



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA – CCEN  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

## **TESE DE DOUTORADO**

### **TUBERCULOSE: ESTUDO DA FORMAÇÃO DE PADRÕES NA ELIMINAÇÃO, CONTENÇÃO E DISSEMINAÇÃO DO BACILO DE KOCH**

por

**Hallan Souza e Silva**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Física.

**Banca Examinadora:**

Prof.<sup>a</sup> Rita Maria Zorzenon dos Santos (Orientadora - UFPE)  
Prof. Sergio Galvão Coutinho (DF - UFPE)  
Prof. Sergio Mascarenhas Oliveira (IEA – USP/SC)  
Prof. Nestor Felipe Caticha Alfonso (IF – USP)  
Prof. Célio Lopes Silva (DBQ – FM/USP-RP)

Recife - PE, Brasil  
Maio – 2007

Silva, Hallan Souza e

Tuberculose: estudo da formação de padrões na eliminação, contenção e disseminação do bacilo de Koch / Hallan Souza e Silva. - Recife : O Autor, 2007.

xx, 175 folhas: il. f.ig., tab

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Física, 2007.

Inclui bibliografia, anexo e apêndices.

1. Física estatística. 2. Tuberculose. 3. Granuloma. 4. Autômatos celulares. 5. Sistema imunológico. 6. Redes complexas. I. Título.

530.13 CDD (22.ed.)

FQ2008-047



Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Física – CCEN  
Programa de Pós-Graduação em Física  
Cidade Universitária - 50670-901 Recife PE Brasil  
Fone (+55 81) 2126-8449/2126-8450 - Fax (+55 81) 3271-0359  
<http://www.df.ufpe.br/pg> e-mail: [posgrad@df.ufpe.br](mailto:posgrad@df.ufpe.br)

---

## Parecer da Banca Examinadora de Defesa de Tese de Doutorado

---

Hallan Souza e Silva

### TUBERCULOSE: ESTUDO DA FORMAÇÃO DE PADRÕES NA ELIMINAÇÃO, CONTENÇÃO E DISSEMINAÇÃO DO BACILO DE KOCH

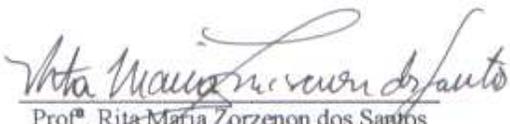
A Banca Examinadora composta pelos Professores Rita Maria Zorzenon dos Santos (Presidente e Orientadora), Sergio Galvão Coutinho, ambos da Universidade Federal de Pernambuco, Sergio Mascarenhas Oliveira, do Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo, Nestor Felipe Caticha Alfonso, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo e Célio Lopes Silva, do Departamento de Bioquímica, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, consideram o candidato:

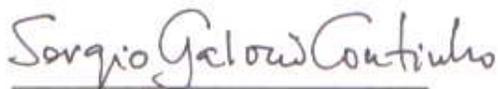
( ) Aprovado com Distinção

() Aprovado

( ) Reprovado

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Física do Departamento de Física do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco aos vinte e três dias do mês de maio de 2007.

  
Prof.<sup>a</sup> Rita Maria Zorzenon dos Santos  
Presidente e Orientadora

  
Prof. Sergio Galvão Coutinho

  
Prof. Sergio Mascarenhas Oliveira

  
Prof. Nestor Felipe Caticha Alfonso

  
Prof. Célio Lopes Silva *ap. distinção*

*Aos meus Pais, Ademar e Maria*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e proteção.

A minha esposa Juscilene e a minha filha Camila, companheiras nesta longa caminhada.

Aos meus Pais e aos meus irmãos Diogo e Felipe, pelo grande incentivo, sem o qual não seria possível seguir em frente.

A Profa. Rita Zorzenon, por sua orientação e por seu profissionalismo, que tanto me motivaram.

Aos colegas de curso e do Laboratório de Física Teórica e Computacional.

Aos estudantes, professores e funcionários do Departamento de Física, em especial ao Prof. Sergio Coutinho.

Aos colaboradores, Ana Amador, Célio Silva, Henrique Lenzi, Marcelo Lobato e Vania Bonato.

Aos moradores da rua Lagoa Vermelha, com quem aprendi um pouco sobre os costumes e dizeres nordestinos, o que tornou mais fácil a minha adaptação a Recife.

Ao CNPq, que desde a iniciação científica tem me apoiado financeiramente.

## RESUMO

A tuberculose é uma doença endêmica causada por uma bactéria aeróbica denominada *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Ela é responsável pela infecção de um terço da população mundial e causa 2,2 milhões de mortes anualmente. A infecção mais comum causada pela Mtb ocorre pela inalação dos microorganismos para os pulmões, onde eles infectam principalmente os macrófagos alveolares. Macrófagos infectados liberam citocinas que ativam a resposta imunológica específica que resulta no desenvolvimento de uma estrutura granulomatosa formada pelas células do sistema imune (macrófagos, células T e B) no sítio de infecção. Apesar de todos os esforços e estudos realizados até o presente, buscando entender a dinâmica de formação de granulomas, ainda não se conhece os mecanismos responsáveis pelo seu crescimento e estabilidade.

Neste trabalho de tese nós introduzimos um modelo matemático, baseado na aproximação de autômatos celulares, para descrever a formação do granuloma como resposta imunológica a Mtb e as diferentes dinâmicas observadas na natureza para este processo. O modelo leva em conta as principais células envolvidas na resposta imune para a Mtb, bem como a ativação e/ou migração celular devido a sinalização de quimiocinas e citocinas. Dependendo da região do espaço de parâmetros, o modelo reproduz pelo menos um dos três tipos de dinâmicas observadas nos modelos animais: eliminação, contenção e disseminação. O modelo reproduz também resultados experimentais obtidos em experimentos realizados com camundongos: a evolução temporal da contagem de células T e de bactérias durante a dinâmica de contenção.

Nesta tese também analisamos as características de uma rede complexa obtida em estudos anteriores, realizados por membros do nosso grupo, sobre o processo endêmico da tuberculose. Dois tipos de rede foram obtidos do estudo da correlação espaço-temporal entre os novos casos anuais de TB ocorridos em Olinda, uma cidade da região Nordeste do Brasil, durante dois períodos de cinco anos consecutivos: redes topológicas onde acontecem os processos endêmicos durante cada período e redes complexas com pesos, nas quais os pesos são atribuídos aos nodos e correspondem ao número de casos que ocorrem em cada nodo durante os cinco anos analisados. Do estudo do comportamento das quan-

tidades usuais definidas para redes complexas, nós mostramos que as redes topológicas extraídas a partir dos processos endêmicos exibem as propriedades de redes “mundo pequeno”. Contudo quando nós associamos pesos aos nodos das redes, estas exibem propriedades de redes livres de escala.

**Palavras-chave:** tuberculose, granuloma, sistema imunológico, autômatos celulares, redes complexas

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an endemic disease caused by an aerobic bacterium named *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). It is responsible for on third of population infected worldwide and it causes 2.2 millions deaths per year. The most common infection by Mtb occurs by inhalation of microorganisms into the lungs, where they infect mainly alveolar macrophages. The infected macrophages release cytokines activating the specific immune that results in the development of a granulomatous structure built by immune cells (macrophages, T and B cells) at the site of infection. The granuloma controls the dissemination of bacteria into the lungs by controlling its replication. Despite all the efforts and studies performed until now to understand the dynamics of the granuloma formation, the mechanisms underlying its growth and its stability are still unknown.

In this thesis we introduce a mathematical model based on a cellular automata approach, to describe the granuloma formation as an immune response to Mtb and the different outcomes resulting from its dynamics that are observed in nature. The model takes into account the main cells involved in the immune response to Mtb, as well as its activation and/or migration due to the influence of chemokine and cytokine signaling. Depending on the region of the parameter space, the model reproduces at least one of the tree dynamical behaviours observed in animal models: elimination, contention and dissemination. The model reproduces also experimental results obtained in experiments performed with mice: the time evolution of T cells and bacteria counts during the dynamics of contention.

In this thesis we also analyse the characteristics of a complex network obtained from a previous study of the tuberculosis endemic processes, which was conducted by other members of our group. Two types of network were obtained from the analysis of the space-time correlation among the annual new TB cases occurring in Olinda, a town of the Northeast of Brazil, during two different periods of five consecutive years: the topological ones where the endemic process take place along the periods and the weighted networks in which the weights are attributed to the nodes and correspond to the number of cases that occurred in each node for each period of five years. By studying the behaviour of the usual quantities defined for complex networks, we show that the topological networks extracted

from the endemic process exhibit the properties of a small world networks. However when we associate weights to the nodes, the networks exhibit scale-free properties.

**Keywords:** tuberculosis, granuloma, immune system, cellular automata, complex networks

# SUMÁRIO

<b>Capítulo 1—Introdução</b>	1
<b>Capítulo 2—O Sistema Imunológico e a Tuberculose</b>	5
2.1 Constituintes do Sistema Imunológico . . . . .	6
2.1.1 Resposta imunológica inata . . . . .	7
2.1.2 Resposta imunológica adaptativa . . . . .	11
2.1.3 Citocinas e Quimiocinas . . . . .	18
2.2 Resposta Imunológica ao bacilo de Koch . . . . .	20
<b>Capítulo 3—Modelos animais e matemáticos</b>	27
<b>Capítulo 4—Modelo de autômatos celulares para a formação de granulomas de tuberculose</b>	40
4.1 Descrição do modelo de Autômatos Celulares . . . . .	43
4.2 Resultados e Discussão . . . . .	52
<b>Capítulo 5—As redes de Olinda</b>	91
5.1 Introdução . . . . .	91
5.2 Redes complexas . . . . .	96
5.2.1 Redes aleatórias . . . . .	96
5.2.2 Redes de Mundo Pequeno . . . . .	97
5.2.3 Redes Livres de Escala . . . . .	100
5.3 Resultados e Discussões . . . . .	103
5.3.1 Redes Epidemiológicas e Censitárias em Olinda . . . . .	103
5.3.2 Redes epidemiológicas com peso . . . . .	108

5.4	Comparação dos resultados obtidos em Olinda com outras redes . . . . .	125
5.4.1	Redes regulares . . . . .	126
5.4.2	Diagramas de Voronoi . . . . .	129
<b>Capítulo 6—Conclusões e Perspectivas</b>		<b>138</b>
<b>Apêndice A—Escala de tempo</b>		<b>144</b>
<b>Apêndice B—Evolução temporal da população de macrófagos residentes</b>		<b>146</b>
<b>Apêndice C—Difusão de sinalizadores</b>		<b>148</b>
<b>Apêndice D—Distribuição espaço-temporal de células sujeitas a um gradiente de concentração</b>		<b>153</b>
<b>Apêndice E—Concentração de IFN-<math>\gamma</math> na vizinhança de células T<sub>H</sub>1</b>		<b>156</b>
<b>Apêndice F—Quantidades usadas na caracterização de redes complexas</b>		<b>160</b>
F.1	Conectividade $K$ . . . . .	160
F.2	Coefficiente de <i>Clustering</i> $C$ . . . . .	161
F.3	Comprimento de Caminho Médio $L$ . . . . .	162
F.4	Densidade Espectral . . . . .	162
<b>Referências Bibliográficas</b>		<b>166</b>

## LISTA DE FIGURAS

2.1	Distribuição dos principais órgãos linfáticos. . . . .	6
2.2	Patógenos e seus epítomos. . . . .	7
2.3	Fagocitose de uma bactéria por uma célula especializada. . . . .	9
2.4	Esquema do processo de fagocitose e degradação de bactérias por célula especializada. . . . .	10
2.5	Ligações dos anticorpos com antígenos. . . . .	12
2.6	Ativação de célula T CD4 <sup>+</sup> por uma célula apresentadora de antígenos. .	15
2.7	Ativação do macrófago infectado pela célula T <sub>H</sub> 1. . . . .	15
2.8	Número de anticorpos em função do tempo, devido a apresentação de dois antígenos, “A” e “B”. . . . .	17
2.9	Influxo de monócitos da circulação sanguínea para o tecido próximo ao sítio de infecção. . . . .	20
2.10	Morfologia do bacilo de Koch (Mtb) por micrografia eletrônica mostrando um macrófago alveolar infectado de um paciente de tuberculose. . . . .	23
2.11	Citocinas e o macrófago infectado. . . . .	23
2.12	Granuloma de tuberculose e as principais células da resposta imunológica envolvidas. . . . .	25
3.1	Câmara de exposição ao <i>M. tuberculosis</i> utilizada para infecção de pequenos animais através das vias aéreas. . . . .	27
3.2	Imagem fluorescente do embrião do peixe zebra, 120 horas após infecção inicial <i>M. marinum</i> . . . . .	29
3.3	Evolução temporal do número de bactérias no modelo EDO de Wigginton e Kirschner. . . . .	31
3.4	Evolução temporal do número de bactérias no modelo EDO de Marino e Kirschner. . . . .	33
3.5	Evolução temporal do número de bactérias no modelo EDO de Ganguli <i>et al.</i> . . . . .	34

3.6	Evolução temporal do número de bactérias no modelo envolvendo equações diferenciais parciais (EDP) de Gammack <i>et al.</i> . . . . .	35
3.7	Evolução temporal do número de bactérias no modelo baseado em agentes de Segovia-Juarez <i>et al.</i> . . . . .	39
4.1	Esquema do modelo de Algood para a formação de granulomas (A). . . . .	42
4.2	Esquema do modelo de Algood para a formação de granulomas (B). . . . .	42
4.3	Rede quadrada com $L \times L$ sítios e as vizinhanças típicas dos autômatos celulares. . . . .	43
4.4	Bactérias extracelulares iniciais no sítio central da rede. . . . .	44
4.5	Movimento do macrófago na sua vizinhança de Moore. . . . .	46
4.6	Interação Macrófago e Mtb no mesmo sítio da rede. . . . .	47
4.7	Ativação do macrófago infectado pela célula $T_H1$ e $IFN-\gamma$ . . . . .	50
4.8	Esquema mostrando as principais regras do modelo de AC. . . . .	51
4.9	Evolução temporal do granuloma na dinâmica de eliminação. . . . .	56
4.10	Distribuição espacial da concentração de $TNF-\alpha$ (eliminação). . . . .	57
4.11	Distribuição espacial da concentração de quimiocinas (eliminação). . . . .	58
4.12	Distribuição espacial da concentração de $IFN-\gamma$ (eliminação). . . . .	59
4.13	Número de macrófagos infectados e bactérias em função do tempo na dinâmica de eliminação. . . . .	60
4.14	Número de macrófagos e células $T_H1$ em função do tempo na dinâmica de eliminação. . . . .	61
4.15	Evolução temporal do granuloma na dinâmica de contenção. . . . .	63
4.16	Distribuição espacial da concentração de $TNF-\alpha$ (contenção). . . . .	64
4.17	Distribuição espacial da concentração de quimiocinas (contenção). . . . .	65
4.18	Distribuição espacial da concentração de $IFN-\gamma$ (contenção). . . . .	66
4.19	Evolução temporal das populações celulares e de bactérias na dinâmica de contenção. . . . .	67
4.20	Evolução temporal do granuloma na dinâmica de disseminação. . . . .	69
4.21	Distribuição espacial da concentração $TNF-\alpha$ (disseminação). . . . .	70
4.22	Distribuição espacial da concentração de quimiocinas (disseminação). . . . .	71
4.23	Distribuição espacial da concentração de $IFN-\gamma$ (disseminação). . . . .	72
4.24	Evolução temporal das populações de células e bactérias na dinâmica de disseminação. . . . .	73

4.25	Comparação entre os resultados experimental e teórico para o número de células $T_H1$ em função do tempo. . . . .	75
4.26	Comparação entre os resultados experimental e teórico para o número de bactérias em função do tempo. . . . .	77
4.27	Comparação entre os resultados experimental e teórico para o número de bactérias em função do tempo (b). . . . .	78
4.28	Comparação entre os resultados experimental e simulado para o número de bactérias em função do tempo (c). . . . .	78
4.29	Comparação entre os resultados experimental e teórico para o número de bactérias em função do tempo (d). . . . .	79
4.30	Evolução temporal da infecção causada por <i>M. tuberculosis</i> , $TNF-\alpha$ não está influenciando na expressão de quimiocinas. . . . .	81
4.31	Distribuição espacial de concentrações de quimiocinas produzida sem a influencia do $TNF-\alpha$ . . . . .	82
4.32	Número células e bactérias em função do tempo, $TNF-\alpha$ não influencia na expressão de quimiocinas. . . . .	83
4.33	Evolução temporal média do número de bactérias para vários valores de $T_{recr}$ . . . . .	85
4.34	Evolução temporal média do número de bactérias para vários valores de $T_{rep}$ . . . . .	87
4.35	Evolução temporal média do número de bactérias para vários valores de $BE_{ini}$ . . . . .	89
4.36	Evolução temporal média do número de bactérias para vários valores de $p_{morte}$ . . . . .	90
5.1	Taxa de incidência de tuberculose na cidade de Olinda no período de 1991 a 2000. . . . .	92
5.2	Distribuição espacial do número de casos de tuberculose acumulados por setor censitário em Olinda. . . . .	93
5.3	Construção da rede epidemiológica em Olinda. . . . .	94
5.4	Redes epidemiológicas de Olinda. . . . .	94
5.5	Construção da rede censitária em Olinda. . . . .	95
5.6	Redes censitárias em Olinda. . . . .	95
5.7	Distribuição de conectividades $K$ para uma rede aleatória com $N = 243$ e $\langle K \rangle = 5$ , formada a partir do modelo de Erdős-Rényi. . . . .	97

5.8	Efeito do redirecionamento das conexões entre os nós da rede para o modelo de Watts-Strogatz. . . . .	98
5.9	Coeficiente de <i>clustering</i> $C$ e comprimento do caminho médio $L$ em função da probabilidade $p$ de redirecionamento para o modelo Watts-Strogatz. . . . .	99
5.10	Distribuições de conectividades $K$ para o modelo de Watts-Strogatz. . . . .	100
5.11	Distribuição de conectividades $K$ para a rede Internet. . . . .	101
5.12	Distribuição de conectividades $K$ para uma rede livre de escala, modelo de Barabási-Albert. . . . .	102
5.13	Distribuições de conectividades $K$ para as redes censitárias e epidemiológicas encontradas em Olinda. . . . .	105
5.14	Distribuições dos setores censitários com baixa, $K \leq 4$ , e alta, $K \geq 8$ , conectividade em Olinda. . . . .	106
5.15	Coeficiente de <i>clustering</i> $C$ em função da conectividade $K$ para as redes censitárias e epidemiológicas encontradas em Olinda. . . . .	106
5.16	Número de nós considerados “foco de infecção” em função da conectividade $K$ para as redes epidemiológica de Olinda. . . . .	107
5.17	Densidades espectrais para as redes censitárias e epidemiológicas encontradas em Olinda. . . . .	107
5.18	Distribuições do número $S^*$ de casos de tuberculose. . . . .	109
5.19	Número de casos de tuberculose acumulados $S^*$ em função da conectividade $K$ . (a) período 1991 a 1995 e (b) período 1996 a 2000. . . . .	110
5.20	Distribuições de intensidades $S$ para a rede epidemiológica no período 1991 a 1995, pesos $W(1)$ , $W(2)$ e $W(3)$ . . . . .	111
5.21	Distribuições de intensidades $S$ para a rede epidemiológica no período 1991 a 1995, pesos $W(4)$ , $W(5)$ e $W(6)$ . . . . .	112
5.22	Distribuições de intensidades $S$ para a rede epidemiológica no período 1996 a 2000, pesos $W(1)$ , $W(2)$ e $W(3)$ . . . . .	113
5.23	Distribuições de intensidades $S$ para a rede epidemiológica no período 1996 a 2000, pesos $W(4)$ , $W(5)$ e $W(6)$ . . . . .	114
5.24	Intensidade $S$ em função da conectividade $K$ para as redes epidemiológicas de Olinda para os pesos $W(1)$ , $W(2)$ e $W(3)$ . . . . .	116
5.25	Intensidade $S$ em função da conectividade $K$ para as redes epidemiológicas de Olinda para os pesos $W(4)$ , $W(5)$ e $W(6)$ . . . . .	117

5.26	Coeficiente de <i>clustering</i> da rede com peso $C^W$ em função da conectividade $K$ para as redes epidemiológicas para os pesos $W(1)$ , $W(2)$ , $W(3)$ , $W(4)$ , $W(5)$ e $W(6)$ . . . . .	119
5.27	Densidades espectrais para as redes epidemiológicas com pesos $W(1)$ , $W(2)$ , $W(3)$ , $W(4)$ , $W(5)$ e $W(6)$ . . . . .	120
5.28	Distribuições de intensidades $S$ para os nós da rede epidemiológica com foco utilizando a definição de peso $W(7)$ . . . . .	121
5.29	Distribuições de intensidades $S$ para os nós da rede epidemiológica com foco, utilizando a definição de peso $W(8)$ . . . . .	121
5.30	Distribuições de intensidade $S$ para o peso $W(7)$ . . . . .	122
5.31	Distribuições de intensidade $S$ para o peso $W(7)$ . . . . .	122
5.32	Intensidade $S$ em função da conectividade $K$ para o peso $W(7)$ . . . . .	123
5.33	Intensidade $S$ em função da conectividade $K$ para o peso $W(8)$ . . . . .	123
5.34	Coeficiente de <i>clustering</i> $C^W$ em função da conectividade $K$ para os peso $W(7)$ . . . . .	124
5.35	Coeficiente de <i>clustering</i> $C^W$ em função da conectividade $K$ para os peso $W(8)$ . . . . .	125
5.36	Densidades espectrais para as redes epidemiológicas com os pesos $W(7)$ e $W(8)$ . . . . .	125
5.37	Vizinhança típica para um nó na rede quadrada e triangular. . . . .	126
5.38	Distribuições de conectividades $K$ para a rede quadrada e triangular. . . . .	127
5.39	Coeficiente de <i>clustering</i> $C$ em função da conectividade $K$ para a rede quadrada e triangular. . . . .	128
5.40	Rede quadrada com $N = 16 \times 16$ nós. . . . .	128
5.41	Densidades espectrais para as redes quadrada e triangular. . . . .	129
5.42	Distribuição de conectividades $K$ para uma rede quadrada, com exclusões de nós e conexões. . . . .	129
5.43	Exemplos de diagramas de Voronoi. . . . .	130
5.44	Diagramas tipo Voronoi. . . . .	130
5.45	Diagramas de Voronoi e triangularização de Delaunay. . . . .	131
5.46	Redes de Voronoi construídas a partir dos nós da rede censitária e epidemiológica para o período 1991 a 1995. . . . .	132
5.47	Redes de Voronoi construídas a partir dos nós da rede censitária e epidemiológica para o período 1996 a 2000. . . . .	133

5.48	Distribuição de conectividades $K$ para as redes de Voronoi geradas a partir dos nós das redes de Olinda. . . . .	134
5.49	Coeficiente de <i>clustering</i> $C$ em função da conectividade $K$ para as redes de Voronoi geradas a partir dos nós das redes de Olinda. . . . .	135
5.50	Densidades espectrais para as redes de Voronoi geradas a partir dos nós das redes em Olinda. . . . .	136
5.51	Redes construídas com a triangularização de Delaunay a partir de nós posicionados aleatoriamente no espaço. . . . .	137
A.1	Concentração total de quimiocinas $Q_T$ produzidas por um único macrófago infectado em função do número $n$ de atualizações da rede. . . . .	144
B.1	Número de macrófagos residentes na rede em função do tempo na ausência de infecção. . . . .	147
C.1	Processo de difusão numa vizinhança de Von Neumann. . . . .	148
C.2	Solução de Laplace por diferenças finitas. . . . .	150
C.3	Simulação preliminar do modelo de AC. . . . .	151
C.4	Concentração do sinalizador em função da distância $r$ , medida em número de sítios, até a fonte para diversos valores de <i>deg</i> . . . . .	152
D.1	Células usadas nas simulações de distribuição espacial. . . . .	153
D.2	Distribuição espaço-temporal para dois tipos de células com tamanhos diferentes. . . . .	154
D.3	Distribuição espaço-temporal para dois tipos de células com tamanhos iguais. . . . .	155
E.1	Distâncias $r$ dos sítios da rede até o sítio da célula $T_H1$ . . . . .	156
E.2	Concentração de IFN- $\gamma$ ( $C(r)$ ) no sítio em função da distância $r$ até a célula $T_H1$ . . . . .	157
E.3	Distribuição de células $T_H1$ em torno de um sítio central para o estudo de concentração de IFN- $\gamma$ . . . . .	158
E.4	Concentração de IFN- $\gamma$ medida no sítio central a um conjunto de células $T_H1$ depois de atingido o estado estacionário. . . . .	158
F.1	Exemplo de rede formada com $N = 6$ nós e 9 conexões. . . . .	160
F.2	Densidade espectral para o modelo de redes livre de escala de Albert-Barabasi. . . . .	163

F.3 Densidades espectrais para o modelo de Watts-Strogatz. . . . . 164

## LISTA DE TABELAS

2.1	Principais funções do linfócitos T e B. . . . .	16
2.2	Tabela de citocinas. . . . .	21
4.1	Valores adotados nas simulações para os parâmetros do modelo de autômatos celulares para a formação de granulomas de tuberculose. . . . .	50
4.2	O limiar de ativação $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$ e a sua influência na dinâmica no modelo. . .	53
4.3	Distribuição das simulações de eliminação e contenção de bactérias em função do tempo de entrada das células $T_{H1}$ na rede. . . . .	85
4.4	Distribuição das simulações de eliminação e de contenção de bactérias em função do limiar de ativação ( $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$ ) para $T_{\text{recr}}=0$ . . . . .	86
4.5	Distribuição das simulações de eliminação e de contenção de bactérias em função do tempo de replicação $T_{\text{rep}}$ das bactérias intracelulares. . . . .	87
4.6	Distribuição das simulações onde houve a eliminação e a contenção de bactérias em função do número $BE_{\text{ini}}$ de bactérias iniciais. . . . .	88
4.7	Distribuição das simulações de eliminação e de contenção de bactérias em função da probabilidade $p_{\text{morte}}$ . . . . .	90
5.1	Resultados obtidos para conectividade média $\langle K \rangle$ , comprimento do caminho médio $L$ e o coeficiente de <i>clustering</i> $C$ calculados para as redes epidemiológicas e redes censitárias obtidas em Olinda. . . . .	104
5.2	Pesos médios $\langle W \rangle$ calculados para as 6 de definições de $W_{ij}$ nas redes epidemiológicas de Olinda. . . . .	115
5.3	Valores do coeficiente de <i>clustering</i> da rede epidemiológica com e sem peso, $C^W$ e $C$ respectivamente. . . . .	118
5.4	Pesos médios $\langle W \rangle$ calculados para as definições de peso $W(7)$ e $W(8)$ . . .	123
5.5	Valores dos coeficientes de <i>clustering</i> $C^W$ para os pesos $W(7)$ e $W(8)$ . . .	124
5.6	Conectividade média $\langle K \rangle$ , comprimento do caminho médio $L$ e coeficiente de <i>clustering</i> da rede $C$ , para as redes regulares. . . . .	127

- 5.7 Conectividade média  $\langle K \rangle$ , comprimento do caminho médio  $L$  e coeficiente de *clustering*  $C$ , para as redes Voronoi formadas a partir das redes de Olinda. 134
- F.1 Características gerais de várias redes complexas encontradas na natureza. 165

# INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença contagiosa que há séculos preocupa a humanidade, sendo causada pelo bacilo de Koch (*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)), bactéria aeróbica que se aloja principalmente nos pulmões, podendo infectar outros órgãos. O bacilo de Koch assim como os agentes infecciosos de algumas doenças respiratórias, espalha-se pelo ar quando expelidas pela fala, tosse, escarro e espirro de pessoas doentes [1]. A tuberculose tem a sua maior incidência nas regiões mais pobres do planeta, como por exemplo Sul da África e Ásia. Durante todo o século XX a tuberculose esteve presente como um problema de saúde pública no Brasil. Atualmente ocupamos o 15º lugar entre os 22 países que concentram 82% dos casos de tuberculose. A prevalência da TB no Brasil é de 58 casos para cada 100 mil habitantes, sendo registrados anualmente cerca de 100000 novos casos da doença. Apesar de ser uma doença curável, o percentual médio de cura dos tratamentos realizados no país é de 72%, sendo de 12% o índice de abandono [2].

O tratamento da tuberculose é lento, com duração média de 6 meses e consiste principalmente no uso de antibióticos [3]. Apesar de gratuito em alguns países, como no Brasil, o tratamento, por ser demorado e por ter uma série de efeitos colaterais é de difícil continuidade [4]. A vacina usada contra a tuberculose é a BCG (bacilo de Calmette-Guerin) [5,6], que não é 100% eficaz, já que observa-se o desenvolvimento de tuberculose em pessoas previamente vacinadas. Estes e outros fatores, levam anualmente em todo o mundo, o aparecimento de 9 milhões de novos casos de tuberculose e a morte de 2 milhões de pacientes [1].

A partir de 1993 houve um aumento muito grande do número de casos de tuberculose no mundo, o que levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar a tuberculose como uma das doenças que inspiram cuidados devido à sua abrangência na população mundial e adotar estratégias para aumentar a eficácia na detecção e no sucesso dos tratamentos. A estratégia DOTS (“Directly Observed Treatment Short Course”) que estava sendo implementada com sucesso na Índia, passa a ser adotada como principal estratégia sugerida pela OMS para atingir as metas de redução de prevalência. Outras metas são também estabelecidas por esta organização: atingir 85% de sucesso nos tratamentos e

70% de detecção de casos de TB nos países que concentram a maioria dos casos desta doença. O DOTS [2] sustenta-se em cinco pilares: detecção de casos por baciloscopia de doentes sintomáticos em serviços de saúde; tratamento padronizado de curta duração diretamente observado e monitorado; fornecimento regular das drogas terapêuticas; sistema de registro de informações que assegurem a avaliação e o controle do tratamento; compromisso do governo em colocar a tuberculose como prioridade entre as políticas de saúde.

Além da política de saúde pública de vigilância e controle da TB, uma intensa atividade de pesquisa tem sido observada na busca do desenvolvimento de drogas e vacinas mais eficazes no combate à TB. Hoje, parte dos estudos sobre a tuberculose está voltado para a chamada tuberculose latente [7,8], estado que pode perdurar durante toda a vida do indivíduo sem que o mesmo desenvolva os sintomas da doença. A tuberculose latente ocorre porque a maioria das pessoas que são infectadas não conseguem eliminar o bacilo de Koch, mantendo-a em um estado latente confinada em uma estrutura chamada granuloma [9]. O granuloma, uma reação inflamatória localizada, surge como resultado da resposta do sistema imunológico ao bacilo, cuja função é a de conter o avanço da infecção, eliminando ou dificultando o crescimento/replicação do patógeno. Atualmente cerca de 1/3 da população mundial está infectada com o bacilo de Koch [1], destas somente 10% desenvolvem a doença, 5% após a infecção inicial e os outros 5% restante durante o seu tempo de vida [10]. No entanto, cada vez mais tem se observado a reativação da TB com o aumento da idade ou na presença de doenças imunossupressoras como a SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida).

O entendimento dos mecanismos subjacentes a dinâmica de infecção da tuberculose e de como o sistema imunológico atua contra o bacilo de Koch é de fundamental importância para o desenvolvimento de drogas e/ou vacinas mais eficazes, que levem a erradicação da doença. Os avanços tecnológicos tem permitido estudar os aspectos genéticos do Mtb e o uso de modelos animais tem possibilitado o entendimento de vários aspectos da resposta imunológica e o teste de novas drogas e vacinas. No entanto, a questão sobre quais são os mecanismos fundamentais de interação entre o patógeno e o sistema imune ainda continua em aberto.

Como veremos ao longo deste trabalho, os resultados obtidos do estudo da TB utilizando modelos animais, nem sempre descrevem o mesmo padrão da doença desenvolvida em humanos, como é o caso dos camundongos. Quando o fazem, como no caso dos macacos, têm um custo elevado e existem questões éticas envolvidas no uso destes animais em

experimentos. Sendo assim, o desenvolvimento de modelos matemáticos, ou “modelos em sílico”, que descrevam os mecanismos essenciais na dinâmica de interação entre o bacilo da tuberculose e o sistema imunológico, tornam-se extremamente importantes e promissores no estudo da tuberculose. Tais modelos podem permitir testar hipóteses que muitas vezes não podem ser testadas em modelos animais, planejar experimentos animais que validem as mesmas, contribuindo assim para o desenho de novas drogas e vacinas, etc. É com este intuito que neste trabalho desenvolvemos um modelo matemático utilizando autômatos celulares para descrever a formação de granulomas na resposta imunológica ao bacilo de Koch. O modelo baseia-se na teoria de Algood e colaboradores [11], que considera os macrófagos e os linfócitos T, como as células fundamentais na dinâmica de formação de granulomas, enquanto que as quimiocinas e as citocinas gama interferon (IFN- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), são os principais sinalizadores celulares que participam deste processo. Como veremos, este modelo simplificado confirma a teoria de Algood e colaboradores, reproduzindo as 3 dinâmicas observadas nas respostas ao bacilo de Koch: eliminação, contenção e disseminação. Além disto, o mesmo reproduz com bastante sucesso os resultados obtidos em experimentos com camundongos. Estes resultados validam o modelo introduzido, em relação ao mesmo estar captando aspectos e mecanismos fundamentais da resposta imunológica ao bacilo de Koch.

Uma outra contribuição importante do modelo diz respeito aos resultados sobre a evolução temporal das distribuições espaciais das citocinas. Face as dificuldades de realizar tais medidas de forma acurada “in vivo” ou “ex-vivo”, o modelo poderá contribuir no desenho de experimentos animais que permitam confirmar o tipo de comportamento observado “in silico”. Este modelo poderá ser usado também no desenho de drogas e/ou vacinas, que atuem no nível de dinâmica descrita pelo mesmo.

Um outro estudo realizado neste trabalho de tese, está relacionado com a caracterização da complexidade de redes baseadas na distribuição espacial da população de Olinda (PE), que sustentam o processo endêmico de TB naquela população. A partir da análise realizada por Zorzenon dos Santos e colaboradores [12] das distribuições anuais de casos de TB por setor censitário<sup>1</sup> em dois períodos consecutivos, 1991-1995 e 1996-2000, os autores obtiveram os focos de infecção e as redes endêmicas nas quais se observam os caminhos do agente etiológico.

A partir das redes obtidas por Zorzenon dos Santos e colaboradores [12], caracteri-

---

<sup>1</sup>Unidades de coletas do censo demográfico, definidos como um agrupamento contíguo de aproximadamente 300 domicílios, com a população total em torno de 1200 habitantes [13].

zamos o tipo de comportamento complexo exibido por elas. Numa primeira abordagem analisamos os aspectos topológicos destas redes endêmicas, mostrando que as mesmas se comportam como redes tipo mundo pequeno. Também comparamos os resultados obtidos com resultados equivalentes para redes regulares e de Voronoi. Num segundo estudo destas redes endêmicas, definimos pesos associados às conexões entre dois setores censitários (nós), a partir do número de casos de TB acumulados ao longo de cada período de 5 anos nestes setores. No estudo das redes endêmicas com pesos, mostramos que elas apresentam comportamento de redes livre de escala.

Este trabalho de tese está organizado em 6 capítulos: no Capítulo 2, introduzimos os conceitos básicos de imunologia necessários para o entendimento da resposta imunológica específica desenvolvida para o bacilo de Koch. No Capítulo 3, descrevemos de maneira sucinta as principais questões envolvidas na modelagem animal de TB e apresentamos uma breve revisão dos principais modelos matemáticos desenvolvidos no estudo da tuberculose, que buscam descrever tanto a resposta imunológica inata como a adaptativa. No Capítulo 4, apresentamos o modelo de autômatos celulares proposto por nós para descrever os principais mecanismos da resposta imunológica a TB e a formação de granulomas. Neste mesmo capítulo descrevemos também os resultados obtidos com o modelo de AC para a formação de granulomas, ou seja, os três tipos de dinâmicas observados na natureza, a simulação de experimentos realizados com camundongos e a análise de parte do espaço de parâmetros. No Capítulo 5, apresentamos o trabalho de caracterização das redes epidemiológicas com e sem peso obtidas do processo endêmico de TB em Olinda. Finalmente no Capítulo 6, apresentamos as conclusões e perspectivas de trabalhos futuros.

# O SISTEMA IMUNOLÓGICO E A TUBERCULOSE

A todo tempo o nosso corpo está sujeito a entrada de diversos tipos de microorganismos, alguns deles bem-vindos, como é o caso das bactérias que fazem parte da microbiota, localizadas no intestino e ajudam nos processos de digestão. Outros microorganismos porém, causam doenças e seriam potencialmente perigosos a nossa saúde se não estivéssemos preparados para controlar as suas ações maléficas ou eliminá-los. Neste grupo enquadram-se os patógenos, microorganismos que são capazes de causar doenças, como por exemplo, algumas bactérias, vírus, parasitas e fungos [14]. Hoje, sabe-se que até algumas proteínas, componentes básicos de todas as células, podem atuar como agentes infecciosos, causando sérias doenças neurodegenerativas, como por exemplo, os príons que podem causar a encefalopatia espongiforme bovina, mais conhecida como “mal da vaca louca” [15]. O sistema imunológico ou sistema imune, engloba todos os mecanismos pelos quais o organismo se defende destes diferentes agentes externos, sendo constituído por barreiras físicas, órgãos, corrente sanguínea e linfática, células e proteínas [16]. Os patógenos possuem grandes diferenças entre si, diferem-se tanto nas suas estruturas, quanto nos seus mecanismos de patogênese, o que requer um enorme conjunto de ações diferenciadas do sistema imunológico.

As ações do sistema imunológico contra os patógenos podem ser divididas em dois tipos de respostas, a resposta imunológica inata e a resposta imunológica adaptativa [14, 16]. A primeira resposta é a resposta imunológica inata, cujos componentes principais, as células fagocitárias, destroem estes organismos sem que seja necessária uma exposição *a priori* a estes, ou seja, atuam de uma maneira inespecífica. A segunda resposta, a resposta imunológica adaptativa, engloba os linfócitos e difere da resposta inata porque ela é moldada para responder de forma específica para cada patógeno independentemente. Os anticorpos, como iremos ver adiante, são produzidos pelos linfócitos B somente depois que a infecção ocorre, sendo tais anticorpos específicos para o patógeno em particular.

Neste capítulo, não pretendemos fazer uma revisão minuciosa sobre o funcionamento do sistema imunológico, e sim fornecer os conceitos básicos que permitam compreender como a resposta imune ao bacilo de Koch é montada. Para leitores interessados sugerimos

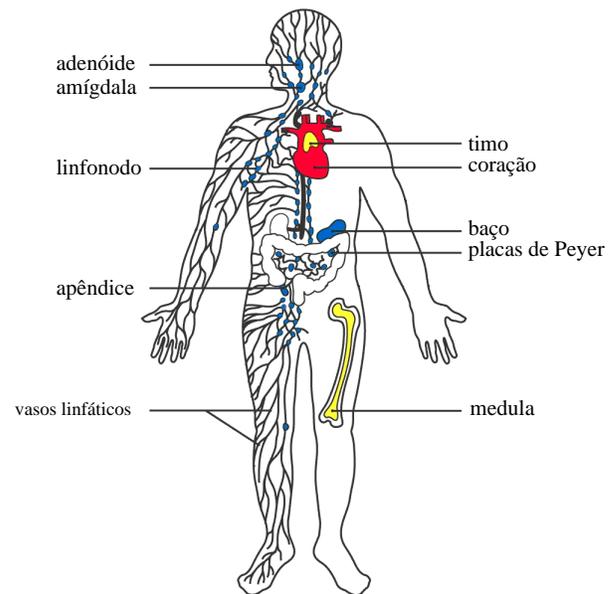
a leitura dos Capítulos 24 e 25 do livro “The Cell” [14], ou ainda o livro “Immunobiology” [16]. As respostas imunológicas específicas aos diferentes patógenos, envolvem diferentes células e sinais, portanto a resposta imunológica ao bacilo de Koch é caracterizada para este patógeno e não se aplica a outros patógenos.

## 2.1 CONSTITUINTES DO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Todas as células do sistema imunológico, conhecidas também como glóbulos brancos ou leucócitos, são produzidas nos órgãos linfáticos, os quais são divididos em centrais (primários) e periféricos (secundários) [16]. Chamamos de órgãos linfáticos centrais a *medula óssea* e o *timo*. Já entre os órgãos linfáticos periféricos podemos destacar a *adenóide*, a *amígdala*, o *apêndice*, o *baço*, os *linfonodos*, as *placas de Peyer* e os *vasos linfáticos*, todos ilustrados na Fig. 2.1.

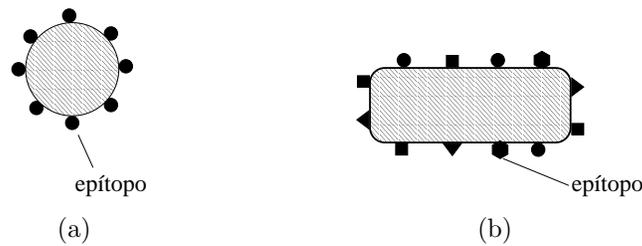
Na *medula óssea* são produzidas as células precursoras que darão origem a todas as células do sistema imunológico, como por exemplo: células dendríticas, monócitos, neutrófilos, basófilos, células B, células T, etc. Estas últimas, também conhecidas como linfócitos B e T, receberam o nome em função da letra inicial do nome (em inglês) do órgão linfático no qual elas se desenvolvem. Os linfócitos T se desenvolvem no *timo* (thymus) e os linfócitos B se desenvolvem na *medula ossea* (“*bone marrow*”). Dos órgãos linfáticos centrais, alguns dos leucócitos (como as células dendríticas e os monócitos) entram na corrente sanguínea e migram para patrulhar todos os tecidos do corpo. Já os linfócitos B e T depois de diferenciados, migram para os órgãos linfáticos periféricos por onde circularão continuamente.

Os patógenos podem entrar no corpo por diferentes rotas e iniciar uma infecção em qualquer parte do organismo. O contato destes com os linfócitos em geral acontecem nos órgãos linfáticos periféricos, onde inicia-se a montagem da resposta adaptativa específica. Por exemplo, os linfonodos estão localizados em pontos de convergências do vasos do



**Figura 2.1** Distribuição dos principais órgãos linfáticos pelo corpo [16].

sistema linfático, um sistema constituído de veias que coleta os fluidos extracelulares (linfa) dos tecidos e os retorna para o sangue (Fig. 2.1). Os vasos linfáticos servem de vias de transportes de patógenos do sítio de infecção para os órgãos linfáticos. Como iremos ver, os patógenos são processados e carregados do sítio de infecção para os órgãos linfáticos periféricos por células especializadas da resposta inata, como por exemplo, as células dendríticas. As partes dos patógenos reconhecidas pelo sistema imunológico e são chamadas de antígenos. Os antígenos possuem sítios de reconhecimentos denominados de determinantes antigênicos (epítomos) através dos quais ocorrem a interação com células ou outros elementos do sistema imunológico. Dependendo do patógeno, podemos observar a existência de um ou mais epítomos, conforme esquematizado na Fig. 2.2.



**Figura 2.2** Dois tipos de patógenos (a) e (b) com 1 e 4 epítomos diferentes respectivamente. Os epítomos são as partes do antígeno reconhecidas pelo sistema imunológico.

### 2.1.1 Resposta imunológica inata

A resposta imunológica inata ou resposta inata é inespecífica e funciona da mesma forma para todos patógenos. A resposta inata [14, 16, 17] pode ser encontrada em todos os animais e plantas e consiste basicamente de barreiras físicas de proteção, que são compostas por tecidos epiteliais (epitélios) ou células fagocitárias. As superfícies epiteliais que revestem as cavidades e a parte externa do corpo, através das junções estreitas entre suas células, criam barreiras que dificultam a entrada e colonização de patógenos. Além disso, o interior e o exterior destas superfícies epiteliais, também são cobertos por uma camada de muco que contém substâncias (moléculas tóxicas, peptídeos, enzimas) que também podem destruir ou inibir o crescimento de patógenos [14, 16]. Por exemplo, no trato respiratório, as células do epitélio são ciliadas e estão cobertas por uma camada de muco, assim microorganismos cobertos por este muco, podem ser expelidos facilmente através do fluxo provocado pelos movimentos ciliares. Outros exemplos destas substâncias produzidas pelas superfícies epiteliais são: a saliva, os sais biliares, o pH ácido ( $\sim 2$ ) e as

enzimas digestivas do estômago. Algumas superfícies epiteliais porém, são menos robustas, como por exemplo o intestino delgado, onde oxigênio e nutrientes são absorvidos e a entrada de patógenos através de especializadas interações célula-superfície se torna mais fácil.

Quando um patógeno consegue atravessar as barreiras epiteliais (através de um ferimento por exemplo), ele se deparará com as células fagocitárias (fagócitos), células que estão presentes em todos os tecidos. A palavra “fago” vem do grego “phágos” que significa: “o que come”. A função dos fagócitos é a de “limpeza”, sendo os mesmos responsáveis não só por encontrar e degradar patógenos, mas também por remover células mortas e tumorais do organismo. Por meio de receptores na sua superfície celular, os fagócitos conseguem reconhecer as estruturas moleculares que estão presentes nos patógenos, daquelas presentes no hospedeiro. Por exemplo, estes receptores reconhecem diretamente as superfícies dos patógenos, ligando-se a padrões de estruturas moleculares que são características das superfícies dos micróbios, e não são encontrados no hospedeiro. Dentre os receptores das células fagocitárias podemos citar os receptores tipo *toll* (TLR) (TLR, sigla em inglês para “**T**oll-**L**ike **R**eceptores”) cujo papel é ativar os fagócitos a responderem aos patógenos; receptores manose, que reconhecem resíduos de manose em arranjos espaciais característicos dos micróbios; receptores Fc (“**F**ragmento **c**ristalizável”), que ligam-se a patógenos marcados com anticorpos; etc [16].

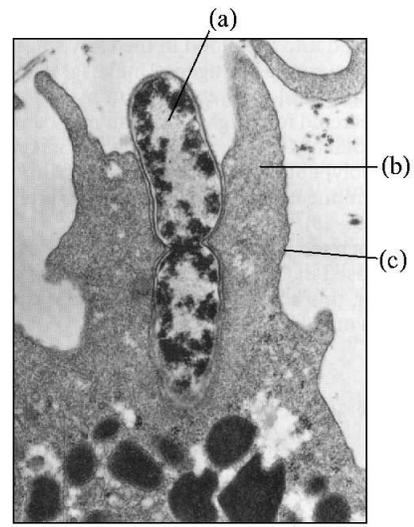
A ligação do fagócito com o patógeno, por meio dos seus receptores dá início a um processo chamado fagocitose, no qual o patógeno ficará sujeito aos mecanismos de degradação da célula. Na fagocitose, o fagócito lança porções da sua membrana plasmática (pseudópodos) sobre o patógeno, engolfando-o e internalizando-o em um compartimento chamado fagossomo, Fig. 2.3. Os fagócitos possuem organelas chamadas lisossomos que contêm enzimas, proteínas e peptídeos que podem mediar a ação antimicrobica intracelular. A fusão do fagossomo com um ou mais lisossomos em um único compartimento chamado fagolisossomo, libera o conteúdo do lisossomo para destruir o patógeno, conforme a ilustração na Fig. 2.4. Os fagócitos também produzem uma série de outros produtos tóxicos que ajudam a matar os microorganismos engolfados, como por exemplo os intermediários reativos de oxigênio (ROI, do inglês “**R**eactive **O**xygen **I**ntermediates”) e os intermediários reativos de nitrogênio (RNI, do inglês “**R**eactive **N**itrogen **I**ntermediates”), como o peróxido de oxigênio ( $H_2O_2$ ) e o óxido nítrico ( $NO$ ) [18]. Nos compartimentos vesiculares (fagossomo) é onde concentra-se toda a atividade microbida, evitando-se assim que a célula sofra injúrias.

Ao interagir com o patógeno, o fagócito inicia também a produção de sinalizadores que vão direcionar a migração de outras células do sistema imunológico da circulação periférica, para o sítio de infecção, dando início a um processo inflamatório. Como iremos ver adiante, o processo inflamatório é iniciado e sustentado por proteínas conhecidas por citocinas e quimiocinas.

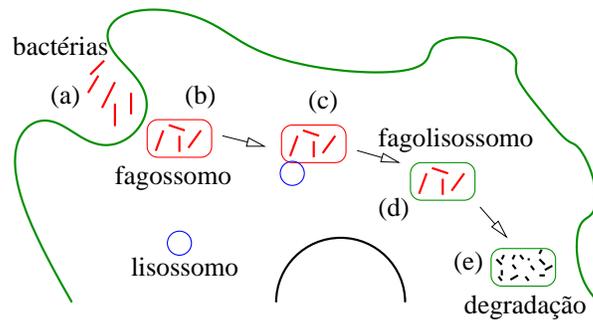
Os macrófagos, neutrófilos e as células dendríticas, compõem o conjunto principal dos fagócitos, sendo chamadas também de fagócitos profissionais. Os macrófagos são células maturadas dos monócitos [19], em geral residentes nos tecidos e são as primeiras células a detectarem os patógenos. Exemplos de macrófagos são as células de Kupffer, no fígado; as células micróglias, no cérebro e os macrófagos alveolares, nos pulmões. Estes últimos, desempenham papel importante na resposta imunológica à tuberculose e são responsáveis por manter o ambiente pulmonar livre de microorganismos e de partículas de poluição que por ventura possam ser inalados pelo indivíduo. Os neutrófilos estão majoritariamente presentes no sangue periférico e não são encontrados em tecidos saudáveis. Ao contrário dos macrófagos que têm vida longa, os neutrófilos morrem logo após degradarem o microorganismo fagocitado, sendo o maior componente do pus gerado em algumas infecções. As células dendríticas são responsáveis pela apresentação de antígenos e pelo início da resposta adaptativa, sendo também conhecidas como células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês “Antigen Presenting Cell”). Os macrófagos e as células B (descritas na próxima Seção) também podem funcionar como células apresentadoras de antígenos em algumas situações específicas.

Nem sempre a resposta inata é suficiente para barrar e eliminar os patógenos encontrados. Por exemplo, no caso da tuberculose, dependendo da virulência da bactéria, depois de fagocitada, ela pode escapar dos mecanismos de degradação e infectar o macrófago alveolar. Em casos como este, onde a resposta inata não consegue eliminar o patógeno, o desenvolvimento da resposta adaptativa, torna-se de fundamental importância na eliminação do invasor.

As células apresentadoras de antígenos é que fazem o elo entre a resposta inata e a res-



**Figura 2.3** Fagocitose de uma bactéria por uma célula especializada. (a) bactéria, (b) pseudópodos, (c) membrana plasmática. Imagem obtida por micrografia eletrônica, a barra equivale a  $1\mu\text{m}$  [14].



**Figura 2.4** Esquema do processo de fagocitose e degradação de bactérias por célula especializada indicando: (a) fagocitose, (b) fagossomo, (c) fusão do fagossomo com o lisossomo, (d) fagolisossomo, (e) degradação das bactérias [16].

posta adaptativa. Após a fagocitose do patógeno ou de seus produtos, a célula dendrítica migra do sítio de infecção para os órgãos linfáticos periféricos onde então expressa na sua superfície celular fragmentos (peptídeos) derivados de proteínas processadas do patógeno. Estes peptídeos na superfície celular das células dendríticas servirão de antígenos para o reconhecimento e ativação das células da resposta adaptativa. Os peptídeos dos patógenos processados pela célula APC, são levados à superfície celular e apresentado às células da resposta adaptativa (linfócitos) por meio de moléculas especializadas e codificadas em um agrupamento de genes chamado de complexo maior de histocompatibilidade, usualmente abreviadas como MHC (“**M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex”). As moléculas MHC foram observadas pela primeira vez em estudos sobre a compatibilidade dos tecidos transplantados em camundongos. As moléculas MHC destes tecidos foram identificadas como os principais antígenos nas reações de rejeição ao mesmo [14]. Estas moléculas são divididas em duas classes: moléculas MHC de classe I (MHC I) e moléculas MHC de classe II (MHC II). Por meio do sítio de ligação existente na molécula MHC, os peptídeos processados do patógeno no citosol<sup>1</sup>, são coletados pelas moléculas MHC I e os peptídeos processados do patógeno em compartimentos vesiculares como o fagossomo, são coletados pelas moléculas MHC II. Tendo alcançado a superfície celular da APC, as diferentes classes de moléculas MHC, como vamos ver adiante, são reconhecidas por diferentes célula da resposta adaptativa que irão gerar respostas específicas distintas.

<sup>1</sup>O citosol é o espaço entre a membrana plasmática e o núcleo celular, onde estão imersos os outros componentes das células, como por exemplo, as organelas.

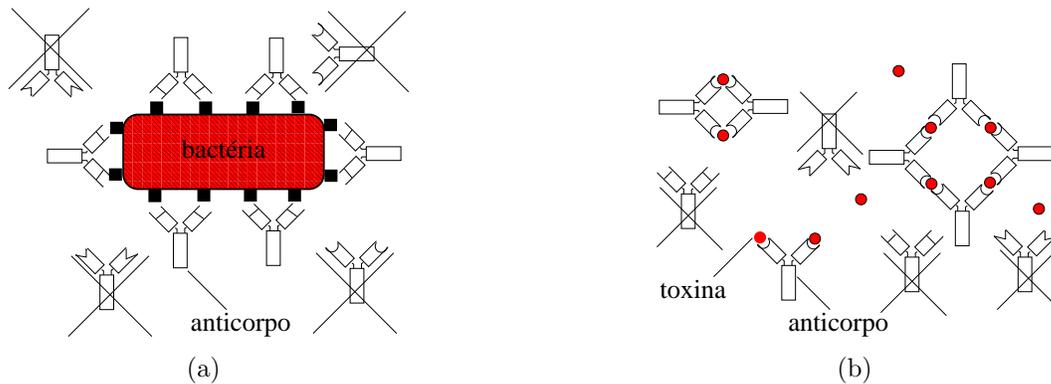
### 2.1.2 Resposta imunológica adaptativa

A resposta imunológica adaptativa ou resposta adaptativa é encontrada somente nos vertebrados e gerada principalmente pelas células B e T [16]. Estas células não possuem os mecanismos de fagocitose e de degradação como os encontrados nos fagócitos e atuam contra os patógenos por outros caminhos, como por exemplo, no reconhecimento e neutralização dos mesmos e no aumento da eficiência da resposta inata. A característica mais importante da resposta adaptativa é sua capacidade de responder a milhões de antígenos diferentes de uma maneira altamente específica. Diferentemente das células da resposta inata, ao longo da vida do indivíduo os linfócitos B podem expressar uma infinidade de receptores diferentes. De acordo com a Teoria de Seleção Clonal, proposta por Macfarlane Burnet nos anos 50, o organismo produz esta grande diversidade de linfócitos para que os mesmos sejam capazes de responder a milhões de antígenos. É o antígeno portanto, que seletivamente estimula os linfócitos que possuem receptores específicos para os seus epítomos. O termo “clonal” na teoria de seleção clonal deriva do postulado de que a resposta adaptativa é composta de milhões de famílias ou clones de linfócitos, cada uma consistindo de células T ou B descendentes de uma célula comum, ou seja, com a mesma especificidade em termos de receptores [14]. Ao contrário dos receptores que mediam a resposta adaptativa, na resposta inata é sempre o mesmo conjunto de receptores que irá estar presente em todas as células e portanto neste caso a resposta será mais rápida, já que a mesma não demanda o tipo de atraso imposto pela expansão clonal dos linfócitos, necessária na resposta adaptativa.

As células B são conhecidas pela produção de imunoglobulinas (Ig), proteínas de reconhecimento que servem como receptores celulares para os epítomos. Estas proteínas são produzidas com ampla variedade de formas, porém, cada célula B produz somente imunoglobulinas de um único tipo. As imunoglobulinas liberadas pelas células B são conhecidas como anticorpos (Ab) e são cópias idênticas das suas imunoglobulinas de superfície. O número total de anticorpos diferentes que encontramos em um indivíduo é conhecido como repertório de anticorpos ou repertório de imunoglobulinas, sendo que nos humanos este é da ordem de  $10^{11}$  e no camundongo da ordem de  $10^9$  [16]. Ou seja, cada indivíduo pode expressar até  $10^{11}$  Ab durante o seu tempo de vida. O número de anticorpos presentes em um dado momento é limitado pelo número de células B presentes que refletem a história passada de exposição antigênica do indivíduo.

Os anticorpos são proteínas em forma de “Y”, possuindo na extremidade de seus dois

“braços” sítios de ligações idênticos, cujas funções principais são de ligar-se aos patógenos e aos seus produtos tóxicos. As ligações dos anticorpos com os epítomos do patógeno são do tipo chave-fechadura, ou seja, para que o receptor de uma célula B se ligue ao epítomo de um antígeno, deve haver uma complementaridade na ligação entre eles do tipo ilustrado na Fig. 2.5.



**Figura 2.5** Ligações dos anticorpos com a bactéria (a) e dos anticorpos com toxinas (b). Dentre os 3 tipos de anticorpos, a ligação é feita apenas com o anticorpo de receptor específico para o epítomo.

Os anticorpos liberados pelas células B só têm ação contra patógenos extracelulares, ou seja, contra os patógenos que não se alojam no interior das células. A ligação do anticorpo com o patógeno pode neutralizá-lo, como acontece com as toxinas ilustradas na Fig. 2.5(b), que ficam impedidas de se ligarem com as células e facilitando assim o trabalho de fagocitose do mesmo. Os fagócitos, como os macrófagos, possuem receptores na sua superfície (receptores FC) que se ligam à cauda dos anticorpos e desta forma reconhecem o patógeno marcado (com vários anticorpos ligados a sua superfície) o que facilita o processo de fagocitose.

As células T são muito parecidas morfológicamente com as células B e os seus receptores de reconhecimento (TCR) de antígenos se parecem com a imunoglobulina tanto na sua forma estrutural<sup>2</sup>, como nos mecanismos genéticos que geram a sua grande diversidade de formas. Contudo, os receptores das células T não são secretados como os anticorpos e não reconhecem ou ligam-se aos antígenos diretamente como os receptores das células B. Os TCRs somente reconhecem os peptídeos específicos derivados de proteínas de patógenos quando ligados com as moléculas MHC, ou seja, os receptores das células T ligam-se ao complexo MHC - peptídeo.

<sup>2</sup>O receptor de células T (TCR) é parecido estruturalmente com o “braço” de uma imunoglobulina.

Dos órgãos linfáticos centrais até o sítio de infecção, as células T passam por vários processos (maturação, proliferação e diferenciação) até atingirem o estado efetor no qual estarão aptas a participarem da resposta imunológica. No *timo*, as células T expressam inicialmente, além do receptor TCR, dois coreceptores, CD4 e CD8, sendo conhecidas como células T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (duplamente positiva (DP)) [20]. Os coreceptores CD4 ligam-se com as moléculas MHC II e os coreceptores CD8 ligam-se com as moléculas MHC I, auxiliando assim os receptores das células T no reconhecimento e ligação com o complexo MHC - peptídeo. Em um estágio posterior, ainda no *timo*, as células T duplamente positivas perdem um dos dois coreceptores (CD4 ou CD8) tornando-se então células T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (células T CD4<sup>+</sup>) ou células T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (células T CD8<sup>+</sup>), e a partir deste estágio migram para os órgãos linfáticos periféricos<sup>3</sup>. As células T CD4<sup>+</sup> possuem funções auxiliares sendo responsáveis pela ativação de outras células do sistema imunológico, como por exemplo dos macrófagos infectados e das células B, já as células T CD8<sup>+</sup> possuem funções citotóxicas sendo responsáveis pela destruição de células infectadas.

Quais os tipos de células T, auxiliares e/ou citotóxicas irão ser requisitadas na resposta adaptativa, como visto na Teoria de Seleção Clonal, irá depender do patógeno encontrado pelas células apresentadoras de antígenos. Ao migrarem para os órgãos linfáticos, as APCs fornecem dois sinais de ativação para as células T, a partir dos quais elas proliferam-se e diferenciarão para um estado efetor. Um dos sinais das APCs é a apresentação dos peptídeos de antígenos para as células T por meio das moléculas MHC (complexo MHC - peptídeo); o segundo sinal é fornecido por moléculas coestimuladoras produzidas pelas próprias APCs, como por exemplo a molécula B7. A ausência do segundo sinal, chamado sinal coestimulador, inibe a ativação da célula T.

Na resposta imunológica à vírus ou bactérias que vivem no citosol da célula infectada, as células apresentadoras de antígenos expressam na sua superfície os peptídeos processados destes patógenos ligados com as moléculas MHC I. Neste caso, a interação da APC irá ocorrer somente com as células T CD8<sup>+</sup> cujo receptor TCR é específico para o antígeno apresentado. O patógeno residente no citosol está livre dos mecanismos microbicidas da célula infectada e do alcance dos anticorpos e neste caso a célula infectada precisa ser destruída. A função das células T CD8<sup>+</sup> é induzir as células infectadas à apoptose (morte celular programada), sendo um importante meio de eliminação das fontes de novas partículas virais e de bactérias, livrando o hospedeiro da infecção. Um

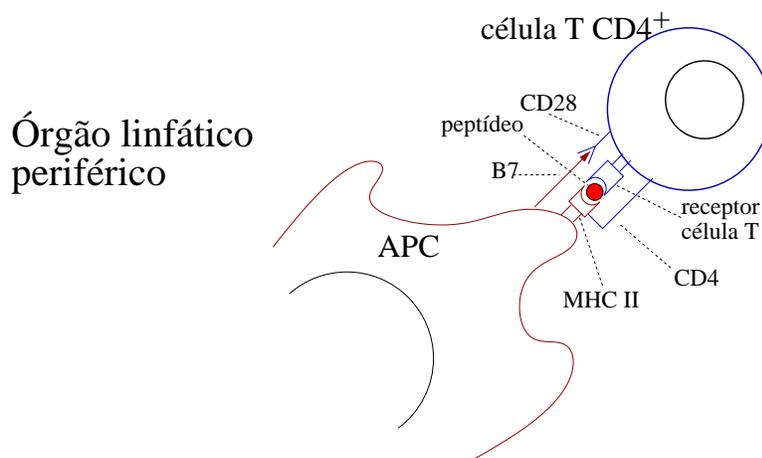
---

<sup>3</sup>O índice “+” e o índice “-” indicam respectivamente que o receptor está sendo expresso ou não.

dos mecanismos utilizados na indução da apoptose das células infectadas é a abertura de canais transmembrana, local por onde passarão proteases (ex: serina) que darão início a apoptose. A ação das células T CD8<sup>+</sup> é bastante efetiva e leva a apoptose somente células infectadas, não afetando as células saudáveis nas proximidades.

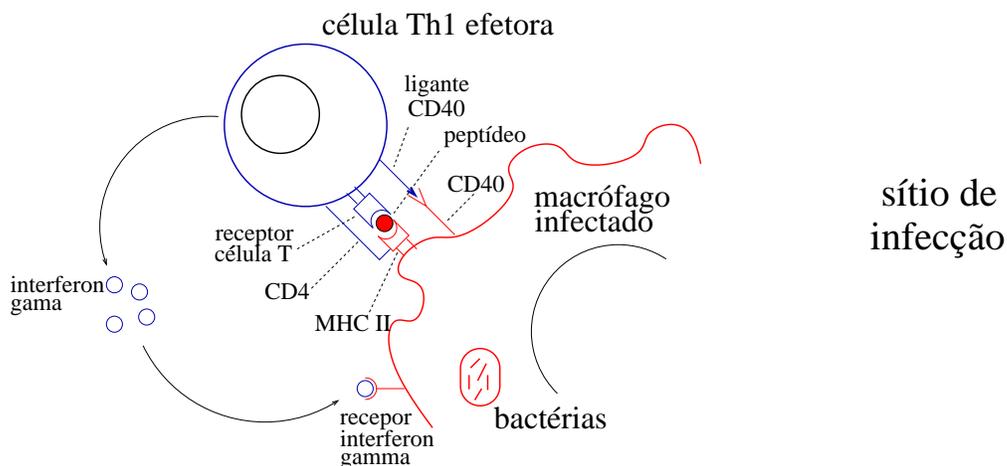
Já na resposta a bactérias e/ou seus produtos alojados em compartimentos vesiculares das células infectadas, a APC ao migrar para os órgãos linfáticos periféricos, irá expressar na superfície celular, os peptídeos processados ligados a moléculas MHC II. O complexo MHC II - peptídeo será reconhecido pela célula T CD4<sup>+</sup> cujo receptor TCR é específico para o antígeno (veja na ilustração da Fig. 2.6). As células T CD4<sup>+</sup>, cuja função será ativar outras células, após contato com a APC podem se encontrar em uma de duas classes funcionais: T<sub>H</sub>1, cuja função principal é ativar os macrófagos infectados e eliminar os patógenos intravesiculares que eles abrigam; e T<sub>H</sub>2, no qual ativam as células B a produzirem anticorpos, para marcarem por exemplo, bactérias que se proliferaram extracelularmente e gerando patologias ligadas a produção de toxinas pelas mesmas. Antes de ser ativada pela célula apresentadora de antígenos, a célula T CD4<sup>+</sup> também é conhecida como célula T<sub>H</sub>0. Qual o tipo de célula T CD4<sup>+</sup> irá ser ativada, se T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2, é uma questão que ainda não foi completamente entendida. Algumas proteínas sinalizadoras como por exemplo as interleucinas IL-12, IL-4 e o gama interferon (IFN- $\gamma$ ), que atuam no local de interação entre a célula T CD4<sup>+</sup> e a célula apresentadora de antígenos, influenciam nesta diferenciação (ver próxima subseção). Se as células T CD4<sup>+</sup> efetoras forem do tipo T<sub>H</sub>1, elas migram para o sítio de infecção onde vão ativar os macrófagos infectados. Como no caso das células T CD8<sup>+</sup>, as células T<sub>H</sub>1 irão reconhecer as células infectadas, porque estas também expressam na sua superfície celular o mesmo complexo MHC II - peptídeo pelo qual o linfócito foi ativado. Na ativação do macrófago infectado a célula T<sub>H</sub>1 utiliza um ligante para o receptor CD40 do macrófago e produz IFN- $\gamma$ , como ilustra a Fig. 2.7. As células T<sub>H</sub>1 no sítio de infecção, podem também ativar as células dendríticas, criando um processo de realimentação positivo para a apresentação de antígenos.

