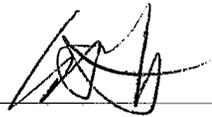


ALGORITMOS GENÉTICOS NA SIMULAÇÃO DA EVOLUÇÃO DAS
BIBLIOTECAS DE GENES DO SISTEMA IMUNE

Grazziela Patrocínio Figueredo

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA DE SISTEMAS E
COMPUTAÇÃO.

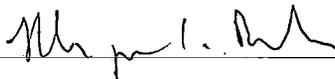
Aprovada por:



Prof. Luís Alfredo Vidal de Carvalho, D.Sc.



Prof. Valmir Carneiro Barbosa, Ph.D.



Prof. Helio José Correa Barbosa, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

OUTUBRO DE 2004

FIGUEREDO, GRAZZIELA P.

Algoritmos Genéticos na Simulação da Evolução das Bibliotecas de Genes do Sistema Imune [Rio de Janeiro] 2004

XX, 114 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, M.Sc., Engenharia de Sistemas e Computação, 2004)

Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE

1. Sistema Imunológico
2. Algoritmos Genéticos
3. Algoritmos Evolucionários
4. Algoritmos Genéticos Coevolucionários
5. Modelagem de Sistema Imune

I. COPPE/UFRJ II. Título (Série)

Ao meu avô, José do Patrocínio.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Luís Alfredo, pela confiança e por mostrar-me novos caminhos.

Ao meu orientador e amigo, Helinho, pela ajuda, incentivo e por ter continuado
presente em mais uma etapa.

Aos amigos Fernando Marcos, Matheus Agostini, Adriano Sant'ana e Luís Otávio
Rigo, por serem os companheiros que dividiram comigo as dificuldades de ter que
lidar com o novo, em prol de um sonho.

À professora Maria Clícia de Castro, pela amizade dedicada e por estar sempre
perto para ajudar nos momentos ruins.

Aos colegas Eduardo Aguilar e Felipe Daetwyler, responsáveis por muito do que
aprendi sobre o sistema imune.

À minha mãe, Dulce, pelo acalanto, preocupação e por nunca permitir que eu
desistisse.

Ao meu irmão Giacomo e sua namorada Cris, que no seu insucesso em fazer de
mim um Rosa, acabaram conseguindo que o meu texto não saísse tão mau.

Ao Rodrigo Rodríguez, por ter sido nestes dois últimos anos meu amigo, meu
médico, psicólogo, psiquiatra, professor, aluno, revisor, co-orientador, consultor em
imunologia, incentivo e, nas horas que sobraram, o grande amor da minha vida.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

ALGORITMOS GENÉTICOS NA SIMULAÇÃO DA EVOLUÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE GENES DO SISTEMA IMUNE

Grazziela Patrocínio Figueredo

Outubro/2004

Orientador: Luís Alfredo Vidal de Carvalho

Programa: Engenharia de Sistemas e Computação

Os receptores dos linfócitos do sistema imune são suas áreas responsáveis pelo reconhecimento de um patógeno. São codificados por segmentos gênicos contidos nas bibliotecas genéticas. A explicação para que haja um número suficiente de receptores para cobrir todos os antígenos é dada por fenômenos conhecidos como recombinações somáticas. Outro fator de diversidade são as hipermutações. Esta tese propõe a modelagem desses mecanismos dentro de um ambiente artificial.

Cinco modelos binários descrevendo alguns dos aspectos da evolução de um sistema imune artificial foram expostos e analisados. O primeiro modelo deu enfoque à evolução de uma população de parátomos, considerando um grupo fixo de epítomos, para simular o mecanismo de hipermutação e observar como o sistema se auto-ajusta para cobrir os epítomos. No segundo modelo, a evolução envolve um grupo de anticorpos se adaptando a uma população de moléculas antigênicas. O terceiro trabalha com a evolução das bibliotecas de genes, dado um grupo de antígenos. A quarta etapa coevolui bibliotecas e antígenos. Finalmente, na quinta simulação, é inserida no a propriedade de tolerância dos sistemas imunes biológicos. Para evolução das populações de cada modelo foram utilizados Algoritmos Genéticos (AGs).

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

GENETIC ALGORITHMS TO SIMULATE THE IMMUNE SYSTEM'S GENE
LIBRARIES EVOLUTION

Grazziela Patrocínio Figueredo

Outubro/2004

Advisor: Luís Alfredo Vidal de Carvalho

Department: Computer and System Engineering

The immune systems lymphocytes receptors are the responsible areas for the pathogen recognition. These receptors are encoded by genes segments located in the genetic libraries. The reason for having enough number of receptors to cover all the antigens is given by the somatic recombining and hypermutation mechanism. This thesis proposes the modelling of such mechanisms in an artificial environment.

Five binary-encoded models describing some aspects of the evolution in an artificial immune system have been proposed and analyzed. The first model has focused on the evolution of a paratope's population, considering a fixed group of epitopes, to simulate hypermutation mechanism and observe how the system would self-adjust to cover the epitopes. In the second model, the evolution involves a group of antibodies adapting to a given molecules population. The third simulates evolution of genes libraries, given a set of antigens. The forth step works on the coevolution of libraries and antigens. Finally, on the fifth model, it is added the biological immune system's tolerance property. For each model, genetic algorithms (Gas) was used in the evolution of populations.

Palavras-chave

1. Sistema Imunológico
2. Algoritmos Genéticos
3. Algoritmos Evolucionários
4. Algoritmos Genéticos Coevolucionários
5. Modelagem de Sistema Imune

Sumário

Resumo	v
Abstract	vi
1 Introdução	1
2 Conceitos Básicos sobre Imunologia	4
2.1 Introdução	4
2.2 Aspectos Gerais das Respostas Imunitárias	5
2.3 Imunidade Natural e Adquirida	8
2.4 Resposta Imunitária Humoral	9
2.5 Resposta Imunitária Mediada por Células	10
2.6 Características Gerais das Respostas Imunes	12
2.7 Mecanismo das Respostas Imunitárias	12
2.8 Antígeno e Antigenicidade	14
2.9 Células e Tecidos do Sistema Imune	15
2.9.1 O Tecido Linfóide	17
2.9.2 Os Órgãos Linfóides	19

2.9.3	Órgãos Linfóides Primários	20
	Medula Óssea	20
	O Timo	20
2.9.4	Órgãos Linfóides Secundários	20
	Os Linfonodos	20
	O Baço	21
2.9.5	Os Linfócitos	22
	Os Linfócitos T	24
	O Reconhecimento dos Antígenos pelas Células T	25
	Os Linfócitos B	27
2.10	O Anticorpo	28
	2.10.1 A Interação da Molécula do Anticorpo com o Antígeno Específico	30
	2.10.2 Região Variável	30
	2.10.3 Região de Dobradilha	32
	2.10.4 Regiões Constantes	32
	Região C_L	32
	Região C_H	32
2.11	A Geração da Diversidade dos Anticorpos	33
	2.11.1 A Diversidade na Região V	33
	Os Segmentos Gênicos da Região V	35
	2.11.2 Processos Geradores da Diversidade dos Anticorpos	36
	2.11.3 Hipermutações Somáticas	36
	Mecanismo Regulador das Hipermutações Somáticas	37

2.12	A Geração de Diversidade dos TCR	38
2.13	Distinção Próprio/Não Próprio	39
2.14	A Teoria da Seleção Clonal	40
2.15	A Arquitetura do SI e o Sistema Global de Defesa	41
2.16	Modelos do Sistema Imunológico	43
2.16.1	A Teoria das Redes Idiotípicas	43
2.16.2	Modelos Evolucionários em SI	43
2.17	SI e Complexidade	44
3	Algoritmos Genéticos	47
3.1	Algoritmos Genéticos	47
3.1.1	Representação e Codificação	49
3.1.2	Inicialização	50
3.1.3	Seleção	50
3.1.4	Operadores de Recombinação	52
3.1.5	Operadores de Mutação	54
3.1.6	A Função de Aptidão	55
3.1.7	Reprodução	56
3.1.8	Critério de Parada	56
3.1.9	Parâmetros do Algoritmo	57
3.2	Coevolução	58
3.3	Simbiose	58
3.3.1	Relações Intra-específicas Harmônicas	59

Sociedades	59
Colônias	59
3.3.2 Relações Intra-específicas Desarmônicas	59
Canibalismo	59
Competição Intra-específica	60
3.3.3 Relações Interspecíficas Harmônicas	60
Mutualismo	60
Protocooperação	60
Inquilinismo e Comensalismo	60
3.3.4 Relações Interspecíficas Desarmônicas	61
Predatismo	61
Parasitismo	61
3.3.5 Competição Interspecífica	61
Amensalismo ou Antibiose	61
Sinfilia	62
3.4 Algoritmos Genéticos Coevolucionários	62
3.4.1 Um AGC Competitivo Genérico	63
4 Modelos Propostos	65
4.1 Introdução	65
4.2 O Primeiro Modelo	65
4.2.1 O Algoritmo	68
4.2.2 Codificação	70

4.2.3	Inicialização	70
4.2.4	Distribuição de Nichos	71
4.2.5	Mutação	72
4.2.6	Avaliação do Estado Geral do Sistema	72
	Início da Evolução:	74
	Primeira Época:	74
	Segunda Época:	75
4.2.7	Avaliação dos Parátomos	75
4.2.8	Experimentos	76
	Primeiro Exemplo	76
	Segundo Exemplo	81
4.2.9	Estudo da Oscilação da Aptidão dos Epítomos durante a Evolução do Modelo	85
4.3	O Segundo Modelo	86
4.3.1	O Algoritmo	87
4.3.2	Distribuição de Nichos	87
4.3.3	Avaliação	89
4.3.4	Avaliação do Estado Geral do Sistema	90
4.3.5	Experimentos	90
	Primeiro Exemplo	90
	Segundo Exemplo	91
4.3.6	Considerações sobre a Evolução para o Segundo Modelo	92
4.4	O Terceiro Modelo	93

4.4.1	Codificação	93
4.4.2	Decodificação	94
4.4.3	Operadores de Recombinação	94
4.4.4	Operadores de Mutação	95
4.4.5	Avaliação	96
4.4.6	Experimentos	96
	Primeiro Exemplo	96
	Segundo Exemplo	97
	Terceiro Exemplo	98
4.5	Quarto Modelo	98
4.5.1	Algoritmo	99
4.5.2	Inicialização	99
4.5.3	Evolução das Bibliotecas	99
4.5.4	Evolução dos Antígenos	99
4.5.5	Experimentos	99
	Primeiro Exemplo	100
	Segundo Exemplo	102
4.6	Quinto Modelo	103
4.6.1	Avaliação	103
4.6.2	Experimentos	104
	Primeiro Exemplo	104
	Segundo Exemplo	107

