

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Trabalho de Conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas,  
Ênfase Molecular, Celular e Funcional

**DINÂMICA DE HEMÓCITOS CIRCULANTES EM LARVAS  
DE *CHRYSOMYA MEGACEPHALA* (FABRICIUS, 1794) (DIPETRA:  
CALLIPHORIDAE)**

Aluna: Gabriela Bettella Cybis

Orientador: Carlos Eugênio Silva

Regras de Formatação: Revista Brasileira de Entomologia

Porto Alegre, 15 de Dezembro de 2007

## CIRCULATING HEMOCYTE DYNAMICS IN *CHRYSOMYA MEGACEPHALA*

(FABRICIUS, 1794) (DIPETRA: CALLIPHORIDAE) LARVAE

**Abstract:** Inflammatory response is one of the most important defense mechanisms in vertebrates, which count also on adaptative immunity; but it is in invertebrates, which have only innate defense mechanisms, that inflammatory response assumes a main role. This kind of immunity is easily isolated and studied in invertebrates, so that in this paper a study of the hemocyte dynamic in response to immune challenges in *Chrysomya megacephala* is presented. Hemocyte and microagregate counts in third instar larvae hemolymph were experimentally determined after inoculation with three different microorganisms; and a mathematical model for the insect cells dynamics and their interaction with the invading microorganism is presented. Comparisons between experimental results and mathematical modeling bring about important reflections concerning the key elements of microagregation response in insects.

**Key-Words:** invertebrate immunology, inflamatory response, mathematical modeling, microagregation.

**DINÂMICA DE HEMÓCITOS CIRCULANTES EM LARVAS DE *CHRYSOMYA*  
*MEGACEPHALA* (FABRICIUS, 1794) (DIPETRA: CALLIPHORIDAE)**

**Resumo:** A resposta inflamatória é um dos principais mecanismos de defesa, tanto para vertebrados dotados de imunidade adquirida quanto para invertebrados. Nos invertebrados, que possuem apenas mecanismos inatos de defesa, a resposta inflamatória tem papel fundamental, além de ser mais facilmente isolada e estudada. Para entender estes mecanismos de resposta celular foi feito um estudo da dinâmica dos hemócitos em resposta a diferentes desafios imunológicos em *Chrysomya megacephala*. Experimentalmente, foram quantificados hemócitos e microagregados na hemolinfa de larvas em resposta a infecções por diferentes microorganismos. Além disso, foi proposto um modelo matemático da dinâmica das células do inseto e suas interações com microorganismos invasores. A comparação entre os resultados experimentais e as decorrências do modelo, traz reflexões sobre os elementos fundamentais da resposta de microagregação nos insetos.

**Palavras-Chave:** imunologia de invertebrados, microagregação, modelagem, resposta inflamatória.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	4
1 Introdução .....	6
2 Revisão Bibliográfica.....	8
2.1 Biologia de <i>Chrysomya megacephala</i> .....	8
2.2 Importância Econômica de <i>C. megacephala</i> .....	9
2.3 Sistemas de Defesa.....	10
2.4 Sistema Imune Inato e Adaptativo .....	12
2.5 Questões Evolutivas .....	12
2.6 O Sistema Imune Inato de Mamíferos .....	14
2.7 Sistema Imune em Díptera.....	14
2.7.1 Melanização .....	16
2.7.2 Peptídeos Antimicrobianos e Resposta Humoral.....	17
2.7.3 Resposta Celular.....	17
2.8 Princípios de Modelagem Matemática.....	19
2.9 Modelagem Matemática em Imunologia .....	21
3 Material e Métodos .....	24
3.1 Obtenção da colônia de <i>Chrysomyia megacephala</i> .....	24
3.2 Manutenção da Colônia <i>Chrysomyia megacephala</i> .....	24
3.3 Preparo das Larvas para Inoculação.....	25
3.4 Preparo do Inóculo .....	25
3.5 Inoculação das Larvas .....	26
3.6 Coleta da Hemolinfa .....	26

3.7	Quantificação de Hemócitos .....	27
3.8	Análise dos Dados.....	27
3.9	Simulações .....	28
4	Resultados .....	29
5	Modelagem.....	34
5.1	Introdução às Equações Diferenciais .....	34
5.2	Um Modelo para a Dinâmica de Hemócitos em Resposta a Infecções.....	38
5.3	Alguns Resultados.....	43
5.3.1	Pontos Singulares .....	43
5.3.2	Populações não Negativas.....	46
5.3.3	O Equilíbrio da População Total de Hemócitos.....	47
5.3.4	Uma Condição para o Crescimento Indeterminado do Microorganismo.....	50
5.4	Simulações .....	52
6	Discussão.....	57
6.1	Diferenças Entre os Tratamentos .....	57
6.2	Alta Variabilidade nas Contagens.....	60
6.3	Microagregados no Tratamento Controle .....	62
6.4	Simplificações do Modelo.....	63
6.5	Tamanho dos Microagregados .....	66
6.6	O Parâmetro R.....	67
6.7	Ajuste do Modelo .....	68
7	Conclusões .....	70
8	Referências Bibliográficas .....	72

## 1 Introdução

Durante muito tempo a atenção dos imunologistas estava voltada para o sistema imune adaptativo, mas ultimamente vem se tornando evidente que muitos dos fenômenos imunes observados não são explicados unicamente pela resposta adaptativa. Dessa maneira, ganha força o estudo do sistema imune inato. (Hoffmann & Reichhart 2002)

Nos vertebrados as respostas imunes inata e adaptativa estão intimamente interligadas, de forma que torna-se difícil isolar os mecanismos da resposta inata para estudo. Portanto, o estudo da imunidade de invertebrados, que não possuem rearranjo somático como parte de mecanismos de defesa, é uma alternativa promissora.

Utilizando a mosca *Chrysomya megacephala*, foram realizados estudos de agregação de hemócitos induzida por microorganismos. Este é um mecanismo bastante interessante e simples de ser estudado, uma vez que a agregação entre células circulantes da hemocele representa o resultado final de diferentes mecanismos de proteção que foram acionados.

Como ferramenta para ampliar a compreensão do problema, foi criado um modelo matemático composto de um sistema de equações diferenciais que tenta explicar a dinâmica de agregação dos hemócitos em resposta a um desafio imunológico. O modelo é baseado nos fenômenos e interações celulares que são aceitos como participantes das respostas de defesa do inseto.

As informações retiradas do modelo da dinâmica de hemócitos foram confrontadas com os dados obtidos do experimento de quantificação de hemócitos do presente trabalho e com outros experimentos semelhantes encontrados na literatura. Essas informações

permitem sugestões de melhorias no modelo e de novas abordagens para modelar o fenômeno.

O objetivo do presente trabalho é utilizar técnicas de modelagem matemática para obter uma melhor compreensão da resposta de defesa em *C. megacephala*, e confrontar os resultados deste modelo com resultados experimentais para verificar a conformidade do modelo.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Biologia de *Chrysomya megacephala*

*Chrysomya megacephala*, popularmente chamada de mosca das latrinas ou mosca oriental das latrinas, é um inseto pertencente à classe Diptera e à família Calliphoridae. Os califorídeos são conhecidos como moscas varejeiras.

Espécie endêmica da Ásia oriental, Austrália e Oceania, *C. megacephala* foi recentemente introduzida na África, América do Sul e América Central (Kurahashi & Magpayo *apud* Sukontason et al. 2003). Relatos contemporâneos indicam sua recente migração para a América do Norte, onde sua primeira identificação foi em 1991 (Tomberlin et al. 2001).

No Brasil a primeira coleta de *C. megacephala* data de 1975 (Tomberlin et al. 2001). No país o inseto predomina nas zonas urbanas, provavelmente por ser originária de uma linhagem da Nova Guiné, onde é encontrada desenvolvendo-se principalmente nas fezes humanas (Wells & Kurahashi *apud* Silva 2005).

*C. megacephala* adulta é uma mosca relativamente grande, podendo atingir 3 cm. de comprimento. A espécie apresenta pequeno dimorfismo sexual, e, como muitos dos califorídeos, tem coloração verde metálica característica no dorso.

Os dípteros apresentam quatro estágios de desenvolvimento, ovo, larva, pupa e adulto. Seu período de desenvolvimento é variável de acordo com condições como a temperatura e fonte de alimento.

As fêmeas de califorídeos realizam a ovoposição em massas de ovos colocadas sobre o substrato, e após aproximadamente oito horas ocorre a eclosão dos ovos. As larvas

desenvolvem-se formando galerias ao se alimentar do substrato onde se encontram. No decorrer de 3 a 5 dias, as larvas passam por 3 instares ( L1, L2, e L3). Nos três instares, as larvas de *C. megacephala* são morfológicamente semelhantes entre si e o ganho de peso acentuado é a principal característica do terceiro instar (Sukontason et al. 2003).

Ao final do último instar, as larvas deixam o substrato para empupar. O período de pupa dura de 4 a 10 dias, ao final do qual emergem insetos adultos. A sobrevivência de *C. megacephala* adulto é, em média, de 60 dias, podendo chegar até 4 meses (Silva 2005).

Na natureza, tanto machos como fêmeas adultos se alimentam de água, substâncias açucaradas e secreções oriundos de animais e vegetais vivos ou mortos. Já as larvas podem se desenvolver sobre carne em decomposição ou excrementos.

Em estudo de tabela de vida de *C. megacephala* cultivadas em laboratório Refaat et al. (2005) verificaram que cada fêmea em seu tempo de vida coloca em média 223,7 ovos. Nesse mesmo estudo foi observado que quase 100% dos ovos eclodiam em um dia, e desses, 38% chegavam ao estágio adulto. As médias de tempo como larva e como pupa obtidas nesse estudo foram de 5,4 dias e 5,3 dias respectivamente. A proporção entre machos e fêmeas é de aproximadamente 1:1. A expectativa de vida verificada nesse estudo foi de aproximadamente 25 dias após a emergência, mas algumas moscas podem chegar a 3 ou 4 meses.

## **2.2 Importância Econômica de *C. megacephala***

Os califorídeos são amplamente conhecidos como agentes de transmissão mecânica de diversas doenças, estando entre os mais perigosos dípteros vetores de patógenos entéricos. Agentes relacionados a gastroenterites e tracoma em recém-nascidos, poliovírus

dos tipos I, II e III, vírus coksakie, enterobactérias *Salmonella* sp. e *Shigella* sp., ovos de vários cestódeos e *Toxoplasma gondii* estão entre os patógenos veiculados por essas moscas (Kuhlhorn *apud* Silva 2005)

Por sua proximidade de convivência com o homem, é acentuado em *C. megacephala* o risco da transmissão de agentes patogênicos. Na Malásia, onde sua população é muito grande em centros urbanos, a mosca é indicada como principal propagador de ovos de parasitas helmínticos. (Refaat et al. 2005)

*C. megacephala* não é só conhecida como vetor de diversos patógenos, mas também como espécie importante em estudos forenses. A larva desta espécie é usada como evidência entomológica para estimar o intervalo pós-morte do cadáver e como indicadora de envenenamento por organofosforados em corpos em decomposição (Sukontason et al. 2003).

Além disso, esses dípteros são importantes na degradação da matéria orgânica; e na Austrália, *C. megacephala* é um importante polinizador das flores de manga (Refaat et al. 2005).

### **2.3 Sistemas de Defesa**

Muitos microorganismos adotam como estratégia evolutiva utilizar os nutrientes e a proteção de um organismo maior, crescendo no interior do mesmo. Além do fardo de carregar e alimentar o parasita, muitas vezes o microorganismo causa alterações e debilitação em diversas funções vitais do hospedeiro. Dessa forma, é fundamental para a sobrevivência de organismos multicelulares um sistema de defesa contra essas invasões.

Plantas e fungos usam predominantemente barreiras físicas e a produção e secreção de substâncias com ação antimicrobiana. Mas é nos animais que esta função de defesa assume sua maior complexidade, sendo realizada por um conjunto de células circulantes e órgãos especializados que compõe o sistema imune.

As primeiras defesas dos animais também são barreiras físicas e químicas que tentam evitar a invasão dos seus tecidos por outros organismos. Muitas vezes estas barreiras não são eficazes, e se torna necessária a ação de mecanismos internos para impedir que os microorganismos se multipliquem livremente.

Acredita-se que a principal função do sistema imune seja reconhecer a invasão de entidades potencialmente patogênicas e eliminá-las, protegendo assim o organismo de doenças.

O reconhecimento de possíveis ameaças é mediado por receptores de membrana que se ligam a moléculas oriundas do organismo invasor. As moléculas reconhecidas podem ser tanto indicadoras de grupos de patógenos, quanto simplesmente moléculas estranhas ao corpo (não-próprias).

Uma vez identificada a invasão, a resposta de defesa é mobilizada para eliminar o organismo estranho. Dentre os mecanismos utilizados estão a liberação de substâncias tóxicas aos microorganismos, fagocitose dos invasores e até morte de células do próprio organismo hospedeiro que estejam comprometidas com o patógeno. Os mecanismos que envolvem as ações tomadas na resposta imune formam uma complexa rede e variam entre os diversos organismos.

## 2.4 Sistema Imune Inato e Adaptativo

O sistema imune dos mamíferos pode ser dividido em duas componentes: inato e adaptativo. O sistema imune inato é tradicionalmente visto como a primeira resposta a patógenos, ele é pouco específico e de ação rápida; sua principal forma de ação é a resposta inflamatória. Já o sistema imune adaptativo demora mais tempo para ser mobilizado em caso de infecção primária, tem alta especificidade de resposta e é mobilizado mais rapidamente em contatos posteriores com o elemento estranho (memória imunológica).

A distinção entre inato e adaptativo se dá porque todas as moléculas envolvidas na imunidade inata são evolutivamente selecionadas e seus genes não sofrem alteração no tempo de vida do organismo. Já na imunidade adquirida, algumas das principais moléculas são fruto da recombinação somática aleatória de genes, de forma que há produção de grande variabilidade de receptores.

A imunidade adquirida, cujos principais atores são linfócitos T e B e anticorpos, tem sido amplamente estudada. Seus receptores reconhecem tudo aquilo que não é próprio do organismo, e podem, dependendo de diversos estímulos, iniciar ou não uma resposta.

Já a imunidade inata atua como um sensor que identifica o patógeno e contribui para erradicá-lo e ativar a resposta adaptativa (Kaisho & Akira 2006).

## 2.5 Questões Evolutivas

Todos os invertebrados combatem seus invasores utilizando apenas o sistema imune inato. Apenas os vertebrados com mandíbula possuem o sistema imune adaptativo, com receptores gerados por mecanismos de recombinação somática.