Se no entanto as células T CD4<sup>+</sup> efetoras forem do tipo T<sub>H</sub>2, elas irão ativar as células B cujas imunoglobulinas são específicas para os epítomos do patógeno. Como as células T, as células B também precisam de dois sinais para a sua ativação. Um dos sinais é fornecido pelo antígeno com a sua ligação ao receptor de superfície da célula B. O receptor



**Figura 2.6** Ativação de célula T  $CD4^+$  por uma célula apresentadora de antígenos (APC). A célula T  $CD4^+$  reconhece o complexo MHC II - peptídeo complementar ao seu receptor. A ligação da molécula B7 com o receptor CD28 fornece um sinal coestimulador para a ativação da célula T.

da célula B juntamente com antígeno são então endocitados<sup>4</sup>, processados e levados até a superfície celular pela molécula MHC II. O segundo sinal necessário para a ativação da célula B é então fornecido pela célula  $T_H2$  (ex: ligante para o receptor CD40), a partir do qual a célula passa para o estado efetor, proliferando e produzindo anticorpos. Sem o segundo sinal da célula  $T_H2$ , a ativação da célula B é inibida [14].



**Figura 2.7** Ativação do macrófago infectado com bactérias pela célula T  $CD4^+$  ( $T_H1$ ) ativada como no caso da TB. A célula  $T_H1$  reconhece o MHC II - peptídeo da célula infectada pelo qual foi previamente ativada. A ativação do macrófago infectado acontece com o ligante para o receptor CD40 e com o sinalizador gama interferon (IFN- $\gamma$ ).

<sup>4</sup>A endocitose é um processo semelhante à fagocitose, porém ocorre apenas para partículas pequenas.

Na Tabela 2.1 apresentamos uma síntese das funções dos linfócitos B e T apresentados até aqui, bem como o tipo de patógeno em cuja resposta imunológica específica eles atuam.

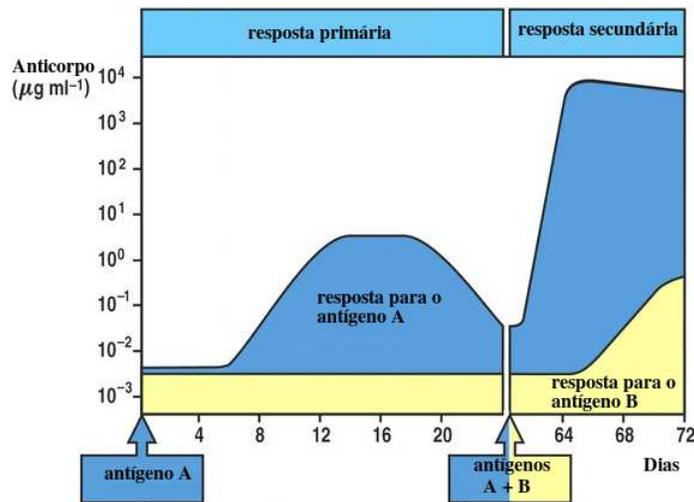
LINFÓCITO	FUNÇÃO	TIPO DE PATÓGENO
B	produção de anticorpos	extracelular
T CD4 <sup>+</sup> (T <sub>H</sub> 1)	ativação do macrófago infectado e ativação da APC	intracelular, residente em compartimento vesicular
T CD4 <sup>+</sup> (T <sub>H</sub> 2)	ativação das células B	extracelular
T CD8 <sup>+</sup>	responsáveis pela morte das células infectadas	intracelular, residente no citosol

**Tabela 2.1** Principais funções dos linfócitos T e B.

Como a resposta adaptativa depende da resposta inata para o seu desenvolvimento, dependendo do patógeno, o período necessário para gerar uma resposta adaptativa pode variar de dias a semanas [16]. Os linfócitos têm tempo de vida limitado e a maioria destas células geradas pela expansão clonal eventualmente sofrem apoptose, contudo um número significativo de linfócitos persistem depois que o antígeno é eliminado. Estas células são conhecidas como células de memória e formam as bases da memória imunológica, que garante uma resposta mais rápida e efetiva em um segundo encontro com o mesmo patógeno. Numa apresentação posterior do mesmo antígeno ao sistema imunológico, estas células de memória tornam-se efectoras mais rapidamente e portanto a expansão clonal também é mais rápida. Desta forma a resposta secundária é gerada mais rapidamente e tem maior intensidade que a primária. A memória imunológica é a consequência biológica mais importante do desenvolvimento da resposta adaptativa, embora as suas bases celulares e moleculares ainda não estejam completamente entendidas. A memória imunológica adquirida pela resposta adaptativa explica porque só contraímos determinados tipos de doenças uma única vez, como é o caso da caxumba, catapora, sarampo, etc [16]. A existência desta memória é demonstrada em modelos animais para as células B. Da evolução temporal da contagem de anticorpos na Fig. 2.8, observamos que se um animal recebe uma dose de um antígeno “A”, depois de vários dias há um crescimento do número de anticorpos até atingir um valor máximo e depois do controle do patógeno, decresce gradualmente (Fig. 2.8). Este comportamento é característico da resposta imunológica primária ao antígeno “A”. Se depois de algumas semanas, meses ou até anos, o animal é reinfectado com o antígeno “A”, ele irá produzir a resposta imunológica secundária a este antígeno que é muito diferente da resposta primária: o período

de atraso da resposta é menor e a resposta é mais intensa. Esta diferença observada no comportamento da contagem no número de anticorpos, indica que o animal guarda certa memória da sua primeira exposição ao antígeno “A”. No entanto se após a infecção pelo antígeno “A” ao invés de ocorrer um novo contato com “A”, ocorre um contato com um novo antígeno tipo “B”, a resposta imunológica será novamente do tipo primária.

A memória imunológica adquirida nos processos de ativação é o princípio básico do desenvolvimento das vacinas, onde a resposta adaptativa a um patógeno é induzida por uma forma morta ou atenuada (não patogênica) do mesmo. Desde que Edward Jenner (1796) descobriu através dos seus experimentos que a varíola bovina induzia proteção contra a varíola humana, mesmo sem saber da existência de patógenos [16], a imunologia moderna tem crescido bastante e desenvolvido vacinas para várias doenças, como a poliomielite, tétano, difteria, hepatite B, sarampo, rubéola, etc [16]. No entanto existem várias doenças que ainda não possuem uma vacina do tipo usual, como por exemplo, a malária, esquistossomose, SIDA e doenças respiratórias. Hoje existem estudos promissores sobre novas vacinas, chamadas vacinas gênicas, que ao invés de usarem o patógeno morto ou atenuado em sua virulência, utiliza pedaços do DNA (plasmídeos) do agente infeccioso. Estes pedaços de DNA codificam fatores de virulência que quando injetados no indivíduo, são capazes de estimular uma resposta imunológica. Na tuberculose, por exemplo, existem estudos com bons resultados para o desenvolvimento de vacinas deste tipo [21, 22].



**Figura 2.8** Número de anticorpos em função do tempo, devido a apresentação de dois antígenos, “A” e “B”. A resposta secundária ao antígeno “A” acontece de forma muito mais rápida e intensa, caracterizando a memória do sistema imunológico para este antígeno [16].

### 2.1.3 Citocinas e Quimiocinas

Todo o processo de montagem de resposta do sistema imunológico, seja resposta inata ou adaptativa, é influenciado pela ação de sinalizadores chamados citocinas [11, 23], que são pequenas proteínas (aproximadamente 25 kDa) secretadas pelas células do sistema imunológico em resposta a sinalização de outras células e/ou a presença de patógenos [16]. No processo cooperativo que se estabelece entre as diferentes células, estes sinalizadores são os mensageiros e/ou ativadores de funções, agindo via receptores específicos existentes na superfície das suas células de atuação. As citocinas podem agir de uma maneira autócrina, influenciando o comportamento da própria célula que a produz; de forma parácrina, afetando o comportamento das células adjacentes; ou pode agir de maneira endócrina, afetando o comportamento de células distantes. As citocinas possuem várias funções: (a) estão associadas com os processos pró-inflamatórios (rubor, edema, dor, calor) e anti-inflamatórios; (b) participam da ativação de macrófagos, nos processos de ativação, diferenciação e proliferação dos linfócitos; (c) induzem o processo de migração celular, etc.

A apresentação de antígenos para a célula  $T_H0$ , como vimos anteriormente na resposta adaptativa, pode dar origem a células T efectoras do tipo  $T_H1$  ou do tipo  $T_H2$ , que se distinguem pelas citocinas que produzem. A célula  $T_H1$  característica da resposta imunológica no caso da tuberculose, irá produzir gama interferon ( $IFN-\gamma$ ) e também fator de necrose tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ) que irão atuar na ativação do macrófago infectado, aumentando a sua atividade microbicida e sua eficiência na eliminação de patógenos localizados dentro do fagossomo. A célula  $T_H2$  que irá ativar células B, vai produzir majoritariamente, IL-4 e IL-10, dentre outras citocinas. A rota de diferenciação da célula  $T_H0$ , também depende de estímulos de citocinas específicas em seus receptores no ato da apresentação ao antígeno pela APC. Por exemplo, no caso da TB, a diferenciação das células  $T_H0$  para  $T_H1$ , é influenciada principalmente pela presença das citocinas  $IFN-\gamma$  e IL-12, onde a última é produzida pela própria célula APC devido ao contato com as bactérias. Já a diferenciação das células  $T_H0$  para  $T_H2$  é influenciada principalmente pela presença da citocina IL-4 e por outras citocinas cuja produção é estimulada pela infecção por vermes, parasitas ou por outros agentes infecciosos extracelulares [14].

O balanço entre as quimiocinas é de fundamental importância no estabelecimento da resposta imunológica [24], como no caso da diferenciação das células T CD4<sup>+</sup>. Uma vez que a resposta por células T<sub>H</sub>1 ou por células T<sub>H</sub>2 se desenvolve, ela predomina e suprime a outra. As citocinas IL-4 e IL-10 produzidas pela célula T<sub>H</sub>2 inibem o desenvolvimento das células T<sub>H</sub>1 enquanto que o IFN- $\gamma$  produzido pelas células T<sub>H</sub>1 inibe o desenvolvimento das células T<sub>H</sub>2. Uma vez definida a resposta T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2, o tipo de resposta específica é mantida, havendo raramente inversão da resposta em relação à inicial [14].

As funções das citocinas dependem também do local no qual são produzidas. Como vimos anteriormente, IFN- $\gamma$  produzido pelas células T<sub>H</sub>1 nos linfonodos induzem a diferenciação da célula T<sub>H</sub>0 para a célula T<sub>H</sub>1. Já o IFN- $\gamma$  produzido pelas células T<sub>H</sub>1 no sítio de infecção é um dos sinais necessários para a ativação do macrófago (Fig. 2.7).

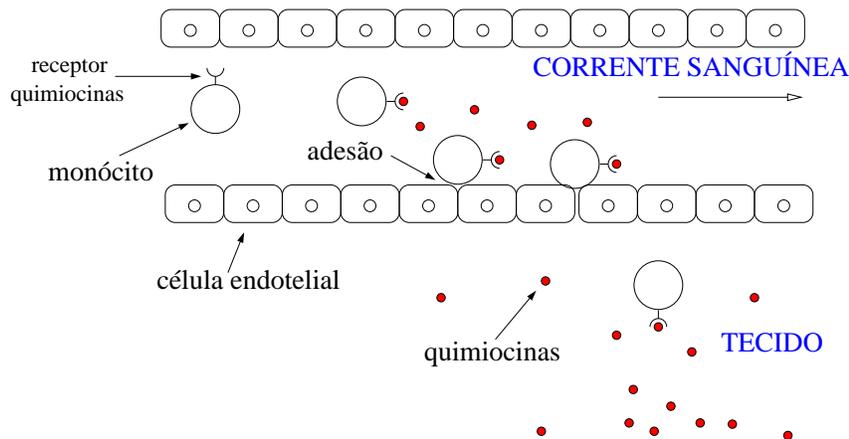
O macrófago também produz importantes citocinas, tais como: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , do inglês “Tumor Necrosis Factor”), IL-12 e IL-10. O TNF- $\alpha$  tem caráter inflamatório, atuando nas células endoteliais<sup>5</sup>, sendo responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, em função de mudanças ocorridas nas junções célula-célula. As células endoteliais estimuladas pela TNF- $\alpha$  produzem moléculas de adesão, que juntamente com as quimiocinas (citocinas quimioatratadoras, vamos ver adiante), aumentam o recrutamento de outras células do sistema imunológico para os tecidos, como por exemplo, os neutrófilos, monócitos e posteriormente os linfócitos (Fig. 2.9). O TNF- $\alpha$  serve também de auto estímulo (autócrina), aumentando a sua produção de quimiocinas. Já a citocina IL-12, como vimos, atua na diferenciação das células T<sub>H</sub>0 em células T<sub>H</sub>1. A citocina IL-10 tem caráter anti-inflamatório, inibindo a produção de sinalizadores bem como a ativação do próprio macrófago. A função da IL-10 é evitar que a ação do sistema imunológico cause injúria ao próprio organismo, como é o caso da necrose de tecido causada pelo TNF- $\alpha$ , que em casos extremos, também pode levar o organismo ao choque séptico, com a vaso-dilatação.

Algumas citocinas tem ação quimiotática e são conhecidas como quimiocinas [25–29]. Este é o caso por exemplo das citocinas CCL2, CCL3, CCL4, e outras, que são produzidas no sítio de infecção, principalmente pelas células infectadas. As quimiocinas são responsáveis pela migração das células do sistema imunológico da circulação periférica até o sítio de infecção [30] (veja a Fig. 2.9). As células do sistema imunológico recrutadas,

---

<sup>5</sup>Células de revestimento de todos os vasos sanguíneos.

numa resposta específica, tais como os neutrófilos e os linfócitos, possuem receptores para quimiocinas e portanto se deslocam orientando-se pelo gradiente de concentração das mesmas em direção ao sítio de infecção. Como iremos ver na próxima seção, quimiocinas tem um papel importante na formação do granuloma de tuberculose.



**Figura 2.9** Influxo de monócitos da circulação sanguínea para o tecido próximo ao sítio de infecção. As quimiocinas estimulam a adesão dos monócitos às células endoteliais, auxiliando na saída da corrente sanguínea e na migração celular até o local de infecção.

Na Tabela 2.2 resumimos as função das citocinas discutidas até agora, citocinas estas que atuam na resposta imunológica a tuberculose, que será discutida em mais detalhes na próxima seção. Uma revisão mais completa sobre as citocinas pode ser encontrada nos apêndices III e IV da ref. [16].

## 2.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO BACILO DE KOCH

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa provocada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), bactéria aeróbica, álcool-ácido resistentes e gram-positiva<sup>6</sup>, descoberta em 1882 pelo alemão Robert Koch [31] e sendo conhecida também como bacilo de Koch ou bacilo da tuberculose. O termo “myco” vem do grego “mykes”, que significa fungo, e se deve ao fato de quando estas bactérias são cultivadas em meio líquido, apresentam aparência fungosa [32]. Existem cerca de outras 30 bactérias do gênero *Mycobacterium*, algumas bastante patogênicas como o bacilo da tuberculose, como é o caso de: *Mycobacterium*

<sup>6</sup>As bactérias gram-positivas, quando submetidas à técnica de Gram, coram-se na cor violeta, já as bactérias gram-negativas coram-se na cor vermelho.

CITOCINA	PRINCIPAIS FONTES	EFEITOS
TNF- $\alpha$	macrófago infectado	aumenta a permeabilidade vascular e estimula produção de quimiocinas no macrófago
IFN- $\gamma$	T <sub>H</sub> 1, T CD8 <sup>+</sup>	ativação do macrófago infectado, aumento da diferenciação T <sub>H</sub> 0 para T <sub>H</sub> 1
IL-4	T <sub>H</sub> 2	aumento da diferenciação T <sub>H</sub> 0 para T <sub>H</sub> 2, aumento da proliferação da células T <sub>H</sub> 2, inibe a ativação do macrófago.
IL-10	T <sub>H</sub> 2, macrófago infectado	supressão celular, diminuição da produção de quimiocinas e citocinas
IL-12	macrófago infectado, células dendríticas	aumento da diferenciação T <sub>H</sub> 0 para T <sub>H</sub> 1

**Tabela 2.2** Ações de algumas citocinas, o balanço entre elas de fundamental importância na resposta imunológica.

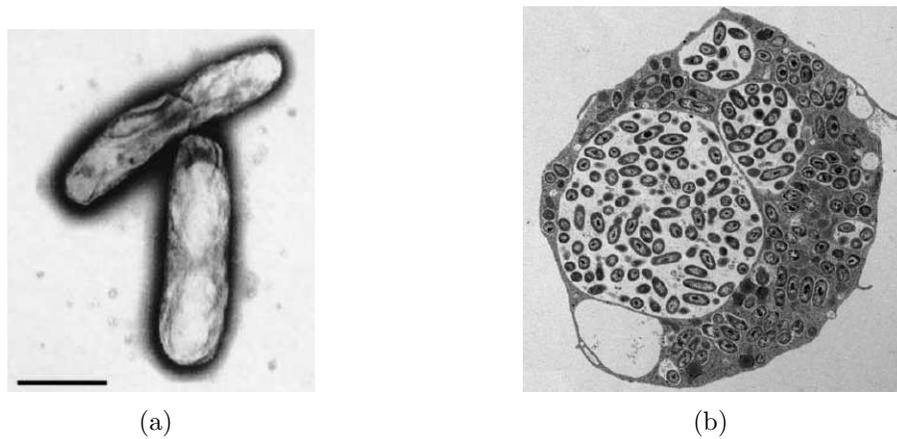
*leprae* [33], *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* e a *Mycobacterium marinum*. A virulência de cada bactéria está associada aos componentes da sua parede celular que são denominados fatores de virulência. No caso do bacilo de Koch, um fator de virulência importante é o glicolípido lipoarabinomanana (LAM) [34,35]. O grau de virulência do bacilo da tuberculose em geral é inversamente proporcional a sua capacidade de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias na célula infectada.

O bacilo de Koch tem cerca de 0,5 $\mu$ m de largura e varia de 1,5 a 3,0 $\mu$ m de comprimento [36] (veja a Fig. 2.10(a)), proliferando-se intracelularmente e replicando-se aproximadamente a cada 12 horas [37]. Este tipo de bactéria utiliza o sistema respiratório como principal meio de entrada e de saída no organismo, sendo transmitida para outros indivíduos principalmente pela tosse ou escarro. O número de bacilos expelidos na tosse pode chegar a 3500, enquanto que o escarro possui 5000 bacilos/ml [38]. Uma vez inalados, os bacilos podem ser retidos na mucosa do trato respiratório e removidos através dos movimentos ciliares discutidos anteriormente. Os bacilos que conseguem alcançar os pulmões são fagocitados pelas células da resposta inata [39], como os macrófagos alveolares [40–42] e as células dendríticas [43]. O macrófago alveolar, como um fagócito profissional, consegue fagocitar e degradar uma grande variedade de patógenos, dentre eles o bacilo de Koch. O grande problema na tuberculose é que em alguns casos, dependendo da virulência da bacilo o macrófago alveolar não consegue eliminá-lo e então

torna-se infectado. O macrófago alveolar é um habitat importante para o bacilo da tuberculose, uma vez que o mecanismo de entrada do bacilo na região intracelular é facilitado pelo processo de fagocitose. Além disso, o macrófago alveolar tem o tempo de vida longo, podendo viver por meses até anos [39], o que é ideal para o bacilo de Koch, que tem uma baixa taxa de replicação. No organismo hospedeiro (animais e homem), a bactéria causadora da tuberculose se aloja principalmente nos pulmões, mas também pode vir a infectar outros órgãos do corpo, como por exemplo, fígado, baço, meninges, linfonodos, etc.

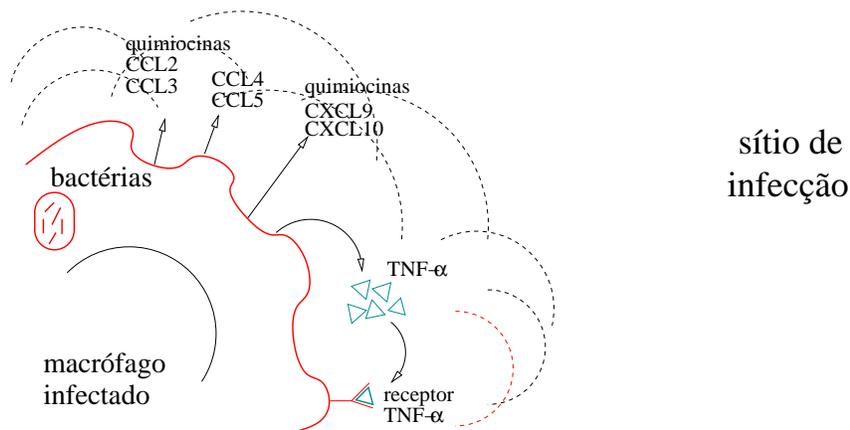
Uma das maneiras pela qual o bacilo de Koch consegue frustrar a própria degradação pelo macrófago alveolar, é inibindo a fusão do fagossomo (compartimento com bacilo) com o lisossomo (enzimas digestivas) [44], o que permite que ele sobreviva e replique. A Fig. 2.10(b) mostra um macrófago alveolar infectado com vários bacilos da tuberculose. Outro mecanismo ainda não totalmente caracterizado é inibindo o macrófago de acidificar o fagossomo fazendo o uso de moléculas tóxicas, como RNI e ROI [44]. O bacilo da tuberculose pode ainda sobreviver evadindo-se do fagossomo para o citosol, ficando assim livre dos mecanismos microbicidas do macrófago alveolar. Recentemente através da análise das proteínas do macrófago presentes no fagossomo, observou-se a ausência da proteína TACO ("tryptophane aspartate-containing coat protein") em fagossomos onde o bacilo interno é degradado e no lisossomo ou fagossomo de células não infectadas [45]. Outras análises mostram, no entanto, que esta proteína está ativamente retida no fagossomo com bacilos vivos, o que inibe a maturação ou a fusão do fagossomo com o lisossomo. Os macrófagos residentes no fígado (células de Kupffer) não expressam a proteína TACO e são capazes da erradicação completa do bacilo de Koch no fagolisossomo [45].

Uma vez infectado, o macrófago alveolar começa a produzir citocinas como o  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-10 e IL-12. Como vimos na subseção 2.1.3, o  $\text{TNF-}\alpha$  além de aumentar a expressão das quimiocinas no próprio macrófago [47, 48], estimula as células endoteliais, aumentando a permeabilidade vascular da circulação periférica. O  $\text{TNF-}\alpha$  produzido pelos macrófagos infectados, pode influenciar também outras células no sítio de infecção a produzirem quimiocinas, como os macrófagos alveolares que não estão interagindo diretamente com o bacilo da tuberculose [11]. As quimiocinas produzidas pelo macrófago infectado, CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5 e as CXCL9 e CXCL10 vão guiar monócitos e linfócitos T e B para o local de infecção [11]. Estas células possuem os receptores específicos para as quimiocinas produzidas, como por exemplo, CCR2 (receptor para CCL2), CCR5 (receptor para CCL3, CCL4 e CCL5) e CXCR3 (receptor para CXCL9 e CXCL10). Na superfície epitelial do



**Figura 2.10** (a) Morfologia do bacilo de Koch (Mtb) por microscopia eletrônica, a barra no canto esquerdo inferior corresponde a  $1\mu m$  [36]. (b) Micrografia eletrônica mostrando um macrófago alveolar infectado de um paciente de tuberculose. Existem vários vacúolos, cada um com muitos bacilos de Koch [46].

alvéolo pulmonar, nem sempre é possível uma proximidade entre os macrófagos alveolares infectados e os linfócitos, o que ressalta ainda mais a importância da interação entre as células através das citocinas e das quimiocinas produzidas [39].



**Figura 2.11** Expressão de algumas quimiocinas e  $TNF-\alpha$  pelo macrófago infectado. As variações nas concentrações de quimiocinas, representadas esquematicamente pelas linhas tracejadas, servirão de atratores para as células do sistema imunológico que possuem os receptores específicos.

A célula dendrítica também tem um papel importante na resposta imunológica contra a tuberculose, pois é ela que dá início a montagem da resposta imunológica adaptativa. Uma vez em contato com bacilo da tuberculose ou com os seus produtos, a célula dendrítica migra do local de infecção para os órgãos linfáticos periféricos, levando

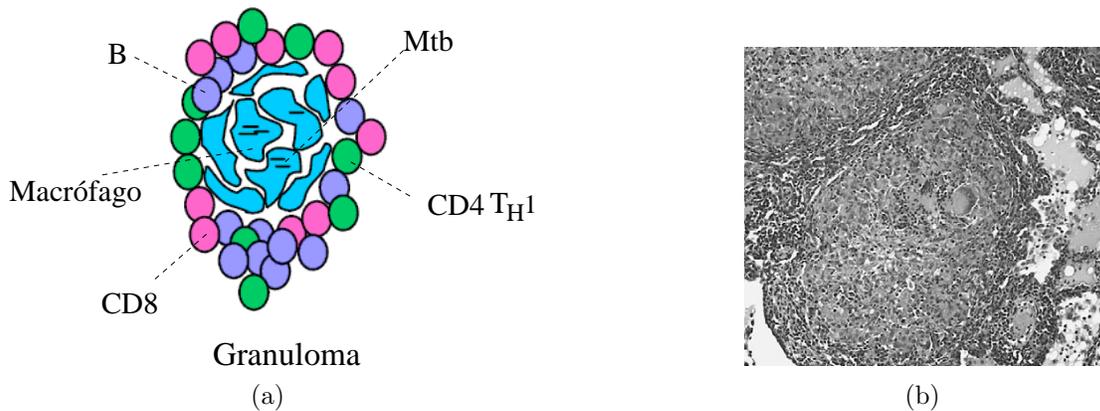
a informação sobre o patógeno e promovendo a ativação dos linfócitos necessários à resposta imunológica. Como o bacilo da tuberculose é um patógeno intracelular residente no fagossomo, a célula dendrítica tem papel fundamental na diferenciação, proliferação e ativação de células  $T_H1$  [49, 50], expressando na sua superfície celular antígenos ligados aos receptores MHC II. Como vimos na subseção 2.1.2, as células  $T_H1$  vão aumentar a atividade microbicida do macrófago infectado. A interação da célula  $T_H1$  com o macrófago infectado acontece por contato e por meio do sinalizador  $IFN-\gamma$  [51, 52]. O macrófago infectado quando ativado pelo  $IFN-\gamma$  consegue, fazer a fusão do fagossomo com o lisossomo, degradando assim os bacilos da tuberculose.

Como vimos anteriormente as células  $T_H2$  são importantes na ação do sistema imunológico contra patógenos extracelulares, uma vez que elas ativam as células B. Alguns estudos mostram que o bacilo de Koch envolvido por anticorpos perde sua capacidade de bloquear enzimas provenientes do lisossomo, o que sugere uma função auxiliar dos anticorpos na proteção contra o bacilo da tuberculose [37]. Como as citocinas produzidas pelas células  $T_H2$  inibem a ativação de células  $T_H1$  e vice-versa, se uma resposta  $T_H2$  é estabelecida ao invés de uma resposta  $T_H1$ , ela não será suficiente para controlar o bacilo de Koch (já que este é patógeno intracelular) o que levará o paciente a sucumbir a doença. Pacientes com infecção simultânea pelo bacilo da tuberculose e por helmintos (vermes), tem muito mais chances de vir a desenvolver a tuberculose. Helmintos, são agentes infecciosos extracelulares, e estimulam uma resposta adaptativa usando células  $T_H2$  o que dificulta o estabelecimento da resposta  $T_H1$  para a tuberculose [53, 54].

As células  $T\ CD8^+$  (citotóxicas) [18, 55] também são importantes na tuberculose, quando há evasão do bacilo de Koch do fagossomo para o citosol do macrófago infectado. Os antígenos do bacilo de Koch provenientes do citosol são fortes ativadores de células  $T$  citotóxicas. Além de matar os macrófagos infectados, as células  $T$  citotóxicas também liberam  $IFN-\gamma$  no sítio de infecção, ajudando assim na ativação do macrófago infectado [37].

Num período que pode variar de 1 a 3 semanas após a infecção causada pelo bacilo de Koch, linfócitos  $T$  e  $B$  começam a migrar para o local de infecção. No sítio de infecção, estas células recrutadas formam uma estrutura em torno dos macrófagos infectados, chamada granuloma [9]. O nome tuberculose vem de tubérculo, nódulos que se assemelham aos granulomas. O granuloma tem a função de conter o avanço do patógeno evitando a disseminação do bacilo da tuberculose pelo pulmão. As principais células que compõem o granuloma são os macrófagos e as células  $T\ CD8^+$ ,  $T\ CD4^+$  e  $B$ . Em várias outras

doenças, como por exemplo na esquistossomose [56], leishmaniose [57] e hanseníase [33], a resposta imunológica contra o patógeno também resulta na formação de granulomas com estrutura e composição variando de acordo com cada hospedeiro. Nos humanos, os macrófagos alveolares estão localizados no centro e os linfócitos na periferia do granuloma, podendo ocorrer infiltrações para o centro do granuloma, veja Fig. 2.12(a). No camundongo ao invés dos macrófagos estarem localizados no centro, eles estão arranjados em folhas ou camadas, adjacentes a agregados de linfócitos.



**Figura 2.12** (a) Estrutura esquemática do granuloma de tuberculose e as principais células da resposta imunológica envolvidas. (b) Granuloma formado em resposta a infecção causada pelo bacilo da tuberculose no macaco [11].

Quando a resposta imunológica é efetiva, o granuloma pode conter ou eliminar o bacilo de Koch do organismo, caso contrário haverá disseminação da mesma. No caso do granuloma conter, caracteriza-se o que chamamos de tuberculose latente [7, 8]. Este estado de latência não é bem entendido e pode ser resultado da falta de oxigênio e nutrientes no meio, levando o bacilo a desativar temporariamente certos metabolismos até que as condições de crescimento sejam novamente ideais. A tuberculose latente pode perdurar durante toda a vida do indivíduo, no entanto, tem se observado a reativação da mesma com o aumento da idade, desnutrição, estresse e principalmente devido a presença de doenças imunossupressoras como a SIDA (Síndrome da imunodeficiência Humana), causada pelo vírus HIV (Vírus da imunodeficiência humana), que representa hoje um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento da tuberculose. Em pacientes soropositivos a reativação da tuberculose é certa e há uma rápida proliferação do bacilo de Koch, com disseminação da infecção e colonização de outros órgãos do hospedeiro [58].

A maioria das infecções provocadas pelo bacilo da tuberculose em humanos são do tipo latente. Somente 5-10% dos infectados, progridem para a tuberculose ativa [1], cujos

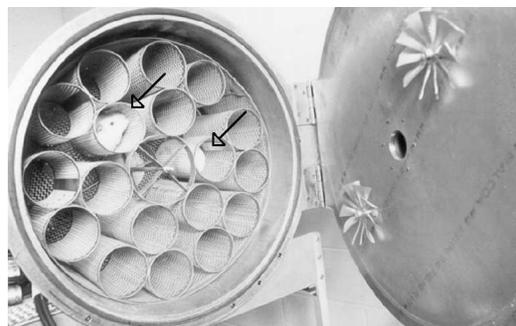
principais sintomas são: tosse com catarro, febre (mais comumente ao entardecer), suores noturnos, falta de apetite, emagrecimento, indisposição e mal-estar. Em estágios mais avançados da tuberculose, pode ocorrer a necrose caseosa nos pulmões, que leva a morte de parte do tecido pulmonar e disseminação dos bacilos para outros órgãos do corpo. A eliminação do tecido necrosado, resulta em cavidades chamadas cavernas. Apesar da replicação do bacilo da tuberculose ocorrer intracelularmente, em alguns casos especiais, existe a replicação extracelular [11, 59], como por exemplo no caso da necrose caseosa líquüefeita no pulmão.

Hoje, o tratamento para a tuberculose é bastante eficaz e envolve três tipos de medicamentos, rifampicina, isoniazida e pirazinamida, também conhecido como RHZ [3]. Estes medicamentos atuam no bacilo de Koch impedindo a síntese de alguns componentes da parede celular (isoniazida), inibindo a transcrição do DNA (rifampicina) e a sua replicação (isoniazida) [60]. O problema é que o tratamento é lento (da ordem de 6 meses) e quando estas drogas são utilizadas de forma irregular não há cura e os bacilos de tuberculose podem tornar-se resistentes. A vacina utilizada para a tuberculose é a BCG (bacilo de Calmette-Guerin) [5, 6], em homenagem aos pesquisadores que a desenvolveram, Albert Calmette e Camille Guerin, e consiste de uma variante menos virulenta da *Mycobacterium bovis*, bacilo causador da tuberculose bovina. A BCG que começou a ser desenvolvida em 1908, hoje é largamente utilizada em todo o planeta, sendo segura, de fácil produção e de baixo custo. No entanto, esta vacina não é 100% efetiva, sendo que pessoas previamente vacinadas podem desenvolver a TB ativa, o que indica neste caso a resistência intrínscica de cada indivíduo é um fator importante. Atualmente existem diversos grupos de pesquisa em busca de uma vacina mais eficaz para a tuberculose. Aqui no Brasil o grupo coordenado pelo pesquisador Celio L. Silva [21] tem encontrado resultados promissores neste sentido. Este grupo de pesquisadores está desenvolvendo uma vacina de DNA que além de prevenir a infecção pelo bacilo de Koch ainda pode ter uma ação terapêutica em infecções já estabelecidas.

## MODELOS ANIMAIS E MATEMÁTICOS

Os humanos são os hospedeiros naturais do bacilo de Koch, mas este também pode vir a infectar e causar doenças em muitos animais. No estudo da tuberculose (TB) alguns modelos animais podem ser úteis na investigação da patogênese da Mtb e também ajudar a entender melhor a resposta imunológica do hospedeiro contra o patógeno. O uso de modelos animais é essencial no desenvolvimento e na descoberta de novas estratégias no tratamento e prevenção da tuberculose e dentre eles podemos citar, os camundongos, porcos da Guiné, macacos e o peixe zebra. Contudo a modelagem da infecção por Mtb nos animais nem sempre é fácil e a interpretação dos resultados tem que ser feito com cuidado. Por mais que os organismos usados nos experimentos sejam parecidos com os humanos, uma nova série de testes tem que ser realizados no homem para se confirmar as hipóteses levantadas através do estudo da TB no modelo animal.

Os camundongos são os animais mais usados como ferramenta experimental no estudo de inúmeras doenças. Eles são fáceis de serem adquiridos e de baixo custo, são manipulados e alojados facilmente no laboratório e tem um período de gestação pequeno (19-21 dias), reproduzindo-se rapidamente. Os camundongos também podem ser modificados geneticamente, o que possibilita a realização de experimentos específicos, utilizando-se animais com as características desejadas. Na tuberculose os camundongos são utilizados como modelos animais para se estudar a resposta imunológica ao



**Figura 3.1** Câmara de exposição ao *M. tuberculosis* utilizada para infecção de pequenos animais através das vias aéreas [61]. As setas indicam dois camundongos sendo preparados.

Mtb ou as suas variantes, para avaliar a eficácia de medicamentos e para testar possíveis vacinas [62]. Os camundongos podem ser infectados com o Mtb de maneiras distintas, pelas vias aéreas de forma aerossol (Mtb em suspensão no ar) como mostra a Fig. 3.1, e por inoculação intratraqueal, intravenosa e intraperitoneal.

Uma das desvantagens em usar camundongos para entender a TB em humanos é a dificuldade em reproduzir a infecção latente. Em humanos, este tipo de infecção é usualmente controlada e reduz-se a níveis bem baixos, com ausência de sintomas da doença. No camundongo, embora a infecção seja controlada, o número de bacilos permanece relativamente alto e a doença progride lentamente. A tuberculose latente em camundongos é simulada com o auxílio de antibióticos, para reduzir os níveis de bacilos a níveis não detectáveis [63]. Como visto na Seção 2.2, o granuloma observado em camundongos não apresenta a forma clássica em que macrófagos são circunscritos pelos linfócitos, nem observa-se a formação de necrose caseosa e cavidades, que são características do granuloma humano.

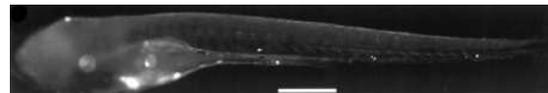
Outro animal bastante utilizado como modelo para a tuberculose é o porco da Guiné (“Guinea pig”), também conhecido como porco da Índia. O porco da Guiné é altamente suscetível à infecção por *Mtb*, sendo que a mudança da infecção por aerossol produzida com uma pequena dose de *Mtb* na grande maioria dos casos é fatal. O granuloma do porco da Guiné possui a forma clássica e se torna necrótico, sendo portanto, muito parecido com o granuloma humano e ideal para o teste de novas vacinas e importante para estudar os casos onde o hospedeiro não consegue controlar a infecção, o que leva a progressão da doença.

Os macacos também são utilizados como modelo para testar vacinas e medicamentos contra a tuberculose. A tuberculose nos macacos é muito parecida com a tuberculose humana, sendo este o único modelo animal que apresenta a tuberculose latente. O granuloma resultante da infecção por *Mtb* nos macacos, também possui regiões necróticas e com cavidades como no granuloma de humanos. Com o aumento do número de mortes causadas pela tuberculose devido à associação com a Síndrome da Imunodeficiência adquirida (SIDA), o macaco torna-se um modelo importante no estudo da interação do *Mtb* com o vírus da imunodeficiência símia (SIV) (sigla em inglês para “**S**imian **I**mmunodeficiency **V**irus”) que é análogo ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) (sigla em inglês para “**H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus”). Contudo, os macacos são difíceis de serem adquiridos e a sua utilização como modelos animais têm um custo bastante elevado, precisam de instalações adequadas e de cuidados especiais que envolvem vários profissionais. Além disso, hoje há restrições éticas para o uso destes modelos.

Um outro modelo importante no estudo da tuberculose utiliza o peixe zebra. O estudo com o peixe zebra é interessante pois do estágio de embrião até os estágios iniciais de larva, ele é opticamente transparente, o que permite estudar *in vivo* a tuberculose pelo

menos no seu período inicial, veja a Fig. 3.2. A infecção do peixe zebra é induzida com a *Mycobacterium marinum* e também resulta na formação de granulomas. Este é um bom modelo para estudar *in vivo* os mecanismos fundamentais da patogênese do Mtb [64]. Dentre os estudos realizados com o peixe zebra, vale a pena mencionar um estudo genético realizado com a *Mycobacterium marinum*, no qual observou-se que alguns genes só são ativados quando a micobactéria está dentro do granuloma [65]. Este resultado mostra que a *Mycobacterium marinum* apresenta certos tipos de comportamentos somente quando dentro do granuloma.

A modelagem animal e a utilização de animais geneticamente modificados, permitiu a realização de experimentos e descobertas importantes a respeito da patogênese e da resposta imunológica ao Mtb. Apesar destes avanços, muitos experimentos ainda são de difícil execução e a modelagem animal enfrenta diversos tipos de problemas, sejam de natureza ética na utilização de animais ou relacionados



**Figura 3.2** Imagem fluorescente do embrião do peixe zebra, 120 horas após infecção inicial por 9 *Mycobacterium marinum*. Os vários pontos fluorescentes no embrião indicam disseminação da infecção. A barra branca na parte inferior da figura corresponde a  $400\mu\text{m}$  [64].

a difícil realização de medidas experimentais [11]. Os sinalizadores produzidos durante a resposta imunológica ao Mtb, como os apresentados na Seção 2.1.3 por exemplo, são de difícil detecção experimental, principalmente nos estágios iniciais da infecção. Outro problema na modelagem animal é que para que se obtenha uma boa estatística nos resultados experimentais, faz-se necessário a aquisição e sacrifício de inúmeros animais.

Hoje, com o acesso a computadores cada vez mais velozes e com a interação entre os vários ramos da ciência, a modelagem matemática e a simulação computacional assumem um papel importante no sentido de complementar a modelagem experimental e contornar problemas como os mencionados acima, utilizando modelos *in silico*. As simulações computacionais são realizadas hoje para estudar fenômenos biológicos que vão desde a escala molecular como é o caso do enovelamento de proteínas [66], até a escala macroscópica como no estudo de propagação de epidemias [67].

A grosso modo podemos dividir os modelos matemáticos que descrevem os sistemas biológicos em dois grupos: (a) modelos que tentam se aproximar ao máximo possível do sistema real, que utilizam um grande número de variáveis e de parâmetros e cuja complexidade os torna de difícil manipulação e (b) modelos simplificados, que utilizam um mínimo de parâmetros e variáveis para descrever as principais características dos siste-

mas reais e procuram reproduzir comportamentos e propriedades globais destes sistemas. Nesta tese, nosso enfoque restringe-se ao estudo de modelos simples (tipo b), com ênfase no uso de modelos discretos do tipo autômatos celulares [68].

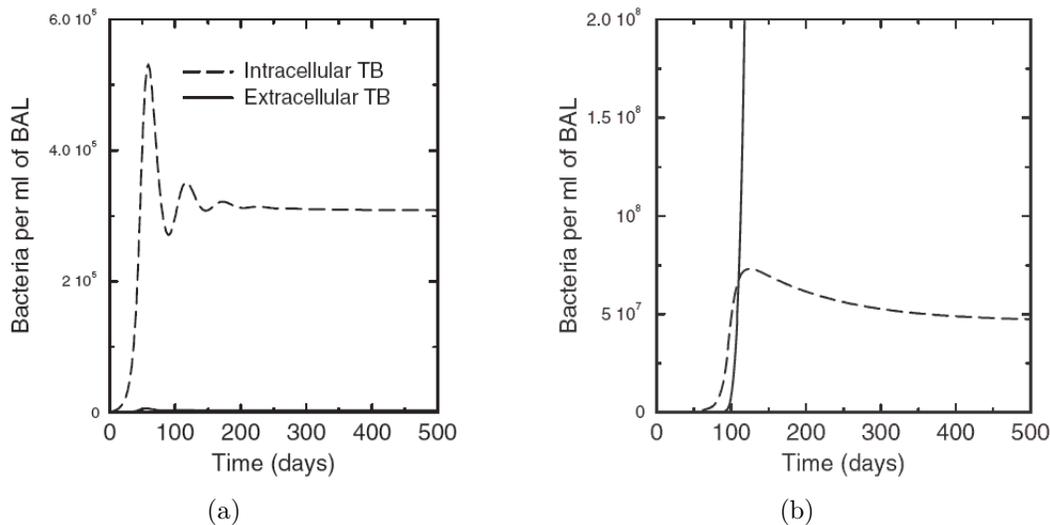
A tuberculose pulmonar vem sendo estudada nos últimos anos a partir de aproximações matemáticas que utilizam equações diferenciais, introduzidas por Kirschner e colaboradores [69–73]. Dentre eles o modelo introduzido por Segovia-Juarez *et al* ([73]) por ser um modelo baseado em agentes é o modelo mais relacionado com o que introduzimos nesta tese para descrever a formação do granuloma na tuberculose. A seguir apresentaremos de maneira sucinta as várias aproximações utilizadas por Kirschner e colaboradores no estudo da tuberculose, dando mais ênfase ao modelo de agentes.

O primeiro modelo proposto por Wigginton e Kirschner [69], busca descrever a evolução temporal da infecção por tuberculose no pulmão. O sistema de equações matemáticas utilizado no modelo é baseado nas interações das principais células e citocinas presentes na infecção por TB. As equações diferenciais ordinárias (EDO) utilizadas descrevem a evolução temporal das bactérias extracelulares ( $B_E$ ), das bactérias intracelulares ( $B_I$ ) que se alojam nos macrófagos, das populações de linfócitos  $T_H0$  ( $T_0$ ),  $T_H1$  ( $T_1$ ) e  $T_H2$  ( $T_2$ ), de macrófagos em repouso ( $M_R$ ), de macrófagos ativados ( $M_A$ ) e de macrófagos infectados ( $M_I$ ). O modelo inclui também a evolução temporal das citocinas IFN- $\gamma$  ( $I_\gamma$ ), IL-4 ( $I_4$ ), IL-10 ( $I_{10}$ ) e IL-12 ( $I_{12}$ ). Ao todo o modelo utiliza 12 equações que envolvem 99 parâmetros. A equação 3.1, exemplifica como o modelo descreve a evolução temporal do número de macrófagos infectados [69], bem como a complexidade das equações utilizadas.

$$\frac{d}{dt}M_I = f(B_E, c_9)k_2M_R + h(B_I, NM_I, 2)k_{17}M_I - f\left(\frac{T_T}{M_I}, c_4\right)(1 - f(B_I, NM_I)p)k_{14}M_I - \mu_I M_I \quad (3.1)$$

onde  $f(x, a) = \frac{x}{x + a}$  e  $h(x, a, m) = \frac{x^m}{x^m + a^m}$  são funções de Hill,  $c_4$  descreve a taxa de morte do macrófago infectado devido a ação citotóxica das células T;  $c_9$  corresponde a metade da concentração de saturação no número total de bactérias na infecção crônica;  $N$  representa a capacidade máxima de bactérias intracelulares por macrófago;  $k_2$ ,  $k_{14}$  e  $k_{17}$  correspondem respectivamente as taxas de infecção crônica, de eliminação do macrófago infectado pela célula T (apoptose) e de morte do macrófago infectado;  $\mu_I$  corresponde a taxa de morte do macrófago infectado;  $T_T$  é o número total de linfócitos T,  $T_T = T_0 + T_1 + T_2$ .

Neste modelo os aspectos espaciais, como a posição e a distância entre as células no granuloma não são levados em conta. Os resultados obtidos fornecem informação global sobre evolução temporal de cada um dos elementos envolvidos. Dependendo dos parâmetros utilizados nas simulações, o modelo pode descrever 3 tipos de comportamentos observados na natureza, relativos a infecção por tuberculose: eliminação, no qual as bactérias intracelulares e extracelulares são eliminadas; contenção, quando o número de bactérias permanece em um valor estacionário; e disseminação da infecção, comportamento este em que o número de bactérias cresce continuamente (Fig. 3.3). O número de bactérias intracelulares encontrados no caso de contenção são maiores do que o número de bactérias extracelulares, o que está de acordo com resultados experimentais obtidos para tuberculose pulmonar em primatas não humanos [74].

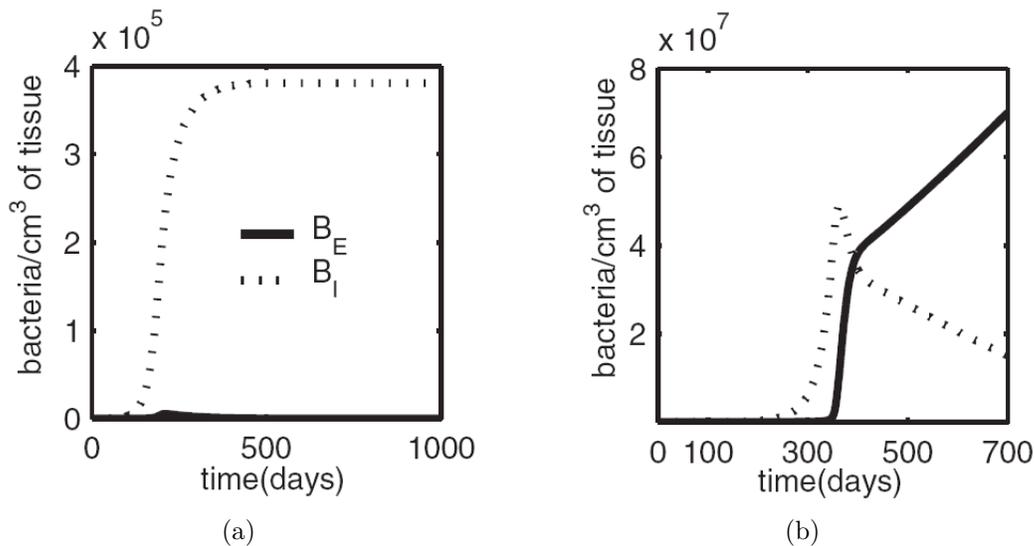


**Figura 3.3** Resultados das simulações do modelo de EDO proposto por Wigginton e Kirschner [69], mostrando o número de bactérias em função do tempo. (a) corresponde a contenção de bactérias e (b) a disseminação da infecção [75].

No caso da contenção, observa-se também que o número de células  $T_{H1}$  é praticamente o mesmo das células  $T_{H2}$ , enquanto que na disseminação, o número de células  $T_{H2}$  é 3 vezes maior do que número de células  $T_{H1}$ . Segundo os autores, estes resultados indicam que o balanço entre as células  $T_{H1}$  e as células  $T_{H2}$  é importante para uma resposta imunológica efetiva à tuberculose [69]. Dentre os parâmetros do modelo, os relacionados com a ativação do macrófago são os mais importantes na determinação dos resultados da infecção.

O modelo proposto por Marino e Kirschner [70] para a tuberculose, na verdade é uma extensão do modelo anterior [69], incluindo a migração celular dos linfonodos para o sitio de infecção, dinâmica esta na qual a célula dendrítica tem um papel importante. Além das 12 equações do modelo anterior, este modelo inclui outras cinco que descrevem a migração para o linfonodo. Estas novas equações descrevem a evolução temporal de variáveis representando a célula dendrítica jovem ( $I_{DC}$ ), a célula dendrítica desenvolvida ( $M_{DC}$ ), a célula T jovens ( $T$ ), a célula  $T_{H0}$  ( $T_0^{LN}$ ) e a citocina IL-12 ( $I_{12}^{LN}$ ). As variáveis que são alocadas no linfonodo levam o índice  $LN$ . As equações do modelo anterior [69] também foram alteradas para receberem as novas variáveis. Os resultados apresentados neste modelo estão de acordo com os resultados obtidos no modelo anterior, sendo possível observar também a importância das taxas de migração celular do sitio de infecção para o linfonodo e vice-versa. De acordo com o modelo o atraso na migração das células dendríticas para os linfonodos ou o atraso na migração das células T para o sitio de infecção, podem alterar os resultados da infecção, por exemplo, passando do estado latente para a doença ativa (disseminação), onde existe o crescimento descontrolado de micobactérias (Fig. 3.4). Os resultados obtidos estão de acordo com a idéia de que uma forte ativação de células dendríticas [76], leva a um máximo de eficiência na apresentação de antígenos e na produção de citocinas, indicando que esta pode ser uma boa estratégia para o desenvolvimento de novos tratamentos para a tuberculose, assim como já está sendo feito para a SIDA [76].

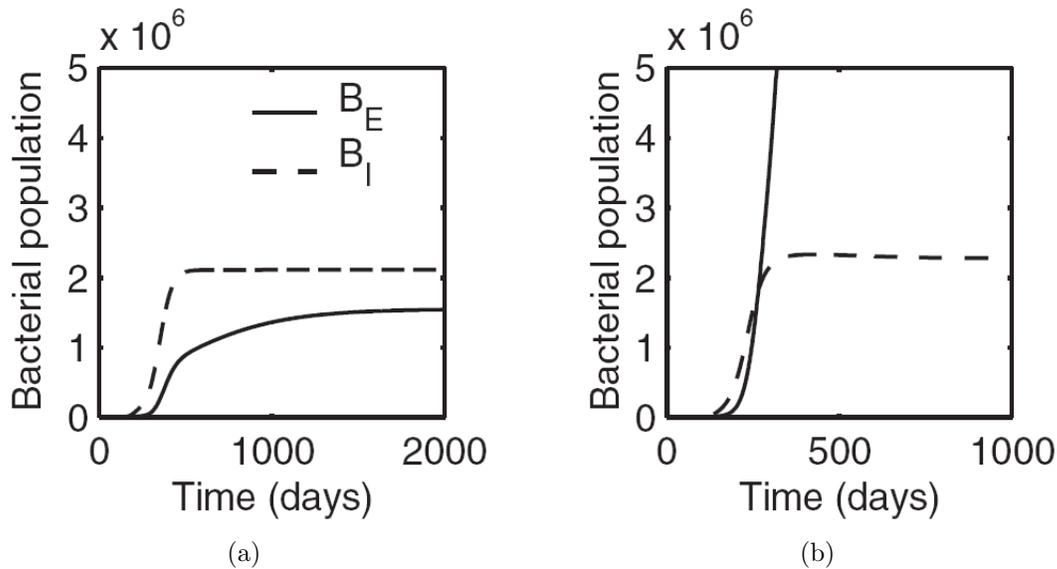
O modelo de Ganguli *et al* [71] adota uma abordagem espaço temporal, utilizando uma representação bidimensional para o pulmão de  $5 \times 5$  sitios, sendo que a cada sitio associa-se um sistema de sete equações diferenciais ordinárias (EDO) envolvendo 35 parâmetros, que descrevem a evolução temporal das subpopulações de bactérias extracelulares ( $B_E(i, j)$ ), bactérias intracelulares ( $B_I(i, j)$ ), macrófagos em repouso ( $M_R(i, j)$ ), macrófagos infectados ( $M_I(i, j)$ ), macrófagos ativados ( $M_A(i, j)$ ) e células T ( $T(i, j)$ ), onde  $(i, j)$  são os índices associados aos diferentes sitios da rede. O modelo inclui também uma equação que descreve as concentrações  $C(i, j)$  de quimiocinas na rede. As ODEs descrevem as interações entre as subpopulações dentro de cada sitio e o movimento de subpopulações entre os sitios adjacentes. A infecção inicial acontece no centro da rede e como os movimentos de bactérias extracelulares e de macrófagos infectados não são permitidos no modelo, a infecção fica restrita ao sitio central neste modelo. Cada sitio tem tamanho suficientemente para alojar um granuloma. Os resultados encontrados com este modelo são qualitativamente os mesmos dos modelos anteriores, com 3 tipos de dinâmicas:



**Figura 3.4** Resultados das simulações do modelo Marino e Kirschner [70] mostrando o crescimento de bactérias em função do tempo (escala logarítmica) [75]. Em (a) houve contenção de bactérias e em (b) a disseminação. Siglas:  $B_E$  para bactérias extracelulares e  $B_I$  para bactérias intracelulares.

eliminação, contenção e disseminação. O modelo mostra que a taxa de migração de macrófagos ativados para fora do sítio central de infecção tem um papel importante no resultado da infecção. Quanto maior o número de macrófagos ativados migrando para fora do sítio central, maiores serão as quantidades de quimiocinas produzidas e a proliferação de células T na periferia da rede. Estes efeitos combinados podem resultar em uma resposta imunológica fraca e em um crescimento de micobactérias descontrolado.

Gammack *et al* [72] utilizaram um modelo de equações diferenciais parciais (EDP) para estudar os estágios iniciais da tuberculose levando em conta apenas a resposta imunológica inata, que acontece antes do desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa. O modelo possui 22 parâmetros e 5 equações representando as bactérias extracelulares  $B(t, x)$ , as quimiocinas produzidas pelas bactérias  $C(t, x)$ , a velocidade das células dentro do granuloma  $v(t, x)$ , o raio do granuloma  $R(t, x)$  e a última  $M_w(t, x)$  representando os macrófagos infectados e não infectados. Se o macrófago está infectado ou não, depende do número  $w$  de bactérias intracelulares. Os resultados obtidos mostram que as quimiocinas produzidas pelas bactérias afetam o tamanho final do granuloma, observando-se dois tipos de comportamentos: (a) quando há o crescimento contínuo do granuloma, e o raio  $R(t)$  do granuloma aumenta; (b) quando há o controle da infecção, e o raio  $R(t)$  do granuloma decai para zero. Como este modelo não leva em conta a



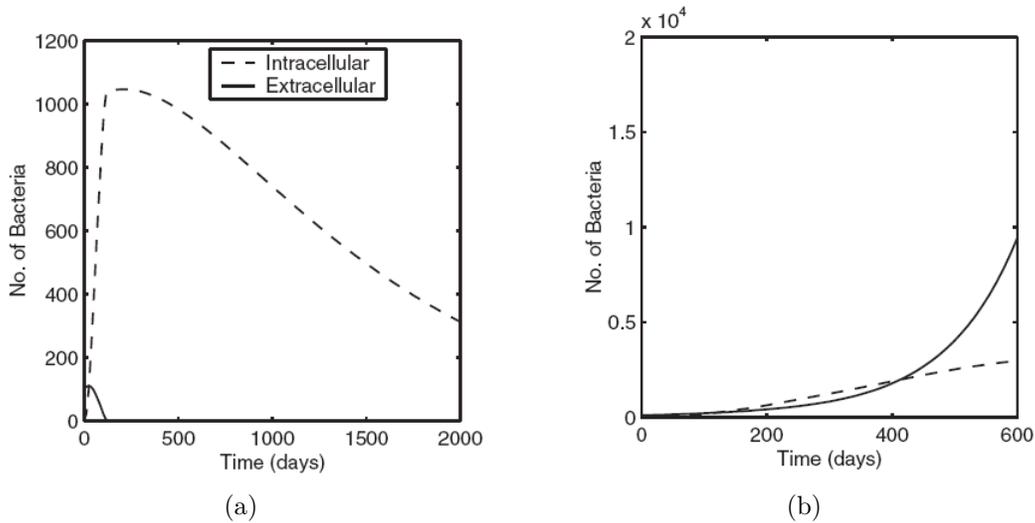
**Figura 3.5** Resultados das simulações do modelo de equações EDO de Ganguli *et al* [71] mostrando o crescimento controlado (a) e o crescimento descontrolado (b) de bactérias [75]. Siglas:  $B_E$  para bactérias extracelulares e  $B_I$  para bactérias intracelulares.

resposta imunológica adaptativa, ele não descreve a contenção, como acontece nos outros modelos discutidos anteriormente para a tuberculose (Fig. 3.6).

Dentre os modelos matemáticos para a tuberculose apresentados aqui, o mais realista é o modelo baseado em agentes de Segovia-Juarez *et al* [73]. Ao contrário dos outros modelos usando equações diferenciais, o modelo baseado em agentes inclui a informação da localização espacial e o estado de cada uma das células, possibilitando desta maneira rastreá-las individualmente no granuloma. As características do modelo são a grosso modo descritas pelo ambiente, que representa uma seção do tecido alveolar; pela a escala de tempo durante as quais as regras são executadas; pelos elementos considerados, ou seja, macrófagos, células T, quimiocinas e bactérias e pelas regras que descrevem as interações biológicas entre estes elementos.

O **ambiente** é descrito por uma rede bidimensional com  $N \times N$  sítios, com condições de contorno periódicas. O tamanho de cada sítio da rede é definido para conter o maior tipo celular do modelo, o macrófago alveolar. Cada sítio aqui pode conter simultaneamente: 1 macrófago, 1 célula T, bactérias e quimiocinas. Nas simulações realizadas eles utilizam redes de  $100 \times 100$  sítio.

O **tempo** no modelo é discreto e é baseado na difusão das quimiocina (processo mais rápido), cada passo de tempo correspondendo a 6s de tempo real [73]. O estado do sistema no tempo  $t + 1$  é atualizado aplicando-se uma série de regras aos estados dos



**Figura 3.6** Resultados das simulações do modelo de equações diferenciais parciais (EDP) de Gammack *et al* [72]. Em (a) as bactérias são eliminadas enquanto que em (b) o crescimento de bactérias é descontrolado [75].

elementos no tempo  $t$ .

O modelo considera a interação entre 4 tipos de elementos envolvidos na formação do granuloma: as quimiocinas e as bactérias extracelulares ( $B_E$ ), representadas por variáveis contínuas, e as células T e macrófagos, representados por variáveis discretas.

As **quimiocinas** tem ação quimiotática para os macrófagos e células T e são descritas pela concentração  $C_{ij}$  em cada sítio  $(i, j)$ . As quimiocinas difundem no espaço e decaem a cada passo de tempo de acordo com as equações [73]:

$$C_{ij}(t + 1) = C_{ij}(t) \times (1 - \lambda) + \lambda \times (C_N + C_S + C_E + C_W)/4$$

$$C_{ij}(t + 1) = C_{ij}(t) - \delta \times C_{ij}(t)$$

onde  $\lambda$  é o coeficiente de difusão e  $\delta$  o de degradação das quimiocinas [73]. Os índices N, S, E, W, são abreviações para, norte, sul, leste e oeste, respectivamente e representam a vizinhança de Neumann do sítio  $(i, j)$ . As fontes de quimiocinas são os macrófagos infectados ( $M_I$ ), os cronicamente infectados ( $M_C$ ) e os ativados ( $M_A$ ) cujas regras de evolução serão descritas mais adiante.

**A infecção inicial** no modelo ( $t = 0$ ) é simulada distribuindo-se 4 bactérias em cada um dos 4 sítios centrais da rede. A difusão de bactérias não é permitida neste modelo.

A cada intervalo de 1 minuto o número de bactérias extracelulares em cada sítio cresce segundo uma taxa  $\alpha_{BE}$  [73], conforme a equação abaixo.

$$B_E(t+1) = B_E(t) + \alpha_{BE} \times B_E(t) \times (1 - B_E(t)/(K_{BE} \times 1, 1))$$

Onde  $K_{BE}$  representa o número máximo de bactérias extracelulares por sítio.

As **células T** tem somente atributos de idade e posição e são recrutadas dos sítios fontes ( $S$ ) (4 sítio simetricamente espaçados como mostra a Fig. 2 do artigo [73]) depois de decorrido um tempo  $T_{delay}$  após a infecção inicial. Uma célula T entra na rede a cada 10 minutos (100 passos de tempo) com probabilidade  $T_{recr}$ , a partir do instante em que a concentração de quimiocinas no sítio fonte ( $C_S$ ) for maior que 1. Cada célula T pode mover para um dos sítios de sua vizinhança de Neumann com probabilidades proporcionais à concentração de quimiocinas nestes sítios. O intervalo de tempo entre um movimento e outro depende da velocidade da célula T ( $T_{sp}$ ). Como o tamanho de cada sítio corresponde a  $20\mu m$ , a cada  $20\mu m/T_{sp}$  a célula T se move ou permanece parada de acordo com as regras de movimento. Se o sítio escolhido para o movimento está vazio, a célula T se move; se o comportamento está ocupado por outra célula T, ela não move e se o sítio está ocupado por um macrófago, a célula T se move com probabilidade  $T_{move}$ . Por exemplo, se um determinado sítio fonte possui uma célula T, está fonte não poderá receber uma nova célula T até que a célula T presente se mova. Uma célula T é removida da rede quando sua idade atinge um tempo de vida  $T_{ls}$ , que é aleatoriamente escolhido entre 0 e 3 dias para cada nova célula T que entra na rede [73].

Os **macrófagos** neste modelo tem os seguintes atributos: posição, idade, número de bactérias intracelulares ( $B_I$ ) e 4 estados: repouso (“resting”) ( $M_R$ ), infectado ( $M_I$ ), cronicamente infectado ( $M_C$ ), ativado ( $M_A$ ). O macrófago é considerado infectado ou cronicamente infectado dependendo do seu número de bactérias intracelulares. Já o macrófago ativado é o macrófago infectado que teve a sua atividade microbicida aumentada para eliminar as bactérias intracelulares e extracelulares da rede. As regras de movimento para os macrófagos são as mesmas consideradas para as células T. Os macrófagos também entram na rede via sítios fonte e são recrutados com probabilidade  $M_{rec}$  a cada 10 minutos, obedecendo as regras de recrutamento descritas acima. O intervalo de tempo entre um movimento e outro depende da velocidade do macrófago, sendo  $M_{rsp}$  a velocidade do macrófago em repouso,  $M_{asp}$  a velocidade do macrófago ativado e  $M_{isp}$  a velocidade do macrófago infectado. O  $M_R$  é removido da rede quando atinge o seu tempo de vida  $M_{rls}$

escolhido aleatoriamente entre 0 e 100 dias [73]. As regras de evolução para os macrófagos são descritas a seguir:

(a) Macrófagos em repouso ( $M_R$ ):  $N_{RK}$  representa o número de bactérias presentes no mesmo sítio que o  $M_R$  a cada passo de tempo. Se  $N_{RK} \leq 2$ , o macrófago fagocita, mata as bactérias e continua em repouso. Se  $N_{RK} > 2$ , o macrófago fagocita com probabilidade  $p_K$ , mata as bactérias e continua em repouso ou fagocita e não mata as bactérias e fica infectado com probabilidade  $1 - p_K$ .