<i>SUMÁRIO</i>	xiv
5 Considerações Finais	108
Referências Bibliográficas	112

Lista de Figuras

2.1	Cinética da resposta imunitária observando as concentrações de anticorpo no soro (adaptado de [37]).	11
2.2	Aspectos essenciais das respostas imunitárias (adaptado de [37]).	13
2.3	Hematopoiese (adaptado de [20]).	16
2.4	Células do SI inato e suas funções (adaptado de [20]).	18
2.5	Distribuição dos tecidos linfóides (adaptado de [20]).	19
2.6	Esquema de um linfonodo (adaptado de [20]).	21
2.7	O baço (adaptado de [20]).	22
2.8	Formação do líquido tecidual. (adaptado de [6]).	23
2.9	O caminho percorrido pelos linfócitos e seu encontro com os antígenos. (adaptado de [20]).	24
2.10	Esquema de um TCR (adaptado de [20]).	26
2.11	Semelhança entre os TCR e as regiões Fab das Imunoglobulinas (adaptado de [20]).	27
2.12	O anticorpo considerando sua divisão em regiões (esquerda) e cadeias (direita) (adaptado de [20]). Cada braço do Y é formado pela associação de uma cadeia leve com a metade amino-terminal de uma cadeia pesada, enquanto a perna do Y é formada pelo pareamento das metades carboxi-terminais das duas cadeias pesadas [20].	29

2.13	Organização estrutural das principais classes das Igs (adaptado de [20]).	30
2.14	O anticorpo (adaptado de [37]).	31
2.15	A geração da diversidade das regiões V do anticorpo (adaptado de [20]).	34
2.16	Organização dos segmentos gênicos de cadeias leve e pesada dentro dos grupos λ (cromossomo 22), κ (cromossomo 2) e H (cromossomo 14) em humanos (adaptado de [20]).	35
2.17	Disposição dos segmentos gênicos de cadeias leves e pesadas em humanos (adaptado de [20]).	36
2.18	Geração da diversidade dos TCR (adaptado de [20]).	39
3.1	Esquema de um AG genérico	48
3.2	Seleção utilizando o método da roleta.	51
3.3	<i>Crossover</i> de um ponto.	53
3.4	<i>Crossover</i> multiponto com dois pontos de corte.	53
3.5	<i>Crossover</i> uniforme.	54
3.6	Um exemplo de mutação.	55
3.7	Outras formas de mutação.	55
3.8	Um AGC competitivo genérico.	63
4.1	Pseudo-código do primeiro modelo.	69
4.2	Primeiro Exemplo: A evolução do SI do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de tamanhos diferentes e avaliação global.	77

- 4.3 Primeiro Exemplo: A evolução da soma das aptidões dos indivíduos do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de tamanhos diferentes e avaliação global. 78
- 4.4 Primeiro Exemplo: A evolução do SI do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de tamanhos diferentes e avaliação individual. 78
- 4.5 Primeiro Exemplo: A evolução da soma das aptidões dos indivíduos do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de tamanhos diferentes e avaliação individual. 79
- 4.6 Primeiro Exemplo: A evolução de SIs do primeiro modelo considerando variações na taxa de mutação. 79
- 4.7 Primeiro Exemplo: A evolução de SIs do primeiro modelo considerando variações na taxa de mutação e número de épocas maior. 80
- 4.8 Segundo Exemplo: A evolução do SI do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de mesmo tamanho e avaliação global. 81
- 4.9 Segundo Exemplo: A evolução da aptidão dos indivíduos do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de mesmo tamanho e avaliação global. 82
- 4.10 Segundo Exemplo: A evolução do SI do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de mesmo tamanho e avaliação individual. 82
- 4.11 Segundo Exemplo: A evolução da aptidão dos indivíduos do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de mesmo tamanho e avaliação individual. 83

4.12 Segundo Exemplo: A evolução da aptidão do SI do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de mesmo tamanho, avaliação individual, variações na Taxa de Ineficiência e mutação de 85%.	83
4.13 Segundo Exemplo: A evolução da aptidão dos indivíduos do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de mesmo tamanho, avaliação individual, variações na Taxa de Ineficiência e mutação de 10%.	84
4.14 Esquema de funcionamento do segundo modelo.	87
4.15 Pseudo-código do segundo modelo.	88
4.16 Primeiro Exemplo: A evolução do SI do segundo modelo considerando uma população pequena de anticorpos.	91
4.17 Segundo Exemplo: A evolução do SI do segundo modelo considerando uma população grande de anticorpos.	91
4.18 Exemplo de um indivíduo no terceiro modelo.	93
4.19 Geração dos anticorpos a partir de um indivíduo.	94
4.20 Exemplo da utilização do operador de <i>crossover</i>	95
4.21 Operadores de mutação utilizados no terceiro modelo.	95
4.22 Primeiro Exemplo: A evolução do SI do terceiro modelo.	97
4.23 Segundo Exemplo: A evolução do SI do terceiro modelo.	97
4.24 Terceiro Exemplo: A evolução do SI do terceiro modelo.	98
4.25 Primeiro Exemplo: A evolução do SI do quarto modelo.	101
4.26 Primeiro Exemplo: A evolução da aptidão dos indivíduos do quarto modelo.	101
4.27 Segundo Exemplo: A evolução do SI do quarto modelo.	102

4.28 Segundo Exemplo: A evolução da aptidão dos indivíduos do quarto modelo.	102
4.29 Primeiro Exemplo: A evolução do SI do quinto modelo.	104
4.30 Primeiro Exemplo: A evolução da aptidão dos indivíduos do quinto modelo.	105
4.31 Primeiro Exemplo: Aptidão dos indivíduos com relação ao <i>self</i>	105
4.32 Segundo Exemplo: A evolução do SI do quinto modelo.	106
4.33 Segundo Exemplo: A evolução da aptidão dos indivíduos do quinto modelo.	106
4.34 Segundo Exemplo: Aptidão dos indivíduos com relação ao <i>self</i>	107

Lista de Tabelas

3.1	Notas dos indivíduos de uma população juntamente com sua aptidão relativa.	51
-----	--	----

Capítulo 1

Introdução

O reconhecimento é uma característica comum entre os seres vivos, desde uma bactéria que engloba uma biomolécula como possível fonte de alimento, até um mamífero que identifica uma fêmea fértil da sua espécie. Sem a capacidade de reconhecer, um indivíduo está mais sujeito, por exemplo, a ingerir uma substância danosa ao seu organismo, ou a não reproduzir. Igualmente, aqueles aptos a perceberem o que lhes é próprio do organismo e o que é estranho, tornam-se mais habilitados a tentar se defender contra invasões microbiológicas.

Uma das formas mais refinadas de reconhecimento é encontrada no sistema imune. O sistema imune é o aparato que confere a um indivíduo a capacidade de discernimento, defesa e eliminação de patógenos e anomalias existentes no próprio organismo. O mecanismo de reconhecimento do sistema imune é tão sofisticado que qualquer molécula é identificada, seja ela própria ou estranha. Isto com um número de genes relativamente pequeno, como no caso dos vertebrados.

A complexidade do sistema imune é proporcional à estrutura celular que cada espécie encerra. Dentro da classe dos mamíferos, por ser um intrincado sistema de defesa, seu estudo costuma ser realizado sob mais de um enfoque. Há pesquisadores que acreditam que se pode obter o conhecimento sobre como o sistema imune opera na proteção do indivíduo através da compreensão do funcionamento de cada uma das suas partes, até o nível biomolecular. Outros crêem na elaboração de modelos,

como as redes idiotípicas [21], para uma visão do funcionamento do sistema como um todo.

Este trabalho faz parte de uma terceira vertente de estudos sobre o sistema imune, onde o que se pretende estudar é a sua evolução filogenética, que deu origem a um robusto aparato de reconhecimento. O objetivo é tentar entender como, ao longo das gerações, os genes dos mamíferos conseguiram chegar à disposição atual.

Para isto, foram propostos aqui cinco modelos evolucionários artificiais em diferentes escalas de complexidade. Sua função é manipular os genes de uma espécie virtual de forma a aprimorar o seu mecanismo de reconhecimento e defesa contra patógenos.

No primeiro modelo considera-se apenas os receptores dos linfócitos responsáveis pelo reconhecimento contra o seu sítio de ligação dentro do antígeno. Estes receptores devem se modificar ao longo das gerações de forma a otimizar a cobertura de um conjunto fixo de agressores. O segundo modelo representa o aperfeiçoamento do seu antecessor, onde são trabalhados anticorpos que devem identificar regiões antigênicas. O experimento três simula a evolução das bibliotecas de genes que codificam os receptores dos linfócitos B. A quarta simulação representa uma extensão da anterior, onde antígenos também evoluem. Trata-se agora de um modelo coevolucionário no qual as bibliotecas genéticas e agentes agressores realizam uma "corrida armamentista". Finalmente, adicionou-se a característica de tolerância ao próprio dos sistemas imunes biológicos em um quinto modelo. Nesta última, o sistema deve reconhecer moléculas pertencem ao próprio organismo e moléculas estranhas. Os modelos foram implementados utilizando algoritmos genéticos.

Através dos modelos, foi possível se ter uma concepção de como provavelmente os sistemas de proteção dos mamíferos evoluíram. Observaram-se também certas dificuldades que poderiam ter ocorrido ao longo do desenvolvimento de uma espécie e quais os artifícios necessários para que se pudesse chegar a um aparato de sistema global eficaz. Cada experimento, isoladamente, também pode ser visto como um algoritmo para resolução de problemas na área de sistemas imunes artificiais, como a detecção de padrões ou irregularidades.

O trabalho foi estruturado da seguinte maneira. O segundo capítulo apresenta os conceitos básicos sobre imunologia necessários para a compreensão desta tese. Em seguida, no capítulo seguinte, são estudados os principais aspectos dos algoritmos genéticos, suas características básicas necessárias para a implementação dos modelos. Os algoritmos genéticos coevolucionários também são discutidos no capítulo. O quarto capítulo fornece uma visão de cada modelo, sua implementação, experimentos e o embasamento teórico que inspirou sua concepção. Finalmente, no quinto capítulo são apresentadas as considerações finais com relação a cada modelo e aos experimentos realizados.

Capítulo 2

Conceitos Básicos sobre Imunologia

2.1 Introdução

A vida se baseia em um frágil equilíbrio de milhões de reações químicas simultâneas e eventos inerentes a um ser vivo, como as interações deste com o ambiente e outros seres.

