização da variável $M_A^L(t)$ ao invés de $M(t)$, como pode ser visto na Equação (4.16).

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}T(t) = b_T T(t) M_A^L(t) (\rho_T - 1) - b_p M_A^L(t) T(t) B(t) + \alpha_T (T^* - T(t)) , \\ T(0) = T^*. \end{cases} \quad (4.16)$$

Linfócitos B, $B(t)$

Assim como foi realizado para os linfócitos-T, a Equação (4.7) foi modificada apenas pela substituição da variável M por $M_A^L(t)$ conforme descrito na Equação (4.17) a seguir:

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}B(t) = b_p^b \left(\rho_B T(t) M_A^L(t) - T(t) M_A^L(t) B(t) \right) + \alpha_B (B^* - B(t)), \\ B(0) = B^*. \end{cases} \quad (4.17)$$

Células do Plasma, $P(t)$

As células do plasma também são representadas da mesma forma que na Equação (4.8), modificando-se apenas a variável que representa a concentração dos macrófagos. A Equação (4.18) mostra a substituição pela variável $M_A^L(t)$.

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}P(t) = b_p^p \left(\rho_P T(t) M_A^L(t) B(t) \right) + \alpha_P (P^* - P(t)), \\ P(0) = P^*. \end{cases} \quad (4.18)$$

Anticorpos, $F(\vec{x}, t)$, $F_L(t)$

De modo inverso aos macrófagos, que migram do tecido para o LN através dos vasos linfáticos, os anticorpos são produzidos no LN e migram para o tecido através dos vasos sanguíneos (Figura 20). Os anticorpos são portanto, outra parte essencial para o acoplamento entre os modelos pois, assim como os macrófagos, podem existir nos dois domínios. Precisamos representá-los tanto sendo produzidos no LN como também no tecido, se difundindo em direção aos antígenos.

A Equação (4.19) representa os anticorpos sendo produzidos no LN pelas células do plasma. A variável foi renomeada para $F^L(t)$ para se distinguir da representação dos anticorpos no tecido, $F(\vec{x}, t)$, que também será descrita a seguir.

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}F^L(t) = \rho_F P(t) + \alpha_F (F^T(t) - F^L(t) \frac{V_{BV}}{V_{LN}}), \\ F^L(0) = F^*, \end{cases} \quad (4.19)$$

em que o primeiro termo descreve a produção dos anticorpos com taxa ρ_F e o último termo representa o fluxo de anticorpos entre os dois compartimentos, tecido e linfonodo, com taxa α_F . $F^T(t)$ é o número médio de anticorpos no tecido calculado pela Equação (4.20):

$$F^T(t) = \frac{1}{V_{BV}} \int_{\Omega} \theta_{BV}(\vec{x}) F(\vec{x}) d\Omega, \quad (4.20)$$

em que Ω é o domínio do tecido e V_{BV} representa o volume das áreas em contato com os vasos sanguíneos na discretização e $\theta_{BV}(\vec{x})$ é uma função que define quais as áreas do domínio estão em contato com os vasos sanguíneos, sendo que para cada ponto do domínio pode ser igual a 1 caso esteja em contato com um vaso sanguíneo e igual a 0 caso

contrário. F representa as quantidades de anticorpos no domínio do tecido representada pela Equação (4.21). Assumiu-se nas simulações realizadas que o volume do linfonodo, V_{LN} é aproximadamente igual ao volume das áreas em contato com os vasos sanguíneos, V_{BV} .

A Equação (4.21) descreve o comportamento dos anticorpos no tecido. Os dois primeiros termos representam o consumo de anticorpos para destruir o antígeno no processo de opsonização com taxas $\lambda_{FA|MR}$ e $\lambda_{FA|MA}$. O terceiro termo modela o processo de difusão dos anticorpos no tecido com coeficiente de difusão D_F e o último termo descreve o fluxo de anticorpos entre o LN e o tecido com taxa α_F , em que a variável F^L representa a concentração de anticorpos liberados pelas células do plasma no LN, Equação (4.19).

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial}{\partial t} F(\vec{x}, t) = -\lambda_{FA|MR} F(\vec{x}, t) A(\vec{x}, t) M_R(\vec{x}, t) - \lambda_{FA|MA} F(\vec{x}, t) A(\vec{x}, t) M_A(\vec{x}, t) \\ \quad + D_F \Delta F(\vec{x}, t) - \alpha_F (F(\vec{x}, t) - F^L(t)) \quad , \\ F(\vec{x}, 0) = F_0, \quad \nabla F(\vec{x}, t) \cdot \vec{n} = 0, \quad \text{em } \partial\Omega. \end{array} \right. \quad (4.21)$$

O último termo da Equação (4.21) foi inserido como parte do acoplamento entre os modelos para que houvesse conexão entre os anticorpos liberados no LN e sua chegada no tecido através dos vasos sanguíneos.

4.1.3.1 Análise de Sensibilidade do Modelo Acoplado

A análise de sensibilidade dos parâmetros de um modelo pode ser utilizada para ajudar a avaliar como o modelo responde a mudanças em um ou mais parâmetros de entrada. De forma geral, a validação do modelo envolve comparações de resultados com observações independentes do sistema que está sendo representado, o que nem sempre é possível de se conseguir. Dessa forma, a análise de sensibilidade pode ser utilizada para compreender o comportamento do modelo e alcançar uma posição confortável em termos de resultados qualitativos (FREY; PATIL, 2002).

Existem várias formas de realizar essa análise e foi escolhido nesse trabalho a abordagem que varia um parâmetro de cada vez (OAT, *one factor at a time* em inglês), que é a estratégia mais utilizada (SALTELLI *et al.*, 2006). A análise de sensibilidade do modelo acoplado foi realizada considerando-se o cenário de infecção durante 30 dias em um domínio cúbico de 10 mm de lado. Cada parâmetro foi variado de -100% a $+200\%$, um de cada vez, mantendo-se os outros parâmetros constantes.

A diferença entre a solução com os parâmetros base e a solução variando-se um parâmetro foi calculada aplicando a Equação (4.22) a cada parâmetro:

$$Max_{dif} = MAX_k \left(\frac{\sqrt{\sum_{i=0}^N (V_{orig}(i) - V_k(i))^2}}{\sqrt{\sum_{i=0}^N (V_{orig})^2}} \right) \quad , \quad (4.22)$$

em que k é um índice que representa a variação do mesmo parâmetro. V_{orig} é a distribuição da variável escolhida no tempo usando o conjunto original de parâmetros. V_k representa cada distribuição da variável no tempo com a variação de um parâmetro de cada vez e N é o número de passos de tempo utilizado.

Dessa forma, temos uma diferença máxima (Max_{dif}) para cada parâmetro que possibilita compreender o quanto os resultados obtidos com o modelo acoplado são sensíveis à variação de cada parâmetro. A Tabela 1 mostra os parâmetros com uma breve descrição e o valor de diferença máxima calculado (Max_{dif}) escolhendo como variável a média da concentração de antígenos no tecido por ser esta uma indicação do comportamento da resposta a infecção.

Tabela 1 – Análise de sensibilidade - parâmetros escolhidos, descrição e valor máximo da diferença entre a solução com parâmetros base e modificando apenas um parâmetro por vez.

Parâmetro	Descrição	Max_{dif}
γ_{AM}	Taxa de ativação de macrófagos	6.47
α_F	Taxa de migração de anticorpos	6.36
MR_0	Condição inicial de macrófagos em repouso	6.17
β_A	Taxa de replicação de antígenos	5.67
ρ_F	Taxa de exportação de antígenos	5.15
k_A	Coefficiente de capacidade de carregamento de antígenos	4.82
b_P^P	Gasto de células B para se tornar células do Plasma	4.09
α_{MA}	Taxa de migração de macrófagos ativados	4.09
$\lambda_{AF MA}$	Taxa de fagocitose de antígenos opsonizados por macrófagos ativados	4.06
b_P	Número de célula T para estimular células B	2.42
D_{MR}	Coefficiente de difusão dos macrófagos em repouso	0.93
D_A	Coefficiente de difusão de antígenos	0.85
λ_{MA}	Taxa de fagocitose de macrófagos ativados	0.76
b_P^B	Coefficiente de estímulo de células B	0.73
D_{MA}	Coefficiente de difusão de macrófagos ativados	0.24
A_0	Condição inicial dos antígenos	0.09
α_{MR}	Coefficiente de fonte de macrófagos	0.07
λ_{MR}	Taxa de fagocitose de macrófagos em repouso	0.05
$\lambda_{AF MR}$	Taxa de fagocitose de antígenos opsonizados por macrófagos em repouso	0.01
b_T	Coefficiente de estímulo de células T	$3 * 10^{-4}$

Entre os 20 parâmetros avaliados, consideramos os que possuem $Max_{dif} \geq 1$ como os mais sensíveis. O parâmetro mais sensível é a taxa de ativação de macrófagos γ_{AM} , e, sem ativação de macrófagos, consequentemente não ocorre migração para o LN, e a resposta adquirida não pode ser iniciada (Figura 21(a)).

O segundo parâmetro mais sensível é o que representa a taxa migração de anticorpos para o tecido (α_F). Esse parâmetro é essencial para que a resposta adquirida funcione efetivamente, levando a opsonização de antígenos para que sejam mais facilmente eliminados (Figura 21(b)).

A condição inicial de macrófagos em repouso no tecido (MR_0) também é significativa ao modelo, e, sem macrófagos, como não estamos representando outras células de defesa inata separadamente, não há resposta ao antígeno (Figura 21(c)).

De acordo com os resultados mostrados na Figura 21(d) sem a taxa de replicação do antígeno (β_A) a quantidade de antígenos no tecido permanece reduzida mas é suficiente para ativar uma resposta. Aumentando-se a taxa de replicação, o sistema imune como um todo leva mais tempo para eliminar o invasor. Acima de 50% de aumento na taxa o sistema não é capaz de eliminar o antígeno em 30 dias.

A taxa de exportação de anticorpos no LN (ρ_F) também afeta diretamente a resposta adquirida. Como pode ser visto na Figura 21(e), dobrando-se o valor original desse parâmetro, os antígenos são eliminados em aproximadamente metade do tempo (9 dias) enquanto que diminuindo-se essa taxa por 50%, a resposta leva aproximadamente 28 dias para eliminar o antígeno. Esse tipo de informação pode ser interessante para o estudo de tratamentos contra os antígenos.

O parâmetro que representa a capacidade de carregamento, k_A , mostrado na Figura 21(f), é o único que não pode ser variado a partir de zero, pois é um denominador na Equação (4.10). Por isso, seu valor foi variado a partir de -50% , o que faz com que o antígeno seja eliminado 2 dias antes do valor original utilizado nas simulações, enquanto se dobrar o valor leva aproximadamente 10 dias. Havendo mais antígenos capazes de se replicar, as células do sistema imune precisam de mais tempo para eliminá-los, ou então precisam ser recrutadas em maior número.

O coeficiente b_P^B é importante para determinar o número de células B que se transformam em células do Plasma. Reduzindo esse valor em 100%, as células B não se transformam em células do Plasma, e, conseqüentemente não produzem anticorpos. Entretanto, aumentar esse parâmetro leva a uma maior produção de anticorpos e a resposta específica contribui para eliminar mais rapidamente os antígenos (Figura 22(a)). Além disso, a taxa de migração dos macrófagos ativados para o LN (α_{MA}) é essencial para iniciar a resposta adquirida, já que estamos considerando que sem essa migração o antígeno não pode ser apresentado para os linfócitos no LN e anticorpos específicos não são produzidos. Portanto, inicializar esse parâmetro com 0 significa que só ocorre a ação das células do sistema imune inato (Figura 22(b)).

A taxa de fagocitose de antígenos opsonizados por macrófagos ativados, $\lambda_{AF|MA}$, também exibe grande discrepância quando inicializada com valor 0 (Figura 22(c)). Essa

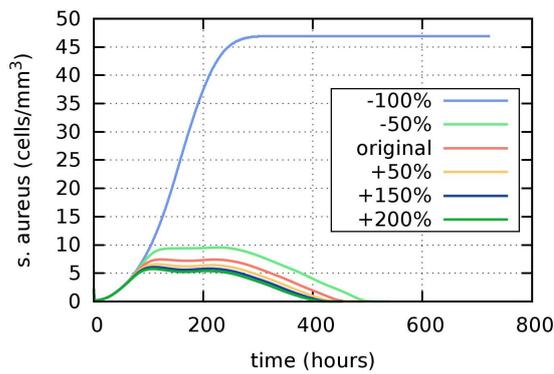
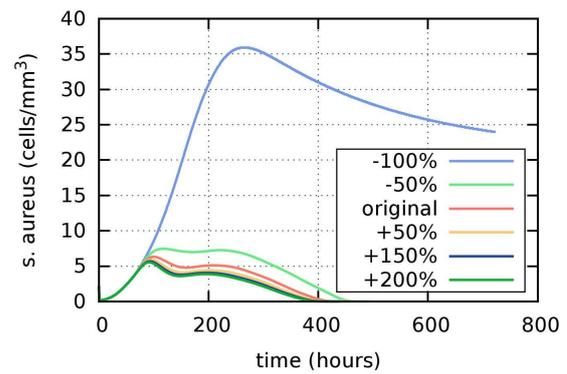
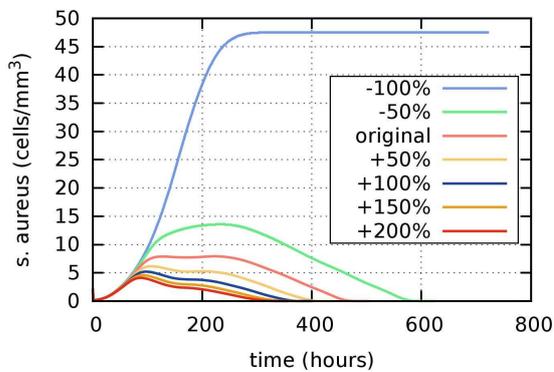
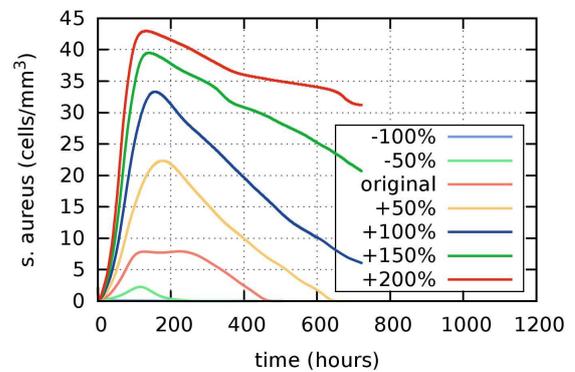
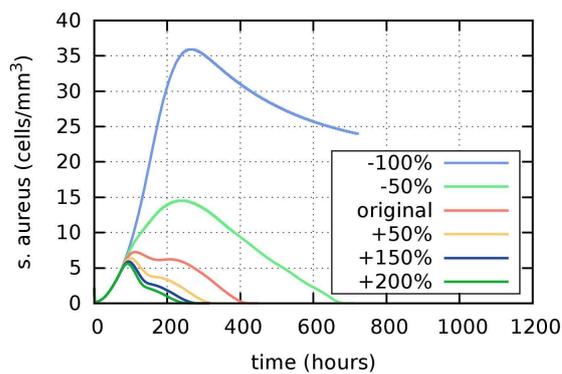
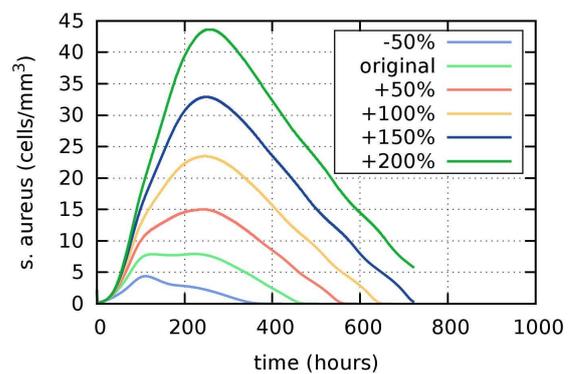
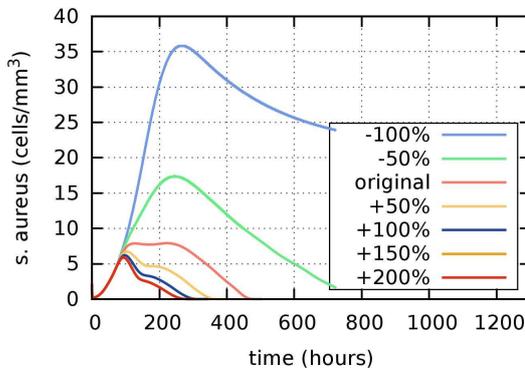
(a) Ativação de macrófagos (γ_{AM}).(b) Taxa de migração de anticorpos (α_F).(c) Condição inicial de macrófagos em repouso (MR_0).(d) Taxa de replicação de antígenos (β_A).(e) Taxa de exportação de anticorpos. (ρ_F).(f) Capacidade de carregamento de antígenos (k_A).

Figura 21 – Impacto da variação dos parâmetros na população de antígenos.

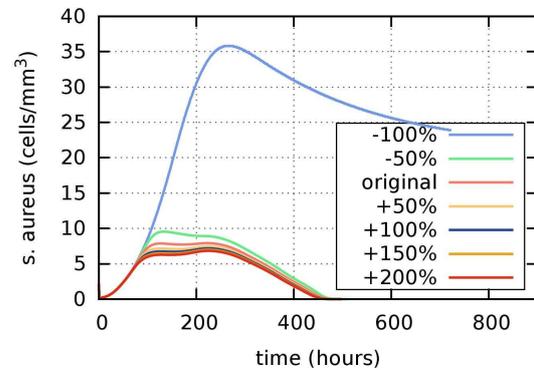
taxa é importante para a efetividade da resposta imune, e a velocidade de eliminação do antígeno é proporcional ao aumento desse parâmetro.

Inicializar o parâmetro que representa a quantidade de células T para estimular

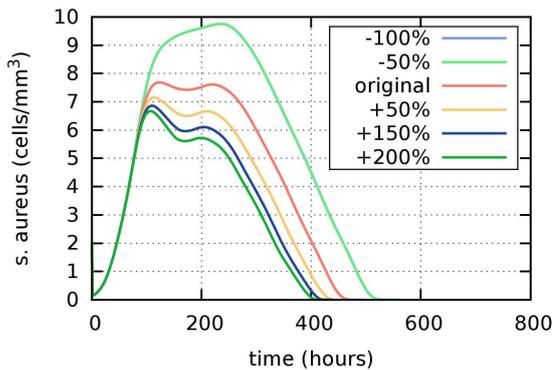
as células B, b_p , com zero, significa que as células B serão estimuladas sem a presença de células T, levando a um constante estímulo de células B no LN. As células B se tornam células do Plasma e sua população aumenta rapidamente no LN. Além disso, assim que macrófagos ativados chegam no LN, uma grande produção de anticorpos é iniciada. Como consequência, esse grande número de anticorpos migra para o tecido, aproximadamente 4 dias após o início da simulação e elimina os antígenos em aproximadamente 3 dias. De forma análoga, aumentar esse coeficiente em 200% significa que mais células T são necessárias para estimular as células B, levando a um número bem menor de antígenos chegando ao tecido, que não são suficientes para eliminar o antígeno em 30 dias (Figura 22(d)).



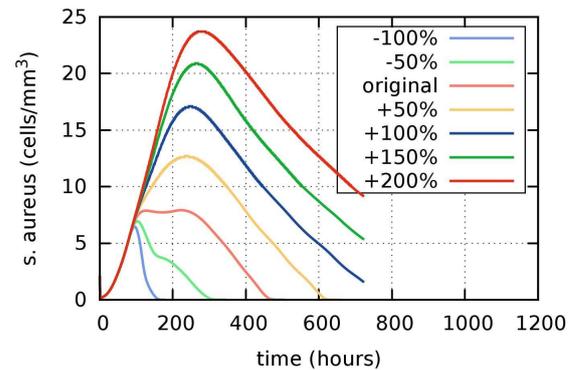
(a) Número de células B para se tornar células do Plasma (b_P^P).



(b) Taxa de migração dos macrófagos ativados (α_{MA}).



(c) Taxa de fagocitose de antígenos opsonizados por macrófagos ativados ($\lambda_{AF|MA}$).



(d) Número de células T para estimular células B (b_P).

Figura 22 – Impacto da variação dos parâmetros na população de antígenos ao longo de 30 dias desde o início da infecção.

4.1.4 Implementação Computacional do Acoplamento (*S. aureus*)

Com o intuito de desenvolver um modelo computacional extensível e adaptável e, devido aos longos intervalos de simulação dos cenários biológicos (semanas a meses),

optou-se por codificar utilizando a linguagem de programação C++. Dessa forma, técnicas de processamento paralelo podem ser exploradas para garantir que os resultados sejam obtidos em tempo razoável de execução da simulação. A opção por essa linguagem se fez pela familiaridade e por atender a todos requisitos de implementação como facilidade de paralelização e de acoplamento a outros módulos.

Modelo Computacional

O método numérico escolhido para resolver o modelo matemático é o Método das Diferenças Finitas (LEVEQUE, 2007). Este método é largamente utilizado na discretização de equações diferenciais parciais e se baseia na aproximação das derivadas por diferenças finitas.