O surgimento do sistema imune adaptativo teria ocorrido em algum ancestral cordado agnato, quando um gene da superfamília Ig foi invadido por um elemento transponível com os genes *rag1* e *rag2*, dando início ao mecanismo de recombinação que hoje gera as imunoglobulinas e os receptores associados à imunidade adquirida (Flajnik & Du Pasquier 2004).

A análise de diversos organismos mostra que as moléculas de reconhecimento de patógenos, que variam entre os grupos de animais, são associadas a vias de sinalização conservadas. Por esses achados sugere-se que os mecanismos eficientes de defesa surgiram cedo na evolução dos animais (Flajnik & Du Pasquier 2004).

Os diversos fatores que caracterizam a imunidade adaptativa estão presentes em todos os vertebrados com mandíbula, de forma que, uma vez ocorrida a mutação original que desencadeou o surgimento da imunidade adquirida, as outras mutações se seguiram rapidamente, tirando proveito de vias já estabelecidas pelo sistema inato (Flajnik & Du Pasquier 2004).

O surgimento da imunidade adquirida provavelmente ocorreu no mar, onde vivem os pré-cordados e os cordados agnatos. Dessa forma, é possível que a abundância de vírus no ambiente marinho tenha servido como pressão evolutiva que impulsionou modificações no sistema imune. (Flajnik & Du Pasquier 2004)

Contrário a essa teoria, Rinkevich (1999) sugere que o surgimento do sistema imune adaptativo nos vertebrados tenha inicialmente cumprido a função de aloreatividade, e só posteriormente vindo a atuar na defesa contra patógenos. Essa visão é baseada nas recentes descobertas de diversos casos naturais de aloenxertos, como nos tunicados, ancestrais próximos dos vertebrados, que apresentam rejeição a aloenxertos. Essa abordagem

privilegia as interações celulares, tornando o conhecimento da dinâmica celular um elemento evolutivamente importante para entender os mecanismos de defesa.

## **2.6 O Sistema Imune Inato de Mamíferos**

As respostas imunes inatas entram em ação imediatamente após o início da infecção, pois não dependem de contato prévio com o patógeno. Essas respostas não são específicas para um patógeno, mas sim dependentes da ativação por grupos de proteínas evolutivamente conservadas.

Uma das principais formas da resposta imune inata é a resposta inflamatória. Nela, são liberadas citocinas inflamatórias que atraem diversos leucócitos para o local da inflamação. Além da liberação de citocinas há o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos próximos à infecção e aumento da circulação local, causando um extravasamento do sangue para os tecidos e edema. Os macrófagos e neutrófilos fagocitam o invasor, e as células dendríticas capturam antígenos do invasor para apresentar a linfócitos, ativando a resposta imune adaptativa.

Estudos recentes de imunologia de vertebrados apontam o papel crucial da imunidade inata no direcionamento e na ativação de mecanismos efetores da resposta adaptativa para o tipo específico de antígeno (Rinkevich 1999).

## **2.7 Sistema Imune em Díptera**

Os Dípteros, assim como todos os invertebrados contam apenas com a resposta imune inata para combater infecções; ainda assim, eles o fazem eficientemente. Existem

estudos com diversos animais sobre a resposta imune em Díptera, já seus mecanismos moleculares são compreendidos, principalmente, por estudos com *Drosophila melanogaster*.

O sistema de defesa contra infecções de insetos envolve os seguintes processos: barreiras físicas do tegumento e do trato digestivo; ação coordenada de diversas subpopulações de hemócitos quando essas barreiras são rompidas; e síntese induzida de peptídeos antimicrobianos e proteínas pelo corpo gorduroso (Gillespie et al. 1997).

Assim, podemos dizer que resposta imune em Díptera é composta de três elementos: a resposta humoral, que depende da produção de peptídeos antimicrobianos pelo corpo gorduroso (equivalente ao fígado dos mamíferos); a resposta celular, que envolve a fagocitose feita pelos plasmatócitos; e a melanização, que tem função semelhante a da cicatrização.

Kim & Kim (2005) verificaram em drosófila que o reconhecimento de padrões moleculares associados a microorganismos (MAMPs) por receptores inatos desencadeia essas respostas por meio de cascatas de sinalização, que levam à produção de peptídeos antimicrobianos, citocinas, fatores inflamatórios e à ativação de cascatas fagocíticas e proteolíticas.

Por meio de pesquisas genéticas, foram identificadas ao menos duas vias de sinalização (vias Toll e Imd) com papéis centrais no início da resposta imune inata e também na produção de peptídeos antimicrobianos pela ativação de fatores do tipo NF- $\kappa$ B. Entretanto, ao contrário do que acontece em mamíferos, em insetos os receptores do tipo Toll (TLRs) não interagem diretamente com MAMPs (Kim & Kim 2005).

Em drosófila, as respostas contra fungos e bactérias Gram positivas são dependentes da via de sinalização Toll. Já as respostas contra infecções por bactérias Gram negativas são controladas por outra via de sinalização, a via Imd (Kim & Kim 2005).

Duas famílias de proteínas foram associadas ao reconhecimento de patógenos. As proteínas de reconhecimento de peptídeos glicosilados (PGRP) foram identificadas como as proteínas de reconhecimento de bactérias Gram positivas. No entanto, as proteínas que reconhecem bactérias Gram negativas são as proteínas de ligação Gram negativa (GNBP), que se ligam a compostos da parede celular das bactérias como LPS e  $\beta$ -1,3-glucano (Kim & Kim 2005).

O reconhecimento específico de diversos patógenos pode ser explicado pelo grande número de moléculas de reconhecimento já encontradas.

Flajnik & Du Pasquier (2004) ressaltam que o sistema imune de invertebrados não é simples, e diferentes organismos podem diferir muito nos graus de complexidade de suas respostas imunes. É importante dizer que a ausência de resposta adaptativa não implica em menor eficiência nos sistema de defesa, uma vez que a resposta inata é a mais difundida do reino animal.

### **2.7.1 Melanização**

Quando o inseto sofre uma lesão em que sua cutícula é rompida, ocorre uma rápida ativação da produção de melanina, seguida da agregação de hemócitos. Além de contribuir para a recuperação de ferimentos, a melanização contribui para o encapsulamento de corpos estranhos e gera intermediários tóxicos (como espécies reativas de oxigênio) que ajudam no

combate à infecção. A enzima fenoloxidase atua na produção de melanina a partir de dopamina, e é ativada por uma cascata de serino proteases (Kim & Kim 2005).

### **2.7.2 Peptídeos Antimicrobianos e Resposta Humoral**

Peptídeos antimicrobianos de sete diferentes famílias podem ser induzidos em *Drosófila*. Sua transcrição ocorre no corpo gorduroso horas após o desafio imunológico, e eles são secretados na hemolinfa. Drosomicina, Metchnikowina e Cecropina têm ação antifúngica; Defensina e Metchnikowina atuam contra bactérias Gram positivas e Attacina, Cecropina, Dipterocina e Drosocina contra bactérias Gram negativas. Estes peptídeos são moléculas pequenas e de estrutura variada que atuam em bloco para afetar a integridade das membranas de organismos invasores, impedindo seu crescimento (Meister et al. *apud* Kim & Kim 2005).

### **2.7.3 Resposta Celular**

A hematopoiese em *drosófila* está restrita aos estágios embrionário e larval, ocorrendo em glândulas linfáticas. Esses órgãos desaparecem na histoneogênese que ocorre nas pupas. Os mecanismos moleculares da formação de linhagens de células sanguíneas são conservados entre *drosófila* e mamíferos (Kim & Kim 2005).

Os hemócitos podem ser divididos em cinco grupos, de acordo com estrutura, forma e função. Os pró-hemócitos são os menores hemócitos, tem alta proporção núcleo/citoplasma, são freqüentemente vistos em posições sugestivas de mitose (Silva et al. 2002). É acreditado que os pró-hemócitos dão origem a todos os outros tipos celulares. Os

plasmatócitos são altamente polimórficos e têm tamanho variado. São as células mais frequentes na hemolinfa das larvas e estão envolvidas tanto na atividade fagocitária quanto nos processos de agregação celular. As células granulares são morfológicamente semelhantes aos plasmatócitos e apresentam uma quantidade variável de grânulos basofílicos no citoplasma. Os esferulócitos são semelhantes às células granulares, mas apresentam grandes inclusões esféricas brilhantes quando vistas em microscópio de contraste de fase. E os oenocitóides são células grandes, geralmente esféricas ou ovais com granulações citoplasmáticas finas. Eles são raros na circulação e provavelmente estão envolvidas com a ativação da fenoloxidase. (Silva et al. 2002; Lackie 1988)

Uma das formas da resposta celular é a fagocitose, que é feita principalmente por células granulares e plasmatócitos. As taxas de fagocitose variam entre esses dois tipos celulares, e também dependem de características da parede do organismo invasor. A fagocitose pode ser estimulada pela via da pró-fenoloxidase (PPO) (Gillespie et al. 1997).

A formação de agregados multicelulares de hemócitos (microagregados) atua no aprisionamento de um grande número de microorganismos em uma matriz extracelular. Esses microagregados podem se aderir a tecidos ou a agregados maiores, e eventualmente ser encapsulados. A agregação de hemócitos pode ser induzida por LPS, zimosina, laminarina ou algumas glicoproteínas (Gillespie et al. 1997).

A encapsulação é a deposição de camadas organizadas de células ao redor do corpo estranho. Ela pode ocorrer sobre os microagregados ou quando o invasor é grande demais para ser fagocitado. A encapsulação pode ser ou não acompanhada de deposição de melanina, induzida pela via PPO.

## 2.8 Princípios de Modelagem Matemática

Modelos matemáticos são usados há muito tempo para ajudar a explicar ou fazer previsões sobre sistemas biológicos. Diversas são as áreas em que essa interface trouxe resultados significativos. Exemplos de áreas da biologia em que modelos matemáticos são aplicados com sucesso são: a genética de populações; interações ecológicas entre populações, como competição e predação; cinética de reações bioquímicas; cascatas de sinalizações celulares; epidemiologia; surgimento de padrões evolutivos; osciladores naturais como ritmo circadiano; inferência de filogenias; transmissão de impulsos nervosos; sucessão vegetal; interações entre hospedeiros e parasitas; evolução de quasi-espécies; crescimento de tumores; evolução de cooperação; estrutura tridimensional de proteínas e configuração de sítios de ligação molecular; e imunologia. (Murray 1993 e Nowak 2006)

A modelagem de sistemas biológicos exige um bom grau de interdisciplinariedade, geralmente dependendo da boa interação entre matemáticos e biólogos para ser produtiva. Nesse processo existem alguns pontos críticos que surgem das diferenças de visão desses profissionais.

Muitas vezes modelos matemáticos podem usar matemática sofisticada, mas ao mesmo tempo ser inúteis do ponto de vista biológico. Isso geralmente ocorre quando há pouca interação entre a experimentação e a modelagem. No outro extremo tem os modelos que são biologicamente realistas, mas excessivamente complexos para se tirar conclusões. Estes normalmente surgem da tentativa de incluir todas as interações biológicas conhecidas no modelo, ao invés de tentar selecionar os fatores preponderantes para o fenômeno (Yates, et al. 2001).

O grau de detalhamento do modelo é um ponto crítico, já que, em muitos casos existe um excesso de informação experimental. Assim sendo, a visão do biólogo experimental é importante na escolha de quais parâmetros devem ser considerados no modelo, para que ele capte os processos fundamentais para o surgimento do fenômeno que está sendo descrito, sem agregar complexidade desnecessária (Yates, et al. 2001).

Murray (1993) em seu livro *Mathematical Biology* destaca que do ponto de vista matemático, a arte da modelagem depende de: (i) boa compreensão do problema biológico; (ii) uma representação matemática realista dos fenômenos biológicos importantes ao problema; (iii) encontrar soluções úteis, de preferência quantitativas; e principalmente (iv) interpretação biológica dos resultados matemáticos em termos de *insights* e previsões.

Ao revisar modelos matemáticos para diversas áreas da biologia, Murray (1993) comenta do processo e objetivos da modelagem. Ele destaca que o objetivo da modelagem é responder a questões biológicas pertinentes, e que até mesmo modelos simples devem trazer questionamentos importantes relativos ao processo que tentam explicar, e freqüentemente o fazem. Mas a maioria dos modelos passa por várias versões até que fenômenos qualitativos possam ser explicados ou previstos com algum grau de confiança.

Como os sistemas biológicos ocorrem em ambientes com muitas perturbações, modelos matemáticos realísticos devem ser pouco sensíveis a variações nos parâmetros ou condições iniciais. Para tanto, a robustez é um critério importante para comparar modelos que foram criados levando unicamente em consideração as motivações (Yates et al. 2001).

Entre as principais ferramentas da modelagem estão as equações diferenciais. Quando se trata de populações grandes, homogêneas, e com longas escalas de tempo elas apresentam bons resultados. Entretanto, muitos processos biológicos, especialmente do sistema imune são probabilísticos ou tem elementos estocásticos. Em processos que

envolvem pequenas quantidades de moléculas, como certas reações intracelulares, efeitos aleatórios são muito importantes (Yates et al. 2001).

## 2.9 Modelagem Matemática em Imunologia

Em 1760 Bernoulli propôs um modelo de equações diferenciais ordinárias não lineares para a epidemia de varíola e os efeitos da vacinação. Esta provavelmente foi a primeira vez em que modelos matemáticos foram usados para questões práticas relativas a imunologia. Posteriormente, vários modelos semelhantes foram usados para estimar os níveis de vacinação necessários para controlar epidemias (Murray 1993).

Apesar da grande quantidade de informações sobre o sistema imune descobertas nos últimos anos, nossa compreensão das propriedades deste sistema como um todo são limitadas. *Feedback, delays*, interações não lineares e a complexidade da rede de interações possíveis entre diversas moléculas e células são fatores típicos do sistema imune que podem exibir comportamentos contra intuitivos. É nesses pontos que o uso de modelos matemáticos pode trazer ganhos significativos à nossa compreensão (Yates et al. 2001).

Grandes quantidades de dados e ferramentas elaboradas de bioinformática para armazenar informação são insuficientes para a compreensão das complexidades do sistema imune. Dessa forma a modelagem matemática torna-se uma ferramenta essencial para complementar técnicas experimentais e de bioinformática. Juntas, essas técnicas possibilitam novas perspectivas sobre o comportamento do sistema imune e permitem a criação de novas hipóteses e sugestão de novos experimentos. A modelagem, quando bem feita, pode até criar um “laboratório virtual” para complementar experimentos *in vivo* e *in vitro* (Yates et al. 2001).