Um acidente corriqueiro, uma pequena farpa que penetre a pele de um indivíduo cria uma instabilidade na homeostase do corpo. Neste caso, só existem duas possibilidades, ou o ser vivo reconhece que existiu uma agressão, o tipo de agressor e a melhor forma de combatê-lo, e de posse destas informações passa a atacá-lo e destruí-lo, sem destruir a si próprio; ou sucumbe. Ao aparato de reconhecimento, ação e controle do organismo frente às agressões bioquímicas dá-se o nome de Sistema Imune ou Imunológico.

O Sistema Imune (SI) é hoje conhecido como um dos sistemas biológicos mais complexos. Apesar da especificação da sua função ser a princípio bastante simples, detectar e eliminar qualquer organismo estranho, a execução desta tarefa não é trivial. Ainda hoje não se sabe exatamente como o SI funciona, nem mesmo qual a dimensão do seu papel dentro das interações do organismo [15]. Entretanto, à luz do que atualmente é conhecido sobre a sua dinâmica, muito se tem feito na tentativa de construir sistemas artificiais inteligentes contendo algumas de suas pro-

priedades [18]. Isto por duas razões: a primeira é tentar trazer para o computador partes do SI através de modelos mais rudimentares e simulações do seu funcionamento, no intuito de entender melhor as tarefas que ele executa. A segunda, utilizar o SI como inspiração para a construção de sistemas computacionais inteligentes.

Há muito interesse neste segundo tópico pelo fato de estarem presentes naturalmente no SI propriedades buscadas pelos projetistas na construção de sistemas. Estas são robustez, tolerância a erros, reconhecimento de padrões, distribuição, memória, adaptabilidade, auto-organização e autonomia.

Este capítulo tem como objetivo discutir os conceitos fundamentais, as principais propriedades do SI e os mecanismos mais importantes das respostas imunes, a fim de fornecer subsídios para que o leitor entenda melhor os modelos artificiais evolucionários propostos neste trabalho.

2.2 Aspectos Gerais das Respostas Imunitárias

Ao se tentar enxertar um pequeno fragmento de tecido vivo extraído de um animal em outro da mesma espécie, observa-se que em poucos dias este tecido será destruído e eliminado pelo organismo do indivíduo receptor. Este processo, conhecido como resposta imunitária, é caracterizado pela capacidade que o organismo possui de reconhecer e destruir material estranho, sem implicar uma consequência fisiológica ou patológica de tal reação. Ao estudo das respostas imunitárias, suas consequências e mecanismos dá-se o nome de Imunologia.

O exemplo de rejeição de tecido visto acima representa apenas uma das formas nas quais a resposta imunitária está presente. Entretanto, ele também é um indicador importante da existência de um sistema eficiente de detecção e eliminação de células e moléculas que se apresentam estruturalmente diferentes daquelas tidas como normais e pertencentes ao organismo. Isto quer dizer que, através da resposta imunitária decorrente do enxerto do caso anterior, é possível deduzir que existe uma espécie de "sistema de vigilância constante", responsável pela identificação e remoção de células anormais, que podem ser pertencentes a outros seres vivos, como

bactérias, ou mesmo células do próprio organismo contendo má formação ou defeitos, como por exemplo, aquelas presentes em tumores. Quanto mais eficaz for este sistema de localização e posterior remoção de irregularidades dentro do organismo, maiores são as suas chances de sobrevivência às invasões de parasitas e microorganismos nocivos.

A identificação das funções defensivas do sistema imune precedeu a concepção de que também uma de suas incumbências seria a detecção de irregularidades nas próprias células do organismo. A explicação para este fato está no registro histórico da evolução da humanidade e o surgimento das epidemias.

No século XI, o mundo inteiro se via tomado por uma grande infestação de varíola. O índice de pessoas mortas decorrente desta doença naquela época foi muito grande, principalmente entre crianças. Na China, curandeiros andarilhos começaram a observar que certos indivíduos afortunados conseguiam se recuperar de uma primeira contaminação com a varíola e se tornavam resistentes a um posterior ataque da doença. Assim, estes curandeiros adquiriram o hábito de deliberadamente infectar crianças com extratos de pústulas da varíola com o objetivo de que aquelas que conseguissem sobreviver estivessem protegidas futuramente, caso houvesse uma nova infecção. Esta era uma operação indubitavelmente arriscada, entretanto, naquela época era aceitável, dado o alto índice de mortalidade infantil. Com o passar do tempo e o acúmulo de experiências na técnica, foi descoberto que era possível obter reações menos drásticas se a inoculação fosse dada a partir de pústulas originárias de casos mais brandos da doença. Este procedimento ficou conhecido como *Variolação* (ou inoculação), e em pouco tempo se disseminou em direção à Europa.

Cem anos antes das evidências da natureza dos vírus serem demonstradas, em 1798, o médico inglês Edward Jenner observou que os trabalhadores rurais que ordenhavam o gado geralmente contraíam uma forma branda de varíola, adquirida do próprio gado. Seguindo a sugestão de uma de suas pacientes, uma vendedora de leite, Jenner passou a utilizar como substrato para a variolação o extrato pústulas bovinas - a *vaccínia* ou *cowpox*, e batizou este procedimento de vacinação. O sucesso foi tal que culminou na popularização do procedimento e posterior erradicação da

doença no mundo. Tem-se aqui o marco inicial da Imunologia.

Quando Jerner introduziu a vacinação, nada sabia a respeito dos agentes infecciosos causadores das enfermidades. No século XIX Robert Koch conseguiu provar que as diversas doenças infecciosas eram causadas por diferentes microorganismos patogênicos. Hoje em dia sabe-se que existem cinco grandes classes de agentes causadores das patologias: as bactérias, os fungos, os parasitas, os vírus, e mais recentemente, os prions ¹.

Por volta de 1900, Louis Pasteur com seus estudos sobre a cólera aviária (*Pasteurella multocida*) foi capaz de promover um melhor entendimento dos métodos propostos por Jenner. Pasteur tentou sem sucesso infectar galinhas com uma cultura já envelhecida do microorganismo causador da cólera em aves. Em uma segunda tentativa, já com uma cultura mais recente da *Pasteurella multocida*, Pasteur se deparou com o estranho fato de que as galinhas infectadas na experiência anterior sobreviveram ao novo contágio, o que supostamente deveria ser letal. Intrigado com os resultados obtidos, levantou a hipótese de uma possível ligação entre o ocorrido com as galinhas e o episódio do uso varíola bovina por Jenner.

Esta suspeita impeliu Pasteur a estudos cujas conclusões deram fundamento ao processo de imunização proposto por Jenner e o levaram a desenvolver a vacina contra doenças como a cólera aviária e a raiva. Ele entendeu que na vacinação, a exposição de um animal a uma cepa não virulenta de um microorganismo causador de doenças pode futuramente protegê-lo contra uma infecção virulenta do mesmo microorganismo ou de algum outro semelhante.

A partir daí, novos estudos dos fenômenos imunes e novas vacinas foram surgindo. O volume de pesquisas envolvendo o SI cresceu, e a Imunologia Moderna deste século se ocupa não só da descoberta de novas vacinas, mas também do estudo dos mecanismos do Sistema Imunológico, seus componentes bioquímicos, genéticos e a compreensão das interações biológicas dos organismos, na tentativa

¹PRIONS - Pequenas partículas infecciosas, proteináceas, que resistem à inativação por procedimentos que modificam os ácidos nucléicos e que contém uma proteína celular isoforme anormal. Podem ser transmissíveis e causam doenças degenerativas do Sistema Nervoso Central em humanos (Kuru, Doença de Creutzfeldt-Jakob, Síndrome de Gerstmann-Straussler) ou em animais (scrapie, encefalopatia espongiforme bovina, etc).

de prevenir e determinar tratamentos eficazes para doenças causadas por agentes externos.

2.3 Imunidade Natural e Adquirida

Como foi visto nos exemplos anteriores, o sistema imunológico dispõe de meios para se adaptar e tentar se proteger de patógenos que se infiltram no organismo ao longo da existência do indivíduo. Entretanto, existem também mecanismos de defesa não condicionados a estímulos externos e que já fazem parte do organismo do indivíduo desde o seu nascimento. Esta é a chamada **imunidade natural** (nativa ou inata) e sua estrutura básica é inerente a toda uma espécie, e não a um exemplar apenas; é de caráter geral e proporciona um tipo de defesa amplo, porém, não discriminado. Fazem parte desta classe as barreiras físico-químicas (pele, membranas, saliva, lágrima, mucosas, enzimas digestivas), células fagocitárias e eosinófilos, um subconjunto de linfócitos denominados *Natural Killer* - NK, ou células matadoras naturais, e várias moléculas originadas no sangue [1]. O outro tipo de imunidade é aquele que confere ao sistema imunológico a robustez de se proteger especificamente contra substâncias estranhas, a chamada **imunidade específica** ou adquirida. Este mecanismo de defesa é induzido ou estimulado pela exposição a fatores estranhos; é particular para cada tipo de macromolécula distinto e se ajusta em magnitude e capacidade defensiva de acordo com a forma e intensidade da infecção, para cada indivíduo da espécie.

Foi convencionado que a imunologia se ocupa do estudo da imunidade específica, contudo, fica difícil separar as duas formas de imunidade, visto que a parte adquirida da imunidade nada mais é do que a evolução do Sistema Imune, e por conseqüência do complexo inato, que torna os mecanismos de defesa do organismo mais potentes frente à igual evolução de patógenos e favorecer a preservação da espécie. Ao longo do capítulo, este conceito se tornará mais claro, pois haverá vários exemplos onde as tarefas efectoras são realizadas pelos dois sistemas em conjunto, ou separadamente, porém, de forma redundante, o que comprova que não há entre eles uma linha

divisora.

Dentro da imunidade, tanto inata como específica, há duas classes distintas que se diferenciam pela forma como a resposta imune se dá. São elas a **resposta imunitária humoral** e a **mediada por células**. As seções seguintes explicam de forma sucinta o funcionamento de cada uma delas, dando ênfase no seu papel dentro da imunidade adquirida.

2.4 Resposta Imunitária Humoral

Apesar do seu sucesso no desenvolvimento de vacinas, Pasteur sabia muito pouco sobre a dinâmica envolvida no processo de imunização. Foi somente dez anos mais tarde (1890) que Emil von Behring e Sibasaburo Kitasato demonstraram que o surgimento dos mecanismos de defesa induzidos por intermédio da vacinação estavam associados a fatores de proteção encontrados no soro sanguíneo dos indivíduos vacinados. Um exemplo desta formação de fatores defensivos está no processo de fabricação de soros antiofídicos.