(b) Macrófagos infectados ( $M_I$ ): A cada passo de tempo, um  $M_I$  libera  $CI = 5000$  unidades de quimiocinas em seu sítio. Assim, a cada passo de tempo  $C_{ij}(t + 1) = C_{ij}(t) + CI$ . As bactérias intracelulares crescem a cada minuto a uma taxa  $\alpha_{BI}$ , ou seja,  $B_I(t + 1) = B_I(t) + \alpha_{BI} \times B_I(t)$

Se  $B_I > N_C$  o macrófago infectado se torna cronicamente infectado. A ativação do macrófago infectado é função do número células T na vizinhança de Moore do mesmo e da probabilidade  $T_{actm}$  das células T ativarem o macrófago [73]. Se o macrófago é ativado, ele elimina suas bactérias intracelulares e sai da rede depois de um tempo  $M_{als} = 10$  dias.

(c) Macrófagos cronicamente infectados ( $M_C$ ): Assim como nos macrófagos infectados, macrófagos cronicamente infectados liberam a cada passo tempo a mesma quantidade de quimiocinas em seu sítio. As bactérias intracelulares se replicam a cada minuto logisticamente com respeito a capacidade máxima do macrófago de armazenar bactérias  $K_{BI} = 20$ . Ou seja,  $B_I(t + 1) = B_I(t) + \alpha_{BI} \times B_I(t) \times (1 - B_I(t)/(K_{BI} + 30))$ . Se o número de bactérias intracelulares é maior que  $K_{BI}$  o macrófago rompe e libera as suas bactérias. As bactérias liberadas são distribuídas uniformemente no sítio ocupado pelo macrófago e nos sítios vizinhos (Moore) [73]. A célula T na vizinhança do macrófago cronicamente infectado, funciona como uma célula T citotóxica, podendo matá-lo com probabilidade  $p_{TK}$ . A morte do macrófago cronicamente infectado pela célula T, elimina também 50% das bactérias intracelulares. Neste caso, as bactérias restantes do macrófago cronicamente infectado que sofre apoptose se espalham uniformemente para os sítios vizinhos.

(d) Macrófagos ativados (MA): Como os macrófagos infectados e cronicamente infectados, cada macrófago ativado também secreta quimiocinas em seu sítio. A cada passo de tempo,

um número  $N_{phag}$  de bactérias extracelulares são eliminadas do sítio onde o macrófago ativado reside.

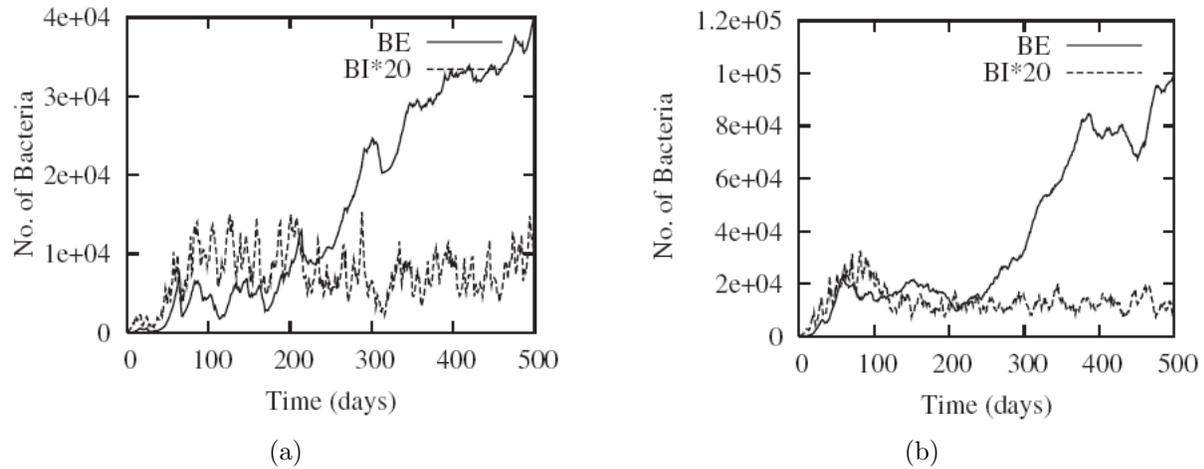
$$B_E(t + 1) = B_E(t) - N_{phag}$$

Este modelo leva em conta também necrose, que ocorre no sítios  $(i, j)$  se o número de macrófagos mortos por células T e/ou por ruptura do mesmo exceder  $N_{necr} = 8$ .

Os resultados do modelo indicam que os elementos chave para a formação do granuloma são a difusão de quimiocinas, o tempo de recrutamento, a mobilidade celular, a posição e o número de células T, a prevenção de aglomeração de macrófagos no granuloma e a taxa de crescimento das bactérias, contudo testes adicionais baseados em aproximações experimentais e teóricas necessitam ser realizados [73]. Com este modelo também é possível analisar as distribuições (posições) de cada uma das células nos diferentes estágios de desenvolvimento do granuloma (Figuras 10 e 11 do artigo [73]). Dependendo dos parâmetros utilizados, assim como nos outros modelos descritos de equações diferenciais [69–72], com exceção do modelo usando EDP [72], o modelo apresenta três tipos de dinâmicas: eliminação, onde o número de bactérias intracelulares e extracelulares vai a zero; contenção, onde o número de bactérias permanece estacionário; e disseminação, onde o número de bactérias cresce continuamente (Fig. 3.7). A maior parte dos resultados obtidos pelo modelo baseado em agentes não podem ser reproduzidos nas outras aproximações matemáticas usando equações diferenciais, pois estes modelos não levam em conta a localização espacial de cada tipo celular envolvido.

A grande desvantagem do modelo baseado em agentes em relação aos outros modelos descritos é que ele não leva em conta citocinas importantes produzidas na resposta imunológica à tuberculose, consideradas nos outros modelos de equações diferenciais, como por exemplo o IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10 e IL-4. Uma revisão mais completa sobre todos estes modelos matemáticos apresentados pode ser encontrada na ref. [75].

Como parte da revisão feita sobre sobre a modelagem matemática para o granuloma de tuberculose, realizamos um estudo detalhado do modelo baseado em agentes [72], cujos resultados não foram reproduzidos a partir da sua descrição do modelo. Utilizando os valores fornecidos dos parâmetros adotados pelos autores e estudando o espaço de parâmetros desse modelo, obtivemos apenas os padrões de distribuições celulares relativas a duas dinâmicas do modelo: eliminação e disseminação. A dinâmica de contenção não foi observada a partir das nossas simulações.



**Figura 3.7** Resultados da evolução temporal do número de bactéria para duas simulações do modelo de agentes de Segovia-Juarez *et al* [73] para contenção (a) e disseminação (b) das bactérias. Siglas:  $B_E$  para bactérias extracelulares e  $B_I$  para bactérias intracelulares. Os valores para bactérias intracelulares são escaladas pelo fator de 20 para que possamos usar a mesma escala para  $B_E$  e  $B_I$  [75].

Neste trabalho apresentamos um modelo mais simples e mais completo para descrever a resposta imunológica à Mtb, que inclui difusão celular, produção de citocinas e quimiocinas, que permite reproduzir resultados observados experimentalmente em camundongos. Este modelo, descrito no próximo capítulo, foi baseado na teoria de Algood *et al* [11], segundo o qual, os macrófagos, as células B e T, as quimiocinas e as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são os elementos chave na formação do granuloma e controle da infecção provocada por Mtb. Neste modelo levamos em conta a produção e ação da citocina TNF- $\alpha$  que não foi levada em conta até agora em nenhum dos modelos matemáticos apresentados na literatura para a tuberculose. Esta citocina, TNF- $\alpha$  é responsável pela regulação das quimiocinas e sua ausência na dinâmica da resposta imunológica à Mtb leva a má formação de granulomas [11].

# MODELO DE AUTÔMATOS CELULARES PARA A FORMAÇÃO DE GRANULOMAS DE TUBERCULOSE

O funcionamento e as atividades básicas de cada uma das principais células do sistema imunológico que atuam na resposta ao bacilo de Koch estão bem documentados na literatura. Apesar dos avanços no entendimento da montagem da resposta específica para o Mtb, ainda falta entender como a interação entre as células do sistema imunológico e destas células com o bacilo da tuberculose, podem levar a sua completa eliminação. Ou seja, quais são os mecanismos subjacentes à dinâmica de interação entre os diversos componentes do sistema imunológico e o bacilo da tuberculose.

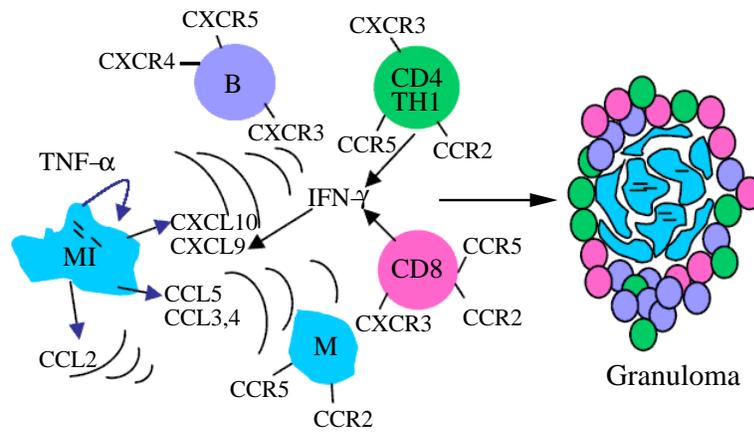
Os autômatos celulares (AC) são sistemas dinâmicos que mostram uma grande versatilidade e potencial de aplicação no estudo de sistemas complexos [68]. Os autômatos celulares são modelos matemáticos nos quais, variáveis, tempo e espaço são discretos, onde  $N$  elementos idênticos são distribuídos sobre os sítios de uma rede ou estrutura espacial  $d$ -dimensional. Cada autômato é descrito por uma variável que pode assumir  $K$  valores, que descrevem os diferentes estados do mesmo. A atualização do estado de um autômato se dá por meio de regras de evolução, definidas em geral em função dos estados de seus vizinhos. Estas regras podem ser locais ou não, mas uma vez definidas não se alteram. A atualização da rede pode ser em paralelo ou seqüencial, e no caso da atualização em paralelo, um passo de tempo corresponde a uma atualização completa da rede. Dependendo da regra de evolução, padrões complexos desenvolvem e propagam-se por todo o sistema no espaço e no tempo [68, 77].

Uma das características principais dos autômatos celulares é a emergência de propriedades globais [78], propriedades estas que surgem em geral a partir das interações locais e que dificilmente seriam vistas a partir da informação das unidades básicas, de onde são definidas as regras do modelo [68]. Assim no estudo da resposta imunológica, enquanto os modelos que utilizam equações diferenciais adotam uma abordagem compartimentalizada ou tipo campo médio, no qual os comportamento de todos os componentes de uma dada população celular são iguais, a abordagem de AC permite tratar cada componente individualmente, ou seja, permite a existência de flutuações em relação ao comportamento

médio da população. As flutuações nas interações locais é que permitirão a formação de propriedades emergentes. Sendo assim enquanto a abordagem com EDO muitas vezes só descreve bem o comportamento estacionário de certos processos dinâmicos, os AC descrevem bem o comportamento desde o início do processo, incluindo a fase transiente [79].

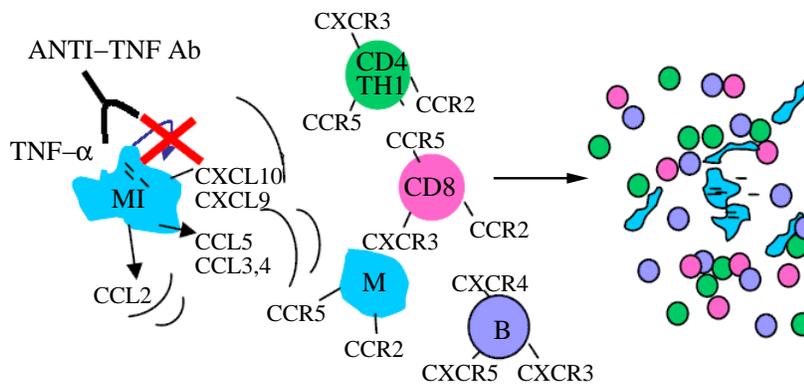
O modelo de autômatos celulares introduzido aqui busca reproduzir o processo de formação de granulomas encontrados em humanos e animais devido a infecção por *Mtb*. O modelo tem as suas regras inspiradas no trabalho de Algood e colaboradores [11], o qual descreve sobre as principais células que compõem o granuloma e sobre o papel das quimiocinas e das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  na formação e manutenção do granuloma de tuberculose. Segundo Algood *et al*, o macrófago alveolar após ser infectado por *Mtb*, começa a produzir TNF- $\alpha$ , o qual estimula a produção de quimiocinas por ele e por outros macrófagos localizados no sítio de infecção. As quimiocinas expressas pelos macrófagos, como por exemplo as CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5 e as CXCL9 e CXCL10 tem a função de auxiliar a migração de outras células do sistema imunológico que entraram no pulmão até o sítio de infecção, células estas que possuem os receptores específicos para as quimiocinas produzidas. Esta reação inflamatória leva à formação do granuloma, constituído principalmente por: macrófagos, linfócitos CD4 e CD8 e linfócito B (Fig. 4.1). Este último, os linfócitos B, são considerados menos importantes na resposta imunológica contra a tuberculose, contudo estão presentes tanto em granulomas de humanos como nos granulomas de camundongos. Os linfócitos T<sub>H</sub>1 produzem a citocina IFN- $\gamma$ , que é uma citocina chave na ativação do macrófago e conseqüentemente no controle da infecção. Já as células CD8 além de ter uma habilidade citotóxica, sendo capazes de eliminar células infectadas, também produzem a citocina IFN- $\gamma$ . O granuloma cria um ambiente de interação entre estas células levando a uma resposta imune mais efetiva onde a produção de citocinas, a ativação do macrófago e as funções efetoras dos linfócitos CD8, podem levar a eliminação do *Mtb*. O controle da infecção, resulta em poucos bacilos da tuberculose e em uma produção menor de TNF- $\alpha$ , a qual reduz a expressão de quimiocinas e conseqüentemente reduz o influxo celular e o tamanho do granuloma.

Segundo os mesmos autores, distúrbios no balanço de TNF- $\alpha$  e quimiocinas podem levar ao controle inadequado da infecção inicial, à reativação de tuberculose latente ou a disseminação extrapulmonar do bacilo de Koch. A neutralização de TNF- $\alpha$  antes da infecção usando, por exemplo, um anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , desregula a produção de quimiocinas e prejudica a migração das células, levando a formação de granulomas desorganizados e a uma infecção descontrolada (Fig. 4.2). Já a neutralização de TNF- $\alpha$  depois que



**Figura 4.1** Esquema do modelo de Algood para a formação de granulomas. A citocina TNF- $\alpha$  e as quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 e CXCL10 são os principais responsáveis pela formação e manutenção do granuloma [11]. CCR2 é o receptor para CCL2; CCR5 é receptor para CCL3, CCL4 e CCL5; e CXCR3 é o receptor para CXCL9 e CXCL10.

o granuloma é formado pode modificar a expressão de quimiocinas dentro do granuloma, fazendo com que as células não mais se mantenham organizadas, levando assim a perda da estrutura do granuloma.

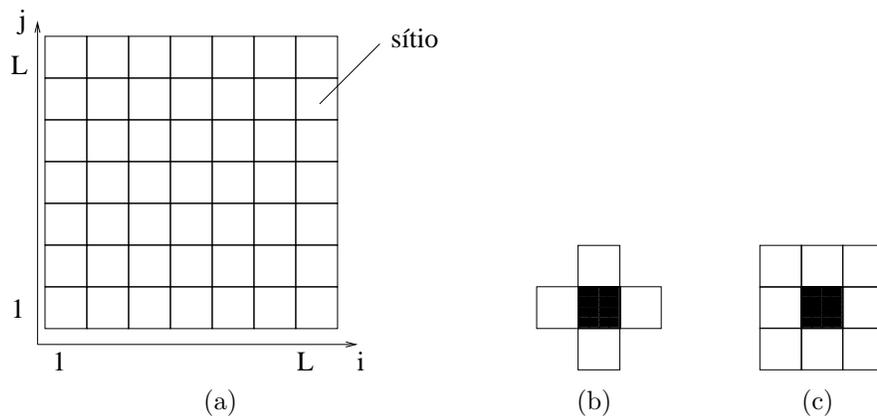


**Figura 4.2** No modelo de Algood, a falta de TNF- $\alpha$  leva a diminuição da produção de quimiocinas e a formação de granulomas desorganizados [11].

## 4.1 DESCRIÇÃO DO MODELO DE AUTÔMATOS CELULARES

A partir da premissa de Algood e colaboradores [11], o modelo de AC introduzido aqui leva em conta a interação entre as bactérias (patógeno) e as principais células que atuam na resposta imunológica à tuberculose: os macrófagos alveolares, que são os fagócitos profissionais residentes no pulmão, e as células  $T_H1$ , que atuam na resposta a agentes infecciosos intracelulares, como é o caso do Mtb. Também consideramos a sinalização entre estas células através das citocinas,  $TNF-\alpha$  e  $IFN-\gamma$ , e das quimiocinas produzidas durante a resposta imunológica à tuberculose. Neste modelo inicial não estamos considerando a presença dos linfócitos B e CD8, que como descrito no trabalho de Algood e colaboradores [11], também fazem parte da estrutura do granuloma.

Pretendemos com este modelo descrever a formação de granulomas em uma seção bidimensional do espaço alveolar, que será descrito por uma rede quadrada com  $N = (L \times L) = (201 \times 201) = 40401$  sítios<sup>1</sup> (Fig. 4.3(a)) e condições de contorno periódicas. Cada sítio da rede pode alojar apenas uma célula do sistema imunológico, ou seja, um macrófago alveolar ou uma célula  $T_H1$ , podendo cada uma delas coexistir com bactérias, quimiocinas e citocinas. Apesar do macrófago alveolar ser maior do que a célula  $T_H1$  ( $\sim 441\mu m^2$  [80] e  $\sim 225\mu m^2$  [14] respectivamente), nesta versão do modelo não diferenciamos o tamanho das células.



**Figura 4.3** (a) Rede quadrada com  $L \times L$  sítios, onde cada sítio pode ser localizado usando os índices  $i = 1, \dots, L$  e  $j = 1, \dots, L$ . As vizinhanças típicas dos autômatos celulares na rede quadrada são do tipo Neumann (b) ou Moore (c), onde o sítio central tem 4 e 8 vizinhos respectivamente.

<sup>1</sup>Não confundir o sítio da rede com o sítio de infecção, que pode abranger vários sítios da rede.

A atualização da rede é feita em paralelo e dependendo da regra de evolução, como a definida para a difusão dos sinalizadores ou como definida para o movimento celular, as vizinhanças dos sítios podem ser do tipo Neumann (Fig. 4.3(b)) ou do tipo Moore (Fig. 4.3(c)). O sítio de entrada para cada novo tipo celular durante o recrutamento do sistema imunológico é escolhido aleatoriamente, respeitando o critério de que duas células não coexistem no mesmo sítio da rede. Desta forma, estamos considerando que a seção alveolar é irrigada por vasos sanguíneos e é através destes vasos que as células migram para o sítio de infecção.

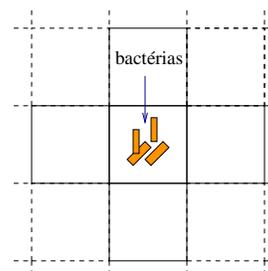
A escala de tempo real associada a cada passo de tempo da simulação, foi escolhida igualando-se o número de passos necessários para que o nível total de quimiocinas na rede atinja o limiar necessário para o recrutamento de novos macrófagos, com o tempo biológico estimado entre a infecção inicial e a entrada dos primeiros macrófagos recrutados [16]. Esta análise, apresentada em detalhes no Apêndice A, nos levou a considerar cada passo de tempo de simulação equivalendo a 18 minutos.

A seguir apresentamos os elementos do modelo, bem como as regras de atualização de cada um deles.

## A - Bactérias (Mtb)

A infecção no modelo é simulada colocando-se inicialmente ( $t = 0$ ) no sítio central da rede um número  $BE_{ini} = 128$  de bactérias extracelulares (BE) [81] (Fig. 4.4). As bactérias extracelulares estarão sujeitas à fagocitose pelo macrófago alveolar, que pode eliminar a bactéria ou infectar-se. A replicação de bactérias no modelo só ocorre dentro dos macrófagos a cada  $T_{rep} = 12$  horas [37]. BI então corresponde ao número de bactérias que foram fagocitadas pelo macrófago alveolar e nele alojadas.

Se o número de bactérias intracelulares do macrófago alveolar exceder um número crítico  $BI_{max} = 16$  bactérias, o macrófago morre, liberando as bactérias intracelulares no sítio onde estava localizado. Consideramos também que um sítio da rede comporta no máximo  $BE_{max} = 128$  bactérias extracelulares: ao ultrapassar este limite, as bactérias em excesso espalham-se para os 4 sítios vizinhos (Fig. 4.3(b)), mas com maior probabilidade para os sítios com quantida-



**Figura 4.4** Inicialmente são colocadas  $BE_{ini}$  bactérias extracelulares no sítio central da rede.

des menores de BE. Assim o sítio de destino é escolhido para cada bactéria espalhada calculando-se a probabilidade:

$$P_{\text{BE}}(i', j') = 1 - \text{BE}(i', j') / \sum_{\text{Neumann } i, j} \text{BE}(i', j) \quad (4.1)$$

onde  $\text{BE}(i', j')$  representa o número de bactérias extracelulares do sítio  $(i', j')$ . Quando não existem bactérias extracelulares na vizinhança, as bactérias em excesso são distribuídas uniformemente nos sítios vizinhos.

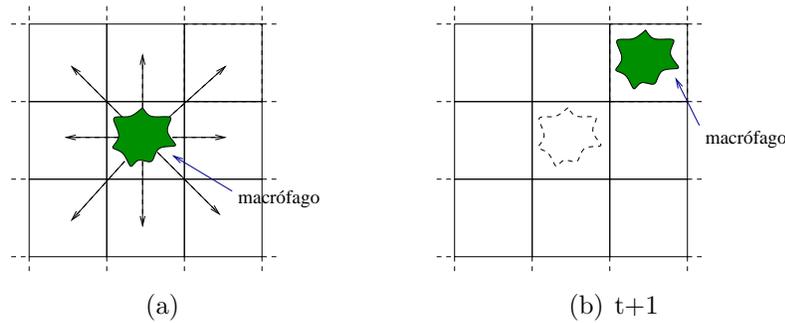
## B - Macrófagos alveolares

No modelo consideramos que o macrófago alveolar pode ser encontrado em três estados: O macrófago alveolar residente ou macrófago alveolar recrutado (M), o macrófago alveolar infectado (MI) e o macrófago alveolar ativado (MA). Como todos os macrófagos considerados no modelo são alveolares, por simplicidade vamos nos referir a ele apenas por macrófago. Na dinâmica do modelo não existe nenhuma diferença entre as atividades do macrófago residente e do macrófago recrutado. A única diferença entre eles está no fato de que o primeiro entra na rede para compor a população de macrófagos residentes (população basal) e o segundo é o macrófago recrutado, que entra na rede devido a infecção. Para cada novo macrófago que entra na rede, residente ou recrutado, escolhemos aleatoriamente um tempo de vida entre 3 e 12 meses, que é a estimativa de vida do macrófago encontrada na literatura [39]. Transcorrido o seu tempo de vida, o macrófago morre e é retirado da rede. Biologicamente, são os monócitos que entram no tecido (rede) e só mais tarde maturam-se em macrófagos (Seção 2.1.1), mas como não estamos considerando monócitos no modelo, diferenciamos os macrófagos da população basal e os recrutados.

Inicialmente ( $t = 0$ ) são distribuídos  $M_{ini} = 150$  macrófagos residentes em posições aleatórias da rede, que estarão movimentando-se aleatoriamente em busca de bactérias. Para a rede quadrada com  $201 \times 201$  sítios, cada macrófago tem em média um raio de ação de  $16 \times 16$  sítios. Os detalhes da dinâmica de recrutamento dos macrófagos residentes, são apresentados no Apêndice B.

### Regras de movimento

A cada passo de tempo, o macrófago movimenta-se (Fig. 4.5) para um sítio pertencente a sua vizinhança de Moore (Fig. 4.3(c)). Uma vez que no modelo as bactérias não produzem nenhum tipo sinalização, inicialmente os macrófagos movimentam-se aleatoriamente até encontrar as bactérias.



**Figura 4.5** A cada passo de tempo o macrófago movimenta-se para um dos sítios da sua vizinhança de Moore com igual probabilidade. No exemplo o macrófago movimenta (a) partindo do sítio  $(i, j)$  no tempo  $t$  para (b) o sítio  $(i + 1, j + 1)$  no tempo  $t + 1$ .

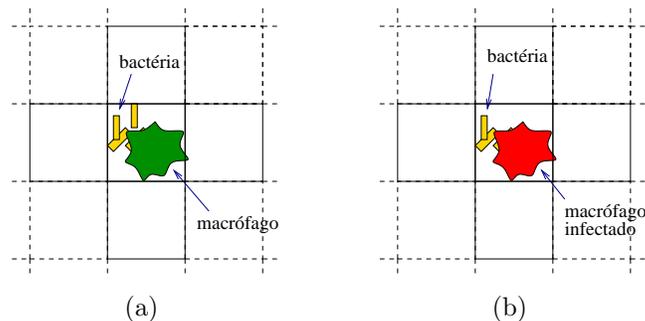
Na presença das quimiocinas, que tem ação quimiotática, cuja produção será descrita posteriormente, o macrófago movimenta-se preferencialmente para o sítio da sua vizinhança onde a concentração das quimiocinas é mais alta, ou seja, em direção a fonte de quimiocinas. Neste caso, o sítio para o qual o macrófago se movimenta é escolhido com probabilidade:

$$P_{i',j'} = Q_{i',j'} / \sum_{\text{Moore } i,j} Q_{i',j'} \quad (4.2)$$

onde  $Q_{i',j'}$  representa a concentração das quimiocinas no sítio  $(i', j')$  da rede. Se houver outra célula no sítio  $(i', j')$  escolhido para o movimento, o macrófago permanece imóvel no sítio  $(i, j)$  até o próximo passo de tempo, quando então novamente escolhe-se um novo sítio  $(i', j')$  para o movimento. Para evitar que haja singularidade na equação 4.2 ( $Q_{i',j'}$  igual a zero) consideramos que inicialmente todos os sítios da rede possuem uma concentração mínima de quimiocinas onde  $Q_{i,j}(t = 0) \ll 1$ .

### Interação macrófago-bactéria

O macrófago fica imóvel ao interagir com uma bactéria localizada no mesmo sítio da rede ocupado por ele e a cada passo de tempo fagocita uma bactéria eliminando-a com probabilidade  $p_{morte} = 0,9$ . Se não conseguir eliminar a bactéria fagocitada, o macrófago passa para o estado de macrófago infectado (Fig. 4.6). Biologicamente as chances de degradação ou não da bactéria fagocitada dependem muito do fator de virulência da bactéria e da atividade microbicida do macrófago. No modelo por simplicidade estamos considerando todas as bactérias com a mesma virulência.



**Figura 4.6** Macrófago e Mtb no mesmo sítio da rede (a), se não conseguir eliminar a bactéria fagocitada o macrófago fica infectado (b).

O macrófago infectado deixa de realizar fagocitose, permanece imóvel e em função da presença da bactéria internalizada, começa a produzir os sinalizadores quimiocinas e  $TNF-\alpha$ .

### Produção de *sinalizadores* pelo macrófago

O macrófago infectado produz a cada passo de tempo uma unidade de  $TNF-\alpha$  e uma unidade de quimiocina no sítio em que está localizado. Por simplicidade todas as quimiocinas produzidas biologicamente durante a resposta imunológica à tuberculose [11] foram reduzidas a um único tipo no modelo inicial. Uma concentração muito alta de quimiocinas, biologicamente, pode saturar os receptores das células, desensibilizando-as ao sinal de migração [11]. Aqui, não estamos considerando a saturação dos receptores, ou seja, as células do modelo sempre conseguem distinguir a concentração de quimiocinas na sua vizinhança.

Os outros macrófagos na rede que não estão infectados, mas que estão sujeitos a

uma concentração de TNF- $\alpha$  superior a um limiar  $\theta_{\text{TNF-}\alpha} = 0,5$ , também irão produzir uma quantidade de quimiocinas corresponde a uma fração  $f_{\text{TNF-}\alpha} = 1/8$  da quantidade produzida pelo macrófago infectado. As quimiocinas produzidas por estes macrófagos também ajudam na migração celular e na formação do granuloma [11]. Consideremos que os macrófagos não infectados produzem uma quantidade menor de quimiocinas, por estes não possuírem o estímulo interno da bactéria, que seria um estímulo maximizado.

A difusão e degradação das citocinas e quimiocinas na rede é descrita respectivamente pelas equações:

$$C_{i,j}(t+1) = C_{i,j}(t)(1-d) + \frac{d}{4} \left( \sum_{\text{Neumann}} C_{i',j'}(t) \right) \quad (4.3)$$

$$C_{i,j}(t+1) = C_{i,j}(t) - \text{deg} \times C_{i,j}(t) \quad (4.4)$$

onde  $C_{i,j}$  é a concentração da citocina/quimiocina no sítio  $i, j$ ,  $d$  representa o coeficiente de difusão e  $\text{deg}$  a degradação do sinalizador com o tempo. O somatório é feito sobre a vizinhança de Neumann do sítio  $i, j$ . Para maiores detalhes sobre a modelagem da difusão e para valores de parâmetros escolhidos veja o Apêndice C.

### Recrutamento celular de novos macrófagos residentes

Como visto na Seção 2.1.3, a citocina TNF- $\alpha$  e as quimiocinas são os principais responsáveis pelo influxo das células do sistema imunológico para o sítio de infecção. Assim estamos considerando que os macrófagos recrutados entram na rede depois que o nível de quimiocinas total ( $Q_T$ ) atinge o limiar de recrutamento  $\theta_{rec} = 18,2$  (ver detalhes no Apêndice A).  $Q_T$  é medido somando-se as concentrações das quimiocinas de todos os sítios da rede. A taxa de entrada dos macrófagos recrutados é de uma célula a cada passo de tempo, mas se o sítio escolhido para a entrada na rede estiver ocupado por outra célula, um outro sítio de entrada será escolhido no próximo passo de tempo. O intervalo de tempo desde o início da infecção até que as quimiocinas atinjam o limiar de recrutamento, funciona como um tempo de retardo para a resposta inata. Se depois de um certo tempo as bactérias são eliminadas pelos macrófagos, devido a degradação das quimiocinas,  $Q_T$  se torna menor que  $\theta_{rec}$  e as células deixam de ser recrutadas, estabelecendo-se novamente a população basal na rede.

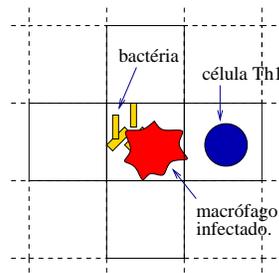
### C - Células $T_H1$

As células  $T_H1$  entram na rede 10 dias [82] após a infecção do primeiro macrófago, desde que  $Q_T$  seja maior do que  $\theta_{rec}$ . Biologicamente, o atraso na entrada das células  $T_H1$ , reflete o tempo necessário para montagem da resposta imune adaptativa, como visto na Seção 2.1.2. As células  $T_H1$  entram na rede a uma taxa de uma célula a cada passo de tempo, e a despeito do que acontece com o macrófago recrutado, se o sítio escolhido para a entrada da célula T na rede estiver ocupado por outra célula, um outro sítio de entrada será escolhido no próximo passo de tempo. O tempo de vida das células  $T_H1$  é escolhido aleatoriamente entre 0 e 8 semanas, conforme observações experimentais [83]. Transcorrido o seu tempo de vida, a célula  $T_H1$  morre e é retirada da rede.

A cada passo de tempo, a célula  $T_H1$  produz uma unidade de IFN- $\gamma$  no sítio da rede em que está localizada, sendo que a difusão e a degradação desta citocina também seguem as equações 4.3 e 4.4 respectivamente (Apêndice C). O movimento da célula  $T_H1$  é análogo ao movimento do macrófago. No modelo inicial não diferenciamos o tamanho das células  $T_H1$  e dos macrófagos. Para maiores detalhes sobre a influência do tamanho das células na sua distribuição espacial na rede, veja o Apêndice D.

### Interação macrófago-célula $T_H1$

Se existir uma célula  $T_H1$  na vizinhança de Neumann do macrófago infectado (Fig. 4.7) e se o nível de IFN- $\gamma$  no sítio do macrófago ultrapassar um limiar de ativação  $\theta_{IFN-\gamma} = 1,63$ , o macrófago infectado é ativado. O macrófago infectado ativado vai ter a sua atividade microbicida aumentada e passa a eliminar novamente uma bactéria a cada passo de tempo. O estado de macrófago infectado ativado só é mantido enquanto forem satisfeitas as condições anteriores, ou seja, se existir a interação macrófago-célula  $T_H1$  e se  $IFN-\gamma > \theta_{IFN-\gamma}$ . O uso da vizinhança de Moore ao invés da vizinhança de Neumann, dá uma probabilidade de ativação maior para o macrófago infectado, uma vez que existem o dobro de posições onde podem ocorrer a interação do macrófago-célula  $T_H1$ . Na discussão dos resultados apresentamos um estudo detalhado dos efeitos da variação do limiar de ativação  $\theta_{IFN-\gamma}$ .



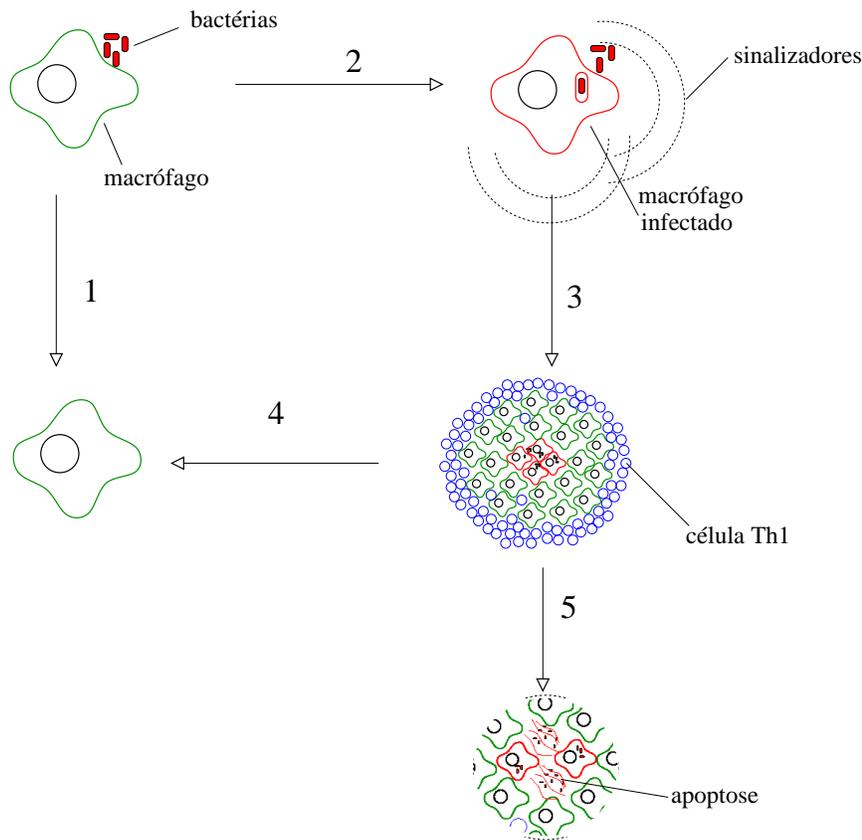
**Figura 4.7** Para a ativação do macrófago infectado é necessário a presença de uma célula  $T_H1$  na sua vizinhança mais uma certa quantidade de  $IFN-\gamma > \theta_{IFN-\gamma}$ .

Na descrição do modelo, os valores adotados para os parâmetros são os utilizados nas simulações iniciais, alguns deles foram estimados da literatura e outros foram inferidos veja a Tabela 4.1. Nas simulações analisamos a influência de diferentes valores para os principais parâmetros do modelo, cujos resultados serão mostrados no próximo Capítulo.

Parâmetro	valor
Número $N$ de sítios na rede	40401 ( $201 \times 201$ )
Constante $d$ da difusão para todos os sinalizadores	0,4
Constante $deg$ da degradação para as quimiocinas	0,05
Constante $deg$ da degradação para $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$	0,001
Quantidade produzida de sinalizadores a cada passo de tempo	1 unidade
Limiar de recrutamento celular $\theta_{rec}$	18,2 unidades de quimiocina
Limiar de produção de quimiocinas $\theta_{TNF-\alpha}$	0,5 unidades de $TNF-\alpha$
Fração $f_{TNF-\alpha}$ de quimiocinas produzidas devido a $TNF-\alpha$	1/8
Número de macrófagos iniciais $M_{ini}$	150
Tempo de vida do macrófago alveolar	3 a 12 meses*
Tempo de vida da célula $T_H1$	0 a 2 meses*
Probabilidade do macrófago eliminar a bactéria	0,9
Tempo de replicação da bactéria intracelular $T_{rep}$	12 horas*
Num. de bactérias extracelulares iniciais $BE_{ini}$	128*
Num. máx. de bactérias intracelulares $BI_{max}$	16
Num. máx. de bactérias extracelulares no sítio $BE_{max}$	128
Tempo de entrada $T_{recr}$ para as células $T_H1$ após a infecção inicial	10 dias*
Taxa de entrada das células recrutadas	1 a cada passo de tempo
Limiar de ativação do macrófago infectado $\theta_{IFN-\gamma}$	1,63

**Tabela 4.1** Valores adotados para os parâmetros do modelo de autômatos celulares para a formação de granulomas de tuberculose. \*valores que foram estimados da literatura.

Na Figura abaixo estão resumidas as principais regras do modelo de AC.



**Figura 4.8** Esquema mostrando as principais regras do modelo de AC. 1) Macrófago fagocita e consegue eliminar as bactérias. 2) Macrófago fagocita e não consegue eliminar as bactérias e então fica infectado. 3) Macrófago infectado produz  $\text{TNF-}\alpha$  e quimiocinas, há o recrutamento de macrófagos e células  $\text{T}_{\text{H}1}$  seguido de formação de granuloma. 4) Macrófago infectado é ativado por célula  $\text{T}_{\text{H}1}$  e  $\text{IFN-}\gamma$  e consegue eliminar as bactérias intracelulares. 5) Macrófago não consegue eliminar as bactérias intracelulares e sofre apoptose devido a excesso de bactérias. As bactérias liberadas após a apoptose estarão novamente sujeitas à fagocitose.

## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na implementação computacional do modelo de AC para a formação de granulomas de tuberculose (Seção 4.1), usamos a linguagem de programação FORTRAN 90, distribuída gratuitamente pela INTEL (<http://www.intel.com>) na sua versão não comercial para LINUX. Na apresentação dos resultados gráficos das simulações do modelo de AC, utilizamos a biblioteca G2 (<http://g2.sourceforge.net>), gnuplot (<http://www.gnuplot.info/>) e o xmgrace (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace>), todos de distribuição gratuita. A maioria das simulações do modelo foi realizada em máquinas Athlon XP 2600, sendo que para cada dia simulado no modelo, ou seja 800 atualizações da rede, são necessários 4 segundos de CPU. A memória RAM consumida por cada simulação do modelo é em torno de  $\sim 25$  megabytes.

Inicialmente analisamos o espaço de parâmetros e encontramos 3 tipos de comportamentos dinâmicos. Como dito anteriormente, alguns parâmetros foram estimados da literatura, outros como os parâmetros de difusão e degradação foram escolhidos através de análise prévia. Sendo assim a análise do espaço de parâmetros se restringe aos parâmetros inferidos como, o número de macrófagos iniciais na rede  $\mathbf{M}_{ini}$ , os limiares de recrutamento celular  $\theta_{rec}$ , de ativação do macrófago infectado  $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$  e de produção de quimiocinas  $\theta_{\text{TNF-}\alpha}$ , a probabilidade do macrófago eliminar a bactéria  $p_{morte}$ , o número inicial de bactérias extracelulares  $\mathbf{BE}_{ini}$ , os tempos de replicação da bactéria intracelular  $T_{rep}$  e o de recrutamento das células  $T_{H1}$  ( $T_{recr}$ ), apesar dos dois últimos serem estimados da literatura [37]. Em todas as simulações do modelo de AC apresentadas neste capítulo, a menos que seja informado o contrário no texto, utilizamos os valores dos parâmetros apresentados na Tabela 4.1.

Um dos parâmetros de maior importância na determinação dos comportamentos dinâmicos do modelo é o limiar de ativação  $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$ , que determina a quantidade mínima de IFN- $\gamma$  necessária no sítio do macrófago infectado para a sua ativação. Sendo assim, analisaremos primeiramente este parâmetro. Dependendo do valor do limiar de IFN- $\gamma$  utilizado nas simulações, encontramos três tipos de comportamentos: as bactérias são eliminadas rapidamente, comportamento que denominaremos de **eliminação**; as bactérias são contidas no granuloma formado, comportamento que chamaremos de **contenção** e situações onde as bactérias se espalham completamente por toda a rede, dinâmica esta que chamaremos de **disseminação**. Estes são os 3 tipos de comportamentos dinâmicos observados também nos outros modelos descritos no Capítulo 3.

Para cada valor do limiar de IFN- $\gamma$  ( $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$ ) estudado, foram feitas 50 simulações utilizando diferentes configurações iniciais de macrófagos residentes e portanto consideradas como 50 amostras diferentes. Variamos  $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$  de 1,63 a 300 unidades de IFN- $\gamma$  conforme estudo realizado no Apêndice E.

Na Tabela 4.2 para cada valor de  $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$ , indicamos a porcentagem de simulações onde houve eliminação, contenção ou disseminação das bactérias e o tempo  $t$  médio medido em dias (equivalendo a 80 atualizações da rede), necessário para a eliminação das bactérias quando isto ocorre. Para se ter uma idéia do tempo computacional necessário para realizar estas simulações, para obtermos os resultados de 50 amostras utilizando  $\theta_{\text{IFN-}\gamma} = 1,63$ , foram necessários aproximadamente 10 dias de CPU.

$\theta_{\text{IFN-}\gamma}$	eliminação	contenção	disseminação
1.63	12%, $t = 69,49 \pm 6,2$	88%, $t = 4229,01 \pm 1125,7$	- - -
25	10%, $t = 69,66 \pm 6,9$	90%, $t = 5061,74 \pm 866,5$	- - -
50	8%, $t = 72,93 \pm 5,5$	92%, $t = 3034,96 \pm 2720,1$	- - -
100	6%, $t = 66,26 \pm 1,9$	- - -	94%
150	16%, $t = 70,54 \pm 8,9$	- - -	84%
300	- - -	- - -	100%

**Tabela 4.2** Dependendo o valor de  $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$  utilizado na simulação, as bactérias podem ser eliminadas, contidas ou podem se espalhar por toda a rede.  $t$  indica o tempo médio em dias, durante o qual as bactérias persistem na rede antes de serem eliminadas. Os resultados de cada limiar  $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$  são relativos a 50 amostras. Os valores adotados para os parâmetros do modelo são indicados na Tabela 4.1

A ativação do macrófago infectado é extremamente importante para a eliminação das bactérias e está intimamente ligada à presença das células  $T_H1$  e da citocina IFN- $\gamma$ . Quanto menor for o valor do limiar de ativação  $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$  adotado na simulação, mais fácil será a ativação do macrófago infectado, pois a quantidade de IFN- $\gamma$  no sítio necessária para a sua ativação será menor. Conseqüentemente também será mais fácil a eliminação e/ou contenção das bactérias. Por outro lado, quanto mais alto for o valor de  $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$ , mais difícil será a ativação do macrófago infectado, facilitando assim a replicação das bactérias intracelulares, podendo ocorrer então a disseminação das bactérias pela rede. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.2, a dinâmica de disseminação, situação onde o crescimento das bactérias não é controlado, é observada para  $\theta_{\text{IFN-}\gamma} > 50$  unidades de IFN- $\gamma$ .

No caso da dinâmica de contenção, as bactérias na verdade serão completamente

eliminadas depois de permanecerem por vários anos na rede (Tabela 4.2). Chamamos este tipo de dinâmica de “contenção”, porque o tempo necessário para a eliminação das bactérias é maior que o tempo de vida média de um camundongo, que varia entre 2 e 3 anos.

A seguir, descreveremos mais detalhadamente cada os 3 tipos de comportamentos dinâmicos exibidos no modelo, dando ênfase à análise das distribuições celulares e ao comportamento das citocinas e quimiocinas produzidas durante a evolução da infecção para as dinâmicas de eliminação, contenção e disseminação.

## Eliminação

Nesta dinâmica, todas as bactérias são eliminadas da rede alguns meses após a infecção inicial, conforme indicado na Tabela 4.2. A resposta imunológica descrita pelo modelo neste caso, leva a formação de um granuloma que se desfaz depois que as bactérias são eliminadas da rede. A Fig. 4.9 mostra diferentes passos de tempo para os padrões de distribuição celular para  $\theta_{\text{IFN-}\gamma} = 1,63$ . Nesta figura e em todas as outras onde mostraremos padrões de distribuição celular obtidos durante o processo de formação do granuloma, cada sítio da rede é representado por um pixel da imagem. As bactérias extracelulares só serão mostradas nestas figuras se estiverem ocupando o sítio sozinhas, ou seja, só aparecerão se não houver outra célula no sítio. Caso isto ocorra, mostraremos a célula que ocupa o sítio.

A Fig 4.9(a) corresponde a configuração inicial da simulação, na qual 150 macrófagos são distribuídos em posições aleatórias da rede. A infecção inicial é simulada colocando-se 128 bactérias extracelulares no sítio central, que estarão sujeitas à fagocitose pela população inicial de macrófagos. Uma vez que no modelo as bactérias não produzem nenhum tipo sinalização, como as quimiocinas por exemplo, a população de macrófagos inicialmente se movimenta aleatoriamente na rede até encontrar com alguma bactéria, o que faz com que a primeira fagocitose leve em média 1 semana para acontecer. De acordo com a regra de interação do macrófago com a bactéria (Seção 4.1), em 10% dos casos a fagocitose da bactéria pode levar à infecção do macrófago, dando início a produção de sinalizadores que recrutarão outros macrófagos e células  $T_H1$  para a rede. Nas Figuras 4.10, 4.11 e 4.12 apresentamos os padrões de distribuição espacial das concentrações dos sinalizadores  $\text{TNF-}\alpha$ , quimiocinas e  $\text{IFN-}\gamma$  respectivamente para os mesmos passos de tempo da Fig. 4.9. Como podemos observar, a ordem de grandeza destas concentrações e

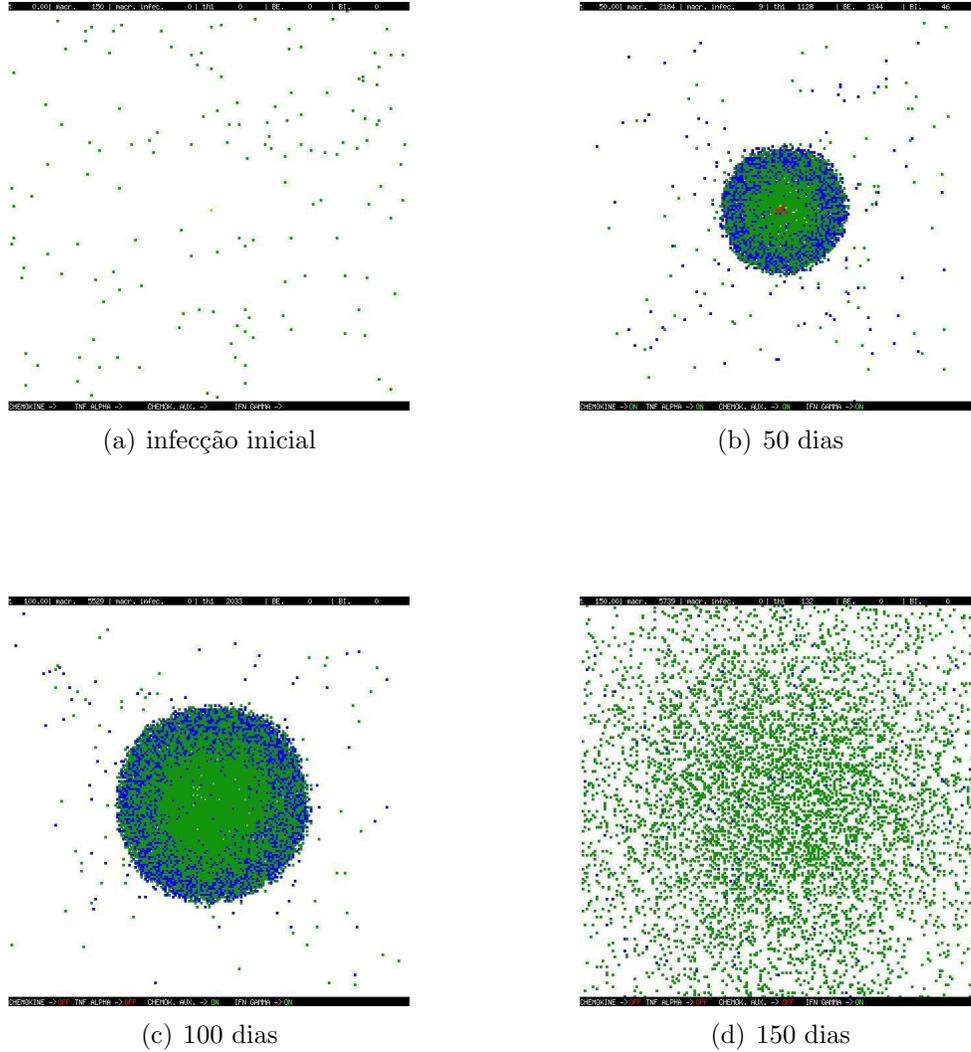
suas respectivas escalas de cores são diferentes para cada um dos sinalizadores, variando de 0 a 40 unidades para as concentrações de TNF- $\alpha$ , de 0 a 8 unidades para as concentrações de quimiocinas e de 0 a 300 unidades para as concentrações de IFN- $\gamma$ . Como mostram as Figuras 4.10(a), 4.11(a) e 4.12(a), nenhum destes sinalizadores estão sendo expressos no início da simulação.

A Fig. 4.9(b) mostra o estágio da evolução do granuloma correspondente a  $t = 50$  dias. Podemos observar a presença de macrófagos infectados no centro do granuloma rodeados por macrófagos alveolares, bem como uma camada mais externa de células T<sub>H</sub>1. A Fig. 4.10(b) mostra os níveis de concentração de TNF- $\alpha$  nestes estágio, indicando a alta concentração de TNF- $\alpha$  apenas no centro do granuloma, que é ocupado por macrófagos infectados. Já o perfil de expressão de quimiocinas apresentado, Fig. 4.11(b), indica alta concentração no centro do granuloma, e valores intermediários de concentração em todo o granuloma, o que explica a agregação de células observada na Fig. 4.9(b). Esta concentração intermediária de quimiocinas corresponde em sua maior parte à produção dos macrófagos não infectados que estão sobre a ação de TNF- $\alpha$ . O perfil da concentração do IFN- $\gamma$  visto na Fig. 4.12(b) para  $t = 50$  dias, tem sua maior concentração, exatamente sob a camada de células T<sub>H</sub>1 que se localizam na periferia do agregado celular. A agregação de células T<sub>H</sub>1 e a maior concentração de IFN- $\gamma$  observados na periferia do granuloma tornam a ativação do macrófago infectado mais fácil e conseqüentemente tornariam difícil a sobrevivência das bactérias. Este pode ser um dos mecanismos pelo qual o granuloma consegue conter as bactérias e eventualmente eliminá-las. A eliminação das bactérias acontece em  $t = 91$  dias. A estrutura do agregado celular observada em todas as simulações é a mesma observada em granulomas humanos, com macrófagos no centro e linfócitos (células T<sub>H</sub>1) localizados na periferia.

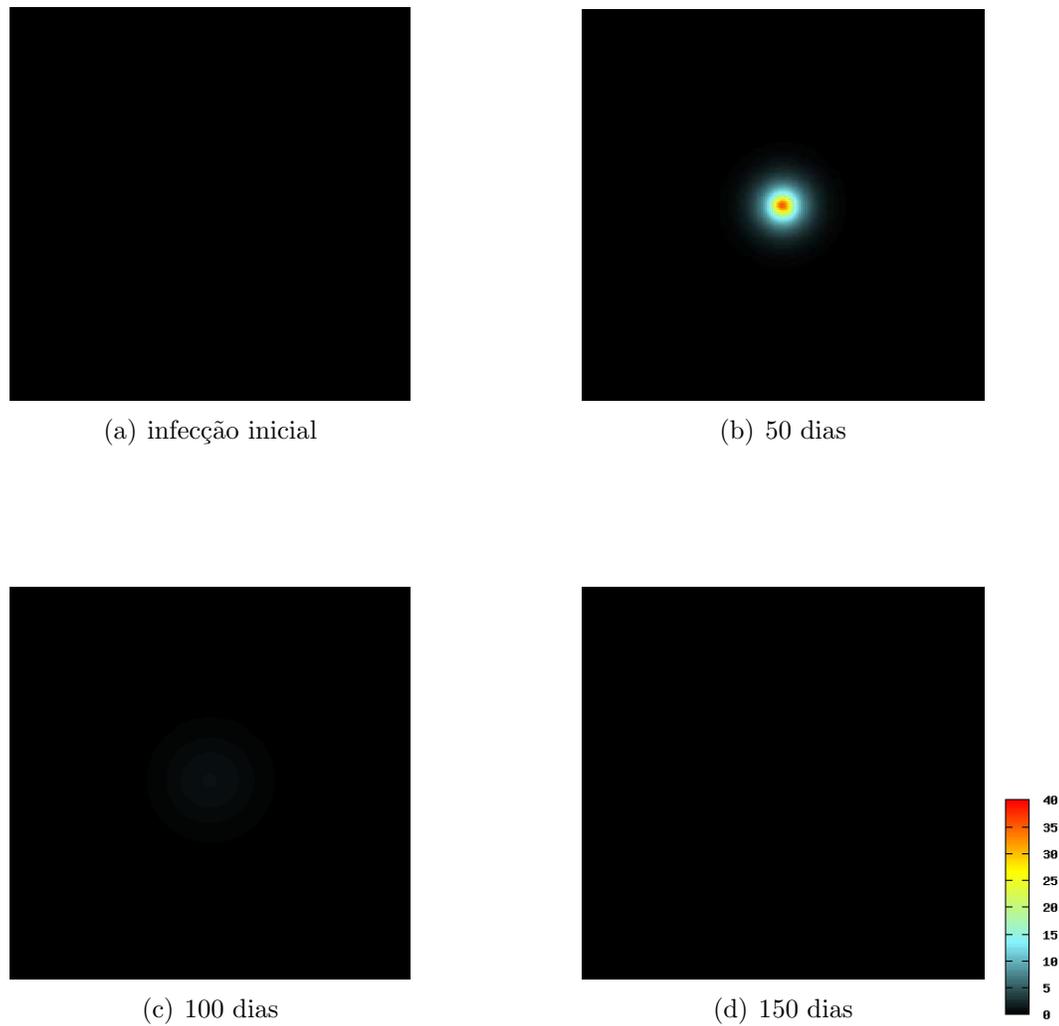
Logo após a eliminação da bactérias o granuloma tem a forma apresentada na Fig. 4.9(c) que corresponde a 100 dias de simulação. Apesar das bactérias já terem sido eliminadas, a concentração de TNF- $\alpha$  (Fig. 4.10(c)) e de quimiocinas (Fig. 4.11(c)) ainda se encontram em níveis suficientes para manter os processos de recrutamento, migração e agregação celular. O IFN- $\gamma$  produzido pelas células T<sub>H</sub>1 na periferia do granuloma atinge valores de concentração ainda mais altos do que em 50 dias, como pode ser observado na Fig. 4.12(c).

As Figuras 4.10(d), 4.11(d) e 4.12(d) mostram que aos  $t = 150$  dias, os níveis de todos os sinalizadores decaem a níveis bem baixos devido a degradação dos mesmos e a falta de estímulo para as suas produções, em função da prévia eliminação das bactérias

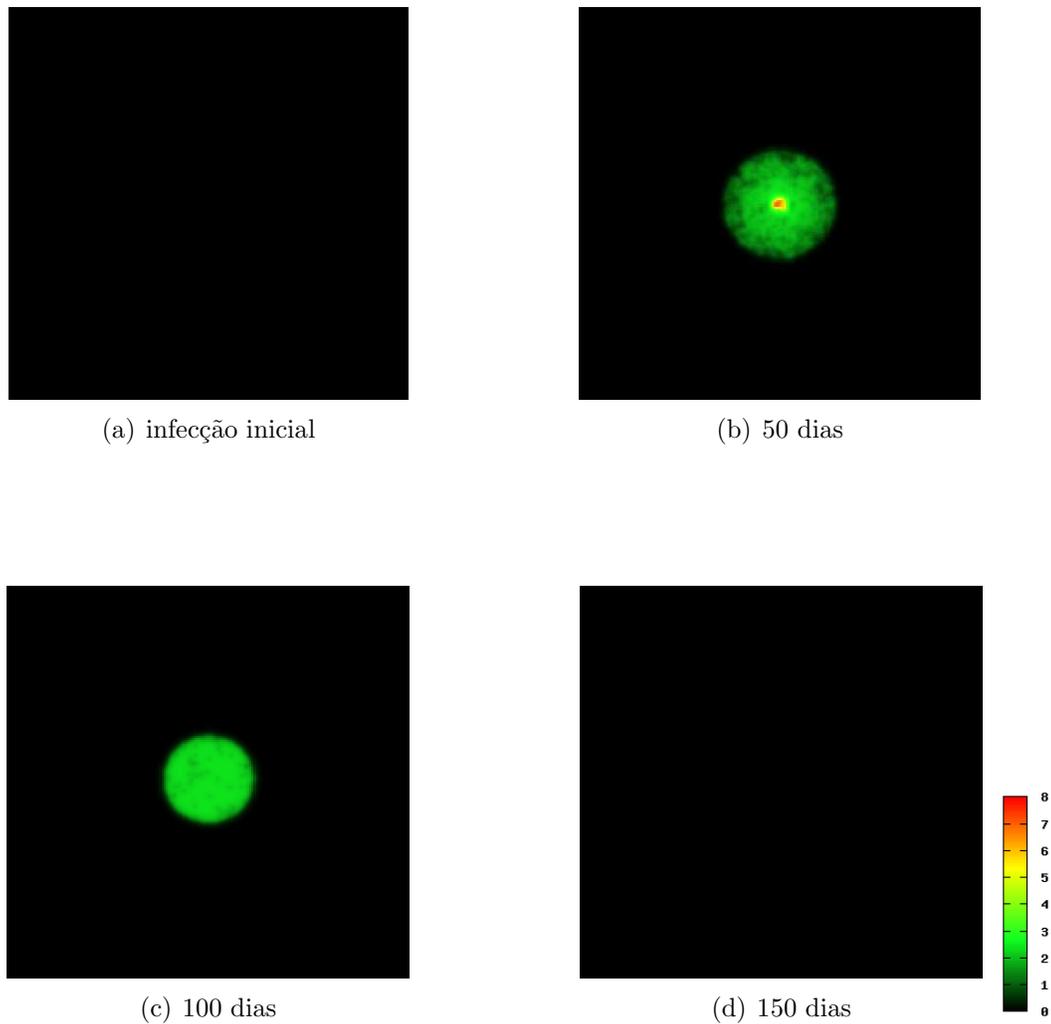
( $t = 91$  dias). Como a concentração total de quimiocinas na rede ( $Q_T$ ) está abaixo do limiar de recrutamento celular  $\theta_{rec}$ , o sistema deixa de recrutar novos macrófagos e células  $T_H1$  (ver a regra de recrutamento do macrófago na Seção 4.1). Neste estágio, o nível de quimiocinas presente na rede também não é suficiente para manter a agregação celular. Os macrófagos e células  $T_H1$  passam então a movimentar-se aleatoriamente e o granuloma começa a se desfazer, como mostra a Fig. 4.9(d).



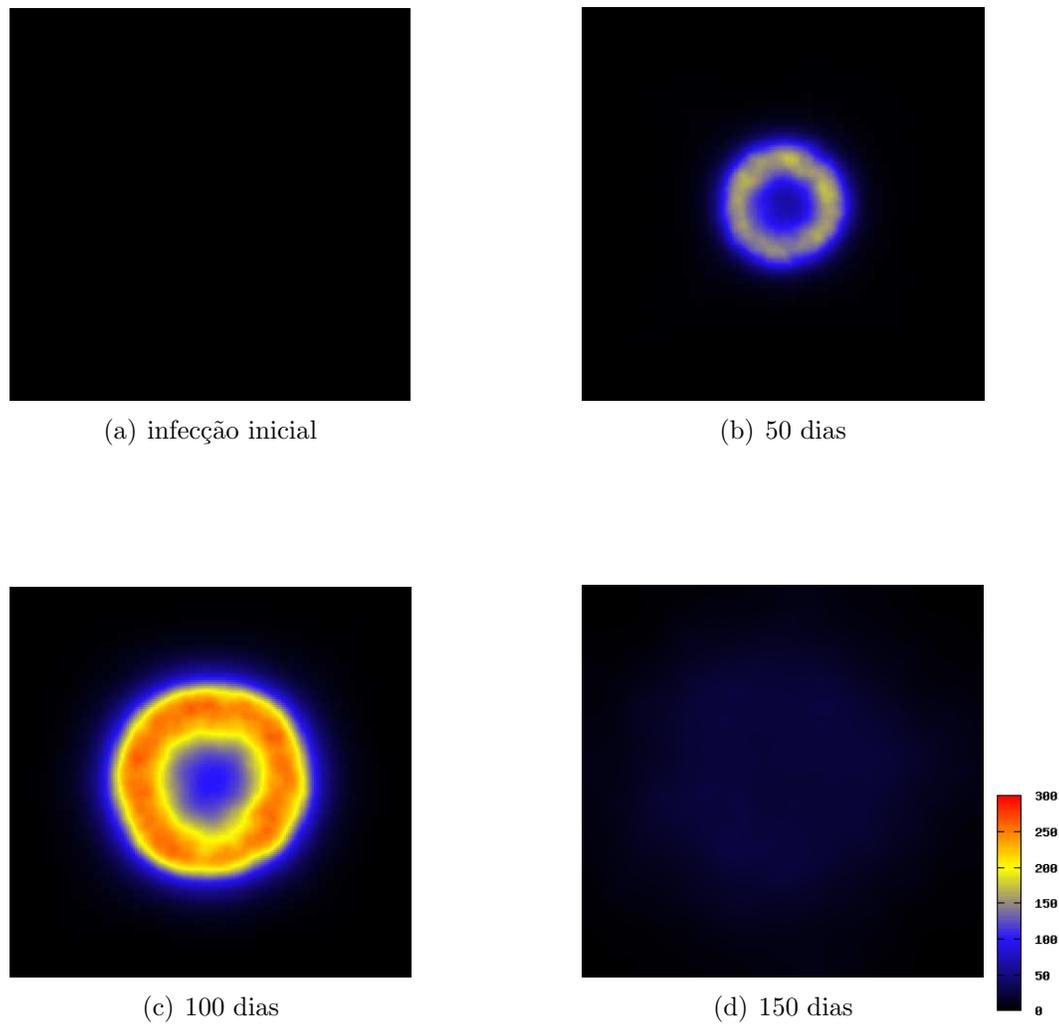
**Figura 4.9** Evolução temporal da infecção causada por *M. tuberculosis* na dinâmica de eliminação. As bactérias foram eliminadas em  $t = 91$  dias. Nesta simulação adotamos  $\theta_{IFN-\gamma}=1,63$  e os outros parâmetros utilizados são os indicados na Tabela 4.1. O código de cores adotado: BE em laranja, célula  $T_H1$  em azul, macrófago alveolar em verde, macrófago infectado em vermelho.



**Figura 4.10** Distribuição espacial da concentração de TNF- $\alpha$  produzido pelos macrófagos infectados na dinâmica de eliminação, correspondentes aos padrões de distribuição celular apresentados na Fig. 4.9.



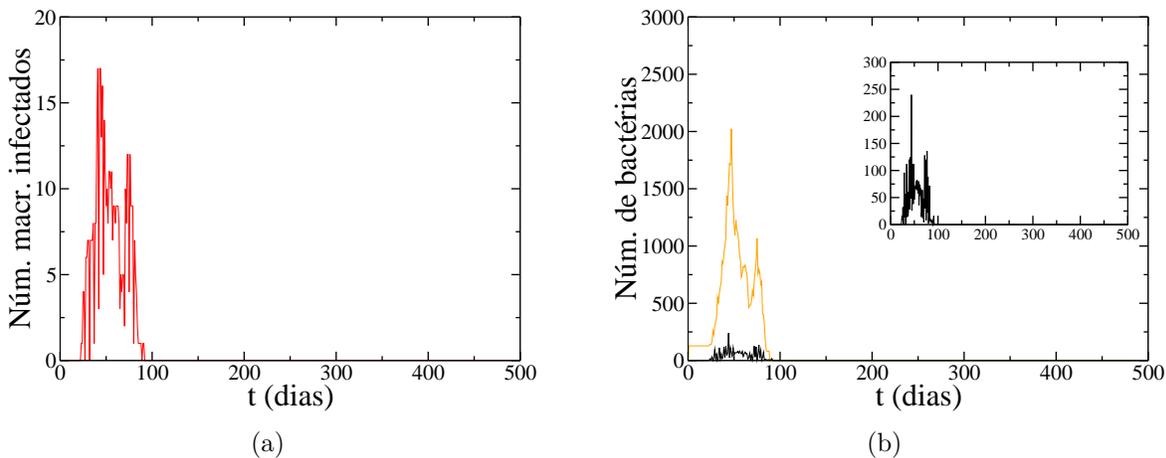
**Figura 4.11** Distribuição espacial da concentração de quimiocinas correspondentes aos padrões apresentados pela Fig. 4.9. As quimiocinas são produzidas pelos macrófagos em resposta a infecção causada por *M. tuberculosis* e ao estímulo de  $\text{TNF-}\alpha$  na dinâmica de eliminação.