Existem diversos exemplos de modelos matemáticos para fenômenos imunológicos. Um dos primeiros é o modelo criado por Bell (Bell *apud* Perelson 1997) para descrever a seleção clonal de linfócitos B. Neste modelo é considerada a dinâmica de antígenos se ligando aos receptores de células B e diversos estágios de diferenciação dos linfócitos. O modelo assume que linfócitos virgens, em presença de concentração suficiente de antígenos, se transformam em células proliferativas. Estas células, sob estímulo continuado, continuam a se dividir e produzir anticorpos que atuam na eliminação do antígeno. Quando a concentração de antígeno é reduzida, assume-se que as células param de proliferar e se diferenciam em células de memória e células de plasma. As células de plasma produzem grandes quantidades de anticorpos e são incapazes de diferenciação; já as células de memória podem ser estimuladas por antígeno a virar células proliferativas. Além disso, é considerada a dinâmica dos antígenos e da ligação destes aos anticorpos, de forma que o modelo é composto de seis equações diferenciais ordinárias ou algébricas. Bell (Bell *apud* Perelson 1997) resolveu numericamente estas equações e encontrou uma dinâmica razoavelmente próxima a do sistema imune. Posteriormente as equações foram resolvidas por aproximações analíticas.

Um outro exemplo de modelo da atividade do sistema imune apresentado por Kepler e Chan (2007) se refere à dinâmica espaço-temporal do processo inflamatório. Neste trabalho são modeladas a locomoção dos leucócitos, levando em consideração sinais quimiotáticos; a difusão das citocinas; a dinâmica intracelular de macrófagos, que recebem estímulos externos e liberam citocinas; e a relação entre TNF e sua versão solúvel sTNF. Os autores mostram, por meio de simulações, a troca programada de produto de secreção pelos macrófagos, de TNF para sTNF, responde pelo controle e término da resposta inflamatória.

Alem desses, diversos outros aspectos do sistema imune foram alvos de investigações matemáticas, como previsões do tamanho dos epítomos, distinção do próprio e não próprio em comparação com o tamanho do repertório do sistema imune (George 2002), proposição de uma rede de interações entre idiotipos de anticorpos (Perelson 1997) e competição entre diferentes linhagens de linfócitos e as quasispécies do vírus da AIDS (Nowak 1996).

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Obtenção da colônia de *Chrysomya megacephala***

A colônia foi formada a partir de *C. megacephala* capturadas no Campus Centro da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o auxílio de uma armadilha entomológica orientada pelo vento (WOT).

#### **3.2 Manutenção da Colônia *Chrysomya megacephala***

Os insetos adultos foram mantidos em gaiolas de madeira com tela de dimensões aproximadas 40x25x25cm, em uma sala com fotoperíodo e temperatura ambiente natural. No inverno, a sala era aquecida com uma estufa de forma que a temperatura não baixasse dos 10° C, uma vez que o tempo de desenvolvimento das moscas é fortemente afetado pela temperatura. Os animais recebiam semanalmente água e uma mistura de açúcar refinado e leite-em-pó.

Para induzir ovipostura, a colônia recebia uma dieta adicional de carne bovina moída, sendo que o ambiente era iluminado indiretamente para favorecer a ovipostura. Os ovos, uma vez postos, eram separados da colônia e colocados para se desenvolver em um recipiente plástico contendo carne bovina moída, onde eclodiam, dando lugar às larvas que se alimentavam da carne. Entre 5 e 7 dias após a ovipostura, as larvas de terceiro estágio (L3) atingiam o momento de dispersão; elas então deixavam o pote de cultivo e caíam em uma bandeja contendo vermiculita colocada sob o recipiente de cultivo. Na vermiculita, as larvas buscavam se enterrar para, então, empupar.

Após 24 ou 72 horas todas as pupas formadas eram separadas manualmente da vermiculita e colocadas em uma gaiola vazia para formar uma nova colônia. As gerações eram mantidas separadas.

### 3.3 Preparo das Larvas para Inoculação

Para os procedimentos experimentais as larvas do estágio L3 em dispersão eram coletadas manualmente. Em seguida passavam por um procedimento de anti-sepsia composto de lavagem em água corrente por um minuto, seguido de um minuto de imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 2%, e mais um minuto sob a água corrente. Em seguida, as larvas eram colocadas em placas de Petry sobre o gelo por 15-20 minutos para imobilização, aguardando o inóculo.

### 3.4 Preparo do Inóculo

Foram utilizados para inóculo três microorganismos diferentes: *Micrococcus luteus*, bactéria Gram positiva; *Escherichia coli* bactéria Gram negativa; e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Todos os microorganismos foram obtidos no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As bactérias foram mantidas em meio sólido agar tripticaseína de soja (TSA) para conservação. Para a inoculação, as bactérias eram cultivadas por 24 horas em meio caldo de infuso cérebro\_coração (BHI).

A levedura usada no experimento de inoculação foi *Saccharomyces cerevisiae*, que foi mantida em meio sólido agar Sabourad (específico para o crescimento de fungos). O

inóculo de levedura foi preparado em caldo Sabourad, de forma semelhante ao inóculo bacteriano.

Esses microorganismos foram escolhidos pela pronta obtenção e pelo fato de não serem patogênicas para o inseto estudado.

### **3.5 Inoculação das Larvas**

Foram inoculadas ao todo 244 larvas conforme o procedimento utilizado por (Okada & Natori, 1985). Após 15 minutos sobre o gelo, as larvas imobilizadas eram mergulhadas em etanol 70% e posteriormente levadas à lupa para a inoculação de um volume de aproximadamente 20 µl do cultivo de microorganismo. A inoculação era realizada em um dos três últimos segmentos abdominais, com uma seringa descartável com agulha 30G<sup>1</sup>.

As larvas inoculadas permaneciam em repouso por duas horas em ambiente úmido sob iluminação constante para inibir a empupação.

### **3.6 Coleta da Hemolinfa**

Aproximadamente 15 minutos antes da coleta da hemolinfa as larvas eram colocadas em placas de Petri sobre o gelo, para imobilização. As larvas imobilizadas eram mergulhadas em etanol 70% gelado para nova anti-sepsia e secas em papel toalha. As larvas eram então decapitadas, e 5µl de sua hemolinfa era coletada com o auxílio de uma micropipeta.

A hemolinfa coletada era diluída 5X em uma solução de anti-coagulante de inseto composta de NaOH, 0,392g; NaCl, 0,853g; EDTA, 0,632g; ácido cítrico, 1,206g e água para completar 100ml de solução (Chalk & Suliaman 1998).

### **3.7 Quantificação de Hemócitos**

Imediatamente após a coleta, a hemolinfa diluída em solução de anti-coagulante era colocada em câmara de Neubauer para contagem. A quantificação de hemócitos livres e microagregados por volume de hemolinfa coletada foi realizada sob microscópio óptico em aumento de 100X.

Os microagregados foram divididos em dois grupos de tamanhos diferentes; foram considerados microagregados grandes aquele em que, ao microscópio, apresentava mais de dez células aparentes, e microagregados pequenos aqueles que apresentavam entre 3 e 9 células visíveis. Células isoladas ou agregadas em duplas eram consideradas hemócitos livres.

### **3.8 Análise dos Dados**

As análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando o programa BioStat 2007<sup>1</sup>. As diferenças entre tratamentos foram consideradas significativas quando apresentaram probabilidade do erro do tipo I,  $\alpha$ , inferior 0,05.

---

<sup>1</sup> AnalystSoft, BioStat - statistical analysis program. Versão 2007. Ver <http://www.analystsoft.com>.

### **3.9 Simulações**

Os gráficos e as simulações do modelo da dinâmica de hemócitos foram feitos no programa MATLAB 5.3.

#### 4 Resultados

A contagem de hemócitos foi realizada em 244 larvas divididas nos quatro tratamentos: inoculadas com bactérias Gram-positivas (*Micrococcus luteus*), inoculadas com bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*), inoculadas com leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e controle (larvas não inoculadas). Em cada larva foram quantificados os hemócitos livres e os microagregados.

A análise da variância (ANOVA) aplicada às contagens de hemócitos indicou diferença significativa entre as médias dos tratamentos, com um p-valor menor do que 0,0001. O teste de comparações múltiplas entre os tratamentos, com correção para o número de tratamentos (Teste Bonferroni para diferença entre as médias) indicou diferenças significativas entre o controle e as larvas inoculadas com *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto o mesmo teste não apontou diferença significativa entre os tratamentos de larvas inoculadas.

As médias e desvios padrão das contagens de hemócitos livres para cada tratamento estão apresentadas na Tabela I. Observa-se que as contagens de hemócitos para os diferentes inóculos diferem, porém devido à grande variabilidade dos dados os testes estatísticos não detectaram essa diferença.

Tabela I. Média e desvio padrão de hemócitos/ $\mu$ l de hemolinfa de *Chrysomya megacephala* após inoculação com diferentes microorganismos.

Hemócitos	Controle*	Gram +	Gram -	Levedura
Média	1517,563	2570,909	2426,442	3555,388
Desvio Padrão	1111,613	1586,056	1915,852	2971,65

\* - controle: hemócitos de insetos não inoculados; Gram +: hemócitos de insetos inoculados com *Micrococcus luteus*; Gram - : hemócitos de insetos inoculados com *Escherichia coli*; e levedura: hemócitos de insetos inoculados com *Saccharomyces cerevisiae*.

Na quantificação de microagregados encontramos uma relação semelhante à dos hemócitos livres. Na análise estatística dos dados foram empregados os mesmos testes usados para hemócitos livres. A análise da variância indicou diferença entre os tratamentos com  $p < 0,0001$ . As comparações múltiplas com correção Bonferroni indicaram um aumento significativo no número médio de microagregados nas larvas inoculadas em relação ao controle. Mas, assim como para hemócitos livres, os testes não apontam distinções entre as contagens médias para larvas inoculadas com os diferentes microorganismos.

A Tabela II apresenta as médias e os desvios padrão das quantificações de microagregados para os diferentes tratamentos.

Tabela II. Média e desvio padrão de microagregados/ $\mu$ l de hemolinfa de *Chrysomya megacephala* após inoculação com diferentes microorganismos.

Microagregados	Controle*	Gram +	Gram -	Levedura
Média	206,4873	556,1364	513,4615	554,9569
Desvio Padrão	214,1514	428,9567	378,4874	450,7969

\* - controle: hemócitos de insetos não inoculados; Gram +: hemócitos de insetos inoculados com *Micrococcus luteus*; Gram - : hemócitos de insetos inoculados com *Escherichia coli*; e levedura: hemócitos de insetos inoculados com *Saccharomyces cerevisiae*.

Uma vez observado tanto o número de hemócitos quanto o número de microagregados aumenta após a inoculação de microorganismos, cabe perguntar o que acontece com a relação entre essas grandezas. Para isso, foi analisada a razão hemócitos livres / microagregados, cujos valores médios estão apresentados na Figura 1.

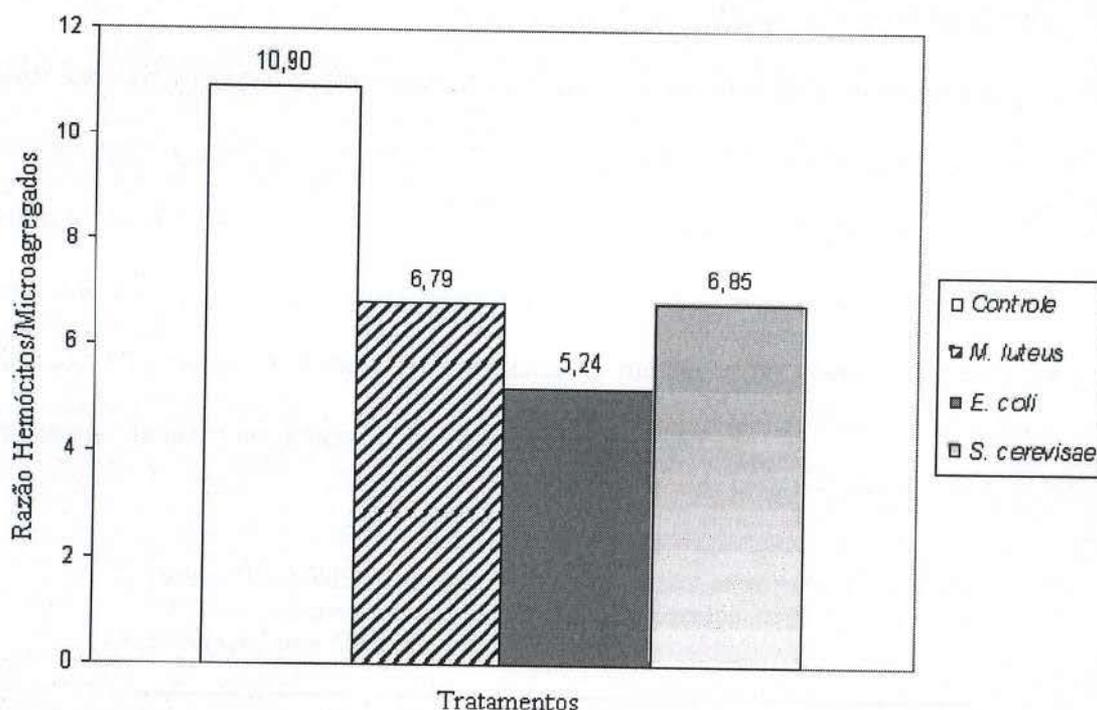


Figura 1. Valores médios para a razão entre hemócitos e microagregados em *Chrysomya megacephala* após inoculação com diferentes microorganismos.

Para analisar estatisticamente essas grandezas foi necessário fazer uma transformação logarítmica nos dados para obter normalidade. A ANOVA indicou diferença entre os tratamentos com probabilidade de erro de 0,0005. Já os testes de comparações múltiplas apontaram redução significativa da proporção hemócitos / microagregados nos insetos inoculados em relação aos controles. Além disso, esses testes indicaram que esta razão difere entre os insetos inoculados com *Escherichia coli* e com *Saccharomyces cerevisiae*. Nas outras duas comparações os testes não demonstram diferenças significativas, porém vale ressaltar que o p-valor da comparação entre os tratamentos com *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus* é 0,057.

Nos dados analisados acima os microagregados foram avaliados igualmente, sem levar em consideração o seu tamanho, todos os agregados celulares com três ou mais células foram contabilizados como microagregados. Entretanto, eles possuem uma ampla variação de tamanho. Para se avaliar essa variação, em 139 das larvas analisadas foi feita uma diferenciação entre microagregados pequenos, com até 10 células, e grandes, com mais de 10 células. A Tabela III apresenta as médias e os desvios padrão para cada tratamento da razão entre hemócitos grandes e pequenos.

