

Sistema Imune Inato - Uma Abordagem com Redes de Petri

Elvis Hernandes Ribeiro*

27 de março de 2019

Resumo

O entendimento de fenômenos complexos na Imunologia é um grande desafio para cientistas em vários campos da ciência. Nos últimos anos, Redes de Petri estão sendo usadas para modelagem de sistemas biológicos. Exemplos disso incluem a modelagem de reações bioquímicas, de redes de interação proteica, de redes de regulação gênica, modelagem do sistema imunológico, entre outros. Neste trabalho, redes de Petri são utilizadas para modelar o papel de neutrófilos e macrófagos durante a resposta imune inata a uma infecção bacteriana. Vários processos presentes nas respostas imunes são considerados e esses processos são modelados com transições estocásticas na rede de Petri. Objetiva-se estudar, com as redes de Petri construídas, a importância do papel regulador do macrófago na resolução da resposta imune e os efeitos de considerar a influência do dano tecidual na resposta imune.

*Financiado por uma bolsa da Fapemig

Sumário

1	Introdução	3
2	Redes de Petri	4
2.1	Colorsets, cores e tokens	4
2.2	O Colorset Dot	4
2.3	Marking	4
2.4	Places	5
2.5	Transições	5
2.6	Arcos	6
3	Rede de Petri Estocástica	7
4	Software para construção e simulação de redes de Petri	7
4.1	Snoopy	7
5	Modelo - Interação bactéria-neutrófilo	8
6	Modelo com Dano Tecidual	10
6.1	Processos modelados	10
7	Resultados	14
7.1	Rede de Petri da interação bactéria-neutrófilo	14
7.2	Rede de petri com dano tecidual	15
8	Conclusão	18

1 Introdução

O entendimento de fenômenos complexos na Imunologia é um grande desafio para cientistas em vários campos da biologia, medicina e farmacologia [1]. Os fenômenos biológicos relacionados às infecções e ao sistema imune podem ser descritos por diversos tipos de modelos dentre os quais destaca-se: equações diferenciais ordinárias, equações diferenciais parciais, modelos baseados em agentes, autômatos celulares, dinâmica de sistemas, redes de Petri, entre outros. Todos esses modelos podem contribuir com o entendimento de mecanismos presentes na interação entre o patógeno e o hospedeiro através da modelagem e simulação de diversos aspectos das respostas imunes [1].

Para muitos patógenos bacterianos, o sistema imunológico do hospedeiro elimina completamente as bactérias invasoras e a infecção é resolvida, ou seja, a inflamação e os danos teciduais cessam. No entanto, em alguns casos, devido a vários fatores como doenças pré-existentes, imunidade baixa, entre outros, as bactérias evadem o sistema imune e estabelecem um ambiente favorável para a persistência (cenário esse que caracteriza uma infecção crônica) [2]. Em certos casos, essas infecções persistentes são assintomáticas por longos períodos de tempo, mas podem sofrer reativação futura em doença clinicamente significativa, ou podem estar associadas a malignidade ou disseminação subsequente da doença [2]. Alternativamente, algumas infecções persistentes resultam em sintomas crônicos clinicamente aparentes. Nesses casos, mesmo o tratamento padrão com antibióticos muitas vezes não consegue esterilizar eficazmente essas infecções, e cursos prolongados ou repetidos de antibióticos são necessários para a erradicação bem sucedida. Ao extremo, a supressão crônica ao longo da vida com antibióticos pode ser necessária na ausência de erradicação [2].

Muitos fatores contribuem para a capacidade dos patógenos em estabelecer infecções persistentes, incluindo tanto fatores hospedeiros quanto bacterianos. Certos agentes patogênicos parecem unicamente adaptados para escapar do sistema imune do hospedeiro e persistir em indivíduos infectados por décadas na ausência de sintomas como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* ou *Salmonella Typhi*. Outros patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* ou *Escherichia coli* podem causar tanto sintomas agudos como crônicos, com alterações específicas no hospedeiro, facilitando o estabelecimento de uma infecção persistente [2].

Uma condição crônica pode ser causada por uma infecção aguda como mostra o trabalho de Moraes *et al* [3] que ao estudar infecções com *Yersinia pseudotuberculosis* observaram que a infecção aguda teve um impacto de longa duração na estrutura e função do sistema imune do intestino [3].

Em muitos casos, infecções crônicas estão associadas com uma inflamação crônica. A inflamação crônica é caracterizada por repetidos ciclos de migração de células do sistema imune, produção de substâncias pró-inflamatórias e dano tecidual que se não forem contidos pelo próprio sistema imune podem levar a consequências graves para o paciente. Os macrófagos são uma das principais células responsáveis pela regulação dessa resposta pró-inflamatória através, por exemplo, da produção de citocinas anti-inflamatórias, da fagocitose de células apoptóticas e da fagocitose de células de tecido mortas, entre outras ações. Portanto, caso o papel regulador dos macrófagos esteja prejudicado por algum motivo, o resultado pode ser fatal. Nesse caso, os macrófagos poderiam contribuir para a continuação da inflamação e do dano tecidual.

Nos últimos anos, Redes de Petri estão sendo usadas para modelagem de sistemas biológicos. Exemplos disso incluem a modelagem de reações bioquímicas, de redes de interação proteica, de redes de regulação gênica, modelagem do sistema imunológico, entre outros.

Neste trabalho, redes de Petri são utilizadas para estudar comportamentos observados em infecções bacteri-

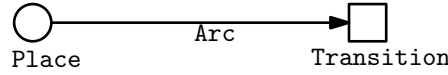


Figura 1: Exemplo de Rede de Petri

anas que podem ser agudas ou crônicas. O objetivo deste trabalho é estudar a importância do papel regulador do macrófago na resolução da resposta imune e os efeitos da influência do dano tecidual na resposta imune.

2 Redes de Petri

Uma Rede de Petri é um grafo bipartido direcionado onde seus vértices são divididos entre *places* (lugares) e *transitions* (transições)¹, representados por círculos e quadrados, respectivamente. Os arcos representam a ligação entre os places e as transições[4].

Existem diversas extensões da Rede de Petri clássica. Neste trabalho, usamos a Rede de Petri Estocástica Colorida \mathcal{SPN}^c (Colored Stochastic Petri Net) que é uma extensão que introduz transições estocásticas e *colorsets*.

2.1 Colorsets, cores e tokens

As redes de petri coloridas têm esse nome por causa de seus *Colorsets* e *cores*. *Colorsets* são tipos de dados, que podem tanto ser tipos simples (inteiro, string, etc), como podem ser tipos compostos (um produto de *Colorsets* simples). As cores são os possíveis valores que podem ser assumidos dentro de um *Colorset*, e um token é uma instância de um *Colorset* específico que assume uma cor em um *Colorset* simples e um conjunto de cores no caso de um *Colorset* composto. Os tokens são transmitidos entre os *places* a cada disparo de uma transição habilitada.