**Figura 4.12** Distribuição espacial da concentração de IFN- $\gamma$  produzido pela célula T em resposta a infecção causada por *M. tuberculosis* na dinâmica de eliminação discutida na Fig. 4.9.

Além das figuras que mostram diferentes passos de tempo da evolução temporal do granuloma, para cada dinâmica do modelo, arquivos de vídeos com as respectivas simulações podem ser encontrados no CD-ROM anexo. O vídeo “eliminação.avi” corresponde a dinâmica de eliminação.

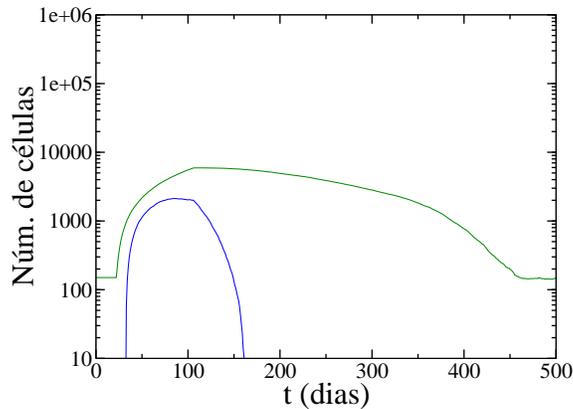
Completamos o estudo da dinâmica de eliminação, analisando o comportamento das células e bactérias da simulação da Fig 4.9. O comportamento do número de macrófagos infectados devido a presença das bactérias na rede é apresentado na Fig. 4.13(a). Este número cresce rapidamente até um valor máximo de 17 células em  $t = 41$  dias e a partir deste ponto decai a zero ( $t = 91$  dias). Como o crescimento de bactérias no modelo só é permitido intracelularmente, o número de bactérias está intimamente ligado com número de macrófagos infectados, o que explica o mesmo tipo de comportamento em função do tempo exibido pelo número de bactérias, apresentado na Fig. 4.13(b). As bactérias intracelulares atingem o valor máximo de 240 aos 44 dias, enquanto que as bactérias extracelulares atingem o máximo de 2023 bactérias em  $t = 47$  dias, lembrando que as bactérias são totalmente eliminadas em  $t = 91$  dias.



**Figura 4.13** (a) Número de macrófagos infectados e (b) número de bactérias intracelulares (preto) e extracelulares (laranja) em função do tempo na dinâmica de eliminação. O detalhe em (b) mostra apenas a evolução temporal do número de bactérias intracelulares. Estes resultados correspondem à simulação descrita na Fig. 4.9.

Os macrófagos são as primeiras células a serem recrutadas e atingem o valor máximo de 5920 células em  $t = 115$  dias, sendo que a partir daí o número decai monotonicamente, até retornar a população basal em  $t = 450$  dias, conforme mostra a Fig. 4.14. Este comportamento da evolução temporal do número de macrófagos é típico de todos os resultados (simulações) em que as bactérias são eliminadas da rede. Já as células  $T_H1$

entram no sistema 10 dias após a infecção do macrófago e atingem um número máximo de 2123 células em  $t = 87$  dias (Fig. 4.14). Observamos que o decaimento no número de macrófagos infectados e de bactérias (Fig. 4.13), coincide com o aumento do número de células  $T_H1$  na rede, o que indica ou confirma a importância das células  $T_H1$  na eliminação da infecção. Após a eliminação das bactérias ( $t = 91$  dias), as células  $T_H1$  deixam de ser recrutadas e a sua população diminui para zero, já que as células que permanecem no sistema têm tempo de vida finito.



**Figura 4.14** Número de macrófagos (verde) e células  $T_H1$  (azul) em função do tempo na dinâmica de eliminação observada na simulação correspondente à Fig. 4.9.

## Contenção

A dinâmica de contenção observada no modelo é muito parecida com a tuberculose latente descrita no Capítulo 2. Apesar das bactérias estarem contidas dentro do granuloma, estas não são facilmente eliminadas e persistem por longos tempos de simulação (Tabela 4.2), como podemos observar na Fig. 4.15. Para  $\theta_{IFN-\gamma}=1,63$ , tal como indicado na Tabela 4.2, a probabilidade de ocorrer contenção é de 88%, enquanto a de ocorrer eliminação é de apenas 12%. A Fig. 4.15 mostra apenas alguns passos de tempo ao longo da evolução temporal. Para a simulação completa ver o vídeo no arquivo “contencao.avi” do CD-ROM (anexo).

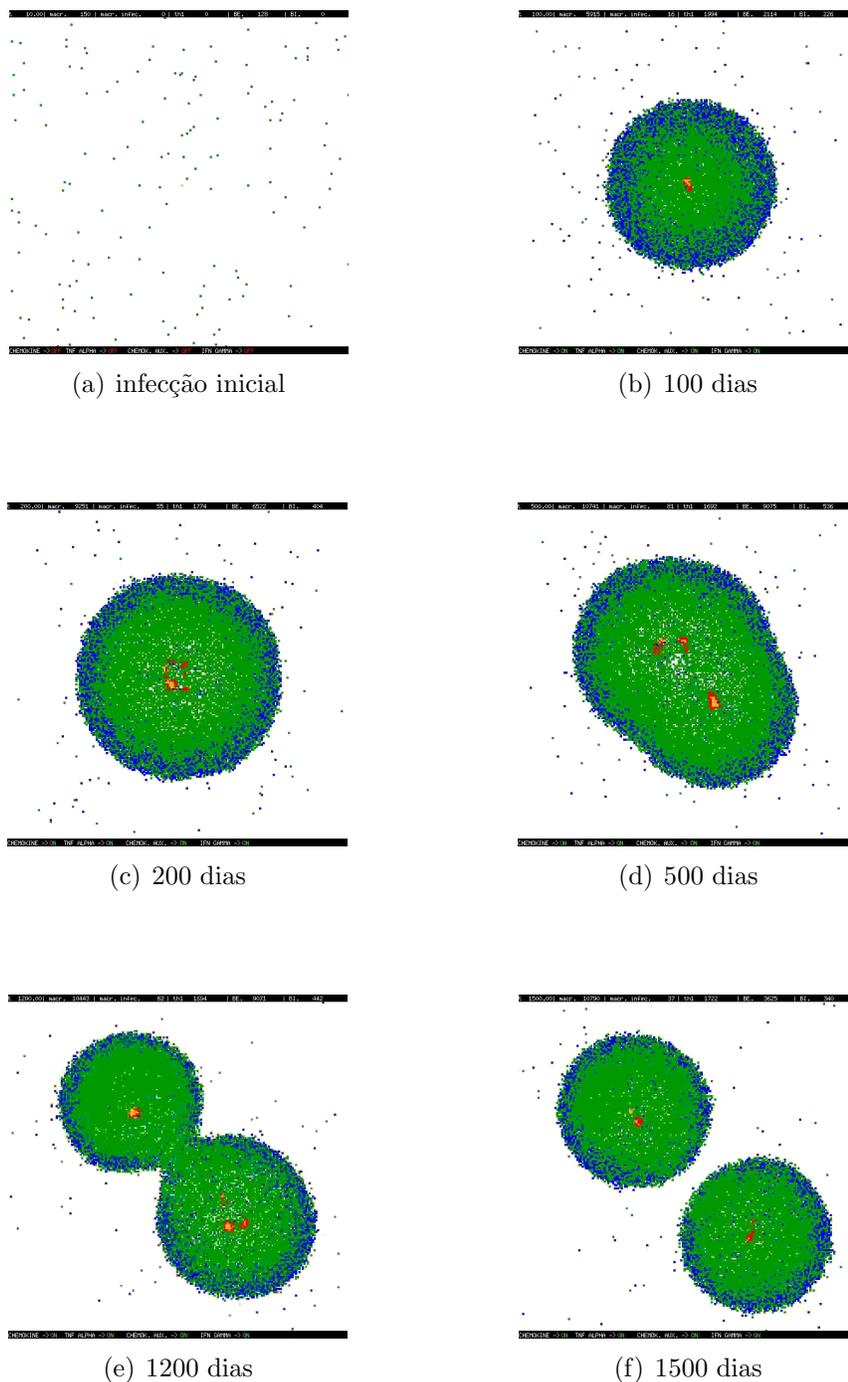
A condição inicial da simulação (Fig. 4.15(a)) tem uma distribuição de células e bactérias similares à mostrada no início da simulação da dinâmica de eliminação: 128 bactérias extracelulares colocadas no sitio central da rede e 150 macrófagos distribuídos em posições aleatórias. Como no caso anterior, a fagocitose da bactéria seguida da infecção do macrófago é que desencadeará os processos de produção de sinalizadores e o

recrutamento de macrófagos e células  $T_H1$  para o sítio de infecção. O perfil de distribuição espacial dos sinalizadores produzidos durante a infecção são apresentados nas Figuras 4.16, 4.17 e 4.18 para as concentrações de  $TNF-\alpha$ , quimiocinas e  $IFN-\gamma$ , respectivamente. Assim como na simulação de eliminação, as escalas das concentrações são diferentes para cada um dos sinalizadores: variando de 0 a 90 unidades para o  $TNF-\alpha$ , de 0 a 8 unidades para a concentração de quimiocinas e de 0 a 300 unidades para a concentração de  $IFN-\gamma$ .

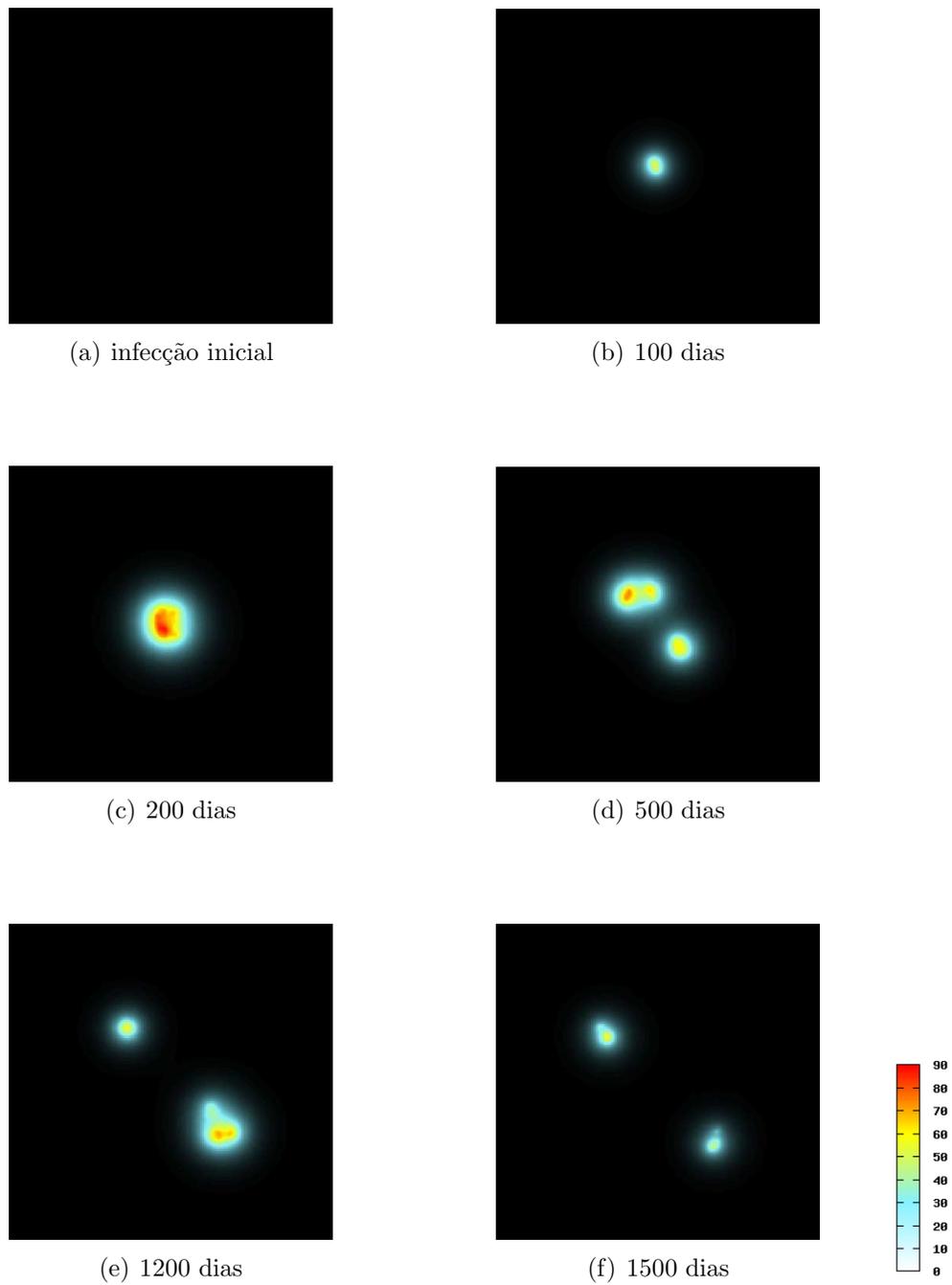
O recrutamento dos macrófagos e das células  $T_H1$  para o sítio de infecção leva à formação do granuloma, mas neste caso não há a eliminação da bactérias na simulação. Aos 100 dias as células  $T_H1$  estão presentes (Fig. 4.15(b)) e todos os sinalizadores estão sendo expressos. No centro do granuloma é onde observamos as maiores concentrações de  $TNF-\alpha$  (Fig. 4.16(b)) e quimiocinas (Fig. 4.17(b)), já que é nesta região onde se concentram os macrófagos infectados. Já a concentração  $IFN-\gamma$  (Fig. 4.18(b)) é maior na periferia do granuloma, onde se concentram a maior parte de células  $T_H1$ .

Durante a evolução temporal do granuloma, observamos que o espalhamento das bactérias pela rede pode criar novos sítios de infecção, em torno dos quais formam-se novos granulomas. Estes novos focos de infecção podem ser melhor localizados observando-se a distribuição espacial de concentração de  $TNF-\alpha$  e das quimiocinas, as quais assumem valores bem altos nas regiões que contenham os macrófagos infectados. Em  $t = 200$  dias, como mostra a Fig. 4.17(c), podemos observar a formação de vários sítios de infecção próximo ao centro da rede. Com o passar do tempo o espalhamento das bactérias pode levar à divisão do granuloma em dois próximo a  $t = 1200$  dias (Figuras 4.15(e) e 4.15(f)). A separação dos novos focos fica melhor caracterizada pela distribuição espacial das concentrações de  $TNF-\alpha$  (Fig. 4.16(d), 4.16(e) e 4.16(f)) e de quimiocinas (Fig. 4.17(d) e 4.17(e) e 4.17(f)).

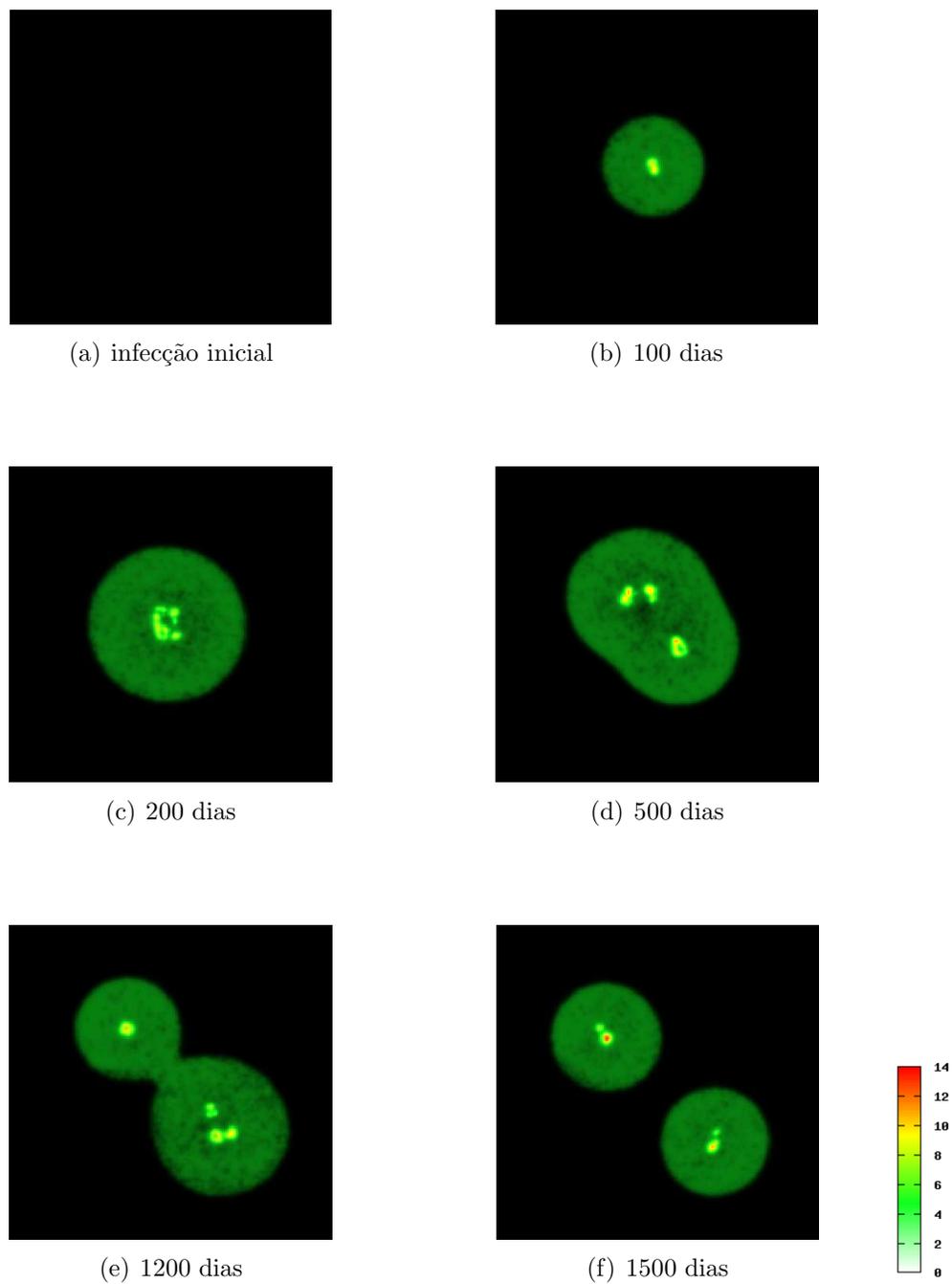
Para  $t = 1500$  dias de evolução, observamos dois granulomas diferentes, que se formaram em torno dos novos focos de infecção. Nesta simulação, as bactérias persistiram dentro do granuloma por 15 anos antes de serem completamente eliminadas, conforme mostra o vídeo no arquivo “contencao.avi” contido no CD-ROM anexo.



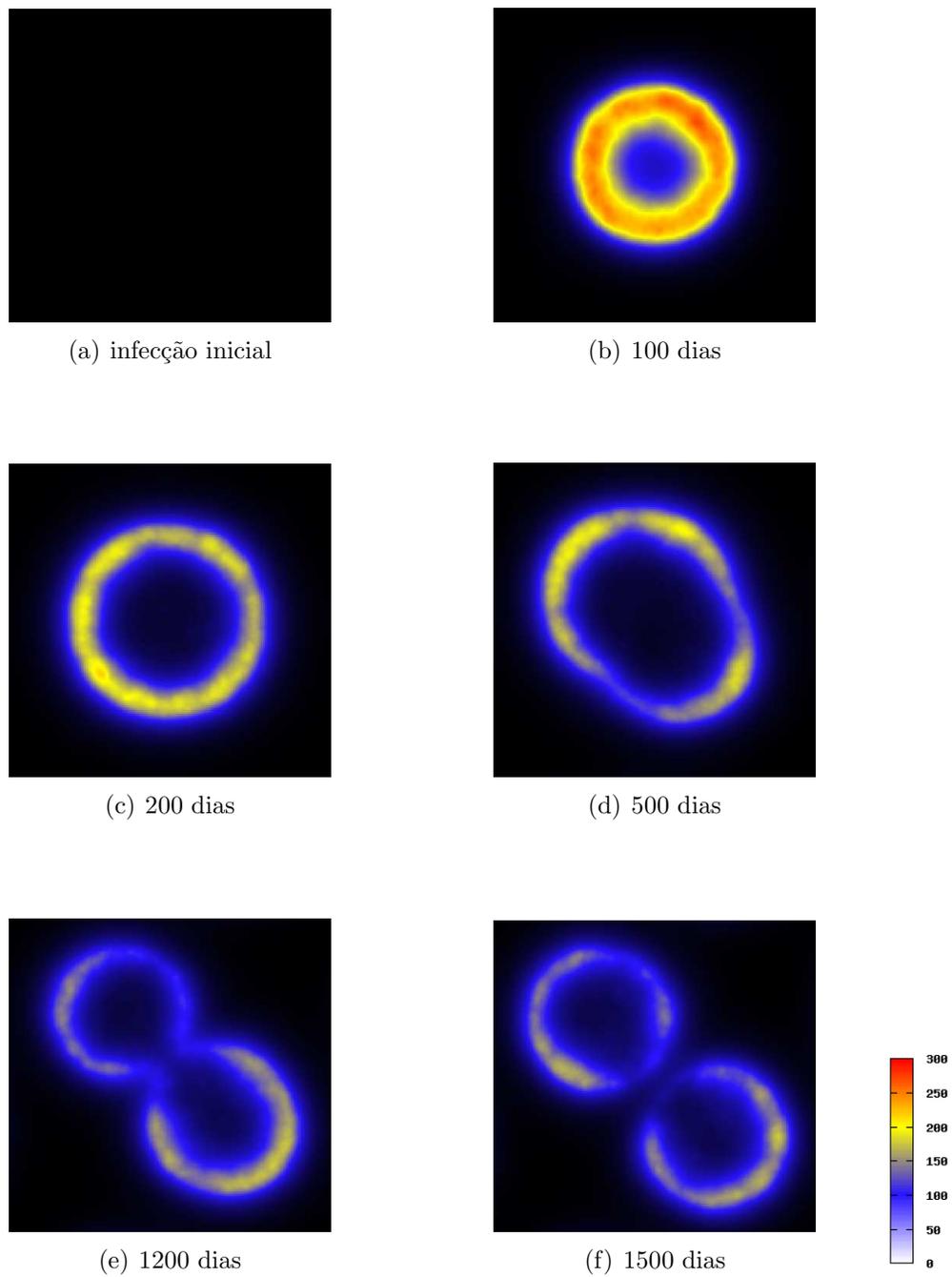
**Figura 4.15** Evolução temporal da infecção causada por *M. tuberculosis* na dinâmica de contenção para diferentes passo de tempo e  $\theta_{\text{IFN-}\gamma}=1,63$ , os outros parâmetros utilizados são os indicados na Tabela 4.1. O código de cores adotado: BE em laranja, célula  $T_H1$  em azul, macrófago alveolar em verde, macrófago infectado em vermelho.



**Figura 4.16** Distribuição espacial da concentração de TNF- $\alpha$  produzido pelos macrófagos infectados na dinâmica de contenção descrita pela Fig. 4.15.

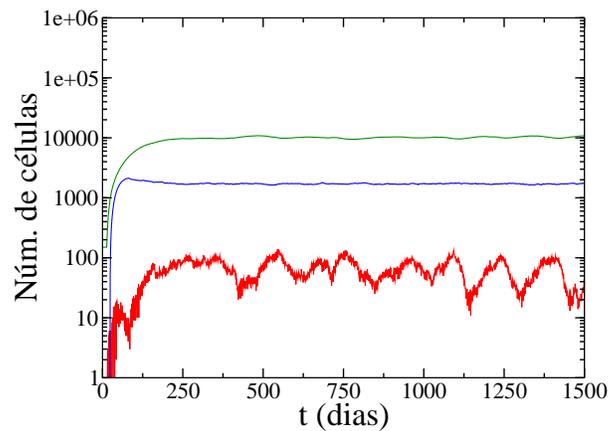


**Figura 4.17** [Distribuição espacial da concentração de quimiocinas produzida por macrófagos em resposta a infecção causada por *M. tuberculosis* e devido ao estímulo de  $\text{TNF-}\alpha$  na dinâmica de contenção correspondente à dinâmica descrita pela Fig. 4.15.]

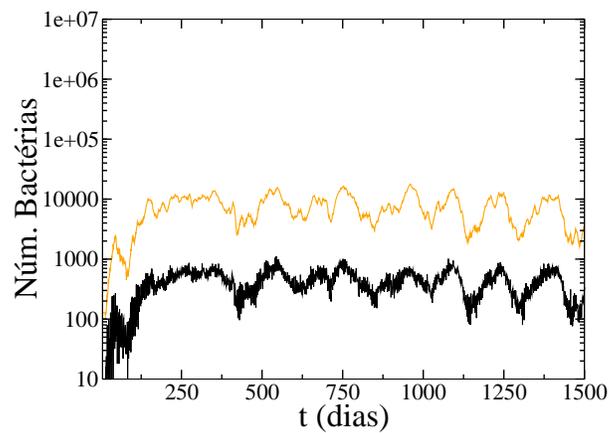


**Figura 4.18** Distribuição espacial da concentração de IFN- $\gamma$  produzido por célula T em resposta a infecção causada por *M. tuberculosis* na dinâmica de contenção descrita pela Fig. 4.15.

Na dinâmica de contenção a evolução do número de macrófagos e células  $T_H1$  cresce rapidamente até atingir um valor de saturação, em torno do qual flutam (Fig. 4.19(a)). O número de macrófagos flutua em torno de 10500 células e o número de células  $T_H1$  flutua em torno de 1700 células. A principal característica da dinâmica de contenção, está relacionada com a permanência das bactérias no sistema, cujas quantidades flutuam em torno dos valores médios: 360 para BI e 6300 para BE, valores estimados da Fig. 4.19(b). A evolução temporal do número de macrófagos infectados tem um comportamento muito parecido com a evolução temporal do número de bactérias, flutuando em torno 54 células (Fig. 4.19(a)).



(a)



(b)

**Figura 4.19** Evolução temporal das populações celulares e de bactérias na dinâmica de contenção descrita na Fig. 4.15. (a) Número células em função do tempo, macrófagos (verde), célula  $T_H1$ (azul), macrófagos infectados (vermelho). (b) Número de bactérias intracelulares (preto) e extracelulares (laranja) em função do tempo.

Observamos também que a divisão do granuloma em dois, que ocorre em torno de  $t =$

1200 dias (Fig. 4.15(e)), não implica em aumento ou diminuição do número de macrófagos e células  $T_H1$ , pois estas populações permanecem inalteradas após  $t = 1200$  dias. Já as flutuações do número de macrófagos infectados e de bactérias indicam aumentar para  $t > 1200$ , o que pode estar sendo gerado pela divisão do granuloma.

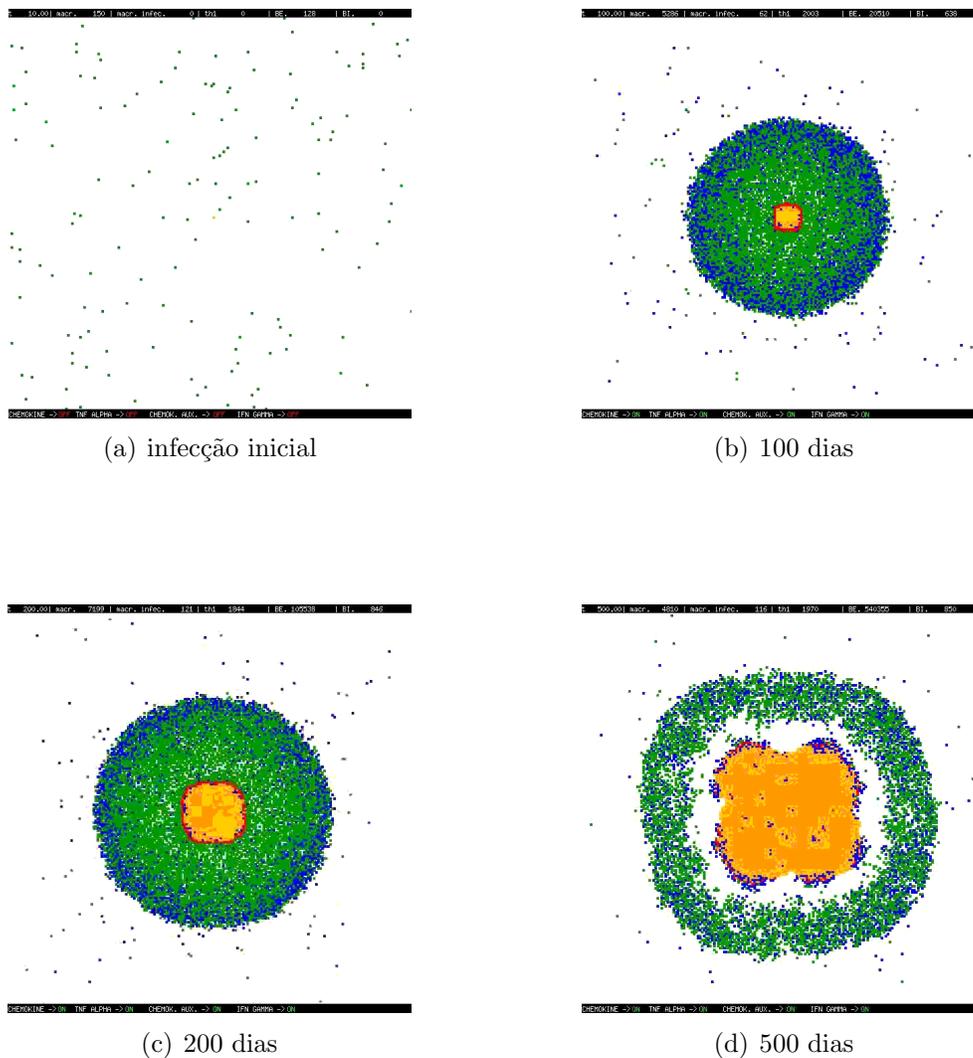
### Disseminação

O granuloma formado na dinâmica de disseminação utilizando  $\theta_{IFN-\gamma}=300$  não consegue eliminar ou conter as bactérias, que então espalham-se por toda a rede, como mostra a Fig. 4.20 e o vídeo no arquivo “disseminacao.avi” no CD-ROM anexo. A configuração inicial ( $t = 0$ ) é a mesma utilizada nas dinâmicas de contenção e eliminação (como mostra a Fig. 4.20(a)). Nas Figuras 4.21, 4.22 e 4.23 apresentamos as distribuições das concentrações de  $TNF-\alpha$ , quimiocinas e  $IFN-\gamma$  respectivamente, para os mesmos passos de tempo da simulação da dinâmica de disseminação apresentados na Fig. 4.20. Vale lembrar que aqui, que como assinalado para as outras dinâmicas, as escalas das concentrações e as respectivas escalas de cores adotadas são diferentes para cada um dos sinalizadores, variando de 0 a 70 unidades o  $TNF-\alpha$ , de 0 a 10 unidades as quimiocinas e de 0 a 300 unidades para o  $IFN-\gamma$ .

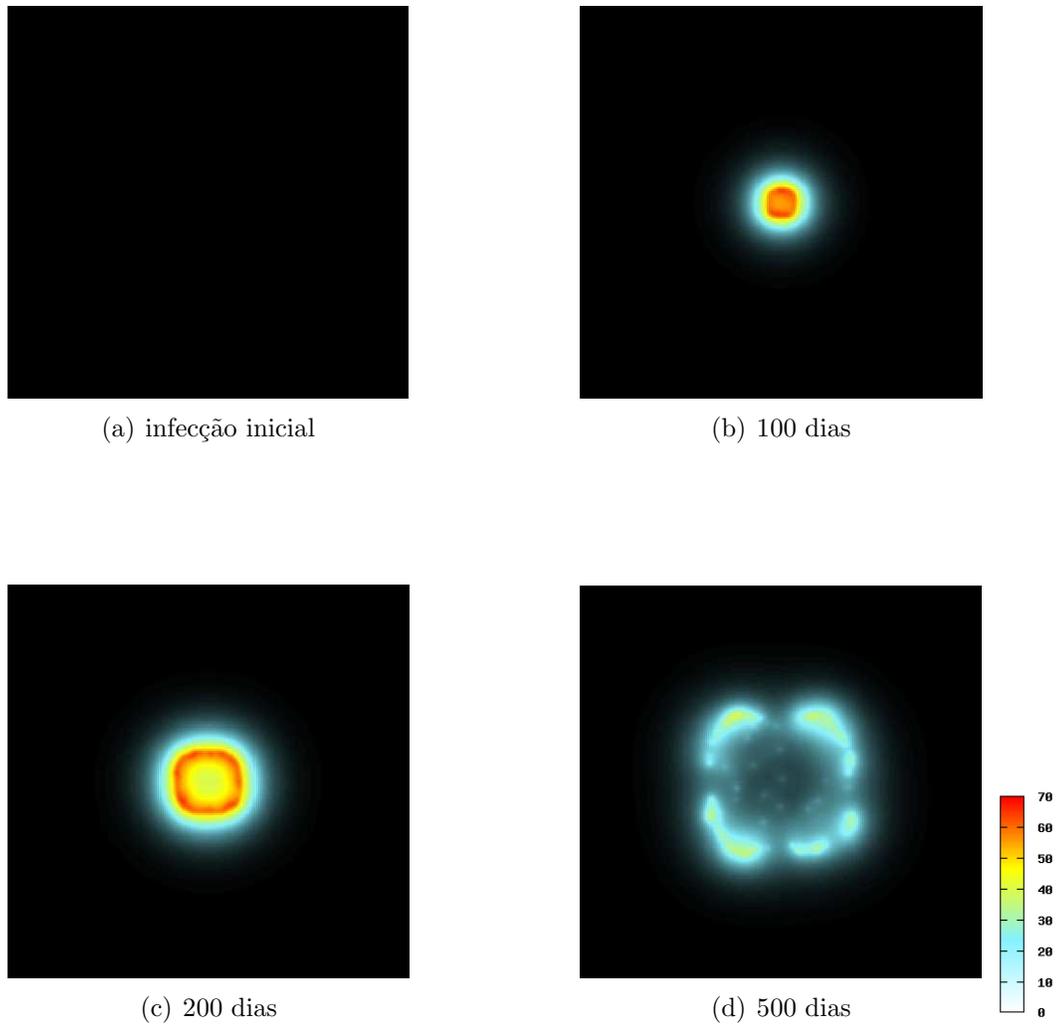
O padrão observado aos 100 dias após a infecção inicial, mostra uma grande quantidade de bactérias extracelulares no centro do granuloma (Fig. 4.20(b)), quando comparado com as outras duas dinâmicas do modelo (Figuras 4.9(c) e 4.15(b)). Na região central da rede, observamos também maiores concentrações de  $TNF-\alpha$  (Fig. 4.21(b)) e de quimiocinas (Fig. 4.22(b)), quando comparadas com as outras duas dinâmicas (Figuras 4.10(c), 4.16(b), 4.11(c) e 4.17(b)). Aos 100 dias de evolução a presença das células  $T_H1$  e os níveis presentes de  $IFN-\gamma$  (Fig. 4.23(b)), não são suficientes para a eliminação ou controle do crescimento das bactérias.

Aos 200 dias de evolução temporal, podemos ver que a região central que contém bactérias extracelulares aumenta de tamanho (Fig. 4.20(c)), pois o granuloma não consegue impedir a replicação das bactérias intracelulares. O perfil de expressão de  $TNF-\alpha$  (Fig. 4.21(c)) evidencia o aumento da região contendo BE, enquanto a baixa expressão da concentração de quimiocinas no centro do granuloma (Fig. 4.22(c)) indica um número baixo de macrófagos na região. Já o perfil de  $IFN-\gamma$  confirma a organização típica observada, onde as células T circundam os macrófagos infectados. Em  $t = 500$  dias, as

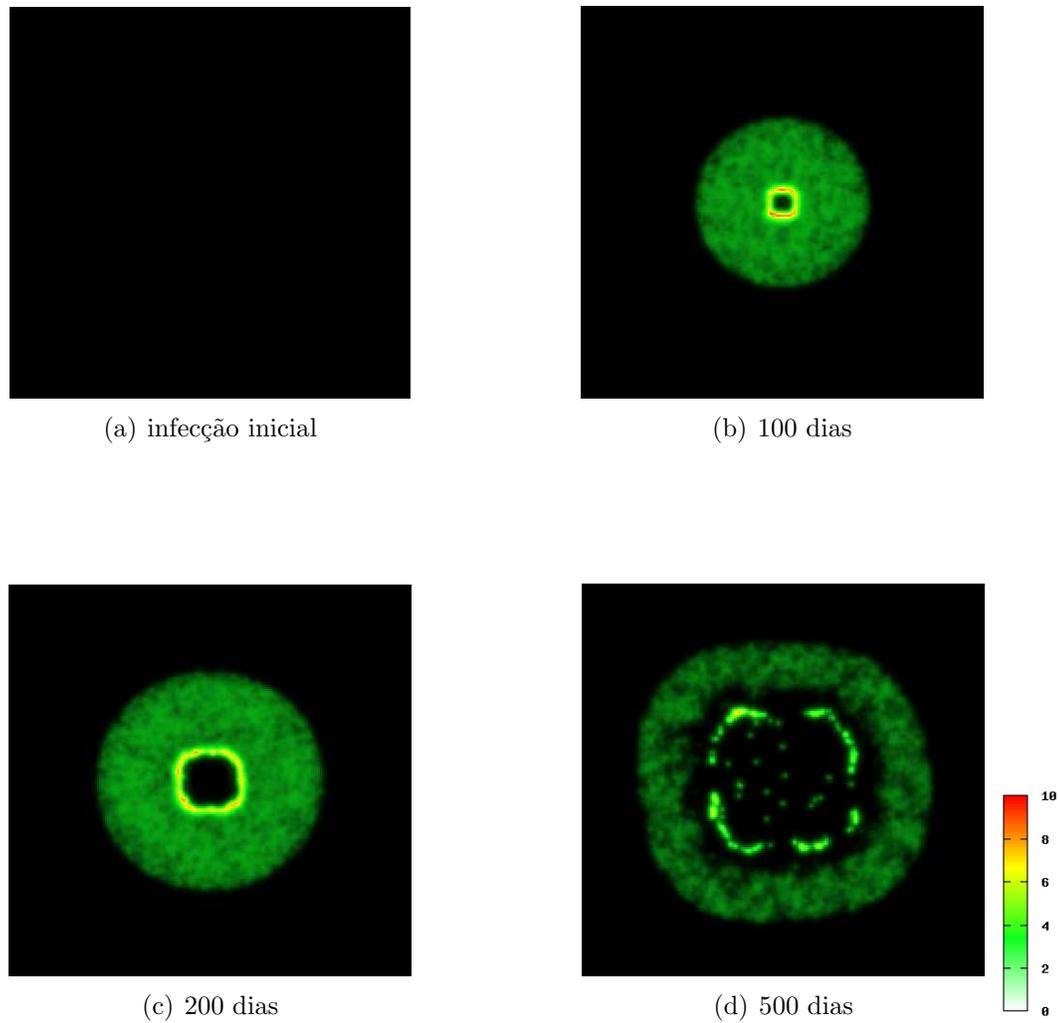
bactérias extracelulares já ocupam uma parte substancial da rede (Fig. 4.20(d)) e os sinalizadores produzidos, agora em níveis de concentração menores, estão mais dispersos em comparação com os estágios anteriores, conforme mostram as Figuras 4.21(d), 4.23(d) e 4.22(d). Neste estágio da dinâmica de disseminação, não se observa mais o cinturão externo de alta concentração (amarelo) de  $\text{IFN-}\gamma$ , observado nos estágios anteriores, o que indica a presença de uma quantidade menor de células T na periferia e portanto uma menor ativação dos macrófagos, o que facilita a replicação das bactérias na região central.



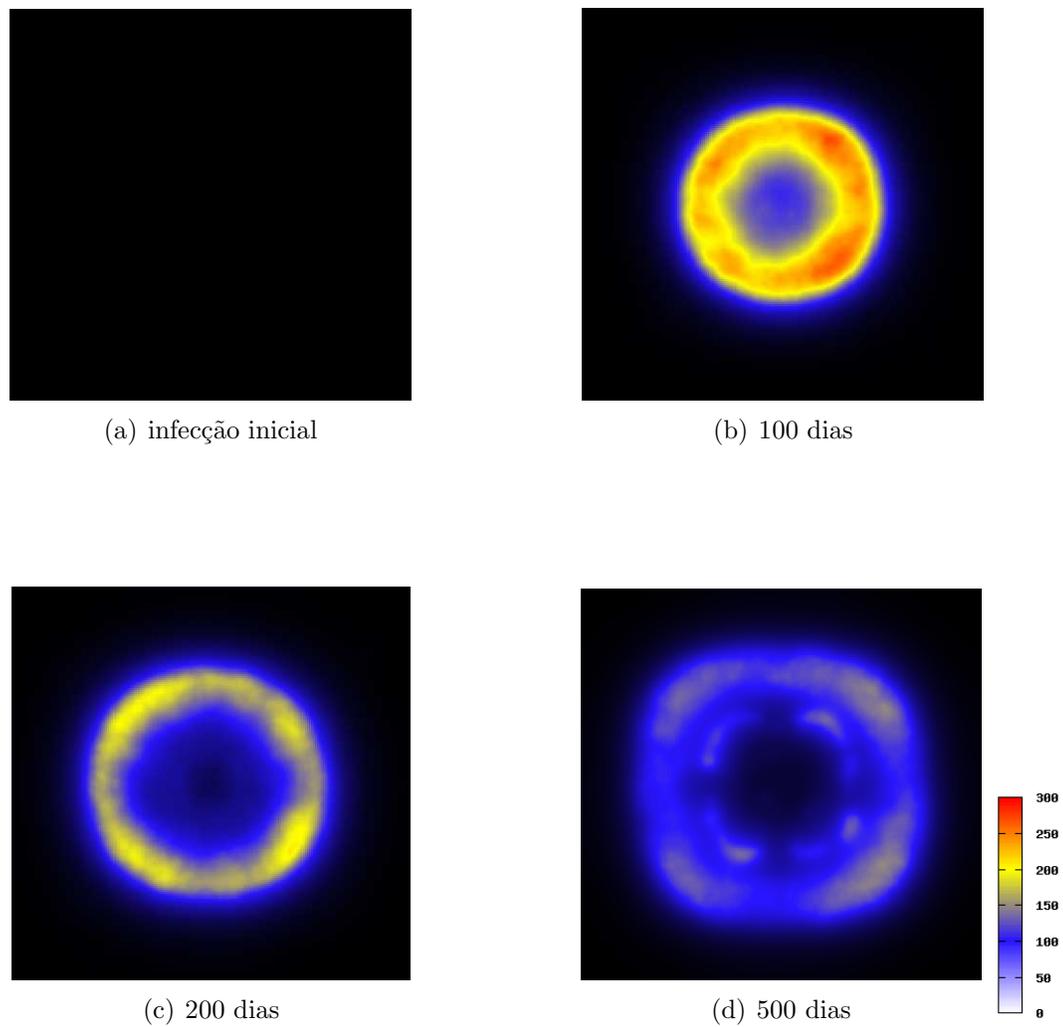
**Figura 4.20** Evolução temporal da infecção causada por *M. tuberculosis* na dinâmica de disseminação utilizando  $\theta_{\text{IFN-}\gamma} = 300$ . Os valores para os outros parâmetros estão indicados na Tabela 4.1. Código de cores adotado: BE em laranja, célula  $T_{\text{H}1}$  em azul, macrófago alveolar em verde, macrófago infectado em vermelho.



**Figura 4.21** Distribuição espacial de concentração de TNF- $\alpha$  produzido pelos macrófagos infectados na dinâmica de disseminação apresentada na Fig. 4.20.

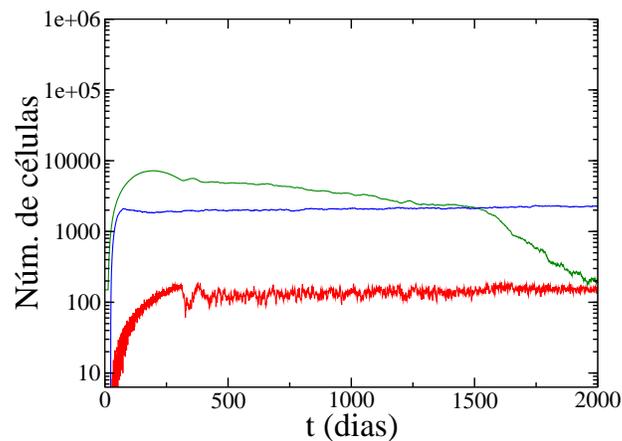


**Figura 4.22** Distribuição espacial de concentração de quimiocinas produzida por macrófago em resposta a infecção causada por *M. tuberculosis* e ao estímulo devido a produção de  $\text{TNF-}\alpha$  na dinâmica de disseminação apresentada na Fig. 4.20.

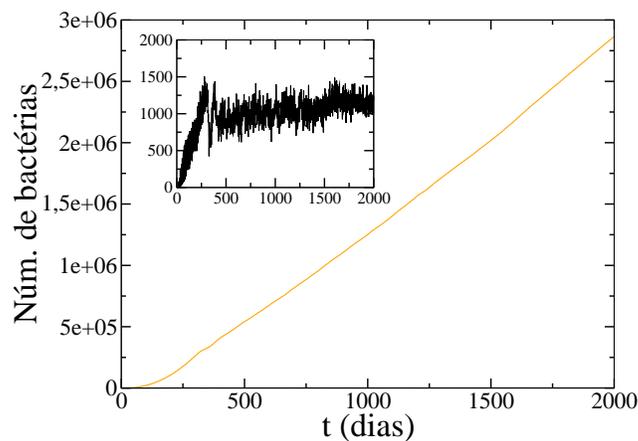


**Figura 4.23** Distribuição espacial da concentração de IFN- $\gamma$  produzido pela célula T em resposta a infecção causada por *M. tuberculosis* na dinâmica de disseminação, correspondente a Fig. 4.20.

Pela análise da evolução temporal das células e bactérias na rede durante a simulação da dinâmica de disseminação, observamos que o número de macrófagos infectados cresce rapidamente logo após a infecção inicial até  $t \sim 300$  dias, quando atinge um estado estacionário no qual o número de macrófago flutua em torno de 140 unidades (Fig. 4.24(a)). Já o número de bactérias extracelulares cresce linearmente (Fig. 4.24(b)) com o tempo atingindo  $\sim 3 \times 10^6$  bactérias aos 2000 dias de simulação, o que permite que as mesmas se espalhem por grande parte da rede como visto na Fig. 4.20. O número de bactérias intracelulares no entanto, permanece flutuando em torno de 1000 bactérias.



(a)



(b)

**Figura 4.24** Evolução temporal das populações de células e bactérias na dinâmica de disseminação apresentada na Fig. 4.20. (a) Número de células em função do tempo, macrófagos (verde), célula  $T_H1$ (azul), macrófagos infectados (vermelho). (b) Número de bactérias extracelulares (laranja) e, no detalhe, as intracelulares (preto) em função do tempo. O número de bactérias extracelulares cresce linearmente com do tempo, coeficiente de inclinação  $a = 1534$ .

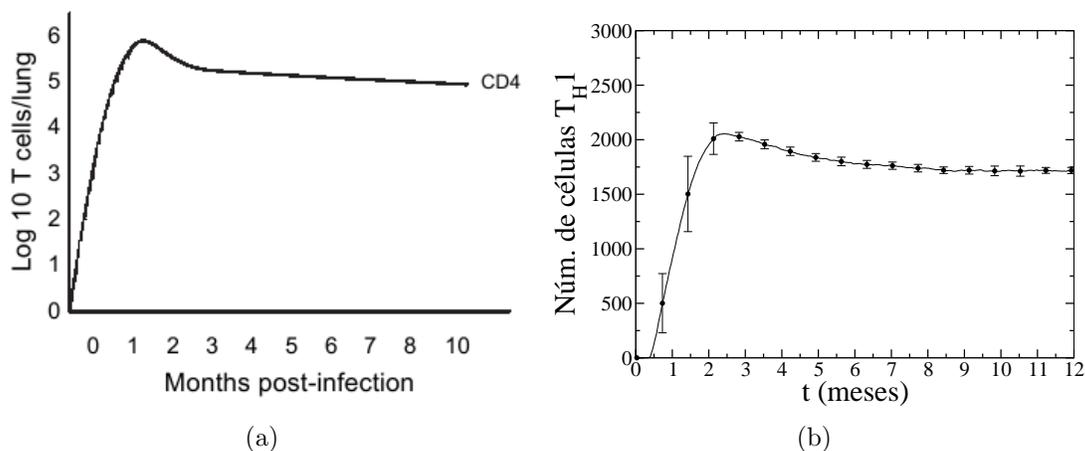
Devido ao recrutamento celular desencadeado pela presença de macrófagos infectados, o número de macrófagos cresce rapidamente até atingir o valor máximo de 7221 células em  $t = 198$  dias (Fig. 4.24(a)), decaindo lentamente a partir deste ponto. A taxa de recrutamento de macrófagos é menor do que a taxa com a qual sofrem apoptose, o que leva a uma diminuição do número de macrófagos com o passar do tempo. Já o número de células  $T_H1$  cresce rapidamente logo após a infecção inicial, até um valor máximo de  $\sim 2000$  células, em torno do qual a população flutua com o passar do tempo (ver Fig. 4.24(a)). A evolução temporal das células  $T_H1$ , exibe o mesmo tipo de comportamento observado na dinâmica de contenção. É importante notar também, que o número de macrófagos passa a cair mais rapidamente quando ele fica menor que o número de células  $T_H1$  (Fig. 4.24(a)).

### Comparação dos resultados do modelo com resultados experimentais

Nos trabalhos com modelos animais utilizados para se estudar a tuberculose são realizados uma série de medidas experimentais, que vão desde medidas da expressão das citocinas presentes no sítio de infecção até a distribuição celular no granuloma (análise imunohistoquímica) [9]. Em três destes trabalhos [81, 82, 84] encontramos resultados experimentais importantes para a validação do modelo proposto para formação de granulomas na TB. Com o modelo de AC obtivemos resultados semelhantes à evolução do número de micobactérias [81] e do número de células T CD4 [82] encontrados no pulmão de camundongos infectados.

No trabalho de Flynn e colaboradores [84], eles buscam observar quais os efeitos que uma exposição prolongada ao bacilo de Koch pode provocar na qualidade da resposta das células T CD4 e T CD8. É observado em outras doenças, por exemplo a SIDA, que a persistência da infecção pode levar a anomalias na resposta imunológica, incluindo uma fraca produção de citocinas e uma ação citotóxica defeituosa. Na tuberculose, o entendimento em vivo dos mecanismos que regulam as funções efetoras das células T durante a persistência infecção por *M. tuberculosis* pode ajudar a desenvolver novas formas de estratégias de vacinas. No trabalho os autores analisam principalmente a evolução temporal de células T CD4 e T CD8 durante a infecção por Mtb no camundongo e a produção da citocina IFN- $\gamma$ . Deste trabalho, vamos apresentar apenas a evolução temporal das célula T CD4, que vamos simular no nosso modelo.

No experimento, os camundongos (C57BL/6) foram infectados por via aérea usando uma baixa dose de *M. tuberculosis* Erdman (20 – 50 CFU)<sup>2</sup>. A dose recebida foi estimada a partir da observação do pulmão de 3 camundongos 24 horas após a infecção aerossol. Após a infecção dos camundongos, a cada intervalo de 10 dias durante um período de 12 meses, sacrificam-se 20 camundongos para a contagem de células T CD4 infiltradas no pulmão. Os resultados obtidos indicam que as células T CD4 se infiltram no pulmão do camundongo depois de cerca de 2 semanas após a infecção inicial, atingindo o valor máximo ( $\sim 10^6$  células) após 4 semanas. A partir daí o número de células T CD4 decai lentamente com o tempo, ou então persiste com a contagem alta, no caso de uma infecção crônica, veja a representação na Fig. 4.25(a).



**Figura 4.25** Número de células T CD4 em função do tempo após a infecção. (a) Resultados de Flynn e colaboradores [82] e (b) resultado do modelo de AC.

Utilizando o modelo introduzido na Seção 4.1, simulamos este experimento, considerando cada amostra correspondendo a um camundongo. Nossos resultados mostram que o número de células  $T_{H1}$  cresce rapidamente em resposta a infecção inicial e atinge um valor máximo da ordem de 2000 células em aproximadamente 9 semanas. A partir deste máximo, o número de célula  $T_{H1}$  decai lentamente (Fig. 4.25(b)). A evolução temporal para as células  $T_{H1}$  no modelo, tem um comportamento qualitativamente igual a contagem de células T CD4 experimental. Note que as escalas dos eixos com o número de células são diferentes, no modelo animal a escala é logarítmica enquanto que para o modelo de AC, ela é linear. Pelas barras de erro dos resultados do modelo de AC (Fig.

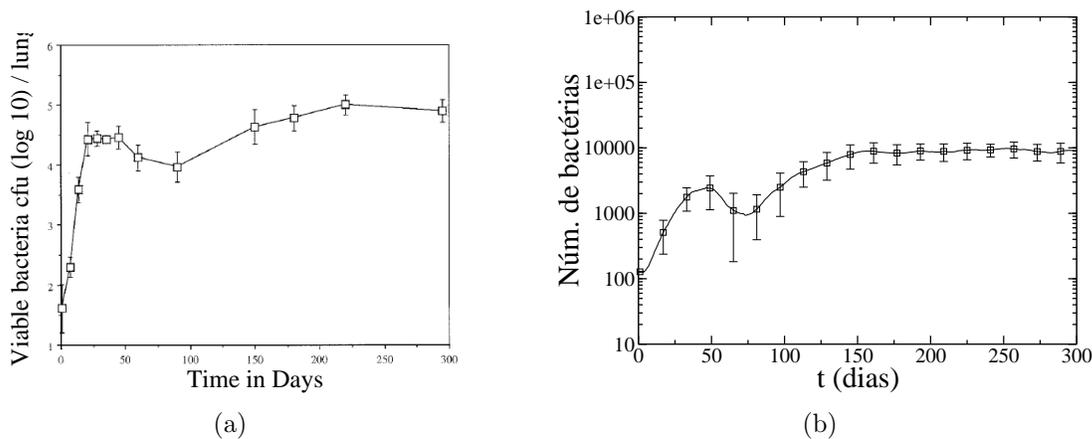
<sup>2</sup>CFU, abreviação do termo em inglês “Colony-Forming Unit” e que quer dizer “unidade em colônias formadas”, é a medida do número de bactérias viáveis existentes em uma amostra.

4.25(b)), podemos observar que no início da simulação existe uma maior flutuação no número de células  $T_{H1}$ . Esta flutuação é devida a variação no tempo de entrada das células  $T_{H1}$ , que acontece depois de 10 dias após a infecção do primeiro macrófago na rede, veja a regra para as células  $T_{H1}$ , descrita na Seção 4.1. Para reproduzir o experimento, usamos o resultados das 44 simulações para as quais houve a contenção das bactérias, e os valores para os parâmetros do modelo foram os usados na Tabela 4.1.

Gonzalez-Juarrero e colaboradores [81] estudam no seu experimento, através da citometria de fluxo, o influxo células T CD4 e T CD8 no pulmão de camundongos infectados com *M. tuberculosis* e usam a análise imunohistoquímica para definir as suas distribuições relativas. O processo de influxo celular e a distribuição dos linfócitos pelo granuloma ainda não são bem entendidos na literatura. No experimento, os autores medem também a evolução temporal das bactérias no pulmão de camundongos infectados, cujos resultados iremos simular no modelo de AC. Os camundongos (C57BL/6) neste trabalho também foram infectados por via aérea com uma baixa dose de *M. tuberculosis* Erdman, resultando em uma inoculação média de 100 bactérias por pulmão para um período de exposição de 30 minutos. O número de bactérias no experimento, medido em unidades de CFU, é estimado por pulmão de camundongo. A contagem de colônias formadas foi realizada após de 3 semanas de incubação e para cada medida CFU foram usados 4 camundongos. Os resultados obtidos [81] indicam um crescimento rápido para o número de bactérias, no qual atinge um patamar de  $\sim 26000$  bactérias em 21 dias (Fig. 4.26(a)), onde permanece até por volta dos 45 dias. Após este tempo, o número de bactérias decai para  $\sim 10000$  aos 90 dias, momento em que torna a crescer até um valor de  $\sim 75000$  bactérias no qual se estabiliza. A contagem das bactérias foi medida até os 295 dias pós infecção.

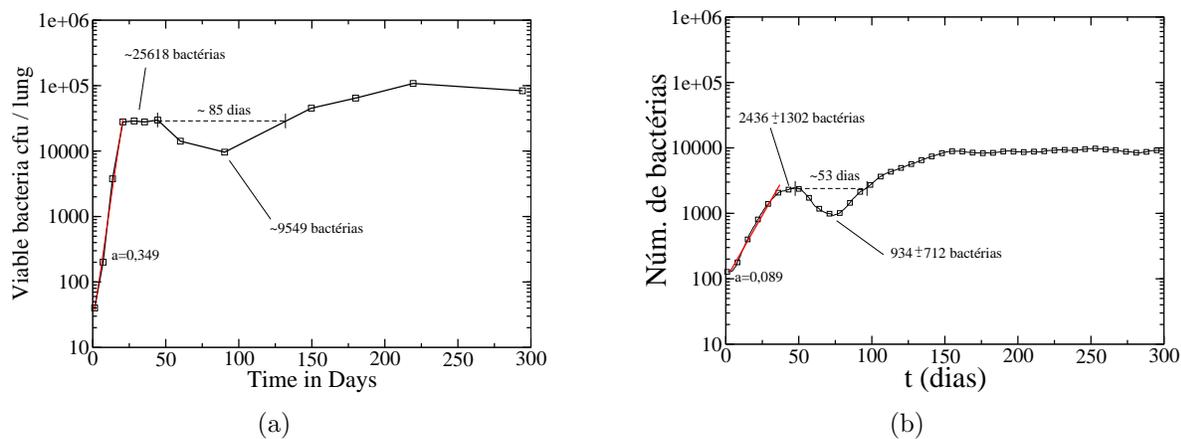
Para reproduzir este resultado experimental, usamos também os resultados das 44 simulações do modelo de AC, onde houve a contenção das bactérias. Os valores para os parâmetros do modelo foram os da Tabela 4.1. A evolução do número de bactérias no modelo AC tem o mesmo comportamento qualitativo observado no resultado experimental, como mostra a Fig. 4.26(b). No modelo o número de bactérias cresce inicialmente até atingir um valor máximo de  $\sim 2436$  aos 43 dias de simulação. Este crescimento inicial das bactérias é bem mais lento do que para o resultado experimental, as inclinações dos ajustes exponenciais são 0,349 e 0,089 respectivamente (Fig. 4.27). Podemos observar também que o máximo local do número de bactérias no modelo de AC é atingido dentro do intervalo de tempo, 21 a 45 dias, onde o crescimento das bactérias no experimento de Flynn se manteve no patamar. A partir dos 43 dias de simulação, o número de bactérias

no modelo decai para  $\sim 934$  em  $t = 73$  dias, no qual retorna o crescimento até um valor de torno de 10000 bactérias, onde permanece flutuando. Podemos observar que o número de bactérias do patamar e do mínimo local na contagem experimental (Fig. 4.27(a)), são respectivamente em torno de 10 vezes maiores que o número de bactérias do máximo e do mínimo local para o nosso modelo (Fig. 4.27(b)). No modelo para a formação de granulomas de tuberculose o valor máximo atingido pelo número de células  $T_H1$  (Fig. 4.25(b)), coincide com o decaimento no número de bactérias (Fig. 4.26(b)), o que indica a ação das células  $T_H1$  na eliminação de bactérias. O intervalo de tempo entre o decaimento no número de bactérias e o retorno do crescimento medido em relação ao máximo local, como indicado na Fig. 4.27, é em torno de 85 dias para o resultado experimental Gonzalez-Juarrero e colaboradores [81] e em torno de 53 dias para o nosso modelo. Este resultado indica uma retomada de crescimento mais rápida para as bactérias no modelo de AC.



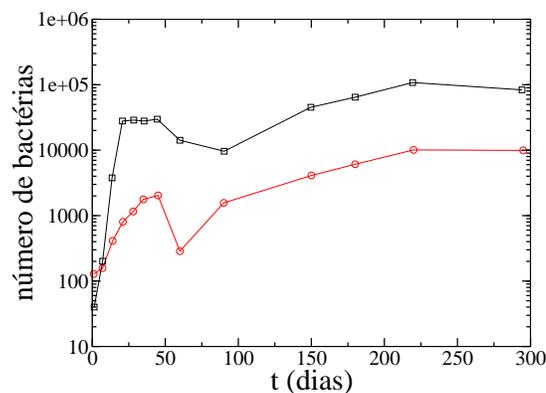
**Figura 4.26** Número de bactérias em função do tempo após a infecção. (a) Resultados experimentais obtido por Gonzalez-Juarrero e colaboradores [81]: para cada ponto medido foram utilizados 4 camundongos. (b) Resultado do modelo de AC.

Para efeito de comparação com o resultado experimental da evolução temporal do número de bactérias, mostrado na Fig. 4.26(a), reproduzimos com o modelo os experimentos de Gonzalez-Juarrero e colaboradores [81] contando as bactérias da mesma forma como foi feito no experimento com os camundongos [81]. Na determinação do número de bactérias no modelo animal, sacrifica-se 4 camundongos em cada tempo medido. Na contagem das bactérias do modelo de AC agora, a cada tempo medido são usadas 4 simulações diferentes, ou seja, os dados referentes a uma simulação, só são usados na contagem de bactérias relativas a um tempo. Decorridos dos 100 dias após a infecção



**Figura 4.27** Número de bactérias em função do tempo após a infecção. (a) Resultados experimental [81] e (b) resultado do modelo de AC. A linha vermelha indica o ajuste exponencial.

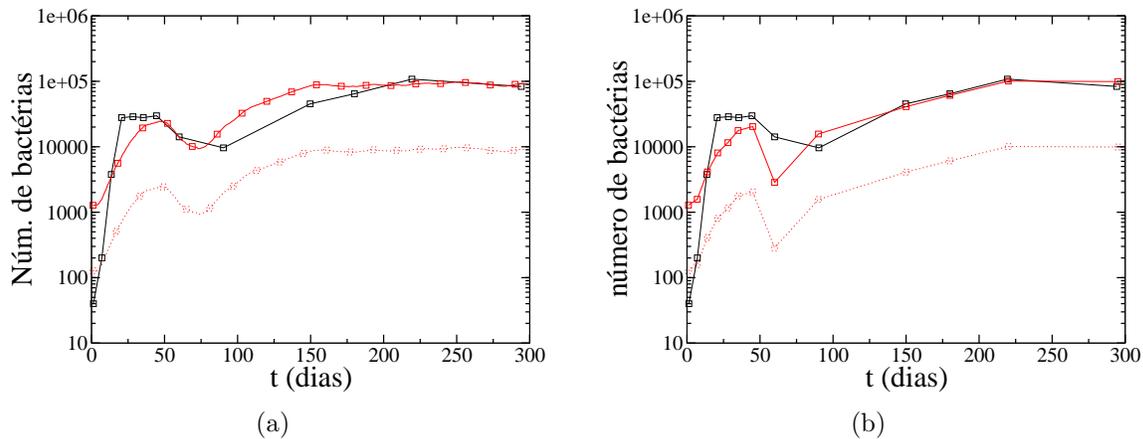
inicial, observamos que o número de bactérias obtido para o modelo (Fig. 4.28), tem um comportamento muito mais parecido com o resultado experimental do ponto de vista quantitativo.



**Figura 4.28** Comparação da evolução temporal do número de bactérias em função do tempo entre o modelo simulado (vermelho) e o experimental [81] (preto). Na contagem das bactérias do modelo de AC foram usadas 4 simulações independentes para cada tempo.

É importante observar que nos resultados experimentais mostrados nas Figuras 4.25(a) e 4.26(a), a ordem de grandeza das contagens experimentais é maior do que a ordem de grandeza encontrada reproduzindo-se os experimentos com o modelo de AC, Figuras 4.25(b) e 4.26(b) respectivamente. Esta diferença pode estar ligada ao fato de que a contagem de células e de bactérias no modelo experimental é feita por pulmão e não por granuloma. Ou seja, enquanto o resultado do modelo apresenta as contagens de apenas 1 granuloma, nas contagens do modelo experimental [81, 84], podem estar participando

células e bactérias de vários granulomas que por ventura existam no pulmão, sendo esta uma possível explicação para o maior número de células encontradas nos resultados dos modelos animais. Multiplicando a contagem do número de bactérias encontradas no modelo de AC por um fator de 10 (Fig. 4.29), imaginando que no pulmão do camundongo existam 10 granulomas, a comparação com o resultado experimental, mostrada na Fig. 4.26, fica ainda mais próximo quantitativamente. Na Fig. 4.29(b), podemos ver que a partir dos 90 dias, a evolução temporal do número de bactérias do nosso modelo, está bem próxima do resultado experimental.