Os antídotos para veneno de cobra são comumente obtidos do sangue de cavalos. O veneno é extraído da serpente e diluído para que fique mais fraco. O cavalo recebe em intervalos de dias, várias aplicações deste preparado, em concentrações cada vez mais altas, porém nunca atingindo a concentração máxima, o que poderia ser danoso ao animal. Após um período de aproximadamente seis semanas, o organismo do cavalo se tornou resistente à peçonha devido à produção de agentes protetores. Para a obtenção do soro antiofídico, uma parcela do sangue do cavalo é retirada e faz-se o seu fracionamento com a finalidade de isolar os agentes de defesa, ou o antídoto propriamente dito. Assim, quando este contraveneno for injetado em uma pessoa ou animal picado por cobra de veneno semelhante ao inoculado no cavalo, espera-se que esta pessoa ou animal se torne temporariamente resistente e não sucumba aos efeitos danosos causados pela substância peçonhenta.

Os elementos do soro sanguíneo que conferem resistência ao organismo a agentes ofensivos como venenos e toxinas são os chamados **anticorpos**, e sua produção

é incitada pela substância danosa injetada, ou **antígeno**. Os anticorpos atuam reagindo quimicamente com os antígenos de forma a neutralizar o seu princípio ativo e impedir que ele cause mais malefícios ao organismo. Os anticorpos são antígeno-específicos. Para um determinado antígeno há um anticorpo produzido especificamente para se ligar a ele. Da mesma forma, quando o antígeno penetra o organismo, somente o anticorpo específico terá sua produção estimulada.

Através da análise sanguínea em intervalos de tempo, é possível determinar a cinética da resposta imune do cavalo. Após a primeira exposição do animal ao antígeno, observa-se um período de latência (janela imunológica ou *lag*) de vários dias, onde não há nenhum tipo de alteração no soro. Em seguida, surge uma alta concentração de anticorpos ² que pode, no decorrer de alguns dias, atingir o seu grau máximo e cair rapidamente, o que caracteriza a chamada resposta primária. Se uma nova dose do veneno for injetada após algum tempo decorrido desde a primeira reação, observa-se que o período *lag* é bem mais curto, e a quantidade de anticorpos aumenta rapidamente, caindo de forma lenta. Esta diferença entre as respostas primária e secundária indica a existência de um aparato produtor de anticorpos capaz de gravar, em uma forma de memória, exposições anteriores a antígenos, provendo o SI da capacidade de se proteger mais rapidamente quando re-exposto a um agente danoso. Esta memória, em certos casos, pode ter sua dimensão reduzida com o passar do tempo, entretanto, ela continua conferindo um tempo de latência mais curto em reações imunes secundárias quando contrastado com as primárias. A figura 2.1 mostra de forma detalhada o mecanismo destas respostas imunes, levando em consideração a quantidade de anticorpos presentes no sangue e os dias decorrentes das inoculações do antígeno.

2.5 Resposta Imunitária Mediada por Células

No caso do enxerto de tecido estranho da seção 2.2, estima-se que em cerca de dez dias esse tecido já terá sido completamente eliminado do organismo. Se,

²Quantidade determinada pela capacidade de neutralização de uma certa medida de antígenos.

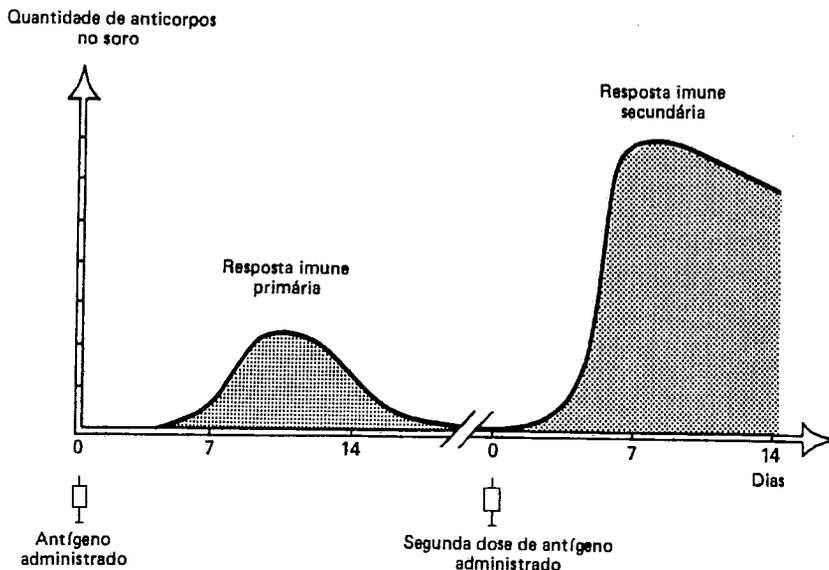


Figura 2.1: Cinética da resposta imunitária observando as concentrações de anticorpo no soro (adaptado de [37]).

porventura, outro tecido com as mesmas características for novamente introduzido no corpo do indivíduo, a eliminação ocorrerá outra vez, porém, o processo durará menos de dois dias. Vê-se que, neste novo exemplo, existem também mecanismos de respostas imunes primária e secundária. Entretanto, o que há de diferente entre as respostas descritas previamente para o complexo humoral, é que agora quem participa principalmente destas respostas não são mais anticorpos, mas células. Destarte, a capacidade de um organismo de reagir contra um tecido estranho, por exemplo, pode ser transmitida para outro através de células vivas chamadas linfócitos, que serão descritas com mais detalhes nas seções seguintes.

Um outro caso no qual a resposta celular pode ser encontrada é na defesa contra parasitas intracelulares, como os vírus e algumas bactérias. Os vírus são organismos compostos por ácido nucléico envolto por uma cápsula de proteína. Por não possuírem um aparato bioquímico necessário à reprodução, invadem células e assumem o comando, fazendo com que as células infectadas funcionem como seu aparelho reprodutor. A infecção viral altera o metabolismo da célula, podendo causar sua morte. Enquanto o vírus estiver no interior celular, está protegido pela membrana plasmática, o que impede às moléculas do complemento e os anticorpos

atuarem contra ele. Para a defesa do organismo frente a este tipo de parasita, existem células imunocompetentes especializadas em vasculhar e destruir no organismo qualquer tipo celular do hospedeiro que apresente alguma irregularidade.

2.6 Características Gerais das Respostas Imunes

A partir do que foi mostrado a respeito das respostas imunitárias, é possível perceber algumas características importantes que devem estar presentes em um SI para que seu funcionamento seja considerado normal:

Especificidade: cada antígeno suscita no organismo um tipo específico de resposta;

Diversidade: estima-se que o sistema imune dos mamíferos seja capaz de discriminar aproximadamente 10^9 determinantes antigênicos distintos.

Memória: confere ao SI um desempenho melhor em suas respostas secundárias quando há uma re-exposição a um determinado antígeno.

Tolerância: capacidade do sistema em distinguir dentre as várias moléculas presentes dentro do indivíduo, o que faz parte do organismo e o que é externo.

Auto-Regulação: existem no SI mecanismos reguladores que proporcionam o equilíbrio com relação à ativação de agentes defensivos contra um determinado antígeno. Quando ocorre um ataque, há em um dado instante um aumento considerável dos fatores de defesa, seguido de redução à medida que o agressor é eliminado.

2.7 Mecanismo das Respostas Imunitárias

Em [37], há uma metáfora do funcionamento básico do sistema imune:

"Em alguns sentidos, o sistema imune pode ser comparado a um estado totalitário em que os estrangeiros são expelidos, os cidadãos que se comportam são tolerados e

aqueles que se "desviam" são eliminados. Ao mesmo tempo que esta analogia não deve ser levada a extremos, torna-se rapidamente claro que tais regimes possuem vários aspectos característicos que incluem defesa de fronteira e uma força policial que mantém a população sob vigilância e elimina prontamente os dissidentes. As organizações dessa natureza também tendem a desenvolver um sistema de passaporte, de modo que os estrangeiros que não possuem certos aspectos de identificação são rapidamente detectados e remanejados".

Assim, quando um antígeno penetra o corpo, deve ser detectado, apreendido e reconhecido. Sendo identificado como estranho, acionam-se os sistemas imunitários para reagir por meio da produção de anticorpos ou células, eliminar o invasor, armazenando, também, informações sobre este evento a fim de que a resposta a uma nova invasão seja mais eficaz. Um esquema deste mecanismo pode ser visto na figura 2.2.

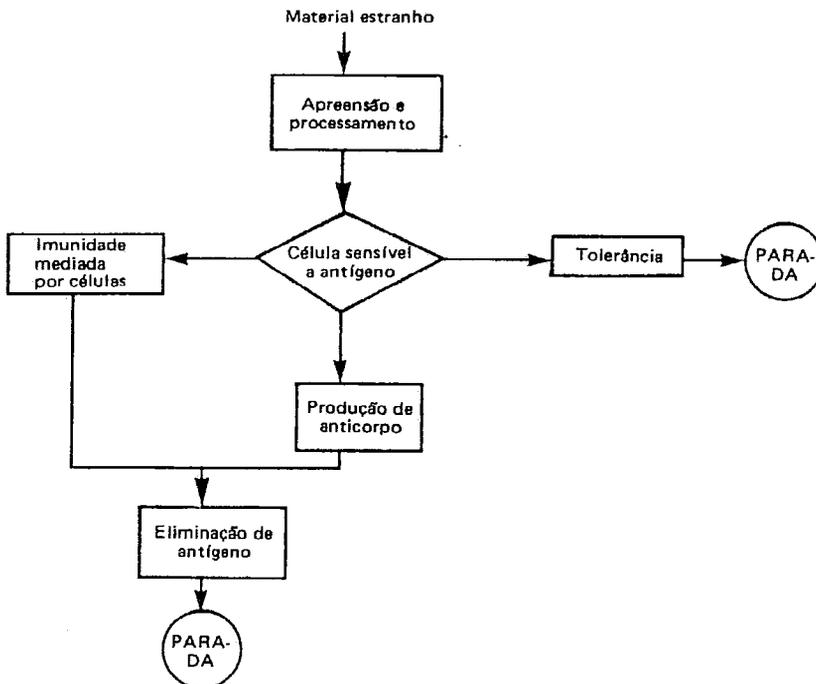


Figura 2.2: Aspectos essenciais das respostas imunitárias (adaptado de [37]).

Dentro do corpo, é possível distinguir os elementos que desempenham cada uma das funções citadas. A primeira linha de defesa celular do organismo é constituída

por células responsáveis pela apreensão do patógeno, exposição e alerta de invasão. É constituída pelos macrófagos, granulócitos, células dendríticas e mastócitos. Os linfócitos são células sensíveis a antígenos, que efetuam o reconhecimento, participam das respostas imunitárias primária e secundária e trabalham como células efetoras nas respostas mediadas por células. As células responsáveis pela produção de anticorpos são derivadas dos linfócitos e conhecidas como plasmócitos. Cada um destes integrantes será visto com mais detalhes nas seções seguintes.