2.2 O Colorset Dot

Colorsets podem assumir um dentre os vários tipos primitivos, inclusive tipos compostos. Existe um *Colorset* especial chamado *Dot*, derivado da Rede de Petri Simples que é definido a priori em todas as redes de Petri. Um *dot* representa um indivíduo da população modelada pelo *place* em que está armazenado.

2.3 Marking

O marking representa o estado atual da rede, isto é, a disposição dos tokens entre os places da rede. Para realizar a simulação de uma Rede de Petri, deve ser definido um marking inicial para todos os *places*. Ao longo da execução da rede, a cada disparo de uma transição, o *marking* da rede será atualizado[4]. O comportamento da rede pode ser descrito pela evolução de seu *marking*.

¹*Places* e lugares, *transitions* e transições serão usados indistintamente neste relatório

2.4 Places

Os *places* representam as entidades biológicas do modelo em questão. Places, geralmente, representam substâncias químicas, genes, proteínas, células e indivíduos de uma população. Neste trabalho, um *place* é utilizado para representar células e moléculas que participam da resposta imune.

Os *places* armazenam os tokens da rede. Na Rede de Petri Colorida, cada *place* tem um *colorset* ou tipo de dado pré-definido. Por exemplo, um *place* com o *colorset* Bacteria pode armazenar somente tokens do tipo Bacteria (Figura 1).

Nas redes de Petri, nenhum *place* pode estar ligado a outro diretamente. Eles são ligados através de transições.

2.5 Transições

As transições representam as interações/relações entre os *places*. As transições são usadas para representar os diversos processos de um sistema biológico. Por exemplo, as transições podem representar reações químicas entre duas substâncias, a ativação ou inibição de um gene, a morte de uma população, migração, entre vários outros processos.

Uma transição pode estar em um de dois estados: habilitada ou desabilitada. Para que uma transição esteja habilitada, um conjunto de condições deve ser satisfeito:

- O número de tokens disponível em cada pré-place é maior ou igual à quantidade de tokens especificada no arco de entrada (*input arc*) que sai do pré-place e vai para a transição;
- As expressões de cada arco de entrada e de saída são satisfeitas;
- A condição de guarda da transição é satisfeita.

Outro conceito relacionado a uma transição é o conceito de disparo. O disparo de uma transição é um evento que representa a execução de uma transição. Uma transição é disparada quando está habilitada e quando é escolhida dentre as outras para ser disparada naquele instante. Quando uma transição é disparada ela consome todos os tokens que estão nos seus arcos de entrada e produz todos os tokens especificados nos arcos de saída.

Existem quatro tipos de transições na rede colorida estocástica:

Estocástica A probabilidade de uma transição estocástica ser disparada é definida pela função apresentada na Equação 1 da Seção 3. Esse tipo de transição permite a definição de uma condição de guarda e de uma função de transição. Todas as transições utilizadas neste trabalho são estocásticas.

Imediata Uma transição imediata ocorre assim que fica habilitada. Ela pode receber um peso que altera a probabilidade de sua ocorrência.

Determinística Uma transição determinística dispara depois de um tempo de espera determinístico, relativo ao instante de tempo no qual a transição tornou-se habilitada.

Planejada Uma transição desse tipo é planejada para disparar em um ou mais pontos equidistantes no tempo.

A função de transição (conhecida como *rate function*) é usada para alterar a probabilidade de disparo de uma transição estocástica. Ela faz isso através da definição de uma equação que pode depender da quantidade

de tokens dos pré-places. Neste trabalho, diferentes equações são definidas para as funções de transição para modelar a seguinte relação: a probabilidade de uma transição ocorrer depende das quantidades das populações envolvidas na transição. Ou seja, a probabilidade de uma transição ocorrer pode aumentar ou diminuir dependendo da quantidade de tokens dos pré-places conectados a ela. Dessa forma, é possível fazer com que a probabilidade de ocorrência de cada evento/processo modelado seja dinâmica e dependa da distribuição de indivíduos na população no instante atual.

2.6 Arcos

Arcos são elementos que ligam os *places* às transições. Os arcos podem ter diversas expressões associadas. As expressões podem especificar a quantidade de tokens de um determinado *colorset* ou de uma determinada cor e expressões relacionais que envolvem essas quantidades. As expressões definem quantos tokens saem ou vão para um *place* dependendo da direção do arco. Os arcos podem ser diferenciados em arcos de entrada (*input arcs*) e arcos de saída (*output arcs*). Os arcos de entrada são todos os arcos que têm como vértice de origem um *place* e como vértice de destino uma transição. Já os arcos de saída ligam uma transição (vértice origem) a um *place* (vértice destino).

Existem seis tipos de arcos: arcos padrões (*standard arcs*), arcos de leitura (*read arcs*), arcos de inibição (*inhibitor arcs*), arcos modificadores (*modified arcs*), arcos de igualdade (*equal arcs*) e arcos de reinício (*reset arcs*).

Arcos padrões Quando o arco padrão é um arco de entrada, o *place* de origem perde a quantidade de tokens especificada na expressão do arco. Quando, por sua vez, é de saída, o *place* de destino recebe a quantidade de tokens especificada no arco.

Arcos de leitura Os arcos de leitura só podem ser usados como arcos de entrada. Eles enviam tokens para uma transição porém não os consome do *place* de origem. São usados para definir uma quantidade mínima de tokens e alterar a probabilidade de disparo da transição conectada a ele.

Arcos de inibição Um arco inibidor inverte a lógica da condição de habilitação de um *place*, ou seja, impõe uma pré-condição de que uma transição só pode ser acionada se o lugar contiver menos tokens do que o peso do arco indica. São usados para definir uma quantidade máxima de tokens que o pré-place pode conter.

Arcos modificadores Um arco modificador conecta um pré-*place* a uma transição, podendo modificar a taxa de disparo da transição, mas esse tipo de arco não tem influência na habilitação da transição.

Arcos de igualdade Um arco de igualdade impõe a condição de que a transição conectada a ele só pode disparar se o número de tokens do *place* conectado ao arco é igual ao peso do arco.

Arcos de reinício É um tipo de arco que permite esvaziar um *place* quando a transição conectada por ele dispara.

Os arcos transmitem tokens por meio de variáveis. Variáveis estas, definidas pelo usuário e que pertencem à somente um *Colorset*.

3 Rede de Petri Estocástica

As redes de Petri estocásticas são uma extensão das redes de Petri qualitativas. A extensão ocorre através da associação de taxas de disparo com atrasos aleatórios às transições, fornecendo uma forma de modelar sistemas estocásticos [4, 5].

O atraso da taxa de disparo associado a cada transição t de uma rede de Petri é uma variável aleatória X_t definida pela seguinte distribuição exponencial de probabilidades [6]:

$$f_{X_t}(\tau) = 1 - \frac{1}{e^{(\lambda_t(m) \cdot \tau)}}, \tau \geq 0. \quad (1)$$

Onde m é o número de tokens dos pré-places conectados à transição e λ_t é uma função matemática que depende da quantidade de tokens dos pré-places no tempo τ . A função f_{X_t} mostra que quanto maior for o valor da função λ_t maior será o valor total, que tem seu máximo em 1 [6]. Sendo assim, quanto menor o atraso da taxa de disparo, maior a frequência com que a transição ocorrerá em relação às outras. Podemos alterar a frequência com que uma transição ocorre através de uma função de transição (Seção 2.5).