Tabela III. Média e desvio padrão da razão entre microagregados grandes e pequenos/ $\mu$ l de hemolinfa de *Chrysomya megacephala* após inoculação com diferentes microorganismos.

	Controle*	Gram +	Gram -	Levedura
Média	0,11986	0,063235	0,119516	0,084414
Desvio Padrão	0,336053	0,088193	0,122834	0,124123

\* - controle: hemócitos de insetos não inoculados; Gram +: hemócitos de insetos inoculados com *Micrococcus luteus*; Gram - : hemócitos de insetos inoculados com *Escherichia coli*; e levedura: hemócitos de insetos inoculados com *Saccharomyces cerevisiae*.

Os testes estatísticos não apontaram diferenças significativas entre os tratamentos quanto à relação entre o tamanho dos agregados. Também não foi encontrada correlação entre a razão microagregados grandes / microagregados pequenos e o número total de microagregados de cada larva. Com base nesses resultados, poderia-se dizer que o tamanho dos microagregados não é afetado pela infecção, ou então que os dados coletados nesse trabalho não permitem conclusões acerca da dinâmica do tamanho desses agregados.

## 5 Modelagem

### 5.1 Introdução às Equações Diferenciais

Uma equação diferencial é uma expressão matemática que descreve relações entre taxas de variação, ou seja, derivadas. Essas relações podem surgir de forma natural a partir de problemas reais, como por exemplo: “a velocidade do carro é 80km/h”. Equivalentemente, podemos dizer que a taxa de variação (derivada) da posição do carro é 80km/h.

$$\frac{dx}{dt} = \dot{x} = 80 \quad (1)$$

Nessa expressão  $x$  representa a posição do veículo e  $\dot{x}$  representa a derivada de  $x$  em relação ao tempo.

Freqüentemente, quando temos uma equação diferencial, queremos obter informações mais diretas sobre a variável dependente da equação, no caso, a posição do carro ( $x$ ) em função do tempo. Para isso, precisamos encontrar uma expressão para  $x$  que satisfaça a equação (uma solução).

Um exemplo de solução para a equação (1) é  $x = 80t$ . Essa expressão nos dá a posição do carro em função do tempo. No instante  $t=1$  o carro está na posição 80 e no instante  $t=10$  o carro está na posição 800. Mas essa não é a única solução para este problema, pois se no tempo  $t=0$  o carro estiver na posição 1, então no tempo  $t=1$  ele estará na posição 81. Portanto, a expressão  $x = 1 + 80t$  também é solução desta equação.

De fato toda expressão do tipo

$$x = C + 80t, \quad (2)$$

em que  $C$  é uma constante qualquer, é solução para a equação (1). A expressão (2) é dita solução geral da equação, ela não descreve apenas uma trajetória, mas infinitas – uma para cada valor de  $C$ . A figura 2 mostra diferentes soluções para (1).

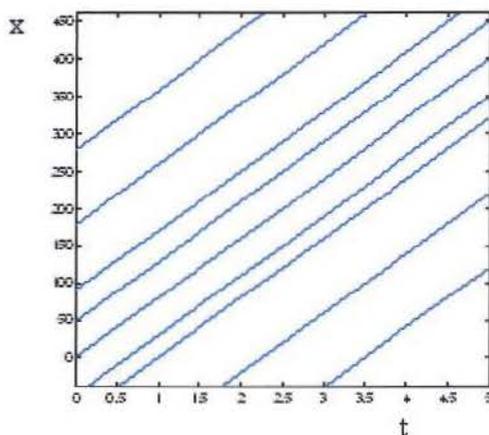


Figura 2: Nove diferentes soluções para a equação diferencial  $\dot{x} = 80$ .

Por outro lado, se sabemos que a posição inicial do carro é 10, então é possível prever com exatidão onde ele estará no instante  $t=1$ , pois nesse caso ele obedece à equação  $x = 10 + 80t$ . Essa expressão recebe o nome de solução particular, e descreve apenas uma trajetória no tempo. Ela é definida pela equação diferencial e uma condição inicial.

Note que a variável  $t$  (tempo) não aparece explicitamente na equação diferencial 1, mas aparece na solução. Equações diferenciais em que a variável independente (o tempo) não aparece explicitamente são chamadas de equações diferenciais autônomas.

Um outro exemplo de equação diferencial autônoma é

$$\dot{x} = ax, \quad (3)$$

em que  $a$  é uma constante qualquer. Esta é a equação do crescimento exponencial, ela diz que a variação de  $x$  é proporcional a  $ax$ , ou seja, quanto maior for  $x$  mais rápido ele aumenta. A solução geral desta equação é dada por

$$x = Ce^{at}, \quad (4)$$

em que a constante  $C$  é a condição inicial, já que quando  $t=0$  temos que  $x=C$ . A figura 3 apresenta o gráfico de algumas soluções particulares para essa equação.

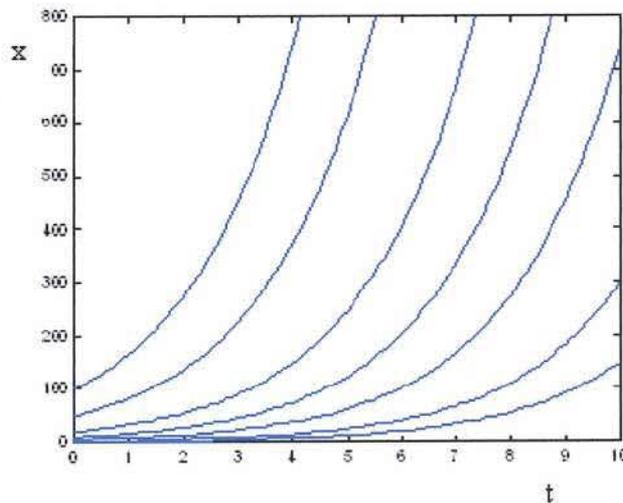


Figura 3: Gráfico de diversas soluções de (3). Parâmetro  $a=0,5$  e condição inicial  $C=1, 2, 5, 10, 20, 50$  e  $100$ .

Quando diferentes variáveis têm interferência mútua em suas taxas de variação temos um sistema de equações diferenciais. Um exemplo é o sistema

$$\begin{cases} \dot{x} = ax - bxy \\ \dot{y} = cxy - dy \end{cases} \quad (5)$$

que descreve as interações entre as variáveis  $x$  e  $y$ .

Este sistema é conhecido como modelo Lotka-Volterra para interações entre presas  $x$  e predadores  $y$ , e pode apresentar uma variedade de comportamentos, dependendo dos valores dos parâmetros  $a, b, c, d$  (Britton 2005). A figura 4 apresenta um dos possíveis comportamentos do sistema.

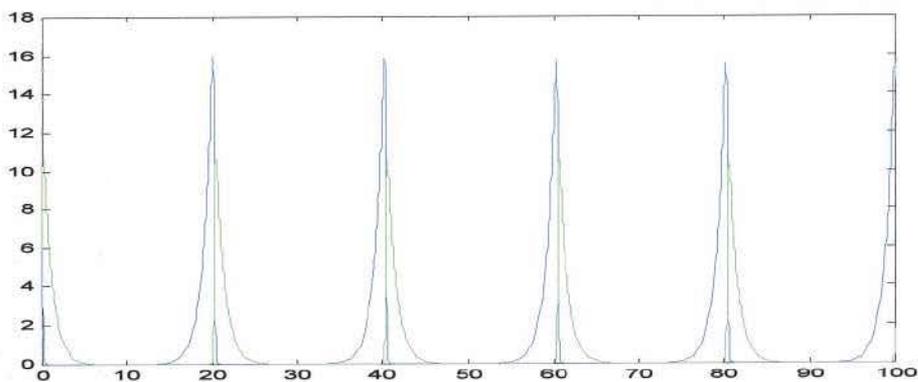


Figura 4: Gráfico de simulação do sistema Lotka-Volterra (5). Linha verde corresponde a  $x$  e linha azul corresponde a  $y$ . Parâmetros do sistema:  $a=1$ ;  $b=1.5$ ;  $c=1$ ;  $d=1$ . Condições iniciais:  $x = 10$ ,  $y = 6$ .

Sistemas de equações diferenciais em que as variáveis dependentes não são multiplicadas por elas mesmas são chamados de sistemas lineares. As equações do

modelo Lotka-Volterra (5) são um exemplo de sistema não linear de equações diferenciais.

Os comportamentos exibidos pelas equações resolvidas neste capítulo são bastante gerais. Por exemplo, quando aparece, em uma equação diferencial, um termo constante, ele geralmente se refere a um processo linear (ver equação (1)). Da mesma forma, termos do tipo  $ax$  são referentes a processos com dinâmica exponencial (ver equação (2)). Termos do tipo  $axy$ , como os que aparecem no sistema (5), representam processos que são proporcionais às quantidades de  $x$  e de  $y$ .

Cabe observar que nem todas as equações diferenciais podem ser resolvidas analiticamente, e nem sempre é possível encontrar uma expressão geral da solução nos formatos de (2) e (4). Em muitos casos é necessário recorrer a métodos numéricos de simulação para conhecer a dinâmica descrita por certas equações diferenciais.

## **5.2 Um Modelo para a Dinâmica de Hemócitos em Resposta a Infecções**

Considerando as interações celulares que ocorrem entre hemócitos e microorganismos durante uma infecção em Díptera, foi elaborado um modelo matemático que descreve a reação imune do inseto. Como o foco deste trabalho é a dinâmica de agregação celular, considera-se apenas a ação dos microagregados no combate à infecção.

O modelo matemático consiste em um sistema não linear de equações diferenciais ordinárias, a exemplo de diversos modelos consagrados de fenômenos biológicos. Eles são adequados para descrever interações entre entidades diferentes. Um exemplo é o modelo Lotka-Volterra, criado em 1926, que descreve as interações entre uma população de predadores e uma população de presas, e é um dos mais conhecidos modelos de ecologia de

populações, apresentando comportamentos oscilatórios (Murray 1993). Modelos que utilizam sistemas não lineares de equações diferenciais também estão presentes em epidemiologia, representando interações entre grupos de pessoas com diferentes suscetibilidades à doença, como os modelos SI, SIR e SIRI *epidemics* (Britton 2005). Nowak (2006) utiliza o mesmo tipo de equações para modelar as interações entre vírus e hospedeiro em uma infecção por HIV.

Os seguintes pressupostos serviram de base para a construção do modelo para a dinâmica de hemócitos. A população de hemócitos foi dividida em três sub-populações: os hemócitos periféricos (X), os hemócitos circulantes (Y), e os hemócitos em microagregados (Z). Os hemócitos periféricos (X) são todos aqueles que estão nos tecidos do inseto ou aderidos à parede da hemocele; neste modelo estas células não participam diretamente da resposta imune. Os hemócitos periféricos podem ser mobilizados para a hemolinfa, transformando-se em hemócitos circulantes. Os hemócitos circulantes (Y) são aqueles que estão na hemolinfa, isolados de outras células; assumimos que eles também não têm ação direta sobre o agente infeccioso. Estas células, quando estimuladas podem sofrer agregação. São os hemócitos em microagregados (Z) os efetores da resposta imune. Os microagregados possuem um número variado de hemócitos, e matam microorganismos aprisionando-os em uma matriz extracelular. Por simplicidade, o modelo considera apenas as trocas de classes descritas nesse parágrafo - de hemócito periférico (X) para circulante (Y); e de hemócito circulante (Z) para hemócito em microagregado (Z). Neste modelo, não é feita distinção entre os tipos de hemócitos (pró-hemócitos, plasmatócitos, células granulares, oleócitos e esferulócitos).

Como o objetivo é descrever a interação dos hemócitos com o microorganismo invasor durante uma infecção, as variáveis do modelo são as três sub-populações de hemócitos apresentadas acima (X, Y e Z) e a população do microorganismo (A). A cada uma das variáveis corresponde uma equação diferencial representando a variação da população no tempo.

$$\begin{cases} \dot{X} = a - bAX - d_1X \\ \dot{Y} = pa + bAX - gAY - d_1Y \\ \dot{Z} = gAY - d_2Z \\ \dot{A} = lA - cAZ \end{cases} \quad (6)$$

Cada termo desse sistema representa um fenômeno que supomos acontecer na resposta imune celular de insetos. A seguir será apresentada uma interpretação dessas equações.

Assume-se que as células periféricas (X) são produzidas em uma taxa constante  $a$ , a partir de uma linhagem produtora de células semelhantes a células tronco; e tem sua taxa de mortalidade  $d_1$ . As células da sub-população X podem deixar os tecidos e migrar para a hemolinfa na presença de citocinas induzidas pela infecção, essa mobilização é proporcional ao tamanho da população X e à quantidade de microorganismo A. O parâmetro  $b$  corresponde à eficiência desse processo.

Quanto aos hemócitos circulantes (Y), considera-se que eles são produzidos da mesma forma que X, porém em uma proporção ( $p$ ) menor, e a sua taxa de mortalidade

( $d_1$ ) é igual à dos hemócitos da periferia. A população Y pode aumentar sempre que algum hemócito deixa a periferia em função de uma infecção, por isso aparece o termo  $+bAX$  na equação de  $\dot{Y}$ . Em contrapartida, a presença de microorganismos (A) pode induzir a agregação celular, esse processo é proporcional às populações de Y e de A, e tem eficiência  $g$ . Sempre que uma célula da hemolinfa se integra a um microagregado considera-se que ela deixa a população Y e passa a participar de Z.

Em relação às células em microagregados (Z), assume-se que elas sejam formadas sempre de hemócitos circulantes (Y), e apenas em resposta a um agente infeccioso (A), com eficiência  $g$ . Os microagregados também têm sua taxa natural de retirada  $d_2$ . Permite-se que ela seja diferente da taxa de mortalidade dos outros hemócitos, por acreditar que os agregados permaneçam mais tempo na hemolinfa.

Os microorganismos se reproduzem de forma diferente dos hemócitos, apresentando crescimento exponencial, uma vez que eles não são gerados por células tronco, pois todas as células mantêm capacidade de se reproduzir. Portanto o parâmetro  $l$  que aparece na equação de  $\dot{A}$  representa o parâmetro de crescimento malthusiano, ou seja, a diferença entre os parâmetros exponenciais de crescimento e mortalidade. Da interação com o sistema imune do inseto surge o termo  $-cAZ$ , que é interpretado como a ação dos microagregados na redução da população do microorganismo.

A figura 5 esquematiza as relações entre as populações descritas pelas equações do modelo.