A Equação (4.23) mostra um exemplo de operador de diferenças finitas utilizado na discretização do operador Laplaciano. As equações diferenciais ordinárias foram resolvidas utilizando o método numérico de Euler explícito (ATKINSON, 1978).

$$\begin{aligned}
 D_O \left(\frac{\partial^2 O(x, y, z)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 O(x, y, z)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 O(x, y, z)}{\partial z^2} \right) \approx & \quad (4.23) \\
 D_O * ((o[x + 1, y, z] - 2 * o[x, y, z] + o[x - 1, y, z]) / \Delta X^2) & \\
 + D_O * ((o[x, y + 1, z] - 2 * o[x, y, z] + o[x, y - 1, z]) / \Delta Y^2) & \\
 + D_O * ((o[x, y, z + 1] - 2 * o[x, y, z] + o[x, y, z - 1]) / \Delta Z^2). &
 \end{aligned}$$

O Algoritmo 1 mostra os passos gerais do aplicativo desenvolvido. Primeiramente, os parâmetros são inicializados e as condições iniciais do problema são definidas. Na sequência são criados os arquivos utilizados para armazenar os estados das variáveis em determinados passos de tempo, de acordo com a configuração escolhida. A parte principal do programa é a integração no tempo para a resolução das equações diferenciais ordinárias e parciais. No caso das equações diferenciais parciais considera-se ainda o domínio espacial e, portanto tem-se também as iterações necessárias para percorrer todas as dimensões do domínio.

Até o momento o programa está configurado apenas para domínios tridimensionais (cúbicos) cuja ordem é parametrizada. O número de passos de tempo depende do número de dias simulados ou de uma tolerância para a eliminação dos antígenos, em que considera-se que após atingir uma média muito pequena no tecido pode-se dizer que os antígenos foram eliminados. A Tabela 2 apresenta os passos de tempo e espaço adotados para a discretização.

Para garantir a estabilidade da solução com o método das diferenças finitas foi considerada a condição de Courant-Friedrichs-Lewy (CFL), que para problemas difusivos com três dimensões de espaço pode ser representada pela relação: $\frac{v\Delta t}{(\Delta x)^2} \leq \frac{1}{6}$, para

Algoritmo 1: Programa principal

```

início
  Inicializa();
  criaArquivos();
  faça
    calculaMedia();
    resolveEDO();
    resolveEDP();
    gravaResultadosParciais();
  enquanto
    | (( $t < iterPorDia * numDias$ ) && ( $A > tol$ ))
  fim
fim

```

Tabela 2 – Valores adotados na discretização.

Parâmetro	Valor	Unidade
Δ_x	0.1	<i>mm</i>
Δ_y	0.1	<i>mm</i>
Δ_z	0.1	<i>mm</i>
Δ_t	$numDias * 10^{-4}$	<i>dia</i> ⁻¹
<i>iterPorDia</i>	10 ⁴	–

$\Delta x = \Delta y = \Delta z$. O método é dito condicionalmente estável pois para manter a estabilidade é preciso garantir essa condição (STRIKWERDA, 2004; COURANT; FRIEDRICHS; LEWY, 1967).

4.2 VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)

Como um segundo exemplo de acoplamento iniciou-se o estudo de um modelo multi-escala baseado no tempo de infecção intracelular do vírus da hepatite C. Rong *et al.* (2013) realizou o acoplamento de um modelo de infecção viral pré-estabelecido na literatura (PERELSON, 2002) a uma equação que representa a produção de RNA viral dentro da célula infectada. Já Guedj e Neumann (2010) representou em um modelo de EDO os dois filamentos de RNA intracelular. A partir desses dois trabalhos, estendemos as equações para melhor representar a dinâmica da infecção dentro da célula e realizamos um novo acoplamento considerando os dois filamentos de RNA em uma abordagem baseada no tempo de infecção.

Nesta seção são detalhadas as etapas realizadas para o acoplamento do modelo multi-escala da infecção por HCV. Primeiramente, um modelo intracelular com duas equações, baseado no modelo apresentado por Guedj e Neumann (2010), foi desenvolvido apresentando bons ajustes aos dados experimentais *in vitro*. O próximo passo foi o desenvolvimento de um modelo intracelular com três EDP para representar a dinâmica da

replicação do HCV, incorporando uma representação do RNA viral positivo disponível para tradução e do RNA viral negativo como complexo de replicação, e validação desse modelo comparando os resultados a experimentos *in vitro*. Finalmente, realizou-se o acoplamento desse modelo intracelular de EDP baseadas no tempo de infecção a um modelo de infecção viral conhecido (PERELSON, 2002).

4.2.1 Modelo Intracelular do HCV com filamentos de RNA positivo e negativo

Guedj *et al.* (2013) desenvolveram um modelo multi-escala incluindo dinâmica intracelular do RNA do vírus causador da hepatite C (em inglês *hepatitis C virus*, HCV) acoplado a um modelo bifásico de infecção durante tratamento. A quantidade de RNA positivo (R) presente em uma célula infectada foi representada usando a seguinte equação:

$$\frac{dR}{da} = \alpha(a) - [\rho(a) + \mu(a)]R(a), \quad (4.24)$$

em que a representa o tempo desde que o vírus entrou na célula, que podemos chamar de idade da infecção ou *age* em inglês. Os parâmetros α , μ e ρ são taxas de produção, degradação e secreção, que dependem da idade (a), respectivamente.

A Eq. 4.24 foi acoplada a um modelo de infecção extracelular originando um modelo multi-escala baseado na idade da infecção considerando as escalas intracelular e extracelular. O modelo multi-escala estruturado por idade desenvolvido por Rong *et al.* (2013), que foi estendido neste trabalho como um segundo exemplo de acoplamento, é apresentado abaixo:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}T(t) &= s - \beta V(t)T(t) - dT(t), \\ \frac{\partial}{\partial t}I(a, t) + \frac{\partial}{\partial a}I(a, t) &= -\delta(a)I(a, t), \\ I(0, t) &= \beta V(t)T(t), I(a, 0) = \bar{I}(a), \\ \frac{\partial}{\partial t}R(a, t) + \frac{\partial}{\partial a}R(a, t) &= (1 - \epsilon_\alpha)\alpha(a) - [(1 - \epsilon_s)\rho(a) + \kappa\mu(a)]R(a), \\ R(0, t) &= 1, R(a, 0) = \bar{R}(a), \\ \frac{d}{dt}V(t) &= (1 - \epsilon_s) \int_0^\infty \rho(a)R(a, t)I(a, t)da - cV(t), \end{aligned} \quad (4.25)$$

em que T representa as células alvo (*target* em inglês) com fonte constante s e decaimento d . Em contato com os Vírus (V) as células alvo (T) se tornam infectadas (I) com taxa β . As células infectadas são representadas em classes com diferentes idades de infecção (a) com decaimento δ que depende da idade. Na primeira classe ($a = 0$) estão o número provável de células que se tornaram infectadas naquele momento. O tempo inicial de simulação ($t = 0$) pode ser escolhido como o início da infecção com $\bar{I}(a) = 0$ ou representar

o início de terapia após uma infecção estabelecida com $\bar{I}(a)$ sendo a distribuição das classes de células infectadas em diferentes idades no estado estacionário.

O RNA intracelular positivo (R) é representado de forma semelhante às células infectadas com classes de idades distintas desde a infecção. Pode ser produzido com taxa α , exportado com taxa ρ e decai com taxa μ . O vírus (V) é representado pelo acúmulo de RNA exportado por células infectadas em todas as classes de tempo desde o início da infecção e pode ser eliminado pelo sistema imune com taxa c .

Escolhendo-se $t = 0$ como início da infecção, tem-se $\bar{R}(a) = 0$, pois ainda não existem células infectadas apresentando RNA viral. No entanto, para simular o tratamento, escolhe-se $t = 0$ como início do tratamento e $R(a, 0)$ representa a distribuição do RNA viral no estado estacionário nas diferentes idades de infecção. Três possíveis efeitos de tratamento com drogas antivirais de ação direta foram estudadas para a infecção por HCV:

- (a) bloqueio da produção de RNA viral, reduzindo α por um fator $(1 - \epsilon_\alpha)$;
- (b) diminuição da secreção de vírus, reduzindo ρ por um fator $(1 - \epsilon_s)$;
- (c) aumento na taxa de degradação viral, multiplicando μ por um fator κ .

Esse modelo foi capaz de ajustar a quantidade de vírus no plasma de pacientes por dois dias definindo $t = 0$ como o início do tratamento. No entanto, para períodos maiores esse modelo não foi capaz de reproduzir resistência a terapia (RONG *et al.*, 2013). Foi apontado que a inclusão de outros filamentos de RNA viral seria uma forma de estudar características que não foram representadas nesse modelo.

Guedj e Neumann (2010) estudou a dinâmica intracelular de ambos os filamentos de RNA positivo e negativo usando apenas EDO. O número de unidades genômicas ou filamentos positivos $R_p(t)$, e o número de filamentos negativos de RNA viral (ou unidades de replicação) $R_n(t)$ foram representados. O modelo desenvolvido por Guedj e Neumann (2010) é dado pela Eq. (4.26) e representa os dois filamentos de RNA durante a replicação intracelular utilizando apenas EDO. Este modelo foi utilizado como base para desenvolvimento do modelo intracelular no presente trabalho:

$$\begin{aligned}
 \frac{dR_n}{dt} &= \beta R_p \left(1 - \frac{R_n}{R_{nmax}}\right) - \gamma R_n, \\
 \frac{dR_p}{dt} &= \alpha R_n - [\rho + \mu] R_p, \\
 \frac{dT}{dt} &= r \left(1 - \frac{T + I}{T_{max}}\right) T - bVT - dT, \\
 \frac{dI}{dt} &= bVT - \delta I, \\
 \frac{dV}{dt} &= \rho R_p I - cV,
 \end{aligned} \tag{4.26}$$

Os parâmetros β e γ são a taxa de formação e degradação de unidades de replicação, respectivamente. α , ρ e μ são as taxas de produção, exportação e decaimento do RNA positivo. r , b e d são as taxas de crescimento, infecção e morte de células alvo. A célula infectada tem uma taxa de morte distinta δ e o vírus pode ser eliminado pelo sistema imune a uma taxa c (GUEDJ; NEUMANN, 2010). Este modelo é uma aproximação média em que se considera que todas as células infectadas possuem a mesma dinâmica intracelular. Um modelo baseado no tempo desde a infecção poderia considerar as mudanças na replicação do vírus com o tempo.

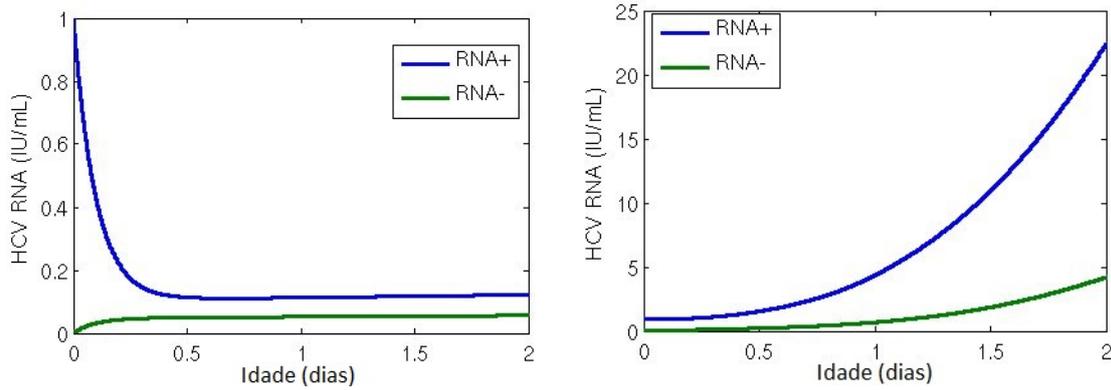
Assumindo-se por simplificação que não há superinfecção, ou seja, apenas um vírus entra em cada célula alvo para iniciar sua replicação, observa-se inicialmente com esse modelo que o RNA positivo apenas decai e não inicia o complexo de replicação. Não são gerados RNAs negativos suficientes para estabelecer a infecção nessa representação, o que pode ser causado por uma alta taxa de decaimento ou de exportação de RNA positivo, não permitindo a produção do RNA negativo. A Figura 23(a) mostra o comportamento do modelo nesse cenário com apenas um vírus entrando na célula.

Com relação à exportação, é observado em experimentos que se inicia aproximadamente 12 horas após a infecção (KEUM *et al.*, 2012). Portanto, para considerar esse atraso biológico, implementamos ρ como uma função do tempo desde o início da infecção, idade. Assume-se que dado um atraso no tempo τ , $\rho = 0$ para *tempo* $< \tau$ e $\rho = (1 - e^{-k(a-\tau)}) * \rho$, caso contrário. Isso significa que ρ cresce exponencialmente até alcançar um valor máximo predefinido, o que evita descontinuidades na função. Com a adição desse atraso biológico na exportação dos vírus, podemos observar o crescimento de ambos os filamentos de RNA intracelular (Figura 23(b)).

Entretanto, esse modelo linear não impõe nenhuma restrição à replicação, e ambos os filamentos de RNA positivo e negativo continuam a crescer exponencialmente, como mostrado nas Figuras 24(a) e 24(b).

Como podem existir limitações impostas por fatores do hospedeiro em uma célula que atrapalham a replicação (LOHMANN *et al.*, 2013), implementamos o crescimento logístico, muito utilizado na ecologia e replicação de células (WODARZ, 2007, 2007; EIKENBERRY *et al.*, 2009), no termo que representa a produção de RNA negativo. A escolha por limitar a produção de RNA negativo ao invés do positivo foi para representar a limitação no número de complexos de replicação observados, já que o número de RNA negativos representa o número de complexos de replicação na célula (GUEDJ; NEUMANN, 2010). O sistema de Equações modificado fica da seguinte forma (4.27):

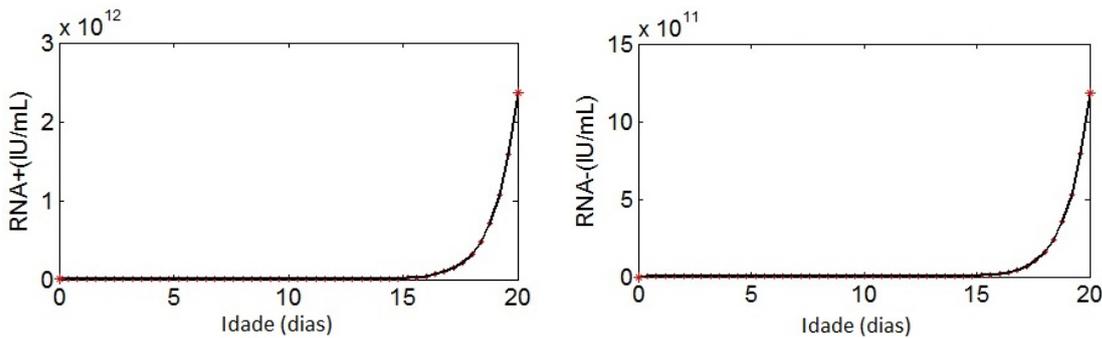
$$\frac{d}{dt}R_p = \alpha R_n - (\rho + \mu)R_p, \quad R_p(0) = R_{p0}, \quad (4.27)$$



(a) Um filamento de RNA positivo entra na célula, decai naturalmente e pode ser exportado.

(b) Um filamento de RNA entra na célula e inicia a replicação com produção de novos filamentos de RNA negativo.

Figura 23 – Modelo intracelular linear com duas equações. Parâmetros: $\alpha = 20 \text{ dia}^{-1}$, $\rho = 8.18 \text{ dia}^{-1}$, $\mu = 1. \text{ dia}^{-1}$, $r = 0.5 \text{ dia}^{-1}$, $\gamma = 1. \text{ dia}^{-1}$, $k = 0.2$, $\tau = 1$. Idade representa o tempo desde o início da infecção.



(a) Filamento positivo.

(b) Filamento negativo.

Figura 24 – Crescimento exponencial de RNA do vírus da hepatite C. Idade representa o tempo desde o início da infecção.

$$\frac{d}{dt}R_n = \left(1 - \frac{R_m}{R_{max}}\right)rR_p - \gamma R_n, \quad R_n(0) = R_{n_0},$$

em que R_p representa o filamento de RNA positivo que é produzido com taxa α , exportado com taxa ρ e decai com taxa μ . O filamento de RNA negativo que também representa o número de complexos de replicação é representado por R_n . O filamento negativo decai com taxa γ e é produzido com taxa r com crescimento logístico considerando que R_{max} representa o número máximo de complexos de replicação por célula.

As Figuras 25(a) e 25(b) mostram a distribuição de RNA intracelular após o início da infecção, representado no gráfico pelo eixo horizontal (idade), sem considerar nenhum tratamento utilizando o modelo não linear. O mesmo conjunto de parâmetros foi utilizado para gerar essas distribuições (Tabela 3).

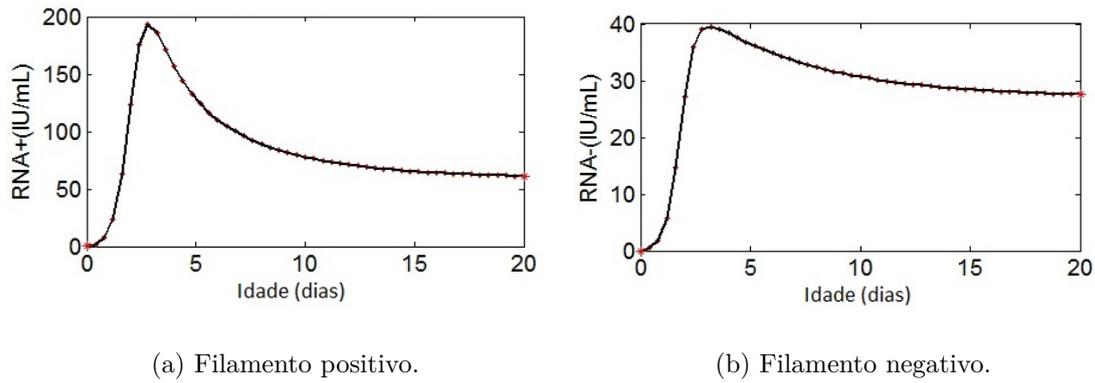


Figura 25 – Distribuição de RNA viral por 20 dias após a infecção. Simulação utilizando o modelo intracelular não linear com crescimento logístico. Apresenta um pico aproximadamente após 4 dias de infecção e decai até atingir um estado de equilíbrio.

Tabela 3 – Valores, unidades e significado biológico para os parâmetros do modelo de replicação de RNA intracelular.

Nome	Valor	Unidade	Significado biológico
α	20	dia ⁻¹	Taxa de replicação do RNA positivo (R_p)
ρ	8.18	dia ⁻¹	Taxa de exportação de RNA positivo (R_p)
μ	1	dia ⁻¹	Decaimento natural de RNA positivo (R_p)
r	1	dia ⁻¹	Taxa de replicação de RNA negativo / complexo de replicação (R_n)
γ	1.7	dia ⁻¹	Decaimento natural de RNA negativo / complexo de replicação (R_n)
k	0.2	-	Coefficiente da função exponencial de atraso na exportação de RNA positivo
τ	0.5	dia	Tempo de atraso para a exportação de RNA positivo
R_{max}	50	moléculas cels ⁻¹	Número máximo de RNA negativo / complexo de replicação (R_n)
R_{p0}	1	moléculas cels ⁻¹	Condição inicial de R_{p0}
R_{n0}	0	moléculas cels ⁻¹	Condição inicial de R_{n0}

4.2.1.1 Análise de Estabilidade Linear

Para estudar o comportamento do modelo de duas equações, primeiramente o escrevemos utilizando a notação matricial:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} R_p \\ R_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -(\rho + \mu) & \alpha \\ r(1 - \frac{R_n}{R_{max}}) & -\gamma \end{pmatrix} \begin{pmatrix} R_p \\ R_n \end{pmatrix} \quad (4.28)$$

e linearizamos próximo aos pontos de equilíbrio R_p^* e R_n^* utilizando séries de Taylor:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} R_p \\ R_n \end{pmatrix} \approx \begin{pmatrix} -(\rho + \mu) & \alpha \\ r(1 - \frac{R_n^*}{R_{max}}) & -\gamma - r\frac{R_p^*}{R_{max}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} R_p - R_p^* \\ R_n - R_n^* \end{pmatrix} \quad (4.29)$$

Esse sistema de equações apresenta dois pontos de equilíbrio:

- $R_n^* = R_p^* = 0$, o que pode significar uma cura sem a necessidade de tratamento, onde o próprio sistema imune é capaz de eliminar o vírus. Autovalores: $\lambda_{1,2} = \frac{1}{2}(-\gamma - \mu - \rho \pm \sqrt{(\gamma + \mu + \rho)^2 - 4(\gamma(\rho + \mu) - \alpha r)})$;
- e $R_n^* = (1 - \frac{\gamma(\rho + \mu)}{\alpha r})R_{max}$, $R_p^* = \frac{\alpha}{(\rho + \mu)}R_n^*$, que pode significar o estabelecimento de uma infecção crônica, onde o sistema imune sozinho não é capaz de eliminar o vírus. Autovalores:
 $\lambda_{1,2} = \frac{-\mu^2 + \alpha r + 2\mu\rho + \rho^2 \pm \sqrt{4\gamma(\rho + \mu)^3 + (\mu^2 - \alpha r + 2\mu\rho + \rho^2)^2}}{2(\rho + \mu)}$.