2.8 Antígeno e Antigenicidade

Um antígeno é qualquer molécula que pode ligar-se especificamente a um anticorpo. Seu nome deriva de sua propriedade de GERar ANTICorpos. Alguns antígenos, contudo, não o fazem por si mesmos, reservando-se a designação de imunógenos apenas para aqueles antígenos que podem induzir a produção de anticorpos.

Os fagócitos do sistema inato trabalham capturando qualquer material estranho encontrado no organismo do hospedeiro. Entretanto, não se pode dizer que todo esse material apreendido desencadeia uma resposta imune adaptativa. Na verdade, para ser considerado antigênico, o corpo estranho deve possuir algumas características com relação à natureza físico-química e o material estranho que o compõe deve ser constituído de substâncias não toleradas pelo sistema imune do indivíduo infectado.

Sob o ponto de vista das limitações físico-químicas, para serem consideradas antigênicas, as moléculas devem ser grandes ³, rígidas e quimicamente complexas [37]. Desta maneira, macromoléculas de estrutura complexa como as proteínas são consideradas melhores antígenos.

Uma outra característica relacionada às restrições físico-químicas é a degradabilidade. Moléculas que não podem ser degradadas e processadas pelos fagócitos desencadeiam pouca ou nenhuma resposta imune. Um exemplo prático descrito

³Há moléculas pequenas que atuam como antígenos, porém as maiores são mais eficazes para este fim.

em [37] é o uso de válvulas cardíacas de porco fixadas com glutaraldeído na cirurgia cardíaca humana. O glutaraldeído fixa as proteínas da válvula, tornando-as metabolicamente inertes e não antigênicas.

A segunda característica para que uma substância seja antigênica é o não reconhecimento pelas células sensíveis a antígenos. Ela define quais moléculas podem ser consideradas próprias e podem permanecer no organismo e quais devem ser eliminadas. Para que não haja reação de linfócitos com auto-antígenos, há mecanismos que os eliminam antes de sua completa formação. Quando há falhas nos mecanismos de eliminação de células que atacariam o que é próprio do organismo, têm-se as chamadas doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e diabetes *mellitus* tipo I.

2.9 Células e Tecidos do Sistema Imune

Todas as células do organismo, inclusive as células brancas têm sua origem em um único grupo de células progenitoras, denominadas células-tronco hematopoiéticas da medula [20], como pode ser visto no esquema da figura 2.3. Neste texto, há interesse em estudar os derivados dos progenitores mielóide e linfóide comum que são as células que se diferenciam em leucócitos dos sistemas inato e adaptativo.

O progenitor mielóide é o precursor dos granulócitos, macrófagos, células dendríticas e mastócitos do sistema imune [20]. Os macrófagos constituem um dos três tipos de fagócitos presentes no SI. Este tipo de célula se encontra amplamente distribuída no sangue e tecidos. Em sua forma imatura, é conhecido como monócito, tornando-se macrófago após a sua migração da corrente sanguínea para os tecidos. Representa uma das células mais importantes da imunidade inata.

O papel das células dendríticas é capturar e apresentar o antígeno aos linfócitos a fim de que ele seja reconhecido e combatido. Realizam tanto a fagocitose como a micropinocitose. Existem em sua superfície receptores capazes de reconhecer estruturas comuns a diversos tipos de patógenos. Assim, quando esses receptores encontram uma molécula patogênica reconhecível, a célula dendrítica é estimulada a englobar

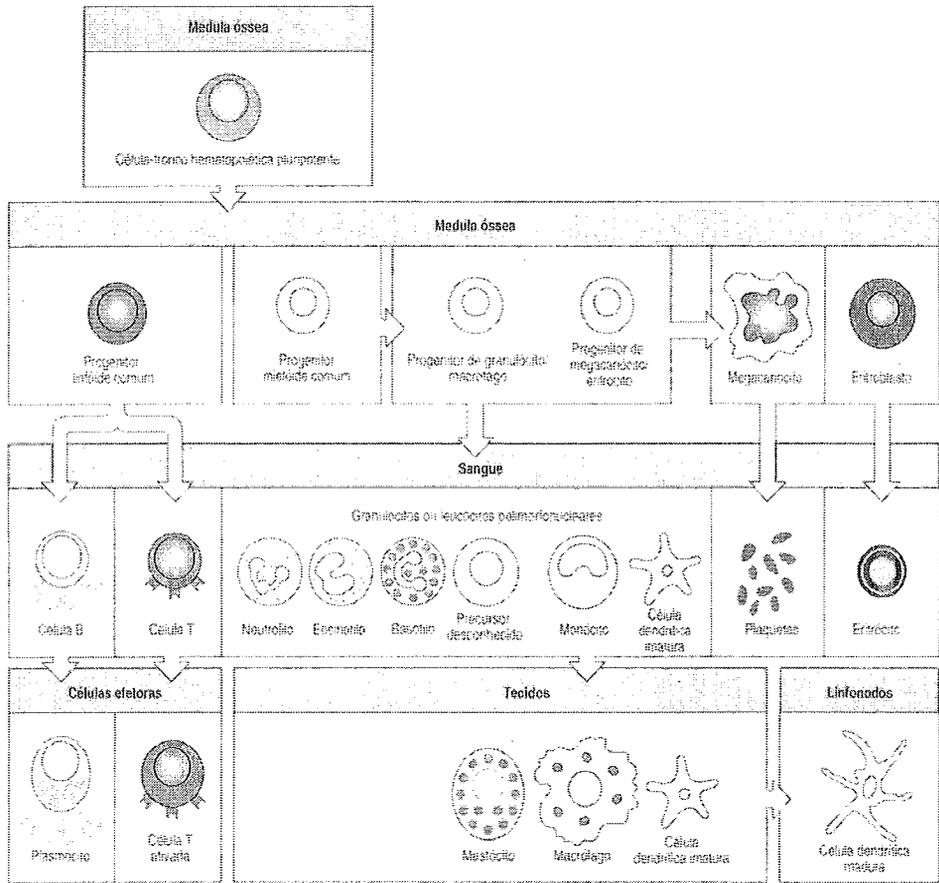


Figura 2.3: Hematopoyese (adaptado de [20]).

o patógeno e degradá-lo. Ao ingerir o patógeno, a célula se ativa, amadurecendo em uma célula apresentadora de antígenos (APC) e migra até o linfonodo mais próximo. Já amadurecida, a célula é capaz de ativar os linfócitos antígeno-específicos do linfonodo e secretar citocinas que determinam quando e como o sistema imune deverá responder aos agentes infecciosos.

Os mastócitos influenciam na permeabilidade vascular, gerenciam as respostas alérgicas e acredita-se que estejam também envolvidos na proteção da superfície de mucosas [20].

Os granulócitos, ou leucócitos polimorfonucleares recebem essa denominação por conterem grânulos altamente coráveis em seu citoplasma. Há três tipos de granulócitos. Em todos os seus tipos, apresentam vida média curta. A sua produção é mais estimulada durante as respostas imunes, onde migram do sangue para os locais de infecção ou inflamação. Os neutrófilos são as células fagocitárias mais numerosas e importantes do complexo inato. Os eosinófilos estão presentes nas respostas contra infecções parasitárias. Os basófilos possuem funções ainda indeterminadas; entretanto, acredita-se que atuam auxiliando as respostas realizadas pelos mastócitos e eosinófilos. Um quadro com o resumo das células descritas e suas funções pode ser visto na figura 2.4.

O progenitor linfóide comum dará origem aos linfócitos, que serão descritos mais detalhadamente no próximo tópico e ao longo do texto.

2.9.1 O Tecido Linfóide

O tecido linfóide é constituído por um conjunto de órgãos e tecidos composto pelo timo, os nódulos linfáticos (folículos linfóides), os linfonodos e o baço (figura 2.5). Em todas as suas formas, está presente neste tecido uma população densa de linfócitos [6], o que pode ser facilmente explicado pelo papel dessas células nas respostas imunes.

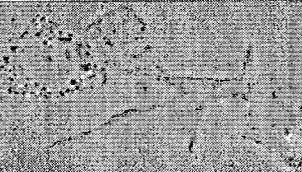
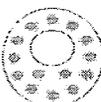
Células		Função ativada
<p data-bbox="283 470 359 490">Macrófago</p> 		<p data-bbox="812 490 938 551">Fagocitose e ativação de mecanismos bactericidas</p> <p data-bbox="812 562 919 602">Apresentação de antígeno</p>
<p data-bbox="283 654 396 674">Célula dendrítica</p> 		<p data-bbox="812 674 945 715">Captura do antígeno nos locais periféricos</p> <p data-bbox="812 725 938 766">Apresentação de antígenos nos linfonodos</p>
<p data-bbox="283 838 359 858">Neutrófilo</p> 		<p data-bbox="812 889 900 950">Fagocitose e ativação de mecanismos bactericidas</p>
<p data-bbox="283 1022 359 1042">Eosinófilo</p> 		<p data-bbox="812 1073 938 1134">Morte de parasitas resistentes por anticorpos</p>
<p data-bbox="283 1205 346 1226">Basófilo</p> 		<p data-bbox="825 1277 919 1297">Desconhecida</p>
<p data-bbox="283 1389 359 1410">Mastócito</p> 		<p data-bbox="825 1430 926 1533">Liberação de grânulos contendo histamina e outros agentes ativos</p>

Figura 2.4: Células do SI inato e suas funções (adaptado de [20]).

2.9.2 Os Órgãos Linfóides

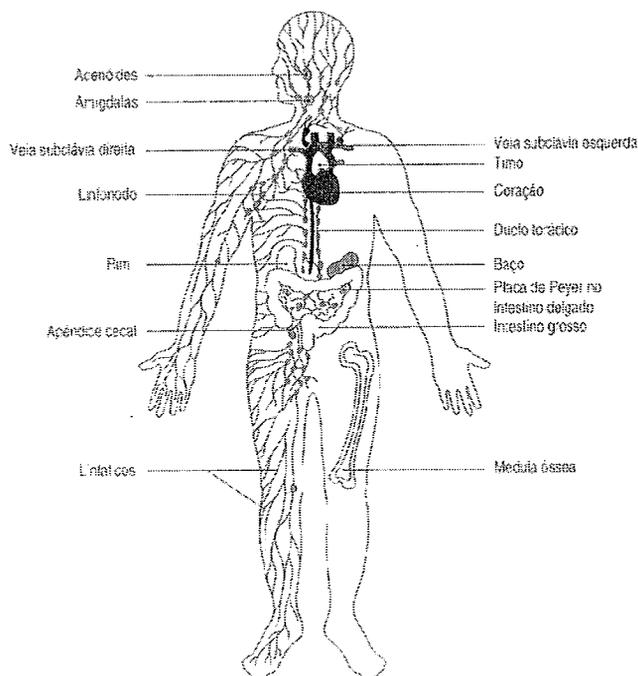


Figura 2.5: Distribuição dos tecidos linfóides (adaptado de [20]).