As funções de transição podem, por exemplo, considerar influências (positivas ou negativas) entre os *places*. Por exemplo, suponha que, em uma transição chamada *Phag*, esteja definida a seguinte função de transição:

$$Phag = \frac{0.05 \times B \times N}{0.5 \times B + 0.5 \times D + 1} \quad (2)$$

Nessa função, B , N e D representam o número de tokens nos pré-places B , N e D respectivamente. Essas quantidades vão influenciar a taxa com que a transição irá ocorrer. No caso da transição *Phag*, B e N contribuem para o aumento da taxa de transição através do termo $0.05 \times B \times N$ e a taxa diminui à medida que B e D aumentam devido à presença do termo $0.5 \times B + 0.5 \times D + 1$ no denominador. As influências dos três places foram consideradas modelando o fato de que a probabilidade da fagocitose ocorrer aumenta à medida que a quantidade de bactérias e neutrófilos aumenta e a probabilidade diminui devido à ação das bactérias para escapar da resposta imune e devido à ação do dano tecidual que atrapalha a fagocitose.

Devido às mudanças que podem ocorrer em tempo de execução nos atrasos de cada transição, a evolução do marking da rede a partir de um mesmo marking inicial é diferente a cada execução, justificando assim, a sua estocacidade.

4 Software para construção e simulação de redes de Petri

4.1 Snoopy

Para modelar e simular a Rede de Petri, utilizamos a ferramenta Snoopy [7]. O Snoopy é uma ferramenta para modelar, animar e simular grafos, neste caso, uma rede de Petri.

Snoopy trás muitas facilidades na construção e na análise da rede de Petri nos seguintes aspectos:

Modelagem A inserção de novos itens na rede (places, transitions e arcs) é feita intuitivamente pelo ponteiro do mouse.

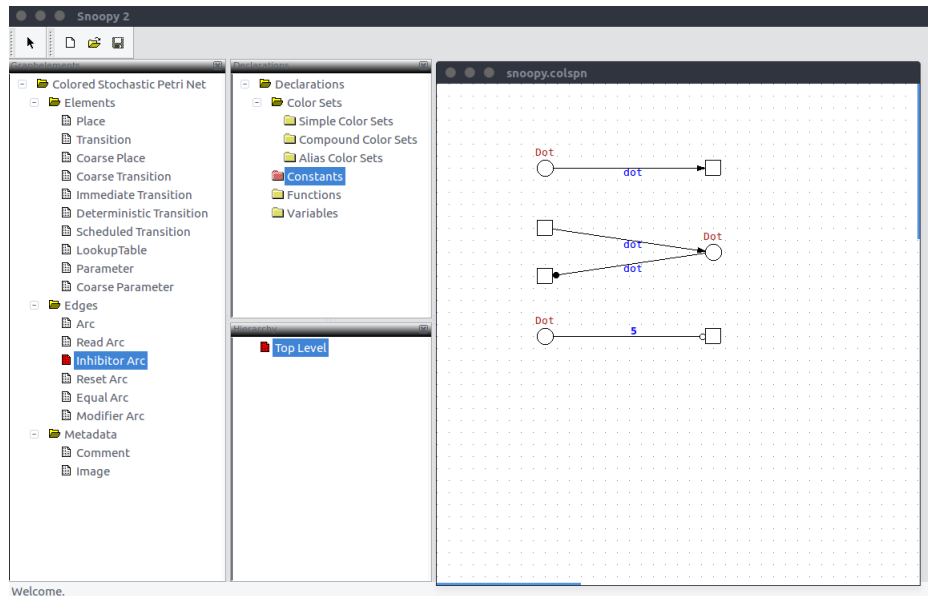


Figura 2: Captura de tela da ferramenta Snoopy

Conjuntos (Sets) O Snoopy permite a criação de conjuntos de parâmetros (Markings, funções de transição, entre outros) o que facilita mudar o estado inicial e o comportamento da rede antes da simulação.

Simulação O Snoopy possui uma interface de simulação poderosa, onde conta com 4 algoritmos de simulação estocástica, permite escolher conjuntos de parâmetros a cada simulação e permite a visualização de gráficos após a mesma.

Gráficos Após a simulação, os dados estão disponíveis para disposição em gráficos ou para exportação. O Snoopy permite ao usuário criar gráficos que exibem a quantidade de tokens em cada *place* ou a taxa de disparo de cada transição.

Embora a interface (figura 4.1) do Snoopy seja simples e intuitiva, ele se mostra uma ferramenta poderosa na criação e simulação de redes de Petri, sendo necessário um aprofundamento maior no estudo da sintaxe de suas funções.

5 Modelo - Interação bactéria-neutrófilo

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foram construídas várias redes de Petri estocásticas que modelam processos e interações que ocorrem durante a resposta imune inata a uma infecção bacteriana. O objetivo inicial foi construir uma rede simples que conseguisse capturar dois comportamentos:

Eliminação das bactérias Cenário onde os neutrófilos conseguem, durante o tempo simulado, eliminar completamente as bactérias.

Infecção persistente Cenário onde os neutrófilos já não são capazes de eliminar as bactérias que persistem no hospedeiro, podendo inclusive apresentar uma tendência de crescimento com o passar do tempo.

A rede de Petri mais simples construída que é capaz de exibir esses dois comportamentos é mostrada na Figura 3.

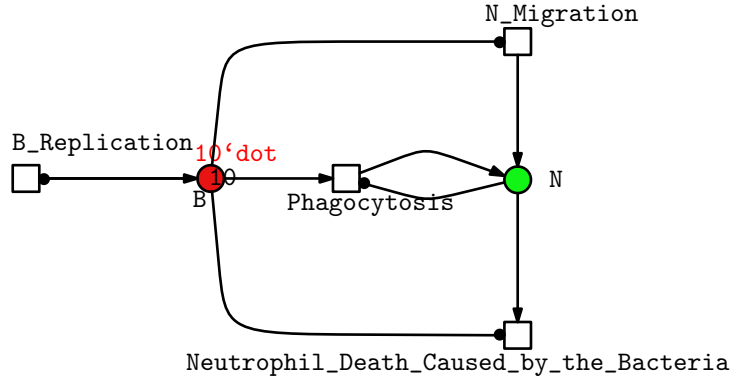


Figura 3: Rede mais simples que representa a interação bactéria-neutrófilo

Essa rede de Petri possui dois places: **B** (que representa as bactérias) e **N** (que representa os neutrófilos). A rede possui um único colorset (o colorset *Dot*) que é o mesmo usado em redes de Petri não coloridas. O tipo de dados dot representa um token que pode ser transmitido entre *places* e transições. O *place* B começa com um marking inicial de 10 dots representando uma infecção inicial do tecido e o *place* N começa com 0 dots representando o fato de que inicialmente, na ausência de infecção, não há neutrófilos no tecido.