Estamos interessados no segundo caso, onde há formação de uma infecção que não é eliminada pelo sistema imune. Para manter a estabilidade linear do modelo próximo ao segundo ponto de equilíbrio, é preciso respeitar a relação entre os parâmetros: $\alpha r > \gamma(\rho + \mu)$.

4.2.2 Modelo Intracelular do HCV com Tradução e Replicação de RNA

Com a intenção de desenvolver um modelo da dinâmica intracelular do vírus da hepatite C, desenvolvemos um modelo que representa o material genético do vírus na forma que entra na célula como um filamento de RNA positivo e também no formato intermediário do RNA negativo utilizado para a replicação, Equação (4.27). No entanto, antes de iniciar a replicação o RNA positivo deve ser primeiro traduzido, utilizando as ferramentas da célula hospedeira para produzir proteínas necessárias a formação do complexo de replicação (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007).

Um modelo incluindo esse estado do RNA positivo disponível para tradução foi desenvolvido, Equação (4.30). Esse modelo intracelular permite o estudo dos seguintes aspectos: tradução do RNA positivo após entrada na célula, formação do complexo de replicação após a tradução do RNA positivo, a produção de RNA negativo e positivo no complexo de replicação e exportação de novos vírions a partir dos dois estados de RNA positivo representados.

Modelo Intracelular:

$$\begin{aligned} \frac{d}{da} R_t &= \theta R_c - (\sigma + \rho(a) + \mu_t) R_t, \\ R_t(0) &= R_{t_0}, \\ \frac{d}{da} R_c &= \alpha R_n + \sigma R_t - (\theta + \rho(a) + \mu_c) R_c, \end{aligned} \quad (4.30)$$

$$\begin{aligned}
R_c(0) &= R_{c_0}, \\
\frac{d}{da}R_n &= r\left(1 - \frac{R_n}{R_{max}}\right)R_c - \mu_c R_n, \\
R_n(0) &= R_{n_0}.
\end{aligned}$$

Após a entrada na célula, o maquinário celular é utilizado pelo vírus para traduzir a poli proteína do genoma do HCV liberado no citoplasma (SHI; LAI, 2006). Assume-se que o RNA positivo traduzido (R_t na Equação (4.30)) pode formar complexos de replicação com taxa σ dia⁻¹, ser montado e exportado como vírus com taxa ρ dia⁻¹, e possui decaimento natural μ_t dia⁻¹. Além disso, o RNA positivo no complexo de replicação (R_c) pode passar a ser disponível para tradução com taxa θ dia⁻¹ ou ser montado e exportado como vírus com a mesma taxa do R_t , ρ dia⁻¹. Os complexos de replicação são formados nas chamadas teias membranosas (CHATEL-CHAIX; BARTENSCHLAGER, 2014), e um RNA negativo (R_n) é formado com taxa r dia⁻¹ para ser utilizado como um carimbo para formação de vários RNA positivos que serão exportados. Assume-se o crescimento logístico (MURRAY, 2002) na formação de complexos de replicação com um número de RNA negativo sendo produzido de R_{max} . R_c se replica a uma taxa α dia⁻¹ e depende da existência e da quantidade de R_n . Considera-se que ambos R_c e R_n no complexo de replicação morrem naturalmente a mesma taxa μ_c dia⁻¹.

Seguindo a tradução e replicação, o RNA viral positivo é montado para ser exportado como uma partícula viral (LINDENBACH; RICE, 2013). Podemos representar o RNA viral exportado através da equação diferencial (4.31):

$$\frac{d}{da}R_s = \rho(a)(R_t + R_c) - c_s R_s, \quad R_s(0) = R_{s_0}, \quad (4.31)$$

em que, $\rho(a)$ dia⁻¹ é a taxa de exportação e c_s dia⁻¹ é a taxa de eliminação do RNA viral, estimada.

4.2.2.1 Análise de Estabilidade Linear do Modelo Intracelular

Considerando o sistema de Equações 4.30 reescrito como:

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt}R_t &= h_1(R_t, R_c, R_n) \\
\frac{d}{dt}R_c &= h_2(R_t, R_c, R_n) \\
\frac{d}{dt}R_n &= h_3(R_t, R_c, R_n)
\end{aligned} \quad (4.32)$$

E, assumindo que $(R_t^*, R_c^*, R_n^*) = \vec{0}$ é um ponto de equilíbrio, aproximamos as funções $h_1(R_t, R_c, R_n)$, $h_2(R_t, R_c, R_n)$ e $h_3(R_t, R_c, R_n)$ quando (R_t, R_c, R_n) é próximo a (R_t^*, R_c^*, R_n^*) . Portanto, o sistema não-linear pode ser aproximado por:

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt}R_t &= h_1(R_t^*, R_c^*, R_n^*) + \frac{\partial}{\partial R_t}h_1(R_t^*, R_c^*, R_n^*)(R_t - R_t^*) + \\
&\quad \frac{\partial}{\partial R_c}h_1(R_t^*, R_c^*, R_n^*)(R_c - R_c^*) + \frac{\partial}{\partial R_n}h_1(R_t^*, R_c^*, R_n^*)(R_n - R_n^*) \\
\frac{d}{dt}R_c &= h_2(R_t^*, R_c^*, R_n^*) + \frac{\partial}{\partial R_t}h_2(R_t^*, R_c^*, R_n^*)(R_t - R_t^*) + \\
&\quad \frac{\partial}{\partial R_c}h_2(R_t^*, R_c^*, R_n^*)(R_c - R_c^*) + \frac{\partial}{\partial R_n}h_2(R_t^*, R_c^*, R_n^*)(R_n - R_n^*) \\
\frac{d}{dt}R_n &= h_3(R_t^*, R_c^*, R_n^*) + \frac{\partial}{\partial R_t}h_3(R_t^*, R_c^*, R_n^*)(R_t - R_t^*) + \\
&\quad \frac{\partial}{\partial R_c}h_3(R_t^*, R_c^*, R_n^*)(R_c - R_c^*) + \frac{\partial}{\partial R_n}h_3(R_t^*, R_c^*, R_n^*)(R_n - R_n^*)
\end{aligned} \tag{4.33}$$

E, como (R_t^*, R_c^*, R_n^*) é um ponto de equilíbrio, $h_1(R_t^*, R_c^*, R_n^*) = h_2(R_t^*, R_c^*, R_n^*) = h_3(R_t^*, R_c^*, R_n^*) = 0$. Logo, temos um sistema linearizado, no qual a matrix de coeficientes é a Jacobiana no ponto de equilíbrio (R_t^*, R_c^*, R_n^*) :

$$\begin{pmatrix} \frac{\partial}{\partial R_t}h_1(R_t^*, R_c^*, R_n^*) & \frac{\partial}{\partial R_c}h_1(R_t^*, R_c^*, R_n^*) & \frac{\partial}{\partial R_n}h_1(R_t^*, R_c^*, R_n^*) \\ \frac{\partial}{\partial R_t}h_2(R_t^*, R_c^*, R_n^*) & \frac{\partial}{\partial R_c}h_2(R_t^*, R_c^*, R_n^*) & \frac{\partial}{\partial R_n}h_2(R_t^*, R_c^*, R_n^*) \\ \frac{\partial}{\partial R_t}h_3(R_t^*, R_c^*, R_n^*) & \frac{\partial}{\partial R_c}h_3(R_t^*, R_c^*, R_n^*) & \frac{\partial}{\partial R_n}h_3(R_t^*, R_c^*, R_n^*) \end{pmatrix} \tag{4.34}$$

Substituindo:

$$\begin{pmatrix} -(\sigma + \rho + \mu_t) & \theta & 0 \\ \sigma & -(\theta + \rho + \mu_c) & \alpha \\ 0 & (1 - \frac{Rm}{R_{max}})r & -(\mu_c + r\frac{Rc}{R_{max}}) \end{pmatrix} \tag{4.35}$$

O ponto de equilíbrio $(R_t^*, R_c^*, R_n^*) = \vec{0}$ pode representar uma cura pelo próprio sistema imune sem necessidade de tratamento. Como estamos interessados nos casos onde se estabelece a infecção, estudamos outro ponto de equilíbrio do sistema:

$$(R_t^*, R_c^*, R_n^*) = \left(\frac{\theta}{\phi_1}Rc, \frac{\alpha}{\phi_2 - \frac{\sigma\theta}{\phi_1}}Rm, (1 - \frac{(\phi_2 - \frac{\sigma\theta}{\phi_1})\mu_c}{\alpha r})R_{max} \right) \tag{4.36}$$

em que, $\phi_1 = \theta + \rho + \mu_t$ e $\phi_2 = \sigma + \rho + \mu_c$.

Seguindo os passos mostrados anteriormente, chegamos a condições que devem ser satisfeitas pelos parâmetros para que exista um ponto de equilíbrio positivo: $\phi_2 > \frac{\sigma\theta}{\phi_1}$ e $\alpha r > (\phi_2 - \frac{\sigma\theta}{\phi_1})\mu_c$.

4.2.2.2 Análise de Sensibilidade do Modelo Intracelular

Foi realizada uma análise de sensibilidade para estimar como a solução é alterada com pequenas perturbações nos parâmetros do modelo. Define-se um índice de sensibilidade como a razão:

$$S_i = \frac{\delta J/J}{\delta p/p}, \quad J, p \neq 0, \quad (4.37)$$

em que, J denota uma função/funcional que depende de um parâmetro p , δ é uma perturbação ao parâmetro p e δJ é a perturbação resultante na função/funcional J .

O índice de sensibilidade é, portanto, uma medida de porcentagem de mudança no resultado dada uma perturbação em cada parâmetro. Variamos em 10% o valor de cada parâmetro, um de cada vez, enquanto os outros parâmetros se mantiveram inalterados e calculamos o índice de sensibilidade de cada parâmetro com relação ao valor resultante de R_t , R_c e R_n após 72 horas (Figura 26). Valores positivos indicam aumento no resultado e valores negativos indicam diminuição no resultado a partir da perturbação feita ao parâmetro.

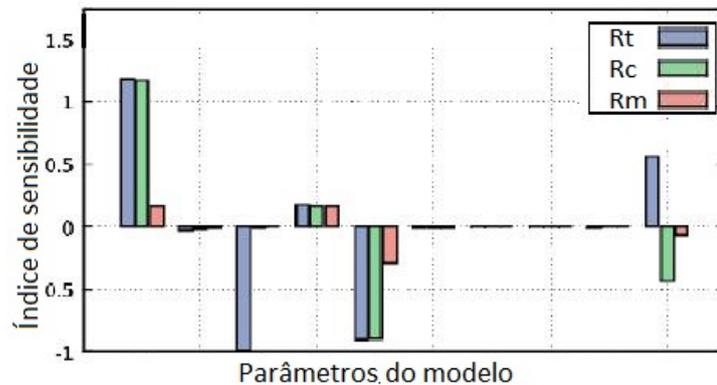


Figura 26 – Análise de sensibilidade do modelo intracelular após 72h. Cada conjunto de três colunas corresponde, respectivamente, aos parâmetros: α , ρ , μ_t , r , μ_c , k , τ , c , σ e θ .

A taxa de replicação do RNA viral positivo, α , os decaimentos durante a tradução e replicação, μ_t e μ_c , e a taxa na qual o RNA positivo passa do complexo de replicação para ser traduzido, θ , são os parâmetros mais sensíveis do modelo.

O índice de sensibilidade confirma que perturbando-se α , a taxa de replicação aumenta mais do que 10 % no complexo de replicação. μ_t representa a taxa de decaimento natural do RNA traduzido e perturbando esse parâmetro diminui o RNA positivo e μ_c , que é o decaimento natural dos RNAs positivo e negativo no complexo de replicação afeta principalmente a produção de RNA positivo.

4.2.3 Acoplamento de modelos (HCV)

Primeiramente, modificamos o sistema de Equações 4.30 para incluir uma abordagem baseada no tempo decorrido desde o início da infecção. Nessa abordagem, considera-se que uma dimensão para representar o tempo desde que a célula foi infectada, chamada de idade, " a " (*age*), e outra dimensão para o tempo de simulação " t ", que pode representar tanto o início da infecção quanto o início do tratamento depois que a infecção foi estabelecida. A Figura 27 mostra um esquema do modelo multi-escala acoplado, considerando os níveis celular e intracelular.

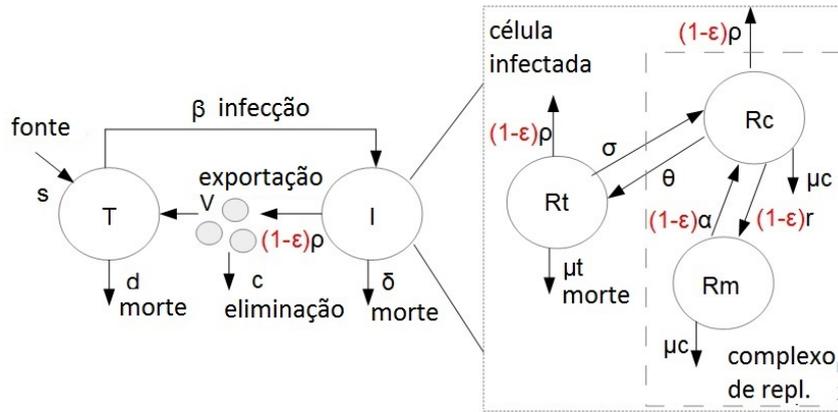


Figura 27 – Esquema representando o modelo multi-escala acoplado com terapia. As células alvo (T) estão representadas com termo fonte constante s , e decaimento natural d . Podem ser infectadas por vírus extracelular (V) a uma taxa β . Os vírus podem ser eliminados pelo sistema imune a uma taxa c e se replicam e são exportados por células infectadas (I). Dentro das células infectadas ocorre a replicação do material genético dos vírus. O filamento positivo ao entrar na célula encontra-se disponível para ser traduzido (R_t). Este filamento positivo pode passar para um complexo de replicação (R_c) a uma taxa σ onde um filamento negativo (R_m) é replicado com taxa r . Novos filamentos positivos são produzidos com taxa α e podem voltar para serem traduzidos com taxa θ ou ser exportados com taxa ρ . Em vermelho estão representadas as ações que podem ser reduzidas ou bloqueadas com terapia.

O modelo intracelular é representado por EDP para considerar as duas dimensões de tempo. Dessa forma podemos quantificar o RNA intracelular para cada idade da célula. O novo conjunto de equações com as condições iniciais e de contorno está descrito na Equação (4.38), abaixo:

Modelo intracelular baseado na idade (a):

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial}{\partial t} R_t(a, t) + \frac{\partial}{\partial a} R_t(a, t) &= \theta R_c - (\sigma + \rho(a) + \mu_t) R_t, \\
 R_t(0, t) &= R_{t_0}, R_t(a, 0) = \bar{R}_t(a), \\
 \frac{\partial}{\partial t} R_c(a, t) + \frac{\partial}{\partial a} R_c(a, t) &= \alpha R_n + \sigma R_t - (\theta + \rho(a) + \mu_c) R_c, \\
 R_c(0, t) &= R_{c_0}, R_c(a, 0) = \bar{R}_c(a), \\
 \frac{\partial}{\partial t} R_n(a, t) + \frac{\partial}{\partial a} R_n(a, t) &= r \left(1 - \frac{R_n}{R_{max}}\right) R_c - \mu_c R_n,
 \end{aligned} \tag{4.38}$$

$$R_n(0, t) = R_{n_0}, R_n(a, 0) = \bar{R}_n(a).$$

em que, $\bar{R}_t(a)$, $\bar{R}_c(a)$, $\bar{R}_n(a)$, são as distribuições no estado estacionário do RNA positivo disponível para tradução, RNA positivo e negativo no complexo de replicação, dados pelas EDO 4.30. As condições iniciais e outros parâmetros são tratadas no Capítulo 6 e dependem da simulação realizada.

Para estudar os efeitos da terapia no modelo intracelular 5 parâmetros são adicionados ao conjunto de equações 4.38 (RONG *et al.*, 2013; GUEDJ; NEUMANN, 2010; GUEDJ; PERELSON, 2011).

Modelo intracelular baseado na idade (a) com terapia:

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial t} R_t(a, t) + \frac{\partial}{\partial a} R_t(a, t) &= \theta R_c - (\sigma + (1 - \epsilon_s)\rho(a) + \kappa_t \mu_t) R_t, \\ R_t(0, t) &= R_{t_0}, R_t(a, 0) = \bar{R}_t(a), \\ \frac{\partial}{\partial t} R_c(a, t) + \frac{\partial}{\partial a} R_c(a, t) &= (1 - \epsilon_\alpha)\alpha R_n + \sigma R_t - (\theta + (1 - \epsilon_s)\rho(a) + \kappa_c \mu_c) R_c, \\ R_c(0, t) &= R_{c_0}, R_c(a, 0) = \bar{R}_c(a), \\ \frac{\partial}{\partial t} R_n(a, t) + \frac{\partial}{\partial a} R_n(a, t) &= (1 - \epsilon_r)r\left(1 - \frac{R_n}{R_{max}}\right) R_c - \kappa_c \mu_c R_n, \\ R_n(0, t) &= R_{n_0}, R_n(a, 0) = \bar{R}_n(a). \end{aligned} \tag{4.39}$$

em que, ϵ_α representa a efetividade da terapia em diminuir ou bloquear replicação de RNA positivo, ϵ_r representa a efetividade do tratamento em diminuir ou bloquear a replicação de RNA negativo, κ_t é um fator para aumentar a degradação de RNA positivo disponível para tradução, κ_c é um fator para aumentar a degradação de RNA positivo e negativo no complexo de replicação e ϵ_s representa a efetividade da terapia em diminuir ou bloquear a exportação de RNA positivo.

Após a definição desse modelo intracelular baseado no tempo desde a infecção, realizamos o acoplamento a um modelo pré-estabelecido de infecção viral, Equação (4.40) (PERELSON, 2002), modificado.

Modelo de Infecção modificado:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} T(t) &= s - \beta V(t)T(t) - dT(t), \\ \frac{\partial}{\partial t} I(a, t) + \frac{\partial}{\partial a} I(a, t) &= -\delta(a)I(a, t), \\ I(0, t) &= \beta V(t)T(t), I(a, 0) = \bar{I}(a), \\ \frac{d}{dt} V(t) &= (1 - \epsilon_s) \int_0^\infty \rho(a) R_s(a, t) I(a, t) da - cV(t), \end{aligned} \tag{4.40}$$

em que, T representa as células alvo, I , células infectadas em diferentes classes de tempo desde a infecção e V representa o HCV no plasma. Células alvo se tornam infectadas a

uma taxa β , possuem alta recuperação com fonte constante s e decaimento natural d . O parâmetro δ representa a probabilidade de uma célula infectada sobreviver a idade "a". R_s representa o RNA positivo exportado ($R_t + R_c$) e os efeitos da terapia na exportação são dados por ϵ_s . O vírus no plasma pode ser eliminado pela resposta imune a uma taxa c . $\bar{I}(a)$ é a distribuição no estado estacionário de células infectadas $\bar{I}(a) = \beta V(t)T(t)e^{-\delta a}$.

O acoplamento entre os modelos é realizado na equação que representa os vírus no plasma (V), através do termo com a integração $\int_0^\infty \rho(a)R_s(a,t)I(a,t)da$. A carga viral depende da quantidade de células infectadas e do número de vírus que cada uma delas exportam. Dessa forma, o modelo de infecção depende do modelo intracelular e da exportação do RNA em forma de vírus. Essa abordagem de acoplamento foi realizada anteriormente por Rong *et al.* (2013) considerando o modelo intracelular com apenas uma equação representando o RNA positivo.

4.2.3.1 Análise de sensibilidade do modelo acoplado

Realizamos a análise de sensibilidade dos parâmetros do modelo acoplado utilizando a mesma abordagem que foi aplicada para a análise de sensibilidade dos parâmetros do modelo intracelular (4.2.2.2). O objetivo é compreender como cada parâmetro afeta a carga viral para ajudar na escolha da abordagem para realizar o ajuste de parâmetros. Variamos cada parâmetro, um de cada vez, e comparamos como cada variação afetou a quantidade de vírus no plasma no dia 2 após início de terapia.