Os órgãos linfóides são tecidos carregados de linfócitos em um ambiente de células não-linfóides [20]. Nestes órgãos, o contato dos linfócitos com células não-linfóides proporcionam seu desenvolvimento e muitas vezes iniciam respostas imunes adaptativas. São divididos em órgãos centrais, ou primários, e periféricos.

Os órgãos centrais compreendem a medula óssea e o timo. Recebem essa denominação por constituírem ambientes de geração de linfócitos. Os órgãos periféricos são assim chamados por serem os locais onde as respostas adaptativas se iniciam e onde os linfócitos se alojam. São compostos pelos linfonodos e baço. O esquema da figura 2.5 mostra em detalhes os órgãos linfóides e sua localização no corpo humano.

2.9.3 Órgãos Linfóides Primários

Medula Óssea

A medula óssea se localiza no interior dos ossos longos e é constituída por um tecido esponjoso mole. Ela é responsável pela hematopoiese, produzindo os leucócitos, hemácias e plaquetas do sangue. É o principal órgão renovador das células do SI.

O Timo

O timo é um órgão localizado no espaço mediastinal anterior [37] e cujo tamanho pode variar consideravelmente entre os mamíferos. É o local onde os linfócitos T são gerados ou amadurecem, quando têm origem na medula. O timo atinge o seu tamanho máximo na puberdade, entretanto, sua atividade é mais intensa na vida fetal e primeira infância, onde os clones das células T estão sendo formados. Após a puberdade, ele sofre atrofia e a produção dos linfócitos diminui. Existe nas aves um órgão equivalente ao timo que serve para maturação de células B. Este órgão é chamado *Bursa de Fabricius*.

2.9.4 Órgãos Linfóides Secundários

Os Linfonodos

Os linfonodos são estruturas linfóides altamente organizadas, localizados em pontos de convergência do sistema linfático [20]. Como pode ser visto na figura 2.6, existem locais específicos para cada tipo de linfócito dentro do linfonodo. Os linfócitos B se concentram em folículos e os linfócitos T ocupam uma área mais vasta, constituindo as chamadas zonas de células T. Alguns folículos possuem pontos centrais denominados centros germinativos, que são caracterizados por intensa proliferação de linfócitos B, quando há encontro com antígenos.

Pode-se dizer que os linfonodos atuam como "centros de inteligência" do SI, onde

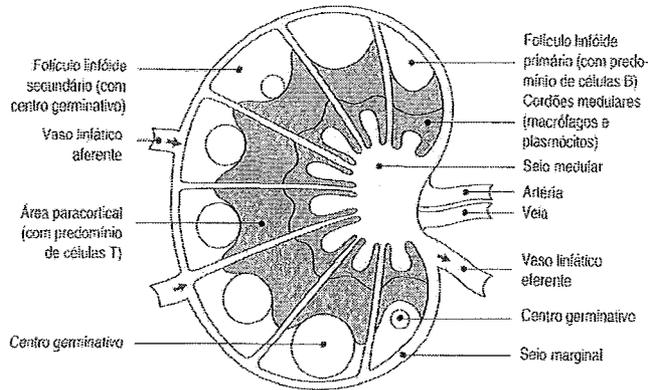


Figura 2.6: Esquema de um linfonodo (adaptado de [20]).

é procurado qual o linfócito mais apto a combater o antígeno apresentado pela APC e se dá o início da resposta ao agressor. Contudo, o propósito dos linfonodos vai além das tarefas de alojar linfócitos e facilitar o mecanismo de defesa adaptativo. Eles, assim como todos os demais constituintes dos tecidos linfóides periféricos, são responsáveis por enviar continuamente sinais de sobrevivência para os linfócitos que ainda não encontraram seu antígeno específico [20].

Existem outros agregados de células linfóides espalhados no organismo. Incluem tecidos linfóides relacionados ao intestino ou GALT – *gut-associated lymphoid tissues* – constituídos pelas tonsilas, adenóides, apêndice cecal e as placas de Peyer responsáveis por coletar antígenos das superfícies epiteliais do trato gastrointestinal [20]; BALT – *bronchial-associated lymphoid tissue* – que protegem o sistema respiratório e MALT – *mucosal associated lymphoid tissues* – relacionado à proteção das mucosas.

O Baço

O baço é o maior órgão linfóide secundário. Sua função é parecida com a dos linfonodos, com a diferença que o baço não possui ligação direta com os vasos linfáticos, mas com a corrente sanguínea. Ele é, portanto, o local onde os linfócitos combatem os agentes infecciosos do sangue. A figura 2.7 mostra um esquema do baço contendo a organização dos seus tecidos linfóides. Ele é constituído pela polpa

branca que responde aos antígenos levados pelo sangue e pela polpa vermelha, que remove células senescentes.

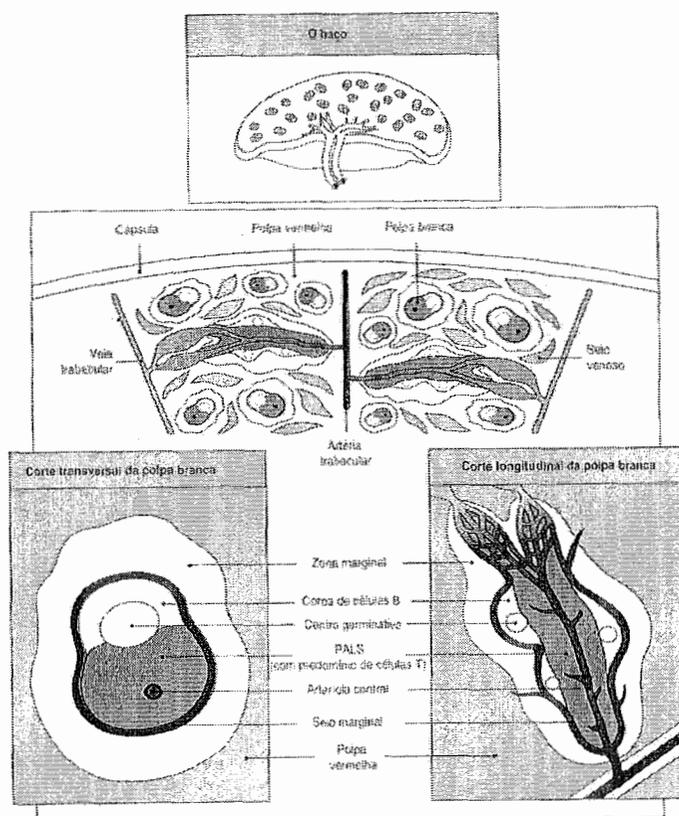


Figura 2.7: O baço (adaptado de [20]).

2.9.5 Os Linfócitos

Os linfócitos são células imunocompetentes recirculantes responsáveis pela imunidade específica. Estas células realizam um intercuro contínuo entre corrente sanguínea e linfa, e em seguida no sentido inverso, num processo chamado recirculação. A linfa origina-se do líquido intersticial excedente que os capilares sanguíneos são incapazes de reabsorver, como pode ser visto na figura 2.8. Este líquido, antes de retornar para a corrente sanguínea, é absorvido pelos capilares linfáticos e drenado ao longo dos vasos linfáticos até os linfonodos. É nos linfonodos que haverá uma triagem determinando quais componentes da linfa poderão retornar ao sangue. Assim, um linfonodo situado ao longo de um vaso linfático é capaz de filtrar diversos tipos de

antígenos e células estranhas que possam estar presentes na linfa, evitando que estes patógenos penetrem na circulação sanguínea. Do mesmo modo, o baço é responsável por filtrar o sangue. Cabe aqui ressaltar que a intensidade desta barreira imposta pelo posicionamento dos linfonodos e do baço depende da sua população residente de macrófagos.

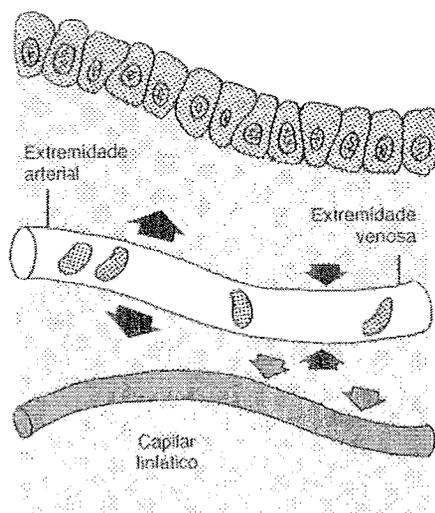


Figura 2.8: Formação do líquido tecidual. (adaptado de [6]).

Durante o movimento de recirculação do sangue para a linfa e novamente para a corrente sanguínea, ilustrado na figura 2.9, há grandes chances dos linfócitos encontrarem antígenos que possam ter penetrado o organismo. Um encontro de tal natureza pode, muitas vezes, desencadear uma resposta imune, pois esse tipo de célula, em sua maioria, dispõe da capacidade funcional para reconhecer e responder a patógenos. Quando um pequeno linfócito reconhece um antígeno, ele aumenta de tamanho, replica o seu DNA e passa por uma série de divisões dando origem aos chamados clones, que são conjuntos de células identicamente programadas para o combate a um determinado agente agressor [6].

É possível destacar duas classes principais de linfócitos. Aqueles cuja diferenciação se dá no Timo são chamados linfócitos T e os outros cujo desenvolvimento se dá na medula óssea (*Bone Marrow*) – são os linfócitos B.

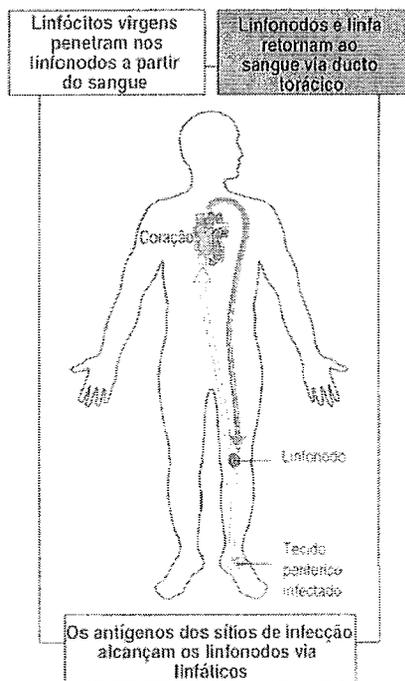


Figura 2.9: O caminho percorrido pelos linfócitos e seu encontro com os antígenos. (adaptado de [20]).