Os seguintes processos foram modelados com essa rede:

1. Replicação (transição Replication): as bactérias se replicam com uma probabilidade dada por $\frac{0.1B}{B+1}$. Essa função modela uma replicação com saturação, onde a probabilidade de replicação aumenta lentamente com a quantidade de bactérias até saturar em 0.1. Essa saturação é necessária para evitar uma replicação exponencial das bactérias. Para modelar a replicação, foi utilizado um arco de leitura (arco Read) como arco de entrada e um arco padrão como arco de saída. Essa escolha se deve ao fato de que um arco de leitura pode alterar a taxa de disparo de uma transição não consumindo os tokens dos pré-places como explicado na Seção 2.6.
2. Fagocitose (transição Phagocytosis): uma bactéria é fagocitada quando encontra um neutrófilo. Nesse caso, a bactéria perde um token e a quantidade de tokens do neutrófilo fica inalterada. Essa transição ocorre com probabilidade $\frac{0.01BN}{0.5B+1}$. Essa função modela o fato de que a probabilidade de fagocitose é proporcional ao número de bactérias e neutrófilos, ou seja, quanto maior o número de bactérias e/ou de neutrófilos maior é o valor da função. A função também possui uma saturação dependente da quantidade de bactérias. Nesse caso, o termo $0.5B + 1$ no denominador modela uma diminuição na probabilidade da transição ocorrer à medida que a quantidade de bactérias aumenta e seu uso é motivado por mecanismos empregados pela bactéria para escapar da fagocitose.
3. Migração dos neutrófilos (transição Neutrophil_Migration): A migração dos neutrófilos para o tecido ocorre quando há uma infecção. A função de transição é dada por $\frac{0.1B}{B+1}$. Nesse caso, a probabilidade de migração aumenta com a quantidade de bactérias e também há uma inibição desse processo realizada pela própria bactéria. Essa inibição também é motivada por mecanismos biológicos empregados pela bactéria que atrapalham a migração de células do sistema imune para o tecido infectado.

4. Morte dos neutrófilos (transição *Neutrophil_Death_Caused_by_the_Bacteria*): As bactérias produzem diversas toxinas (não modeladas explicitamente na rede) que causam a morte dos neutrófilos. A morte dos neutrófilos é proporcional à concentração de bactérias e de neutrófilos e é modelada pela função $0.001BN$.

6 Modelo com Dano Tecidual

Com o objetivo de estudar infecções crônicas e seus efeitos na resposta imune inata, foi desenvolvida uma outra rede de Petri (Figura 4) que modela novas populações e novos processos. As novas populações modeladas são: macrófagos (*place* Macrophages), macrófagos mortos (*place* MD), o dano tecidual (*place* Damage), neutrófilos apoptóticos (*place* ND) e citocinas anti-inflamatórias (*place* AC).

Os macrófagos foram escolhidos por desempenharem um papel muito importante na regulação da resposta imune, controlando a inflamação e limpando o local da infecção através da fagocitose dos neutrófilos apoptóticos (transição *Phag_ND_M*), da fagocitose de células de tecido mortas (transição *Phag_D_M*) e da produção de citocinas anti-inflamatórias (produção de AC). A fagocitose dos neutrófilos apoptóticos é importante para evitar que os neutrófilos sofram necrose e liberem, como consequência desse processo, um conjunto de substâncias que podem causar dano tecidual. Outro processo importante, a fagocitose de células mortas, evita mais inflamação e mais dano tecidual. As citocinas anti-inflamatórias são responsáveis por regular a entrada de novas células do sistema imune (principalmente neutrófilos) no local da infecção, impedindo um crescimento da inflamação e dos danos teciduais.

Jarrett *et al.* [8] acreditam que a resposta anti-inflamatória dos macrófagos e a via reguladora da resposta adaptativa são importantes para o controle da inflamação, evitando mais danos aos tecidos, limpando e liberando o local da infecção para que a resposta adaptativa pró-inflamatória funcione melhor no ambiente em questão. Eles também destacam a importância das respostas Treg e Th2 [8].

A importância dos macrófagos também é destacada no trabalho de Cohen *et al.* [9]. A pneumonia bacteriana, como a causada por *S. aureus*, é associada com um influxo de neutrófilos no tecido do pulmão e nas vias respiratórias. A regulação e limpeza dos neutrófilos recrutados é essencial para prevenir um dano tecidual causado pelo “fogo amigo”, sendo essa uma responsabilidade dos macrófagos em um processo chamado eferocitose. Cohen *et al.* [9] hipotetizaram que a bactéria *S. aureus* prejudica a eferocitose realizada pelos macrófagos alveolares através da atividade do fator de virulência chamado *alpha toxin*, que também está associado com alterações na função antimicrobial dos macrófagos alveolares.

Nós acreditamos que uma possível explicação para essa importância pode estar também no fato de que, no contexto de infecções persistentes com a bactéria *S. aureus*, a presença de quantidades consideráveis de neutrófilos necróticos, células de tecido mortas e outras células mortas prejudica as interações entre neutrófilos e bactérias, entre células B plasmáticas e bactérias assim como entre os anticorpos e as bactérias.

6.1 Processos modelados

As transições que modelam os novos processos considerados na rede de Petri são descritas na tabela 1. Nessa tabela, apresentamos o nome da transição, uma breve descrição do processo modelado pela transição, os efeitos do processo, os *places* que participam da transição e com quais tipos de arcos estão ligados a ela, além de apresentar a função de transição utilizada.