**Figura 4.29** Comparação da evolução temporal do número de bactérias em função do tempo para os dados experimentais [81] (linha preta cheia), para os resultados da simulação (linha vermelha tracejada) e para estes mesmos resultados multiplicados por um fator de 10 (linha vermelha cheia). (a) Resultados do modelo usando 44 simulações e (b) 4 simulações independentes.

## Sobre a importância de alguns parâmetros na dinâmica do modelo de Autômatos Celulares

### TNF- $\alpha$

Vários trabalhos encontrados na literatura, mostram a importância da citocina TNF- $\alpha$  na formação e manutenção do granuloma de tuberculose [47, 48, 85–88]. Nos modelos animais, a neutralização do TNF- $\alpha$ , seja pelo uso de animais geneticamente modificados ou pelo uso de anticorpos anti-TNF- $\alpha$ , leva a formação de granulomas desorganizados, que não são capazes de conter a disseminação do Mtb. Para entender a importância desta citocina no modelo, e verificar a reprodutibilidade de alguns resultados encontrados na literatura, realizamos algumas simulações onde o TNF- $\alpha$  não estimula a produção de

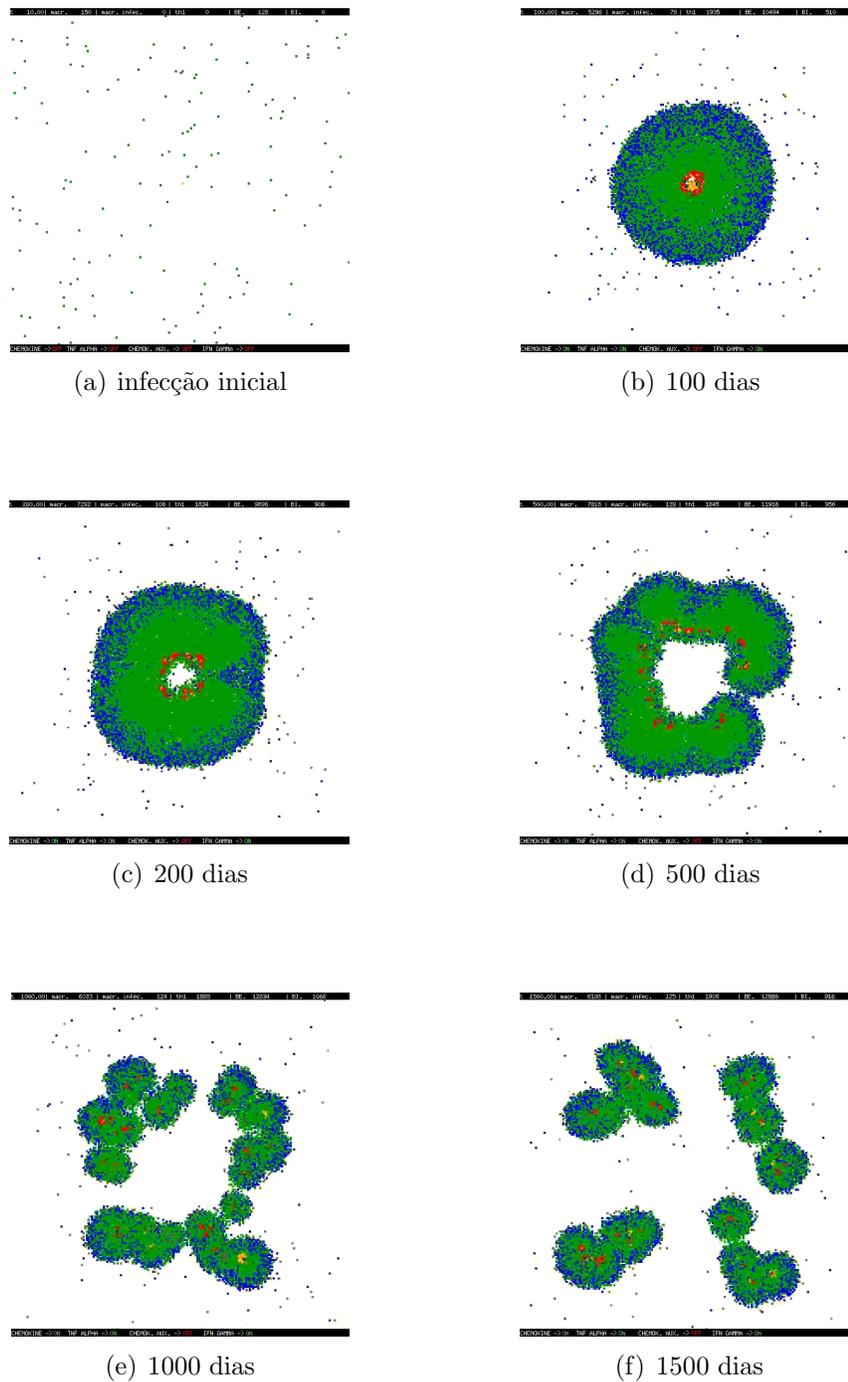
quimiocinas nos macrófagos que não estão infectados com bactérias, estimulando apenas os macrófagos infectados. Ou seja, o limiar de produção de  $\text{TNF-}\alpha$  que nas simulações anteriores era  $\theta_{\text{TNF-}\alpha}=0,5$  (Tabela 4.1), passa a assumir agora  $\theta_{\text{TNF-}\alpha}\gg 0$ . Os macrófagos infectados são agora os únicos produtores de quimiocinas. Na evolução temporal da simulação nós observamos que o granuloma inicial não consegue se manter estável e o mesmo se desfaz em formando várias unidades, como mostra a Fig. 4.30. O vídeo para esta simulação onde o  $\text{TNF-}\alpha$  foi neutralizado, pode ser encontrado no arquivo “tnf.avi” no CD-ROM anexo. Os parâmetros utilizados nesta simulação são os mesmos adotados para obter a Fig. 4.15.

Na Fig. 4.30 observamos que aos 100 dias de evolução (Fig. 4.30(b)) o granuloma formado é aparentemente igual ao granuloma observado para a simulação da dinâmica de contenção (Fig. 4.15(b)). No entanto a distribuição espacial das concentrações de quimiocinas expressas (Fig. 4.31(a)) estão localizadas apenas no centro do granuloma, região de atuação menor quando comparada com a região de atuação das quimiocinas na simulação de contenção no mesmo período (Fig. 4.17(b)). Neste caso as escalas são as mesmas para as Fig. 4.17 e 4.31. As maiores concentrações de quimiocinas estão em torno dos macrófagos infectados, que são as únicas fontes de quimiocinas.

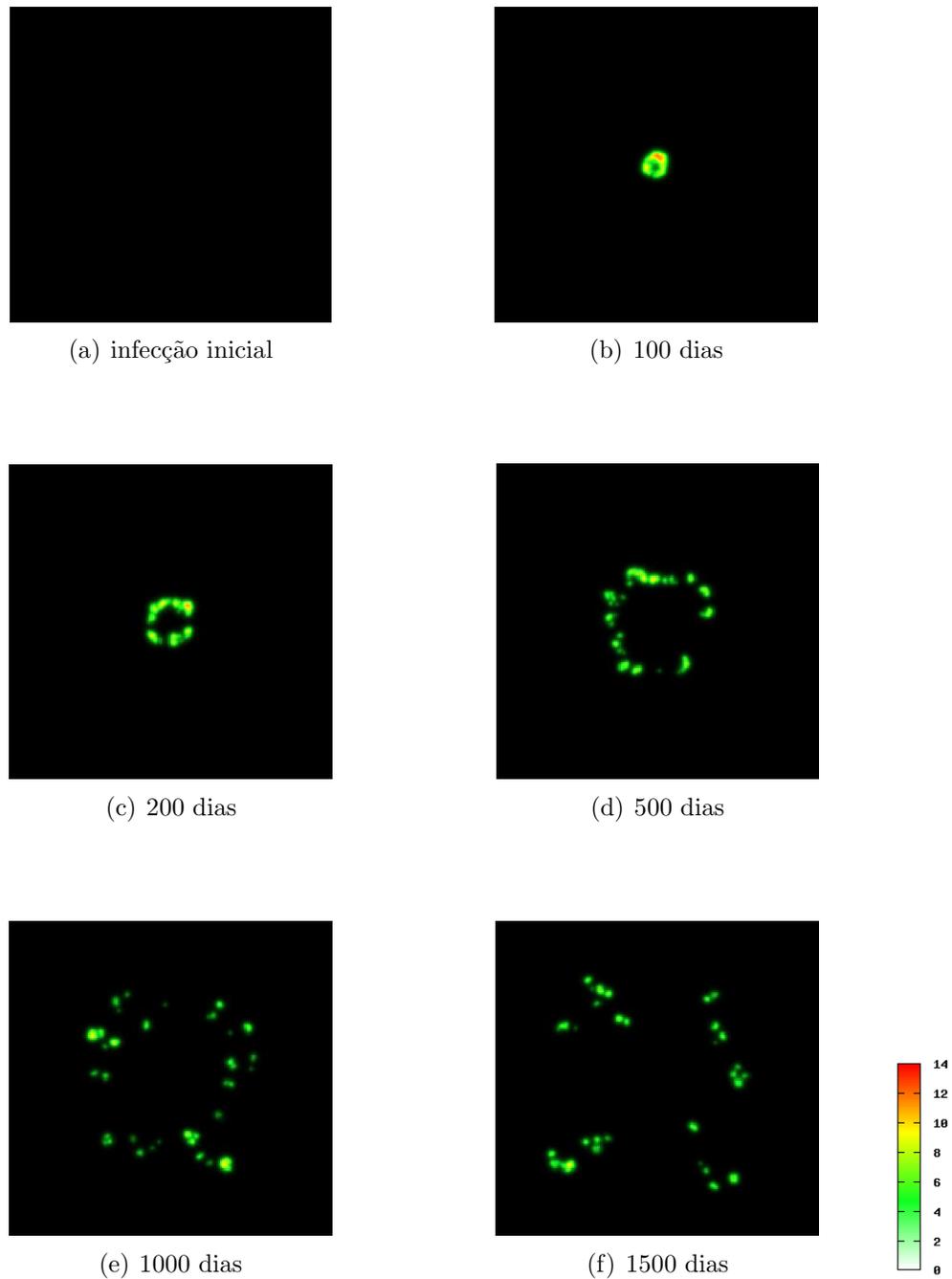
Com o passar do tempo observamos que o granuloma passa a assumir uma forma diferente do granuloma encontrado na contenção. Com 200 dias de evolução temporal, surge uma região com uma baixa densidade de células no centro do granuloma (Fig. 4.30(c)). Esta região de baixa densidade de células aumenta ainda mais aos 500 dias de evolução (Fig. 4.17(d)), levando o granuloma a fragmentação e dando origem a vários granulomas menores, como mostram as Figs. 4.30(e) e 4.30(f), para  $t = 1000$  dias e 1500 dias respectivamente.

A fragmentação do granuloma é conseqüência da ação limitada das quimiocinas no agregado celular (Fig. 4.31), concentradas apenas em torno dos macrófagos infectados. Na simulação de contenção, onde o  $\text{TNF-}\alpha$  não foi neutralizado (Fig. 4.17), existe uma “nuvem” de quimiocinas em torno dos focos de infecção que dão estabilidade ao granuloma, evitando a fragmentação.

Este resultado se contrapõem aos obtidos por Segovia-Juarez e colaboradores [73], discutidos no Capítulo 3, segundo o qual somente as quimiocinas produzidas pelos macrófagos que interagem com as bactérias são suficientes para a formação e manutenção do granuloma inicial. Nossos resultados ao contrário mostram que na presença somente destas citocinas, o granuloma se fragmenta formando várias unidades.

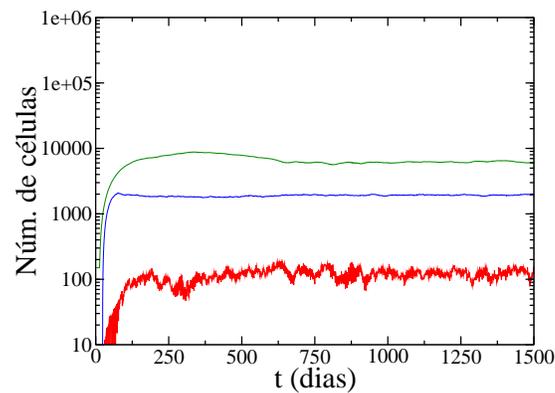


**Figura 4.30** Evolução temporal da infecção causada por *M. tuberculosis*,  $TNF-\alpha$  não está influenciando na expressão de quimiocinas, em função disto, a medida que o tempo passa a aparecem vários granulomas menores. BE (laranja), célula  $T_H1$  (azul), macrófago alveolar (verde), macrófago infectado (vermelho). Os parâmetros adotados são os mesmos utilizados no estudo da contenção (Fig. 4.15).

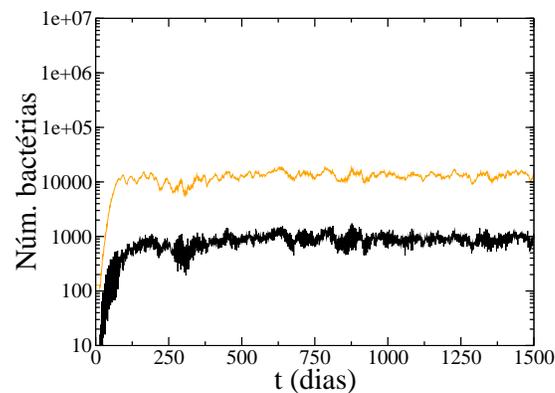


**Figura 4.31** Distribuição espacial da concentração de quimiocinas produzida por macrófagos infectados em resposta a infecção causada por *M. tuberculosis* no modelo onde  $\text{TNF-}\alpha$  não influencia na expressão de quimiocinas. Os parâmetros adotados são os mesmos utilizados no estudo da contenção (Fig. 4.15).

As evoluções temporais do número de macrófagos, macrófagos infectados, células  $T_H1$  e bactérias (Fig. 4.32), correspondentes à simulação do modelo onde o  $TNF-\alpha$  tem ação apenas sobre os macrófagos infectados (Fig. 4.30), apresentam comportamentos semelhantes aos observados na dinâmica de contenção (Fig. 4.19). Os números de macrófagos e de células  $T_H1$  crescem rapidamente até atingirem os valores de saturação de 7600 e 1900 células respectivamente, em torno dos quais passam a flutuar. Os valores de saturação neste caso são maiores do que os alcançados na dinâmica de contenção. As evoluções temporais dos números de macrófagos infectados e de bactérias também flutuam em torno de valores médios maiores do que os alcançados na dinâmica de contenção. A população de macrófagos infectados flutua em torno de 100 células, enquanto que as populações de bactérias extracelulares e de bactérias intracelulares flutuam em torno de 700 e 10900 bactérias respectivamente.



(a)



(b)

**Figura 4.32** Número células em função do tempo: (a) macrófagos (verde), célula  $T_H1$ (azul), macrófagos infectados (vermelho). (b) Número de bactérias intracelulares (preto) e extracelulares (laranja) em função do tempo. Resultados para o modelo onde  $TNF-\alpha$  não influencia na expressão de quimiocinas.

A simulação realizada mostra a importância do TNF- $\alpha$  na formação e manutenção do granuloma, sem esta citocina o granuloma formado inicialmente não consegue se manter estável, levando a bactéria a se espalhar pela rede dentro de vários granulomas. Os experimentos *in silico* neste caso podem vir a contribuir bastante na elaboração de novos experimentos que permitam realizar medidas da expressão de citocinas, já que o modelo permite estimar as distribuições espaciais de concentrações, identificando por exemplo as regiões de alta e baixa expressão. A medida de citocinas realizada experimentalmente é de difícil detecção, principalmente nos estágios iniciais da infecção, onde as quantidades produzidas ainda se encontram em valores baixos [11].

### Tempo de entrada das células $T_H1$

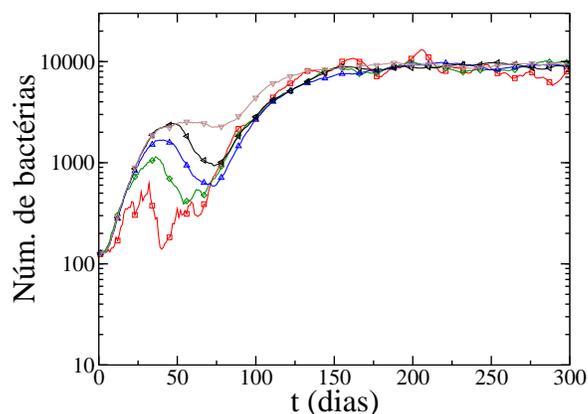
No capítulo 2, vimos que os linfócitos, as principais células da resposta imunológica adaptativa, são extremamente importantes em uma ação mais efetiva do sistema imunológico contra os patógenos. A resposta adaptativa é montada somente depois que o patógeno entra em contato com o hospedeiro, que é simulada no modelo de AC através da ação das células  $T_H1$ . O tempo necessário para a montagem da resposta adaptativa varia dependendo do tipo de patógeno. No caso da tuberculose este tempo é da ordem de 10 dias. No entanto, como esta é apenas uma estimativa, estudamos a influência deste tempo no modelo, variando o intervalo de tempo  $T_{recr}$ , conforme a regra de entrada das células  $T_H1$  na Seção 4.1. Na Tabela 4.3, apresentamos os resultados obtidos utilizando os valores de parâmetros indicados na Tabela 4.1, variando  $T_{recr}$  entre 0 e 14 dias, indicando para cada valor de  $T_{recr}$  a porcentagem de eliminação, contenção e disseminação, obtidos em relação a análise de 50 amostras. Vemos que quanto menor o intervalo entre a infecção inicial e o aparecimento das células  $T_H1$ , maior será a probabilidade das bactérias serem eliminadas da rede.

Para vários valores de  $T_{recr}$  também analisamos a evolução temporal média para o número de bactérias em função do tempo para as simulações onde houve contenção, conforme indicado na Tabela 4.3. Podemos ver na Fig. 4.33, que o intervalo necessário para a entrada das células  $T_H1$  influencia o crescimento do número de bactérias apenas para  $t < 150$  dias, já que para tempos maiores, todas as curvas têm o mesmo comportamento. Os resultados indicam que quanto maior  $T_{recr}$ , menor a influência da ação das células  $T_H1$  sobre as bactérias e portanto maior o crescimento do número de bactérias. Para

$T_{\text{regr}}$ (dias)	eliminação	contenção	disseminação
00	98%	2%	- - -
02	94%	6%	- - -
04	68%	32%	- - -
07	20%	60%	- - -
10	12%	88%	- - -
14	0%	100%	- - -

**Tabela 4.3** Distribuição das simulações de eliminação e contenção de bactérias em função do tempo de entrada das células  $T_{\text{H1}}$  na rede.  $T_{\text{regr}}=0$  indica que as células  $T_{\text{H1}}$  entrarão na rede juntamente com os macrófagos recrutados. Para cada tempo  $T_{\text{regr}}$ , foram usadas 50 simulações. Não houve a disseminação de bactérias pela rede em nenhuma das simulações.

os valores de  $T_{\text{regr}} < 14$  dias, apresentados na Fig. 4.33, observamos um crescimento inicial que leva a um máximo na contagem de bactérias. Após atingir este máximo há um decréscimo na contagem de bactérias até um valor mínimo, após o que o número de bactérias volta a crescer até atingir a saturação ( $\sim 10000$ ). Os tempos nos quais ocorrem o máximo e mínimo, crescem proporcionalmente ao crescimento de  $T_{\text{regr}}$ . Este comportamento muda para  $t = 14$  dias, para o qual o número de bactérias cresce até atingir um patamar ( $\sim 2500$  bactérias) em torno de 30 dias, que perdura por um intervalo de tempo de cerca de 60 dias, quando o número de bactérias volta a crescer até um segundo patamar ( $\sim 10000$  bactérias), ou seja, a influência das células  $T_{\text{H1}}$  no crescimento bacteriano se reduz mais ainda para  $T$  grandes. Em nenhum dos casos simulados para  $T_{\text{regr}}=14$  dias houve eliminação das bactérias.



**Figura 4.33** Evolução temporal média do número de bactérias para vários valores de  $T_{\text{regr}}$ : 2 dias (vermelho), 4 dias (verde), 7 dias (azul), 10 dias (preto) e 14 dias (marrom).

O caso  $T_{\text{recr}}=0$  implica que as células  $T_{\text{H}1}$  surgem no sistema ao mesmo tempo que os primeiros macrófagos são recrutados, ou seja, não haveria retardo na montagem da resposta específica, que surgiria junto com a resposta inata. Para este caso particular, variamos os valores de  $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$ , buscando entender o efeito causado na dinâmica, quando não há retardo na montagem da resposta adaptativa. Como mostrado na Tabela 4.4, em praticamente todas as simulações as bactérias foram eliminadas da rede. Com a entrada rápida das células  $T_{\text{H}1}$  na rede, a eliminação das bactérias ocorreu até mesmo para valores de  $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$  onde em simulações anteriores, usando  $T_{\text{recr}}=10$ , observávamos a disseminação das bactérias pela rede (ver a Tabela 4.2).

$\theta_{\text{IFN-}\gamma}$	eliminação	contenção	disseminação
1, 63	98%	2%	- - -
25	100%	0%	- - -
50	100%	0%	- - -
100	100%	0%	- - -
150	100%	0%	- - -

**Tabela 4.4** Distribuição das simulações de eliminação e de contenção de bactérias em função do limiar de ativação ( $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$ ) para o caso  $T_{\text{recr}}=0$ . Para cada  $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$  foram feitas 50 amostras.

Os resultados apresentados aqui ressaltam a importância de uma rápida resposta adaptativa no combate e eliminação do Mtb, a qual é simulada no modelo pela entrada prematura das células  $T_{\text{H}1}$  na rede. No início da simulação, o número de bactérias ainda é baixo e o tamanho pequeno do granuloma facilita o acesso das células  $T_{\text{H}1}$  aos macrófagos infectados. Sendo assim, quanto mais rápido for a entrada das células  $T_{\text{H}1}$  na rede, maior será a probabilidade de eliminação da infecção.

### Tempo $T_{\text{rep}}$ de replicação da bactéria intracelular

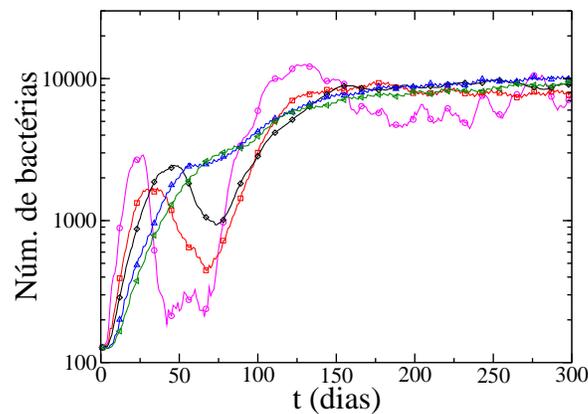
Biologicamente o tempo de replicação das bactérias intracelulares é estimado em 12 horas [37]. No entanto, variamos o tempo de replicação  $T_{\text{rep}}$  das bactérias intracelulares para entendermos sua influência no comportamento dinâmico do modelo, para isto utilizamos os valores de parâmetros indicados na Tabela 4.1. Os resultados são apresentados na Tabela 4.5, podem observar que a probabilidade de eliminação das bactérias da rede é inversamente proporcional ao seu tempo replicação. Quanto menor for  $T_{\text{rep}}$  maior é a

probabilidade das bactérias serem eliminadas.

$T_{\text{rep}}$ (horas)	eliminação	contenção	disseminação
01	100%	0%	- - -
03	100%	0%	- - -
06	96%	4%	- - -
09	36%	64%	- - -
12	12%	88%	- - -
18	0%	100%	- - -
20	0%	100%	- - -

**Tabela 4.5** Distribuição das simulações de eliminação e de contenção de bactérias em função do tempo de replicação  $T_{\text{rep}}$  das bactérias intracelulares. Para cada  $T_{\text{rep}}$  foram usadas 50 amostras.

Pela análise da evolução temporal do número de bactérias podemos observar que no início das simulações, quanto menor é o valor de  $T_{\text{rep}}$ , maior é o crescimento bacteriano (Fig. 4.34). Contudo, maior será também a quantidade de bactérias eliminadas da rede, visto pelo decaimento no número de bactérias em torno de  $\sim 2$  meses após a infecção inicial. Para  $T_{\text{rep}} > 18$  horas, onde a taxa de replicação das bactérias são mais lentas, a evolução do número de bactérias tem um crescimento contínuo e em nenhuma das amostras as bactérias são extintas da rede (Tabela 4.5). Para  $t > 150$ , o crescimento do número de bactérias mostra ser independente do tempo de replicação das bactérias.



**Figura 4.34** Evolução temporal média do número de bactérias para vários valores de  $T_{\text{rep}}$ : 6 horas (rosa), 9 horas (vermelho), 12 horas (preto), 18 horas (azul) e 20 horas (verde). Os parâmetros utilizados foram os utilizados na Tabela 4.1.

A rápida replicação das bactérias leva também a uma morte rápida dos macrófagos infectados por apoptose, conforme descrito na regra de interação do macrófago com a bactéria (Seção 4.1). Fora do macrófago, as bactérias estarão sujeitas novamente ao ataque e a eliminação por outros macrófagos da rede, cujos mecanismos de degradação não estão inibidos pelas bactérias e que podem também estar ativados pela célula  $T_H1$ . Por outro lado uma replicação lenta das bactérias, fará com que a mesma permaneça por mais tempo dentro do macrófago infectado, que enquanto não for ativado é um ótimo habitat. Este pode ser o mecanismo responsável pela maior probabilidade de eliminação da bactéria, quando esta tem um tempo menor de replicação (Tabela 4.5).

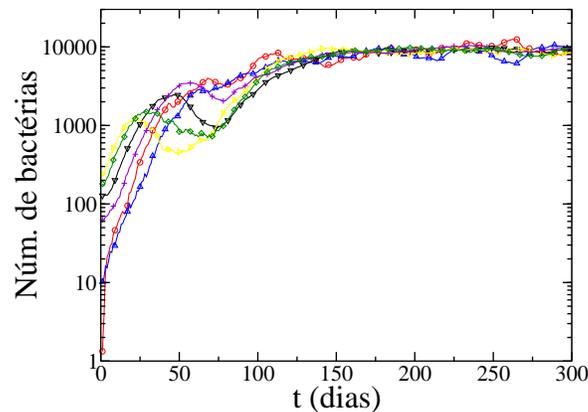
### Número inicial de bactérias na rede

O número de bactérias usado na infecção inicial é de fundamental importância no desenvolvimento da tuberculose no modelos animais, como por exemplo, nos camundongos [82]. Quanto maior é a quantidade de Mtb utilizadas para provocar a infecção inicial, maiores serão as injúrias causadas pela doença ao animal. Sendo assim analisamos o comportamento do modelo de AC em função da variação do número de bactérias extracelulares  $BE_{ini}$  colocadas no centro da rede como condição inicial. Para isto adotamos os parâmetros da Tabela 4.1, que para  $BE_{ini}=128$ , vimos que as dinâmicas observadas eram de eliminação e contenção (Tabela 4.2). Podemos observar dos resultados obtidos, Tabela 4.6, que para um número de bactérias iniciais pequeno, a probabilidade de eliminação das bactérias é maior, mas não impede que em alguns casos haja a formação de granulomas com contenção de bactérias. Aumentando-se o número de  $BE_{ini}$ , a probabilidade de contenção cresce atingindo 100% para  $BE_{ini}=64$  e a partir daí decresce até 50% para  $BE_{ini}=256$ .

$BE_{ini}$	eliminação	contenção	disseminação
1	85%	15%	---
3	70%	30%	---
5	60%	40%	---
10	30%	70%	---
64	0%	100%	---
128	12%	88%	---
192	35%	65%	---
256	50%	50%	---

**Tabela 4.6** Distribuição das simulações onde houve a eliminação e a contenção de bactérias em função do número  $BE_{ini}$  de bactérias iniciais. Para cada  $BE_{ini}$  foram usadas 20 simulações.

Como mostra a Fig. 4.35, o crescimento inicial do número de bactérias é mais rápido para as simulações onde o número  $BE_{ini}$  é maior. Enquanto o comportamento nos primeiros 150 dias depende de  $BE_{ini}$  esta dependência desaparece para tempos maiores.



**Figura 4.35** Evolução temporal média para o número de bactérias para vários valores de  $BE_{ini}$ : 1 bactéria (vermelho), 10 bactéria (azul), 64 bactérias (violeta), 128 bactérias (preto), 192 bactérias (verde) e 256 bactérias (amarelo).

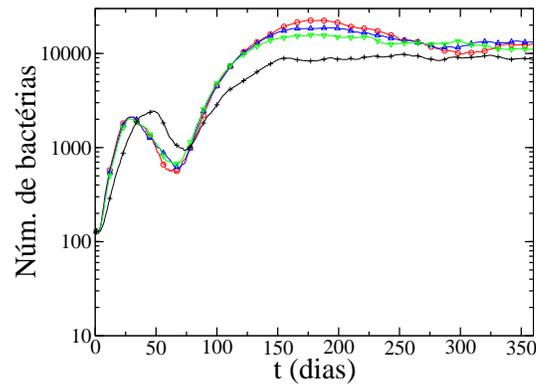
### Probabilidade de eliminação da bactéria pelo macrófago

No Capítulo 2, vimos que o bacilo de Koch pode escapar dos mecanismos de degradação do macrófago e sobreviver dentro dele gerando a infecção. No modelo que introduzimos neste trabalho, a sobrevivência ou não da micobactéria é simulada pela probabilidade  $p_{morte}$  que o macrófago tem de eliminar a bactéria. Nos estudos realizados adotamos  $p_{morte}=90\%$ , ou seja, 10% de probabilidade da bactéria sobreviver e desenvolver a infecção, já que não há dados disponíveis sobre esta probabilidade na literatura. O valor por nós escolhido foi arbitrário, mas inspirado no dado de que das pessoas contaminadas, só 10% desenvolvem a doença. Sendo assim, tornou-se inspirativo analisar os efeitos da variação deste parâmetro a dinâmica do modelo de AC. Este estudo, apresentado na Tabela 4.7, revelou que ao contrário do que se imaginava, quanto mais alto é  $p_{morte}$ , mais difícil é a eliminação das bactérias da rede.

$p_{morte}$	eliminação	contenção	disseminação
0,20	38%	62%	- - -
0,50	20%	80%	- - -
0,70	14%	86%	- - -
0,90	12%	88%	- - -

**Tabela 4.7** Distribuição das simulações de eliminação e de contenção de bactérias em função da probabilidade  $p_{morte}$ . Para cada valor de  $p_{morte}$  utilizado foram usadas 50 simulações com os parâmetros indicados na Tabela 4.1.

Já a evolução temporal do número de bactérias é pouco influenciada pela probabilidade  $p_{morte}$ , já que todas as curvas correspondentes a diferentes  $p_{morte}$ , apresentam o mesmo comportamento, como mostra a Fig. 4.36.



**Figura 4.36** Evolução temporal média para o número de bactérias para vários valores de  $p_{morte}$ : 0,2 (vermelho), 0,5 (azul), 0,7 (verde), 0,9 (preto). Nas simulações foram utilizados os parâmetros da Tabela 4.1

# AS REDES DE OLINDA

## 5.1 INTRODUÇÃO

Na natureza e na sociedade vários sistemas podem ser vistos como redes de múltiplas conexões, conhecidas como **redes complexas** [89]. Os elementos destas redes estabelecem conexões entre si, sendo estas determinadas a partir das características de cada sistema. A Internet, por exemplo, pode ser vista como uma rede complexa, onde os milhões de computadores (nós da rede) estão conectados entre si por meio de cabos (conexões). O fenômeno biológico de dobramento de proteínas também pode ser descrito como uma rede complexa onde os nós representam as possíveis conformações. Nesta rede, uma ligação é feita entre as conformações que podem ser obtidas uma a partir da outra, sendo necessário para isto uma única transformação. Na sociedade, as relações de amizades podem ser descritas como uma rede complexa onde as pessoas, nós da rede, possuem uma conexão entre si se elas se conhecem. Outro exemplo de rede complexa, é a rede formada por atores (nós) de filmes, onde as conexões são feitas entre aqueles que atuaram no mesmo filme. Uma revisão sobre as redes aqui descritas e sobre outras redes complexas pode ser encontrada no trabalho de Réka Albert e Albert-Lászlo Barabási [90].

O estudo das redes complexas, ganhou um avanço considerável nas últimas décadas com a descoberta de que estas possuem propriedades diferentes das redes aleatórias [91] e podem contribuir para o melhor entendimento de vários fenômenos encontrados na natureza. As redes complexas como iremos ver, são estudadas utilizando-se o formalismo da teoria de grafo e apresentam características topológicas não triviais, tal como estruturas hierárquicas [92]. A maioria das redes tecnológicas, sociais e biológicas, podem ser agrupadas de acordo com as suas propriedades topológicas, sendo classificadas por exemplo, como redes de mundo pequeno [93] e redes livres de escala [90]. Na Seção 5.2 apresentamos um pouco mais detalhadamente cada uma destas redes complexas.

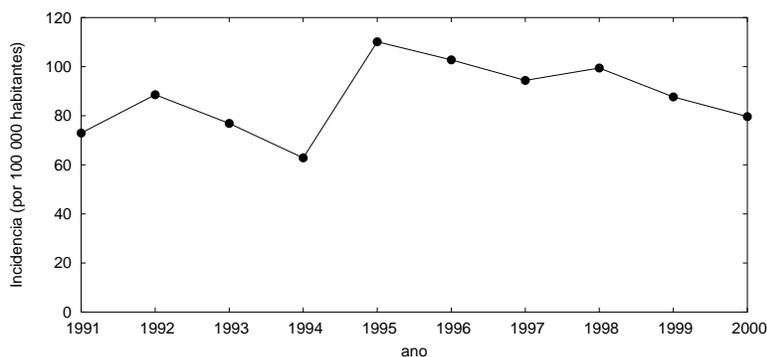
Neste capítulo, estudaremos redes cujas estruturas são baseadas na distribuição da população da cidade de Olinda<sup>1</sup> e que sustentam um processo endêmico de tuberculose

---

<sup>1</sup>Cidade localizada no Nordeste do Brasil com cerca de 380.000 habitantes [13]

naquela comunidade [12]. Na análise destas redes epidemiológicas, buscamos identificar as suas características topológicas e entender as suas relações com o processo epidemiológico de tuberculose. Neste estudo usamos uma abordagem distinta da encontrada na literatura, onde os processos epidemiológicos são estudados a partir de modelos matemáticos, usando as diferentes topologias encontradas em redes complexas [94], tais como as redes mundo pequeno e livres de escala. Comparando os resultados obtidos da análise das propriedades das redes de Olinda, com os resultados característicos de outras redes complexas verificamos por exemplo, que as redes que caracteriza o processo endêmico da tuberculose em Olinda, possuem propriedades topológicas do tipo mundo pequeno, propriedade que quando combinadas com a distribuição de casos (pesos) tem características de redes livre de escala.

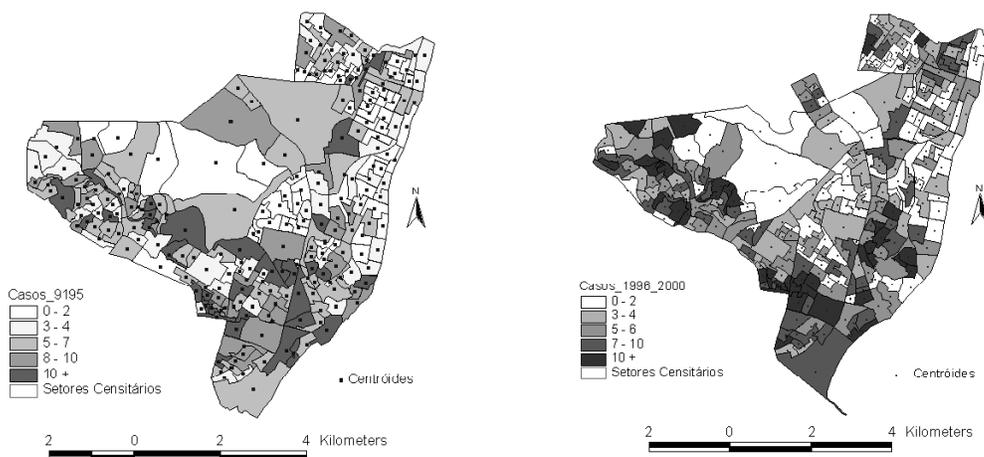
Os dados que são utilizados neste trabalho, foram obtidos por Amador e colaboradores [12], que recentemente estudaram a dinâmica do processo endêmico de tuberculose em Olinda. No período de 1991 a 2000 (Fig. 5.1), período estudado por Amador, as taxas de incidência de tuberculose são maiores do que a média nacional no período, de 50 casos de tuberculose para cada 100 mil habitantes [95].



**Figura 5.1** Taxa de incidência de tuberculose na cidade de Olinda no período de 1991 a 2000 [12].

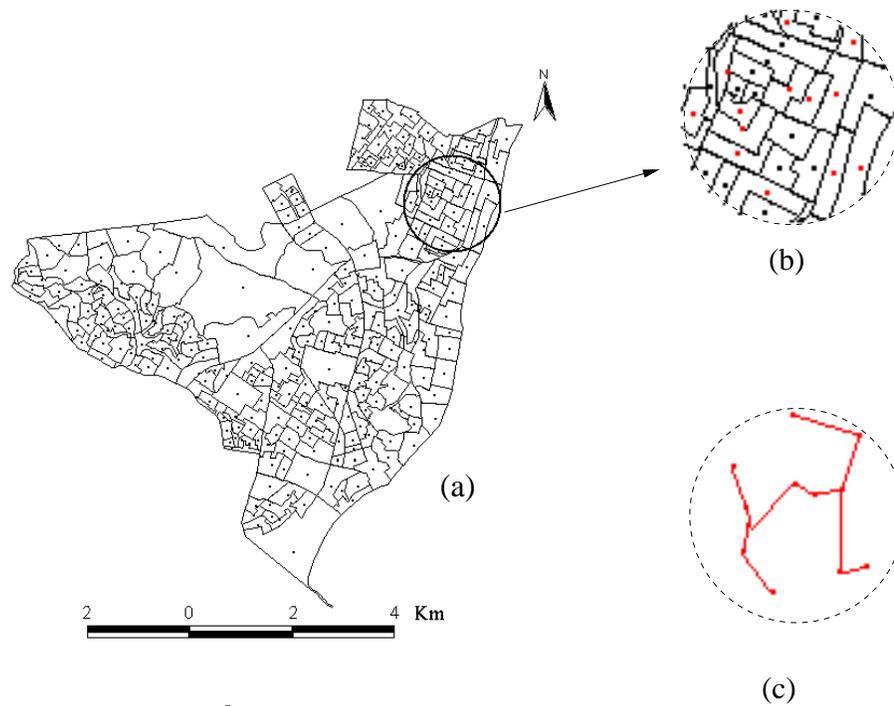
A base de dados estudada por Amador, consiste na distribuição anual de casos de tuberculose geo-referenciados por setor censitário (SC) no período de 1991 a 2000. Os setores censitários correspondem às unidades de coletas do censo demográfico, sendo definidos como um agrupamento contíguo de aproximadamente 300 domicílios, ou de 1200 habitantes [13]. Os setores censitários são redefinidos em média a cada 10 anos devido a mudanças ocorridas nas habitações e no aumento da população da cidade. O número de casos mensais e as distribuições anuais de casos de TB, entre 1991 e 2000 foram agrupados

em dois períodos de 5 anos, por terem sido geo-referenciados em relação a divisões de SC correspondentes a censos diferentes: o período 1991-1995 (91-95) foi geo-referenciado em relação a 243 SC, relativos a divisão do censo de 1990; e o período 1996-2000 (96-00) foi geo-referenciado em relação a 299 SC, relativos à divisão do censo 2000 (Fig. 5.2).

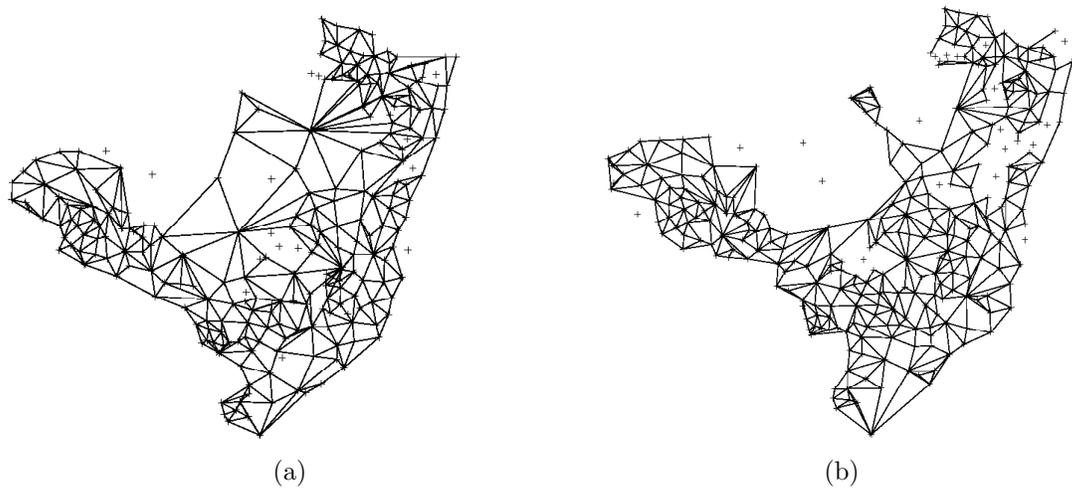


**Figura 5.2** Distribuição espacial do número de casos de tuberculose acumulados por setor censitário em Olinda para os períodos 1991 a 1995 (mapa à esquerda) e 1996 a 2000 (mapa à direita).

Em uma das análises feitas, observando-se a correlação espaço-temporal dos casos de tuberculose em cada período de 5 anos (91-95 e 96-00), Amador et al obtiveram os focos (fontes) de infecção da doença, definidos como sendo aqueles setores censitários com pelo menos um caso de tuberculose durante o período de cinco anos, já que casos complicados de TB se resolvem em 5 anos, pela cura ou óbito. O número de focos encontrados nos períodos 91-95 e 96-00 foram 37 e 53 respectivamente. Os autores, definem também a rede SC que sustenta as interações de curto alcance responsáveis pela disseminação da tuberculose e manutenção do processo endêmico ao longo dos anos. Esta rede que chamaremos de rede epidemiológica é definida pela superposição dos caminhos anuais percorridos pelo agente etiológico (Mtb). Como exemplificado na Fig. 5.3, cada caminho deste é obtido conectando-se os centros dos SC (centro geométrico do polígono) que tiveram pelo menos um caso de TB naquele ano e são vizinhos entre si. Na Fig. 5.4, apresentamos as redes epidemiológicas formadas com a superposições anual dos caminhos do agente etiológico no período de 1991 a 1995 e 1996 a 2000, com 226 e 279 nós respectivamente.



**Figura 5.3** (a) Distribuição dos setores censitários em Olinda no período de 1996 a 2000. Os pontos presentes nos setores censitários identificam a posição de cada centróide. (b) Os centróides marcados em vermelho, indicam os setores censitários com pelo menos um caso de tuberculose. (c) Na construção da rede epidemiológica as conexões são feitas entre setores censitários adjacentes com pelo menos um caso de tuberculose.

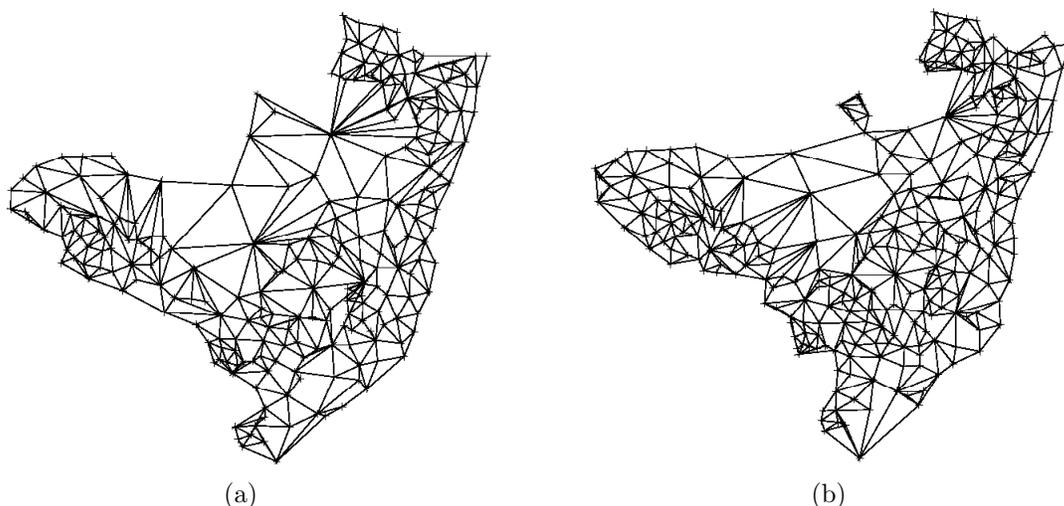


**Figura 5.4** Redes epidemiológicas de Olinda no período de 1991 a 1995 (a) e no período de 1996 a 2000 (b). O símbolo + indica os centróides dos setores censitários que não fazem parte das redes epidemiológicas.

Além das redes epidemiológicas podemos construir as redes censitárias, conectando todos os setores censitários adjacentes, ou seja, setores censitários que possuem pelo menos uma fronteira em comum. Como no caso anterior, a conexão entre dois SC adjacentes é feita unindo-se os seus centros geométricos (centróides), que são os nós da rede (Fig. 5.5). A rede censitária de Olinda do período de 91-95 tem 243 nós e é apresentada na Fig. 5.6(a), enquanto a rede censitária do período 96-00 tem 299 nós, conforme mostra a Fig. 5.6(b). O número de nós da rede epidemiológicas é menor do que o número de nós da rede censitária quando comparados no mesmo período, sendo a diferença em torno de 7%.



**Figura 5.5** À esquerda são mostrados em detalhe, alguns setores censitários de Olinda no período de 1996 a 2000 (Fig. 5.3 (a)). Na construção da rede censitária, à direita, as conexões são feitas entre setores censitários adjacentes.



**Figura 5.6** Redes censitárias em Olinda para os períodos 1991 a 1995 (a) e 1996 a 2000 (b).

Neste trabalho buscamos caracterizar o tipo de comportamento complexo [90] exibido pelas redes censitárias (Fig. 5.6) e pelas redes epidemiológicas (Fig. 5.4) obtidas para Olinda. Numa primeira análise estudamos apenas a estrutura topológica das redes censitárias e epidemiológicas, sem levar em conta as informações sobre o número de casos de tuberculose acumulados por setor censitário no período. Em virtude de uma certa regularidade exibida pelas redes topológicas de Olinda, comparamos os resultados obtidos com as propriedades e características de algumas redes regulares e diagramas de Voronoi com o mesmo número de nós das primeiras.

Num segundo estudo destas redes, associamos aos nós da rede, pesos correspondentes ao número de casos acumulados por período e por SC, dado por  $S^*$ . Como o estudo usual de grafos encontrados na literatura só levam em conta pesos nas conexões e não pesos nos nós, aplicamos a metodologia de engenharia reversa para efetuar tal estudo. No estudo dos grafos com pesos [96] nas ligações, um dos objetivos é obter a distribuição de pesos dos nós  $P(S)$  e  $S(K)$ . Sendo assim, no nosso caso escolhemos várias definições para os pesos das ligações entre os SC definidos em função dos pesos do nós (número de casos de TB acumulados). Para cada definição de pesos das ligações escolhidas obtivemos  $P(S^*)$  e  $S^*(K)$ . Da análise da similaridade entre os diferentes  $P(S)$  e  $P(S^*)$ ,  $S(K)$  e  $S^*(K)$ , escolhemos as definições de pesos nas ligações que melhor refletem a realidade. Nossos resultados são então analisados e discutidos em função destas escolhas.

Antes de passarmos ao estudo propriamente dito das redes, na próxima seção descreveremos em pouco mais de detalhes, as características das redes aleatórias, de mundo pequeno e livres de escala. As definições das quantidades usadas na caracterização das mesmas, encontra-se no Apêndice F.

## 5.2 REDES COMPLEXAS

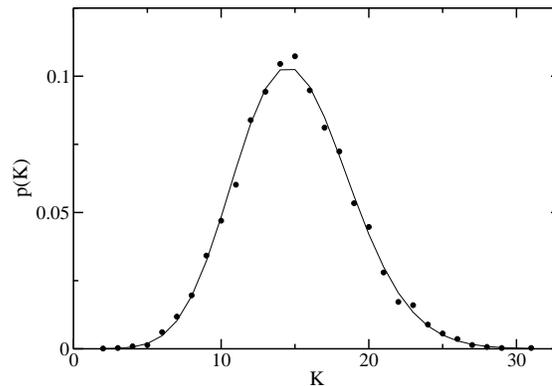
### 5.2.1 Redes aleatórias

A rede aleatória, modelo matemático tradicionalmente usado para estudar as redes complexas, foi introduzido na década de 1950 por Paul Erdős e Alfréd Rényi [91]. Na construção de uma rede aleatória com  $N$  nós, cria-se uma conexão entre cada par de nós com uma probabilidade  $p$ . Desta forma o número de conexões total de uma rede aleatória com  $N$  nós é estimado por  $pN(N-1)/2$ , onde  $N(N-1)/2$  é o número total de conexões possíveis. Uma propriedade topológica característica das redes aleatórias é o histograma

de ocorrências de conectividades  $K$  ou distribuição de conectividades  $K$  (Apêndice F). A distribuição de conectividades  $K$  para a rede aleatória, como mostra a Fig. 5.7, segue uma lei de Poisson:

$$P(K) = e^{-\langle K \rangle} \times \frac{\langle K \rangle^K}{K!} \quad (5.1)$$

onde  $\langle K \rangle$  é a conectividade média da rede. Como as conexões entre os nós nas redes aleatórias são sorteadas ao acaso, é de se esperar que a distribuição de conectividades  $K$  seja finita, com a maioria dos nós distribuídos em torno da conectividade média  $\langle K \rangle$  da rede. Uma vez que as conexões são criadas aleatoriamente, o coeficiente de *clustering* que mede a coesão média da vizinhança dos sítios da rede (Apêndice F), é pequeno para as redes aleatórias, ou seja, se um nó  $A$  está conectado aos nós  $B$  e  $D$ , a probabilidade de que  $B$  e  $D$  estejam conectados entre si é pequena. No caso da rede aleatória, mostra-se que o coeficiente de *clustering* é igual a probabilidade de dois nós na rede estarem conectados, ou seja,  $C_{rand} = p$  [90] e que a distância entre quaisquer dois nós é pequena, onde  $L_{rand}$  é o comprimento de caminho médio (Apêndice F), definido por  $L_{rand} \sim \ln(N)/\ln(\langle K \rangle)$  [90].



**Figura 5.7** Distribuição de conectividades  $K$  para uma rede aleatória com  $N = 243$  e  $\langle K \rangle = 5$ , formada a partir do modelo de Erdős-Rényi [91]. A distribuição de conectividades é uma distribuição de Poisson.

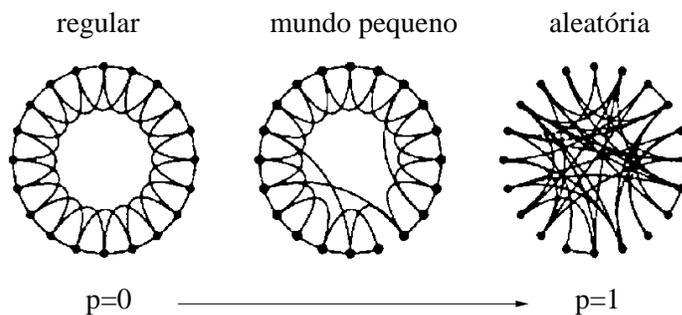
### 5.2.2 Redes de Mundo Pequeno

As redes mundo pequeno [97–100] apresentam duas propriedades principais: (i) O tamanho do comprimento do caminho entre dois sítios,  $L$ , é pequeno quando comparado com número  $N$  de nós da rede. Nesta rede existem alguns nós que funcionam como atalhos

(“hubs”) e diminuem o caminho entre dois nós quaisquer da rede, daí o nome mundo pequeno (“small world”). Geralmente para estas redes  $L$  cresce logaritmicamente com  $N$ , ou seja, cresce da mesma forma que o comprimento de caminho médio para uma rede aleatória com a mesma conectividade média  $\langle K \rangle$ . (ii) A vizinhança de cada nó na rede mundo pequeno é tipicamente local, como em uma rede regular [101].

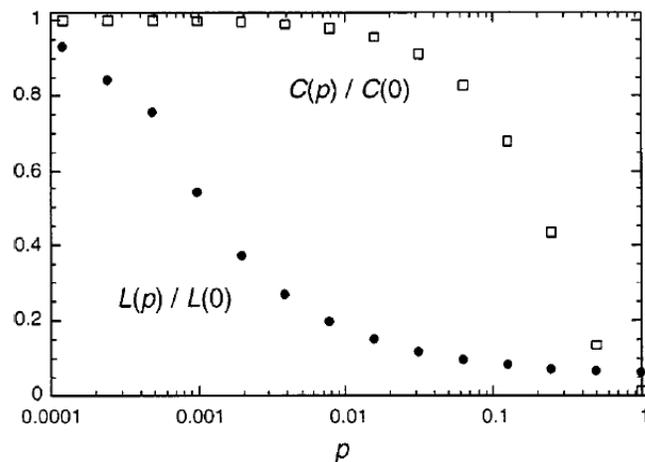
Um exemplo de rede mundo pequeno é a rede de palavras sinônimas [90], baseada no dicionário Merriam-Webster, onde duas palavras (nós) estão conectadas se elas são sinônimas. O comprimento do caminho médio desta rede mede,  $L = 4,5$ , é bem menor do que o número  $N = 22311$  de nós. O coeficiente de *clustering* para esta rede é  $C = 0,7$ , valor alto, quando comparado com o coeficiente de *clustering*  $C_{rand} = 0,0006$  para uma rede aleatória equivalente. O coeficiente de *clustering* para a rede de palavras sinônimas mostra uma vizinhança tipicamente local, pois os vizinhos de um determinado nó, tem probabilidade 0,7 de serem vizinhos entre si. Um outro exemplo de rede mundo pequeno é a rede de atores de filmes [93], baseada em um banco de dados na Internet. Nesta rede, cada ator (nó) está ligado a outro se eles atuaram em um mesmo filme. O comprimento do caminho médio desta rede é  $L = 3,65$ , também é muito menor do que o número  $N = 225226$  de nós.

Um dos primeiros modelos matemáticos para simular as redes mundo pequeno, foi introduzido por Watts-Strogatz [93]. O modelo considera um anel com  $N$  nós, onde cada nó está conectado com os seus  $r$  primeiros vizinhos. A partir destas redes regulares, as conexões são redirecionadas com probabilidade  $p \in [0, 1]$ , excluindo-se os casos de auto conexão e a possibilidade de conexões dupla, como mostra a Fig. 5.8. No limite em que  $p = 0$ , temos um anel regular, e no limite em que  $p = 1$ , temos uma rede aleatória como mostra a Fig. 5.8.



**Figura 5.8** Efeito da probabilidade  $p$  de redirecionamento das conexões entre os nós da rede para o modelo de Watts-Strogatz. O anel circular no exemplo tem  $N = 20$  nós e  $r = 2$  [97].

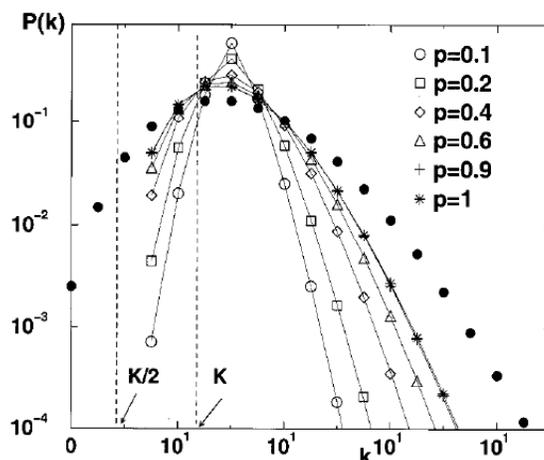
O comportamento do coeficiente de *clustering*  $C$  e do comprimento do caminho médio  $L$  em função da probabilidade de redirecionamento  $p$  para o modelo de Watts-Strogatz são apresentados na Fig. 5.9. Podemos observar a mudança de uma rede regular ( $p = 0$ ) para uma rede aleatória ( $p = 1$ ), passando por uma rede do tipo mundo pequeno ( $p \sim 0$ ). As regiões onde as redes se comportam como mundo pequeno, são caracterizada por valores altos do coeficiente de *clustering*  $C$  e valores pequenos de  $L$ , ou seja, nestas regiões, as redes ainda preservam a vizinhança local do anel regular, mas alguns nós passam a funcionar como atalhos.



**Figura 5.9** Coeficiente de *clustering*  $C$  (□) e comprimento do caminho médio  $L$  (●) em função da probabilidade  $p$  de redirecionamento para o modelo Watts-Strogatz [90].

A distribuição de conectividades  $K$  para o modelo de rede mundo pequeno de Watts-Strogatz com  $N$  nós é muito parecida com a distribuição de conectividades para uma rede aleatória com o mesmo número de nós e conectividade média  $\langle K \rangle$ . A distribuição de conectividades é uma distribuição de Poisson com um pico, como mostra a Fig. 5.10.

Grande parte das redes mundo pequeno encontradas na natureza, apresentam distribuições de conectividade finitas, como as encontradas no modelo de Watts-Strogatz ou do tipo de redes aleatórias. Por exemplo, a rede de dobramento de proteínas possui uma distribuição de conectividades  $K$  que segue uma lei do tipo gaussiana [101]. No entanto, como veremos a seguir, existem redes tipo mundo pequeno, que exibem distribuições de conectividades diferentes das apresentadas até agora, e estas são as chamadas redes livres de escala [101].



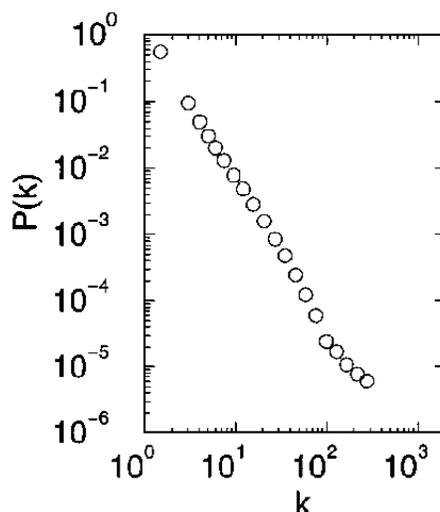
**Figura 5.10** Distribuições de conectividades  $K$  para uma rede mundo pequeno, modelo de Watts-Strogatz, com  $r = 3$  e  $N = 1000$ , para vários valores de probabilidade de redirecionamento  $p$ . As distribuições de conectividade tem a forma de uma distribuição de Poisson com pico. Para comparação, a distribuição de conectividades para uma rede aleatória equivalente é mostrada em pontos cheios ( $\bullet$ ) [90].

### 5.2.3 Redes Livres de Escala

Várias redes complexas, como a da Internet, a rede de atores e a rede de palavras sinônimas [90], mostram um comportamento livre de escala na distribuição de conectividades  $K$ , ou seja exibem um comportamento de lei de potência, [90, 102], como a apresentada na Fig. 5.11 e por isto são chamadas redes livres de escala. Este tipo de distribuição mostra que a maioria dos nós na rede tem poucas conexões e que poucos nós tem muitas conexões (“hubs”) e no caso os nós mais importantes são os nós que possuem as maiores conectividades  $K$ . Por exemplo na rede formada pela Internet, os nós que representam os computadores servidores, são em geral os que possuem maior conectividade e portanto são os mais importantes.

A estabilidade das redes livres de escala à retirada de nós de maneira aleatória [90] é bem robusta. Como o número de nós com muitas conexões na rede (mais importantes) é pequeno, a probabilidade de serem escolhidos aleatoriamente para a retirada da rede também é pequena. Por exemplo, na Internet a quebra aleatória de um computador, ou o ataque de algum computador por vírus, dificilmente leva a instabilidade na rede, pois em geral afetam os computadores menos conectados na rede. A instabilidade surge quando um servidor for desconectado da rede.

As distribuições de conectividades  $K$  das redes livres de escala (Fig. 5.11) são bem



**Figura 5.11** Distribuição de conectividades  $K$  para a rede Internet [90], a distribuição segue uma lei de potência.

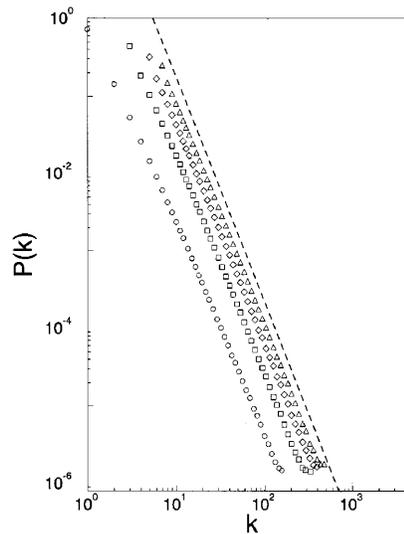
diferentes das obtidas para redes aleatórias e de mundo pequeno (Fig. 5.7), já que as primeiras são descritas por uma lei de potência e as outras são descritas por distribuições finitas. No entanto, tal como nas redes de mundo pequeno, o coeficiente de *clustering*  $C$  nas redes livres de escala é bem mais alto que o coeficiente de *clustering*  $C_{rand}$  da rede aleatória equivalente (mesmo  $N$  e conectividade média  $\langle K \rangle$ ). No caso da rede formada pela internet por exemplo,  $C$  é em torno de  $\sim 180 \times C_{rand}$  [90]. Já o tamanho do comprimento do caminho médio  $L$  para as redes livres de escala é pequeno comparado com o número de nós  $N$ , ou seja, as redes livres de escala também tem comportamento mundo pequeno [90]. Nas redes livres de escala, são os nós mais conectados que servem como atalhos para encurtar as distâncias entres quaisquer outros dois nós da rede.

A partir de um modelo matemático simples, Barabási-Albert [90], conseguiram reproduzir as propriedades básicas encontradas nas redes livres de escala. A distribuição de conectividades  $K$  em lei de potência no modelo matemático é gerada por dois ingredientes básicos, crescimento da rede e ligação preferencial dos novos nós com os nós mais conectados já existentes. Tal como um sistema em crescimento, os novos elementos (nós) da rede preferem se ligar aos elementos mais bem sucedidos no sistema, ou seja aos elementos mais conectados. No modelo de Barabási-Albert, a rede inicial possui um número pequeno  $m_0$  de nós e a cada passo de tempo adiciona-se um novo nó com  $m \leq m_0$  conexões com os nós da rede. A probabilidade  $\prod(K_i)$  de um novo nó adicionado ser conectado a

um determinado nó  $i$  com  $K_i$  conexões é dada por:

$$\Pi(K_i) = \frac{K_i}{\sum_j K_j} \quad (5.2)$$

Após um certo tempo  $t$ , a rede resultante terá  $N = m_0 + t$  nós e  $mt$  conexões. A distribuição de conectividades  $K$  para o modelo Barabási-Albert, apresentado na Fig. 5.12, segue uma lei de potência assim como ocorre para a distribuição de conectividades para as redes livre de escala encontradas na natureza.



**Figura 5.12** Distribuição de conectividades  $K$  para uma rede livre de escala, modelo de Barabási-Albert, com  $N = m_0 + t = 300000$ . Símbolos:  $\circ$ ,  $m_0 = m = 1$ ;  $\square$ ,  $m_0 = m = 3$ ;  $\diamond$ ,  $m_0 = m = 5$ ;  $\triangle$ ,  $m_0 = m = 7$ . A inclinação da reta (linha tracejada) é 2,7 [90].

Devemos ressaltar aqui, que no estudo de propagação de epidemias é cada vez mais freqüente a utilização de redes livres de escala e de mundo pequeno, nos modelos matemáticos utilizados para entender tais problemas, como por exemplo nos modelo SIS (suscetível infectado suscetível) e SIR (suscetível infectado removido) [94,103–107]. Neste modelos, os indivíduos suscetíveis a uma doença são representados por nós em uma rede e as conexões representam os contatos sociais e/ou espacial entre os indivíduos. A vizinhança tipicamente local e o comprimento do caminho médio  $L$  pequeno entre os indivíduos são características importante das redes sociais, tendo uma forte influência nos fenômenos dinâmicos de interação da população. Por exemplo, no trabalho de Shirley e Rushton [94], os autores estudam a disseminação de epidemia utilizando o modelo SIS

em 4 redes: livres de escala, mundo pequeno, aleatórias e regulares. Os resultados mostraram que para as redes livres de escala, a epidemia dissemina-se mais rapidamente e tem um maior tamanho quando comparado com as outras topologias de rede. Neste caso a probabilidade de disseminação da epidemia é bem grande, mesmo se a probabilidade de transmitir a infecção entre indivíduos for baixa, um resultado não reproduzido pelas outras redes.