Os Linfócitos T

Os linfócitos T representam a maioria dos linfócitos do sangue e são os principais responsáveis pela imunidade adaptativa. Assim como os linfócitos B, eles tem sua origem na medula óssea, entretanto, sua fase de maturação se dá no Timo. É nesta fase de maturação que o linfócito terá a sua função e especificidade antigênica definidos. Apesar do seu aspecto microscópico de maneira geral ser uniforme, os linfócitos T se subdividem em diversas classes funcionais distintas [6], das quais se destacam as células T regulatórias e as células T citotóxicas ou citolíticas.

Há dois subtipos de células T regulatórias: as células T auxiliares (T *helper*) e as células T supressoras. As células T auxiliares são responsáveis pela secreção de linfocinas ⁴ que desencadeiam a ativação e transformação das células B "virgens" em plasmócitos. Atuam também na ativação das células T citotóxicas e de leucócitos

⁴Linfocinas são fatores solúveis semelhantes a hormônios que afetam outras células (do grego *knesis*, movimento).

inflamatórios [1]. Os linfócitos T auxiliares são as principais células infectadas pelo vírus da imunodeficiência adquirida (AIDS) [31]. Ao segundo subtipo de células regulatória cabe a tarefa de inibir respostas imunes, ou mesmo suprimir a função de uma célula B diretamente. Ela também é capaz de tolher a ativação de uma célula T auxiliar, podendo ser, em certos casos, antígeno-específica.

As células T citotóxicas são as chamadas matadoras naturais e protagonizam a resposta imune mediada por células. Elas atuam lisando células estranhas ou aquelas infectadas por vírus e outros patógenos intracelulares.

A identificação destas subclasses de linfócitos T se deu com a descoberta de uma relação existente entre o papel realizado por uma célula T e certas proteínas expressadas em sua membrana. Por exemplo, constatou-se que a maioria das células T auxiliares expressa uma proteína de superfície designada como CD4⁵. Já nas células citolíticas, a proteína que se destaca é a CD8 [1]. Com isto, puderam ser identificados diversos subgrupos específicos de linfócitos diferentes das células B e T. Um terceiro grupo de células foi destacado por não possuir marcadores de membrana com características específicas que os identifique como linfócitos B ou T. Ele é composto pelas chamadas células nulas, células *natural killer* e células *killer* dependentes de anticorpos. Há suspeitas que nelas se incluem certos estágios iniciais de diferenciação dos linfócitos B e T, entretanto, sua ontogênese e especificidade ainda não estão completamente elucidados. Sabe-se, contudo, que sua função envolve atividade citolítica dirigida contra alguns tipos de células neoplásicas, certas células enxertadas e alguns microorganismos.

O Reconhecimento dos Antígenos pelas Células T

Os locais de reconhecimento de antígenos dos linfócitos T, ou receptores das células T, conforme a ilustração da figura 2.10, são formados por duas cadeias polipeptídicas α e β , cada qual com uma região variável e uma constante ligadas por uma ponte dissulfídrica e pequenas cadeias laterais de oligossacarídeos firmemente presas na membrana celular [6, 20].

⁵CD significa *cluster differentiation*.

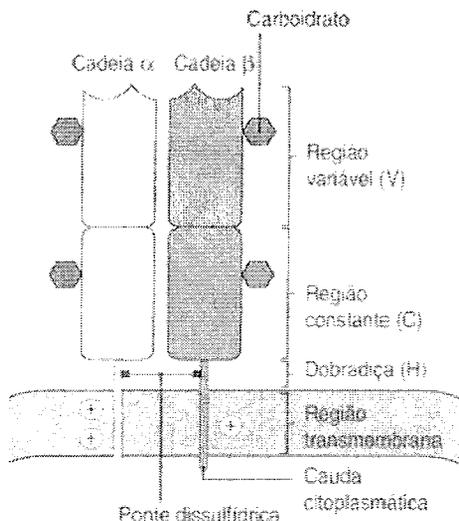


Figura 2.10: Esquema de um TCR (adaptado de [20]).

A figura 2.11 mostra a semelhança existente entre os receptores da célula T (TCR) e as regiões Fab das Imunoglobulinas, que serão vistas nas seções seguintes. Há um outro tipo de receptor, constituído por cadeias polipeptídicas diferentes γ e δ , que parece possuir propriedades diferentes de reconhecimento do antígeno em relação aos receptores $\alpha:\beta$. Sua função, contudo, ainda não é totalmente conhecida. A especificidade de cada célula tem origem nas diversas combinações genéticas que codificam as regiões variáveis do receptor.

O processo de reconhecimento de um antígeno é semelhante ao que acontece com os linfócitos B, entretanto, as células T não são capazes de identificar um antígeno sozinhas. A maioria das células T só responderá a um antígeno estranho se este lhes for apresentado por uma célula acessória, que pode ser um macrófago ou uma célula apresentadora de antígenos, juntamente com as glicoproteínas integrais do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) [6]. O MHC é o conjunto de genes responsável por codificar estas proteínas. Este mecanismo de apresentação de um antígeno, associado a partes integrantes do próprio organismo, confere ao linfócito T a capacidade de identificar células do corpo que contenham alguma irregularidade, como a expressão de antígenos estranhos em sua membrana (por exemplo, células infectadas por parasitas intracelulares) ou até mesmo células que apresentem glicoproteínas de

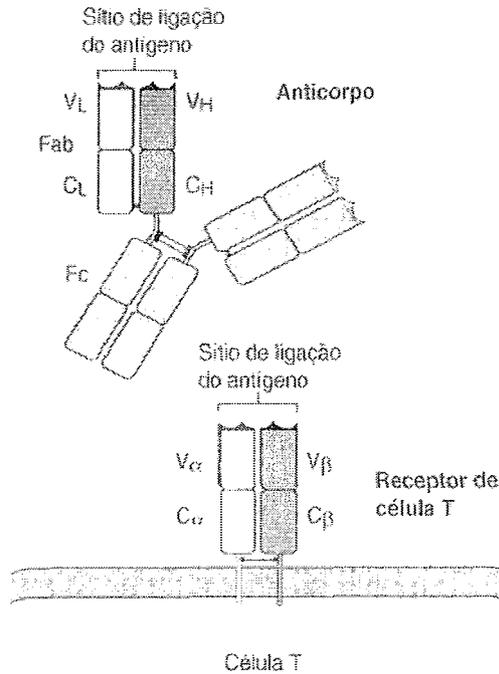


Figura 2.11: Semelhança entre os TCR e as regiões Fab das Imunoglobulinas (adaptado de [20]).

um MHC estranho.

Há duas classes de moléculas de MHC. Elas são denominadas MHC classe-I e MHC classe-II. As moléculas da primeira classe são encontradas em todas as células, enquanto que as da segunda estão presentes nas células apresentadoras de antígenos [10]. As células T citotóxicas respondem a antígenos ligados a moléculas do MHC classe-I e as T auxiliares interagem com antígenos ligados a moléculas do MHC classe-II.

Os Linfócitos B

Como já foi dito anteriormente, cabe aos linfócitos B a produção de anticorpos (ou imunoglobulinas), sendo que cada clone de linfócitos B é responsável por um antígeno em específico. Antes de sua ativação, cada linfócito B apresenta em sua superfície pequenas áreas de imunoglobulinas específicas, também chamadas de parátomos (em sua maioria, sIgM e sIgD das classes IgM e IgD). Estas áreas

são responsáveis pelo reconhecimento do antígeno através da identificação do seu determinante antigênico, ou epítopo, que são as áreas contra as quais a resposta imunitária tende a se dirigir e onde os anticorpos costumam se ligar [37]. Assim, quando um linfócito B encontra e reconhece um antígeno, ele se torna ativado.

Durante o seu processo de ativação, o linfócito aumenta ⁶, reproduz e sua progênie se diferencia em células secretoras de anticorpos, os plasmócitos, e algumas células de memória de mesma especificidade antigênica determinada pelas imunoglobulinas da superfície celular do primeiro linfócito.

Enquanto a função dos plasmócitos é basicamente a liberação de anticorpos, as células de memória adquirem mais imunoglobulina de superfície (sIg) durante a sua diferenciação, mantendo o aspecto morfológico dos pequenos linfócitos e com um ciclo de vida muito maior que os plasmócitos - elas podem permanecer no organismo durante vários anos. Estes linfócitos B de memória são os responsáveis por uma resposta humoral secundária mais imediata e mais ampla.

A explicação para que a capacidade de reconhecimento dos linfócitos B seja tão abrangente, cobrindo praticamente todos os antígenos existentes, está na forma como é estruturada uma molécula de anticorpo.

2.10 O Anticorpo

O anticorpo é o receptor da célula B em sua forma solúvel. A principal diferença entre os receptores da membrana dos linfócitos B e os anticorpos está na cadeia pesada. Nos receptores das células B a porção C-terminal da cadeia pesada apresenta uma seqüência hidrofóbica, ao passo que nas imunoglobulinas essa seqüência é hidrofílica, fato que permite a sua secreção.

Uma molécula de imunoglobulina é constituída de quatro cadeias de polipeptídios com pequeno número de oligossacarídeos ligados [6]. Destas quatro cadeias, duas são cadeias pesadas idênticas entre si, e as outras duas são cadeias leves tam-

⁶Nesta fase ele recebe o nome de linfoblasto.

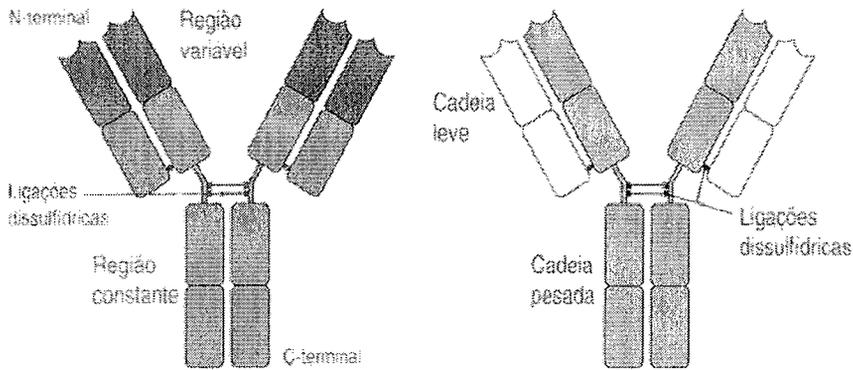


Figura 2.12: O anticorpo considerando sua divisão em regiões (esquerda) e cadeias (direita) (adaptado de [20]). Cada braço do Y é formado pela associação de uma cadeia leve com a metade amino-terminal de uma cadeia pesada, enquanto a perna do Y é formada pelo pareamento das metades carboxi-terminais das duas cadeias pesadas [20].

bém iguais entre si. As cadeias pesadas possuem esse nome por apresentarem maior número de aminoácidos que as cadeias leves. A forma da molécula pode ser vista na figura 2.12. Seu formato é de Y. Sua base é composta por partes das duas cadeias pesadas enquanto os braços são constituídos de parte restante das cadeias pesadas juntamente com uma cadeia leve. O local de reconhecimento dos antígenos, específico para cada tipo diferente de patógeno, fica localizado na ponta de cada um dos braços do Y e é denominado região variável, ou região V. Os demais componentes da molécula constituem a região constante C. A especificidade do sítio de reconhecimento dos antígenos é determinada pela sua seqüência de aminoácidos, e a sua diversidade é conferida pelos genes codificadores dessas seqüências e pelas mutações somáticas, o que será discutido com mais detalhes na seção 2.11.