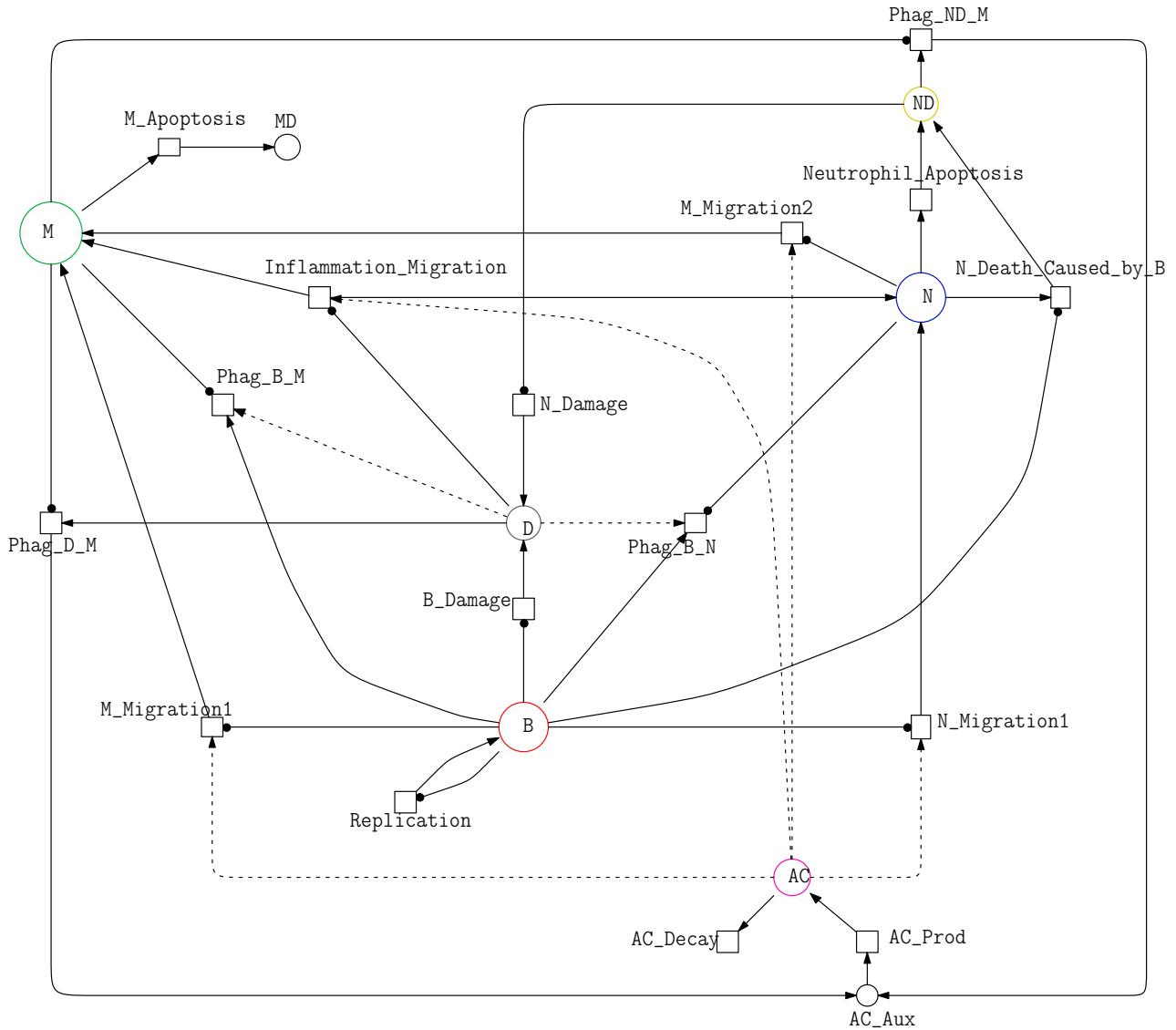


Figura 4: Rede de Petri para a resposta imune inata considerando o papel regulador dos macrófagos e os efeitos do dano tecidual. As bactérias são representadas pelo *place* Bacteria na cor vermelha, os neutrófilos são representados pelo *place* Neutrophil em azul, os neutrófilos apoptóticos são representados pelo *place* ND em amarelo, os macrófagos são representados pelo *place* Macrophages em verde, macrófagos mortos são representados pelo *place* MD na cor preta, o dano tecidual é representado pelo *place* Damage em cinza e as citocinas anti-inflamatórias são representadas pelo *place* AC na cor rosa. As transições são representadas pelos quadrados.

Tabela 1: Transições

Nome	Descrição	Efeito	Places	Função
Replication	As bactérias se replicam com determinada probabilidade e a replicação possui uma saturação.	Aumenta o número de tokens de B em 1.	B [arc in = read, arc out = std]	$\frac{0.5 \times B}{B+1}$
Phag_B_N	Modela a fagocitose das bactérias realizada pelos neutrófilos.	Diminui o número de tokens de B em 1.	B [arc in = std], N [arc in = read] D [arc in = mod]	$\frac{0.1 \times B \times N}{0.5 \times B + 0.1 \times D + 1}$
Phag_B_M	Modela a fagocitose das bactérias realizada pelos macrófagos.	Diminui o número de tokens de B em 1.	B [arc in = std] M [arc in = read] D [arc in = mod]	$\frac{0.05 \times B \times M}{0.5 \times B + 0.1 \times D + 1}$
N_Death_B	Modela a morte de neutrófilos causada pelas bactérias.	Diminui o número de tokens de N em 1.	B [arc in = read] N [arc in = std] ND [arc out = std]	$0.005 \times B \times N$
Inflam_Mig	Modela a migração de neutrófilos e macrófagos como consequência da inflamação causada pela morte de células do sistema imune e pelo dano tecidual.	Aumenta em 1 o número de tokens de N e M.	D[arc in = read] AC[arc in = mod] N[arc out = std] M[arc out = std]	$0.005 \times D$
N_Migration1	Modela a migração dos neutrófilos atraídos pelas bactérias.	Aumenta o número de tokens de N em 1.	B[arc in = read] AC[arc in = mod] N [arc out = std]	$\frac{0.1 \times B}{0.1 \times B + 0.3 \times AC + 1}$
M_Migration1	Modela a migração dos macrófagos atraídos pela bactéria.	Aumenta em 1 o número de tokens de M.	B[arc in = read] AC[arc in = mod] M[arc out = std]	$\frac{0.001 \times B + 0.000001}{0.1 \times AC + 1}$

Continua na próxima página

Tabela 1 – continuando da página anterior

Nome	Descrição	Efeito	Places	Função
M_Migration2	Modela a migração dos macrófagos atraídos pelos neutrófilos.	Aumenta em 1 o número de tokens de M.	N[arc in = read] AC[arc in = mod] M[arc out = std]	$\frac{0.001 \times N}{0.1 \times AC + 1}$
N_Apoptosis	Modela a apoptose dos neutrófilos.	Diminui em 1 o número de tokens de N.	N [arc in = std] ND[arc out = std]	$0.02 \times N$
M_Apoptosis	Modela a apoptose dos macrófagos.	Diminui em 1 o número de tokens de M.	M [arc in = std] MD [arc out = std]	$0.001 \times M$
B_Damage	Modela o dano tecidual causado pelas bactérias.	Aumenta em 1 o número de tokens de D.	B [arc in = read] D [arc out = std]	$0.005 \times B$
N_Damage	Modela o dano tecidual causado pelos neutrófilos necróticos.	Aumenta em 1 o número de tokens de D.	ND [arc in = read] D [arc out = std]	$0.01 \times ND$
Phag_D_M	Modela a fagocitose de células de tecido mortas realizada pelos macrófagos.	Diminui em 1 o número de tokens de D.	D [arc in = std] M [arc in = read] AC_Aux[arc out=std]	$0.005 \times M \times D$
Phag_ND_M	Modela a fagocitose de neutrófilos apoptóticos realizada pelos macrófagos.	Diminui em 1 o número de tokens de ND.	ND [arc in = std] M [arc in = read] AC_Aux[arc out=std]	$0.05 \times M \times ND$
AC_Prod	Modela a produção de citocinas anti-inflamatórias.	Aumenta em 1 o número de tokens de AC.	AC_Aux[arc in = std] AC[arc out=std]	$0.05 \times AC_Aux$

Continua na próxima página

Tabela 1 – continuando da página anterior

Nome	Descrição	Efeito	Places	Função
AC_Decay	Modela o decaimento de citocinas anti-inflamatórias.	Diminui em 1 o número de tokens de AC.	AC[arc in = std]	$0.05 \times AC$

Analisando-se a tabela de transições, destaca-se as seguintes características do modelo:

- O dano tecidual influencia negativamente os processos de fagocitose.
- As citocinas anti-inflamatórias influenciam negativamente todos os processos de migração de neutrófilos e macrófagos que são modelados pelas transições N_Migration1, M_Migration1, M_Migration2 e Inflammation_Migration. Dessa forma, atuam na regulação da resposta imune contribuindo para a resolução da inflamação durante um processo infeccioso.
- A transição Inflammation_Migration modela o recrutamento de mais células do sistema imune (neutrófilos e macrófagos) devido aos efeitos da inflamação (aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade do endotélio dos vasos, sinalização pró-inflamatória como consequência da morte de células, entre outros).
- Através das transições Phag_D_M e Phag_ND_M, o macrófago realiza a limpeza do local infectado contribuindo para o término da inflamação.