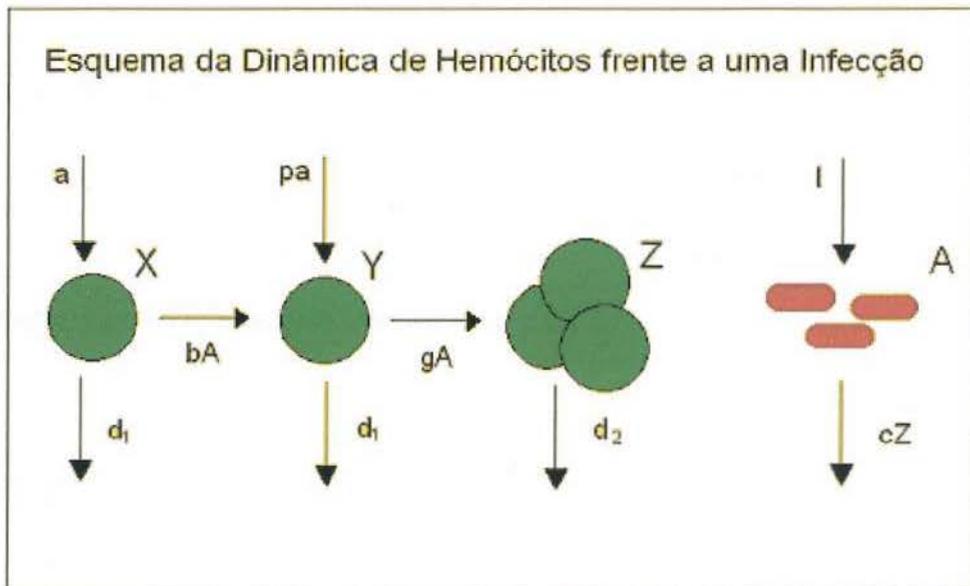


Figura 5: Representação esquemática das interações descritas no modelo da dinâmica de hemócitos. A representa a população de microorganismo, Z a de hemócitos em microagregados, Y a população de hemócitos circulantes e X a população de hemócitos periféricos.  $a$ ,  $p$ ,  $b$ ,  $g$ ,  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $l$  e  $c$  são os parâmetros do modelo.

Cabe destacar que o modelo apresentado nessa sessão tem diversas simplificações. Ele foi criado com o objetivo de descrever apenas um aspecto da resposta celular dos insetos, a agregação. Por essa razão, apenas os microagregados têm ação na redução da população microbiana. Além disso, o modelo não considera a possibilidade de retorno dos hemócitos à população periférica. Esse fator pode ser importante no retorno das populações à condições de equilíbrio após o combate à infecção, entretanto, como nosso interesse nesse trabalho se restringe ao desfecho da infecção e o tipo de resposta dada pela larva, não nos preocupamos com o que ocorre na seqüência. Além disso, como os experimentos com as larvas ocorrem tradicionalmente no estágio L3, o tempo remanescente antes da empupação é pequeno.

### 5.3 Alguns Resultados

Nessa seção serão apresentados alguns resultados derivados do modelo da dinâmica de hemócitos. Esses resultados têm significado biológico claro, e, portanto, têm um importante papel na avaliação da adequação do modelo.

#### 5.3.1 Pontos Singulares

Em equações diferenciais pontos singulares ou pontos estacionários são condições em que não ocorrem modificações no sistema. Se as condições iniciais do sistema são um ponto singular, então ele permanecerá indefinidamente constante. Portanto, essas condições equivalem às soluções constantes do sistema.

Na prática, para encontrar um ponto singular basta encontrar um ponto em que todas as derivadas do sistema são nulas, pois nesse ponto todas as taxas de variação são zero. Dessa forma, no modelo da dinâmica de hemócitos deste trabalho, encontrar os pontos singulares corresponde a resolver o seguinte sistema:

$$\begin{cases} 0 = a - bAX - d_1X \\ 0 = pa + bAX - gAY - d_1Y \\ 0 = gAY - d_2Z \\ 0 = lA - cAZ \end{cases} \quad (7)$$

Este sistema algébrico é de simples resolução por substituição de variáveis. Olhando para a última equação percebe-se que  $A(l - cZ) = 0$ , portanto temos que  $A = 0$ , ou  $Z = \frac{l}{c}$ .

Explorando o primeiro caso, percebe-se que  $E_0 = (X_0, Y_0, Z_0, A_0)$  é um ponto de equilíbrio, em que

$$\begin{aligned} X_0 &= \frac{a}{d_1} & Z_0 &= 0 \\ Y_0 &= \frac{pa}{d_1} & A_0 &= 0 \end{aligned} \quad (8)$$

Este ponto singular tem um significado biológico importante, ele corresponde ao equilíbrio do sistema imune do inseto na ausência de infecção. As populações de hemócitos periféricos e hemócitos circulantes encontram-se em seus pontos de equilíbrio naturais, correspondentes à razão entre taxas de natalidade e mortalidade, e não há presença de microorganismos nem de microagregados.

A ausência de microagregados no equilíbrio natural do sistema, embora contradiga dados experimentais, é resultado esperado deste modelo, pois assumimos que os agregados celulares só se formam em resposta a microorganismos.

O ponto singular  $E_0$  é um ponto de equilíbrio estável. Isto significa que, além de todo ponto que iniciar em  $E_0$  permanecer em  $E_0$  indefinidamente, se o sistema tiver uma condição inicial suficientemente próxima de  $E_0$  com o tempo o sistema tenderá a  $E_0$ . Equivalentemente podemos dizer que se o sistema que estiver em  $E_0$  sofrer uma pequena perturbação, com o tempo ele retornará a  $E_0$ . A região próxima ao ponto singular, onde esse fenômeno ocorre é denominada bacia de atração.

O fato de  $E_0$  ser um equilíbrio estável tem interessantes interpretações biológicas. Por exemplo, se o inseto sofrer uma lesão em que perca hemolinfa (e junto alguns

hemócitos) com o tempo as populações de hemócitos retornarão às condições de equilíbrio; este evento corresponde a uma perturbação em que  $Y$  é diminuído, mas com o tempo retorna a seu valor original. Outro exemplo interessante é o que ocorre nas infecções que são controladas pelo sistema imune em que uma pequena população inicial de microorganismos causa uma alteração nas variáveis do sistema. Após algum tempo, quando a infecção é controlada, as populações de microagregados e microorganismos retornam ao zero e o sistema volta ao equilíbrio  $E_0$ .

Ainda resta explorar o segundo caso em que  $z = \frac{1}{c}$ . Trabalhando com o sistema resultante de substituir esta expressão na terceira equação de (7) obtém-se uma equação de segundo grau para  $A$ . A solução desta equação para  $A$  é

$$A = \frac{-\left(d_1 p a - \frac{b d_1 d_2 l}{c g} - \frac{d_1 d_2 l}{c}\right) \pm \sqrt{\left(d_1 p a - \frac{b d_1 d_2 l}{c g} - \frac{d_1 d_2 l}{c}\right)^2 + 4 \frac{d_1^2 d_2 l}{g c} \left(b p a + b a - \frac{b d_2 l}{c}\right)}{2 \left(b p a + b a - \frac{b d_2 l}{c}\right)} \quad (9)$$

de forma que temos dois diferentes resultados para  $A$ . Substituindo estes valores de  $A$  em

$$\begin{aligned} X &= \frac{a}{(d_1 + bA)} \\ Y &= \frac{d_2 l}{g c A} \\ Z &= \frac{l}{c} \end{aligned} \quad (10)$$

obtemos os outros dois pontos singulares  $E_1$  e  $E_2$ .

### 5.3.2 Populações não Negativas

Como em situações biológicas é impossível encontrar populações com um número negativo de integrantes, é interessante verificar se o sistema admite essas populações. Para averiguar esse caso, impõe-se a condição técnica de que  $d_1=d_2$  para simplificar os cálculos, e assume-se que as populações iniciais (  $X(t=0)$ ,  $Y(t=0)$ ,  $Z(t=0)$ ,  $A(t=0)$  ) são todas não negativas.

Olhando para a equação das variações de  $X$ ,

$$\dot{X} = a - bAX - dX = a - (d + bA)X,$$

percebemos que quando  $X(t)=0$  a derivada  $\dot{X} = a > 0$ . Isso significa que em qualquer momento que a população de  $X$  atinja o zero ela terá derivada positiva, e portanto aumentará. Dessa forma  $X$  sempre será maior ou igual a zero, pois como a dinâmica é contínua, é impossível que  $X$  fique negativo sem passar pelo ponto  $X=0$ .<sup>2</sup>

Olhando para a última equação

$$\dot{A} = lA - cAZ = A(l - cZ)$$

percebemos que quando  $A=0$  a derivada de  $A$  se anula. Dessa forma, uma vez que a população de  $A$  atinja o zero ela será extinta, mas nunca assumirá valores negativos.

---

<sup>2</sup> Essa análise é válida pelo fato de as equações das derivadas das populações dependerem do tempo. Isso significa que em qualquer momento em que  $X=0$  sua derivada é  $a$ . O mesmo fato é utilizado para as  $Y$ ,  $Z$ , e  $A$ .

Uma análise semelhante pode ser feita em relação à equação de  $\dot{Y}$ , a derivada de Y no ponto  $Y(t)=0$  é

$$\dot{Y} = pa + bAX .$$

Note que  $pa + bAX > 0$ , pois A e X são não negativos e os parâmetros do modelo, por hipótese, também são. Portanto, se a população inicial de Y for não negativa, Y será sempre não negativo.

Resta ainda olhar para a terceira equação, que governa os microagregados,

$$\dot{Z} = gAY - dZ .$$

Quando  $Z=0$  temos que  $\dot{Z} = gAY$ , mas como já vimos que  $A \geq 0$  e  $Y \geq 0$ , temos que  $gAY \geq 0$  sempre. Portanto a população de microagregados também nunca pode ser negativa.

Estes resultados têm um efeito de corroboração ao modelo, pois indicam que se escolhermos condições iniciais “naturais” (populações não negativas) o modelo não nos levará a condições que não são “naturais”.

### 5.3.3 O Equilíbrio da População Total de Hemócitos.

O modelo da dinâmica de hemócitos desse trabalho possui uma propriedade interessante em relação à população total de hemócitos do inseto. Para verificar isso

devemos observar as três primeiras equações do sistema, correspondentes às equações das sub-populações de hemócitos. Assumindo que  $d=d_1=d_2$  e somando as três equações obtemos

$$\begin{aligned} \dot{X} &= a - bAX - dX \\ \dot{Y} &= pa + bAX - gAY - dY \\ + \quad \dot{Z} &= gAY - dZ \\ \hline \dot{X} + \dot{Y} + \dot{Z} &= a(1+p) - d(X+Y+Z) \end{aligned}$$

Se  $W = X+Y+Z$  for a população total de hemócitos, obtemos a seguinte equação diferencial para a variação de  $W$  no tempo

$$\dot{W} = a(1+p) - dW. \quad (11)$$

Note que  $W = \frac{a(1+p)}{d}$  é um ponto singular dessa equação, pois a derivada de  $W$  nesse ponto é zero. Note também que  $\frac{a(1+p)}{d} = \frac{a}{d} + \frac{pa}{d}$ , ou seja, a soma dos valores de  $X$ ,  $Y$  e  $Z$  no ponto singular  $E_0$  (seção 5.3.1) corresponde ao ponto singular da equação do total de hemócitos  $W$ .

A equação (11) possui solução analítica dada por

$$W = \frac{a(1+p)}{d} + \left( W(0) - \frac{a(1+p)}{d} \right) e^{-dt}. \quad (12)$$

Nessa expressão  $W(0)$  corresponde à condição inicial da equação. A solução da equação é uma função que inicia no ponto  $W(0)$  quando  $t=0$ , e tem decaimento exponencial para o ponto singular  $W = \frac{a(1+p)}{d}$ . As figuras 6 e 7 apresentam gráficos dessa função nos casos em que  $W(0)$  é maior e menor que o ponto singular, respectivamente.

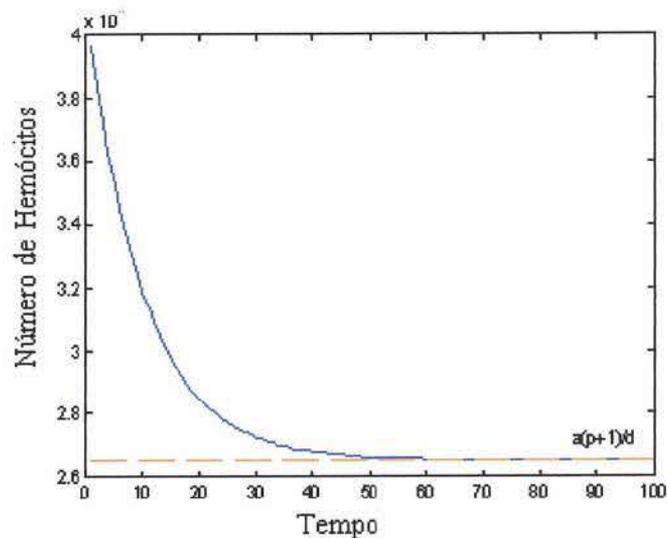


Figura 6: A linha inteira representa a função (12) com  $a=2500$ ,  $d=0.1$ ,  $p=0.06$  e  $W(0)=40000$ , e a linha tracejada marca o valor do ponto singular ( $\frac{a(1+p)}{d} = 26518$ ).

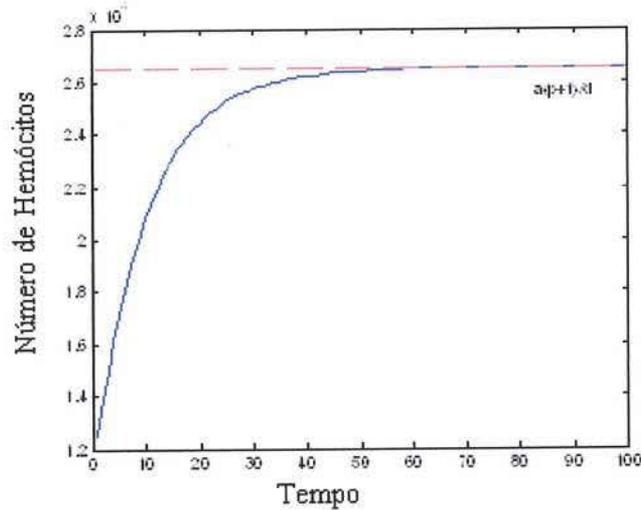


Figura 7: A linha inteira representa a função (12) com  $a=2500$ ,  $d=0.1$ ,  $p=0.06$  e  $W(0)=10000$ , e a linha tracejada marca o valor do ponto singular ( $\frac{a(1+p)}{d} = 26518$ ).