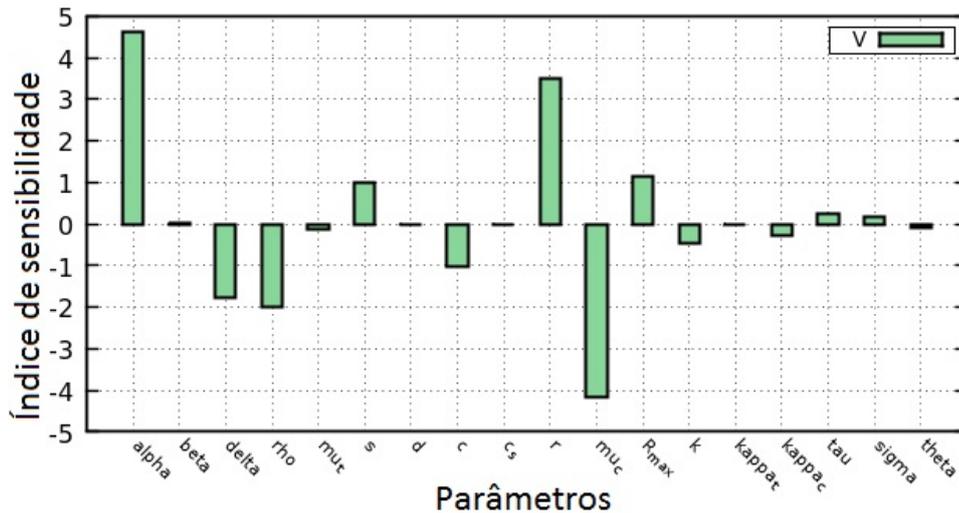


Figura 28 – Análise de sensibilidade dos parâmetros do modelo acoplado 48h após início de terapia. A Figura mostra quanto cada parâmetro afeta a carga viral (V).

O índice de sensibilidade é calculado conforme a Equação (4.37) e a Figura 28 mostra os índices de sensibilidade para todos os parâmetros do modelo acoplado relacionados a carga viral.

Os parâmetros do modelo intracelular como os que representam as taxas de replicação e decaimento, α , r , μ_c são os que mais afetam a carga viral. Outros parâmetros como o que representa a exportação de vírus ρ , e decaimento de células infectadas δ , também são significativos, o que mostra o quanto a replicação intracelular é importante para a carga viral. Outros parâmetros quase não influenciam tão diretamente a quantidade de vírus e podem ser fixados, por exemplo, durante o ajuste de parâmetros.

4.2.4 Implementação Computacional do Acoplamento (HCV)

Com a mesma justificativa do acoplamento anterior, iniciou-se a implementação dos modelos utilizando a linguagem de programação C++ e como método de solução das equações as Diferenças Finitas. No entanto, o interesse por realizar modificações no modelo e pela disponibilidade de outras ferramentas, optamos por desenvolver os modelos intracelulares e o posterior acoplamento utilizando o ambiente Matlab.

Escolheu-se o Matlab pela disponibilidade de um *solver* específico desenvolvido previamente por um dos colaboradores do presente trabalho para resolver equações diferenciais ordinárias e parciais simultaneamente sem a necessidade de implementar uma solução para cada modelo. Este *solver* utiliza o método das linhas em que uma dimensão a menos é discretizadas para a solução de EDP. Por realizar uma transformação das equações diferenciais parciais em um sistema de equações diferenciais ordinárias, apresenta bom desempenho computacional comparado a outras implementações de soluções numéricas (SADIKU; OBIOZOR, 2000).

É possível utilizar o método das linhas devido às EDP serem bem colocadas e possuírem valor inicial para pelo menos uma dimensão. O *solver* discretiza as EDP com relação à idade utilizando diferenças finitas de ordem 2, 4 ou 6 que depende do número de pontos discretizados. A condição de contorno é diferenciada com relação ao tempo e adicionada. Após as EDP terem sido parcialmente discretizadas para um problema de valor inicial de EDO, podem ser utilizados integradores numéricos para resolver esse sistema junto com as outras EDO. Foi utilizado o método numérico Runge Kutta de quarta ordem (*ode45* no Matlab) para resolver as equações diferenciais ordinárias resultantes.

As equações diferenciais parciais utilizadas não representam condições espaciais e sim de tempo sendo que foi assumida a relação $\frac{da}{dt} = 1$, que representa que a unidade de tempo para idade é a mesma unidade de tempo da simulação. O algoritmo representando o programa principal para a solução das equações do modelo acoplado está representado na listagem 2.

O algoritmo principal foi implementado de forma a receber os parâmetros por um vetor chamado POI, parâmetros de interesse (*Parameters of Interest* em inglês), calcular as condições iniciais que dependem do caso simulado, resolver as equações e exibir os resultados. O cálculo das equações acopladas é realizado na sub-rotina resumida no

Algoritmo 2: Programa principal(POI)**início**

```
inicializa(POI); // inicializa os parâmetros
calculaCI(); // calcula condições iniciais
defineTratamento(); // define os parâmetros para terapia
resolveED_Acopladas(); // resolve EDO e EDP juntas
exibeResultados();
```

fim

Algoritmo 3. Primeiramente o sistema de equações diferenciais é discretizado em uma direção de coordenada, no caso a idade de infecção (a) e transformado para um sistema de equações diferenciais ordinárias desacopladas. As condições de contorno são introduzidas e o sistema é resolvido.

Algoritmo 3: resolveED_Acopladas**início**

```
transformaEDO(); // obtém sistema de EDO desacopladas
condContorno(); // introduz condições de contorno
resolveEDO(); // solução das equações
```

fim

5 RESULTADOS DO ACOPLAMENTO (*S. aureus*)

Neste Capítulo são apresentados os resultados do modelo acoplado desenvolvido para representar a resposta imune a uma infecção por *S. aureus*. Os parâmetros utilizados nas simulações encontram-se nas Tabelas 7, 8 e 9 no Apêndice A.

Com o intuito de mostrar a importância de determinadas células, moléculas e processos na dinâmica da resposta imune, três simulações são apresentadas. Em um cenário inicial foi simulado apenas o comportamento do antígeno se difundindo no tecido sem resistência externa (5.1). Em seguida, para reforçar a importância da ação das células e moléculas da resposta adquirida para a eliminação do antígeno, foi simulada apenas a resposta inata (5.2). E, por fim, foi simulado o modelo acoplado completo, incluindo a resposta adquirida (5.3).

5.1 COMPORTAMENTO DO ANTÍGENO

A intenção dessa simulação é mostrar o comportamento de um antígeno sem restrições de proliferação e movimentação dentro do tecido. Dessa forma, podemos avaliar se a difusão está ocorrendo quando não há influência de outras células e moléculas no modelo.

Inicialmente, injeta-se antígeno na parte central do domínio tridimensional com 10 mm de lado (Figura 33) e, em algumas horas observa-se que o antígeno espalha-se pelo domínio (Figuras 33(a) a 33(b)). Como não encontra resistência, o antígeno continua se replicando e difundindo pelo tecido representado. Para os parâmetros utilizados, essa difusão sem nenhuma resistência do organismo ocorre em torno de 10 dias. Observa-se também, pelo aumento na concentração dos antígenos, que esses replicam-se (a sua reprodução é modelada pelo primeiro termo da Equação (4.10)).

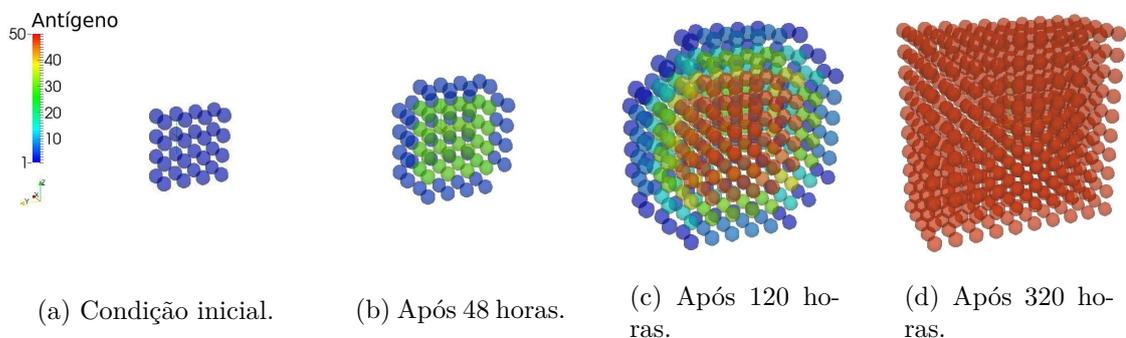


Figura 29 – Condição inicial e difusão de antígenos durante 20 dias de simulação sem limitação de crescimento e difusão. Após aproximadamente 10 dias todo o domínio da simulação contém antígenos e estes continuam se replicando e se difundindo.

As Figuras 30(a) e 30(b) mostram o crescimento logístico do antígeno limitado apenas pelo espaço disponível respectivamente, durante 20 e 100 dias de simulação. Pode ser observado que após 10 dias os antígenos alcançam o máximo que poderiam ocupar, que foi assumido como 50 antígenos por milímetro cúbico.

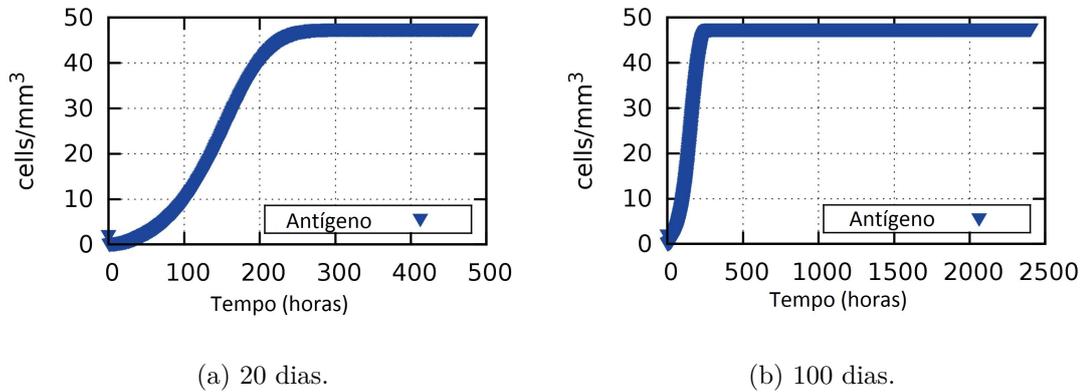


Figura 30 – Concentração média de antígenos no tecido na ausência de resposta imune.

5.2 IMUNIDADE INATA

Inicialmente, sem considerar a resposta adaptativa, o antígeno cresce lentamente, limitado apenas pela resposta inata e o espaço disponível, que assumiu-se que comporte até 50 antígenos por milímetro cúbico. Nessa representação, usou-se somente as Equações (4.1), (4.2), (4.3). Percebe-se analisando as concentrações médias de antígenos no tecido (Figuras 31(a) e 31(b)) que os macrófagos são capazes de conter o crescimento dos antígenos mas não conseguem eliminá-los.

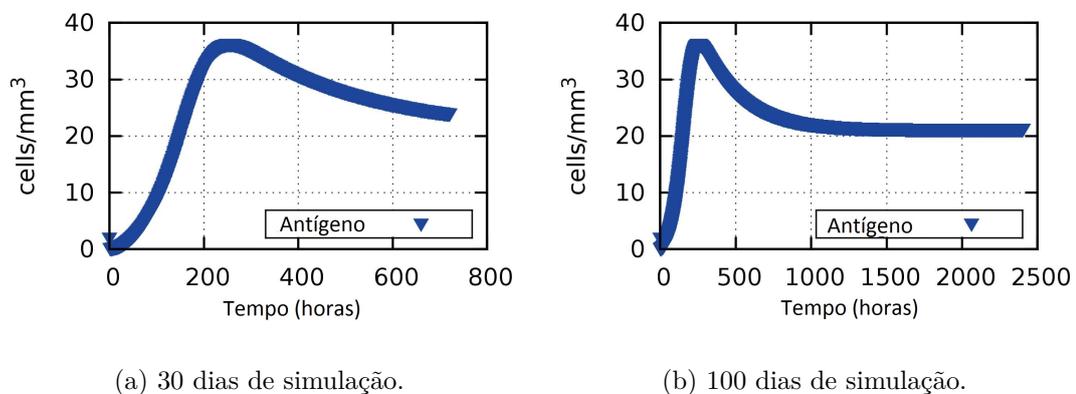


Figura 31 – Os resultados mostram a média de antígenos no tecido contidos apenas pela resposta inata.

Ao longo das simulações, assume-se que os macrófagos no estado de repouso entram no tecido através dos vasos sanguíneos que foram posicionados nas extremidades do domínio de simulação ao longo do eixo y conforme mostrado nas Figuras 32(a) e 32(b). Considerando o domínio tridimensional com 10 mm de lado os vasos foram representados aproximadamente com 2 mm cada um. Escolheu-se utilizar essa representação por possibilitar a visualização da difusão das células ao redor dos vasos. Neste trabalho não testamos outras geometrias pois assumiu-se que esta simplificação atende ao propósito da análise qualitativa do comportamento das células e apresenta boa proporção considerando a escala representada.

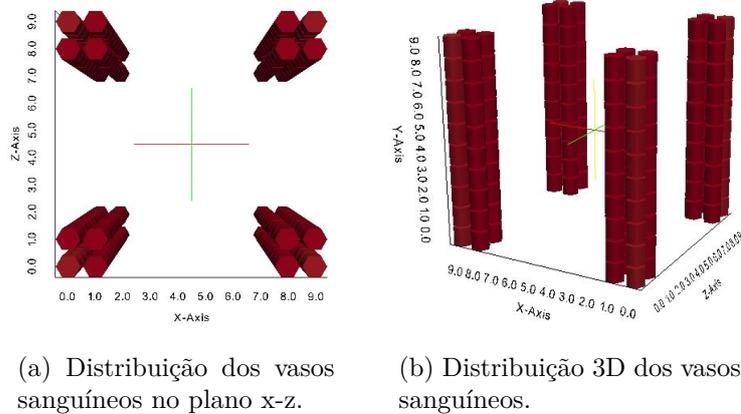


Figura 32 – Esquema representando a posição dos vasos sanguíneos nas extremidades do domínio simulado. Considera-se um domínio cúbico com 10 mm de lado em que os diâmetros dos vasos são aproximadamente 2 mm. Sua localização e geometria foram escolhidas de forma a permitir a visualização da difusão das células.

O conjunto de Figuras 33(a) - 33(d) mostra a difusão dos antígenos em um domínio cúbico com 10 mm de lado. Para essa simulação foi mantida a mesma condição inicial do caso anterior, considerou-se inicialmente apenas a existência de macrófagos no estado de repouso em todo o tecido e a figura foi cortada pela metade para facilitar a visualização dos resultados. Pode ser observado que somente a resposta inata não é suficiente para eliminar a quantidade de antígeno injetada. A resposta inata é capaz de conter o antígeno, no entanto, não é capaz de eliminá-lo para os parâmetros avaliados o que justifica o interesse por estudar a ativação da resposta adquirida.

As Figuras 34(a) e 34(b) mostram as médias das concentrações de macrófagos nos estados repouso e ativado, respectivamente, ao longo de 30 dias. A mudança de estado de repouso para ativado pode ser observada com a redução da população de macrófagos no estado repouso (Figura 34(a)) enquanto a população de macrófagos ativados aumenta (Figura 34(b)). No entanto, as curvas não apresentam soma constante por representarem diferentes taxas de fagocitose e de decaimento aplicadas a cada estado.

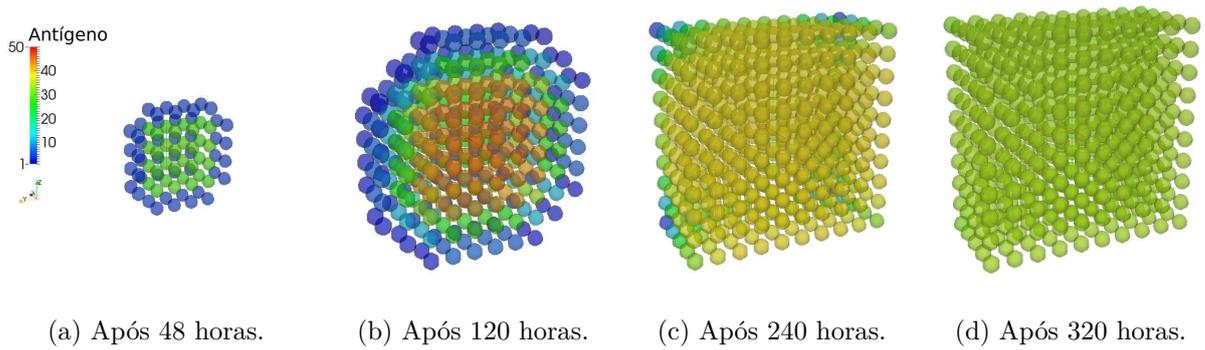


Figura 33 – Difusão dos antígenos durante 30 dias de simulação limitados pela presença de macrófagos. Os macrófagos são capazes de restringir o número de antígenos mas não são capazes de eliminá-los.

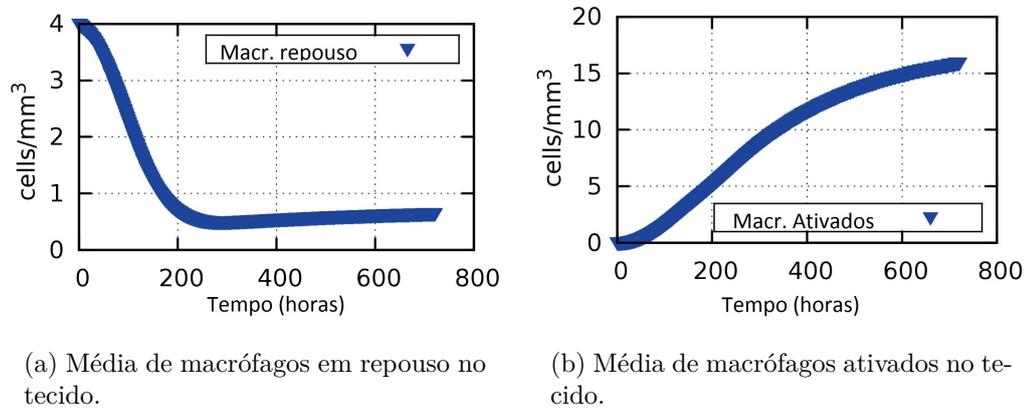
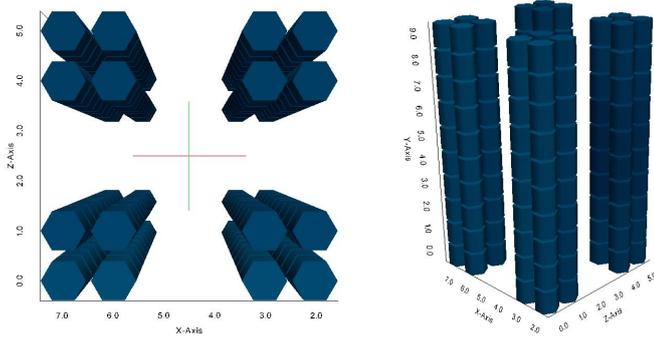


Figura 34 – Macrófagos no tecido durante 30 dias de simulação.

5.3 IMUNIDADES INATA E ADQUIRIDA - ACOPLAMENTO

Esta simulação apresenta o cenário completo do modelo acoplado, com a resposta inata ativando a resposta adquirida. O cenário acoplado foi simulado considerando quatro capilares sanguíneos e quatro capilares linfáticos em um domínio cúbico com 10 mm de lado. Os capilares sanguíneos foram posicionados conforme as Figuras 32(a) e 32(b) e os capilares linfáticos foram posicionados mais ao centro ao longo do eixo y conforme as Figuras 35(a) e 35(b). Essa distribuição é realizada por uma função que pode ser facilmente modificada para permitir diferentes configurações.

Semelhante aos casos analisados anteriormente, foram injetados antígenos apenas na porção central do tecido e considera-se que existem macrófagos em estado de repouso que chegam constantemente pelos capilares sanguíneos. Vemos o acoplamento proposto em funcionamento com os macrófagos que passam para o estado ativo ao encontrarem antígenos migram para o LN (Figuras 36(a) e 36(b)). Podemos inferir isso pois, conforme os macrófagos são ativados, aumenta sua população no tecido, e começam a surgir macrófa-

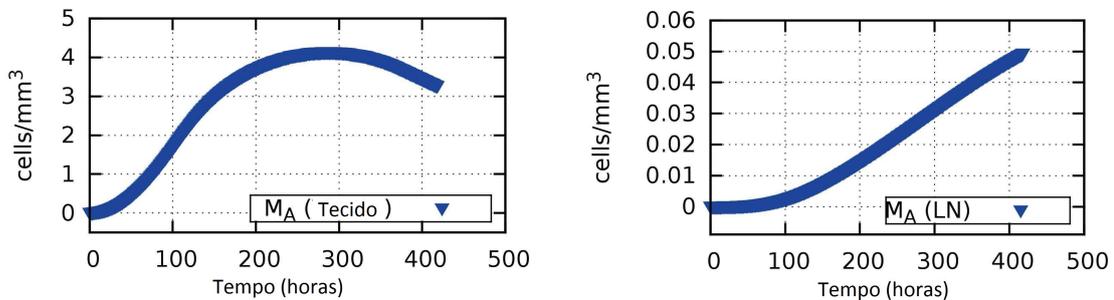


(a) Distribuição dos capilares linfáticos no plano x-z.

(b) Distribuição 3D dos capilares linfáticos.

Figura 35 – Esquema representando o posicionamento dos capilares linfáticos no domínio cúbico com 10 mm de lado. Os diâmetros dos vasos possuem aproximadamente 2 mm e foram posicionados de forma a não sobreponem os locais escolhidos para os vasos sanguíneos.

gos ativados no LN. São apresentadas nas Figuras 36(a) e 36(b) médias das concentrações de macrófagos ativados no tecido ($\text{células}/\text{mm}^3$) e as concentrações de macrófagos ativados no LN mais próximo (células) utilizando escala logarítmica para comparação.