7 Resultados

Para analisar as redes de Petri construídas e verificar os comportamentos que podem ser obtidos, realizou-se diversas simulações considerando-se diferentes cenários. Os cenários simulados tentam refletir diferentes condições fisiológicas e patológicas encontradas na literatura assim como tentam ilustrar o efeito de determinadas variáveis e processos na dinâmica do sistema. Os resultados mostram a evolução do *marking* dos *places* ao longo do tempo.

7.1 Rede de Petri da interação bactéria-neutrófilo

Para a rede de Petri que modela a interação bactéria-neutrófilo, foi simulado somente o cenário de uma resposta imune “normal”, ou seja, as taxas de migração e fagocitose foram ajustadas de forma que os neutrófilos conseguissem eliminar as bactérias na maioria das simulações.

Os resultados para o cenário da resposta imune “normal” podem ser observados nas Figuras 5 e 6.

Na Figura 5, observa-se que as bactérias foram completamente eliminadas. As bactérias iniciam com um *marking* igual a 10 (tokens do tipo *dot*) e os neutrófilos iniciam com um *marking* igual a 0, ou seja, a quantidade inicial de bactérias é 10 e a de neutrófilos é 0. Observa-se na Figura 5 que as bactérias apresentam um crescimento

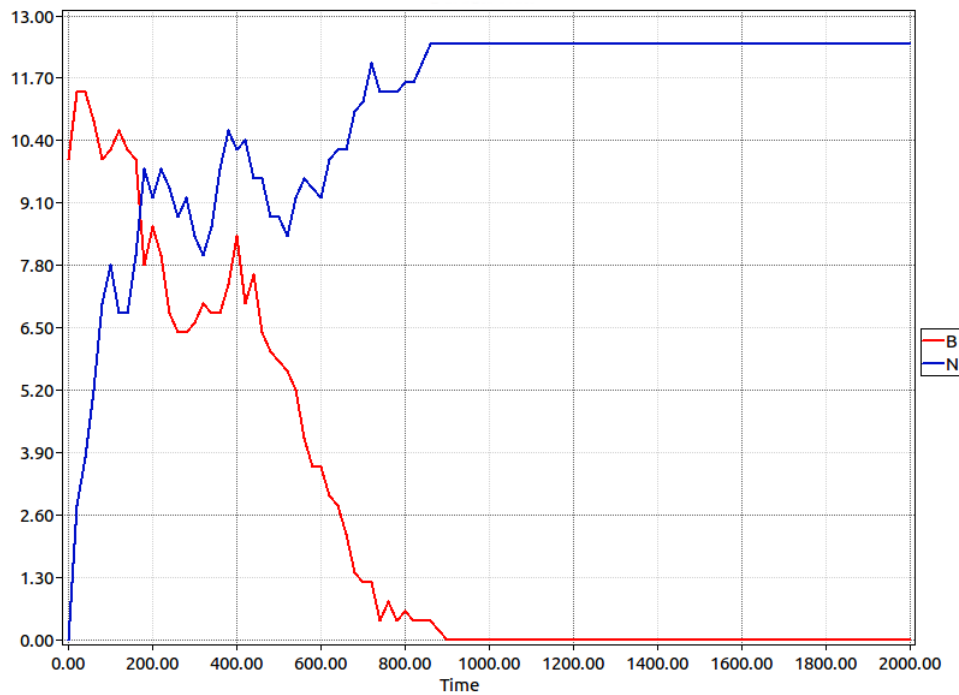


Figura 5: Eliminação da infecção obtida pela rede de Petri da interação bactéria-neutrófilo. B representa as bactérias e N representa os neutrófilos.

pequeno no início e depois decrescem até serem eliminadas. Esse decrescimento foi devido a fagocitose realizada por um maior número de neutrófilos que migraram para o tecido. Após a eliminação das bactérias, a quantidade de neutrófilos se estabiliza devido ao fato de que não foi modelado o processo de apoptose ou morte natural dos neutrófilos.

Na Figura 6, observa-se que os neutrófilos não foram capazes de eliminar as bactérias. Nesse caso, as bactérias foram bem sucedidas em persistir no hospedeiro. Esse cenário ilustra uma infecção crônica.

É importante destacar que devido ao fato da rede ser estocástica, esses dois comportamentos foram obtidos sem realizar nenhuma modificação na rede.

7.2 Rede de petri com dano tecidual

Para a rede de Petri com dano tecidual, os seguintes cenários foram considerados:

1. Resposta imune normal;
2. Depleção dos macrófagos;
3. Depleção dos leucócitos, ou seja, depleção de neutrófilos e macrófagos;

A depleção é a redução drástica de alguma célula, molécula ou substância ou de um processo físico, químico ou biológico. A depleção de células imunes efetoras (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) tem sido usada de forma bem sucedida para delinear os papéis e funções dessas células nas respostas imunes (DALEY et al., 2008).

O primeiro cenário representa um sistema imune saudável pronto para combater a infecção. O resultado para esse cenário é mostrado na Figura 7. Observa-se que, após as bactérias apresentarem um pequeno crescimento,