Como vimos, podemos obter redes complexas seja através da modelagem, ou através da análise de processos naturais que evoluem no tempo, que darão origem as redes as quais nos referimos como redes reais. As redes que vamos analisar são do segundo tipo, e são as primeiras redes estudadas na literatura, que foram obtidas a partir do estudo de um processo de disseminação de doença. No caso, trata-se do processo endêmico observado para a tuberculose. Como nosso objetivo nesta breve revisão sobre redes complexas é apenas fornecer ao leitor os conceitos necessários para o entendimento do estudo que apresentamos a seguir, para aqueles interessandos em mais informações a respeito de redes complexas, sugerimos completar esta leitura com as referências [90,97,101].

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.3.1 Redes Epidemiológicas e Censitárias em Olinda

Iniciamos nosso estudo analisando as redes epidemiológicas e censitárias de Olinda obtidas por Amador e colaboradores (Figuras 5.4 e 5.6). A razão de analisarmos a rede censitária se deve ao fato das redes epidemiológicas diferirem daquelas pela ausência de poucos nós, 17 para o período 91-95 e 20 para o período 96-00. Numa caracterização de complexidade exibida pela topologia das redes, é de se esperar que ambas sejam do mesmo tipo, como mostraremos ao longo do estudo. No entanto o foco do nosso interesse está na caracterização das redes epidemiológicas. Para cada uma das redes correspondentes aos dois períodos, calculamos o comprimento do caminho médio  $L$ , a conectividade média  $\langle K \rangle$  e o coeficiente de *clustering*  $C$ , que são apresentados na Tabela 5.1. Para cada caso estudamos também o coeficiente de *clustering*  $C_{rand}$  e o comprimento do caminho médio  $L_{rand}$  para redes aleatórias equivalentes, ou seja, de redes que possuem o mesmo número  $N$  de nós e mesma conectividade média  $\langle K \rangle$ , das quatro redes analisadas. Mesmo a vizinhança de cada nó sendo local nas redes de Olinda, onde só se permite a conexão entre setores censitários adjacentes, observamos (Tabela 5.1) que o comprimento do ca-

minho médio  $L$  destas redes é pequeno se comparado com os seus respectivos números  $N$  de nós. Comparando o comprimento do caminho médio  $L$  das redes com o das redes aleatórias equivalentes, observamos que as diferenças são pequenas,  $L \sim 2 \times L_{rand}$ . No entanto, os valores encontrados para  $C$ , foram muito maiores do que os encontrados para  $C_{rand}$  ( $C \sim 24C_{rand}$ ), resultados estes que são semelhantes aos obtidos para outras redes reais apresentados na Tabela F.1 do Apêndice F. Em redes que possuem coeficiente de *clustering* grande, se o nó  $A$  é vizinho dos nós  $B$  e  $D$ , existe uma probabilidade alta de que os nós  $B$  e  $D$  sejam vizinhos entre si.

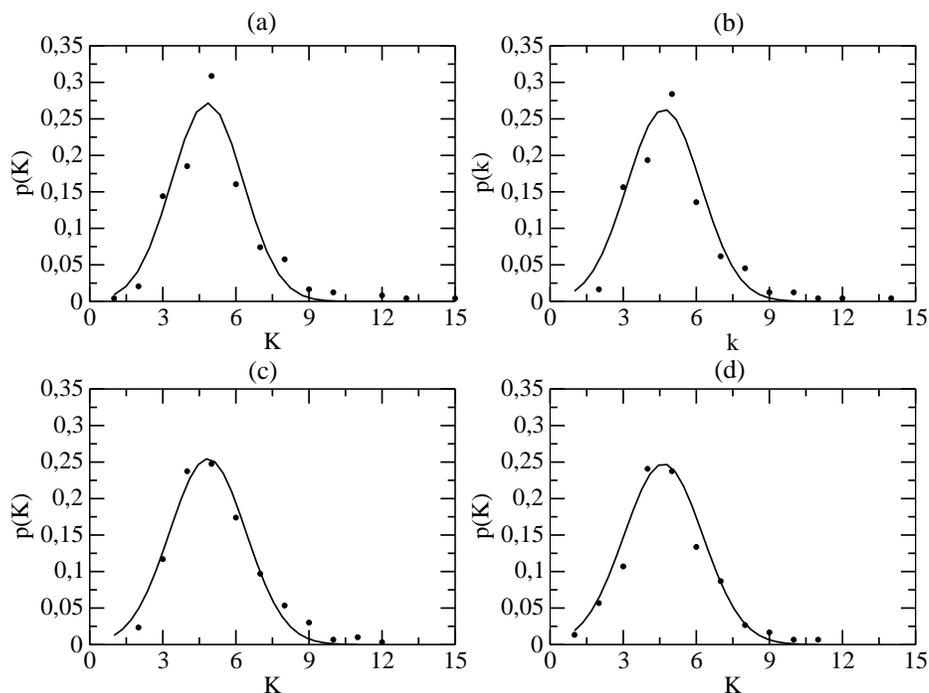
Rede	N	$\langle K \rangle$	$L$	$L_{rand}$	$C$	$C_{rand}$
epidem. 91-95	226	5,04	6,99	3,35	0,45	0,022
SC 91-95	243	5,19	6,71	3,33	0,47	0,021
epidem. 96-00	279	4,84	8,50	3,57	0,48	0,017
SC 96-00	299	5,18	7,59	3,46	0,47	0,017

**Tabela 5.1** Conectividade média  $\langle K \rangle$ , comprimento do caminho médio  $L$  e o coeficiente de *clustering*  $C$  calculados para as redes epidemiológicas (epidem.) e redes censitárias (SC) obtidas em Olinda nos períodos 91-95 e 96-00. Os valores de  $C_{rand}$  e  $L_{rand}$  para as redes aleatórias equivalentes também foram calculados.

As distribuições de conectividades  $K$  para as redes epidemiológicas e censitárias são finitas, e seguem uma lei gaussiana ( $e^{-(K-a)^2}$ ), como mostram a Fig. 5.13 (a-d), ou seja, existe um valor de conectividade  $K$  característico, centrado em torno da conectividade média  $\langle K \rangle$  (Tabela 5.1). A conectividade pequena de alguns nós, observada nas distribuições de conectividades, reflete a existência de fronteiras (Figuras 5.4 e 5.6). Nas Figuras 5.14 (a,b) mostramos a distribuição espacial dos setores censitários com baixa ( $K \leq 4$ ) e alta ( $K \geq 8$ ) conectividade nos períodos de 1991 a 1995 e 1996 a 2000. Observamos que a maioria dos setores censitários na fronteira da rede possui baixa conectividade  $K$ .

Da análise feita para o coeficiente de *clustering*  $C$  em função dos diferentes valores de conectividade dos nós, para as redes epidemiológicas e censitárias nos períodos 1991 a 1995 e 1996 a 2000, observamos um comportamento de lei de potência  $C(K) \sim K^{-1}$ , como mostra a Fig. 5.15. Conforme reportado em outros trabalhos na literatura, este comportamento de lei de potência com o expoente igual a  $-1$  é típico de redes hierárquicas [92]. Em uma rede hierárquica existem grupos de nós que estão bem conectados entre si, mas com poucas conexões para outros nós que não pertencem ao grupo; os nós com maior conectividade (menor coeficiente de *clustering*) servem como “pontes” entre os grupos

de nós com menor conectividade (maior coeficiente de *clustering*). Comportam-se desta maneira, por exemplo, as redes de amizades, onde entre as rodas de amigos (grupos de nós) existem algumas pessoas (“pontes”) que se conhecem. No caso das redes de Olinda, se compararmos os resultados das Figuras 5.14 e 5.15 vemos que este comportamento hierárquico, corresponde à interação entre os setores censitários centrais, com maior conectividade  $K$  e menor  $C$ , com os setores censitários pertencentes a fronteira da rede, com menor conectividades  $K$  e maior coeficiente de *clustering*  $C$ .

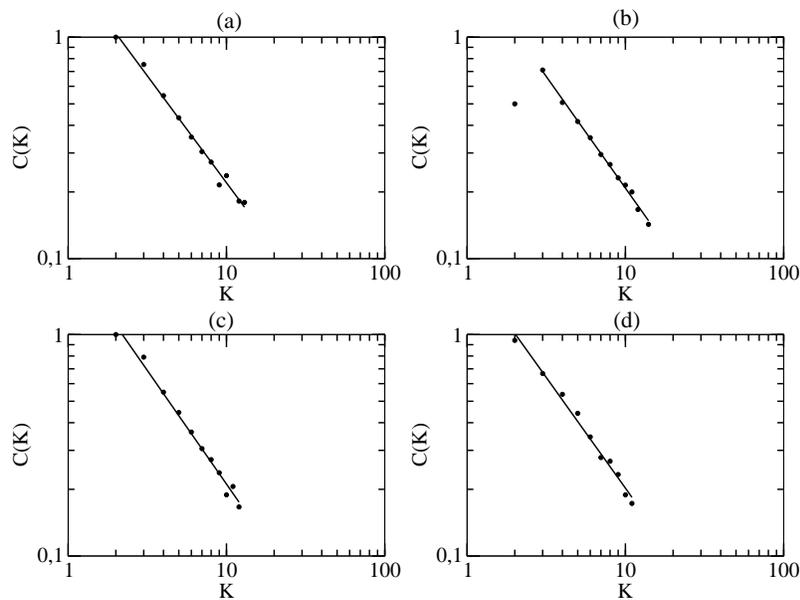


**Figura 5.13** Distribuições de conectividades  $K$  para as redes censitárias e epidemiológicas encontradas em Olinda. (a) rede censitária 91-95 ( $cc=0,97$ ), (b) rede epidemiológica 91-95 ( $cc=0,96$ ), (c) rede censitária 96-00 ( $cc=0,99$ ) e (d) rede epidemiológica 96-00 ( $cc=0,98$ ).  $cc$  = coeficiente de correlação, onde  $cc$  corresponde ao coeficiente de correlação.

Neste trabalho, estudamos também a conectividade dos setores censitários (nós) que são os focos de infecção em Olinda, encontrados por Amador e colaboradores (Seção 5). Como dissemos anteriormente, estes setores “foco” são SC com pelo menos um caso de tuberculose durante o período de cinco anos consecutivos. A maioria dos setores focos tem conectividade em torno da conectividade média das redes  $\langle K \rangle$  (Tabela 5.1), conforme mostra a Fig. 5.16. Este resultado indica não haver uma relação entre os nós focos e os nós “pontes” das redes epidemiológicas de Olinda, uma vez que os últimos possuem conectividade  $K$  acima da conectividade média.

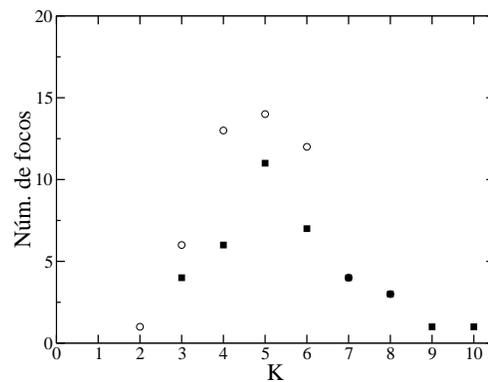


**Figura 5.14** Distribuições dos setores censitários com baixa,  $K \leq 4$  (■), e alta,  $K \geq 8$  (□), conectividade nos períodos de 1991 a 1995 (a) e 1996 a 2000 (b). Os pontos (·) representam os centróides dos outros setores censitários.



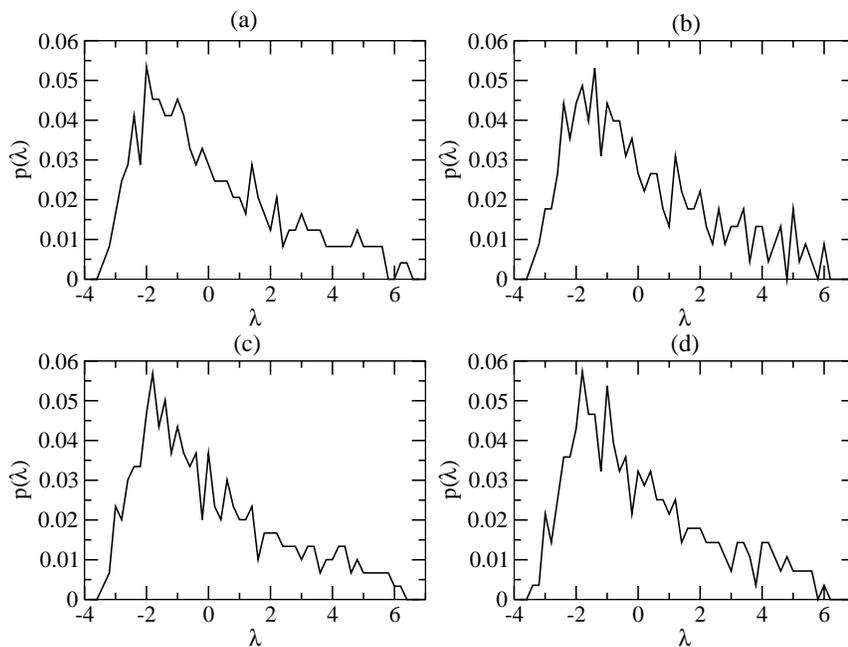
**Figura 5.15** Coeficiente de *clustering*  $C$  em função da conectividade  $K$  para as redes censitárias e epidemiológicas encontradas em Olinda. (a) rede censitária 91-95, (b) rede epidemiológica 91-95, (c) rede censitária 96-00 e (d) rede epidemiológica 96-00. As inclinações dos ajustes são: (a)  $a = -0,96$ , (b)  $a = -1,00$ , (c)  $a = -1,02$  e (d)  $a = -0,99$ .

Também calculamos para as redes de Olinda, a densidade espectral, como mostra a Fig. 5.17. As densidades espectrais para as redes epidemiológicas e censitárias nos diferentes períodos são irregulares e assimétricas, assemelhando-se mais com as redes



**Figura 5.16** Número de nós focos em função da conectividade  $K$  para as redes epidemiológica nos períodos 1991 a 1995 (■) e 1996 a 2000 (○).

mundo pequeno (ver Figuras F.2 e F.3 do Apêndice F), já que as densidades espectrais das redes livre de escala são simétricas e as das redes aleatórias tem a forma de um semicírculo.



**Figura 5.17** Densidades espectrais para as redes censitárias e epidemiológicas encontradas em Olinda. (a) Rede censitária 91-95, (b) rede epidemiológica 91-95, (c) rede censitária 96-00 e (d) rede epidemiológica 96-00.

Das quantidades calculadas aqui e dos estudos comparativos feitos, podemos concluir que as redes obtidas em Olinda podem ser consideradas redes mundo pequeno. Devido às restrições geográficas na montagem das redes em Olinda, as vizinhanças dos nós são

essencialmente locais e o comprimento do caminho médio  $L$  é pequeno se comparado com o número  $N$  de nós na rede, sendo estas as duas propriedades que definem as redes mundo pequeno [101]. Os nós com as maiores conectividades  $K$ , funcionam como atalhos e reduzem as distâncias entre todos os nós da rede (Fig. 5.14). A medida do comprimento do caminho médio  $L$  em função de  $N$  [101], poderia confirmar que as redes encontradas em Olinda são realmente redes mundo pequeno, o que não é possível por falta de dados.

### 5.3.2 Redes epidemiológicas com peso

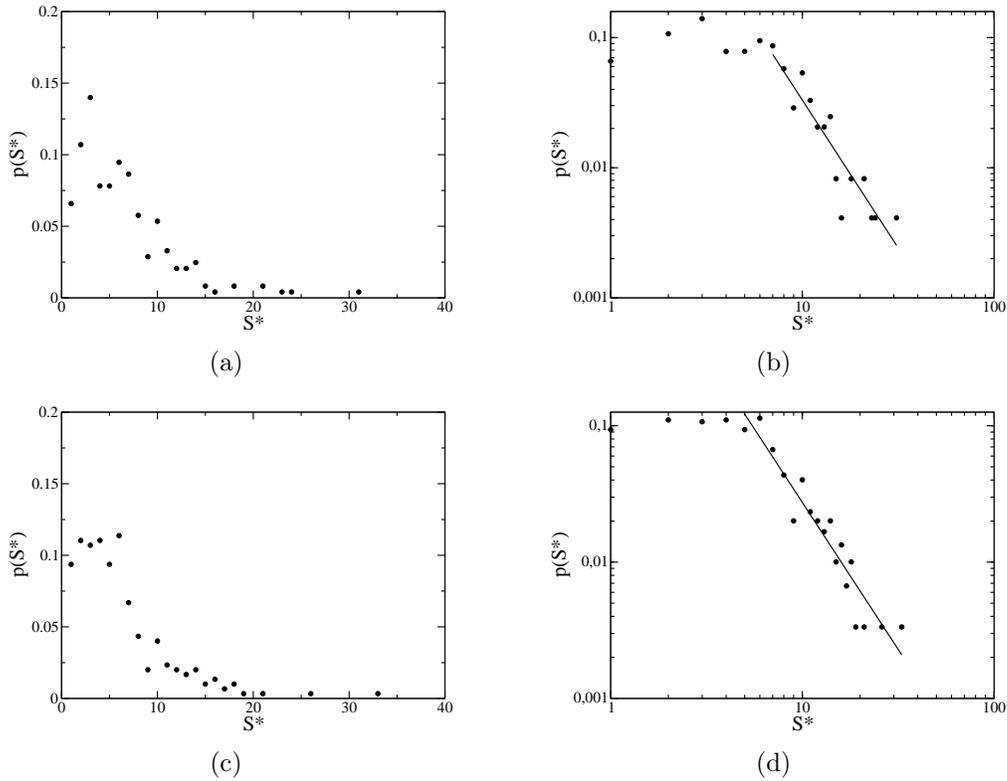
Várias redes complexas mostram uma grande heterogeneidade na distribuição das intensidades das conexões entre os nós, sendo algumas conexões mais importantes que outras. Em função disto, quando se leva em conta o peso de cada conexão na análise da rede, podemos obter mais informações sobre a complexidade da mesma levando em conta tanto a topologia como a influência destes atributos [96,108]. Como redes desta natureza podemos citar a rede mundial de aeroportos, a rede de colaborações científicas, a rede de linhas de transmissão [96]. Na rede de aeroportos, dois aeroportos (nós) estão conectados se existe um voo sem escala entre eles. Neste caso o peso  $W_{ij}$  da conexão entre os aeroportos  $i$  e  $j$  é definido como o número de assentos disponíveis entre os dois aeroportos.

Como dissemos anteriormente, para estudarmos as redes epidemiológicas obtidas do processo de disseminação de tuberculose em Olinda (Fig. 5.4), foi necessário definir os pesos  $W$  das conexões entre os nós, a partir do número de casos de tuberculose acumulados  $S^*$  por setor censitário. Outra alternativa utilizada foi definir tais pesos dando ênfase aos focos de infecção encontrados nas redes epidemiológicas como veremos mais adiante. Na literatura os pesos  $W_{ij}$  são definidos a partir das informações das conexões entre os nós  $i$  e  $j$ . Nas redes epidemiológicas de Olinda,  $W_{ij}$  será definido em função de  $S_i^*$  e  $S_j^*$  ou equivalente, quando levamos em conta a importância dos focos de infecção.

#### Definindo os pesos $W_{ij}$ em função do número de casos $S^*$ acumulados por setor censitário

As distribuições de casos de tuberculose acumulados  $S^*$  por setor censitário em Olinda no períodos 91-95 e 96-00, como se observa na Fig. 5.18, não seguem uma simples lei de escala. As distribuições em lei de potência indicam não existir um  $S^*$  característico, mostrando a heterogeneidade dos setores censitários quanto ao número de casos de tuberculose acumulados. Esta informação da heterogeneidade não é incorporada quando

se olha apenas para a informação topológica das redes epidemiológicas de Olinda, daí a importância de se estudar as redes com peso.



**Figura 5.18** Distribuições do número  $S^*$  de casos de tuberculose acumulados para o períodos 91-95 (a) e (b) e 96-00 (c) e (d). As inclinações dos ajustes nos gráficos log-log são: (b)  $a = -2,27$  e (d)  $a = -2,15$ .

Da Fig. 5.19 observamos que a alta conectividade  $K$  do nó, não está relacionada com um número maior de casos de tuberculose acumulado  $S^*$ . No período de 1991 a 1995, existe maior número de casos de tuberculose acumulado para nós com  $K \sim 9$  vizinhos e no período de 1996 a 2000 para nós com  $K \sim 6$  vizinhos. Chamaremos de  $S_i^*$  o número de casos de tuberculose acumulados no nó  $i$  das redes epidemiológicas de Olinda no períodos 1991 a 1995 e 1996 a 2000, consideramos as seguintes definições para o peso  $W_{ij}$  da conexão entre dois setores censitários  $i$  e  $j$ .

$$W_{ij}(1) = \frac{S_i^*}{K_i} + \frac{S_j^*}{K_j}$$

$$W_{ij}(3) = \frac{S_i^* + S_j^*}{\left(\frac{r_{ij}}{r_{min}}\right)^2}$$

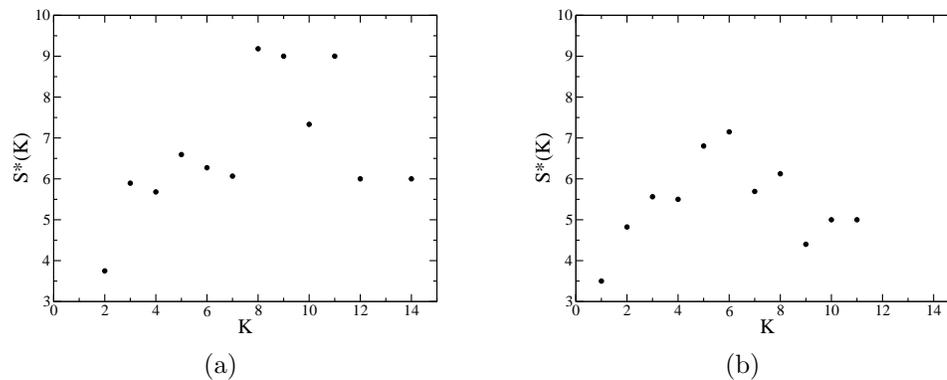
$$W_{ij}(5) = S_i^* + S_j^*$$

$$W_{ij}(2) = \frac{S_i^*}{K_i} \times \frac{S_j^*}{K_j}$$

$$W_{ij}(4) = \frac{S_i^* \times S_j^*}{\left(\frac{r_{ij}}{r_{min}}\right)^2}$$

$$W_{ij}(6) = S_i^* \times S_j^*$$

onde  $r_{ij}$  é a distância entre o nó  $i$  e o nó  $j$  e  $r_{min}$  é a menor distância entre todos os pares de nós da rede epidemiológica. Em todas as definições acima o valor do peso  $W_{ij}$  é proporcional ao número de casos de tuberculose acumulados  $S^*$  nos nós  $i$  e  $j$ . Nas definições  $W_{ij}(1)$  e  $W_{ij}(2)$  os pesos  $W_{ij}$  são inversamente proporcionais às conectividades dos nós  $i$  e  $j$ , o que faz com que a interação entre nós com pouca conectividade seja mais forte. Já nas definições  $W(3)$  e  $W(4)$  os pesos  $W_{ij}$  são inversamente proporcionais à distância  $r_{ij}$  que separa os nós  $i$  e  $j$ .



**Figura 5.19** Número de casos de tuberculose acumulados  $S^*$  em função da conectividade  $K$ . (a) período 1991 a 1995 e (b) período 1996 a 2000.

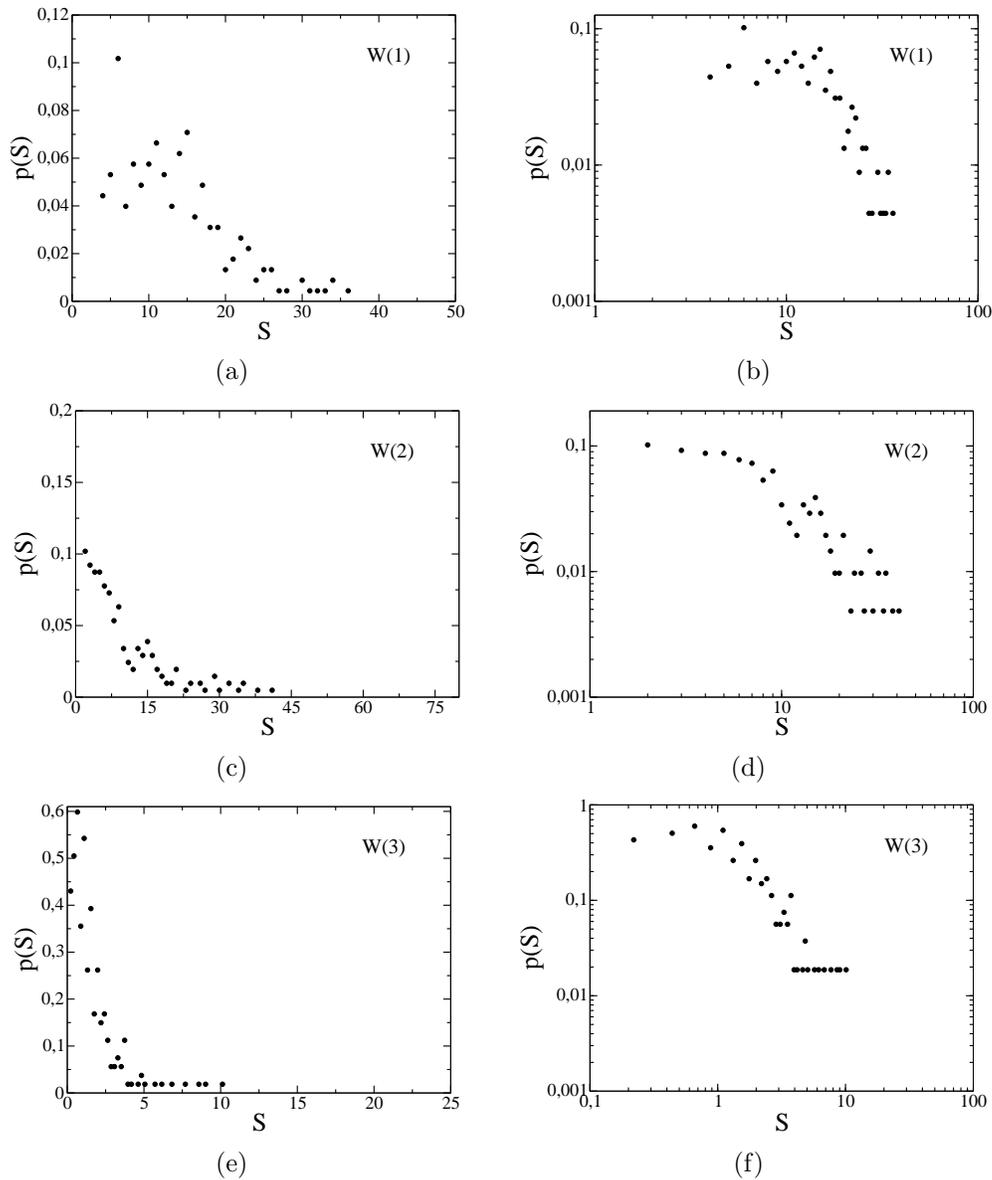
No estudo usual das redes com peso nas ligações encontrado na literatura [108], uma das quantidades mais estudadas é a distribuição de intensidades  $S_i$  dos nós, que neste caso é considerado uma generalização da conectividade  $K$ . Sendo assim, a intensidade  $S_i$  do nó  $i$  é definida como sendo:

$$S_i = \sum_j a_{ij} W_{ij} \quad (5.3)$$

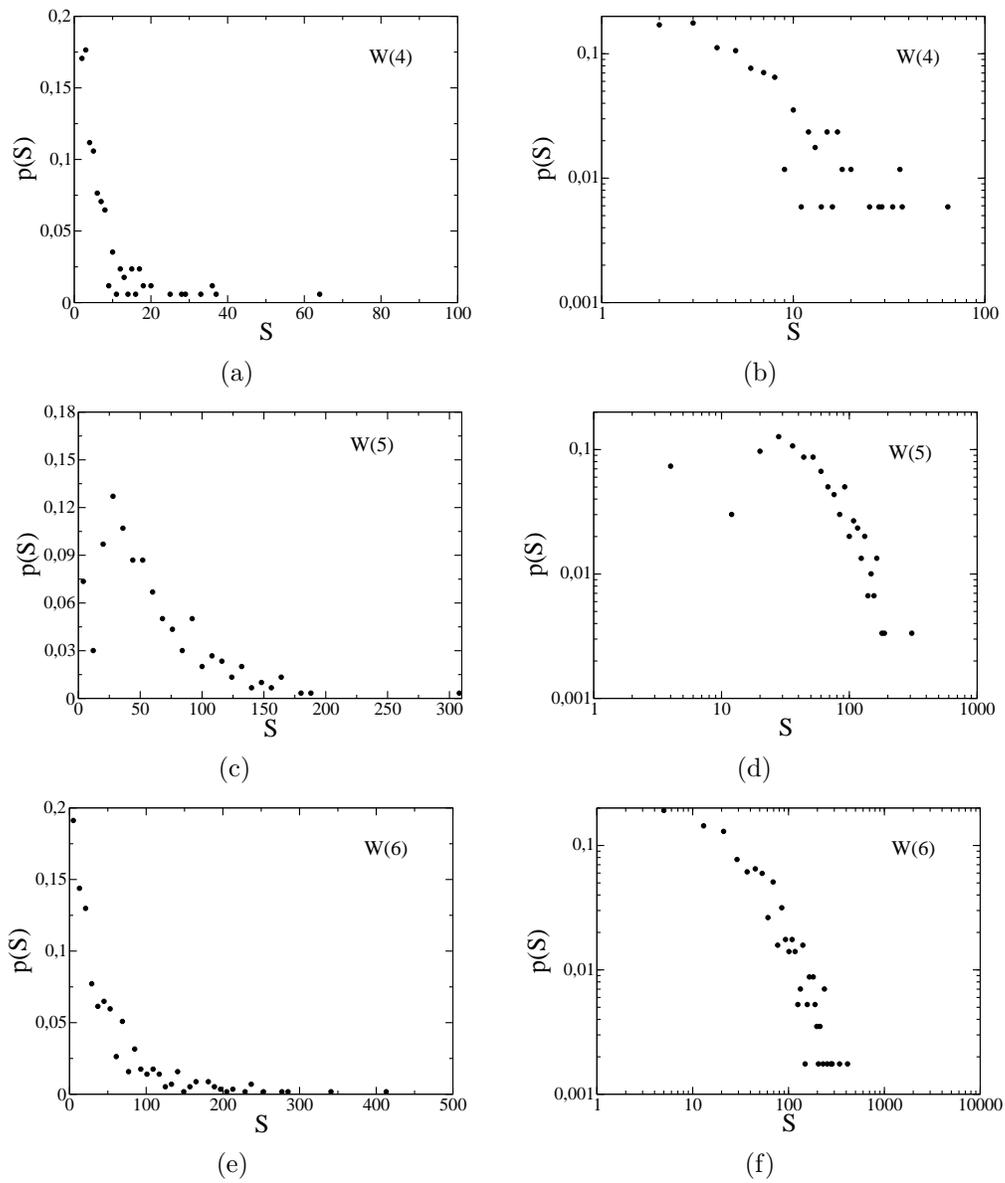
A intensidade  $S_i$  de um nó  $i$  integra as informações sobre os pesos e sobre a sua conectividade  $K_i$ ,  $a_{ij}$  são os elementos da matriz de conectividades. No limite em que todos dos pesos são unitários, a intensidade  $S$  é igual a conectividade  $K$ .

Para as redes epidemiológicas de Olinda, conhecemos a intensidade real dos pesos dos nós, ou seja, o número  $S^*$  de casos de tuberculose acumulados por setor censitário. Desta forma para identificar a melhor escolha entre as funções de  $W_{ij}$ , consideramos que a definição ideal será aquela que fornecer uma distribuição de intensidades  $S$ , semelhante a distribuição de  $S^*$  (Fig. 5.18) e a distribuição de intensidades  $S(K)$  semelhante a  $S^*(K)$ . As distribuições de intensidades  $S$  calculadas para as redes epidemiológicas de Olinda

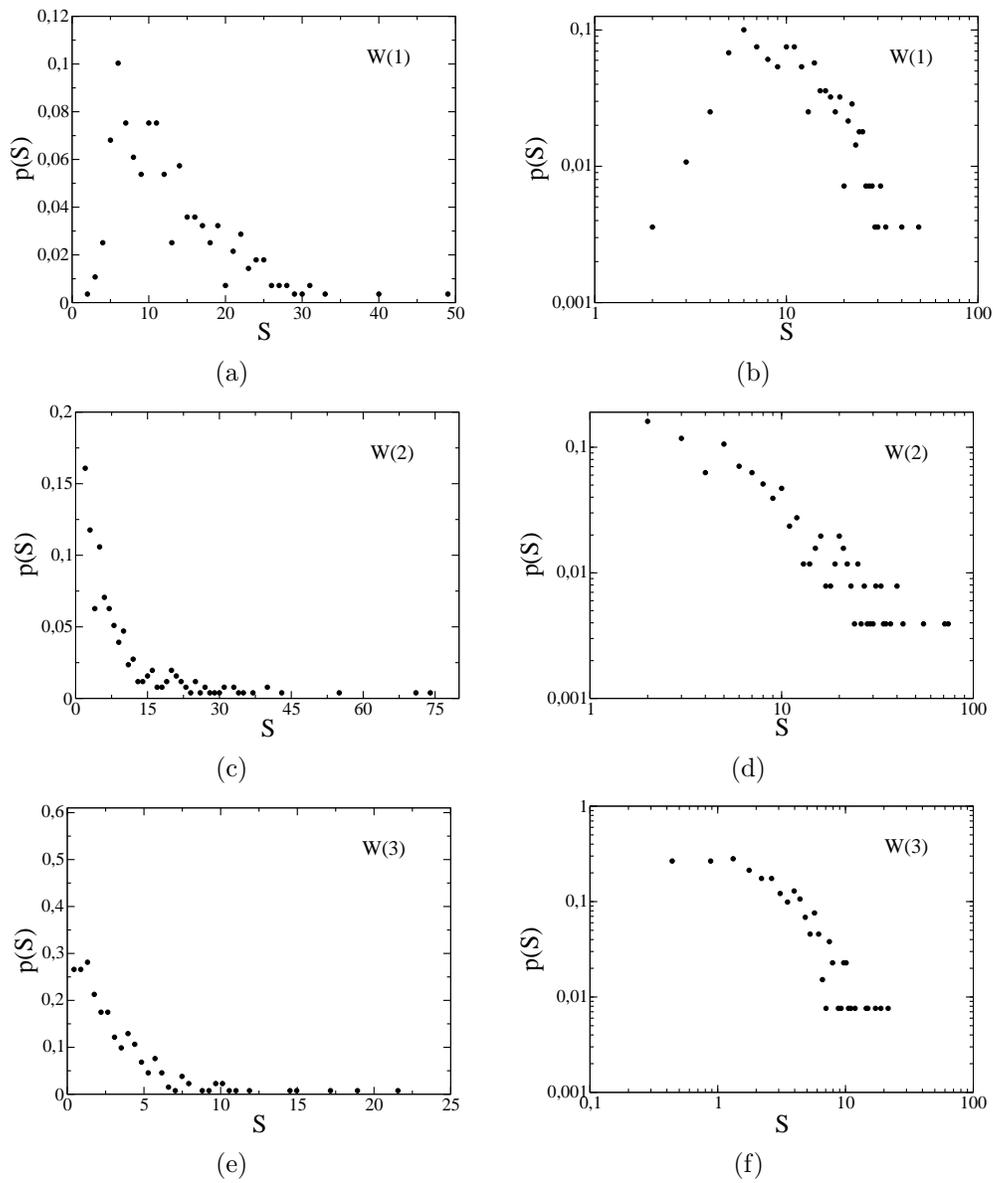
paras as diferentes definições de  $W_{ij}$ , nos períodos 91-95 e 96-00, mostradas nas Figuras 5.20, 5.21, 5.22 e 5.23 respectivamente. Podemos ver que as distribuições de intensidades  $S$  calculadas para as definições de pesos  $W(2)$  (Figuras 5.20 (c) e (d) e 5.22 (c) e (d)) e  $W(4)$  (Figuras 5.21 (c) e (d) e 5.23 (c) e (d)) são as que mais se aproximam das distribuições do número  $S^*$  de casos de tuberculose acumulados por setor censitário (Figuras 5.18 (a-d)).



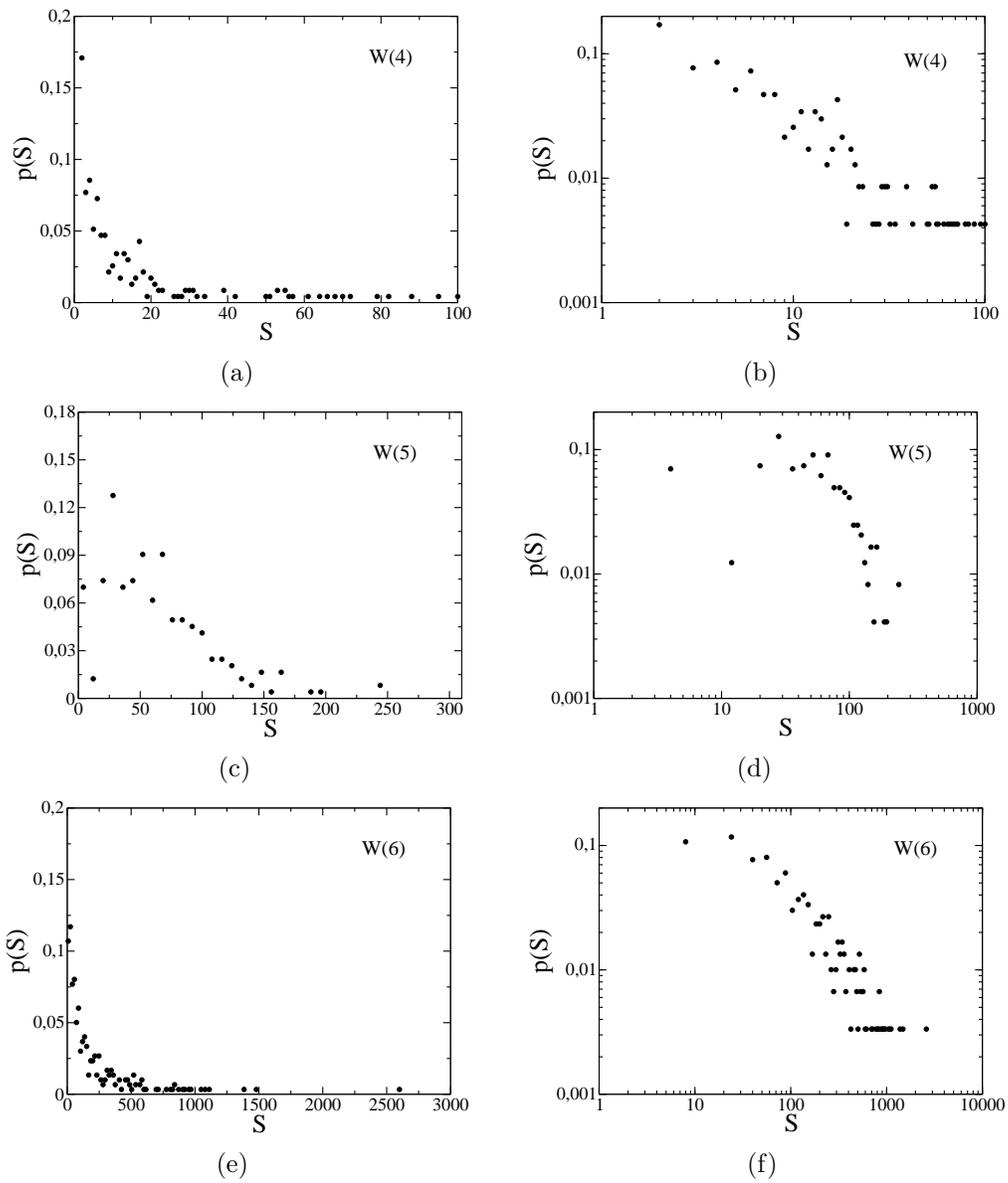
**Figura 5.20** Distribuições de intensidades  $S$  para a rede epidemiológica no período 1991 a 1995. Pesos  $W(1)$  (a) e (b),  $W(2)$  (c) e (d),  $W(3)$  (e) e (f)



**Figura 5.21** Distribuições de intensidades  $S$  para a rede epidemiológica no período 1991 a 1995. Pesos  $W(4)$  (a) e (b),  $W(5)$  (c) e (d),  $W(6)$  (e) e (f).



**Figura 5.22** Distribuições de intensidades  $S$  para a rede epidemiológica no período 1996 a 2000. Pesos  $W(1)$  (a) e (b),  $W(2)$  (c) e (d),  $W(3)$  (e) e (f).



**Figura 5.23** Distribuições de intensidades  $S$  para a rede epidemiológica no período 1996 a 2000. Pesos  $W(4)$  (a) e (b),  $W(5)$  (c) e (d),  $W(6)$  (e) e (f).

Através do estudo do comportamento da intensidade  $S$  em função da conectividade  $K$ , podemos investigar as correlações entre os pesos e as estruturas topológicas das redes. Se não há correlação entre os pesos  $W_{ij}$  e as conectividades  $K_i$  e  $K_j$  do nós, os pesos  $W_{ij}$  são em média independentes de  $i$  e  $j$  e neste caso podemos aproximar  $W_{ij} = \langle W \rangle$ , onde  $\langle W \rangle$  é o peso médio dos nós (Tabela 5.2). Ou seja, na ausência de correlações, a equação 5.3 pode ser reescrita como  $S_i = \langle W \rangle K_i$  e neste caso as duas grandezas ( $S_i$  e  $K_i$ ) fornecem a mesma informação para o sistema, já que  $S_i$  é simplesmente proporcional a  $K_i$  [96].

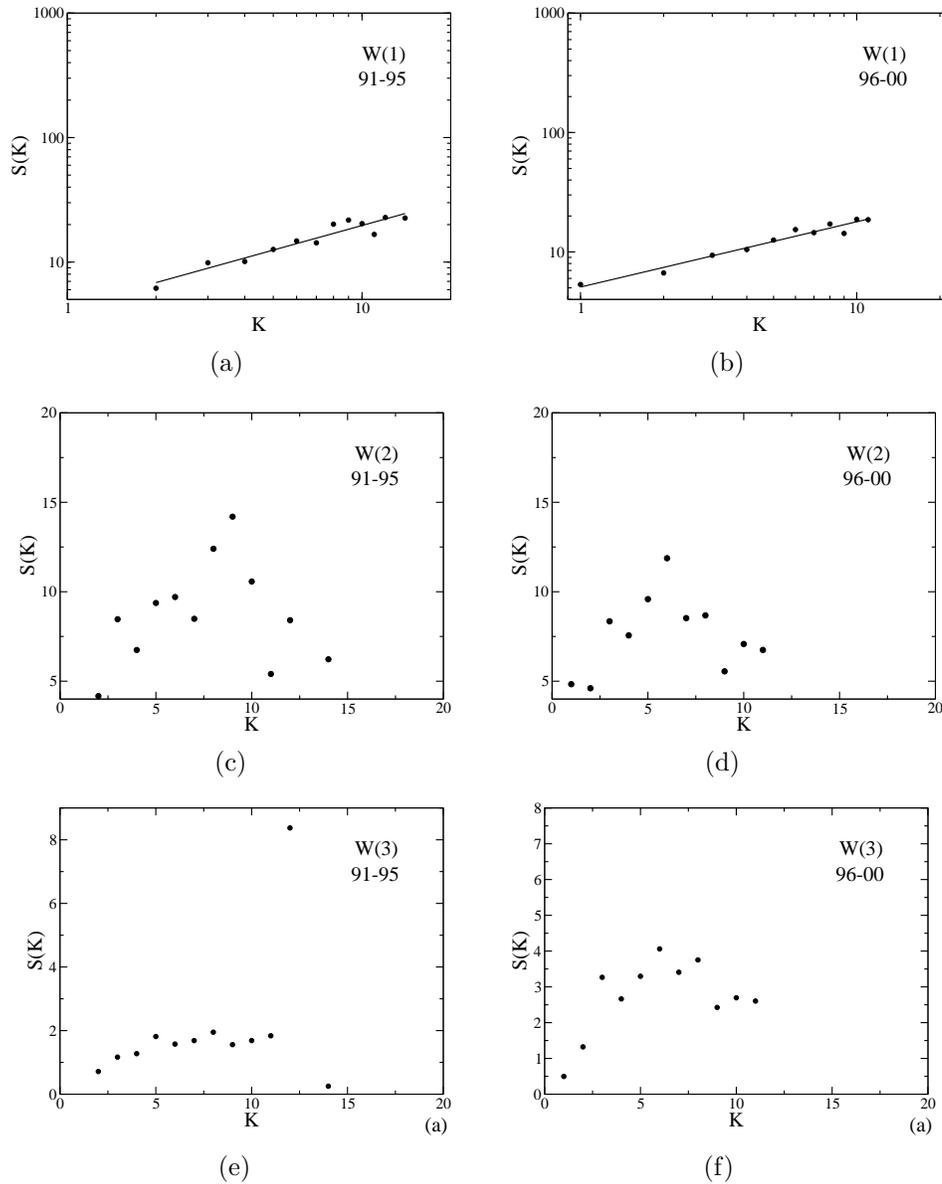
Rede	$\langle W(1) \rangle$	$\langle W(2) \rangle$	$\langle W(3) \rangle$	$\langle W(4) \rangle$	$\langle W(5) \rangle$	$\langle W(6) \rangle$
91-95	2, 51	1, 74	0, 42	1, 11	13, 97	47, 20
96-00	3, 49	1, 79	0, 43	2, 40	12, 24	44, 39

**Tabela 5.2** Pesos médios  $\langle W \rangle$  calculados para as 6 de definições de  $W_{ij}$  nas redes epidemiológicas de Olinda.

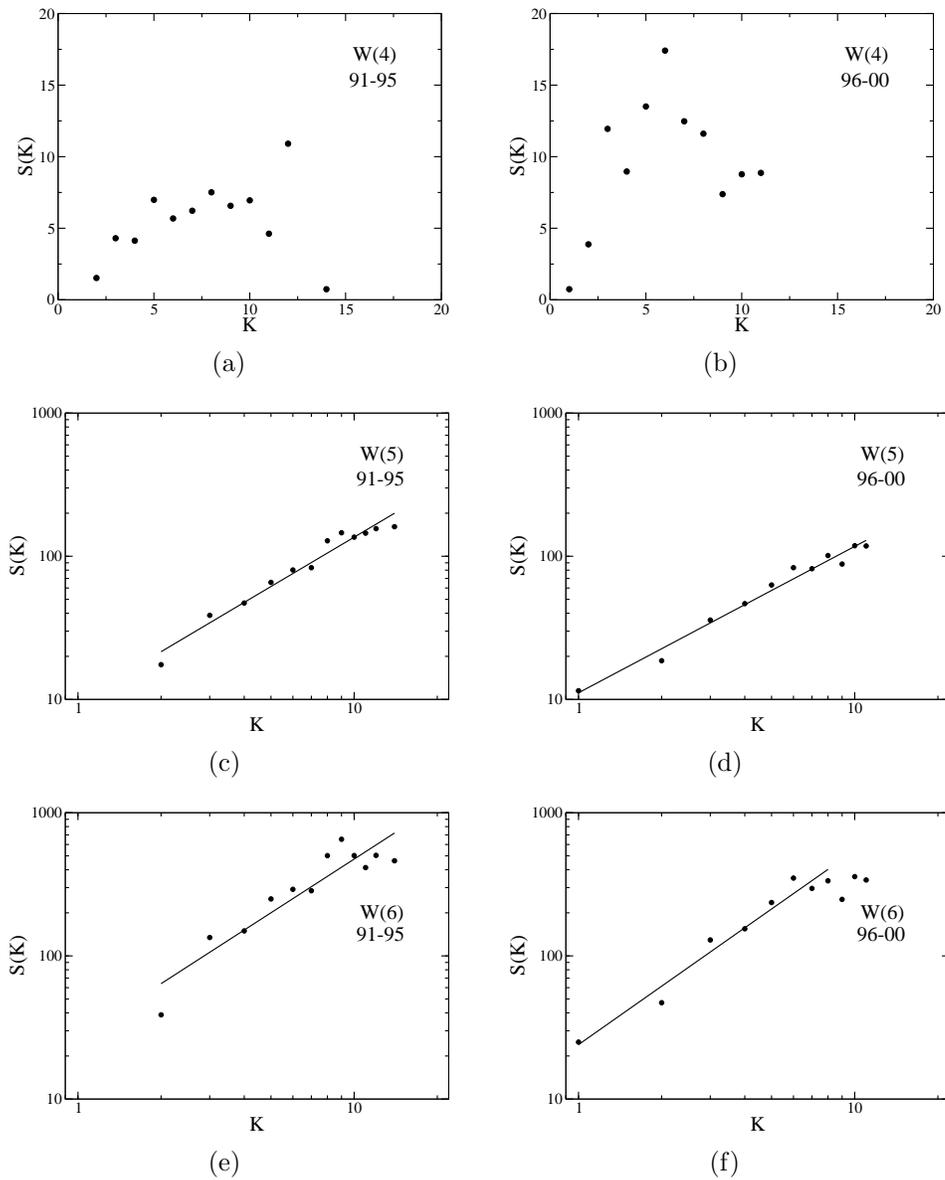
As distribuições de intensidade  $S$  em função da conectividade  $K$  calculadas para as redes epidemiológicas de Olinda mostram diversos tipos de comportamentos como visto nas Figuras 5.24 e 5.25, para os períodos de 91-95 e 96-00 respectivamente. Para as definições de pesos  $W(1)$  (Figuras 5.24(a) e 5.24(b)),  $W(5)$  (Figuras 5.25(c) e 5.25(d)) e  $W(6)$  (Figuras 5.25(e) e 5.25(f)), podemos observar que a intensidade  $S$  cresce como uma lei de potência em  $K$  (veja os ajustes nas Figuras) em ambos os períodos. Como as definições de  $W_{ij}(5)$  e  $W_{ij}(6)$ , só levam em conta  $S^*$ , é fácil ver que quanto maior a conectividade  $K$ , maior é o número de casos de tuberculose acumulados por setor censitário. No entanto, a distribuição  $S(K)$  calculada a partir da definição  $W_{ij}(5)$  na rede epidemiológica no período 96-00 (Fig. 5.25(d)), indica ausência de correlação entre os pesos  $W$  e as conexões, pois podemos escrever  $S(K)$  em função do peso médio  $\langle W(5) \rangle$  como  $S(K) \sim \langle W \rangle K$  (Tabela 5.2) e portanto o ajuste é linear. Para as definições de pesos  $W(2)$  (Figuras 5.24(c) e 5.24(d)),  $W(3)$  (Figuras 5.24(e) e 5.24(f)) e  $W(4)$  (Figuras 5.25(a) e 5.25(b)) em ambos os períodos,  $S(K)$  não se comporta como uma lei de potência como nas outras definições. Para estas definições de peso,  $S(K)$  cresce com  $K$  e decai a partir da conectividade média  $\langle K \rangle$  da rede (Tabela 5.1), e seu comportamento está mais próximo da distribuição de intensidades reais ( $S^*(K)$ ) (Fig. 5.19 (a e b)) em função da conectividade.

Pelas distribuições de intensidades  $S$  e  $S(K)$ , pudemos ver que os pesos mais apropriados para descrever as intensidades reais  $S^*$ , são os pesos  $W(2)$  e  $W(4)$ , pois apresentam

maiores semelhanças com a distribuição de casos de tuberculose acumulados por setor censitário.



**Figura 5.24** Intensidade  $S$  em função da conectividade  $K$  para as redes epidemiológicas de Olinda. Peso  $W(1)$  (a) 91-95,  $S(K) = 4,34 \times K^{0,67}$  e (b) 96-00,  $S(K) = 5,04 \times K^{0,55}$ ; peso  $W(2)$  (c) 91-95 e (d) 96-00; peso  $W(3)$  (e) 91-95 e (f) 96-00.



**Figura 5.25** Intensidade  $S$  em função da conectividade  $K$  para as redes epidemiológicas de Olinda. Peso  $W(4)$  (a) 91-95 e (b) 96-00; peso  $W(5)$  (c) 91-95,  $S(K) = 9,75 \times K^{1,14}$  e (d) 96-00,  $S(K) = 11,20 \times K^{1,02}$ ; peso  $W(6)$  (e) 91-95,  $S(K) = 26,98 \times K^{1,24}$  e (f) 96-00,  $S(K) = 24,02 \times K^{1,35}$ .

No estudo de redes com peso o coeficiente de *clustering*  $C_i^W$  é definido como uma generalização do coeficiente de *clustering* sem peso (equação F.3) [96].

$$C_i^W = \frac{1}{s_i(K_i - 1)} \sum_{j,h} \frac{W_{ij} + W_{ih}}{2} a_{ij} a_{ih} a_{jh} \quad (5.4)$$

O coeficiente de *clustering* da rede com peso,  $C^W$ , é obtido da média realizada sobre todos os nós da rede

$$C^W = \frac{1}{N} \sum_i C_i^W \quad (5.5)$$

Na Tabela 5.3 podemos comparar os coeficientes de *clustering* das redes epidemiológicas sem e com peso,  $C$  e  $C^W$  respectivamente. Dos valores apresentados, podemos ver que independentemente da definição de peso ( $W_{ij}$ ) escolhido, o valor do coeficiente de *clustering* da rede epidemiológica calculado com peso  $C^W$  está muito próximo do coeficiente de *clustering* da rede epidemiológica sem peso  $C$ .

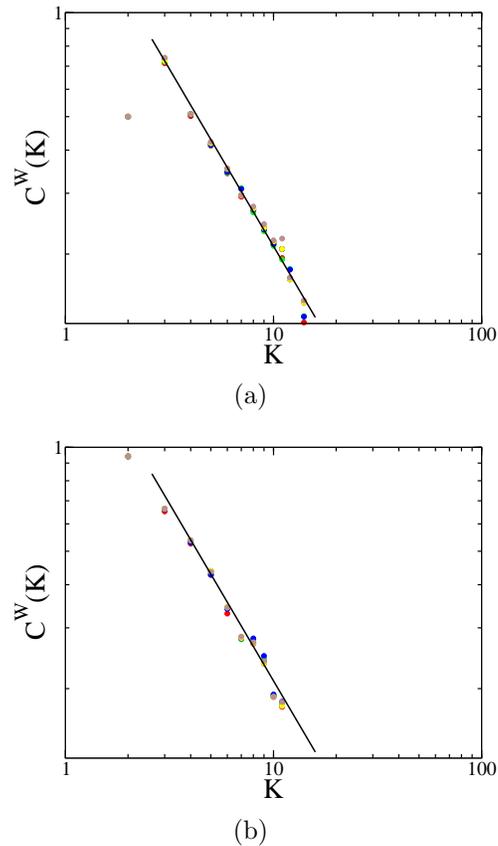
Rede	C	$C^W$					
		W(1)	W(2)	W(3)	W(4)	W(5)	W(6)
91-95	0,45	0,45	0,45	0,46	0,46	0,46	0,47
96-00	0,48	0,48	0,47	0,48	0,47	0,49	0,48

**Tabela 5.3** Valores do coeficiente de *clustering* da rede epidemiológica com e sem peso,  $C^W$  e  $C$  respectivamente.

A análise da distribuição do coeficiente de *clustering* da rede com peso  $C^W$  em função da conectividade  $K$ , apresentado na Fig. 5.26, mostra que o coeficiente de *clustering* com peso é independente da definição de peso utilizado entre ligações, e segue uma lei de potência,  $C^W(K) \sim K^{-1}$ . Este comportamento, assim como mostrado nas redes epidemiológicas sem peso (5.15), é causado pela fronteira bem definida da rede.

Na análise da densidade espectral das redes epidemiológicas sem peso (Fig. 5.17), utilizamos a matriz de conectividades (ver seção F.4 do Apêndice F), no entanto, no cálculo da densidade espectral para as redes com peso, usamos a matriz de intensidades, onde o elemento de matriz  $i, j$  fornece o peso  $W_{ij}$  da conexão entre  $i$  e  $j$ . As densidades espectrais calculadas para as redes epidemiológicas 91-95 e 96-00 às diferentes definições de peso, são mostradas na Fig. 5.27 e apresentam semelhanças com a densidade espectral calculada para as redes livre de escala (Fig. F.2 do Apêndice F), ou seja, são assimétricas e apresentam um pico bem definido. Este resultado é diferente do encontrado para as

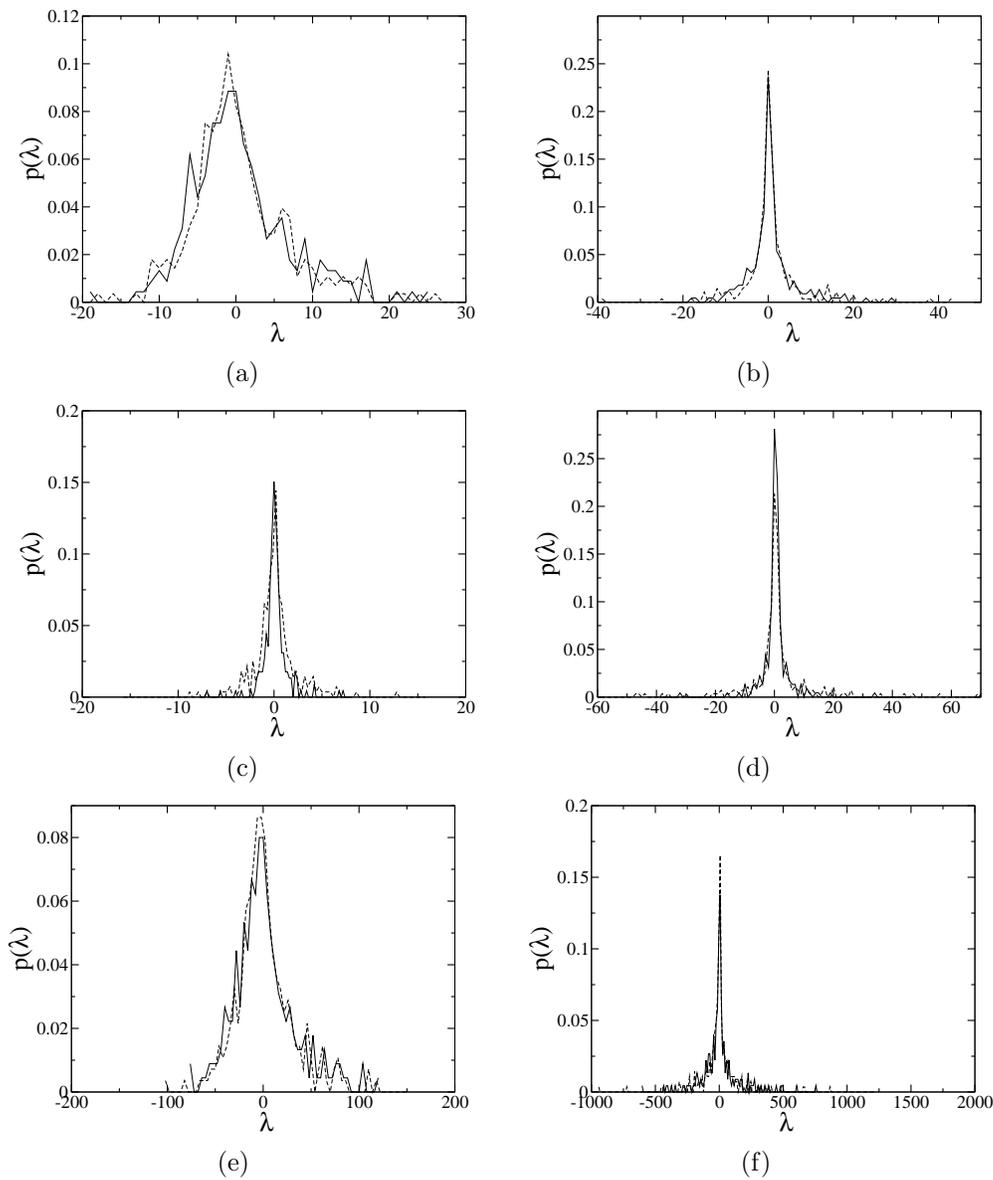
densidades espectrais para as redes sem peso (Fig. 5.17), onde as densidades espectrais são do tipo redes mundo pequeno (Fig. F.3).



**Figura 5.26** Coeficiente de *clustering* da rede com peso  $C^W$  em função da conectividade  $K$  para as redes epidemiológicas nos períodos 1991 a 1995 (a) e 1996 a 2000 (b).  $W(1)$  (preto),  $W(2)$  (vermelho),  $W(3)$  (verde),  $W(4)$  (azul),  $W(5)$  (amarelo),  $W(6)$  (cinza). As inclinações dos ajustes para os dois períodos são próximas de -1.

### Importância dos focos no peso $W$ das ligações

Outra maneira de definirmos o peso  $W$  das conexões nas redes epidemiológicas de Olinda é dando mais importância aos setores que permaneceram com casos de tuberculose por mais anos consecutivos, ou seja, definindo um peso que diferencia os setores focos de infecção de tuberculose dos outros (Amador et al [12]). Para isto vamos introduzir agora uma variável  $Y_i$ , que guarda o maior número de anos consecutivos que o setor censitário  $i$  permaneceu com caso de tuberculose no período, e considerarmos outras duas definições,  $W(7)$  e  $W(8)$ , para o peso  $W_{ij}$  entre a conexão dos nós  $i$  e  $j$ , agora diferen-



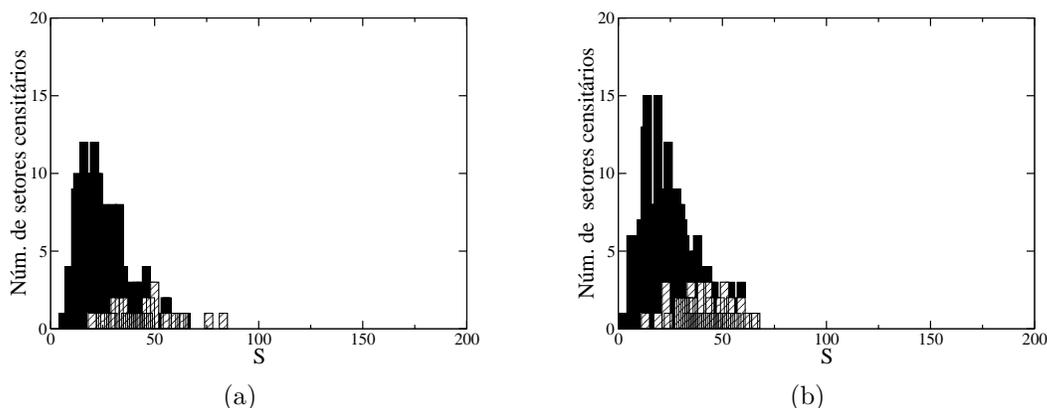
**Figura 5.27** Densidades espectrais para as redes epidemiológicas com pesos nos períodos 1991 a 1995 (linha sólida) e 1996 a 2000 (linha tracejada). Pesos  $W(1)$  (a),  $W(2)$  (b),  $W(3)$  (c),  $W(4)$  (d),  $W(5)$  (e) e  $W(6)$  (f). Tamanho das caixas para os histogramas: 1 (a), 1 (b), 0,2 (c), 1 (d), 2 (e), 10 (f).

ciando os setores “foco” dos outros. Neste caso,  $W_{ij}$  não dependerá do número de casos de TB acumulados no período e sim do número de anos consecutivos que o SC apresenta pelo um caso de de TB.

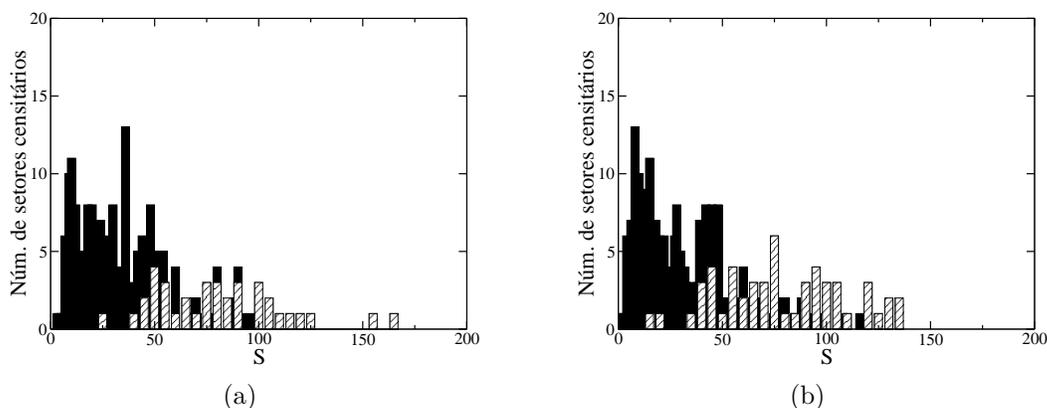
$$W_{ij}(7) = Y_i + Y_j$$

$$W_{ij}(8) = Y_i * Y_j$$

Nas Figuras 5.28 e 5.29 comparamos a distribuição do número de SC em função da intensidade  $S$  calculada para  $W(7)$  e  $W(8)$  respectivamente e a distribuição de  $S$  para os focos nos períodos 91-95 e 96-00. Observa-se destas figuras que os focos estão entre os nós com os maiores valores de intensidades  $S$  (ver equação 5.3).