Portanto, podemos concluir que na dinâmica descrita pelo modelo existe uma população total de hemócitos de equilíbrio. Independente de qual a população inicial, com o tempo, a soma das sub-populações de hemócitos tenderá a esse equilíbrio. Além disso, o processo infeccioso não afeta a população total dos hemócitos, tendo influência apenas nas proporções de cada sub-população.

### 5.3.4 Uma Condição para o Crescimento Indeterminado do Microorganismo

Para descobrir quais as condições necessárias para que os hemócitos do inseto não consigam controlar uma infecção deve-se olhar para a equação diferencial que representa a variação da população de microorganismos no tempo. Desta equação podemos tirar que

$$\dot{A} > 0 \Leftrightarrow \frac{l}{cZ} > 1$$

Assumindo que  $d_1=d_2$  e que o sistema começa em  $(X_0, Y_0, Z_0, 1)^3$ , que corresponde a uma pequena perturbação em  $E_0$ , equivalente ao inoculo do microorganismo, então pode se mostrar como consequência do resultado da seção 5.3.3 que  $Z \leq \frac{a}{d_1} + \frac{pa}{d_1}$ . Portanto, se

$$R = \frac{ld_1}{ca(1+p)} > 1$$

então a derivada de  $A$  no tempo é sempre positiva, ou seja, a população de microorganismos aumenta sempre, independente da ação dos hemócitos do inseto. Em certo sentido,  $R$  se aproxima da taxa reprodutiva básica  $R_0$ , um parâmetro importante da epidemiologia.

Este parâmetro  $R$  é um indicador da capacidade do microorganismo fugir ao controle do inseto, ele é afetado por parâmetros chave do modelo. O parâmetro  $l$  indica a taxa reprodutiva do microorganismo, portanto, se  $l$  for grande  $R$  também é grande, e o microorganismo tem maiores chances de escapar ao sistema imune. Já o parâmetro  $c$  é a eficiência com que o sistema imune elimina os invasores, portanto quanto maior  $c$ , menor as chances de o microorganismo ter sucesso. A expressão  $\frac{a(1+p)}{d_1}$  representa a população total de hemócitos no equilíbrio, que neste modelo não é afetada pela infecção. Quanto maior a população de hemócitos, maiores as chances de o sistema imune controlar a infecção.

---

<sup>3</sup>  $X_0 = \frac{a}{d_1}, Y_0 = \frac{pa}{d_1}, Z_0 = 0$

## 5.4 Simulações

Simular o modelo da dinâmica de hemócitos neste momento se faz necessário para verificar que tipos de comportamentos ele é capaz de produzir. Na seção 5.3 foram apresentadas algumas características desse modelo, que serão exploradas nas simulações.

Idealmente, o modelo deve ser capaz de reproduzir aquilo que ocorre na resposta imune do inseto, mas para que isso aconteça, os parâmetros certos devem ser encontrados. Com esses parâmetros, que devem ser estimados a partir de dados experimentais, é possível verificar se o comportamento do modelo corresponde àquilo que se observa no inseto. Se o modelo tiver um bom ajuste, ele pode ser usado para fazer previsões sobre a resposta imune do inseto.

Entretanto, com os dados obtidos na parte experimental deste trabalho não é possível ajustar os parâmetros do modelo, pois só dispomos das informações de hemócitos circulantes ( $Y$ ) e de microagregados ( $X$ ) em dois pontos no tempo. Considera-se que antes da inoculação os hemócitos do inseto estejam em sua condição de equilíbrio, este ponto corresponde aos dados do controle. O outro ponto que temos é duas horas após a inoculação, quando se acredita que a resposta esteja próxima de seu auge. Assumimos também que o número total de hemócitos seja próximo da maior contagem obtida no experimento.<sup>4</sup>

Como um ajuste melhor não é possível, nos limitamos a simular o modelo em busca de respostas (comportamentos) qualitativas, sem, no entanto desprezar as informações quantitativas de que dispomos.

---

<sup>4</sup> Contagem obtida em uma larva muito próxima da empupação, quando ocorre reestruturação total dos tecidos. Assumimos que nesse momento quase todos os hemócitos estão na hemolinfa.

A primeira simulação corresponde ao caso comentado na seção 5.3.1 quando o inseto sofre uma lesão, perdendo hemolinfa e junto alguns hemócitos circulantes.<sup>5</sup> Suponhamos que o inseto perca 20% da hemolinfa, então a condição inicial para a simulação é  $(X_0, 0,8Y_0, Z_0, A_0)$ . A figura 8 representa o resultado desta simulação para a população Y, a única que sofre variação. Pode se observar que, após algum tempo, a população Y retorna ao seu valor de equilíbrio.

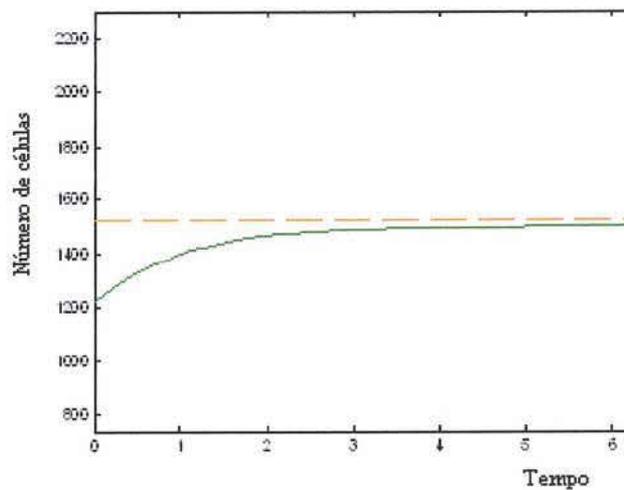


Figura 8: Simulação do modelo da dinâmica de hemócitos. A linha inteira corresponde à população de Y e a linha tracejada representa o valor de equilíbrio  $Y=1518$ . Os parâmetros da simulação são  $a=25000$ ;  $d1=1$ ;  $d2=1$ ;  $p=0.06$ ;  $l=100$ ;  $c=0.05$ ;  $b=0.007$ ;  $g=0.06$ ; e a condição inicial é  $X=25000$ ,  $Y=1214$ ,  $Z=0$ ,  $A=0$ .

Para as simulações de infecções, consideramos as informações obtidas do tratamento controle como a situação do inseto antes da inoculação. Então, quando inoculamos o microorganismo, há uma pequena perturbação, de forma que a condição inicial seja  $(X_0, Y_0, Z_0, 10)$ .

<sup>5</sup> Não há perda de microagregados, pois no estado de equilíbrio  $E_0$  a população de microagregados  $Z=0$ .

Inicialmente procuramos simular as condições ocorridas no experimento de inoculação, em que uma pequena carga de microorganismos desencadeia uma resposta em que há aumento tanto do número de hemócitos livres quanto de microagregados. Para que isto ocorra, há uma redução no número de hemócitos periféricos. Esta simulação está representada na figura 9, e os parâmetros do modelo foram escolhidos de forma que picos das populações de hemócitos livres e microagregados se aproximassem dos valores encontrados nos experimentos.

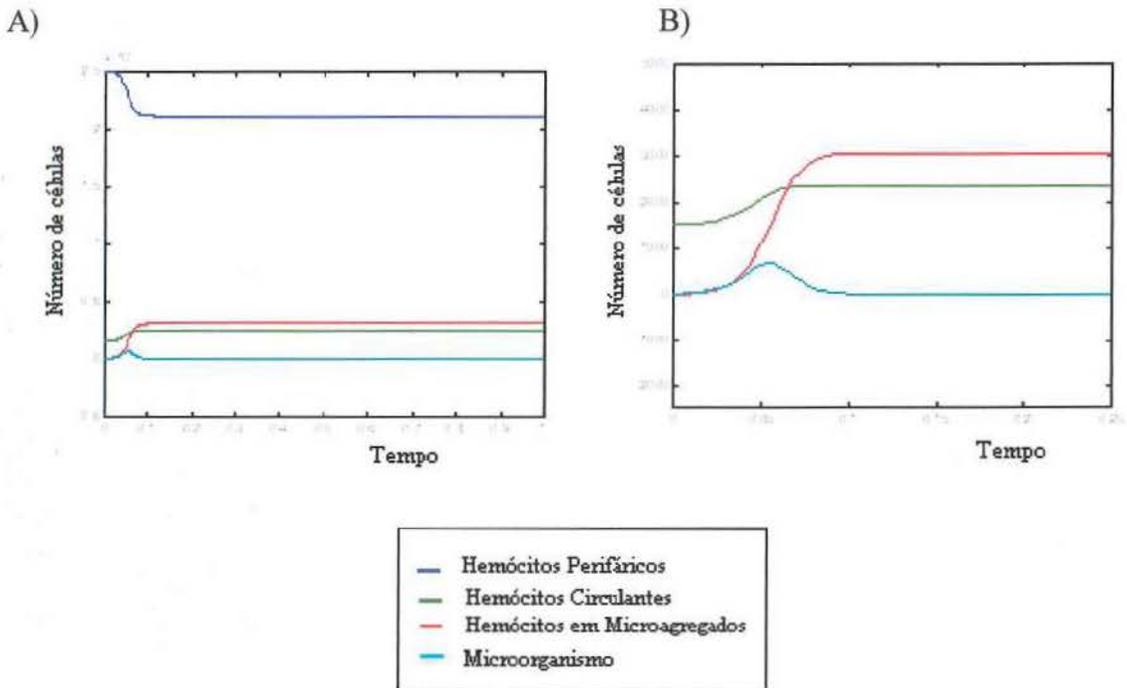


Figura 9: Simulação do modelo da dinâmica de hemócitos. Figura B em escala ampliada. Os parâmetros da simulação são  $a=2500$ ;  $d1=0.1$ ;  $d2=0.1$ ;  $p=0.06$ ;  $l=100$ ;  $c=0.07$ ;  $b=0.007$ ;  $g=0.06$ ; e a condição inicial é  $X=25000$ ,  $Y=1518$ ,  $Z=0$ ,  $A=10$ .

Embora não fique claro no gráfico (figura 9) devido à escala de tempo, após atingidos os valores máximos de resposta e eliminado o microorganismo, as populações de hemócitos livre e microagregados diminuem, aproximando-se dos valores do equilíbrio  $E_0$ . Esta redução dos hemócitos livres e microagregados é dependente dos parâmetros de reposição de hemócitos ( $a, p, d_1$  e  $d_2$ ) e portanto sua velocidade é dada por esses parâmetros. Entretanto, como o tempo de vida da larva no estágio L3 é relativamente curto, e não dispomos de informações suficientes sobre o período pós resposta celular, o foco do trabalho é somente a resposta inicial.

Na simulação seguinte, é considerado o caso em que os microagregados têm uma ação menos efetiva na eliminação do microorganismo invasor. Isso corresponde a uma redução no parâmetro  $c$ , que na simulação anterior valia 0.07 e nesta vale 0.004. A figura 10 é a representação gráfica desta simulação.

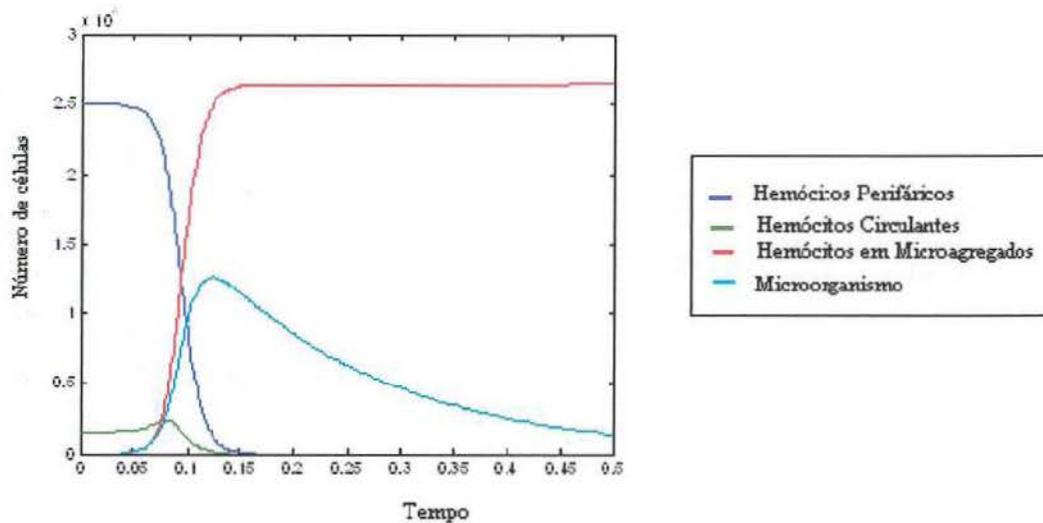


Figura 10: Simulação do modelo da dinâmica de hemócitos. Os parâmetros da simulação são  $a=25$ ;  $d_1=0.001$ ;  $d_2=0.001$ ;  $p=0.06$ ;  $l=100$ ;  $c=0.004$ ;  $b=0.007$ ;  $g=0.06$ ; e a condição inicial é  $X=25000$ ,  $Y=1518$   $Z=0$ ,  $A=1$ .

Observe que neste caso é necessário que quase todos os hemócitos se mobilizem para a agregação para que a infecção possa ser controlada. Inicialmente, como a população de agregados é pequena o microorganismo se multiplica, entretanto, com o aumento do número de agregados a infecção é controlada. Após o controle da infecção as populações de hemócitos tendem a voltar para os valores de equilíbrio.

Na figura 10 a redução do parâmetro de eficiência na eliminação dos microorganismos ( $c$ ) foi insuficiente para que a resposta imune não fosse efetiva. Isso é consoante com o fato de que o parâmetro  $R$ , apresentado na seção 5.3.4, vale 0.94 nesta simulação e, portanto é menor que um.<sup>6</sup>

Já na figuras 11 é apresentada uma simulação em que a redução no parâmetro de eficiência da eliminação do microorganismo é suficiente para que os hemócitos não consigam conter a infecção. Nesta simulação o valor de  $R = 3,77 > 1$ , e de forma condizente a população de microorganismos tem crescimento indeterminado.