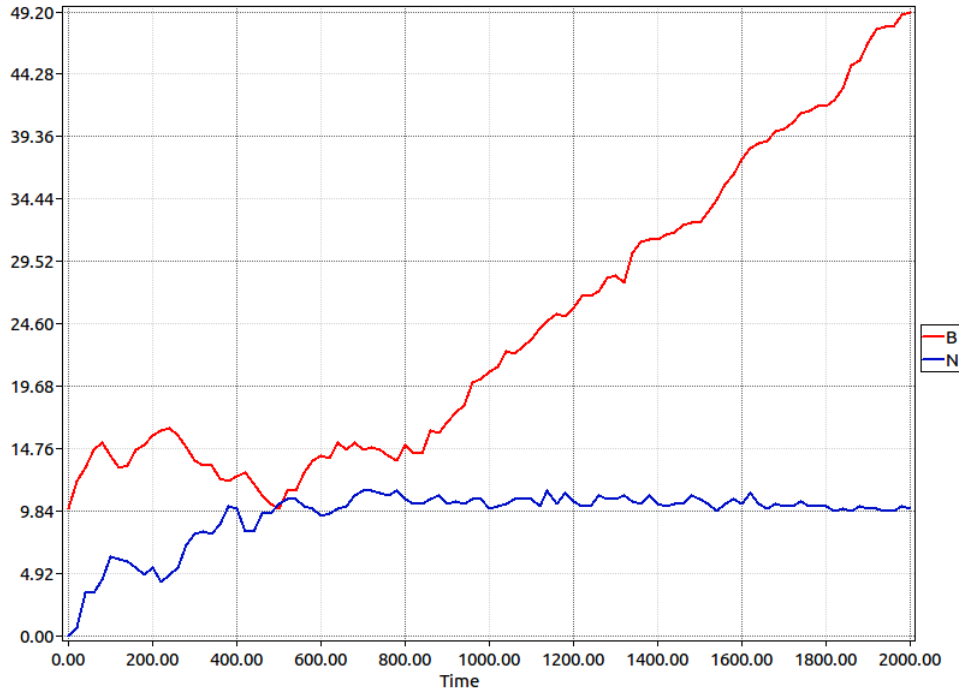


Figura 6: Infecção persistente obtida pela rede de Petri da interação bactéria-neutrófilo. B representa as bactérias e N representa os neutrófilos.

elas começam a decrescer até serem completamente eliminadas. Os neutrófilos que migram para o tecido são os principais responsáveis pela eliminação das bactérias. Observa-se um aumento no dano tecidual com o crescimento do número de neutrófilos. O crescimento de neutrófilos e do dano tecidual é acompanhado por um crescimento no número de macrófagos que migram para o tecido em resposta à inflamação. Como consequência da migração dos macrófagos, pode-se observar a partir de $t = 100$ aproximadamente, uma diminuição da quantidade de neutrófilos, da quantidade de dano tecidual e de neutrófilos apoptóticos até não haver mais dano e nem neutrófilos (vivos e apoptóticos) no tecido, mostrando que os macrófagos realizaram de forma bem sucedida a regulação da resposta imune e o controle da inflamação.

O cenário 2 que simula a depleção dos macrófagos tenta ilustrar a importância desse tipo de célula na regulação e resolução da resposta imune. Para simular esse cenário, as taxas das funções de transição $M_Migration1$ e $M_Migration2$ foram diminuídas, sendo consideradas taxas três vezes menor do que as do cenário 1. O resultado desse cenário é mostrado na Figura 8.

Observa-se, na Figura 8, durante um tempo considerável após a eliminação das bactérias, a presença de dano tecidual e de neutrófilos, ilustrando o fato de que a inflamação demorou a ser controlada. Isso se deve ao fato de que há menos macrófagos migrando para controlar a inflamação. Os poucos macrófagos presentes no tecido demoram a realizar a limpeza do local infectado (através da fagocitose de células mortas e de neutrófilos apoptóticos). Como consequência da inflamação persistente, há uma segunda onda de migração de neutrófilos, por volta do instante de tempo $t = 340$, atraídos pela inflamação. Por fim, próximo do tempo $t = 600$, a inflamação cessa.

No cenário 3, temos a depleção de neutrófilos e macrófagos. O resultado para esse cenário é mostrado na Figura 9. Pode-se observar que, em relação aos outros cenários, a resposta imune levou um tempo maior para

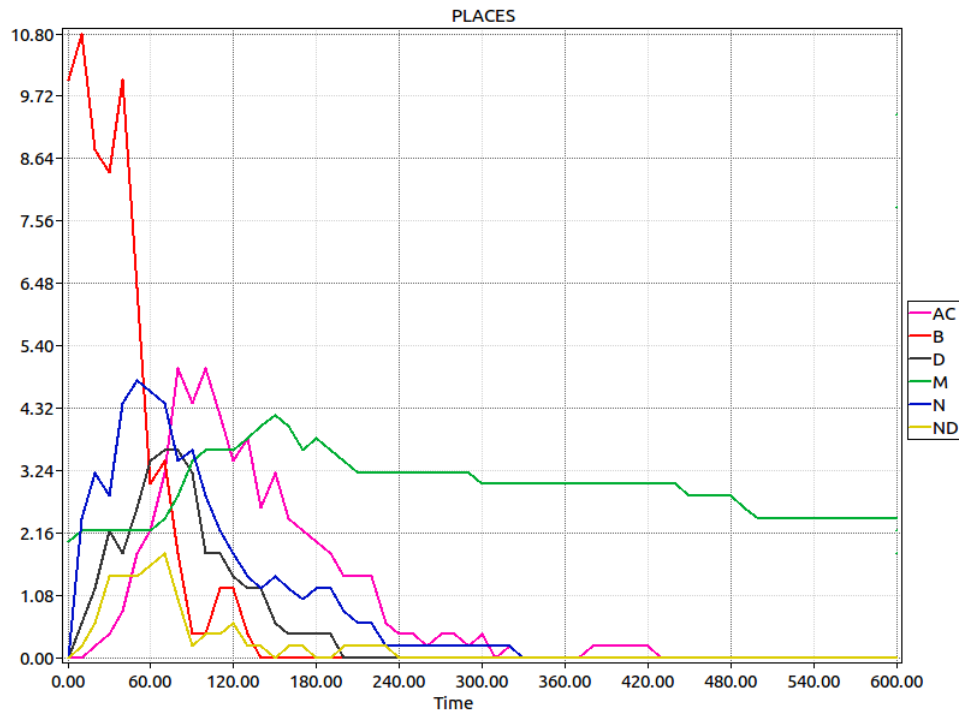


Figura 7: Eliminação das bactérias e resolução da inflamação na rede de Petri com dano tecidual. As citocinas anti-inflamatórias (AC) são representadas pela linha rosa. As bactérias (B) estão representadas em vermelho. O dano tecidual (D) é representado pela linha na cor preta. Os macrófagos (M) estão representados pela cor verde. A cor azul representa os neutrófilos (N) e a cor amarela representa os neutrófilos apoptóticos (ND).