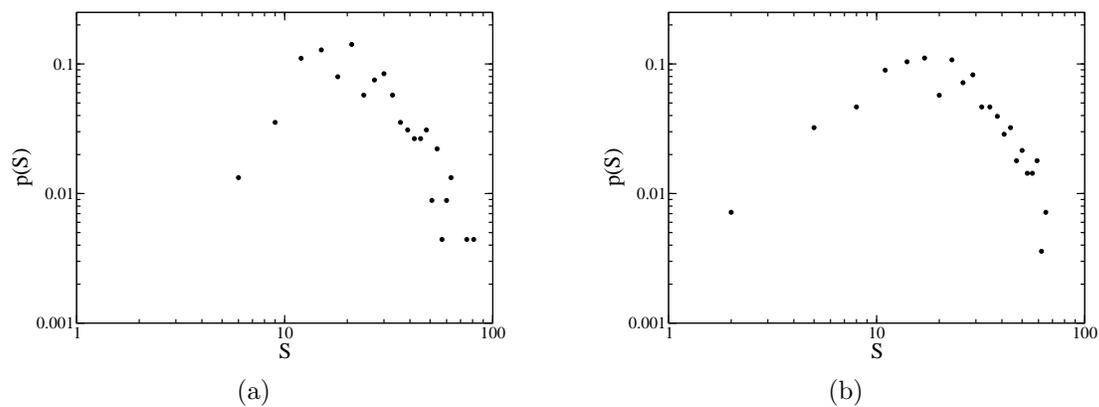


**Figura 5.28** Distribuições de intensidades  $S$  (barra cheia) para os nós da rede epidemiológica utilizando a definição de peso  $W(7)$ . As distribuições de  $S$  para os nós cujos setores censitários são focos são mostradas com barras listradas. (a) 1991 a 1995 e (b) 1996 a 2000.

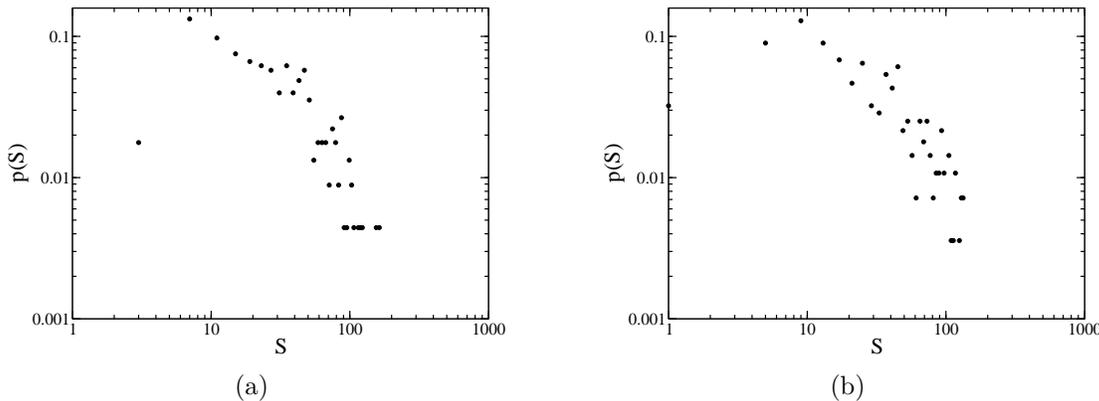


**Figura 5.29** Distribuições de intensidades  $S$  (barra cheia) para os nós da rede epidemiológica utilizando a definição de peso  $W(8)$ . As distribuições de  $S$  para os nós cujos setores censitários são focos são mostradas com barras listradas. (a) 1991 a 1995 e (b) 1996 a 2000.

O comportamento das distribuições de intensidades  $S$  para as definições de peso  $W(7)$  e  $W(8)$  apresentados nas Figuras 5.30 e 5.31 respectivamente, indica que as distribuições (91-95 e 96-00) para o peso  $W(8)$  são as mais parecidas com as distribuições da intensidade real  $S^*$  de casos de tuberculose acumulados por setor censitário (Figuras 5.18).



**Figura 5.30** Distribuições de intensidade  $S$ . Peso  $W(7)$ , (a) 1991 a 1995 e (b) 1996 a 2000.



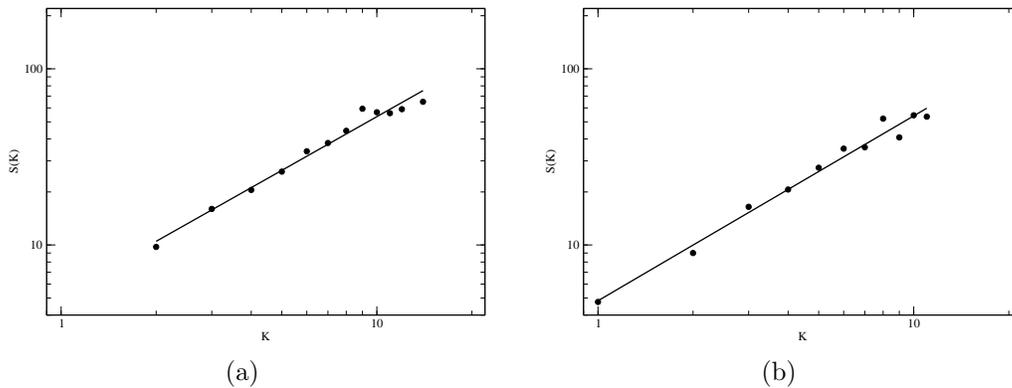
**Figura 5.31** Distribuições de intensidade  $S$ . Peso  $W(8)$ , (a) 1991 a 1995 e (b) 1996 a 2000.

Já o comportamento das intensidades  $S$  calculadas em função da conectividade  $K$  para as redes epidemiológicas calculadas com as definições de peso  $W(7)$  e  $W(8)$ , tal como nos resultados obtidos para os pesos  $W(1)$ ,  $W(5)$  e  $W(6)$  (Figuras 5.24 e 5.25) mostram um crescimento em forma de lei de potência (Figuras 5.32 e 5.33). Para as definições de peso  $W(7)$  e  $W(8)$ , a intensidade  $S$  é proporcional a conectividade  $K$  do nó, ou seja, os nós com maior conectividade estariam entre os nós com um maior número de casos de tuberculose. Entretanto, se compararmos os pesos médios  $\langle W \rangle$  calculados para as diferentes redes (Tabela 5.4) com os ajustes lineares feitos para  $S(K)$ , observamos uma ausência de correlação entre os pesos  $W$  e as conexões dos nós nas redes epidemiológicas no período 91-95, ou seja, é possível escrever  $S(K) \sim \langle W \rangle K$  para as definições de peso  $W(7)$  e  $W(8)$ , da mesma forma como o que ocorre para  $S(K)$  na rede epidemiológica do

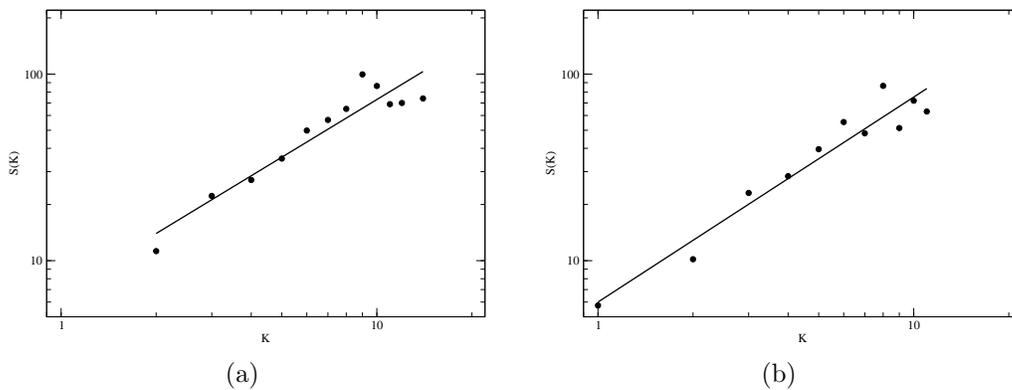
período 96-00 utilizando o peso  $W(5)$  (Fig. 5.25(d)).

Rede	$\langle W(7) \rangle$	$\langle W(8) \rangle$
91-95	5,37	7,52
96-00	5,42	7,76

**Tabela 5.4** Pesos médios  $\langle W \rangle$  calculados para as definições de peso  $W(7)$  e  $W(8)$  para as epidemiológicas de Olinda.



**Figura 5.32** Intensidade  $S$  em função da conectividade  $K$ . Peso  $W(7)$ , (a) 1991 a 1995  $S(K) = 5,20 \times K^{1,01}$  e (b) 1996 a 2000  $S(K) = 4,82 \times K^{1,05}$ .



**Figura 5.33** Intensidade  $S$  em função da conectividade  $K$ . Peso  $W(8)$ , (a) 1991 a 1995  $S(K) = 6,86 \times K^{1,02}$  e (b) 1996 a 2000  $S(K) = 6,00 \times K^{1,10}$ .

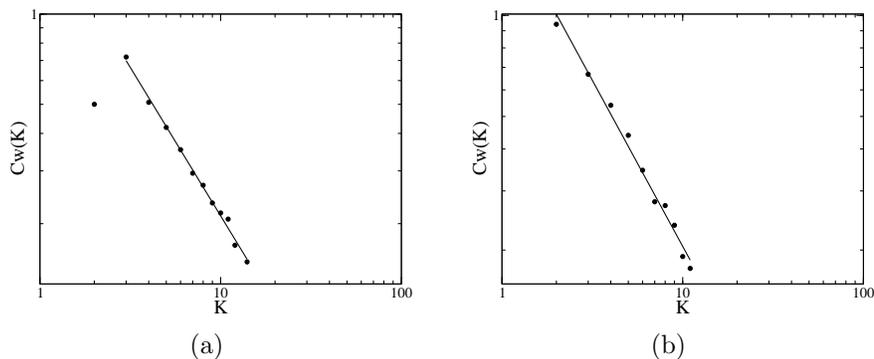
A análise do coeficientes de *clustering*  $C^W$  (ver equação 5.5) para as redes epidemiológicas com peso calculados a partir das definições  $W(7)$  e  $W(8)$  (Tabela 5.5), estão muito próximos dos coeficientes de *clustering*  $C$  das redes epidemiológicas sem peso, assim como observado para as definições anteriores de peso (Tabela 5.3). Ou seja, os

coeficientes de clustering independem do peso das conexões entre os sítios  $i$  e  $j$ , ou seja, é definido pelas características topológicas da rede.

Rede	C	$C^W$	
		$W(7)$	$W(8)$
91-95	0.45	0.42	0.44
96-00	0.48	0.43	0.44

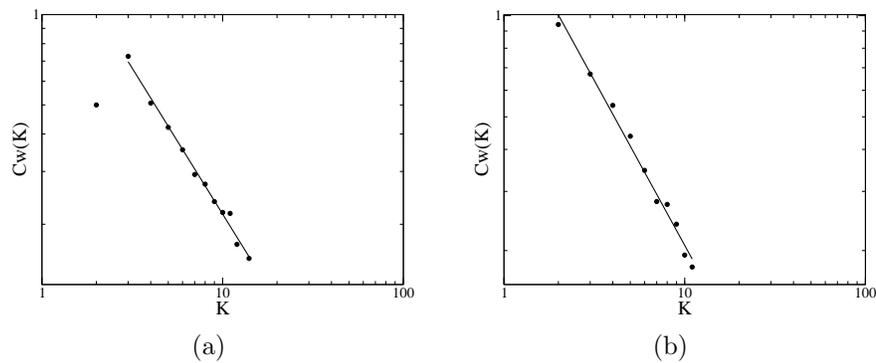
**Tabela 5.5** Valores dos coeficientes de *clustering* para as redes epidemiológicas com e sem peso,  $C^W$  e  $C$  respectivamente.

Aqui também as distribuições do coeficiente de *clustering*  $C^W$  em função da conectividade  $K$  para os pesos  $W(7)$  e  $W(8)$  seguem uma lei do tipo  $C^W(K) \sim K^{-1}$ , como mostram as Figuras 5.34 e 5.35. Este comportamento tal como observado para as redes epidemiológicas sem peso (Fig. 5.15) e redes com as outras 6 definições anteriores de peso (Fig. 5.26) e está associado com a fronteira bem definida da rede.

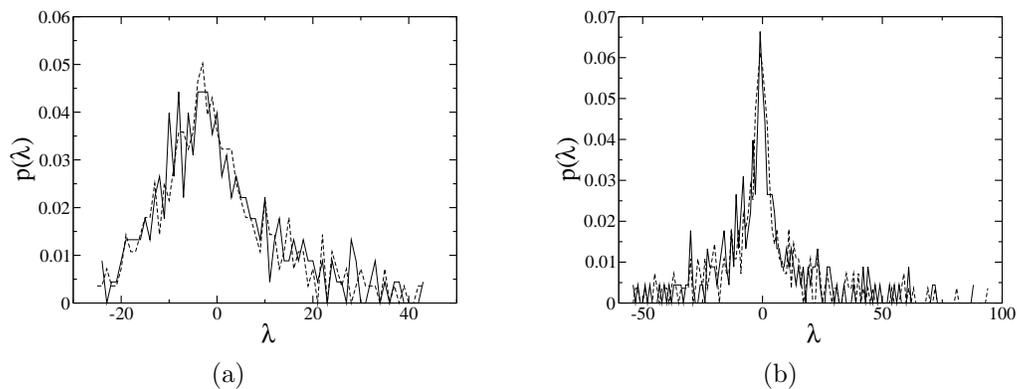


**Figura 5.34** Coeficiente de *clustering*  $C^W$  em função da conectividade  $K$ . Peso  $W(7)$ , (a) 1991 a 1995 e (b) 1996 a 2000. Inclinações dos ajustes, (a)  $a = -0,99$  e (b)  $a = -0,99$ . As redes exibem  $C^W(K) \sim K^{-1}$ .

As densidades espectrais calculadas para as definições de peso  $W(7)$  e  $W(8)$ , mostradas na Fig. 5.36, apresentam comportamentos semelhantes aos obtidos com as definições anteriores de peso (Fig. 5.27), ou seja, apresentam um pico central bem definido e são aproximadamente simétricas, características estas semelhantes ao comportamento da densidade espectral de redes do tipo livre de escala (Fig. F.2 do Apêndice F). Estas densidades espectrais, tal como ocorre para as definições anteriores, são diferentes das densidades espectrais calculadas para as redes de Olinda sem peso (Fig. 5.17), que se assemelham às densidades espectrais para as redes mundo pequeno (Fig. F.3).



**Figura 5.35** Coeficiente de *clustering*  $C^W$  em função da conectividade  $K$ . Peso  $W(8)$ , (a) 1991 a 1995 e (b) 1996 a 2000. Inclinações dos ajustes, (a)  $a = -0,97$  e (b)  $a = -0,98$ . As redes exibem  $C^W(K) \sim K^{-1}$ .



**Figura 5.36** Densidades espectrais para os pesos  $W(7)$  (a) e  $W(8)$  (b), nos períodos 1991 a 1995 (linha sólida) e 1996 a 2000 (linha tracejada). Caixa do histograma igual a 1 unidade.

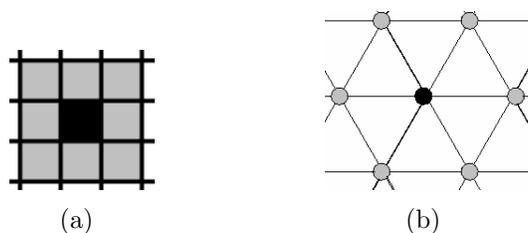
## 5.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM OLINDA COM OUTRAS REDES

Como a estrutura das redes de Olinda é bastante regular, com grandes semelhanças com diagramas de Voronoi [109], nesta seção estudamos o comportamento destas redes e de outras redes regulares com o mesmo número de nós que as redes de Olinda analisadas durante este estudo. Nosso intuito aqui é entender qual a importância da distribuição espacial dos SC e vizinhança nos resultados obtidos. Em outras palavras, se formos simular o processo de Olinda, é necessário considerar a rede real ou podemos utilizar uma rede conhecida, que exibe complexidade similar [94]. Para isto analisaremos as características de complexidade estudadas até agora (conectividade  $K$ , coeficiente de *clustering*  $C$ , comprimento de caminho médio  $L$  e densidade espectral) para duas redes regulares, quadrada e triangular, e também dois diagramas de Voronoi, como mesmo

número de nós, comparando os resultados obtidos com as redes de Olinda.

### 5.4.1 Redes regulares

No estudo topológico das redes quadrada e triangular, utilizamos  $N = 256$  nós. Na Fig. 5.37 mostramos as vizinhanças típicas definidas para os dois tipos de rede: na rede quadrada (Fig. 5.37(a)), consideramos a vizinhança do tipo Moore, primeiros vizinhos e vizinhos mais próximos e na rede triangular consideramos uma vizinhança hexagonal (Fig. 5.37(b)). Se tivéssemos definido para a rede quadrada a vizinhança do nó sendo do tipo Newmann (primeiros vizinhos), o coeficiente de *clustering* calculado para a rede quadrada seria  $C = 0$ , uma vez que os vizinhos de um nó não seriam vizinhos entre si.



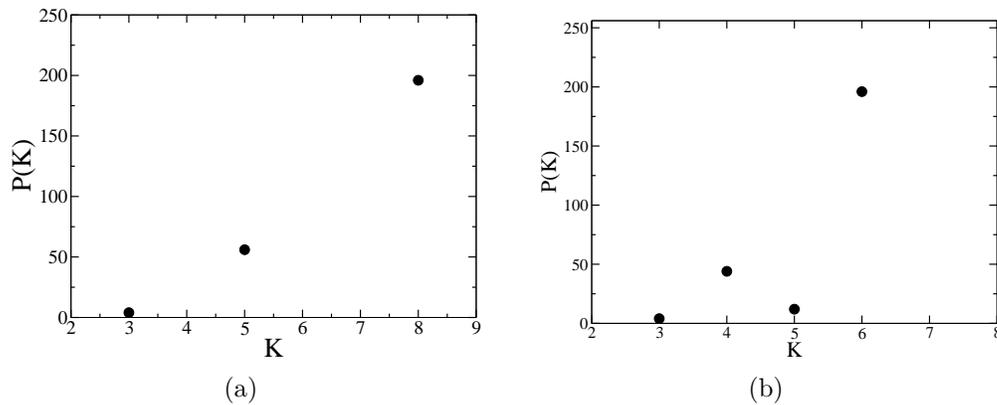
**Figura 5.37** Vizinhança típica para um nó na rede (a) quadrada e (b) triangular, com  $K = 8$  e  $K = 6$  vizinhos respectivamente. Código de cores: vizinhança, sítios cinzas, e nó, sítio preto.

Os valores de conectividade média  $\langle K \rangle$ , comprimento do caminho médio  $L$  e coeficiente de *clustering*  $C$  calculados para as redes regulares, são bastantes semelhantes aos obtidos para as redes de Olinda, como mostra a Tabela 5.6. As distribuições de conectividades  $K$  das redes regulares (Fig. 5.38), são bem diferentes das distribuições obtidas nas redes de Olinda, que seguem um lei gaussiana (Fig. 5.13). As distribuições para as redes regulares apresentam apenas alguns valores diferentes de conectividades  $K$  diferentes,  $K = 3, 5$  ou  $8$ , para a rede quadrada e  $K = 3-6$  para a rede triangular. Neste caso os valores  $K = 8$  e  $6$  que aparecem em maior número de SC na rede quadrada e triangular respectivamente, são as conectividades típicas de cada rede (Fig. 5.37). Os outros valores menores de  $K$ , associados a um número menor de SC em ambas as redes, resultam da fronteira definida da rede, tal como observado para os nós pertencentes às fronteiras das redes de Olinda (Figuras 5.6 e 5.4).

O comportamento do coeficiente de *clustering*  $C$  em função da conectividade  $K$  para a rede quadrada, parece ser do tipo lei de potência (Fig. 5.39(a)) tal como as redes de Olinda, enquanto que para a rede triangular ele é indefinido (Fig. 5.39(b)).

Rede	N	$\langle K \rangle$	L	C
epidem. 91-95	226	5,04	6,99	0,45
SC 91-95	243	5,19	6,71	0,47
epidem. 96-00	279	4,84	8,5	0,48
SC 96-00	299	5,18	7,59	0,47
quadrada	256	7,26	7,47	0,47
triangular	256	5,56	7,44	0,41

**Tabela 5.6** Conectividade média  $\langle K \rangle$ , comprimento do caminho médio  $L$  e coeficiente de *clustering* da rede  $C$ , para as redes censitárias (SC) e epidemiológicas (epidem.) obtidas em Olinda e para redes regulares, quadrada e triangular.

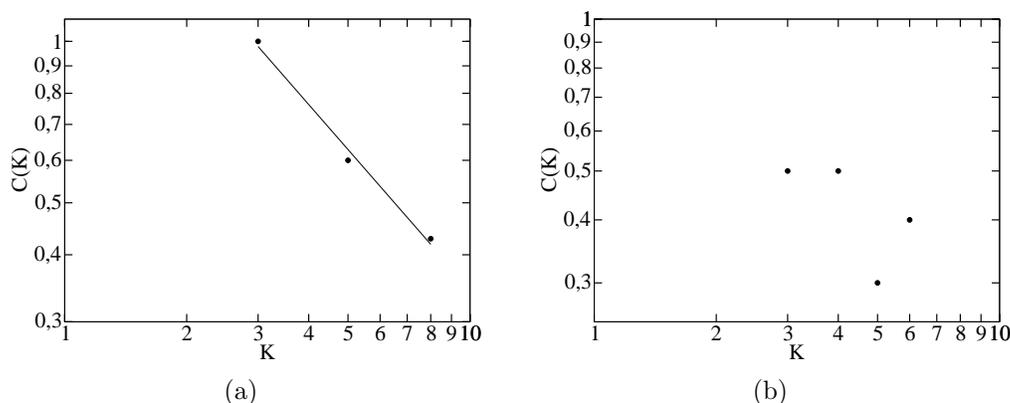


**Figura 5.38** Distribuições de conectividades  $K$  para a rede quadrada (a) e triangular (b).  $N = 256$  nós.

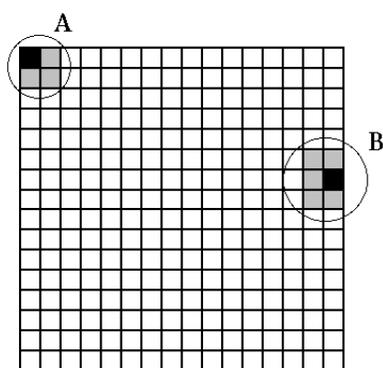
Os nós menos conectados da rede quadrada, como os nós menos conectados das redes de Olinda (Fig. 5.14) estão na fronteira (Fig. 5.40), reforçando a idéia de que o comportamento do tipo lei de potência ( $C(K) \sim K^{-1}$ ) encontrado para as redes obtidas em Olinda seja um efeito da fronteira bem definida e não de efeitos de hierarquia como definido em [92].

Na Fig 5.41, mostramos as densidades espectrais calculadas para as redes quadrada e triangular. Elas são assimétricas e possuem irregularidades, assemelhando-se com as densidades espectrais encontradas para as redes censitárias e epidemiológicas sem peso em Olinda (Fig. 5.17).

Uma propriedade que difere bastante as redes de Olinda das redes regulares é a distribuição de conectividades  $K$ . Em uma tentativa de encontrar uma distribuição gaussiana



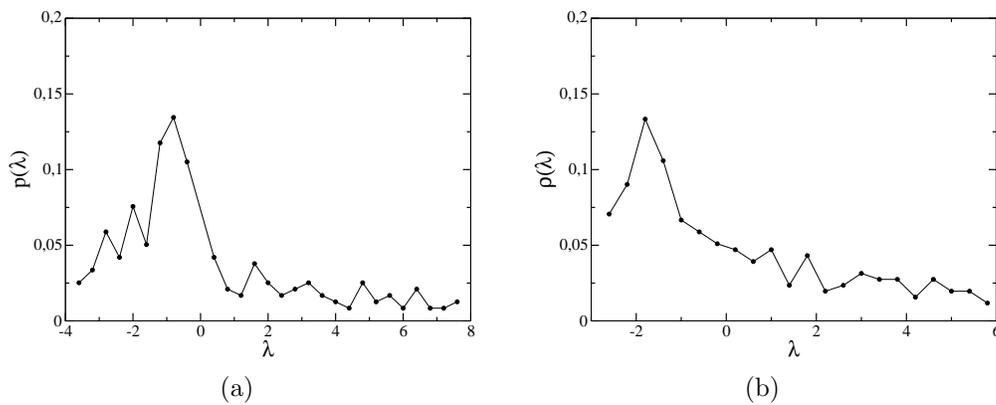
**Figura 5.39** Coeficiente de *clustering*  $C$  em função da conectividade  $K$  para a rede quadrada (a) e triangular (b) com  $N = 256$  nós. A inclinação da reta em (a) é igual a  $-0,87$ .



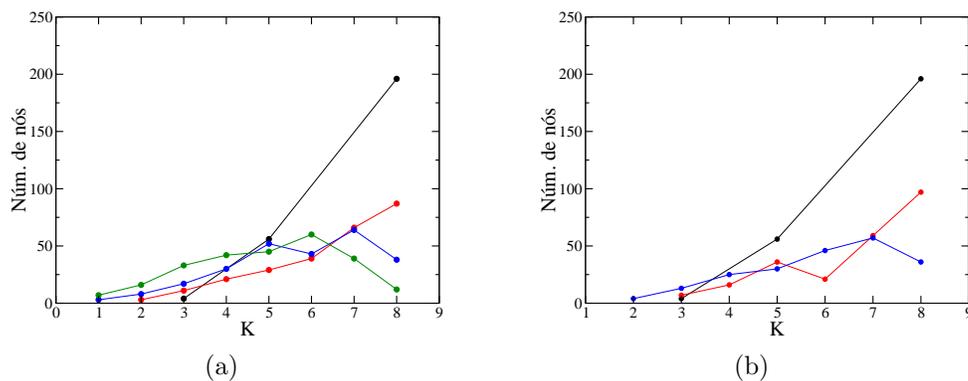
**Figura 5.40** Rede quadrada com  $N = 16 \times 16$  nós. A fronteira da rede possui os nós com os menores valores de conectividades  $K$ . Em **A** temos um exemplo de um sítio com conectividade  $K = 3$  e em **B** temos um outro exemplo de um sítio com conectividade  $K = 5$ .

para a conectividade  $K$  a partir de uma rede regular, similar as distribuições encontradas nas redes epidemiológica e total de Olinda (Fig. 5.13), retiramos aleatoriamente de uma rede quadrada conexões e nós. O efeito das exclusões para uma rede quadrada com  $N = 256$  e 830 conexões é apresentado na Fig. 5.42. Observamos que as exclusões aleatórias de algumas conexões e nós da rede, não levam a uma distribuição de conectividades  $K$  em forma de gaussiana como a encontrada em Olinda (Fig. 5.13).

A pesar das redes regulares terem a conectividade média  $\langle K \rangle$ , coeficiente de clustering médio  $C$  e o comprimento de caminho médio  $L$ , próximo dos valores obtidos para as redes de Olinda (Tabela 5.6), elas não são boas para descreverem o processo endêmico de tuberculose, pois apresentam diferentes distribuições para o coeficiente de clustering e para a conectividade.



**Figura 5.41** Densidades espectrais para as redes quadrada (a) e triangular (b).  $N = 256$  nós.

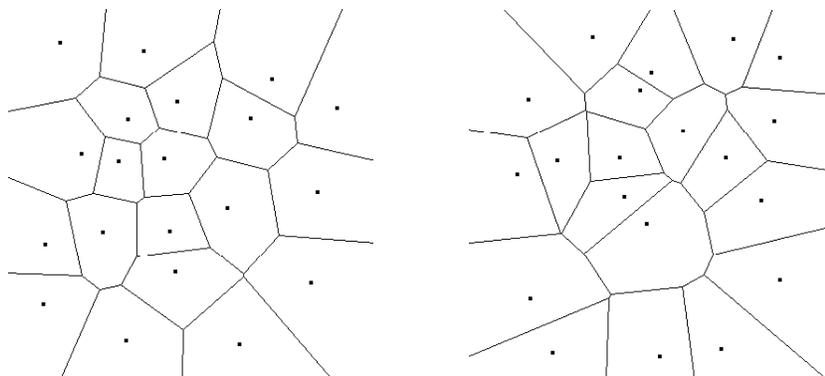


**Figura 5.42** Distribuição de conectividades  $K$  para uma rede quadrada com  $N = 256$  nós. As curvas mostram o efeito da exclusão aleatória de conexões (a) e de nós (b) da rede. O número de conexões excluídas em (a) foram: 0 conexões (linha preta), 20 conexões (linha vermelha), 30 conexões (linha azul). O número de nós excluído em (b) foram: 0 nós (linha preta), 100 nós (linha vermelha), 200 (linha azul) e 300 nós (linha verde).

### 5.4.2 Diagramas de Voronoi

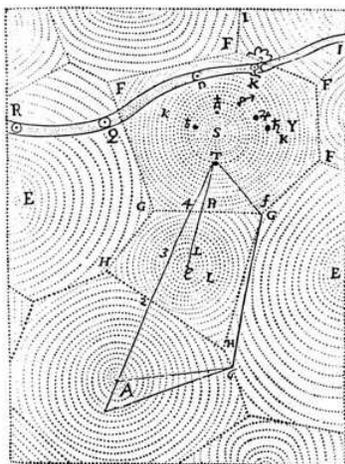
Pela definição matemática, os diagramas de Voronoi [109] dividem um plano com  $N$  pontos, em polígonos convexos, cada um contendo apenas o seu ponto gerador, como mostra a Fig. 5.43. A fronteira entre dois polígonos adjacentes é um segmento de linha perpendicular ao segmento de linha unindo os seus pontos. O mais interessante é que qualquer ponto em um dado polígono está mais próximo do seu ponto gerador do que de qualquer um dos outros  $N-1$  pontos geradores. Por exemplo, imagine que um conjunto de  $N$  pontos represente as informações espaciais de cada um dos restaurantes em uma cidade. Como seria possível encontrar qual a área de cobertura de cada restaurante? Para resolver este problema, seria necessário determinarmos os diferentes conjuntos e consumidores

encontrados próximos a cada um dos restaurantes. Os diagramas de Voronoi fornecem exatamente a solução para este problema.



**Figura 5.43** Exemplos de diagramas de Voronoi (a) e (b) para dois conjuntos com  $N = 20$  pontos. Em cada polígono existe apenas o seu ponto gerador.

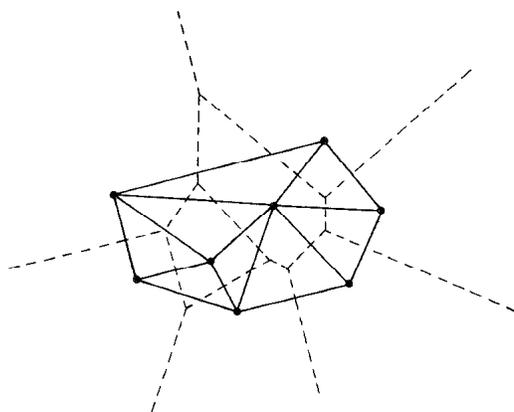
Em 1644, Descartes (“Le Monde de Mr. Descartes”) já usava diagramas deste tipo para analisar a influência gravitacional das estrelas, como mostra a Fig. 5.44. No Rio de Janeiro (capital), os diagramas de Voronoi foram utilizados para localizar a área de abrangência de cada um dos hospitais públicos do município [110]. A partir dos diagramas de Voronoi, também é possível determinar por exemplo, a área espacial que deverá ser alcançada para cada um dos pontos de uma rede sem fio (“wireless”). Existem dezenas de aplicações para os Diagramas de Voronoi que podem ser encontradas na Ref. [111].



**Figura 5.44** Trabalho feito por Descartes (1644) para a análise da influência gravitacional das estrelas. Podemos observar diagramas tipo Voronoi.

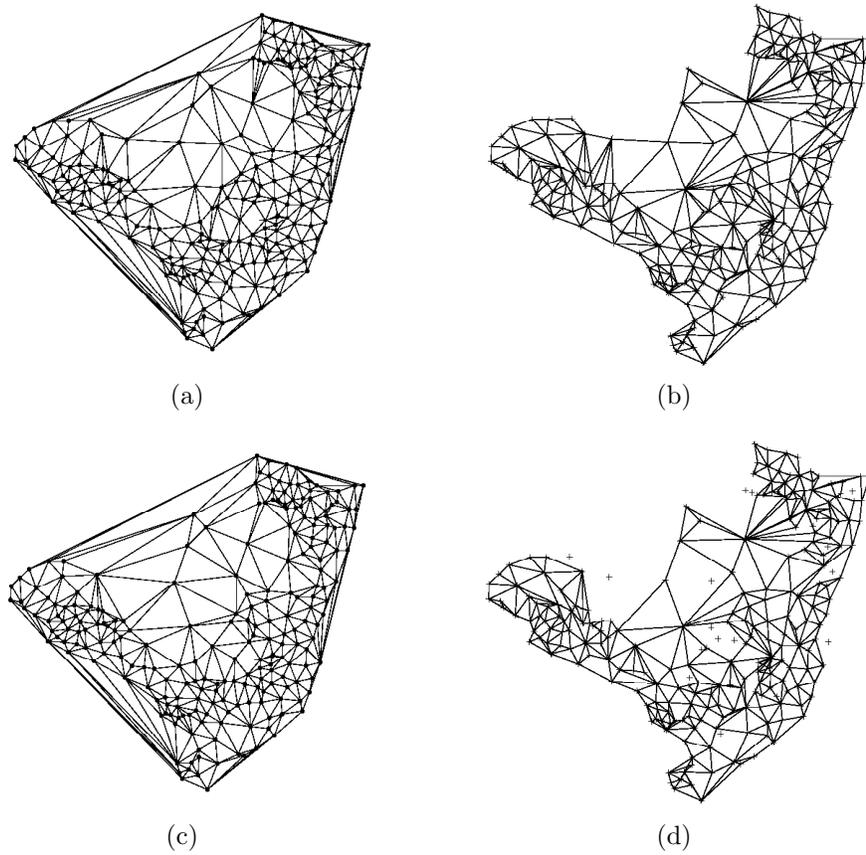
Como os diagramas de Voronoi são criados baseados no critério de proximidade com o seu ponto gerador, que de certa forma assemelham-se aos centróides dos setores censitários encontrados em Olinda (Fig. 5.2), na construção dos diagramas de Voronoi utilizamos estes centróides como pontos geradores para comparar as características de complexidades destes diagramas com as das redes de Olinda. O procedimento usado para a construção da rede de Voronoi foi o mesmo utilizado na construção das redes de Olinda, conectando-se os pares de diagramas de Voronoi que têm pelo menos uma fronteira em comum, a conexão une os pontos geradores (centróides) de cada diagrama.

O dual do diagrama de Voronoi é a triangulação de Delaunay [112] e podemos utilizá-la como rotina para a construção das redes. A triangulação de Delaunay conecta justamente dois pontos geradores que possuem uma borda dos seus diagramas de Voronoi em comum, como mostra a Fig. 5.45.

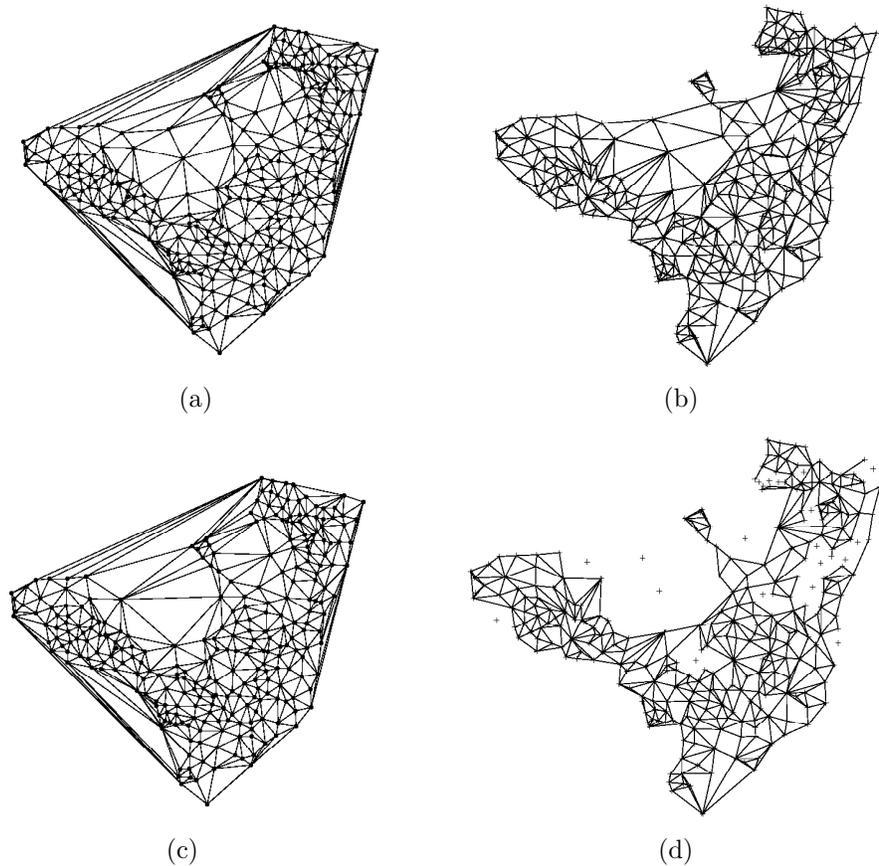


**Figura 5.45** Diagramas de Voronoi (linha tracejada) e triangulação de Delaunay (linha sólida) para um conjunto de 8 pontos geradores [109].

Assim usamos a triangulação de Delaunay para construir a rede de Voronoi a partir da distribuição espacial dos centróides de Olinda. As redes de Voronoi geradas para a nossa análise são mostrados nas Figuras 5.46(a), 5.46(c), 5.47(a) e 5.47(c).



**Figura 5.46** Redes de Voronoi (a) e (c) construídas a partir da distribuição dos centróides das redes de Olinda usando a triangularização de Delaunay para a rede censitária (b) e rede epidemiológica (d) respectivamente no período 91-95.



**Figura 5.47** Redes de Voronoi (a) e (c) construídas a partir da distribuição dos centróides das redes de Olinda usando a triangularização de Delaunay para a rede censitária (b) e rede epidemiológica (d) respectivamente no período 96-00.

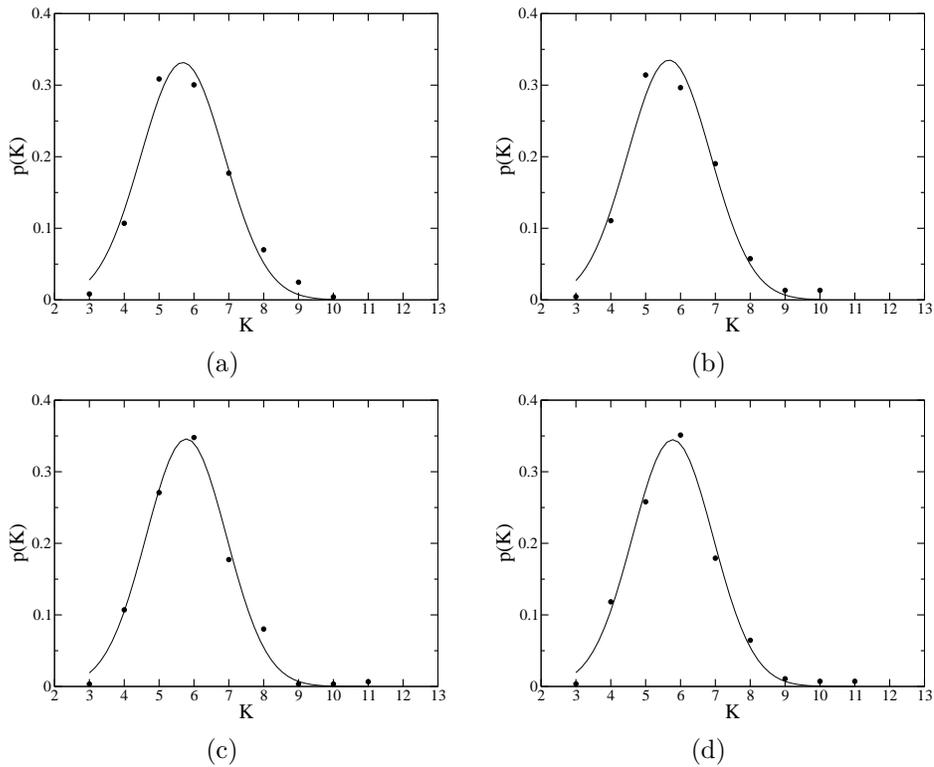
As redes de Olinda e as respectivas redes criadas a partir dos diagramas de Voronoi, mostram características topológicas bem próximas, como mostra a Tabela 5.7. A maior (15%) conectividade média para as redes de Voronoi quando comparada com as respectivas redes de Olinda, leva também a um menor comprimento do caminho médio  $L$  para estas redes ( $\sim 20\%$ ). Já o coeficiente de *clustering*  $C$  para as redes formadas a partir dos diagramas de Voronoi são em média  $\sim 10\%$  menores do que os coeficientes de *clustering*  $C$  encontrados para as respectivas redes de Olinda.

Na análise da distribuição de conectividades  $K$ , podemos observar uma distribuição gaussiana para todas as redes formadas a partir dos diagramas de Voronoi, veja a Fig.

5.48. Estas distribuições são semelhantes as distribuições de conectividades apresentadas para as redes censitárias e epidemiológicas de Olinda (Fig. 5.13).

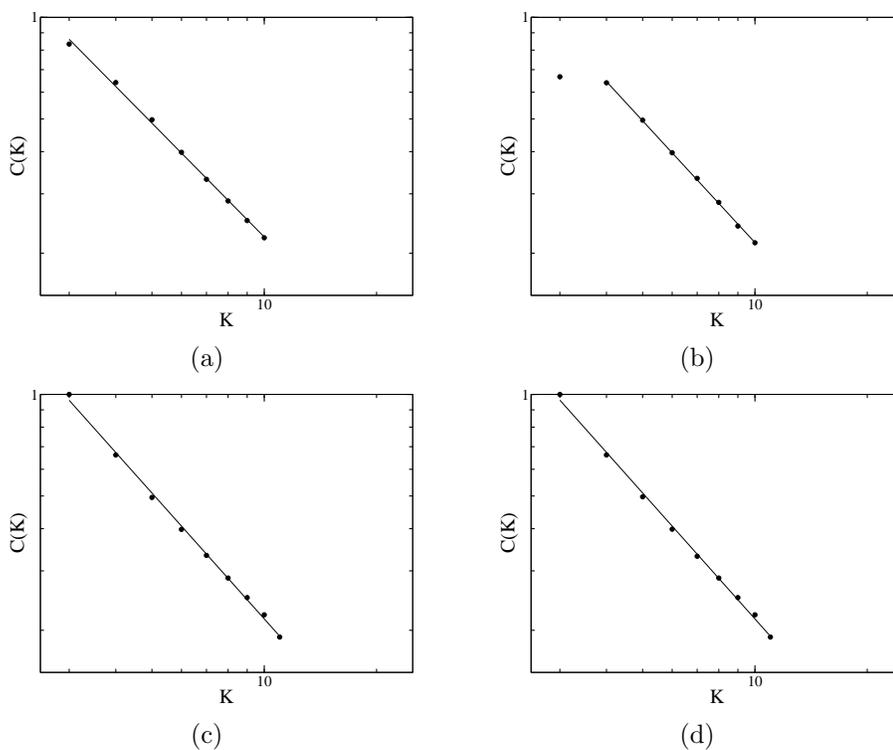
Rede	$N$	$\langle K \rangle$	$\langle K \rangle$ (Voronoi)	$L$	$L$ (Voronoi)	$C$	$C$ (Voronoi)
SC 91-95	243	5,19	5,86	6,71	6,09	0,47	0,43
epidem. 91-95	226	5,04	5,85	6,99	5,91	0,45	0,43
SC 96-00	299	5,18	5,90	7,59	6,48	0,47	0,43
epidem. 96-00	279	4,84	5,89	8,5	6,13	0,48	0,43

**Tabela 5.7** Conectividade média  $\langle K \rangle$ , comprimento do caminho médio  $L$  e coeficiente de *clustering*  $C$ , para as redes censitárias (SC) e epidemiológicas (epidem.) obtidas em Olinda e para as respectivas redes Voronoi nos períodos 1991 a 1995 e 1996 a 2000.



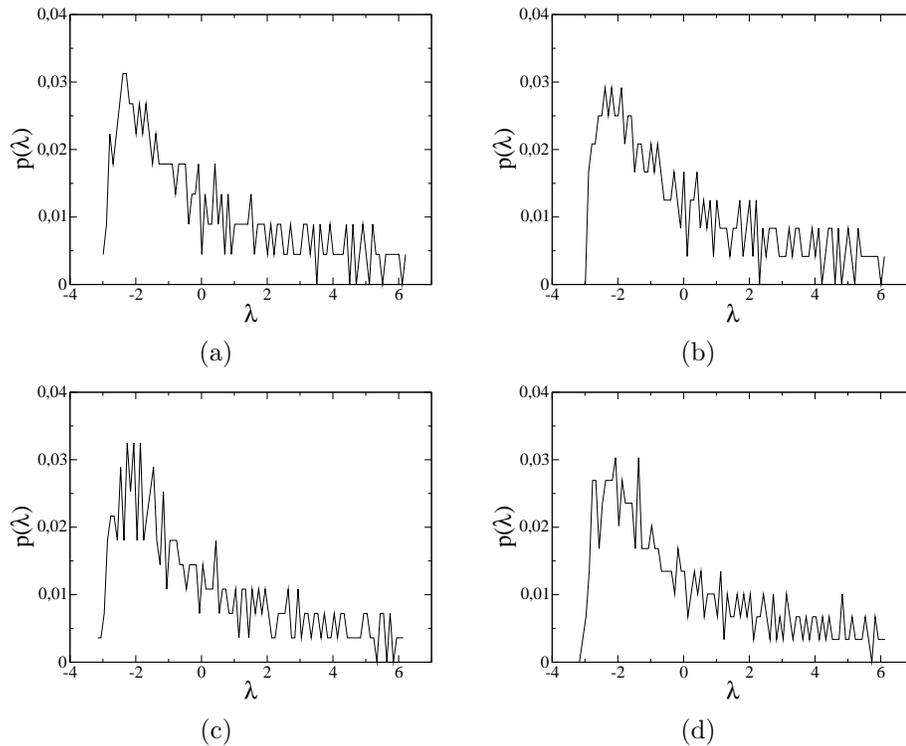
**Figura 5.48** Distribuição de conectividades  $K$  para as redes de Voronoi geradas a partir dos nós das redes de Olinda. Nós da rede censitária 91-95 (a) ( $cc=0,99$ ), nós da rede epidemiológica 91-95 (b) ( $cc=0,99$ ), nós da rede censitária 96-00 (c) ( $cc=0,99$ ) e nós da rede epidemiológica 96-00 (d) ( $cc=0,99$ ). Todas as distribuições de conectividades  $K$  são gaussianas.  $cc$  = coeficiente de correlação.

O coeficiente de *clustering*  $C$  em função da conectividade  $K$  para todas as redes de Voronoi formadas a partir dos nós das redes de Olinda, obedecem um decaimento em lei de potência, Fig. 5.49, assim como obtido para as redes de Olinda (Fig. 5.15). No entanto, coeficiente de *clustering*  $C$  em função da conectividade  $K$  não obedece a uma lei de potência do tipo  $C(K) \sim K^{-1}$  como nas redes obtidas em Olinda (Fig. 5.15), comportamento este devido a fronteira bem definida dos mesmos. Nos diagramas de Voronoi, um número menor de sítios estão localizados nas fronteiras (bordas) das redes (Figuras 5.46(a), 5.46(c), 5.47(a) e 5.47(c)) e esta deve ser a razão da diferença nos valores dos expoentes que são menores que  $-1$ .



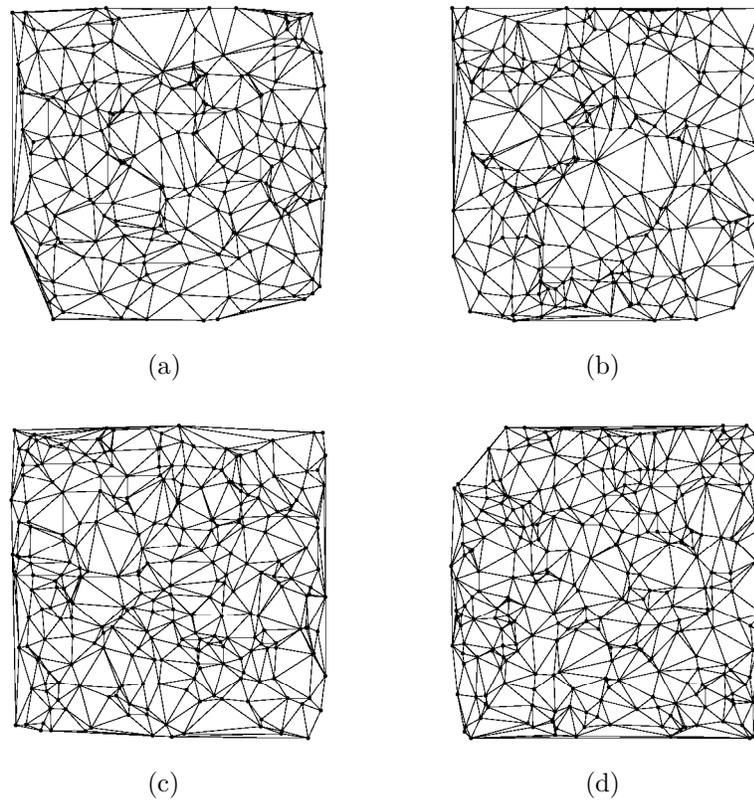
**Figura 5.49** Coeficiente de *clustering*  $C$  em função da conectividade  $K$  para as redes de Voronoi geradas a partir dos nós das redes de Olinda. Nós da rede censitária 91-95 (a), nós da rede epidemiológica 91-95 (b), nós da rede censitária 96-00 (c) e nós da rede epidemiológica 96-00 (d). Inclinações dos ajustes: (a)  $a = -1,19$ , (b)  $a = -1,12$ , (c)  $a = -1,23$  e (d)  $a = -1,24$ .

A análise das densidades espectrais para as redes formadas pelos diagrama de Voronoi, como mostra a Fig. 5.50, revelam um comportamento muito similar às densidades espectrais encontradas para as redes topológicas obtidas em Olinda (Fig. 5.17), elas são assimétricas e também possuem várias irregularidades.



**Figura 5.50** Densidades espectrais para as redes de Voronoi geradas a partir dos nós das redes em Olinda. Nós da rede censitária 91-95 (a), nós da rede epidemiológica 91-95 (b), nós da rede censitária 96-00 (c) e nós da rede epidemiológica 96-00 (d).

Também construímos diagramas de Voronoi a partir de nós posicionados aleatoriamente no espaço. Foram construídas 4 redes com os mesmos números  $N$  de nós das redes de Olinda,  $N = 226$  (rede epidemiológica 91-95),  $N = 243$  (rede censitária 91-95),  $N = 279$  (rede epidemiológica 96-00) e  $N = 299$  (rede censitária 96-00), como mostra a Fig. 5.51. Os resultados obtidos para as redes construídas com os diagramas de Voronoi a partir de pontos geradores aleatoriamente distribuídos no espaço foram similares aos resultados encontrados para as redes de Voronoi construídas a partir dos nós das redes de Olinda.



**Figura 5.51** Redes construídas com a triangularização de Delaunay a partir de nós posicionados aleatoriamente no espaço. (a)  $N = 226$ , (b)  $N = 243$ , (c)  $N = 279$  e (d)  $N = 299$  pontos geradores.

O estudo das redes formadas a partir dos diagramas de Voronoi (Figuras 5.46, 5.47 e 5.51) mostrou que estas redes tem propriedades semelhantes às redes de Olinda (Figuras 5.4 e 5.6). As rede de Voronoi servem portanto, de base para uma posterior modelagem do processo endêmico de tuberculose em Olinda, onde as interações e as vizinhanças serem definidas em cima da topologia destas redes. Um estudo futuro utilizando redes de Voronoi com um número  $N$  maior de nós (pontos geradores) também poderá dar uma intuição de como as propriedades topológicas encontradas nas redes de Olinda mudam com o tamanho da rede. Importante por exemplo na análise do comprimento do caminho médio  $L$  em função do número  $N$  de nós da rede, que pode indicar dentre outras coisa o comportamento encontrado em redes de mundo pequeno (seção 5.2.2).

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Um dos objetivos principais deste trabalho de Tese foi desenvolver um modelo matemático que captasse a dinâmica de interação entre o bacilo de Koch e o hospedeiro, que leva à formação do granuloma como resposta imunológica na tuberculose. Para isto nos baseamos na teoria de Algood e colaboradores [11] que postula que os elementos fundamentais para a formação da estrutura granulomatosa na tuberculose são os macrófagos, as células  $T_H1$ , as quimiocinas e as citocinas gama interferon ( $IFN-\gamma$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  ( $TNF-\alpha$ ). Utilizamos a aproximação de autômatos celulares com difusão celular para a modelagem matemática da interação entre estas células através da sinalização de quimiocinas e citocinas. O modelo matemático proposto reproduz os três comportamentos observados na natureza como respostas ao bacilo de Koch: a eliminação, situação na qual as bactérias são eliminadas em poucos meses com a formação do granuloma; a contenção, na qual as bactérias permanecem por vários anos represadas no granuloma antes de serem eliminadas; e a disseminação, na qual as bactérias não são contidas pelo granuloma e disseminam-se por todo sistema. A distribuição espacial das células no granuloma obtido com o modelo matemático é similar à distribuição de células encontrada em humanos, onde os macrófagos estão localizados no centro e as células  $T_H1$  localizadas na periferia. Através da análise do espaço de parâmetros do modelo, observamos que o principal regulador das três dinâmicas é o limiar de ativação do  $IFN-\gamma$  ( $\theta_{IFN-\gamma}$ ), que determina qual é a quantidade mínima desta citocina necessária para a ativação do macrófago infectado. As dinâmicas de eliminação e contenção da bactéria são obtidas para valores pequenos ( $\theta(1)$ ) de  $\theta_{IFN-\gamma}$ , enquanto que a dinâmica de disseminação da bactéria se estabelece para os valores maiores de  $\theta_{IFN-\gamma}$  ( $\theta_{IFN-\gamma} \sim \theta(102)$  unidades) (ver Tabela 4.2), ou seja, quando há desensibilização do macrófago infectado em relação ao sinal do  $IFN-\gamma$ . Alguns experimentos mostram que camundongos geneticamente modificados para não produzirem  $IFN-\gamma$ , não conseguem controlar o crescimento das bactérias e desenvolvem a tuberculose crônica [52], resultados que são reproduzidos pelo modelo matemático para  $\theta_{IFN-\gamma} \gg 0$ , regime no qual ocorre a disseminação de bactérias.

O modelo aqui introduzido ao descrever ao longo do tempo as distribuições espaciais

das concentrações das citocinas, assume papel preditivo importante, já que o perfil de distribuição espacial das concentrações de citocinas em experimentos “in vitro” ou “ex-vivo”, não pode ser obtido facilmente e nem detalhadamente, como seria necessário para o entendimento do papel dos sinalizadores na resposta imunológica ao bacilo de Koch. Desta forma, estes resultados além de descreverem o que pode estar ocorrendo na natureza, permitem desenhar experimentos animais que validem esta informação. Nos três regimes dinâmicos obtidos com o modelo (contenção, eliminação e disseminação) os valores mais altos de concentração das citocinas se localizam próximos a suas fontes celulares, que estão no centro do granuloma no caso das quimiocinas e TNF- $\alpha$  que são produzidos em sua maior parte pelos macrófagos infectados, e na periferia do granuloma para o IFN- $\gamma$  produzido pelas células T<sub>H</sub>1. Estes perfis de distribuição espacial de concentrações de citocinas obtidos através da modelagem funcionam também como uma espécie de “raio-x” para o granuloma. Por exemplo, através do gradiente de concentração de quimiocinas e TNF- $\alpha$  podemos detectar a formação de novos sítios de infecção que podem vir a dar origem a outros granulomas. Observamos também que o papel da “coroa” de IFN- $\gamma$  formada na periferia do granuloma, é impedir o crescimento de bactérias no regime de contenção, ao passo que esta mesma “coroa” no regime de disseminação não impede o crescimento das bactérias devido a falta de sensibilidade do macrófago ao sinal de IFN- $\gamma$ .

Estes resultados do nosso trabalho de Tese exemplificam a importância da interação multidisciplinar e da modelagem nos avanços do entendimento dos mecanismos subjacentes à resposta imunológica a micobactéria de tuberculose. A diferença entre o modelo proposto neste trabalho e outros modelos propostos na literatura que também reproduzem as três dinâmicas [69–72] é que nosso modelo leva em conta os efeitos do TNF- $\alpha$  no estudo da resposta imunológica ao bacilo de Koch, um aspecto não considerado nos outros modelos. Resultados obtidos de experimentos com camundongos, mostram que a neutralização da produção de TNF- $\alpha$ , leva a má formação de granulomas e conseqüentemente a uma resposta imunológica ineficaz para a micobactéria de tuberculose [11], levando à tuberculose crônica e morte do animal [86]. A neutralização do TNF- $\alpha$  dá origem a formação de um granuloma difuso que não impede a disseminação das bactérias. Tal como nos experimentos com animais, os resultados obtidos com o modelo de autômatos celulares proposto nesta Tese mostram que o TNF- $\alpha$  é de fundamental importância na manutenção do granuloma: quando simulamos a neutralização do TNF- $\alpha$  obtemos a formação de um granuloma instável, que posteriormente fragmenta-se em vários granulomas menores. O entendimento da importância desta quimiocina no modelo de autômatos, só foi possível

com a análise da evolução temporal das distribuições espaciais das concentrações de quimiocinas na rede. Esta análise indica que depois de neutralizado o  $\text{TNF-}\alpha$ , a concentração de quimiocinas na rede (tecido) se dá de forma menos espalhada em torno do centro do granuloma, o que leva às sucessivas divisões do granuloma. Esta fragmentação do granuloma inicial em vários granulomas menores permite que as bactérias se espalhem pelo sistema, o que também está de acordo com os resultados experimentais. Se por um lado estes resultados sobre a importância do  $\text{TNF-}\alpha$  estão de acordo com os resultados experimentais, eles contrastam com os resultados obtidos no trabalho matemático elaborado por Segovia-Juarez e colaboradores [73], no qual quimiocinas produzidas somente pelos macrófagos infectados são suficientes para a formação e manutenção do granuloma.

Outros resultados importantes obtidos com o modelo de autômatos celulares proposto nesta Tese se referem à reprodução qualitativa da evolução temporal do número de micobactérias [81] e do número de células T CD4 [82], durante o processo de contenção tal como observado nos camundongos. As diferenças quantitativas encontradas nos resultados (ver Fig. 4.29) estão relacionadas com o fato de que a contagem de células experimentalmente é feita por pulmão de camundongo e não por granuloma e no nosso caso estamos trabalhando apenas com um granuloma. Como a infecção produzida nos camundongos em geral leva a formação de mais de um granuloma (em média de sete a dez granulomas), esta pode ser a principal origem das diferenças quantitativas observadas entre os resultados teóricos e experimentais. Para validar esta hipótese, buscaremos simular a formação do número médio de granulomas observado experimentalmente em camundongos. Outro fator importante que pode ter influenciado o resultado quantitativo é o fato de modelarmos apenas uma seção bidimensional do tecido pulmonar, enquanto que na natureza os granulomas têm estrutura tridimensional. A dimensionalidade adotada na modelagem pode estar contribuindo para a obtenção de um número muito menor de células do que o encontrado experimentalmente.

Os resultados surpreendentes obtidos com este modelo simples nos incitam a aprimorar ainda mais este tipo de modelagem. No caso do modelo proposto, poderemos melhorar as escalas de tempo utilizadas, guiando-nos por resultados experimentais, como por exemplo, a partir de comparações feitas entre as escalas de tempo da evolução temporal do número de bactérias no modelo e no experimento. A validação dos resultados teóricos através da reprodução de resultados experimentais, serve de motivação também para uma posterior melhoria da modelagem incluindo outros elementos não considerados aqui.

Atualmente estamos trabalhando na proposta de um modelo mais complexo do que

o modelo apresentado nesta Tese. Este novo modelo inclui outros tipos celulares que não foram considerados no modelo inicial: as células T CD8<sup>+</sup> e as células T<sub>H</sub>2. Ao incluirmos estas células, também é necessário incluir as citocinas IL-4, IL-10 e IL-12, que estão associadas com a sinalização destas células e com os processos de diferenciação das células T<sub>H</sub>0. Com o enriquecimento do modelo, a idéia é tentar reproduzir outros resultados experimentais relacionados com o comportamento destas células e suas citocinas. A inclusão das células T<sub>H</sub>2 no modelo, nos permitirá também estudar o papel do balanço na produção de células tipo T<sub>H</sub>1 e células tipo T<sub>H</sub>2 na determinação da resposta imunológica final para a tuberculose. Numa etapa posterior pretendemos incluir nestes modelos moléculas de adesão entre as células que tornam mais fortes a adesão entre células do mesmo tipo e mais fraca a adesão entre tipos celulares diferentes. Este estudo será de grande importância para entender melhor os experimentos relacionados com o granuloma de tuberculose em camundongos, uma vez que se observa nos mesmos, a presença de agregados constituídos de linfócitos [11, 81]. As moléculas de adesão entre as células também são de grande importância no estudo da formação de granulomas na ausência de quimiocinas e de citocinas.

Outro trabalho desenvolvido ao longo desta Tese foi a análise do grau de complexidade das redes epidemiológicas obtidas a partir do estudo do processo endêmico de TB em Olinda analisando a distribuição anual de casos de tuberculose por setor censitário. Vários trabalhos recentes na literatura estudam do ponto de vista teórico a propagação de epidemias através dos modelos SIR, SIS, etc [94, 103–107], em diferentes redes complexas, sem analisar especificamente epidemias reais, nem justificar o tipo de rede utilizada. Nesta Tese, analisamos as propriedades de redes complexas obtidas a partir do estudo do processo endêmico de TB e da análise da rede de conexões entre SC que sustentam o processo endêmico. O estudo da distribuição espacial de conectividades destas redes epidemiológicas mostrou que as mesmas são muito semelhantes às redes censitárias (rede que conecta todos os SC vizinhos), com propriedades semelhantes de redes mundo pequeno: a distribuição de conectividades  $K$  segue uma lei gaussiana, o caminho médio  $L$  entre 2 sítios quaisquer é pequeno e as vizinhanças dos nós são essencialmente locais. Observamos também que as redes epidemiológicas de Olinda, exibem propriedades topológicas semelhantes aos diagramas de Voronoi equivalentes. Estes resultados são importantes para uma posterior modelagem do processo endêmico de TB, pois mostram que as redes censitárias de Olinda (que diferem em 7% dos nós das redes epidemiológicas) podem ser simuladas por diagramas de Voronoi. Sendo assim, nosso estudo serviu não só para

a caracterização de uma rede epidemiológica real, como também serviu de pilar para uma posterior modelagem de disseminação da TB em Olinda. A descrição do processo de disseminação de TB numa população como a de Olinda deverá ser baseada em sete estágios clínicos da doença e nas regras adotadas na modelagem realizada recentemente por Macedo, Ruffino Neto e Zorzenon dos Santos [113] e buscarão reproduzir os resultados obtidos por Zorzenon dos Santos et al [12].

Também analisamos a complexidade das redes epidemiológicas de Olinda quando atribuímos pesos ( $S^*$ ) aos nós (centros geométricos dos setores censitários), correspondendo ao número de casos de tuberculose acumulados no período analisado (91-95 ou 96-00). Em função dos pesos dos nós, definimos diferentes pesos para as conexões entre dois nós quaisquer, já que a análise de redes com pesos na literatura se baseia em redes com pesos nas conexões e não nos nós. Com estas definições de pesos para as conexões, realizamos a análise usual encontrada na literatura para grafos com pesos nas ligações [96, 108], a partir da qual obtivemos as distribuições de novos pesos para os nós ( $S$ ). A comparação das distribuições reais  $P(S)$  e das obtidas das diferentes escolhas de  $P(S)$  e das distribuições de  $S(K)$  com  $S^*(K)$  nos permitiu escolher as melhores definições para os pesos das conexões, onde  $K$  é a conectividade do setor censitário (nó da rede). Das comparações feitas, pudemos observar que as distribuições de pesos  $W(2)$ ,  $W(4)$ ,  $W(8)$  são as que mais se aproximam das distribuições em lei de potência, observadas para as distribuições de  $S^*$  (Fig. 5.18). Já a comparação das distribuições de  $S(K)$  com  $S^*(K)$ , mostram que as definições de peso  $W(2)$ ,  $W(3)$  e  $W(4)$  são as que mais se aproximam do caso real, onde  $S^*$  é maior para nós que tem uma conectividade intermediária (Fig. 5.19). Sendo assim, consideramos  $W(2)$  e  $W(4)$  as definições de pesos mais apropriadas, pois são capazes de reproduzir  $P(S^*)$  e  $S^*(K)$ , ambas envolvem o produto dos pesos.