(a) Macrófagos ativados no tecido.

(b) Macrófagos ativados no LN.

Figura 36 – Concentração média de macrófagos ativados no tecido e concentração de macrófagos ativados no linfonodo mais próximo.

Com a chegada dos anticorpos ao tecido, a resposta imune é capaz de combater os antígenos em aproximadamente 20 dias como pode ser visto na Figura 40.

Outra característica do acoplamento é a migração de anticorpos produzidos após a cascata de estímulos no LN para o local no tecido onde está ocorrendo a infecção. Uma média da concentração de anticorpos no tecido é calculada para visualização e comparação com a concentração de anticorpos no LN (Figura 37). Pode ser observado que os anticorpos começam a ser produzidos no início da simulação, após algumas horas, devido a presença de macrófagos ativados no LN. Uma pequena quantidade de anticorpos

migra para o tecido através dos vasos sanguíneos após algumas horas e uma quantidade significativa pode ser observada no tecido em torno de 5-6 dias, o que contribui para a eliminação dos antígenos.

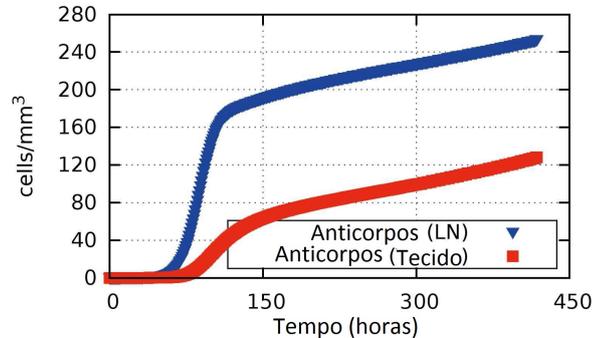


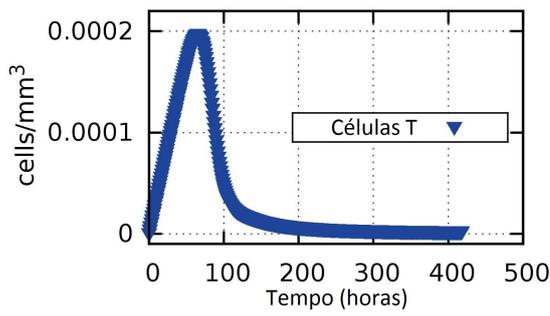
Figura 37 – Presença de anticorpos no tecido e no LN em aproximadamente 20 dias de simulação da presença de um antígeno.

A média de concentração de anticorpos, assim como a dos macrófagos ativados, tende a um estado de equilíbrio ao invés de decair após a eliminação dos antígenos. Isso pode acontecer devido a ausência de um processo de auto-regulação da resposta imune (KIM; LEVY; LEE, 2009). No momento, o modelo representa macrófagos ativados presentes no LN que continuam a estimular os linfócitos a produzirem mais anticorpos que migram para o tecido. Com isso, o decaimento se dá apenas pela morte natural das células envolvidas. No entanto, a resposta adquirida é auto-regulada e a inserção no modelo de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 ou IL-10, poderia representar melhor essa regulação da resposta.

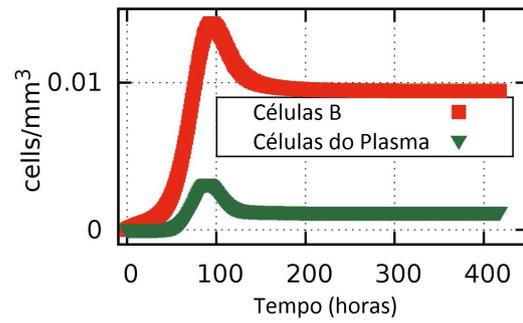
A Figura 38 mostra as concentrações de linfócitos T, linfócitos B e células do Plasma, respectivamente, para 20 dias de simulação. É possível perceber que os linfócitos são ativados desde o princípio da simulação com o aumento das concentrações nas primeiras horas, levando a um pico após 2 dias para os linfócitos T e 5 dias para linfócitos B e células do plasma.

Com a intenção de mostrar o efeito da difusão na chegada dos anticorpos ao tecido, as Figuras 39(a) - 39(f) apresentam a concentração de antígenos no domínio hexaédrico 3D. O cubo foi cortado ao meio para melhor visualização da difusão no centro do domínio, onde são inseridos os antígenos. No total existem 4 vasos linfáticos mas são exibidos apenas metade devido ao corte realizado para a visualização. De forma semelhante, as Figuras 40(a) - 40(f) exibem a difusão dos antígenos no tecido.

Após dois dias do início da simulação da infecção com a injeção dos antígenos na porção central do domínio 3D, é possível visualizar sua difusão (Figura 40(a)). Os antígenos continuam a se difundir lentamente pois são contidos pelas células da resposta inata como os macrófagos, por exemplo, até aproximadamente o 3º dia. Após alguns dias

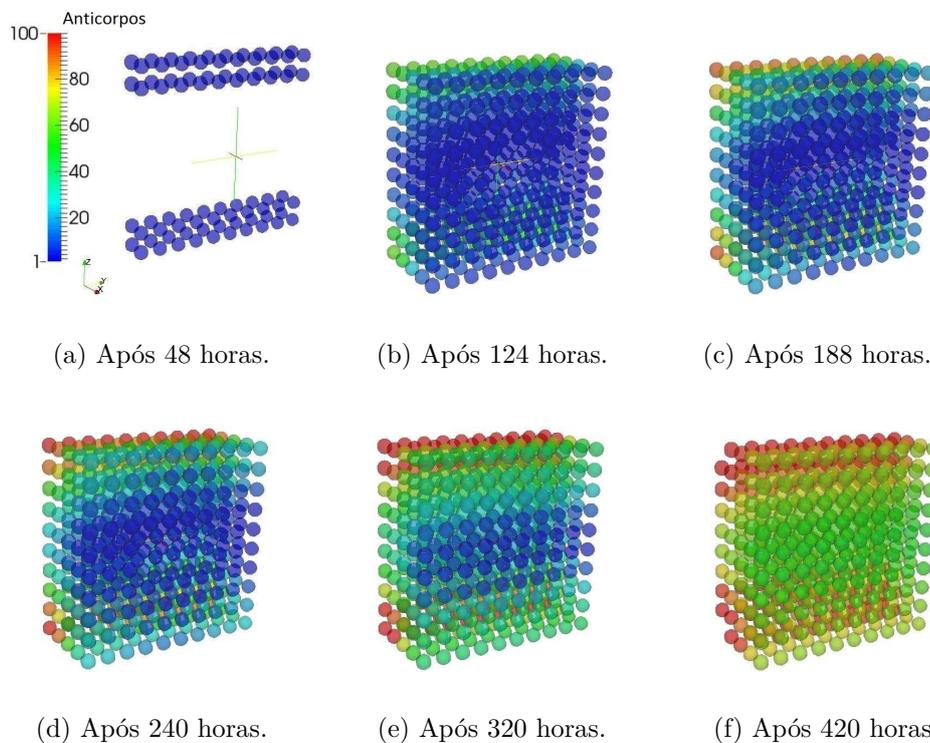


(a) Células T no LN.



(b) Células B e do Plasma no LN.

Figura 38 – Concentrações dos linfócitos T, B e células do Plasma no LN.



(a) Após 48 horas.

(b) Após 124 horas.

(c) Após 188 horas.

(d) Após 240 horas.

(e) Após 320 horas.

(f) Após 420 horas.

Figura 39 – Anticorpos chegando ao tecido através dos vasos sanguíneos. Inicialmente, não existem anticorpos no tecido e, começam a se difundir a partir dos capilares até se espalharem pelo domínio.

a quantidade de anticorpos que chega ao tecido após a ativação ajuda na eliminação dos antígenos através da opsonização, o que faz com que os macrófagos e outros fagócitos possam eliminar os antígenos de forma mais eficiente onde há maior concentração de anticorpos (Figuras 40(c) - 40(f)).

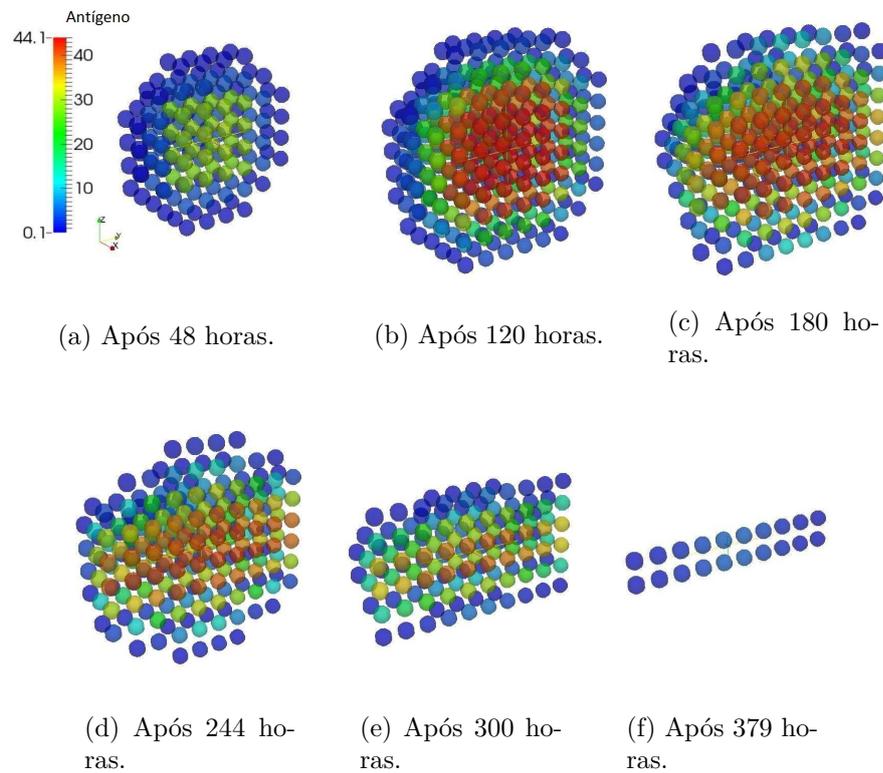


Figura 40 – Difusão dos antígenos durante 20 dias de simulação do modelo acoplado. Os macrófagos são capazes de restringir o crescimento antígenos mas para esse conjunto de parâmetros, não são suficientes para eliminar os antígenos. No entanto, com a chegada de anticorpos no tecido através dos vasos sanguíneos, os macrófagos eliminam completamente os antígenos devido a opsonização dos antígenos pelos anticorpos.

6 RESULTADOS DO ACOPLAMENTO (HCV)

Neste Capítulo são apresentados os resultados obtidos pelo acoplamento de modelos matemáticos da infecção pelo HCV. São apresentadas três comparações com dados obtidos em experimentos de infecção em cultura de células (*in vitro*) e com quantidade de vírus no plasma (*in vivo*).

6.1 VALIDAÇÃO DO MODELO INTRACELULAR - EXPERIMENTO DE TRANSFEÇÃO

Para validar o modelo matemático de infecção do HCV dentro da célula, primeiramente comparou-se os resultados da Equação (4.30) a experimentos de transfeção realizados por Binder *et al.* (2013), em que grandes quantidades de material genético viral são inseridas diretamente em células de cultura para simular uma infecção. Em seu trabalho, utilizou duas linhas de células distintas para avaliar a replicação do HCV durante 72 horas: (a) Huh7-Lunet que é altamente permissiva a replicação do RNA do HCV; (b) Huh7 cells (Huh7-lp) que apresenta níveis reduzidos de permissividade a replicação. Foram medidos a quantidade de RNA viral positivo e negativo usando *strand specific quantitative Northern blotting*.

Binder *et al.* (2013) desenvolveu um modelo matemático complexo representando 13 espécies moleculares com 16 parâmetros em dois compartimentos: citoplasma e complexo de replicação. Um esquema do modelo definido por Binder *et al.* (2013) é apresentado na Figura 41. Utilizando o modelo matemático intracelular proposto aqui (Equação (4.30)) pode-se ajustar parâmetros para os dois tipos de células utilizados no experimento (Figura 42), obtendo resultados similares ao modelo mais complexo utilizado na referência supracitada. O modelo da Equação (4.30) foi capaz de reproduzir o decaimento inicial observado após a transfeção em ambos os tipos de células e o platô durante as 72 h medidas. Utilizando o mesmo modelo, apenas modificando parâmetros (Tabela 4), foi possível capturar as diferenças de permissividade, Figuras 42(a) e 42(b).

Outra forma de validação que foi possível realizar ainda comparando-se à mesma referência (BINDER *et al.*, 2013) foi testar a fase de tradução do RNA. A quantidade de RNA positivo de vírus com problemas na replicação medida experimentalmente reflete o RNA disponível para tradução, apenas decaindo. Para representar a ausência de replicação no modelo, inicializamos o parâmetro que representa a taxa em que o RNA positivo disponível para a tradução passa para o complexo de replicação, $\sigma = 0$, significando que o RNA positivo não inicia a replicação. Na ausência de replicação, o RNA positivo do HCV decai exponencialmente e nenhum filamento de RNA negativo é formado, não iniciando o complexo de replicação (Figura 43).

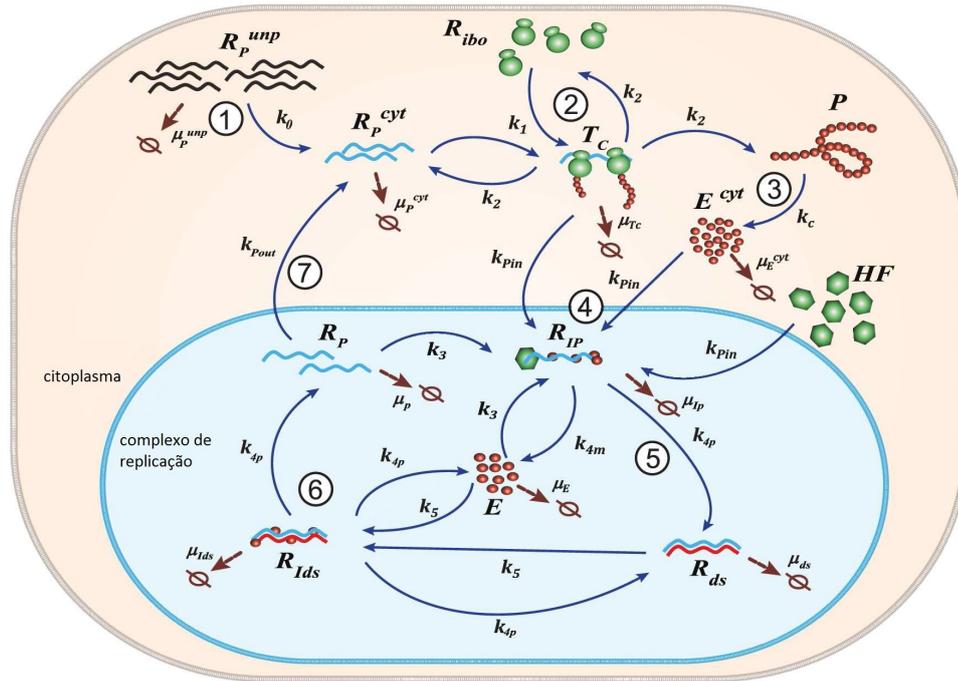
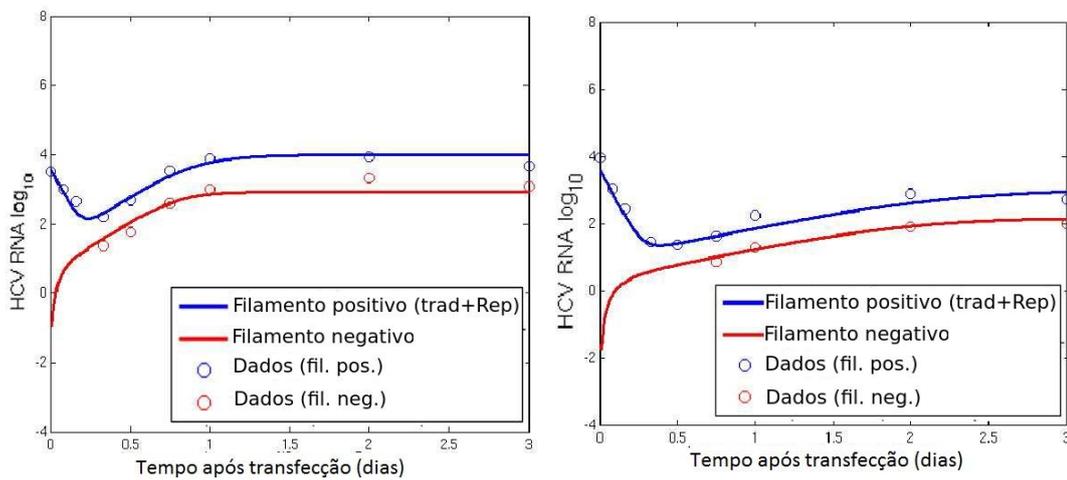


Figura 41 – Esquema representando o modelo matemático complexo desenvolvido por Binder *et al.* (2013). RNA viral entra na célula (1), ribossomos se ligam ao RNA formando um complexo de tradução, traduzindo a poliproteína (2), a poliproteína é clivada nas proteínas maduras (3), as proteínas virais induzem a formação do complexo de replicação e inicia a replicação do RNA positivo (4), o RNA negativo complementar é transcrito (5) e RNA positivo pode ser liberado do complexo de replicação para o citoplasma. Adaptado de Binder *et al.* (2013).



(a) **Huh7-Lunet** (alta permissividade)

(b) **Huh7-lp** (baixa permissividade)

Figura 42 – Replicação do RNA viral. Círculos representam os dados experimentais de Binder *et al.* (2013) e linhas representam os resultados obtidos com o modelo descrito nesse trabalho com os conjuntos distintos de parâmetros para cada tipo de célula (a) alta e (b) baixa permissividade.

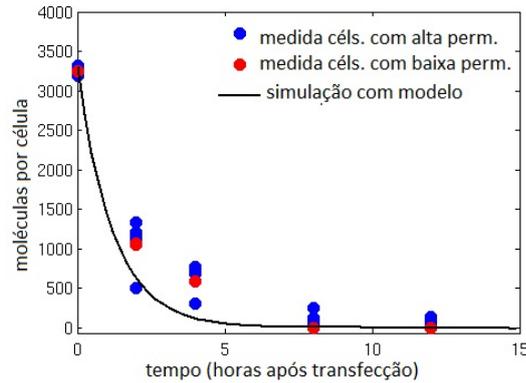


Figura 43 – Comparação dos resultados obtidos com o modelo ao experimento com deficiência de replicação de RNA do HCV em células com alta e baixa permissividade. Inicializando $\sigma = 0$ no modelo, para ambos os conjuntos de parâmetros, foi possível visualizar somente o decaimento de RNA. Os pontos representam os dados experimentais (BINDER *et al.*, 2013).

Tabela 4 – Conjuntos de parâmetros do modelo para validação através da comparação ao experimento de transfecção (BINDER *et al.*, 2013).

Nome	Huh7-Lunet	Huh7-lp	Unidade	Significado
α	60	20	dia ⁻¹	Taxa de replicação de R_c
ρ	0.1	0.1	dia ⁻¹	Taxa de exportação de R_t e R_c
μ_t	20	20	dia ⁻¹	Taxa de decaimento natural de R_t
r	2.1	1	dia ⁻¹	Taxa de replicação de R_m
μ_c	3.4	1.7	dia ⁻¹	Taxa de decaimento do complexo de replicação
R_{max}	1000	200	moléculas cel ⁻¹	Número máximo de complexos de replicação R_m
σ	0.3	0.1	dia ⁻¹	Taxa em que R_t passa para R_c
θ	2.1	1.2	dia ⁻¹	Taxa em que R_c passa para R_t
k	0.8	0.8	-	Coefficiente da função exponencial da taxa de exportação
τ	0.5	0.5	dia	Atraso de tempo para exportação
R_{t_0}	4000	4000	moléculas cel ⁻¹	Condição inicial de R_{t_0}
R_{c_0}	0	0	moléculas cel ⁻¹	Condição inicial de R_{c_0}
R_{m_0}	0	0	moléculas cel ⁻¹	Condição inicial de R_{m_0}

6.2 VALIDAÇÃO DO MODELO INTRACELULAR - INFECÇÃO

O modelo intracelular também foi comparado a um experimento de infecção *in vitro* de Keum *et al.* (2012). Naquele trabalho, foi quantificado o número de RNA viral positivo e negativo em células Huh.5.1 utilizando análise do genoma do HCV em tempo real, RT-PCR. Ajustamos um conjunto de parâmetros sem modificar o modelo intracelular, que foi capaz de reproduzir a dinâmica da replicação do RNA do HCV desde o início de

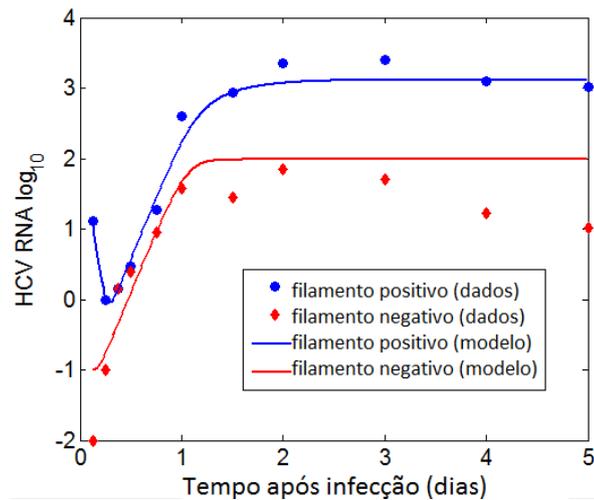


Figura 44 – Comparação dos resultados obtidos com a simulação do modelo matemático intracelular aos dados obtidos com o experimento de infecção *in vitro*. Os pontos representam os dados da referência Keum *et al.* (2012) e as linhas representam os resultados do modelo intracelular que considera tradução e replicação do RNA.

uma infecção. A Figura 44 exibe o resultado do ajuste de parâmetros realizado, onde os círculos representam os dados obtidos pela referência de forma experimental (KEUM *et al.*, 2012).