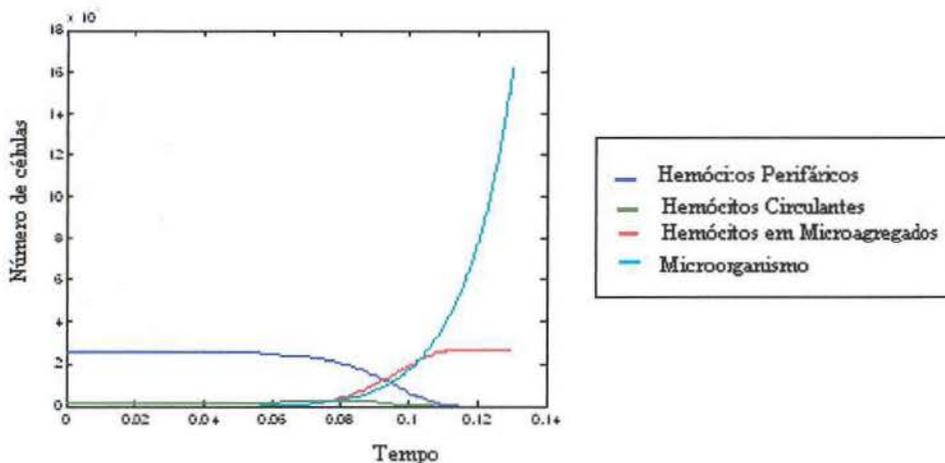


Figura 11: Simulação do modelo da dinâmica de hemócitos. Os parâmetros da simulação são  $a=25$ ;  $d1=0.001$ ;  $d2=0.001$ ;  $p=0.06$ ;  $l=100$ ;  $c=0.001$ ;  $b=0.007$ ;  $g=0.06$ ; e a condição inicial é  $X=25000$ ,  $Y=1518$ ,  $Z=0$ ,  $A=1$ .

<sup>6</sup> Mostramos na seção 3.3.4 que quando  $R = \frac{ld_1}{ca(1+p)} > 1$  o sistema imune não consegue controlar o crescimento do microorganismo.

## 6 Discussão

Em *Chrysomya megacephala*, as concentrações de hemócitos e agregados celulares na hemolinfa são claramente afetadas pela inoculação de microorganismos. Diversos autores (Faraldo & Lello 2003; Kim & Kim 2005; Gillespie et. al. 1997) destacam o papel dessas células na defesa dos insetos contra agentes estranhos que penetram na hemolinfa, como microorganismos, parasitas helmínticos e substâncias abióticas. Além disso, o aumento de microagregados na hemolinfa após a infecção está de acordo com a hipótese de um papel ativo da agregação celular na resposta de defesa em insetos.

### 6.1 Diferenças Entre os Tratamentos

Os hemócitos podem responder de forma diversa a diferentes organismos, entretanto, nesse trabalho, as diferenças entre os valores médios de contagens celulares na hemolinfa em larvas submetidas à inoculação por microorganismos diferentes não foram consideradas significativas. A alta variabilidade encontrada nos tratamentos dificulta conclusões acerca das diferenças entre respostas a organismos diferentes. Diferenças significativas entre tratamentos com inoculação só foram encontradas na razão entre hemócitos livres e microagregados.

Em *Escherichia coli* a razão entre contagens de hemócitos livres e microagregados foi considerada significativamente inferior à de *Saccharomyces cerevisiae*, e, com probabilidade de erro de 5,7% , inferior a de *Micrococcus luteus*. Esse resultado é consoante com o fato de que, em drosófila, as respostas contra fungos e bactérias Gram positivas são dependentes da via de sinalização Toll. Já as respostas contra infecções por

bactérias Gram negativas são controladas pela via Imd (Kim & Kim 2005), levando a crer que este mecanismo de ativação se mantenha conservado em *Chrysomya*.

Essa relação entre hemócitos livre e microagregados pode ser tanto um indicativo de diferentes velocidades de resposta quanto de diferentes prioridades entre os tipos de resposta. No primeiro caso, altas contagens relativas de microagregados podem significar um avançado processo de agregação em que uma grande proporção dos hemócitos já foi mobilizada para se agregar, enquanto baixas contagens relativas indicariam etapas anteriores desse processo. Desta forma, contagens feitas em tempos posteriores tenderiam a apresentar valores relativos de microagregados diferentes. Por outro lado, assim como os microagregados, os hemócitos livres têm papel importante no combate a infecções por meio da fagocitose. Portanto, a razão hemócitos livres / microagregados pode ser um indicativo da importância relativa entre as respostas por agregação e por fagocitose na defesa do inseto. Tanto o tipo prioritário quanto a velocidade da resposta de defesa devem ser fortemente influenciados pela via de ativação.

Do ponto de vista do modelo proposto, diferenças da razão hemócitos livres / microagregados entre os tratamentos podem ser explicadas por variação dos parâmetros de mobilização de células para a hemolinfa  $b$  e de agregação celular  $g$ . As figuras 12 e 13 apresentam simulações que demonstram o efeito desses parâmetros sobre as quantidades relativas de microagregados e células circulantes.

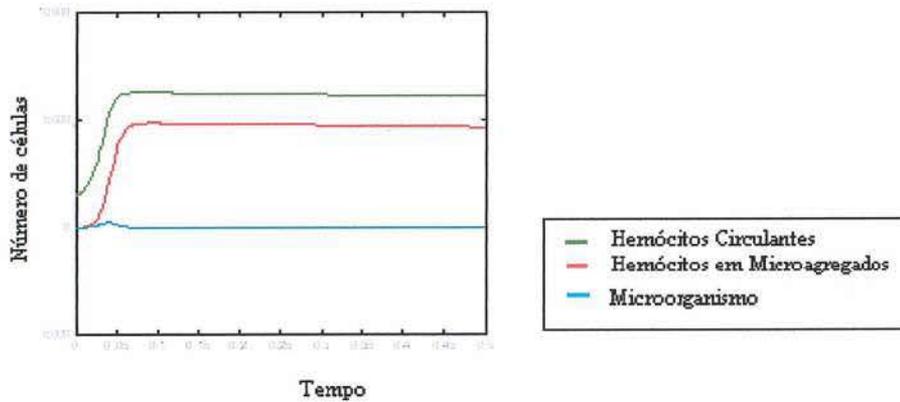


Figura 12: Simulação do modelo da dinâmica de hemócitos. Os parâmetros da simulação são  $a=2500$ ;  $d1=0.1$ ;  $d2=0.1$ ;  $d3=0.1$ ;  $p=0.06$ ;  $l=100$ ;  $c=0.05$ ;  $b=0.07$ ;  $g=0.15$  e a condição inicial é  $X=25000$ ,  $Y=1518$   $Z=0$ ,  $A=10$ .

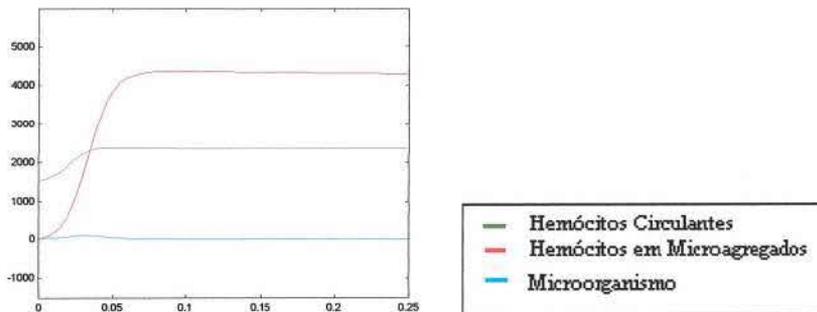


Figura 13: Simulação do modelo da dinâmica de hemócitos. Os parâmetros da simulação são  $a=2500$ ;  $d1=0.1$ ;  $d2=0.1$ ;  $d3=0.1$ ;  $p=0.06$ ;  $l=100$ ;  $c=0.05$ ;  $b=0.07$ ;  $g=0.6$  e a condição inicial é  $X=25000$ ,  $Y=1518$   $Z=0$ ,  $A=10$ .

Ainda considerando o modelo da dinâmica de hemócitos, fatores como as taxas reprodutivas dos microorganismos devem se considerados na análise das diferentes respostas. O pressuposto de que a intensidade da resposta é proporcional à quantidade do agente infeccioso presente na hemolinfa implica que microorganismos de crescimento rápido induzam respostas maiores do que microorganismos equivalentes de crescimento mais lento. Apesar disso, não foi percebida diferença significativa entre as respostas a

bactérias e leveduras (que inclusive apresentaram médias maiores de hemócitos e microagregados). Possivelmente, fatores como o reconhecimento de diferentes padrões moleculares (MAMPs) e variações nas vias de ativação da resposta atuam como compensadores, de forma que as respostas finais, em termos da agregação e mobilização de células para a hemolinfa, sejam semelhantes.

## **6.2 Alta Variabilidade nas Contagens**

A alta variabilidade encontrada neste experimento não difere daquela encontrada em experimentos semelhantes (Silva et al. 2002; Silva 2005). Em estudos de quantificação de hemócitos, freqüentemente, as variâncias são muito altas, de forma que se tornam necessárias amostras grandes como as desse trabalho.

Possíveis razões para essa variabilidade são etapas do experimento ou condições de criação dos insetos mal controladas e ausência de padronização em pontos chaves do experimento, como quantificação adequada do número de bactérias no inóculo. Essa variabilidade ainda pode ser resultado de diferenças naturais entre os indivíduos (ainda que eles sejam fruto de diversas gerações de endocruzamentos) ou causada por mecanismos próprios da resposta imune, ainda não completamente conhecidos.

Processos biológicos, como a resposta imune, são geradores naturais de variabilidade. Essa variabilidade pode ser maior ou menor dependendo de características do processo, e pode ou não ter grande influência na dinâmica do processo.

Uma possibilidade para explicar a variabilidade encontrada nos dados de estudos de quantificação de hemócitos seria assumir que flutuações aleatórias inerentes ao próprio

processo tenham conseqüências importantes no desfecho da resposta. Isso pode ser feito através da modelagem por meio de um processo estocástico.

A figura 14 apresenta a comparação entre a curva de um modelo determinístico e simulações do processo estocástico equivalente.

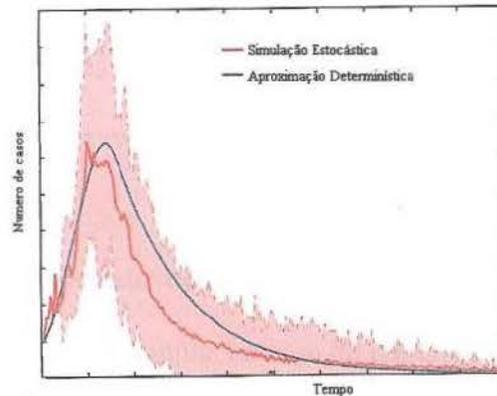


Figura 14: Modelo estocástico para o número de animais infectados por febre aftosa. Região em vermelho representa o espectro de possíveis realizações do processo estocástico e a linha vermelha representa sua média. A linha azul representa um modelo determinístico para o mesmo processo. Retirado de May (2004).

O modelo apresentado nesse trabalho é determinístico e não considera flutuações aleatórias do processo. Quando se trata de processos em que as entidades envolvidas estão em grande número, modelos determinísticos proporcionam boas aproximações, entretanto, para processos governados pela interação entre entidades raras muitas vezes as formulações estocásticas são mais adequadas (Allen 2003).

Modelos determinísticos prevêem resultados com certeza, enquanto processos estocásticos informam apenas as probabilidades de certos eventos acontecerem. Para um modelo determinístico como o deste trabalho, dada uma condição inicial, existe apenas uma possível trajetória para o sistema. Em compensação, para um processo estocástico, partindo

da mesma condição inicial, uma única trajetória do modelo não descreve todo o comportamento do sistema, de forma que se faz necessário o conhecimento da distribuição da variável.

Em modelos de populações, quando o tamanho populacional é suficientemente grande, normalmente são utilizados métodos determinísticos, que são mais simples, e geralmente oferecem conclusões mais gerais. Entretanto, quando o tamanho da população é pequeno, é possível que ocorra extinção, e nesse caso uma formulação estocástica é mais realista (Allen 2003).

Em alguns casos o modelo determinístico e seu equivalente estocástico podem prever resultados diferentes. Por exemplo, no caso do crescimento logístico, no longo prazo a população tende para um valor de equilíbrio correspondente à capacidade de suporte do meio em que ela se encontra; já no equivalente estocástico, com 100% de probabilidade a população será extinta em algum momento (Allen 2003).

### **6.3 Microagregados no Tratamento Controle**

No tratamento controle foram encontrados microagregados, ainda que em contagem menor do que nos tratamentos com inoculação. Isso é um indício da presença permanente desses agregados celulares nas larvas do estágio L3. Por outro lado, a análise do modelo proposto indica que o equilíbrio natural do sistema, na ausência de microorganismos, corresponde à ausência de microagregados e que pequenas perturbações nesse equilíbrio conduzem a dinâmicas que retornam ao equilíbrio. Ainda nas simulações do modelo foram apresentados exemplos dessas perturbações, que correspondem a infecções microbianas.

Esses dois fatos, aparentemente contraditórios, se explicam se for considerado que as larvas do experimento não são estéreis. Elas permanecem por alguns dias antes da inoculação em um ambiente repleto de microorganismos (carne moída em estado de decomposição), de forma que é alta a probabilidade de que elas já tenham enfrentado infecções anteriores. Como resultado dessas infecções ocorre o aumento dos agregados celulares na hemolinfa, que persistem até o momento do experimento.

Uma lenta taxa de retirada dos agregados, aliada a infecções recorrentes e curto tempo de vida da larva, pode explicar a presença permanente dos microagregados, sem, no entanto, invalidar o modelo.

Por outro lado, é possível que muitas das células dos microagregados encontradas no controle estejam mortas, mas permaneçam na circulação sem ação antimicrobiana. Neste caso, estas células não devem ser consideradas pelo modelo por não apresentar mais função de defesa.

Uma outra possibilidade para a presença de microagregados na hemolinfa de organismos não inoculados é a histoneogênese. A fase em que o experimento foi realizado é pré-metamorfose, portanto a formação dos microagregados pode indicar o início do processo de remodelação tecidual.

#### **6.4 Simplificações do Modelo**

Modelos matemáticos que são biologicamente realistas, mas excessivamente complexos para se tirar conclusões, normalmente surgem da tentativa de incluir todas as interações biológicas conhecidas, ao invés de tentar selecionar os fatores preponderantes

para o fenômeno (Yates et al. 2001). Para evitar essas situações é necessário que algumas simplificações sejam feitas, mas estas não devem afetar de forma significativa o comportamento do sistema.

Uma das simplificações feitas no modelo da dinâmica de hemócitos foi desconsiderar a possibilidade dos hemócitos trocarem de sub-população (hemócitos periféricos X, hemócitos circulantes Y e hemócitos em microagregados Z) a não ser que essas trocas sejam induzidas pelo microorganismo. Segundo o modelo, as únicas trocas que podem ser induzidas pelo agente infeccioso são de hemócito periférico para circulante e de hemócito circulante para microagregado.