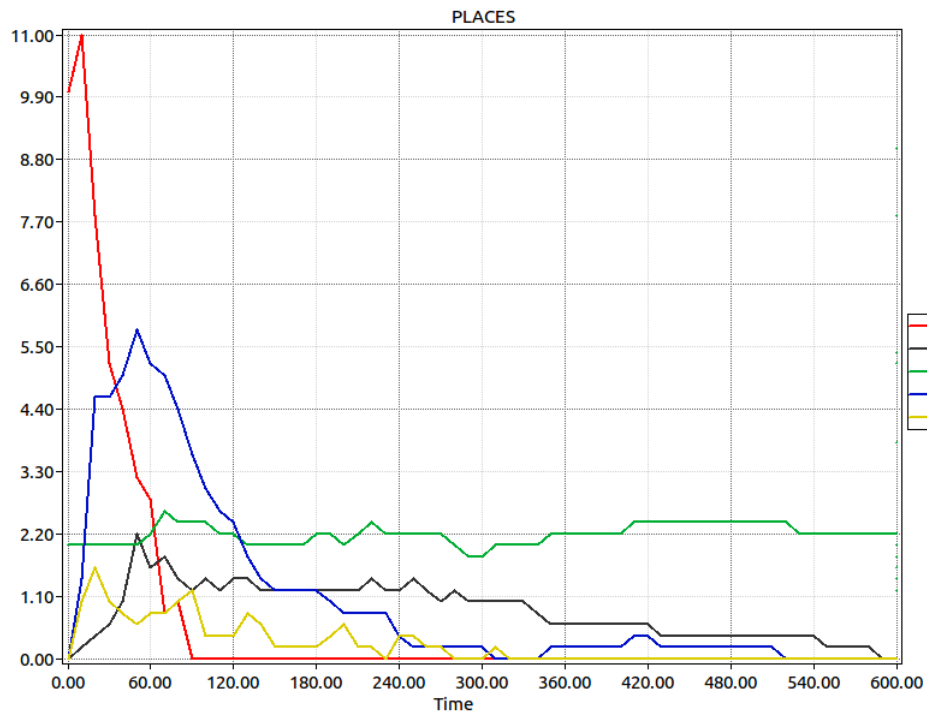


Figura 8:

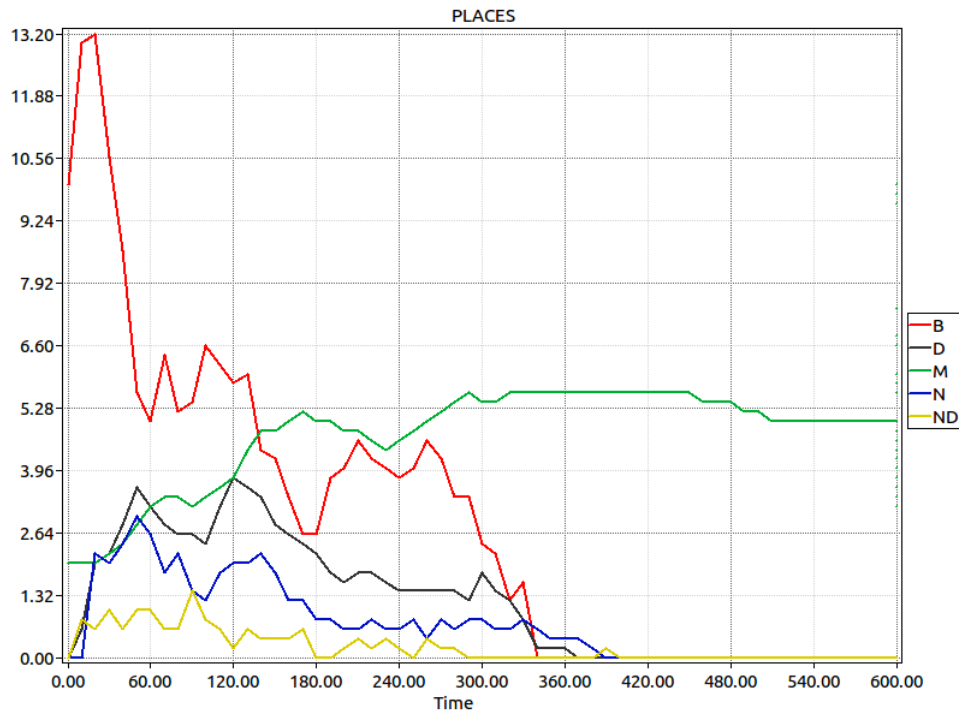


Figura 9:

eliminar as bactérias. Isso ocorreu porque poucos neutrófilos e macrófagos migram para o local infectado. Eles não são capazes de conter a infecção durante um bom tempo.

8 Conclusão

Neste trabalho, desenvolveu-se redes de Petri para a modelagem da resposta imune inata. Foi possível modelar diversos processos presentes nas respostas imunes através da definição de funções de transição nas transições estocásticas e da utilização de arcos padrões e arcos modificadores.

O software Snoopy facilitou e acelerou o processo de construção e simulação das redes de Petri, permitindo, entre outros recursos, a visualização da rede, visualização dos resultados da simulação e um passo a passo da execução da rede através de uma animação.

A partir das simulações realizadas, observou-se a importância da transição *Inflammation_Migration* no surgimento de um estado de inflamação crônica. A presença de um *feedback* positivo entre o dano tecidual, neutrófilos e macrófagos modelando a migração de células do sistema imune devido a efeitos da inflamação enfatiza a importância do controle da inflamação que evita um estado de inflamação persistente. Também observou-se, a partir da análise dos resultados, que o dano tecidual/inflamação persiste se existe algum prejuízo nas funções dos macrófagos.

Referências

- [1] Rafael V. Carvalho, Jeroen Van den Heuvel, Jetty Kleijn, and Fons J. Verbeek. Coupling of petri net models of the mycobacterial infection process and innate immune response. *Computation*, 3(2):150–176, 2015.

- [2] Sarah Schmidt Grant and Deborah T. Hung. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence*, 4(4):273–283, 2013. PMID: 23563389.
- [3] Denise Morais da Fonseca, Timothy W. Hand, Seong-Ji Han, Michael Y. Gerner, Arielle Glatman Zaretsky, Allyson L. Byrd, Oliver J. Harrison, Alexandra M. Ortiz, Mariam Quinones, Giorgio Trinchieri, Jason M. Brenchley, Igor E. Brodsky, Ronald N. Germain, Gwendalyn J. Randolph, and Yasmine Belkaid. Microbiota-dependent sequelae of acute infection compromise tissue-specific immunity. *Cell*, 163(2):354 – 366, 2015.
- [4] Fei Liu. *Colored Petri Nets for systems biology*. doctoralthesis, BTU Cottbus - Senftenberg, 2012.
- [5] Monika Heiner, Robin Donaldson, and David Gilbert. Petri nets for systems biology.
- [6] Fei Liu and Ming Yang. Sersc colored stochastic petri nets for modeling complex biological systems. 2013.
- [7] Monika Heiner, Mostafa Herajy, Fei Liu, Christian Rohr, and Martin Schwarick. Snoopy – a unifying petri net tool. In Serge Haddad and Lucia Pomello, editors, *Application and Theory of Petri Nets*, pages 398–407, Berlin, Heidelberg, 2012. Springer Berlin Heidelberg.
- [8] Angela M Jarrett, N G Cogan, and M E Shirliff. Modelling the interaction between the host immune response, bacterial dynamics and inflammatory damage in comparison with immunomodulation and vaccination experiments. *Mathematical medicine and biology : a journal of the IMA*, 32(3):285–306, September 2015.
- [9] Taylor S Cohen, Omari Jones-Nelson, Meghan Hotz, Lily Cheng, Lloyd S Miller, JoAnn Suzich, C Kendall Stover, and Bret R Sellman. *S. aureus* blocks efferocytosis of neutrophils by macrophages through the activity of its virulence factor alpha toxin. *Scientific reports*, 6:35466–35466, October 2016.