O estudo da distribuição do coeficiente de clustering em função da conectividade para as redes epidemiológicas com e sem peso de Olinda,  $C(K)$  e  $C^w(K)$  respectivamente, mostrou uma lei do tipo  $C(K) \sim K^{-1}$ . Em outras redes complexas encontradas na literatura, este tipo de comportamento é associado com as redes hierárquicas [92]. Nas redes epidemiológicas de Olinda com e sem peso, observamos que o decaimento em lei de potência é devido à fronteira bem definida da rede e não a efeitos de hierarquia. Das comparações feitas com outras redes complexas observamos também que as densidades espectrais calculadas para redes epidemiológicas de Olinda, apresentam semelhança com as densidades espectrais encontradas para as redes mundo pequeno e com as redes de Voronoi. Já as densidades espectrais calculadas para as redes epidemiológicas de Olinda

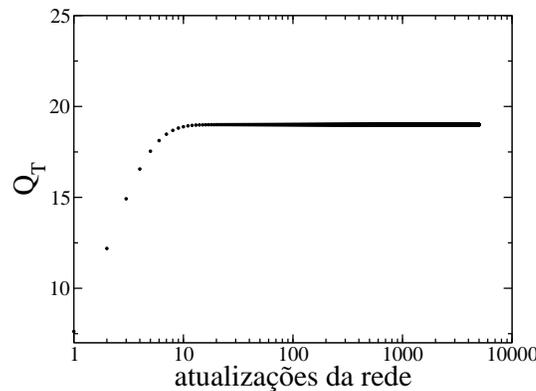
com pesos, são mais semelhantes às densidades espectrais para as redes livres de escala. Futuramente pretendemos fazer um estudo mais aprofundado, através dos autovalores principais das matrizes de conectividades e das matrizes de pesos, para entender melhor as origens dos espectros encontrados e as suas relações com as redes epidemiológicas com e sem peso.

Os trabalhos relatando os principais resultados obtidos nesta Tese estão em fase de redação e serão submetidos em breve para publicações em revistas internacionais especializadas

## ESCALA DE TEMPO

Cada passo de tempo de simulação é associada a uma escala de tempo real, estimada analisando-se o comportamento da concentração total ( $Q_T$ ) de quimiocinas na rede, concentração esta, que estimula a entrada das células recrutadas. As quimiocinas são produzidas pelos macrófagos infectados com a micobactéria e pelos macrófagos residentes (não infectados) na presença da citocina TNF- $\alpha$ . A difusão das quimiocinas (Apêndice C) auxilia na migração das células do sistema imunológico em direção ao sítio de infecção. No modelo os macrófagos são as primeiras células a serem recrutadas após a infecção, entram na rede a partir do momento que  $Q_T$  atinge o limiar  $\theta_{rec}$  de entrada.  $Q_T$  é medido somando-se a concentração das quimiocinas de todos os sítios da rede.

O valor de  $\theta_{rec}$  é escolhido arbitrariamente e neste caso corresponde a 95% do valor de saturação atingido pela concentração total de quimiocinas na rede,  $Q_T(n \gg 0)$ , onde  $n$  é igual ao número de atualizações da rede. Analisando a produção das quimiocinas de uma única célula infectada, cujo comportamento é mostrado na Fig. A.1, 95% de  $Q_T(n \gg 0)$ , valor que é atingido para  $n \sim 6$  atualizações da rede e equivale a 18,2.



**Figura A.1** Concentração total de quimiocinas  $Q_T$  produzidas por um único macrófago infectado em função do número  $n$  de atualizações da rede. As equações de difusão e degradação das quimiocinas, bem como a quantidade de quimiocinas produzidas pelo macrófago infectado estão descritos no Apêndice C.

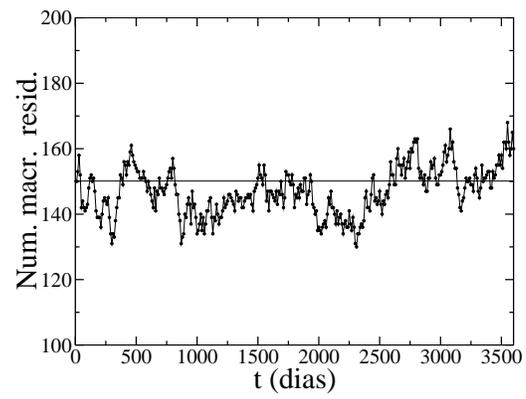
Biologicamente a entrada no tecido das primeiras células recrutadas da resposta inata acontece, em geral, algumas horas após a infecção inicial [16]. Considerando que no modelo, a entrada das células recrutadas se dá 2 horas após a infecção inicial, cada atualização de rede, corresponderá a 18 minutos. Esta escala de tempo adotada inicialmente pode vir a ser melhorada a partir da comparação dos resultados obtidos do modelo com os resultados encontrados experimentalmente.

# EVOLUÇÃO TEMPORAL DA POPULAÇÃO DE MACRÓFAGOS RESIDENTES

Os macrófagos residentes estão sempre presentes no tecido (rede) mesmo na ausência de infecção. Sendo assim o modelo prevê a existência de uma população basal aproximadamente constante na ausência de infecção.

Para cada novo macrófago residente que entra na rede, sorteamos o seu tempo de vida (3-12 meses) e o intervalo de tempo entre a entrada deste e do próximo macrófago residente. Este tempo de entrada futuro é escolhido aleatoriamente entre 3 e 12 meses, da mesma forma como é escolhido o tempo de vida para o macrófago. Esta dinâmica de realimentação garante uma população de macrófagos residentes em torno de uma população constante. Se o tempo de entrada futuro escolhido para o próximo macrófago residente for sempre maior do que o tempo de vida escolhido para o macrófago residente, o número total de macrófagos residentes na rede diminuirá. Se ao contrário, o tempo de entrada futuro escolhido para o próximo macrófago residente for sempre menor do que o tempo de vida escolhido para o macrófago residente, o número total de macrófagos residentes na rede aumenta. A entrada dos macrófagos residentes (população basal) é independente do recrutamento dos macrófagos devido a infecção, conforme a regra dos macrófagos alveolares na Seção 4.1.

Na ausência de infecção, o número de macrófagos residentes flutua em torno 150 macrófagos (Fig. B.1) que é o tamanho da população basal adotada arbitrariamente no modelo. Neste caso, os macrófagos apenas movem-se aleatoriamente pela rede até que seja esgotado o seu tempo de vida.



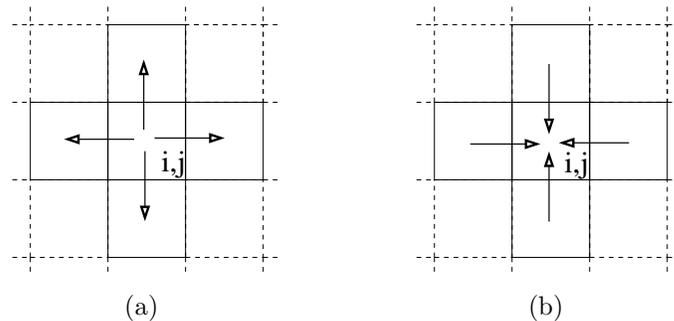
**Figura B.1** Número de macrófagos residentes na rede em função do tempo na ausência de infecção.

## DIFUSÃO DE SINALIZADORES

Os processos de difusão estão ligados a vários fenômenos na natureza, desde a formação de padrões intrigantes encontrados por exemplo em conchas marinhas e em pelagens de animais [114, 115], até a propagação do agradável perfume de uma rosa pelo ar.

A nível microscópico, a difusão é devida simplesmente ao movimento aleatório das moléculas. As moléculas colidem umas com as outras e desta forma tendem a difundir das regiões de alta concentração para as regiões de baixa concentração buscando atingir o estado estacionário [116].

Se pensarmos em uma difusão na rede, como na rede quadrada utilizada no modelo de AC para formação de granulomas de tuberculose, a cada passo de tempo, uma certa quantidade de sinalizador é transferido de um determinado sítio  $(i,j)$ , veja a Fig. C.1(a), para seus sítios vizinhos, mas a cada passo de tempo também, este mesmo sítio  $(i,j)$ , recebe sinalizadores transferidos da sua vizinhança mais próxima (Fig. C.1(b)).



**Figura C.1** Processo de difusão numa vizinhança de Von Neumann, onde ocorre a saída (a) e entrada (b) de sinalizadores em um sítio  $(i,j)$ . Este processo acontece em todos os sítios da rede.

Para simular a difusão dos sinalizadores (quimiocinas e citocinas) no modelo de AC usamos a equação C.1:

$$C_{i,j}(t+1) = C_{i,j}(t)(1-d) + \frac{d}{4} \left( \sum_{\text{Neumann}} C_{i',j'}(t) \right) \quad (\text{C.1})$$

A equação diz que a concentração  $C_{i,j}(t+1)$  do sinalizador presente no sítio  $(i, j)$  em  $t+1$ , é igual a quantidade de sinalizador que deixou o sítio (1º termo) mais a quantidade de sinalizador que o sítio recebeu da sua vizinhança de Neumann (2º termo). O coeficiente de difusão  $d$  corresponde a fração da quantidade do sinalizador transferido do sítio para a sua vizinhança. Esta equação é a mesma utilizada na aproximação matemática baseada em agentes para simular a formação de granulomas de tuberculose [70].

A equação C.1 pode ser obtida a partir da equação geral da conservação.

$$\frac{\partial C}{\partial t} - D \nabla^2 C = 0 \quad (\text{C.2})$$

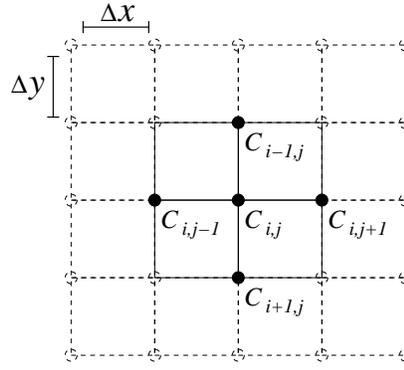
onde  $C$  representa a concentração do material e  $D$  é o coeficiente de difusão. No estado estacionário, a equação (C.2) reduz a:

$$\nabla^2 C = 0 \quad (\text{C.3})$$

a equação é conhecida como a equação de Laplace [117]. Em duas dimensões temos:

$$\nabla^2 C = \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} = 0 \quad (\text{C.4})$$

A discretização da rede surge naturalmente resolvendo a eq. C.4 por diferenças finitas [118–121], veja a Fig. C.2.



**Figura C.2** Solução de Laplace por diferenças finitas. Discretização da rede.

$$\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} = \frac{C_{i,j+1} - 2C_{i,j} + C_{i,j-1}}{(\Delta x)^2} \quad (\text{C.5})$$

e

$$\frac{\partial^2 C}{\partial y^2} = \frac{C_{i+1,j} - 2C_{i,j} + C_{i-1,j}}{(\Delta y)^2} \quad (\text{C.6})$$

substituindo (C.5) e (C.6) em (C.4), temos

$$\frac{C_{i,j+1} - 2C_{i,j} + C_{i,j-1}}{(\Delta x)^2} + \frac{C_{i+1,j} - 2C_{i,j} + C_{i-1,j}}{(\Delta y)^2} = 0 \quad (\text{C.7})$$

sendo  $\Delta x$  igual a  $\Delta y$  (Fig.C.2)

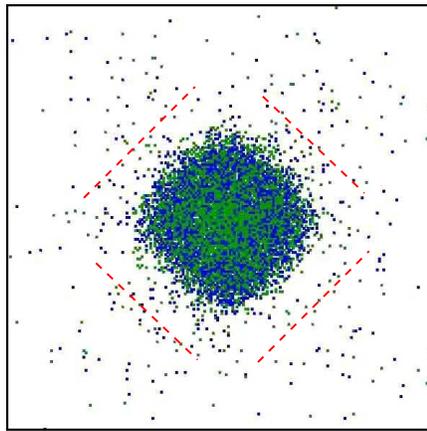
$$C_{i,j} = \frac{C_{i,j+1} + C_{i,j-1} + C_{i+1,j} + C_{i-1,j}}{4} \quad (\text{C.8})$$

Para o caso de  $d = 1$ , a equação C.1 se reduz a C.8. Onde,

$$C_{i,j+1} + C_{i,j-1} + C_{i+1,j} + C_{i-1,j} = \sum_{\text{Neumann}} C_{i',j'}$$

e o somatório leva em conta apenas os valores das concentrações dos primeiros vizinhos do sítio  $(i, j)$ . Quanto maior for o número de iterações, mais próximo o sistema se encontrará do estado estacionário.

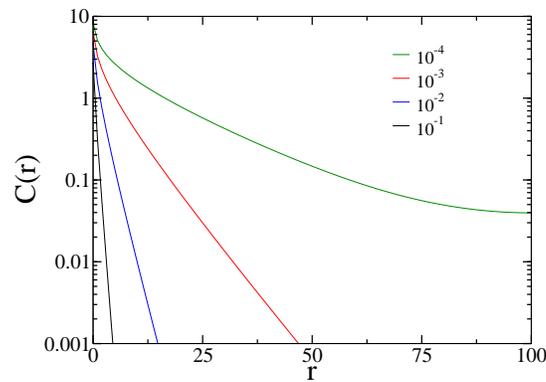
No modelo adotamos para todos os sinalizadores, a constante de difusão  $d = 0,4$  e de degradação  $deg = 0,001$  (veja a equação 4.4) com base no estudo apresentado a seguir, já que não encontramos na literatura resultados experimentais para os valores de  $d$  e  $deg$  que pudessem ser utilizados no modelo. Nas simulações preliminares da difusão de quimiocinas observamos alguns problemas com relação à migração (orientação) de células segundo o gradiente de concentração. As diferenças de concentrações de quimiocinas entre os sítios geradas pelos processos de difusão e degradação, não eram grandes o suficiente para que o movimento celular realizado devido ao gradiente de concentração levasse à formação do granuloma. Da expressão para a probabilidade de movimento (Equação 4.2) observamos que quanto menor a diferença de concentração das quimiocinas entre os sítios da vizinhança de Moore, mais o movimento celular se aproxima de uma caminhada aleatória. Para contornar este problema, utilizamos outra regra de movimento, onde o movimento celular agora é realizado com probabilidade  $p_{mov}$  para o sítio com maior concentração de quimiocinas na vizinhança de Moore, ou com probabilidade  $1 - p_{mov}$  para qualquer outro sítio da mesma vizinhança. Esta regra descreve melhor a migração para o sítio de infecção e formação do granuloma (Fig. C.3).



**Figura C.3** Simulação preliminar do modelo de AC. A linha vermelha tracejada mostra a influência da simetria da rede quadrada na distribuição espacial do granuloma. bactérias extracelulares (pixel laranja), célula  $T_H1$  (pixel azul), macrófago alveolar (pixel verde), macrófago infectado (pixel vermelho). A probabilidade de movimento utilizada é  $p_{mov} = 0,5$ .

Utilizando a probabilidade  $p_{mov}$  encontramos outro problema, observando o granuloma na Fig. C.3, podemos ver que a distribuição de células no mesmo é influenciada pela simetria da rede, que faz com que o granuloma assumira ligeiramente a forma de um quadrado (Fig. C.3).

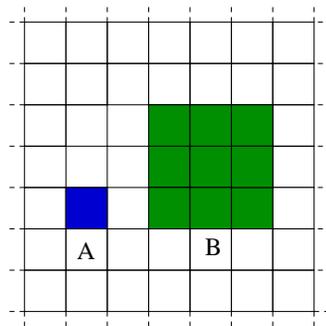
Após outra análise que realizamos, para tentar obter uma migração celular que leve a uma formação de granuloma sem a influência da simetria da rede, investimos novamente na probabilidade de movimento  $P_{i',j'} = Q_{i',j'} / \sum_{Moore\ i,j} Q_{i',j'}$  (Equação 4.2). Dos estudos feitos, concluímos que para que haja a formação do granuloma sem a simetria da rede, os processos de difusão e degradação deveriam ser executados na rede 10 vezes a cada passo de tempo e a constante de degradação passaria de 0,001 para 0,05. Sendo assim, enquanto os processos de difusão e degradação dos outros sinalizadores, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , ocorrem em toda a rede a cada 18 minutos, no mesmo intervalo de tempo, os processos de difusão e degradação das quimiocinas são executados 10 vezes em toda a rede. O aumentando na constante de degradação na Equação 4.4, aumenta a diferença de concentração de quimiocinas entre um sítio e outro (Fig. C.4) e conseqüentemente maior será a probabilidade de movimento (equação 4.2) em direção a fonte de quimiocinas. Como vimos no início do Apêndice, para  $deg = 0,001$  a migração das células segundo o gradiente de concentração não levava a formação de granulomas.



**Figura C.4** Concentração de quimiocinas em função da distância  $r$ , medida em número de sítios até a fonte, para diversos valores de  $deg$ . A cada passo de tempo produz-se 1 unidade de sinalizador no sítio fonte. A concentração foi medida para cada  $r$  no estado estacionário.

## DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE CÉLULAS SUJEITAS A UM GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO

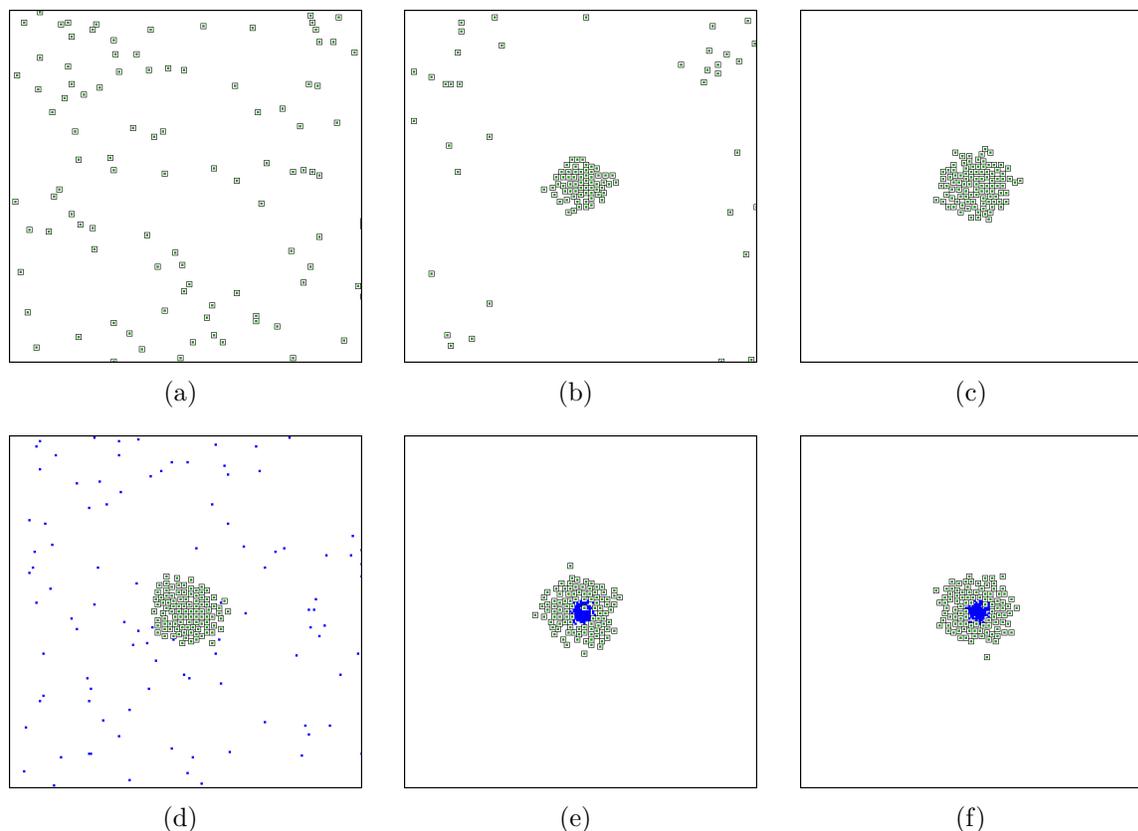
Aqui mostramos os resultados do estudo realizado para o processo de difusão quando adotamos células com tamanhos diferentes. Neste caso as células movimentam-se em um rede quadrada ( $201 \times 201$ ) de acordo com um gradiente de concentração, como descrito no modelo de AC (Capítulo 4). Para simular o gradiente de concentração que irá direcionar a migração celular, colocamos uma fonte de quimiocinas no centro da rede a partir da qual as quimiocinas irão se difundir e degradar de acordo com as equações 4.3 e 4.4. Consideramos dois tipos de células, uma verde e outra azul, de dois tamanhos diferentes, que ocupam 1 e 9 sítios respectivamente, como mostra a Fig. D.1. Na análise da distribuição espaço-temporal, foram usadas 100 células de cada tipo, distribuídas em posições aleatórias da rede.



**Figura D.1** Célula azul e verde ocupando 1 e 9 sítios respectivamente.

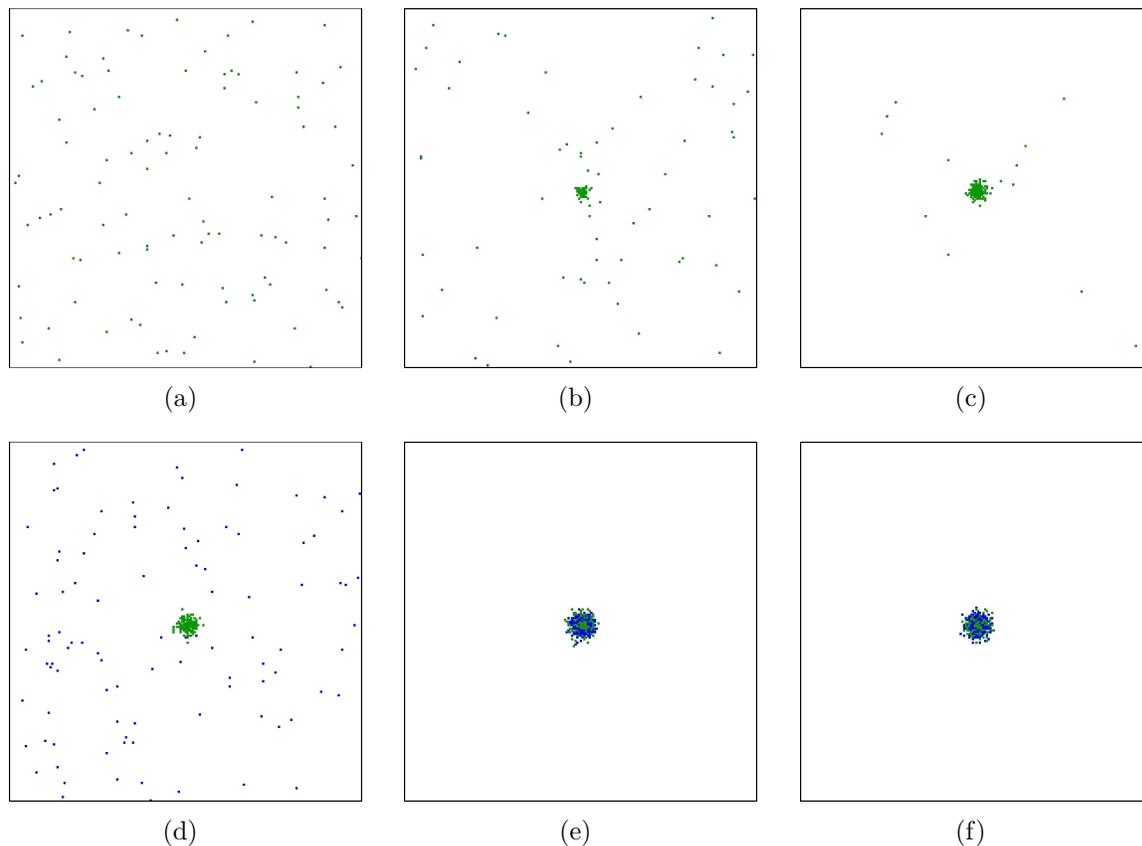
Se considerarmos apenas as células de cor verde distribuídas na rede, estas são guiadas pelo gradiente de concentração em direção a fonte de quimiocinas (Fig. D.2) e para  $t = 12, 50$  dias (Fig. D.2(c)) as mesmas estarão todas localizadas no centro da rede, região que tem a concentração mais alta de quimiocinas. Em  $t = 18, 75$  dias (Fig. D.2(d)) as células de cor azul entram na rede em posições aleatórias e passam a ser guiadas pelo gradiente de concentração em direção ao centro da rede. Devido ao tamanho menor das

células de cor azul, elas tem facilidade de passar entre as células de cor verde. Em função disto, em  $t = 50,00$  dias (Fig. D.2(e)), as células de cor azul é que passam a estar localizadas em torno da fonte de quimiocinas, circundadas pelas verdes.



**Figura D.2** Distribuição espaço-temporal para dois tipos de células, azuis e verdes, ocupando 1 e 9 sítios da rede respectivamente. As células movimentam-se segundo um gradiente de concentração localizado no centro da rede. Inicialmente ( $t = 0$ ) só existem as células de cor verde, as células de cor azul entram na rede em  $t = 18,75$  dias. Com o passar do tempo, em  $t = 50,00$  dias, devido ao seu tamanho menor, as células de cor azul localizam-se no centro da rede. (a)  $t = 0,00$  dias, (b)  $t = 6,25$  dias, (c)  $t = 12,50$  dias, (d)  $t = 18,75$  dias, (e)  $t = 50,00$  dias, (f)  $t = 75,00$  dias.

Se repetirmos este estudo (Fig. D.3) com células do mesmo tamanho (por exemplo 1 sítio), a “penetração” das células de cor azul em relação à verde neste caso torna se mais difícil. Em  $t = 50,00$  dias (Fig. D.3(e)) e em  $t = 75,00$  dias (Fig. D.3(f)) as células verdes ainda permanecem no centro do granuloma. Neste caso a tendência é que os dois tipos células, depois de um longo tempo, fiquem uniformemente distribuídas (resultado não mostrado).



**Figura D.3** Distribuição espaço-temporal para dois tipos de células, azuis e verdes, ambas de mesmo tamanho, cada uma ocupando 1 sítio. As células movimentam-se segundo um gradiente de concentração localizado no centro da rede. Inicialmente só existem as células de cor verde, as células de cor azul entram na rede em  $t = 18,75$  dias. Com o passar do tempo, as células verdes e azuis tendem a ficar uniformemente distribuídas na rede. (a)  $t = 0,00$  dias, (b)  $t = 6,25$  dias, (c)  $t = 12,50$  dias, (d)  $t = 18,75$  dias, (e)  $t = 50,00$  dias, (f)  $t = 75,00$  dias.

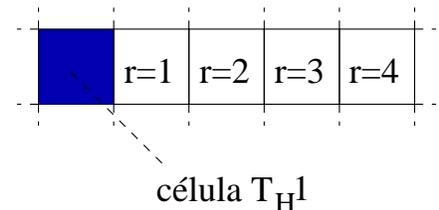
Os resultados apresentados aqui, mostram que a distinção no tamanho dos tipos celulares influencia a distribuição final das células sujeitas ao gradiente de concentração. Se adotássemos tal diferenciação espacial de células no modelo para a formação de granulomas de tuberculose (Capítulo 4), já que o macrófago alveolar é maior que a célula  $T_H1$ , observaríamos uma distribuição invertida em relação ao que acontece no granuloma biológico, ou seja, células  $T_H1$  (células menores) no centro e macrófagos (células maiores) na periferia do granuloma. Aparentemente para considerarmos células com tamanhos diferentes, deveremos considerar outros ingredientes que não são levados em conta neste modelo inicial, como por exemplo, moléculas de adesão. As moléculas de adesão proporcionariam uma maior coesão entre os macrófagos em torno do sítio de infecção, dificultando a entrada das células  $T_H1$  no centro do granuloma que chegam depois de um tempo.

## CONCENTRAÇÃO DE IFN- $\gamma$ NA VIZINHANÇA DE CÉLULAS T<sub>H</sub>1

A citocina IFN- $\gamma$  e conseqüentemente o limiar de ativação do macrófago infectado ( $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$ ) são de extrema importância no modelo de autômatos celulares para a formação de granulomas de tuberculose (Capítulo 4). Dependendo do valor de  $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$  utilizado na simulação, encontramos diferentes tipos de comportamento dinâmico no modelo. Portanto, utilizando uma rede com  $N = 201 \times 201$  sítios (como a utilizada no modelo) e condições de contorno periódicas, fizemos um estudo da concentração de IFN- $\gamma$  presente nos sítios das vizinhanças de células T<sub>H</sub>1 buscando entender a importância deste parâmetro e estimar a ordem de grandeza do mesmo a ser adotada para descrever os 3 comportamentos observados.

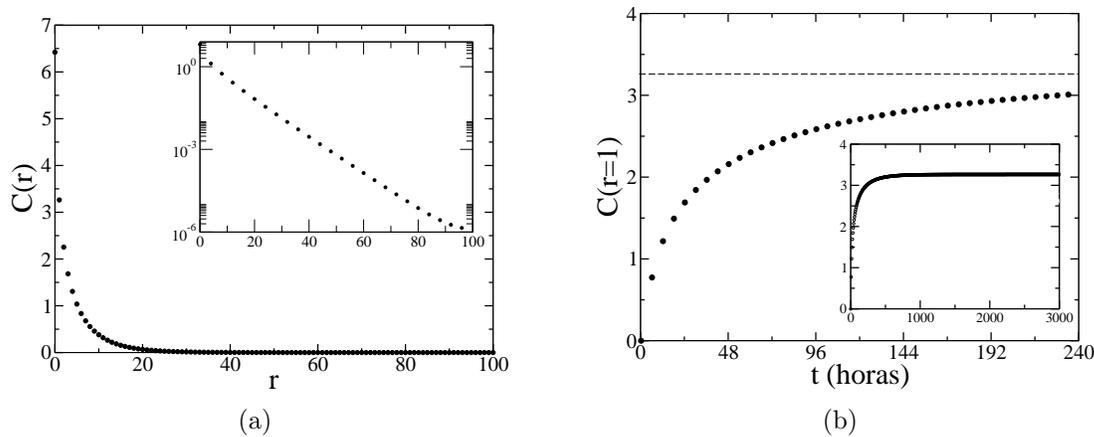
Primeiramente estudamos a distribuição espacial da concentração de IFN- $\gamma$ , produzido por uma única célula T<sub>H</sub>1 em repouso na rede. A cada passo de tempo a célula T<sub>H</sub>1 produz uma 1 unidade de IFN- $\gamma$ , que se difunde e degrada pela rede conforme descrito na regra de evolução das células T<sub>H</sub>1 (Seção 4.1). A concentração espacial de IFN- $\gamma$  foi medida em função da distância  $r$  do sítio analisado à célula T<sub>H</sub>1 (Fig. E.1). Na Fig. E.2(a), mostramos que o comportamento da concentração de IFN- $\gamma$  decai exponencialmente com  $r$ , comportamento este, devido a dinâmica de difusão e degradação, descritas na Seção 4.1 e no Apêndice C, e evidencia a ação localizada do IFN- $\gamma$ . Biologicamente, a ação do IFN- $\gamma$  também é localizada, quando uma célula T interage com uma célula (macrófago por exemplo), acontece um rearranjo do seu citoesqueleto e do seu citoplasma de forma a redirecionar e forçar a liberação de citocinas na região de contato entre as células [16].

A Fig. E.2(b) mostra a concentração de IFN- $\gamma$  medida em um sítio da vizinhança de Neumann da célula T<sub>H</sub>1 em função do tempo, ou seja, a concentração medida em um sítio a uma distância  $r = 1$ . A concentração  $C(r = 1)$  de IFN- $\gamma$  atinge um valor de



**Figura E.1** Distâncias  $r$  dos sítios da rede até o sítio da célula T<sub>H</sub>1.

saturação igual a 3,26 unidades em  $t \sim 1000$  horas após o início da sua produção. Se imaginarmos ou considerarmos um macrófago infectado na vizinhança ( $r = 1$ ) da célula T<sub>H</sub>1, de acordo com a regra de ativação do macrófago infectado na Seção 4.1,  $\theta_{\text{IFN-}\gamma}$  tem que ser menor do que 3,26 unidades de para que a célula T<sub>H</sub>1 consiga ativá-lo. Assim o menor valor do limiar de IFN- $\gamma$  adotado nas nossas simulações para a ativação do macrófago infectado, foi de  $\theta_{\text{IFN-}\gamma} = 1,63$  unidades de IFN- $\gamma$ , que corresponde a metade do valor da concentração ( $C(r = 1) = 3,26$ ), limiar este que é atingido depois  $\sim 20$  horas do início da produção de IFN- $\gamma$  pela célula T<sub>H</sub>1. Se  $\theta_{\text{IFN-}\gamma} > 3,26$ , a quantidade de IFN- $\gamma$  produzido por uma única célula T<sub>H</sub>1 na rede não é suficiente para ativar o macrófago infectado, como veremos mais adiante.



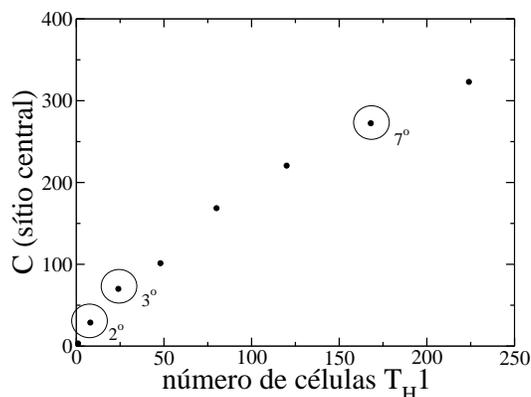
**Figura E.2** (a) Concentração de IFN- $\gamma$  ( $C(r)$ ) no sítio em função da distância  $r$  até a célula T<sub>H</sub>1. Para cada  $r$  a concentração foi medida depois de atingido o estado estacionário ( $t \sim 1000$  horas). O comportamento exponencial é confirmado utilizando a escala log-linear no detalhe de (a). (b) Concentração de IFN- $\gamma$  ( $C(r = 1)$ ) medida em um dos sítio vizinhos (vizinhança de Neumann) à célula T<sub>H</sub>1 em função do tempo. A linha pontilhada em (b) indica o valor da concentração  $C = 3,26$  unidades de IFN- $\gamma$  que é atingida no estado estacionário. No detalhe em (b) podemos observar  $C(r = 1)$  para longos tempo de simulação.

Em um segundo estudo, analisamos a concentração de IFN- $\gamma$  em um sítio localizado no centro de uma distribuição de células T<sub>H</sub>1 em repouso na rede. As células T<sub>H</sub>1 foram distribuídas em camadas em torno de um sítio central, como mostra os exemplos da Fig. E.3, 1 camada para a Fig. E.3(a) e 2 camadas para a Fig. E.3(b). Neste caso também, cada célula T<sub>H</sub>1 produz 1 unidade de IFN- $\gamma$  a cada passo de tempo. Na Fig. E.4 mostramos o comportamento da concentração de IFN- $\gamma$  no sítio central de um conjunto de células T<sub>H</sub>1 depois de atingido o estado estacionário. A concentração de IFN- $\gamma$  do sítio

central dos exemplos das Fig. E.3(a) e Fig. E.3(b) correspondem ao 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> pontos da Fig. E.4, e equivalem a 28, 79 unidades e 69, 99 unidades respectivamente. Observamos na Fig. E.4 que há uma tendência da concentração de IFN- $\gamma$  no sítio central, mostrada na Fig. E.4, é de saturar com o aumento no número de células  $T_{H1}$ , pois a contribuição do IFN- $\gamma$  proveniente de células distantes é pequena, como mostrado na Fig. E.2(a).



**Figura E.3** Distribuição de células  $T_{H1}$  em torno de um sítio central. (a) 8 células  $T_{H1}$  e (b) 24 células  $T_{H1}$ .



**Figura E.4** Concentração de IFN- $\gamma$  medida no sítio central a um conjunto de células  $T_{H1}$  depois de atingido o estado estacionário.

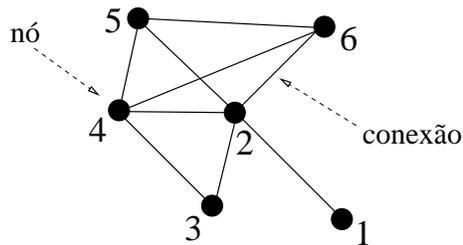
Os resultados desta análise nos ajudam a entender melhor os valores de  $\theta_{IFN-\gamma}$  a serem utilizados no modelo. Imaginemos que haja um macrófago infectado no sítio central de uma distribuição de células  $T_{H1}$  dispostas em camadas, como mostrado nos exemplos da Fig. E.3. Se adotarmos  $\theta_{IFN-\gamma} = 25$ , para que o macrófago infectado seja ativado serão necessárias cerca de 8 células  $T_{H1}$  produzindo IFN- $\gamma$  dispostas como no exemplo da Fig. E.3(a). Já para uma valor de  $\theta_{IFN-\gamma} = 300$ , maior limiar de IFN- $\gamma$  adotado nos nossos estudos, para que o macrófago infectado seja ativado serão necessárias mais de 168 células  $T_{H1}$  dispostas em camadas, como indicado no 7<sup>o</sup> ponto na Fig. E.4, para o qual

concentração de IFN- $\gamma$  no sítio central é um pouco menor que 300 unidades de IFN- $\gamma$ .

## QUANTIDADES USADAS NA CARACTERIZAÇÃO DE REDES COMPLEXAS

### F.1 CONECTIVIDADE $K$

No estudo das redes complexas a quantidade mais usada para obter informação topológica é a conectividade  $K$  dos nós [90]. A conectividade  $K_i$  de um nó  $i$  é definido como o número de vizinhos conectados a ele (Fig. F.1).



**Figura F.1** Rede formada com  $N = 6$  nós e 9 conexões, onde as conectividades são dadas por  $K_1 = 1$ ,  $K_2 = 5$ ,  $K_3 = 2$ ,  $K_4 = 4$ ,  $K_5 = 3$  e  $K_6 = 3$ .

A conectividade dos nós de uma rede pode ser descrita pela matriz de adjacências. Para uma rede com  $N$  nós, os elementos  $a_{ij}$  desta matriz de  $N \times N$  elementos, são descritos por uma variável binária, que assume valor 1 se existe uma conexão entre os nós  $i$  e  $j$  e 0 caso contrário. Para a rede ilustrada na Fig. F.1, teríamos a seguinte matriz de conectividades.

$$A = \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 \end{bmatrix}$$

Em termos da matriz  $A$  de conectividades, podemos escrever a conectividade  $K_i$  do nó  $i$  da seguinte forma:

$$K_i = \sum_{j=1}^N a_{ij} \quad (\text{F.1})$$

Utilizando esta fórmula podemos obter os valores de  $K_i$  descritos na Fig. F.1.

## F.2 COEFICIENTE DE *CLUSTERING* $C$

Outra quantidade muito usada no estudo de redes complexas é o coeficiente de *clustering*  $C$  da rede [90]. A tradução correta do inglês para o português para a palavra *clustering* seria “agrupamento”, entretanto, estamos adotando coeficiente de *clustering* e não coeficiente de “agrupamento” porque este é o termo mais usado na comunidade científica.

O coeficiente de *clustering*  $C_i$  do nó  $i$  mede a coesão da sua vizinhança e é definido como:

$$C_i = \frac{2n_i}{K_i(K_i - 1)} \quad (\text{F.2})$$

onde  $n_i$  é o número de conexões entre os  $K_i$  vizinhos do nó  $i$ .  $C_i = 0$  indica que não existem conexões entre os vizinhos de  $i$ , e  $C_i = 1$  implicaria que todos os vizinhos de  $i$  estão conectados entre si. Em uma rede de amigos por exemplo, haverá uma conexão entre duas pessoas se estas forem amigas. Neste caso particular, o coeficiente de *clustering* mede quantos amigos de uma determinada pessoa são amigos entre si [90].

Para o sítio 4 do exemplo da Fig. F.1, o coeficiente de *clustering* vale

$$C_4 = \frac{2n_4}{K_4(K_4 - 1)} = \frac{2 \times 4}{4(4 - 1)} = 0,667$$

O coeficiente de *clustering*  $C_i$  para o nó  $i$ , também pode ser escrito de uma forma mais geral, em termos da matriz  $A$  de conectividades.

$$C_i = \frac{1}{K_i - 1} \sum_{j,h} a_{ij} a_{ih} a_{jh} \quad (\text{F.3})$$

A média sobre todos os nós dá o coeficiente de *clustering*  $C$  da rede.

$$C = \frac{1}{N} \sum_i C_i \quad (\text{F.4})$$

### F.3 COMPRIMENTO DE CAMINHO MÉDIO $L$

Definindo  $L_{ij}$  como o número de conexões existentes no caminho mais curto entre os nós  $i$  e  $j$ . O comprimento do caminho médio  $L$  é definido como sendo:

$$L = \frac{1}{2N(N-1)} \sum_i^N \sum_j^N L_{i,j}$$

Esta medida identifica comportamentos do tipo mundo pequeno, no qual o comprimento do caminho médio  $L$  entre dois nós quaisquer da rede é pequeno se comparado com o número  $N$  de nós.

### F.4 DENSIDADE ESPECTRAL

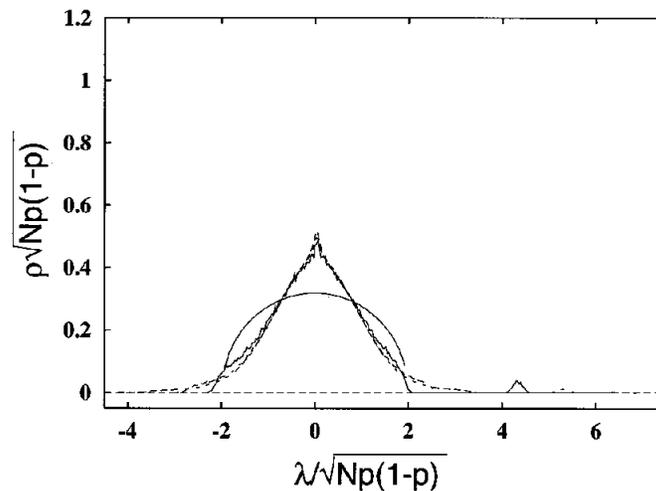
A partir da densidade espectral podemos obter informações topológicas da rede, como o número de ciclos, a existência de estruturas tipo árvore formada entre as conexões, densidade de conexões, condutância da rede, etc. O conjunto de autovalores da matriz de conectividades corresponde ao espectro da rede, sendo o número de autovalores  $\lambda_j$  igual ao número  $N$  de nós [122, 123].

A densidade espectral é definida como:

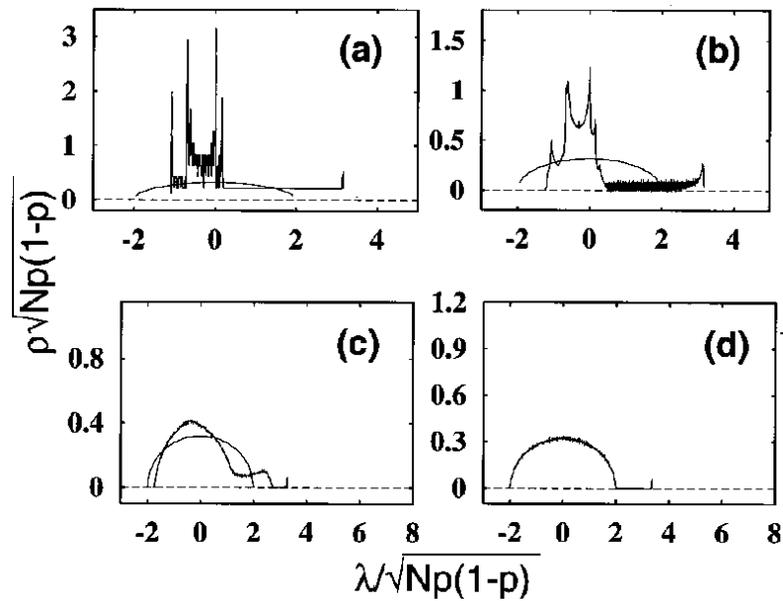
$$p(\lambda) = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \delta(\lambda - \lambda_j) \quad (\text{F.5})$$

$\lambda_j$  é o  $j$ -ésimo maior autovalor e  $\delta = 1$  se  $\lambda = \lambda_j$  e 0 caso contrário.

A densidade espectral há muito tempo é estudada para os grafos aleatórios, cuja distribuição em forma de semicírculo é bastante conhecida [124–126]. Para as redes livres de escala e para as redes mundo pequeno, a densidade espectral apresenta comportamentos diferentes dos grafos aleatórios. A densidade espectral para a rede livre de escala [90], gerada a partir do modelo Albert-Barabasi, é simétrica e tem forma triangular quando comparada com a forma exibida pelas redes aleatórias (semi-círculo) (Fig. F.2), já a densidade espectral da rede mundo pequeno, gerada a partir do modelo de Watts-Strogatz, tem uma forma assimétrica e possui singularidades (Fig. F.3) originadas da simetria circular do anel utilizado no modelo. No modelo de Watts-Strogatz, para  $p$  pequeno temos uma distribuição assimétrica com vários picos, e conforme se aproxima de 1 ela vai assumindo a forma de semicírculo (Fig. F.3).



**Figura F.2** Densidade espectral para o modelo de redes livre de escala de Albert-Barabasi [90]. A linha contínua mostra a comparação com a lei de semicírculo do grafo aleatório equivalente [122].



**Figura F.3** Densidades espectrais para o modelo de Watts-Strogatz [93] comparada com a lei de semicírculo correspondente ao grafo aleatório (linha sólida) como o mesmo número de  $N$  de nós e conectividade média  $\langle K \rangle$ . As probabilidades de redirecionamento das ligações do modelo Watts-Strogatz utilizadas são: (a)  $p = 0$ , (b)  $p = 0,01$  e (c)  $p = 0,3$  e (d)  $p = 1,0$  [122].

A Tabela a seguir mostra os valores de algumas quantidades descritas aqui e calculadas para várias redes complexas encontradas na natureza.

Rede	$N$	$\langle K \rangle$	$L$	$L_{rand}$	$C$	$C_{rand}$
WWW	153127	35,21	3,1	3,35	0,1078	$2,3 \times 10^{-4}$
Internet	3015-6209	3,52-4,11	3,7-3,76	6,36-6,18	0,18-0,3	0,001
Movie actors	225226	61	3,65	2,99	0,79	$2,7 \times 10^{-4}$
LANL co-autoria	52909	9,7	5,9	4,79	0,43	$1,8 \times 10^{-4}$
MEDLINE co-autoria	1520251	18,1	4,6	4,91	0,066	$1,1 \times 10^{-4}$
SPIRES co-autoria	56627	173	4,0	2,12	0,726	0,003
NCSTRL co-autoria	11994	3,59	9,7	7,34	0,496	$3 \times 10^{-4}$
Math. co-autoria	70975	3,9	9,5	8,2	0,59	$5,4 \times 10^{-4}$
Neurosci. co-autoria	209293	11,5	6	5,01	0,76	$5,5 \times 10^{-4}$
E. coli, grafo de substratos	282	7,35	2,9	3,04	0,32	0,026
E. coli, grafo de reações	315	28,3	2,62	1,98	0,59	0,09
Estuário Ythan, cadeia alimentar	134	8,7	2,43	2,26	0,22	0,06
Silwood Park, cadeia alimentar	154	4,75	3,40	3,23	0,15	0,03
palavras, co-ocorrência	460902	70,13	2,67	3,03	0,437	$1 \times 10^{-4}$
palavras, sinônimos	22311	13,48	4,5	3,84	0,7	$6 \times 10^{-4}$
rede elétrica	4941	2,67	18,7	12,4	0,08	0,005
C. Elegans	282	14	2,65	2,25	0,28	0,05

**Tabela F.1** Características gerais de várias redes complexas, para cada uma delas é indicado o número  $N$  de nós, a conectividade média  $\langle K \rangle$ , o comprimento do caminho médio  $L$  e o coeficiente de *clustering*  $C$ . Para uma comparação, foi incluído o comprimento do caminho médio  $L_{rand}$  e o coeficiente de *clustering*  $C_{rand}$  para uma rede aleatória com o mesmo número  $N$  de nós e conectividade média  $\langle K \rangle$  [90].

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] World Health Organization. *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing*. World Health Organization (WHO/HTM/TB/2006.362), Geneva, 2006.
- [2] Antonio Ruffino Netto and Tereza Cristina Scatena Villa. *Tuberculose: Implantação do DOTS em algumas regiões do Brasil. Histórico e peculiaridades regionais*. Inst. Milênio Rede TB, Rede Brasileira de Pesquisas em Tuberculose, 2006.
- [3] O. Brandli, D. Dreher, and D. Morger. Treatment of tuberculosis with Isoniazid, Rifampin and Pyrazinamide. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 123:1300–1306, 1993.
- [4] Marcus V. N. Souza and Thatyana R. A. Vasconcelos. Fármacos no combate à tuberculose: Passado, presente e futuro. *Química Nova*, 28:678–682, 2005.
- [5] R. E. Huebner et al. BCG vaccination in the control of tuberculosis. *Tuberc. Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 215:263–282, 1996.
- [6] Ian M. Orme. Beyond BCG: the potential for a more effective TB vaccine. *Molecular Medicine Today*, 5:487–492, 1999.
- [7] Nikki M. Parrish, J. D. Dick, and W. R. Bishai. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology*, 6:107–112, 1998.
- [8] John Chan and JoAnne Flynn. The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clinical Immunology*, 110:2–12, 2004.
- [9] Dov L. Boros. *Granulomatous Infections and Inflammations: Cellular and Molecular Mechanisms*. ASM Press, Washington, 2003.
- [10] G. W. Comstock. Epidemiology of tuberculosis. *American Review Of Respiratory Disease*, 125:8–15, 1982.

- [11] Holly M. Scott Algood, John Chan, and JoAnne L. Flynn. Chemokines and tuberculosis. *Cyt. Gr. Fact. Rev.*, 14:467–477, 2003.
- [12] R. M. Zorzenon dos Santos, Ana Amador, W. V. Souza, M. F. M. Albuquerque, S. Ponce Dawson, A. Ruffino Neto, and C. L. Silva. Dynamics aspects underlying the transmission of infectious diseases. *preprint*, 2007.
- [13] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). <http://www.ibge.gov.br>.
- [14] Bruce Alberts et al. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science, New York, NY, 2002.
- [15] Jay R. Silveira et al. The most infectious prion protein particles. *Nature*, 437:257–261, 2005.
- [16] Charles A. Janeway et al. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland Science, New York, NY, 2005.
- [17] Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, and Jordan S. Pober. *Imunologia Celular e Molecular*. Revinter, 4 edição, 2002.
- [18] Celio L. Silva et al. Cytotoxic T cells and mycobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 197:11–18, 2001.
- [19] Siamon Gordon and Philip R. Taylor. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, 5:953–964, 2005.
- [20] Nelson M. Vaz and Ana Maria C. de Faria. *Guia Incompleto de Imunobiologia*. COOPMED, Belo Horizonte - MG, 1993.
- [21] Douglas B. Lowrie et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*, 400:269–271, 1999.
- [22] Celio L. Silva et al. Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guerin or DNA vaccination. *Immunology*, 97:573–581, 1999.
- [23] Bo-Chin Chiu et al. Cytokine-chemokine networks in experimental mycobacterial and schistosomal pulmonary granuloma formation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 29:106–116, 2003.

- [24] Fiona Powrie and Kevin J. Maloy. Regulating the regulators. *Immunology*, 299:1030–1031, 2003.
- [25] Giorgio Trinchieri. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ ). *Current Opinion in Immunology*, 9:17–23, 1997.
- [26] Elisabetta Ferrero et al. Macrophages exposed to *Mycobacterium tuberculosis* release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on  $\gamma\delta$  cells. *Immunology*, 108:365–374, 2003.
- [27] Michael Wilson, Robert Seymour, and Brian Henderson. Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infection and Immunity*, 66:2401–2409, 1998.
- [28] Gael Fenhalls et al. In situ production of gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granulomas. *Infection and Immunity*, 68:2827–2836, 2000.
- [29] Ian M. Orme and Andrea M. Cooper. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunology Today*, 20:307–312, 1999.
- [30] Simone Rosseau et al. Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: Adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. *The Journal of Immunology*, 164:427–435, 2000.
- [31] Robert Koch. Die aetiologie der tuberculose. *Klinische Wochenschrift*, 15:221–230, 1882.
- [32] Biblioteca Virtual em Saúde. <http://www.bvsalut.coc.fiocruz.br>, 2007.
- [33] Stella M. Van Beers, Madeleine Y. L. de Wit, and Paul R. Klatser. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: Recent insight. *FEMS Microbiology letters*, 136:221–230, 1996.
- [34] Gregg R. Strohmeier and Matthew J. Fenton. Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis. *Microbes and Infection*, 1:709–717, 1999.
- [35] Delphi Chatterjee and Kay-Hooi Khoo. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology*, 8:113–120, 1998.

- [36] B.W. James, A. Williams, and P. D. Marsh. The physiology and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* grown under controlled conditions in a defined medium. *Journal of Applied Microbiology*, 88:669–677, 2000.
- [37] William E. Paul. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999.
- [38] Nadia Ait-Khaled and Donald A. Enarson. *TUBERCULOSIS: A Manual for Medical Students*. World Health Organization (WHO/CDS/TB/99.272), Geneva, 2003.
- [39] Herbert Y. Reynolds. Immunologic system in the respiratory tract. *Physiological Reviews*, 71:1117–1133, 1991.
- [40] William G. Hocking and David W. Golde. The pulmonary-alveolar macrophage, PART I. *N. Engl. J. Med.*, 301:580–587, 1979.
- [41] William G. Hocking and David W. Golde. The pulmonary-alveolar macrophage, PART II. *N. Engl. J. Med.*, 301:639–645, 1979.
- [42] A. B. V. O. Alblas and R. V. Furth. Origin, kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J. Exp. Med.*, 149:1504–1518, 1979.
- [43] Reinout van Crevel, Tom H. M. Ottenhoff, and Jos W. M. van der Meer. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. R.*, 15:–309, 2002.
- [44] David G. Russel et al. Why intracellular parasitism need not be a degrading experience for *Mycobacterium*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 352:1303–1310, 1997.
- [45] Giorgio Ferrari et al. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*, 97:435–447, 1999.
- [46] David G. Russell, Henry C. Mwandumba, and Elizabeth E. Rhoades. *Mycobacterium* and the coat of many lipids. *J. of Cell Biol.*, 158:421–426, 2002.
- [47] Daniel R. Roach, Andrew G. D. Bean, Caroline Demangel, Malcolm P. France, Helen Briscoe, and Warwick J. Britton.
- [48] Holly M. Scott Algood and et al. TNF influences chemokine expression of macrophages in vitro and that of CD11b<sup>+</sup> cells in vivo during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of Immunology*, 172:6846–6857, 2004.

- [49] Padmini Salgame. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Current Opinion in Immunology*, 17:374–380, 2005.
- [50] Steffen Stenger and R. L. Modlin. T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Opin. Microbio.*, 2:89–93, 1999.
- [51] J. L. Flynn et al. An essential role for interferon  $\gamma$  in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.*, 178:2249–2254, 1993.
- [52] Andrea M. Cooper et al. Disseminated tuberculosis in interferon  $\gamma$  gene-disrupted mice. *J. Exp. Med.*, 178:2243–2247, 1993.
- [53] A. Demissie et al. Healthy individuals that control a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4 delta 2. *The Journal of Immunology*, 172:6938–6943, 2004.
- [54] G. A. W. Rook et al. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends in Immunology*, 25:483–488, 2004.
- [55] Vanja Lazarevic and JoAnne L. Flynn. CD8(+) T cells in tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 166:1116–1121, 2002.
- [56] Paul J. Brindley. The molecular biology of schistosomes. *TRENDS in Parasitology*, 21:533–536, 2005.
- [57] Henry W. Murray. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *J. Exp. Path.*, 82:249–267, 2001.
- [58] Jean Pieters. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes and Infection*, 3:249–255, 2001.
- [59] S. H. E. Kaufmann. Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.*, 11:129–163, 1993.
- [60] Akos Somoskovi, Linda M. Parsons, and Max Salfinger. The molecular basis of resistance to Isoniazid, Rifampin, and Pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir. Res.*, 2:164–168, 2001.

- [61] David N. McMurray. Disease model: pulmonary tuberculosis. *TRENDS in Molecular Medicine*, 7:135–137, 2003.
- [62] Ian M. Orme. The mouse as a useful model of tuberculosis. *Tuberculosis*, 83:112–115, 2003.
- [63] Charles A. Scanga. Reactivation of latent tuberculosis: Variations on the cornell murine model. *Infection and Immunity*, 67:4531–4538, 1999.
- [64] J. M. Davis et al. Real-time visualization of *Mycobacterium*-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity*, 17:693–702, 2002.
- [65] K. Chan et al. Complex pattern of *Mycobacterium marinum* gene expression during long-term granulomatous infection. *Proc. Nati. Acad. Sci.*, 99:3920–3925, 2002.
- [66] Lorenzo N. Mazzone and Lapo Casetti. Curvature of the energy landscape and folding of model proteins. *Phys. Rev. Lett.*, 97:218104, 2006.
- [67] Konstantin B. Blyuss. On a model of spatial spread of epidemics with long-distance travel. *Physics Letters A*, 345:129–136, 2005.
- [68] S. Wolfram. *Theory and Applications of Cellular Automata*. World Scientific, Singapore, 1986.
- [69] J. Wigginton and D. Kirschner. A model to predict cell-mediated immune regulatory mechanisms during human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology*, 166:1951–1967, 2001.
- [70] S. Marino and D. Kirschner. The human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* in lung and lymph node. *J. Theor. Biol.*, 173:494–506, 2004.
- [71] S. Ganguli, D. Gammack, and D. E. Kirschner. A metapopulation model of granuloma formation in the lung during infection with *Mycobacterium tuberculosis*.
- [72] D. Gammack, C. R. Doering, and D. E. Kirschner. Macrophages responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Math. Biol.*, 48:218–242, 2004.

- [73] Jose L. Segovia-Juarez, Suman Ganguli, and Denise Kirschner. Identifying control mechanisms of granuloma formation during *m. tuberculosis* infection using an agent-based model. *J. Theor. Biol.*, 231:357–376, 2004.
- [74] Saverio V. Capuano III and at al. Experimental mycobacterium tuberculosis infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human *M. tuberculosis* infection. *Infection and Immunity*, 71:5831–5844, 2003.
- [75] D. Gammack et al. Understanding the immune response in tuberculosis using different mathematical models and biological scales. *Multiscale Model Simul.*, 3:312–345, 2005.
- [76] Wei Lu et al. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nature Medicine*, 10:1359–1365, 2004.
- [77] D. Kaplan and L. Glass. *Understanding Nonlinear Dynamics*. Springer-Verlag, New York, 1995.
- [78] R. Lewin. *Complexity, Life at the Edger of Chaos*. Chicago University Press, Chicago, 1993.
- [79] R. M.Zorzenon dos Santos and S. G. Coutinho. The dynamics of the evolution HIV infection: A cellular automata approach. *Phys. Rev. Let.*, 87:16810, 2001.
- [80] Fritz Krombach et al. Cell size of alveolar macrophages: An interspecies comparison. *Envir. Health Perspect.*, 105, 1997.
- [81] Mercedes Gonzalez-Juarrero, Oliver C. Turner, Joanne Turner, Peter Marietta, Jason V. Brooks, and Ian M. Orme. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 69:1722–1728, 2001.
- [82] JoAnne L. Flynn. Lessons from experimental mycobacterium tuberculosis infections. *Microbes and Infection*, 8:1179–1188, 2006.
- [83] Jonathan Sprent. Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr. Opin. Immun.*, 5:433–436, 1993.

- [84] Vanja Lazarevic, Dawn Nolt, and JoAnne L. Flynn. Long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection is mediated by dynamic immune responses. *The Journal of Immunology*, 175:1107–1117, 2005.
- [85] Holly M. S. Algood, Philana Ling Lin, and JoAnne L. Flynn. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, 41:s189–s193, 2005.
- [86] JoAnne L. Flynn et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*, 2:561–572, 1995.
- [87] Vellore P. Mohan et al. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: Possible role for limiting pathology. *Infection and Immunity*, 69:1847–1855, 2001.
- [88] Reto Guler et al. Differential effects of total and partial neutralization of tumor necrosis factor on cell-mediated immunity to *Mycobacterium bovis* BCG infection. *Infection and Immunity*, 73:3668–3676, 2005.
- [89] Steven H. Strogatz. Exploring complex networks. *Nature*, 410:268, 2001.
- [90] Réka Albert and Albert-László Barabási. Statistical mechanics of complex networks. *Rev. Mod. Phys.*, 74:47–97, 2002.
- [91] P. Erdős and A. Rényi. *Publ. Math.*, 6(290), 1959.
- [92] Erzsébet Ravasz and Albert-László Barabási. Hierarchical organization in complex networks. *Phys. Rev. E*, 67(026112), 2003.
- [93] Duncan J. Watts and Steven H. Strogatz. Collective dynamics of 'small-world' networks. *Nature*, 393:440–442, 1998.
- [94] Mark D. F. Shirley and Steve P. Rushton. The impacts of network topology on disease spread. *Ecological Complexity*, 2:287–299, 2005.
- [95] Fundação Nacional da Saúde. <http://www.funasa.gov.br>.
- [96] A. Barrat et al. The architecture of complex weighted networks. *PNAS*, 101:3747–3752, 2004.

- [97] Duncan J. Watts. *Small Worlds. The dynamics of networks between order and randomness*. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey, 1999.
- [98] S. Milgram. *Psychol. Today*, 1967.
- [99] M. Kochen. *The Small World*. Ablex, Norwood, NJ, 1989.
- [100] J. Guare. *Six Degrees of separation: A Play*. Vintage, New York, 1990.
- [101] L. A. N. Amaral, A. Scala, M. Barthélemy, and H. E. Stanley. Classes of small-world networks. *PNAS*, 97(21):11149–11152, 2000.
- [102] Albert-László Barabási and Réka Albert. Emergence of scaling in random networks. *Science*, 286:509–512, 1999.
- [103] R. Pastor-Satorras A. Vespignani M. Barthélemy, A. Barrat. Velocity and hierarchical spread of epidemic outbreaks in scale-free networks. *Phys. Rev. Let.*, 92:178701–1 178701–4, 2004.
- [104] M. Kuperman and G. Abramson. Small world effect in an epidemiological model. *Phys. Rev. Let.*, 86:2909–2912, 2001.
- [105] A. Grabowski and R. A. Kosiński. Epidemic spreading in a hierarchical social network. *Phys. Rev. E*, 70(031908), 2004.
- [106] J. Saramaki and K. Kaski. Modelling development of epidemics with dynamic small-world networks. *J. Theor. Biol.*, 234:413–421, 2005.
- [107] J. Verdasca et al. Recurrent epidemics in small world networks. *J. Theor. Biol.*, 233:553–561, 2005.
- [108] A. Barrat, Marc Barthélemy, and A. Vespignani. Modeling the evolution of weighted networks. *Phys. Rev. E*, 70(066149), 2004.
- [109] Franz Aurenhammer. Voronoi diagrams - a survey of a fundamental geometric data structure. *ACM Computing Surveys*, 23:345–405, 1991.
- [110] Flavio A. V. S. Rezende, Renan M. Varnier Almeida, and Flavio F. Nobre. Diagramas de voronoi para a definição de áreas de abrangência de hospitais públicos no município do rio de janeiro. *Cad. Saúde P 'ublica*, 12:467–475, 2000.

- [111] The Voronoi web site. <http://www.voronoi.com>.
- [112] B. N. Delaunay. Sur la sphere vide. *Bull. Acad. Science USSR VII: Class. Sci. Math.*, pages 793–800, 1963.
- [113] T. Maceco, Ruffino Neto, and Zorzenon dos Santos. preprint. 2007.
- [114] J. D. Murray. *Mathematical Biology*. Springer, 2003.
- [115] Alan. M. Turing. The chemical basis of morphogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. London*, B237:37–72, 1952.
- [116] Robert C. Hilborn. *Chaos and Nonlinear Dynamics*. Oxford, New York, 2000.
- [117] Eugene Butkov. *Física Matemática*. Guanabara, Rio de Janeiro, 1988.
- [118] John C. Strikwerda. *Finite Difference Schemes and Partial Differential Equations*. Chapman & Hall, New York, 1989.
- [119] Christie J. Geankoplis. *Transport Process and Unit Operations*. Prentice Hall, New Jersey, 1993.
- [120] C. O. Bennett and J. E. Myers. *Fenômenos de Transporte, Quantidades de Movimento, Calor e Massa*. McGraw-Hill, São Paulo, SP, 1978.
- [121] L. E. Sissom and D. R. Pitts. *Fenômenos de Transporte*. Guanabara Dois, Rio de Janeiro, RJ, 1979.
- [122] Illés J. Farkas et al. Spectra of 'real-world' graphs: Beyond the semicircle law. *Phys. Rev. E*, 64(026704), 2001.
- [123] D. M. Cvetković, M. Doob, and H. Sachs. *SPECTRA OF GRAPHS, Theory and Application*. Academic Press, New York, 1987.
- [124] Eugene P. Wigner. Characteristic vectors of bordered matrices with infinite dimensions. *Annals of Math.*, 62:548–564, 1955.
- [125] M. L. Mehta. *Random Matrices*. Academic, New York, 1991.
- [126] F. Hiai and D. Petz. The semicircle law, free random variables and entropy. *American Mathematical Society, providence*, Section 4.1, 2000.