Naquele experimento, a exportação de RNA positivo também foi medida, e estimou-se que 10 % do RNA positivo é exportado. Por isso, inicializamos o parâmetro que representa a taxa de exportação como $\rho = 0.1 \text{ dia}^{-1}$ com atraso na exportação de 12 horas e sem utilizar os parâmetros da terapia, para simular o início de uma infecção (Figura 45). Os outros parâmetros que foram utilizados são: $t_0 = 0$, $R_{t_0} = 12.8$, $\alpha = 30 \text{ dia}^{-1}$, $\mu_t = 24 \text{ dia}^{-1}$, $r = 3.18 \text{ dia}^{-1}$, $\mu_c = 1.05 \text{ dia}^{-1}$, $R_{max} = 100 \text{ moléculas}$, $\sigma = 0.1 \text{ dia}^{-1}$, $\theta = 1.2 \text{ dia}^{-1}$.

6.3 EFEITO DA TERAPIA - SIMULANDO O MODELO ACOPLADO

Após a validação do modelo intracelular, foi necessário validar também o modelo multi-escala acoplado. Uma dificuldade encontrada durante essa validação foi a inexistência de dados experimentais que quantifiquem o RNA intracelular de humanos *in vivo*, sendo possível apenas, por enquanto, estudá-los em modelos animais, matemáticos e computacionais. No entanto, as cargas virais no plasma, que também são representadas pelo modelo, são mais facilmente obtidas e permitem a comparação e validação do modelo acoplado. Dessa forma é possível utilizar o modelo acoplado para realizar análises e criar hipóteses teóricas do comportamento da replicação do RNA do HCV dentro das células humanas.

A validação do modelo acoplado foi realizada através do ajuste de um conjunto

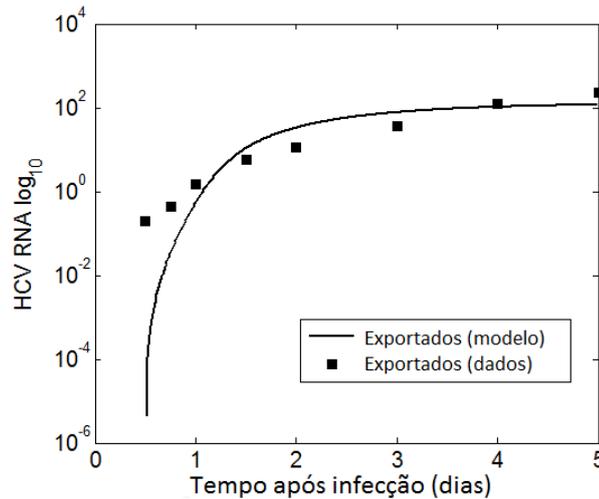


Figura 45 – Exportação do RNA do HCV. Pontos representam os dados obtidos experimentalmente (KEUM *et al.*, 2012) e a linha representa o resultado da simulação do modelo intracelular.

de parâmetros que representam a dinâmica do HCV em humanos. As Equações que representam o modelo acoplado da infecção por HCV, Equação (4.39) e Equação (4.40), tiveram seus parâmetros mais sensíveis ajustados aos dados de pacientes tratados com uma dose de 10 mg ou 100 mg de Daclatasvir (DCV) (GUEDJ *et al.*, 2013) por dois dias considerando que uma infecção já havia sido formada e se encontrava num estado de equilíbrio com o sistema imune. DCV é um medicamento antiviral de ação direta (DDA) que inibe a proteína NS5A, que atua inibindo a replicação de RNA do HCV (LEE, 2013; SCHEEL; RICE, 2013).

O conjunto de parâmetros específicos para representar a dinâmica do RNA do HCV em humanos *in vivo* está apresentado na Tabela 5. Assumiu-se em todas as simulações realizadas até o momento que apenas um vírus entra em cada célula, não havendo superinfecção. A partir desse conjunto de parâmetros foram estimados os outros parâmetros do modelo e a variação obtida para cada conjunto de dados dos pacientes é mostrada na Tabela 6.

As Figuras 46 e 47 mostram os resultados obtidos com a simulação do modelo acoplado multi-escala comparado aos dados de cada paciente. O parâmetro que representa a taxa de replicação de RNA positivo foi fixado $\alpha = 30d^{-1}$ e os parâmetros que representam um fator para o aumento no decaimento do RNA com terapia também $\kappa_t = \kappa_c = 1d^{-1}$.

Ao calcularmos o número esperado de RNA por célula podemos analisar o efeito da terapia na replicação do RNA intracelular (Figura 47). Observa-se um aumento no número de RNA positivo disponível para tradução, já que essa etapa não é afetada pela terapia. No entanto, após o início do tratamento percebe-se que não há formação de novos complexos de replicação, que apenas decaem na presença do DCV.

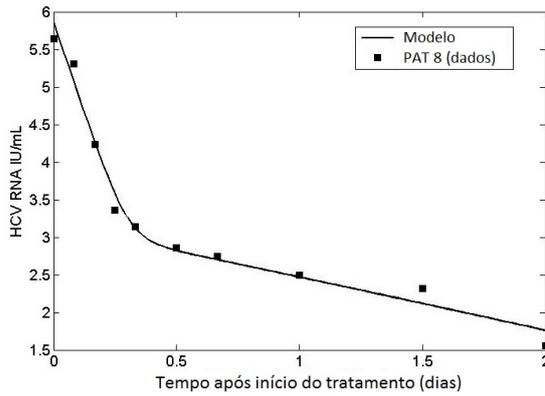
Tabela 5 – Conjuntos de parâmetros base do modelo para validação através da comparação ao experimento de transfecção (BINDER *et al.*, 2013).

Nome	Valor	Unidade	Referência
α	30	dia ⁻¹	(RONG <i>et al.</i> , 2013)
ρ	8.18	dia ⁻¹	(RONG <i>et al.</i> , 2013)
δ	0.14	dia ⁻¹	(RONG <i>et al.</i> , 2013)
c	22.3	dia ⁻¹	(RONG <i>et al.</i> , 2013)
$\kappa_t = \kappa_c$	1	dia ⁻¹	Estimado
σ	1.3	dia ⁻¹	Estimado (<i>in vitro</i>)
θ	1.2	dia ⁻¹	Estimado (<i>in vitro</i>)
ϵ_α	0.99	-	(GUEDJ <i>et al.</i> , 2013)
ϵ_s	0.998	-	(GUEDJ <i>et al.</i> , 2013)

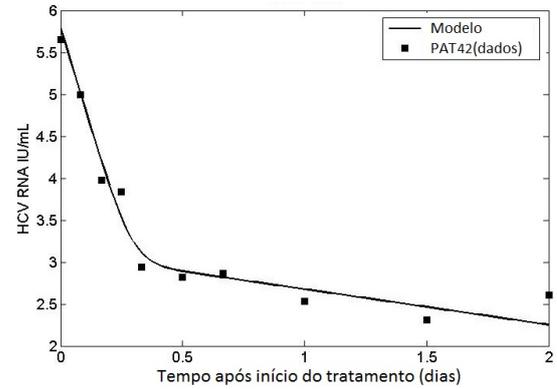
Tabela 6 – Conjunto de parâmetros ajustados para as simulações de experimentos *in vivo* com o modelo acoplado. São mostrados apenas os parâmetros que permitimos que variassem. Fixamos os parâmetros $\alpha = 30d^{-1}$ e $\kappa_t = \kappa_c = 1d^{-1}$.

Parâmetro	PAT 8	PAT 42	PAT 68	PAT 69	PAT 83
δ	0.58	0.64	0.1	0.47	0.62
μ_t	0.89	0.89	0.88	0.89	0.89
r	1.49	1.1	5.08	2.24	1.61
μ_c	2.55	1.72	3.38	3.15	2.39
ϵ_α	0.928	0.909	0.992	0.936	0.924
ϵ_r	0.47	0.12	0.61	0.36	0.29
Erro	0.496	0.619	0.69	0.71	0.96

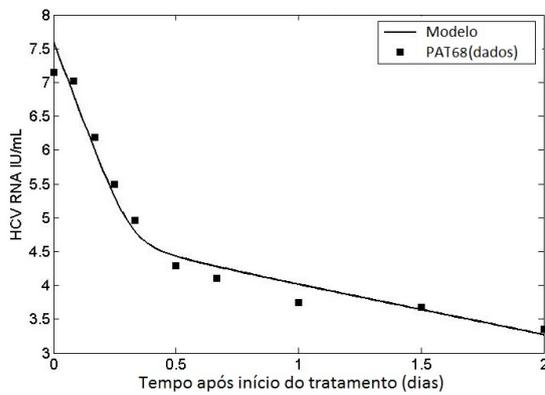
O modelo multi-escala, portanto, foi capaz de reproduzir as cargas virais de pacientes durante tratamento com DCV e o modelo desenvolvido para representar as dinâmicas intracelular foi validado através da comparação a dados experimentais *in vitro*.



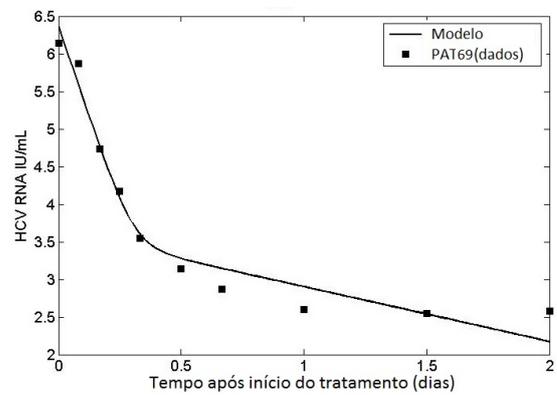
(a) PAT 8



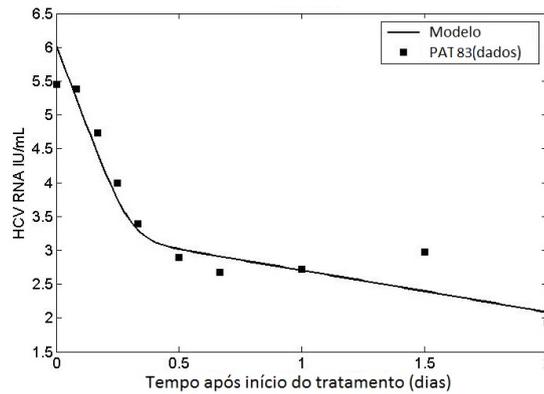
(b) PAT 42



(c) PAT 68

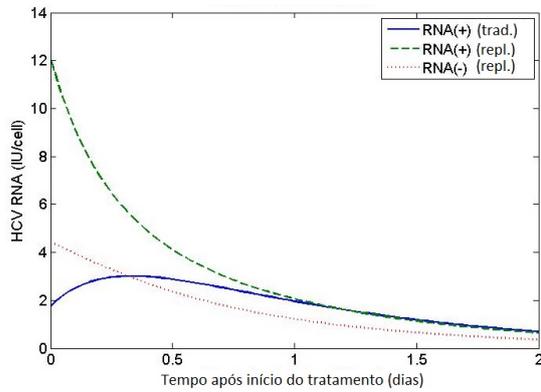


(d) PAT 69

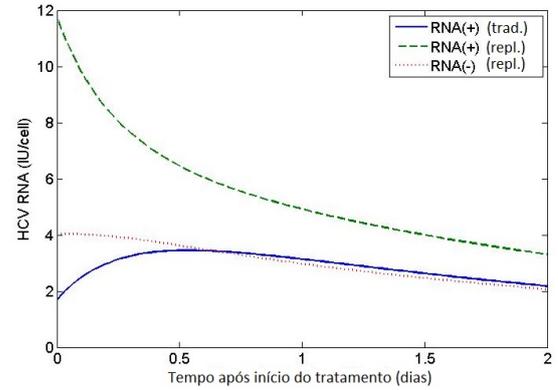


(e) PAT 83

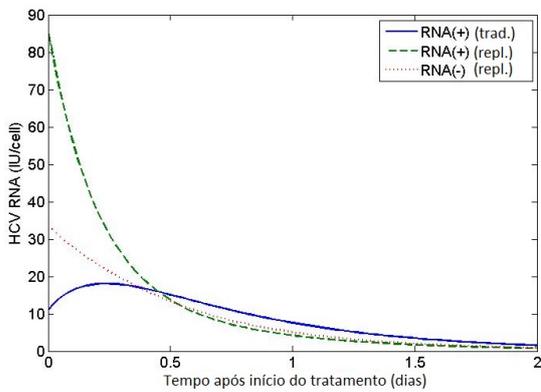
Figura 46 – Ajuste de parâmetros do modelo acoplado com relação a dados experimentais contendo a carga viral para 5 pacientes distintos por 2 dias após uma dose de 10 mg ou 100 mg de DCV da referência Guedj *et al.* (2013). Os resultados obtidos com a simulação do modelo acoplado são representados pelas linhas e os dados dos pacientes como quadrados. Os parâmetros mais significativos são mostrados na Tabela 6.



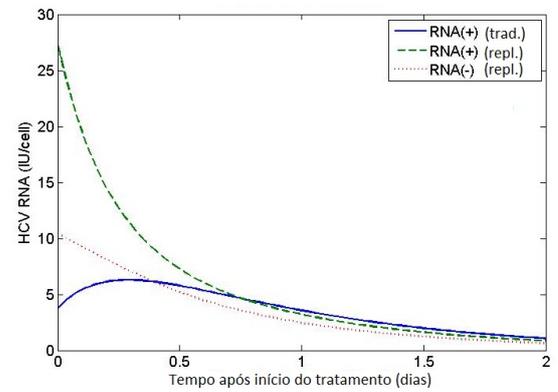
(a) PAT 8



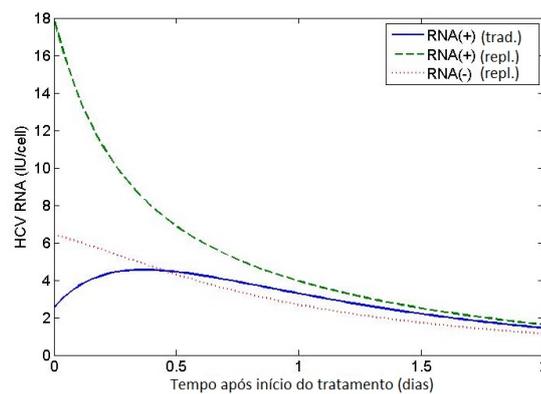
(b) PAT 42



(c) PAT 68



(d) PAT 69



(e) PAT 83

Figura 47 – Dinâmicas do RNA positivo disponível para tradução (trad.) e dos RNA positivo e negativo no complexo de replicação (repl.) obtidas com as simulações do modelo acoplado para cada um dos 5 pacientes tratados com DCV. Parâmetros mais significativos são mostrados na Tabela 6.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS

7.1 INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é um dos sistemas mais complexos presentes no corpo humano e tem como principal papel identificar e exterminar os patógenos nos defendendo da morte por infecções (MARCHUK, 1997; PERELSON; WEISBUCH, 1997). A compreensão da interação dos patógenos com o sistema imune permite o desenvolvimento de terapias e vacinas (ABBAS; LICHTMAN, 2010; SOMPAYRAC, 2008), no entanto, a sua grande complexidade e a interação entre seus muitos componentes, em níveis distintos, tornam a tarefa extremamente complicada.

Uma ferramenta que tem sido de grande auxílio para o entendimento do funcionamento deste sistema é a modelagem matemática que permite que pesquisadores da área de imunologia possam realizar experimentos *in silico* e testar hipóteses em um curto período de tempo através de análises do comportamento do modelo, ajudando no direcionamento de estudos *in vitro* e *in vivo* (CELADA; SEIDEN, 1992; PERELSON, 2002; DEEM, 2005; KIM; LEVY; LEE, 2009; NAMAS *et al.*, 2013). Utilizam-se diversas abordagens, entre elas acoplamento de modelos matemáticos em diferentes escalas e compartimentos (KIRSCHNER *et al.*, 2007; WAKELAND; MACOVSKY; AN, 2007; RONG *et al.*, 2013).

A partir desse cenário foi feita a seguinte pergunta científica:

Como relacionar informações em diferentes escalas da resposta imune disponíveis atualmente, obtidas através de experimentos *in vitro* e *in vivo*?

para a qual apresentamos uma possível resposta com o acoplamento de modelos matemáticos. Este capítulo apresenta um fechamento do trabalho respondendo à pergunta científica e comentando as etapas, as dificuldades obtidas, sugestões de trabalhos futuros e considerações finais.

7.2 SÍNTESE

Foram apresentados dois exemplos de acoplamentos de modelos matemáticos distintos em diferentes escalas com a intenção de responder a hipótese formulada.

O primeiro exemplo escolhido, como uma prova de conceito, foi uma representação matemática espaço-temporal da infecção pela bactéria *S. aureus* no pulmão com a ativação da resposta sistêmica nos linfonodos. Esse exemplo baseou-se em dois modelos pré-existentes (PIGOZZO *et al.*, 2012; MARCHUK, 1997), cada um representando aspectos distintos da resposta imune, e que já possuíam parâmetros validados e disponíveis. Esses modelos foram então simplificados e realizou-se o acoplamento dos modelos simplificados utilizando variáveis que fossem comuns a ambos os modelos. No caso da resposta

imune, as variáveis comuns que ligam os dois tipos de resposta são a célula apresentadora de antígenos e os anticorpos. A primeira que pode ser tanto um macrófago quanto uma célula dendrítica, pois ambos fazem parte da primeira linha de defesa e funcionam como apresentadoras, se comunicando com as células da resposta adquirida. A segunda é produzida após o estímulo da resposta específica e age no local da infecção.

Nesse primeiro exemplo, optou-se por utilizar modelos previamente elaborados que já possuíam parâmetros validados. No entanto, no momento em que esses modelos foram acoplados e uma nova dimensão foi introduzida, os mesmos parâmetros precisaram ser ajustados para acompanhar a nova realidade representada. Foram apresentados os resultados com uma análise qualitativa dos fenômenos representados. Foi possível perceber que o acoplamento proposto funciona transportando os macrófagos para o LN mais próximo e os anticorpos para o local da infecção.

Foi realizada uma extensiva pesquisa sobre o funcionamento dos sistemas imunológicos com ênfase nos mecanismos de defesa inata e adquirida. Foi realizada também uma pesquisa com relação aos modelos existentes para representar esses mecanismos biológicos e, a partir dessa pesquisa, partiu-se para a implementação computacional dos modelos mencionados acima. Este acoplamento ofereceu uma representação adicional da resposta imune específica a um antígeno da bactéria *S. aureus* causadora da pneumonia em um organismo afetado pelo vírus da gripe.

O segundo exemplo foi o acoplamento de modelos matemáticos para representar uma infecção pelo vírus da hepatite C no fígado, considerando duas dimensões de tempo no tecido: uma que representa o tempo desde o início da infecção e outra para que a simulação possa ser realizada a partir de qualquer tempo após a infecção estar estabelecida, para possibilitar o estudo dos efeitos da terapia, por exemplo. Esse acoplamento também foi baseado em modelos preexistentes (RONG *et al.*, 2013; GUEDJ; NEUMANN, 2010) com a diferença que o acoplamento para a infecção do vírus da hepatite C já havia sido realizado (RONG *et al.*, 2013) e apenas estendemos uma escala.

Os modelos utilizados para esse acoplamento também foram validados previamente e os parâmetros foram aproveitados, quando possível, dependendo dos cenários simulados. O modelo intracelular foi estendido acrescentando uma representação para o filamento de RNA negativo no complexo de replicação e uma representação para o RNA positivo disponível para tradução. Não foi encontrado nenhum modelo para replicação de RNA do vírus da hepatite C nesse formato. O acoplamento deste novo modelo intracelular a um modelo de infecção estabelecido foi capaz de reproduzir dados experimentais de tratamento de pacientes por dois dias.