Isso claramente não corresponde à realidade, pois não existe divisão rígida entre os hemócitos que estão nos tecidos do inseto e os hemócitos que circulam na hemolinfa. Ambos pertencem a uma mesma população e ora estão nos tecidos, ora na hemolinfa. Mas, assumindo uma homogeneidade na população de hemócitos, esse fator não influencia a dinâmica imediatamente após a infecção, pois não estamos interessados no destino de células particulares, mas sim nas proporções em cada sub-população.

Entretanto, para analisar devidamente o tempo de retorno das populações para o equilíbrio após uma infecção, seria necessário introduzir mais um termo no sistema que representaria o retorno da população de Y para os tecidos. Dessa forma, teríamos o equivalente a populações de X e de Y que se misturam, e poderíamos ter um retorno mais rápido dessas populações ao equilíbrio.

A divisão dos hemócitos em sub-populações circulante e periférica serve ao intuito de explicar o aumento de células na hemolinfa após a infecção. Já que apenas a divisão celular dos hemócitos não é suficiente para explicar esse fenômeno, as células devem estar saindo de algum compartimento (tecidos/periferia) e indo para a hemolinfa.

Em relação às trocas de sub-população dos microagregados não foi feita simplificação, pois como eles estão na hemolinfa, eles só podem ser formados a partir de células da hemolinfa. Além disso, uma vez que se integre a um agregado a célula nunca se desprende voltando a ser hemócito livre. (Lavine & Strand 2002)

Outra das simplificações feitas no modelo é o pressuposto de que apenas os microagregados atuam diretamente na eliminação do microorganismo. Isso claramente não acontece, uma vez que hemócitos livres estão envolvidos em fagocitose, e ainda há a ação dos peptídeos antimicrobianos e da melanização. Mas, como o foco do modelo é a dinâmica de agregação, a simplificação se justifica. Além disso, como os microagregados se formam apenas a partir da população de hemócitos circulantes, de forma indireta, outras ações dos hemócitos estão implícitas no modelo.

Entretanto, se o interesse for quantificar as relações entre ação dos hemócitos livres e dos microagregados, é possível adicionar um novo termo dependente de  $Y$  na equação que governa a variação da população de microorganismos  $A$ . Dessa forma, estaríamos considerando diretamente a ação dos hemócitos livres sobre os agentes infecciosos. Com este novo sistema, pode se pensar em perguntas que visem à otimização da resposta do inseto, como “para um determinado agente infeccioso, qual a melhor resposta para o inseto?”. As respostas poderiam ser fagocitose, agregação, ou alguma mistura entre as duas estratégias. Mas, para esse tipo de abordagem, se faz necessária uma boa estimativa dos parâmetros do modelo.

Outra característica do modelo da dinâmica de hemócitos é a falta de distinção entre tipos celulares. Isso é uma simplificação, pois as células têm funções diferentes, sendo que plasmatócitos e células granulares são os tipos celulares mais abundantes e envolvidos em mecanismos de defesa (Faraldo & Lello 2003). Ainda assim, considerando que os últimos

estão entre as células mais abundantes na hemolinfa, e assumindo que, de modo geral, as células têm uma distribuição aproximadamente homogênea, esta simplificação não traz conseqüências significativas.

### **6.5 Tamanho dos Microagregados**

Uma questão importante da dinâmica de agregação celular se refere ao tamanho dos microagregados. Nos resultados do experimento não foi possível encontrar muitas informações acerca da dinâmica de agregação celular. Não foi percebida diferença entre os tratamentos (inoculados e controle) quanto à relação de microagregados grandes e pequenos. Também não foi encontrada correlação entre esta razão e o número total de microagregados.

No modelo da dinâmica de hemócitos essa questão foi completamente ignorada, pois a variável que representa os agregados se refere ao número total de células, independente do tamanho do agregado a que elas estão aderidas. Essa abordagem dificulta a comparação com os dados experimentais, que contam agregados totais, e não células. Entretanto, ao assumir que a ação dos agregados é proporcional ao número de células, resolve-se a complicada questão de considerar os detalhes da dinâmica de agregação para tamanhos diferentes.

Uma alteração simples, e um pouco ingênua, para que a variável  $Z$  passe a representar o número de agregados seria multiplicar o termo  $+gAY$  da equação dos microagregados pelo inverso do tamanho médio dos agregados. Dessa forma, supondo que o tamanho médio do agregado seja 7, a cada 7 hemócitos que deixam a população  $Y$ , para se agregar teríamos um novo microagregado.

Uma segunda possibilidade para considerar essa dinâmica de maneira mais realista seria dividir a população de agregados em diversas sub-populações, uma para cada tamanho de agregado. Dessa forma teríamos um número muito grande de equações diferenciais, de difícil manipulação.

## 6.6 O Parâmetro R

O parâmetro R apresentado na seção 5.3.4 representa uma condição para que a população de microorganismos do modelo tenha crescimento indeterminado. Foi mostrado que, partindo de condições iniciais próximas do equilíbrio na ausência de microorganismos, quando  $R > 1$  a derivada da população de microorganismos (A) é sempre positiva. Dessa forma, a ação do sistema imune é incapaz de conter a infecção.

Apesar de não ter sido provado que na relação contrária, quando  $R < 1$ , os hemócitos do estágio larval são capazes de conter a infecção, em uma das simulações apresentadas, a população de microorganismos foi contida pelo sistema de defesa da larva para um valor de R muito próximo de 1 ( $R=0.94$ ).

Este parâmetro R apresenta uma relação próxima com o parâmetro  $R_0$  da epidemiologia. O parâmetro  $R_0$  é conhecido como a taxa reprodutiva básica do agente infeccioso, e no caso de epidemias de microparasitas, é dado pelo número de novos indivíduos infectados a partir de um indivíduo originalmente contaminado, durante o tempo em que este permanecer infectado. Esse cálculo é feito assumindo que toda a população é inicialmente suscetível à doença. Portanto quando  $R_0 > 1$ , em média cada infectado infecta mais de um suscetível, e ocorre uma epidemia, já quando  $R_0 < 1$  a epidemia não ocorre (Murray 1993).

Mas, neste caso a epidemia se refere ao aumento inicial do número de infectados, que posteriormente pode ser reduzido ou não. No modelo da dinâmica de hemócitos, se partirmos de próximo do equilíbrio “natural”, é comum que haja uma proliferação inicial de microorganismos, até que se forme um número suficiente de microagregados que podem controlar a infecção. O parâmetro  $R$  dá uma condição para que a infecção não possa ser controlada.

Por outro lado, se assumirmos uma população inicial de microagregados remanescentes de infecções anteriores (conforme discutido na seção 6.3) é possível encontrar uma outra relação entre os parâmetros do modelo (diferente de  $R$ ) mais próxima do  $R_0$  da epidemiologia. Esta relação determina se a população de microorganismos desaparece imediatamente ou se ocorre uma proliferação inicial dos microorganismos (que posteriormente poderiam ser controlados ou não).

## 6.7 Ajuste do Modelo

Com os dados experimentais desse trabalho não é possível estimar os parâmetros do modelo. Por esta razão, as simulações foram feitas com parâmetros fictícios, escolhidos de forma que os valores do equilíbrio na ausência de microorganismos e o máximo da resposta à infecção fossem semelhantes aos valores encontrados no experimento. Entretanto, o experimento não confirma que os valores da resposta após 2 horas realmente correspondem ao máximo da resposta.

Para realmente calibrar o modelo é necessário um acompanhamento temporal da resposta do inseto. Como não é possível acompanhar temporalmente as populações celulares do mesmo inseto sem causar enormes perturbações no sistema, é necessário fazer

o experimento com um grande número de larvas em cada ponto no tempo. Além disso, é preciso quantificar a população de microorganismos e a população total de hemócitos ao longo do tempo. Também, para maior precisão, o número de células em microagregados deve ser contado (e não estimado em cima de um número médio fictício de células em microagregados).

Se o estudo do número total de hemócitos demonstrar que estes se mantêm aproximadamente constantes durante infecções, então este é um indício de que o modelo é adequado. Pois, de acordo com o resultado apresentado na seção .3.3, população total de hemócitos constante é uma propriedade do modelo.

Outra forma de verificar o se o modelo é adequado é comparar a curva obtida do acompanhamento temporal das sub-populações com aquelas encontradas nas simulações.

## 7 Conclusões

Foi verificado nesse trabalho que as concentrações de hemócitos e microagregados na hemolinfa de *Chrysomya megacephala* são afetadas por infecções microbianas, o que está de acordo com diversos autores que apontam o papel destas células na resposta de defesa de insetos.

Em relação às respostas a microorganismos diferentes, verificou-se que a relação entre microagregados e hemócitos livres é menor na bactéria Gram negativa testada do que na levedura. Também foram verificados indícios de que esta relação se mantém entre a bactéria Gram negativa e a Gram positiva, o que sugere que as diferentes vias de ativação da resposta imune em drosófila, Toll (leveduras e bactérias Gram positivas) e Imd (bactérias Gram negativas), sejam conservadas em *Chrysomya*, e que estas vias induzam padrões diferentes de formação de microagregados.

Por meio da modelagem, verificou-se que o conjunto de premissas usado para a construção do modelo tem como consequência um processo que se assemelha à resposta imune dos insetos. Das comparações dos dados experimentais com as decorrências do modelo (fruto de resultados analíticos e simulações) verificou-se que o modelo representa uma boa aproximação para a formação da resposta de defesa dos insetos, restrita a mecanismos de microagregação. Propriedades como a impossibilidade de populações inicialmente positivas ficarem negativas e a existência de um ponto de equilíbrio estável, que representa o sistema na ausência de infecções, atuam na corroboração do modelo. Além disso, a existência de um equilíbrio estável para a população total de hemócitos está de acordo com a dinâmica de diversas populações celulares.

Do parâmetro  $R$ , que dá uma condição para que os hemócitos do inseto sejam incapazes de conter a infecção, obtém-se relações importantes entre os parâmetros naturais do sistema: eficiência na eliminação de microorganismos pelos microagregados  $c$ , taxa reprodutiva do microorganismo  $l$ , e a população total de hemócitos. Este parâmetro não considera as taxas de mobilização de hemócitos para a hemolinfa  $b$  e de agregação  $g$ . Entretanto, é possível que estes parâmetros, que atuam na velocidade de remoção do organismo infectante, tenham papel em impedir que todos os hemócitos se transformem em microagregados, o que pode prejudicar o funcionamento fisiológico do inseto.

O modelo proposto não contempla a ação de hemócitos livres sobre os microorganismos, a dinâmica de formação de agregados de diferentes tamanhos, e não têm pressupostos realistas quanto ao retorno dos hemócitos à periferia após o término da infecção. Para que estes aspectos sejam contemplados, seriam necessárias alterações no modelo.

## 8 Referências Bibliográficas

Allen, L. J. S. 2003. **An Introduction to Stochastic Processes with Applications to Biology.** Pearson, Prince Hall. xiii + 385.

Britton, N. F. 2005. **Essential mathematical Biology.** Springer. xv + 335.

Chalk, R; Suliaman, W. Y. 1998. Antimicrobial Peptides from Small Insects: Methods for insect Cultures and for the Detection, Visualisation, Isolation and Sequencing of Active Hemolymph Peptides. in **Techniques in Insect Immunology.** Wiesner, G.B et al. SOS publications.

Faraldo, A. C. & Lello, E. 2003. Defense reactions of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) larval hemocytes. **BIOCELL 27(2):** 197-203.

Flajnik, M. F & Du Pasquier, L. 2004. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? **Trends in Immunology 25 (12):** 640-645.

George. A. J. T. 2002. Is the number of genes we possess limited by the presence of an adaptive immune system? **Trends in Immunology. 23(7):** 351-355.

Gillespie. J. P.; Kanost, M. R.; Trenczek, T. 1997. Biological Mediators of Insect Immunity. **Annual Review in Entomology. 42:**611-643.

Hoffmann, J. A. & Reichhart J. M. 2002. Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective” **Nature Immunology**. **3(2)**: 121-126.

Kaisho, T; & Akira, S. 2006. Toll-like receptor function and signaling. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. **117 (5)**: 979-987.

Kepler, T. B. & Chan, C. 2007. Spatiotemporal programming of a simple inflammatory process. **Immunological Reviews**. **216**: 153-163.

Kim, T. & Kim, Y. J, 2005. Overview of Innate Immunity in Drosophila. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. **38(2)**: 121-127.

Lavine M. D. & Strand M. R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. **32(10)**:1295-309.

Lackie AM. 1988. Immune mechanisms in insects. **Parasitology Today**. **4(4)**:98-105.

May, R. M. 2004. Uses and Abuses of Mathematics in Biology. **Science**. **303**: 790-793.

Murray, J. D. 1993. **Mathematical Biology**. Ed. Springer-Verlag. Heidelberg. xiv + 767.

Nowak, M. A. 2006. **Evolutionary Dynamics: Exploring the equations of life**. Harvard University Press. xi+ 363.

Okada M, & Natori S. 1985. Primary structure of sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. *Journal of Biological Chemistry*. 260(12):7174-7177.

Perelson, A. S & Weisbuch, G. 1997. Immunology for physicists. **Reviews of modern physics**. 39(4):1219-1267.

Refaat M. Gabre, R. M.; Adham, F. K.; Chi, H. 2005. Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). *Acta Oecologica*. 27: 179–183.

Rinkevich, B. 1999. Invertebrates versus Vertebrates Innate Immunity: In the Light of Evolution. *Scandinavian Journal of Immunology*. 50: 456-460.

Silva, C. E. 2005. **Resposta de Defesa em *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794)(Diptera: Calliphoridae): Fatores Humorais e Celulares**. Tese de Doutorado: UFRRJ, Rio de Janeiro.

Silva, J. E. B.; Boleli, I. C.; Somões, Z. L. P. 2002. Hemocyte Types and Total and Differential Counts in Unparasitized and Parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) Larvae. *Brazilian Journal of Biology*. 62(4A): 689-699

Sukontason ,K .L; Sukontason K.; Piangjai, S.; Boonchu, N.; Chaiwong, T.; Vogtsberger, R. C.; Kuntalue, B; Thijuk, N.; Olson, J. K. 2003. Larval morphology of *Chrysomya*

*megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) using scanning electron microscopy. **Journal of Vector Ecology** **28(1)**: 47-52.

Tomberlin, J. K.; Reeves, W. K. R; Sheppard, D. C. R. 2001. First Record of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in Georgia, U.S.A. **Florida Entomologist**. **84(2)**: 300-301.

Yates, A.; Chan C. C. W.; Callard, R. E.; George A. J. T.; Stark, J. 2001. An approach to modeling in immunology. **Briefings in Bioinformatics**. **2 (3)**: 245-257.