Apresentamos dois acoplamentos de modelos matemáticos, sendo que o primeiro trouxe uma nova forma de representar a resposta imune de forma tridimensional em um tecido infectado por uma bactéria que se reproduz e podem ser identificadas por células

do sistema inato que se tornam células apresentadoras de antígenos e migram para outro compartimento, para estimular os linfócitos que produzem anticorpos (QUINTELA; SANTOS; LOBOSCO, 2014). Modelos matemáticos que representem mais de um compartimento tem sido utilizados para representar vários tipos de infecções (KIRSCHNER *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2009; MARINO *et al.*, 2010) e a diferença que apresentamos está no formato do acoplamento realizado, que acredita-se ser um diferencial para futuras comparações a diagnósticos por imagens e análises matemáticas.

Modelos baseados em idade já foram apresentados no contexto de infecções no hospedeiro (NELSON *et al.*, 2004; RONG *et al.*, 2013) e uma representação do complexo de replicação de vírus do HCV considerando os dois filamentos de RNA foi apresentada por Guedj e Neumann (2010). No entanto, apresentamos um acoplamento de modelos que incluem características baseadas em idade de infecção com um modelo intracelular que representa dois filamentos de RNA no complexo de replicação e uma representação do RNA positivo disponível para tradução que não foi realizado anteriormente. Dessa forma, obteve-se uma representação mais realística da replicação do vírus da hepatite C durante a infecção e tratamento. Espera-se contribuir para o estudo de terapias a partir dessa nova representação acoplada (QUINTELA *et al.*, em preparação.).

Concluindo, a principal contribuição deste trabalho para o estado da arte em imunologia de sistemas foi uma possibilidade de representar a integração de diferentes níveis da resposta imune a doenças infecciosas utilizando modelos matemáticos. Conseqüentemente, oferecendo dois exemplos de acoplamento que podem ser estendidos e aplicados como uma ferramenta adicional para ajudar os imunologistas. Como uma forma de facilitar a realização de outros acoplamentos de aspectos distintos da resposta imune à uma infecção podemos sugerir os seguintes passos, que foram utilizados no presente trabalho:

1. A partir de um problema existente, identificar modelos matemáticos distintos que possuam uma variável comum ou que permitam a inclusão de uma nova variável para relacioná-los de forma a representar um cenário mais realista que permita estudar o problema em questão.
2. Realizar a conversão das unidades dos parâmetros de algum dos modelos caso seja necessário.
3. Caso os modelos representem escalas distintas da resposta imune, estudar possíveis formas de relacionar essas escalas de acordo com o comportamento da variável que está sendo representada nas escalas escolhidas. No presente trabalho apresentamos dois exemplos, sendo que no primeiro as variáveis migram de um compartimento a outro, o que foi representado utilizando um termo que modela o fluxo entre os dois compartimentos a uma determinada taxa. No segundo exemplo, a variável que

aparece nas duas escalas foi representada considerando-se um termo que modela o desaparecimento em um local e surgimento instantaneamente no outro.

4. Adaptar os modelos ao acoplamento, incluindo novas variáveis, se for preciso.
5. Validar o modelo matemático acoplado através de comparação a resultados obtidos por outros modelos de experimentos *in vitro* ou *in vivo* disponíveis, para que seja possível a utilização desse novo modelo acoplado para estudar o comportamento desejado.

Os exemplos abordados nesta tese consideraram acoplamentos entre dois modelos, no entanto, acreditamos que outras escalas ou compartimentos possam ser acrescentados conforme a necessidade de estudar mais aspectos envolvidos.

7.3 LIMITAÇÕES DA PESQUISA

A maior dificuldade encontrada durante o desenvolvimento de modelos que representem fenômenos biológicos como a resposta imune é a disponibilidade de parâmetros para alimentar o modelo. Devido ao uso, principalmente, de uma abordagem científica reducionista na realização de experimentos biológicos, há uma grande dificuldade de encontrar em um mesmo trabalho dados relacionados a células e moléculas do sistema imune durante uma infecção, sendo necessário recorrer a uma extensa pesquisa em busca de informações para representar um determinado cenário olhando-se de vários ângulos diferentes, como foi a intenção do presente trabalho.

Durante a realização da pesquisa percebeu-se que o desenvolvimento de modelos computacionais muito complexos que representem vários aspectos da resposta imune a uma infecção se torna complicado devido a dificuldade de encontrar modelos *in vivo* ou *in vitro* que representem esse cenário. Representar a resposta imune humana também é algo complicado pois a tecnologia existente para quantificar células da resposta imune se baseia em coleta de sangue e não é possível até o momento quantificar células no tecido de humanos vivos de forma simples.

Para o segundo acoplamento, esperava-se acrescentar uma representação mais detalhada da resposta imune ao vírus, com células efectoras ou representando a ação de citocinas dentro das células infectadas. No entanto, essas quantidades ainda não são completamente conhecidas durante o desenvolvimento de uma infecção em um humano. Por isso representamos apenas uma taxa em que o vírus pode ser eliminado pelo sistema imune, sem detalhar a resposta como no primeiro caso.

7.4 RECOMENDAÇÕES E TRABALHOS FUTUROS

A escolha por implementar uma representação da resposta inata utilizando um domínio tridimensional vislumbra a possibilidade de simular cenários de doenças, como por exemplo a pneumonia, em que há um dano causado ao tecido que pode ser visualizado através de exames de imagens. Espera-se que seja possível utilizar essa representação tridimensional para estudo da dinâmica do patógeno no pulmão durante uma infecção, com adição de outras características e validação por comparação a imagens de diagnósticos. Esse tipo de representação pode ser mais custosa computacionalmente por aumentar significativamente o número de elementos no domínio, requerendo a utilização de técnicas como a computação paralela. O modelo tridimensional da resposta inata já foi paralelizado utilizando unidades de processamento gráfico de propósito geral (GPGPUs) (XAVIER, 2013) e o acoplamento ao modelo da resposta adquirida no formato apresentado neste trabalho está em desenvolvimento prevendo a necessidade de escalabilidade para problemas mais complexos.

No caso do acoplamento do modelo de infecção do vírus da hepatite C este trabalho apresentou uma continuação do estudo que vem sendo realizado com o surgimento de novas opções de terapia. Espera-se acrescentar outras hipóteses ao modelo, como por exemplo, considerar como a superinfecção, onde mais de um filamento de RNA viral distinto pode infectar a mesma célula (TSCHERNE *et al.*, 2007; SCHALLER *et al.*, 2007; WEBSTER *et al.*, 2012; WEBSTER; OTT; GREENE, 2013) e as altas taxas de mutação do vírus da hepatite C no nível intracelular (SANJUAN *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2012) podem afetar no tratamento. Devido ao número reduzido de complexos de replicação esperado para células infectadas de humanos, seria interessante explorar uma abordagem estocástica para o modelo intracelular.

Uma vantagem da existência de modelos computacionais que representem uma infecção é a possibilidade de estudar os possíveis resultados na ausência de alguns elementos da resposta imune, por exemplo, sem a necessidade de realizar vários experimentos *in vivo*, que são muito mais caros em termos financeiros e temporais, permitindo o direcionamento desses experimentos baseados nas análises matemáticas do modelo e simulações de vários cenários que podem ser realizadas em um espaço de tempo razoável.

Acreditamos que a partir de uma representação validada da resposta imune a uma infecção seja possível realizar estudos teóricos, com análises matemáticas e simulações, que possam acrescentar ao conhecimento atual da resposta imune. Parcerias entre equipes teóricas e experimentalistas que entendam a necessidade de cada tipo de representação podem facilitar o estudo de sistemas complexos como o sistema imune e o estabelecimento e tratamento de infecções.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Basic Immunology Updated Edition: Functions and Disorders of the Immune System*. [S.l.]: Elsevier Health Sciences, 2010.
- AFZAL, M. S. *et al.* Regulation of core expression during the hepatitis c virus life cycle. *Journal of General Virology*, v. 96, p. 311–21, 2014.
- AGRAWAL, N. G. B.; LINDERMAN, J. J. Mathematical modeling of helper t lymphocyte / antigen-presenting cell interactions: analysis of methods and modifying antigen processing and presentation. *J. theor. Biol.*, v. 182, n. 4, p. 487–504, 1996.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J. *Molecular Biology of the Cell*. 4. ed. New York: Garland Science, 2002.
- AN, G.; LEE, I. A. Computer simulation to study inflammatory response. *Simulation and Gaming*, v. 32, n. 3, p. 344–361, 2001.
- APPEL, N. *et al.* From structure to function: New insights into hepatitis c virus rna replication. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 14, p. 9833–9836, 2006.
- ATKINSON, K. E. *An Introduction to Numerical Analysis*. [S.l.]: Wiley, 1978.
- AVENDAÑO, R. *et al.* A mathematical model for the dynamics of hepatitis c. *Journal of Theoretical Medicine*, v. 4, p. 109–118, 2001.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature*. [S.l.: s.n.], 1998. v. 392, cap. 19.
- BANERJEE, S.; KEVAL, R.; GAKKHAR, S. Modeling the dynamics of hepatitis c virus with combined antiviral drug therapy: Interferon and ribavirin. *Mathematical Biosciences*, v. 245, n. 2, p. 235 – 248, 2013. ISSN 0025–5564.
- BARROZO, S.; YANG, H. M. Desenvolvimento de um modelo para resposta imunológica primária célula-mediada. *Tendências em matemática aplicada e computacional*, v. 7, n. 1, p. 31–41, 2006.
- BERNASCHI, M.; CASTIGLIONE, F. Design and implementation of an immune system simulator. *Comput. Biol. Med.*, v. 31, n. 5, p. 303–331, 2001.
- BESSAUD, M. *et al.* Development of a taqman rt-pcr assay for the detection and quantification of negatively stranded rna of human enteroviruses: evidence for false-priming and improvement by tagged rt-pcr. *J Virol Methods*, v. 153, p. 182–9, 2001.
- BINDER, M. *et al.* Replication vesicles are load- and choke-points in the hepatitis c virus lifecycle. *PLOS Pathogens*, v. 9, n. 8, p. e1003561, Aug 2013.
- BISCEGLIE, A. M. D. *Essentials of Hepatitis C Infection*. [S.l.]: Springer Healthcare, 2010. ISBN 978-1-89813-445-3.
- BOER, R. J. D. Symmetric idiotypic networks: Connectance and switching, stability and suppression. In: PERELSON, A. S. (Ed.). *Theoretical Immunology Part Two. SFI Studies in the Science of Complexity*. [S.l.]: Addison-Wesley, 1988. III, p. 265–289.

- BOYCE, W. E.; DIPRIMA, R. C. *Elementary Differential Equations and Boundary Value Problems*. [S.l.]: John Wiley and Sons, 2001.
- BRODSKY, F. M.; GUAGLIARDI, L. E. The cell biology of antigen processing and presentation. *Annual review of immunology*, 1991. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.iy.09.040191.003423>>.
- BROMLEY, S. K. *et al.* The immunological synapse. *Annual Review of Immunology*, p. 375–396, 2001.
- CALBO, E.; GARAU, J. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 35, n. 2, p. 107–113, 2009.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L.-a. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infection and Immunity*, Am Soc Microbiol, v. 68, n. 12, p. 6511–6518, 2000. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/68/12/6511.short>>.
- CASTIGLIONE, F.; BERNASCHI, M. C-immsim: playing with the immune response. In: *Sixteenth International Symposium on Mathematical Theory of Networks and Systems (MTNS2004)*. [S.l.: s.n.], 2004.
- CASTILLO-CHAVEZ, C.; FENG, Z. To treat or not to treat: The case of tuberculosis. *JMB*, v. 35, p. 629–56, 1997.
- CELADA, F.; SEIDEN, P. E. A computer model of cellular interactions in the immune system. *Immunology Today*, v. 13, n. 2, 1992.
- CHATEL-CHAIX, L.; BARTENSCHLAGER, R. Dengue Virus- and Hepatitis C Virus-Induced Replication and Assembly Compartments: the Enemy Inside – Caught in the Web. *Journal of Virology*, American Society for Microbiology, v. 88, n. 11, p. 5907–5911, jun. 2014. ISSN 1098-5514. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/jvi.03404-13>>.
- CHATERJEE, A.; GUEDJ, J.; PERELSON, A. S. Mathematical modelling of hcv infection: what can it teach us in the era of direct-acting antiviral agents? *Antiviral Therapy*, v. 17, p. 1171–1182, 2012.
- CHMEL, H.; PERSON, A.; TECSON-TUMANG, F. Studies on multi-antibiotic resistant strains of staphylococcus aureus. *Infection*, v. 10, n. 3, p. 173–176, 1981. ISSN 0300-8126.
- CLERMONT, G. *et al.* In silico design of clinical trials: A method coming of age. *Crit Care Med*, v. 32, n. 10, p. 2061–2070, 2004.
- CORTHAY, A. A three cell model for activation of naïve t helper cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 64, n. 2, p. 93–96, 2006. ISSN 1365-3083.
- COURANT, R.; FRIEDRICHS, K.; LEWY, H. On the partial difference equations of mathematical physics. *IBM Journal of Research and Development*, v. 11, n. 2, p. 2015–234, 1967.
- CRAGGS, J. K. *et al.* Development of a strand-specific rt-pcr based assay to detect the replicative form of hepatitis c virus rna. *J Virol Methods*, v. 94, p. 111–20, 2001.

- CREUSOT, R. J.; MITCHISON, N. A.; TERAZZINI, N. M. The immunological synapse. *Mol. Immunol.*, p. 997–1002, 2002.
- DAHARI, H. *et al.* A mathematical model of hepatitis c virus dynamics in patients with high baseline viral loads or advanced liver disease. *Gastroenterology*, v. 136, p. 1402–1409, 2009.
- DAHARI, H. *et al.* Modeling subgenomic hepatitis c virus rna kinetics during treatment with alpha interferon. *Journal of Virology*, v. 83, n. 13, p. 6383–6390, 2009.
- DAVIS, D. M.; DUSTIN, M. L. What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol.*, v. 25, p. 323–327, 2004.
- DEEM, M. Complexity in the immune system. *Computers and chemical engineering*, v. 50, n. 4, p. 734–738, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098135404002340>>.
- DELEO, F. *Public Health Image Library (PHIL), National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)*. 2008. Acessado em Fevereiro de 2015. Disponível em: <<http://phil.cdc.gov/phil/>>.
- DIXIT, N. M. Advances in the mathematical modelling of hepatitis c virus dynamics. *Journal of the Indian Institute of Science*, v. 88, p. 37–43, 2008.
- DONG, X. *et al.* Agent-based modeling of endotoxin-induced acute inflammatory response in human blood leukocytes. *PLoS ONE*, v. 5, n. 2, 2010.
- EIKENBERRY, S. *et al.* The dynamics of a delay model of hepatitis b virus infection with logistic hepatocyte growth. *Math Biosci Eng.*, v. 6, n. 2, p. 283–299, 2009.
- ELLIOT, R. M.; ARMSTRONG, V. J.; MCLAUCHLAN, J. Structural and molecular virology. In: KARAYIANNIS, P.; MAIN, J.; THOMAS, H. (Ed.). *Hepatitis C Virus*. London, UK: International Medical Press, 2009, (Human Virus Guides). cap. 2. ISBN 9781901769159.
- F, K. M.; M, D. M. Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr Opin Immunol.*, v. 14, p. 66–74, 2002.
- FLOWER, D.; TIMMIS, J. *In Silico Immunology*. [S.l.]: Springer, 2010.
- FOLCIK, V. A. *et al.* Using an agent-based model to analyze the dynamic communication network of the immune response. *Theor Biol Med Model*, v. 8, n. 1, 2011.
- FORDE, J. E. *Delay Differential Equation Models in Mathematical Biology*. Tese (Doutorado) — University of Michigan, 2005.
- FORRESTER, J. W. *Industrial dynamics*. Waltham, MA: Pegasus Communications, 1961.
- FORRESTER, J. W. *Urban dynamics*. [S.l.]: Pegasus Communications, 1969.
- FREY, H. C.; PATIL, S. R. Identification and review of sensitivity analysis methods. *Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis*, v. 22, p. 553–578, jun. 2002.

- GAGE, S.; REDFERN, S. *Science images from across the globe*. 2013. Acessado em Fevereiro de 2015. Disponível em: <<http://www.bbc.com/news/science-environment-24078176>>.
- GASTAMINZA, P. *et al.* Cellular determinants of hepatitis c virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *Journal of Virology*, p. 2120–2129, 2008.
- GOUTAGNY, N.; INCHAUSPE, G. Emerging therapies for hepatitis c infection. In: KARAYIANNIS, P.; MAIN, J.; THOMAS, H. (Ed.). *Hepatitis C Virus*. [S.l.]: International Medical Press, 2009, (Human Virus Guides). cap. 12.
- GRAKOU, A. *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling t cell activation. *Science*, v. 285, n. 5425, p. 221–227, 1999.
- GREEN, J.; ARIYAN, C. *Deploying the body's army. Using patients' own immune system to fight cancer*. 2014. Acessado em Fevereiro de 2015. Disponível em: <<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/39511/title/Deploying-the-Body-s-Army/>>.
- GREMION, C.; CERNY, A. Hepatitis c virus and the immune system: a concise review. *Reviews in Medical Virology*, v. 15, n. 4, p. 235–268, 2005. ISSN 1099-1654.
- GRILO, A.; CAETANO, A.; ROSA, A. Immune system simulation through a complex adaptive system model. In: *System Model, CiteSeer Scientific Literature Digital Library*. [S.l.: s.n.], 2000. p. 681–704.
- GUEDJ, J. *et al.* Modeling shows that the ns5a inhibitor daclatasvir has two modes of action and yields a shorter estimate of the hepatitis c virus half-life. *PNAS*, v. 110, n. 10, p. 3991–3996, 2013.
- GUEDJ, J.; NEUMANN, A. Understanding hepatitis c viral dynamics with direct-acting antiviral agents due to the interplay between intracellular replication and cellular infection dynamics. *Journal of Theoretical Biology*, v. 267, p. 330–340, 2010.
- GUEDJ, J.; PERELSON, A. S. Second-phase hepatitis c virus rna decline during telaprevir-based therapy increases with drug effectiveness: Implications for treatment duration. *Viral Hepatitis*, v. 53, n. 6, p. 1801–8, 2011.
- GUO, Z.; SLOOT, P. M. A.; TAY, J. C. A hybrid agent-based approach for modeling microbiological systems. *Journal of Theoretical Biology*, 2008.
- HAESSLER, S. D.; BROWN, R. B. Pneumonia caused by staphylococcus aureus. *Current Respiratory Medicine Reviews*, v. 5, n. 1, p. 62–67, 2009. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/crmr/2009/00000005/00000001/art00011>>.
- HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 13, n. 4-5, p. 413–421, 2002. ISSN 1359-6101.
- HARRIS, L. G.; FOSTER, S. J.; RICHARDS, R. G. An introduction to staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying s. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review. *European Cells and Materials*, v. 4, p. 39–60, 2002.
- HETHCOTE, H. W. The mathematics of infectious diseases. *SIAM review*, SIAM, v. 42, n. 4, p. 599–653, 2000. Disponível em: <<http://epubs.siam.org/doi/abs/10.1137/S0036144500371907>>.

HEYDTMANN, M. Macrophages in hepatitis b and hepatitis c virus infections. *Journal of Virology*, v. 83, n. 7, p. 2796–2802, 2009. ISSN 0022-538X.

HUANG, S.; WISZNIEWSKI, L.; CONSTANT, S. The use of in vitro 3d cell models in drug development for respiratory diseases. In: KAPETANOVIC, D. I. (Ed.). *Drug, Discoveries and Development - Present and Future*. InTech, 2011. cap. 8. ISBN 978-953-307-615-7. Disponível em: <<http://cdn.intechweb.org/pdfs/25227.pdf>>.

IVERSON, A. *et al.* Influenza virus primes mice for pneumonia from staphylococcus aureus. *Journal of Infectious Diseases*, highwire, v. 204, n. 6, p. 880–888, Jan 2011. ISSN 0022-1899. Disponível em: <<http://jid.oxfordjournals.org/content/203/6/880.abstract>>.

JACOB, C.; LITORCO, J.; LEE, L. Immunity through swarms: Agent-based simulations of the human immune system. In: *Lecture Notes in Computer Science*. [S.l.]: Springer Berlin, 2004. (Artificial Immune Systems, v. 3239), p. 400–412.

JANGRA, R. K.; YI, M.; LEMON, S. M. Regulation of hepatitis c virus translation and infectious virus production by the microrna mir-122. *Journal of Virology*, 2010.

JENKINS, A. *et al.* Differential expression and roles of staphylococcus aureus virulence determinants during colonization and disease. *mBio*, v. 6, n. 1, p. e02272–14, Jan 2014.

JENNINGS, N. R. Agent-based computing: Promise and peril. In: *In Proceedings of the 16th Int. Joint Conf. on Artificial Intelligence*. [S.l.: s.n.], 1999. p. 1429–1436.

KALITA, J. K. *et al.* Computational modelling and simulation of the immune system. *Int. J. Bioinformatics Res. Appl.*, v. 2, n. 1, p. 63–88, 2006.

KALLEN, A. *et al.* Staphylococcus aureus community-acquired pneumonia during the 2006 to 2007 influenza season. *Annals of emergency medicine*, v. 53, n. 3, p. 358–365, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196064408007737>>.

KEENER, J.; SNEYD, J. *Mathematical Physiology*. [S.l.]: Springer, 2009.

KEUM, S. J. *et al.* The specific infectivity of hepatitis c virus changes through its life cycle. *Virology*, v. 433, p. 462–470, Nov 2012.

KIM, P. S.; LEE, P. P.; LEVY, D. Modeling regulation mechanisms in the immune system. *J Theor Biology*, v. 246, n. 1, p. 33–69, 2007.

KIM, P. S.; LEVY, D.; LEE, P. P. Modeling and simulation of the immune system as a self-regulating network. *Methods Enzymol*, v. 467, p. 79–109, 2009. ISSN 1557-7988. Disponível em: <<http://www.biomedsearch.com/nih/Modeling-simulation-immune-system-as/19897090.html>>.

KIRSCHNER, D. The multi-scale immune response to pathogens: M. tuberculosis as an example. In: FLOWER, D. R.; TIMMIS, J. (Ed.). *In silico immunology*. [S.l.]: Springer, 2010.

KIRSCHNER, D. E. *et al.* Toward a multiscale model of antigen presentation in immunity. In: *Immunological reviews 2007*. [S.l.: s.n.], 2007. v. 216, p. 93–118.

- KLEIN, E.; SMITH, D. L.; LAXMINARAYAN, R. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant staphylococcus aureus, united states, 1999–2005. *Emerging infectious diseases*, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2876761/>>.
- KNOP, I. *Infraestrutura para Simulação de Processos de Software Baseada em Metamodelos de Dinâmica de Sistemas*. Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós Graduação em Modelagem Computacional. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora - MG, Brazil, 2009.
- KNOP, I. O. *et al.* Modeling human immune system using a system dynamics approach. In: JOBBAGY, A.; MAGJAREVIC, R.; MAGJAREVIC, R. (Ed.). *5th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering*. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2012, (IFMBE Proceedings, v. 37). p. 363–366.
- KUANG, Y. Delay differential equations. In: *Encyclopedia of Theoretical Ecology*. [S.l.]: Hastings and Gross ed. University of California Press, 2012. p. 163–166.
- LEE, C. Daclatasvir: potential role in hepatitis c. *Drug Des Devel Ther.*, v. 7, p. 1223–1233, 2013.
- LEE, H. Y. *et al.* Simulation and prediction of the adaptive immune response to influenza a virus infection. *Journal of Virology*, v. 83, n. 14, p. 7151–7165, 2009.
- LEE, M.-H. H. *et al.* A postinfluenza model of staphylococcus aureus pneumonia. *The Journal of infectious diseases*, v. 201, n. 4, p. 508–15, Feb 2010. ISSN 0022-1899.
- LEVEQUE, R. J. *Finite Difference Methods for Ordinary and Partial Differential Equations*. [S.l.]: Society for Industrial and Applied Mathematics, 2007.
- LI, J.; BRAUER, F. Continuous-time age-structured models in population dynamics and epidemiology. In: BRAUER, F.; DRIESSCHE, P. van den; WU, J. (Ed.). *Mathematical Epidemiology*. Springer Berlin Heidelberg, 2008, (Lecture Notes in Mathematics, v. 1945). p. 205–227. ISBN 978-3-540-78910-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-78911-6_9>.
- LIANG, T. J.; GHANY, M. G. Current and future therapies for hepatitis c virus infection. *The New England Journal of Medicine*, 2013.
- LIBRARY, S. P. *Neutrophil engulfing thrush fungus, SEM*. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencephoto.com/media/113701/>>.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. The ins and outs of hepatitis c virus entry and assembly. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, p. 688–700, Sep 2013.
- LIU, Z.; ROCHE, P. A. Macropinocytosis in phagocytes: regulation of mhc class-ii-restricted antigen presentation in dendritic cells. *Frontiers in physiology*, v. 6, p. 1, Jan 2015. ISSN 1664-042X.
- LOHMANN, V. *et al.* Viral and cellular determinants of hepatitis c virus rna replication in cell culture. *Journal of Virology*, v. 77, n. 5, p. 3007–3019, 2013.
- LOWY, F. Staphylococcus aureus infections. *The New England Journal of Medicine*, nejm, 1998. ISSN 0028-4793.

- MADHI, S. A.; KLUGMAN, K. P.; GROUP, T. V. T. A role for streptococcus pneumoniae in virus-associated pneumonia. *Nature medicine*, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/doi:10.1038%2Fnm1077>>.
- MARCHUK, G. I. *Mathematical Modelling of Immune Response in Infectious Diseases*. [S.l.]: Kluwer Academic Publishers, 1997. (Mathematics and its applications).
- MARINO, S. *et al.* Tnf and il-10 are major factors in modulation of the phagocytic cell environment in lung and lymph node in tuberculosis: A next-generation two-compartmental model. *Journal of Theoretical Biology*, v. 265, n. 4, p. 586–598, 2010.
- MARTCHEVA, M.; CASTILLO-CHAVEZ, C. Diseases with chronic stage in population with varying size? *Math. Biosci.*, v. 182, p. 1–25, 2003.
- MCCABE, C. *et al.* Guideline-concordant therapy and reduced mortality and length of stay in adults with community-acquired pneumonia: Playing by the rules. *Archives of Internal Medicine*, v. 169, n. 16, p. 1525–1531, 2009. ISSN 0003-9926.
- MEIER-SHELLERSHEIM, M.; MACK, G. Simune, a tool for simulating and analyzing immune system behavior. *CoRR*, cs.MA/9903017, 2008.
- MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, v. 106, p. 255–258, 2001.
- MIAO, H. *et al.* Quantifying the early immune response and adaptive immune response kinetics in mice infected with influenza a virus. *Journal of Virology*, v. 84, n. 13, p. 6687–98, 2010.
- MIRSKY, H. P. *et al.* Systems biology approaches for understanding cellular mechanisms of immunity in lymph nodes during infection. *Journal of Theoretical Biology*, v. 287, p. 160–170, 2011.
- MIZGERD, J. P.; SKERRETT, S. J. Animal models of human pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 294, n. 3, p. 387–398, 2008. Disponível em: <<http://ajplung.physiology.org/content/294/3/L387.short>>.
- MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C. M. Replication of hepatitis c virus. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, p. 453–463, 2007.
- MURRAY, J. *Mathematical Biology: I. An Introduction*. [S.l.]: Springer, 2002.
- NAMAS, R. A. *et al.* Combined in silico, in vivo, and in vitro studies shed insights into the acute inflammatory response in middle-aged mice. *PloS one*, 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0067419.g004>>.
- NARANG, V. *et al.* Systems immunology: a survey of modeling formalisms, applications and simulation tools. *Immunologic Research*, v. 53, n. 1–3, p. 251–261, 2012.
- NELSON, P. W. *et al.* An age-structured model of hiv infection that allows for variations in the death rate of productively infected cells. *Mathematical Biosciences*, v. 1, n. 2, September 2004.
- NIAZI, M.; HUSSAIN, A. Agent-based computing from multi-agent systems to agent-based models: a visual survey. *Scientometrics*, v. 89, n. 2, p. 479–499, 2011.

NIH. *U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Understanding the Immune System How It Works*. [S.l.: s.n.], 2007.

OLIVEIRA, F. *et al.* Doenças infecciosas como causas de morte em idosos autopsiados. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, scielo, v. 37, n. 1, 2004. ISSN 0037-8682.

PARHAM, P. *The Immune System, Fourth Edition*:. Taylor & Francis Group, 2014. ISBN 9781317511571. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=Ph7ABAAAQBAJ>>.

PARISI, G. A simple model for the immune network. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. [S.l.: s.n.], 1990. (Immunology, v. 87), p. 429–433.

PENNISI, M. A mathematical model of immune-system-melanoma competition. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, v. 2012, 2012.

PERELSON, A. Modelling viral and immune system dynamics. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, n. 1, p. 28–36, 2002. ISSN 1474-1733.

PERELSON, A. S.; WEISBUCH, G. Immunology for physicists. *Reviews of Modern Physics*, v. 69, n. 4, p. 1219–1267, 1997.

PIGOZZO, A. B. *Implementação computacional de um modelo matemático do sistema imune inato (in Portuguese)*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora - MG, Brazil, 2011.

PIGOZZO, A. B. *et al.* Implementation of a computational model of the innate immune system. In: *ICARIS*. [S.l.: s.n.], 2011. p. 95–107.

PIGOZZO, A. B. *et al.* On the computational modeling of the innate immune system. *BMC Bioinformatics*, 2012.

PIRES, F. *et al.* Nasal carriage of staphylococcus aureus in botucatu, brazil: A population-based survey. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, p. e92537, 2014.

POSSI, M. A. *et al.* An in-silico immune system model for investigating human autoimmune diseases. In: *XXXVII Conferencia Latinoamericana de Informatica (XXXVII CLEI)*. Quito, Equador: [s.n.], 2011.

PUGLIESI, A.; GANDOLFI, A. A simple model of pathogen-immune dynamics including specific and non-specific immunity. *Mathematical Biosciences*, v. 214, n. 1–2, p. 73–80, 2008.

PUZONE, R. *et al.* Immsim, a flexible model for in machina experiments on immune system responses. *Future Generation Computer Systems*, v. 18, n. 7, 2002.

QUINKERT, D.; BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V. Quantitative analysis of the hepatitis c virus replication complex. *Journal of Virology*, v. 79, p. 13594–13605, 2005.

QUINTELA, B. M. *et al.* An age-based multiscale mathematical model of hepatitis c virus life-cycle during infection and therapy with direct-acting drugs. em preparação.

- QUINTELA, B. M.; SANTOS, R. W. d.; LOBOSCO, M. On the coupling of two models of the human immune response to an antigen. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 410–457, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/410457>>.
- REED, K. *et al.* *General Model of the Innate Immune Response*. [S.l.]: The University of Texas, 2011.
- RIBEIRO, R. M. *et al.* Quantifying the diversification of hepatitis c virus (hcv) during primary infection: Estimates of the in vivo mutation rate. *PLOS Pathogens*, v. 8, n. 8, p. e1002881, 2012.
- ROBINS, A. Innate and adaptive immunity. In: FLOWER, D.; TIMMIS, J. (Ed.). *In Silico Immunology*. Springer US, 2007. p. 11–21. ISBN 978-0-387-39238-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-39241-7_2>.
- RONG, L. *et al.* Analysis of hepatitis c virus decline during treatment with the protease inhibitor danoprevir using a multiscale model. *PLOS Computational Biology*, v. 9, n. 3, p. e1002959, 2013.
- SADIKU, M. N. O.; OBIOZOR, C. N. A simple introduction to the method of lines. *International Journal of Electrical Engineering Education*, v. 37, n. 3, p. 282–296, 2000.
- SALTELLI, A. *et al.* Sensitivity analysis practices: Strategies for model-based inference. *Reliability Engineering & System Safety*, v. 91, p. 1109–1125, 2006.
- SANJUAN, R. *et al.* Viral mutation rates. *Journal of Virology*, v. 84, n. 19, 2010.
- SANTOS, J. W. A.; NASCIMENTO, D. Z.; GUERRA, V. A. Pneumonia estafilocócica adquirida na comunidade. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 34, n. 9, Sep 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132008000900008&lng=en&nrm=iso>.
- SANTOS, R. M. Zorzenon dos; COUTINHO, S. Dynamics of hiv infection: A cellular automata approach. *Phys. Rev. Lett.*, American Physical Society, v. 87, n. 16, p. 168102, Sep 2001. Disponível em: <<http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.87.168102>>.
- SCHALLER, T. *et al.* Analysis of hepatitis c virus superinfection exclusion by using novel fluorochrome gene-tagged viral genomes. *Journal of Virology*, v. 81, n. 9, p. 4591–4603, 2007.
- SCHEEL, T. K. H.; RICE, C. M. Understanding the hepatitis c virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat. Med.*, v. 19, n. 7, p. 837–849, 2013.
- SCHELLER, N. *et al.* Translation and replication of hepatitis c virus genomic rna depends on ancient cellular proteins that control mrna fates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, p. 13517–22, Aug 2009.
- SHI, S. T.; LAI, M. M. C. Hcv 5' and 3'utr: When translation meets replication. In: . Norfolk (UK): Horizon Bioscience: in: Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. Tan SL, editor, 2006. cap. 2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1624/>.

- SLOOT, P. M. A.; CHEN, F.; BOUCHER, C. Cellular automata model of drug therapy for hiv infection. In: *Proceedings of the 5th International Conference on Cellular Automata for Research and Industry*. London, UK, UK: Springer-Verlag, 2002. (ACRI '01), p. 282–293. ISBN 3-540-44304-5. Disponível em: <<http://dl.acm.org/citation.cfm?id=647299.723456>>.
- SMITH, A. *et al.* Kinetics of coinfection with influenza a virus and streptococcus pneumoniae. *PLoS Pathogens*, v. 9, n. 3, p. e1003238, 2013. ISSN 1553-7366.
- SMITH, A.; MCCULLERS, J.; ADLER, F. Mathematical model of a three-stage innate immune response to a pneumococcal lung infection. *Journal of theoretical biology*, v. 276, n. 1, p. 106–116, 2011. ISSN 0022-5193.
- SOMPAYRAC, L. *How the Immune System Works*. 3. ed. [S.l.]: Blackwell Publishing, 2008. ISBN 9781405162210.
- STRIKWERDA, J. *Finite Difference Schemes and Partial Differential Equations, Second Edition*. Society for Industrial and Applied Mathematics, 2004. Disponível em: <<http://epubs.siam.org/doi/abs/10.1137/1.9780898717938>>.
- SU, B. *et al.* Mathematical modelling of immune response in tissues. *Computational and Mathematical Methods in Medicine: An Interdisciplinary Journal of Mathematical, Theoretical and Clinical Aspects of Medicine*, v. 10, n. 1, p. 1748–6718, 2009.
- TAY, J. C.; JHAVAR, A. Cafiss: a complex adaptive framework for immune system simulation. In: *ACM Symposium on Applied Computing*. [S.l.: s.n.], 2005. p. 158–164.
- THIEME, H.; CASTILLO-CHAVEZ, C. How may infection-age-dependent infectivity affect the dynamics of hiv/aids? *SIAM J. Appl. Math.*, v. 53, p. 1337–79, 1993.
- THIEME, H.; CASTILLO-CHAVEZ, C. A two-strain tuberculosis model with age infection. *SIAM J. Appl. Math.*, v. 62, p. 1634–56, 2002.
- THOMPSON, M. *Dendritic Cells in Treatment for Type 1 Diabetes*. 2014. Disponível em: <<http://www.hemacare.com/blog/index.php/dendritic-cells/>>.
- TIMPE, J. M.; MCKEATING, J. A. Hepatitis c virus entry: possible targets for therapy. *Gut*, v. 57, p. 1728–1737, 2008.
- TSCHERNE, D. M. *et al.* Superinfection exclusion in cells infected with hepatitis c virus. *Journal of Virology*, v. 81, n. 8, p. 3693–3703, 2007.
- VODOVOTZ, Y. *et al.* Mathematical simulation of sepsis and trauma. In: *In Proceedings of the 11th Congress of the European Shock Society*. [S.l.]: Medimond, 2005. p. 151–159.
- VODOVOTZ, Y. *et al.* Mathematical models of the acute inflammatory response. *Current Opinion in Clinical Care*, v. 10, n. 5, p. 383–390, 2004.
- WAKELAND, W.; MACOVSKY, L.; AN, G. A hybrid simulation model for studying acute inflammatory response. In: *Proceedings of the 2007 spring simulation multiconference - Volume 2*. San Diego, CA, USA: Society for Computer Simulation International, 2007. (SpringSim '07), p. 39–46. ISBN 1-56555-313-6. Disponível em: <<http://dl.acm.org/citation.cfm?id=1404680.1404686>>.

- WANG, C. *et al.* Influenza primes human lung microvascular endothelium to leak upon exposure to staphylococcus aureus. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, Feb 2015. ISSN 1044-1549.
- WARRENDER, C. E. *Modeling intercellular interactions in the peripheral immune system*. Tese (Doutorado) — The University of New Mexico, Albuquerque, New Mexico, 2004.
- WEBSTER, B.; OTT, M.; GREENE, W. C. Evasion of superinfection exclusion and elimination of primary viral rna by an adapted strain of hepatitis c virus. *Journal of Virology*, v. 87, n. 24, p. 13354–13369, 2013.
- WEBSTER, B. *et al.* Rapid intracellular competition between hepatitis c viral genomes as a result of mitosis. *Journal of Virology*, v. 87, n. 1, p. 581–596, 2012.
- WHO. *Hepatitis C*. 2014. Date accessed: November, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>.
- WODARZ, D. *Killer cell dynamics : mathematical and computational approaches to immunology*. New York, NY: Springer, 2007. (Interdisciplinary applied mathematics). ISBN 978-0-387-30893-7. Disponível em: <[ttp://opac.inria.fr/record=b1123529](http://opac.inria.fr/record=b1123529)>.
- WODARZ, D.; MAY, R.; NOWAK, M. The role of antigen-independent persistence of memory cytotoxic t lymphocytes. *International Immunology*, v. 12, n. 4, p. 467–477, 2000. ISSN 0953-8178.
- WOLFRAM, S. *Theory and Applications of Cellular Automata*. [S.l.]: World Scientific, 1986. ISBN 9971-50-123-6.
- WOLFRAM, S. *A New Kind of Science*. [S.l.]: Wolfram Media, 2002.
- WU, H. *et al.* Dediscover: A computation and simulation tool for hiv viral fitness research. In: *BioMedical Engineering and Informatics, 2008. BMEI 2008. International Conference on*. [S.l.: s.n.], 2008. v. 1, p. 687–694.
- XAVIER, M. P. *Implementação Paralela em um Ambiente de Múltiplas GPUs de um Modelo 3D do Sistema Imune Inato*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora - MG, Brazil, 2013.
- ZAWILINSKA, B.; KOSZ-VNENCHAK, M. General introduction into the ebola virus biology and disease. *Folia medica Cracoviensia*, v. 54, n. 3, p. 57–65, Jan 2014. ISSN 0015-5616.

APÊNDICE A – PARÂMETROS

As Tabelas 7, 8 e 9 apresentam os parâmetros utilizados nas simulações do modelo de infecção da bactéria *S. aureus*, as unidades adotadas e as respectivas referências.

Tabela 7 – Valores iniciais das variáveis do modelo acoplado.

Parâmetro	Valor	Unidade	Referência
A_0	$1.7 * 10^2$	$cell/mm^3$	(MARCHUK, 1997)
MR_0	$2.3 * 10^2$	$cell/mm^3$	(MARCHUK, 1997)
MA_0	0.0	–	–
T^*	$8.4 * 10^{-16}$	$cell/mm^3$	(MARCHUK, 1997)
B^*	$8.4 * 10^{-15}$	$cell/mm^3$	(MARCHUK, 1997)
P^*	$8.4 * 10^{-17}$	$cell/mm^3$	(MARCHUK, 1997)
F^*	$9.5 * 10^{-11}$	$cell/mm^3$	(MARCHUK, 1997)
F_0	10^{-10}	$cell/mm^3$	(MARCHUK, 1997)
MR^*	$2.3 * 10^2$	$cell/mm^3$	estimado

Tabela 8 – Coeficientes de difusão.

Parâmetro	Valor	Unidade	Referência
D_A	$3.7 * 10^{-5}$	mm^3/dia	(HAESSLER; BROWN, 2009)
D_{MR}	0.432	mm^3/dia	(PIGOZZO, 2011)
D_{MA}	3.0	mm^3/dia	(PIGOZZO, 2011)
D_F	0.16	mm^3/dia	(PIGOZZO, 2011)

Tabela 9 – Outros coeficientes utilizados.

Parâmetro	Valor	Unidade	Referência
α_{MA}	2.5	$1/dia$	(MARCHUK, 1997)
α_T	0.01	$1/dia$	(MARCHUK, 1997)
α_B	1.0	$1/dia$	(MARCHUK, 1997)
α_P	5.0	$1/dia$	(MARCHUK, 1997)
α_F	0.43	$1/dia$	(MARCHUK, 1997)
α_{MR}	5.0	$1/dia$	estimado
β_A	18.0	$1 / dia$	(MARCHUK, 1997)
γ_{AM}	$5.98 * 10^{-3}$	$mm^3/cell * dia$	(MARCHUK, 1997)
γ_{MA}	$8.3 * 10^{-2}$	$mm^3/cell * dia$	(MARCHUK, 1997)
λ_{AF}	$1.66 * 10^{-4}$	$mm^6/cell^2 * dia$	(MARCHUK, 1997)
λ_{FA}	$7.14 * 10^{-3}$	$mm^6/cell^2 * dia$	(MARCHUK, 1997)
b_T	$1.7 * 10^{-1}$	$mm^3/cell * dia$	(MARCHUK, 1997)
b_P	10^5	$mm^6/cell^2 * dia$	(MARCHUK, 1997)
b_P^B	$6.02 * 10^3$	$mm^6/cell^2 * dia$	(MARCHUK, 1997)
b_P^P	$2.3 * 10^6$	$mm^3/cell * dia$	(MARCHUK, 1997)
ρ_T	2.0	-	(MARCHUK, 1997)
ρ_B	16.0	$cell/mm^3$	(MARCHUK, 1997)
ρ_P	3.0	-	(MARCHUK, 1997)
ρ_F	$5.1 * 10^4$	-	(MARCHUK, 1997)