A função de reconhecimento e neutralização do antígeno fica a cargo da região V. A região C participa na ativação de mecanismos efetores e, diferente da região V, a região C possui um número bastante reduzido de possíveis configurações estruturais. Dessa maneira, é possível organizar as imunoglobulinas (Igs) em cinco classes principais, de acordo com a forma da região C ou isotipo: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. As peculiaridades de cada classe de molécula estão expostas na figura 2.13. A IgG é a imunoglobulina de maior concentração no soro sanguíneo.

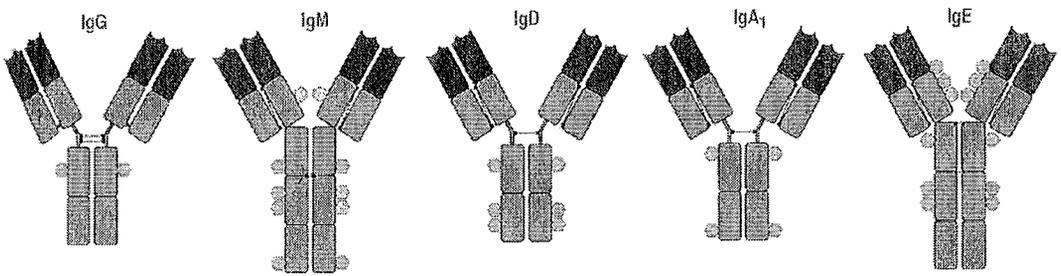


Figura 2.13: Organização estrutural das principais classes das Igs (adaptado de [20]).

2.10.1 A Interação da Molécula do Anticorpo com o Antígeno Específico

O tipo de força de ligação entre antígeno e anticorpo envolve interações não-covalentes. Em sistemas biológicos, as ligações não-covalentes permitem que haja uma formação rápida de complexos, com flexibilidade e de forma reversível. Isto possibilita a reutilização dos anticorpos e sua adaptação à superfície da molécula antigênica. As ligações não-covalentes se formam com a proximidade das moléculas, assim, quanto mais ajustado um anticorpo estiver de um antígeno, maior a força de ligação entre eles. As interações não covalentes conhecidas entre antígeno e anticorpo são ligação iônica ou eletrostática, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals. A ocorrência de cada uma dessas forças dependerá da estrutura das moléculas envolvidas na ligação.

2.10.2 Região Variável

É constituída de mais ou menos a metade da cadeia leve e um quarto da cadeia pesada. Existe ao longo desta região algumas áreas que possuem uma variabilidade muito maior que as demais. Estas áreas são chamadas de regiões hipervariáveis. Este conjugado de regiões hipervariáveis e regiões de menor variação constituem o sítio de ligação do anticorpo.

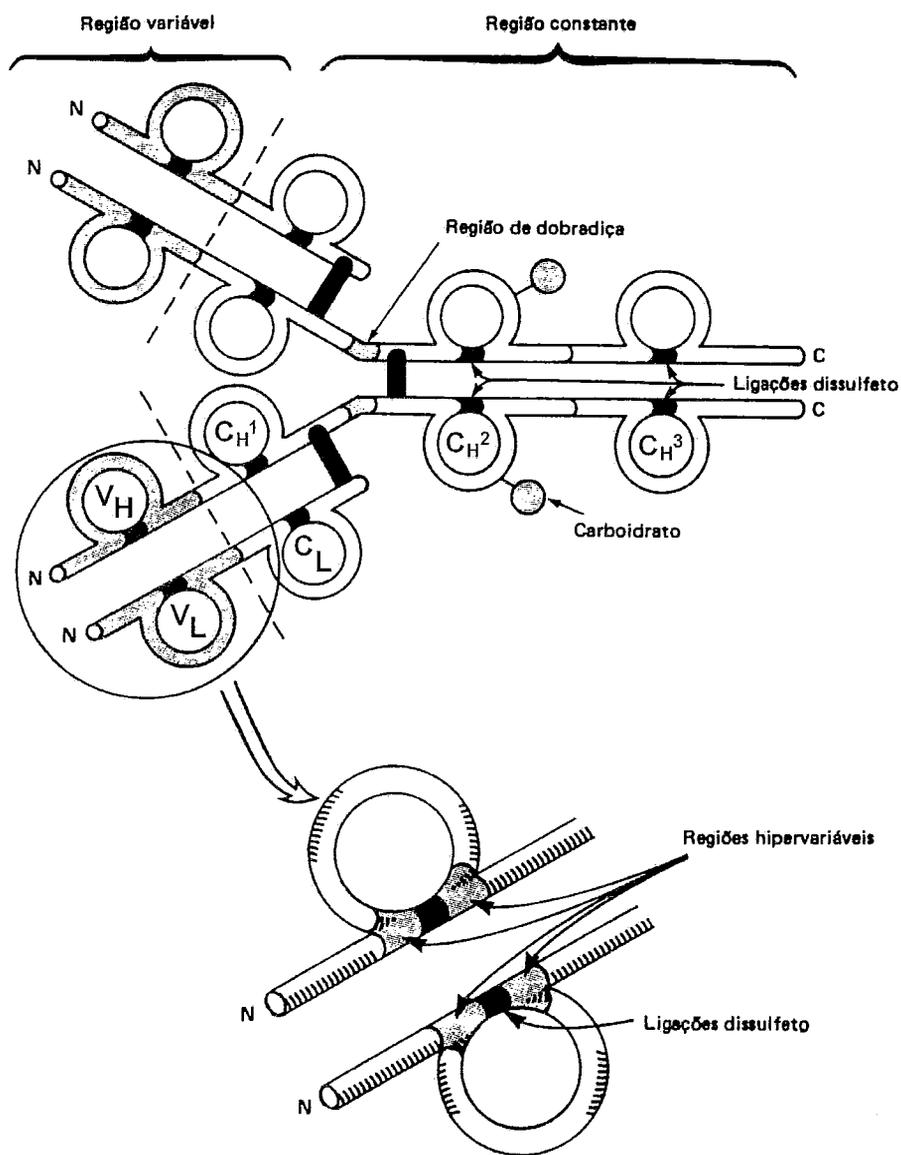


Figura 2.14: O anticorpo (adaptado de [37]).

2.10.3 Região de Dobradilha

Como pode ser visto no esquema da figura 2.14, existe uma região no anticorpo que permite que os braços do Y ⁷ de uma IgG se dobrem e girem livremente em torno do centro da molécula. Esta flexibilidade favorece a união dos braços do Y contra sítios de ligação de uma molécula de antígeno separados por distâncias diferentes.

2.10.4 Regiões Constantes

São formadas pela metade C-terminal de cada cadeia leve e dos três quartos finais de cada cadeia pesada [37]. A porção constante da cadeia leve é denominada C_L . A cadeia pesada é dividida em três subunidades similares, ou regiões homólogas C_H^1 , C_H^2 e C_H^3 tomando como base IgG ⁸.

Região C_L

As cadeias leves são divididas em dois grupos κ e λ . Esta divisão se dá com base na antigenicidade e na seqüência de aminoácidos. As duas cadeias leves de uma imunoglobulina devem pertencer ao mesmo grupo.

Região C_H

A ativação dos mecanismos efetores fica a cargo da região constante. Certos sítios existentes na região constante das cadeias pesadas medeiam a ativação do complemento e a formação de imunocomplexos como preparação para ingestão por células fagocitárias [37].

⁷Regiões Fab.

⁸IgM e IgE possuem uma quarta região C_H^4 .

2.11 A Geração da Diversidade dos Anticorpos

Antes da descoberta do mecanismo gerador da diversidade dos anticorpos, havia duas hipóteses principais para explicar a origem dessa multiplicidade. A teoria da linhagem germinal propunha a existência de um gene distinto para cada cadeia diferente de anticorpo e esse repertório seria transmitido por herança para as gerações subsequentes. Em contrapartida, as teorias da diversificação somática acreditavam na existência de um número limitado de genes codificadores das regiões V que seriam herdados e a diversidade decorreria de mutações desses genes nas células B.

Hoje se sabe que essas teorias estão ambas parcialmente corretas. O repertório de anticorpos é gerado durante o desenvolvimento das células B por rearranjos do DNA. Estes rearranjos combinam diferentes segmentos gênicos da região V [20]. Outro fator que potencializa essa diversidade são as hipermutações somáticas que ocorrem nos linfócitos B ativados.

2.11.1 A Diversidade na Região V

A região V é codificada pelo rearranjo de mais de um segmento gênico. Dentro da cadeia leve, a porção variável requer dois segmentos distintos de DNA para a sua codificação. O primeiro segmento, denominado segmento gênico V codifica a maior parte do domínio variável, que compreende os primeiros 95-101 aminoácidos da cadeia leve. O segundo segmento codifica a região de junção, que corresponde ao restante do domínio V constituído de até 13 aminoácidos. Esse último segmento é denominado junção ou segmento gênico J [20]. A junção desses dois segmentos forma um fragmento de DNA capaz de codificar todo o domínio variável da cadeia leve.

Em uma célula B não ativada, as seqüências de DNA codificadoras da região V ficam espacialmente separadas por uma distância considerável daqueles genes codificadores da região C. Quando os linfócitos B amadurecem, ocorre um fenômeno conhecido como recombinação somática, que rearranja os genes das imunoglobulinas fazendo com que eles fiquem próximos. Antes do rearranjo, os segmentos J se lo-

calizam próximos aos segmentos gênicos da região C. A união dos segmentos V aos J aproxima V e C. O segmento J de uma região V rearranjada fica então separado da região C por apenas um pedaço de DNA não codificante (*íntron*). O RNA mensageiro da cadeia leve completa é obtido através do processamento do RNA transcrito. Este processamento une os genes codificadores das porções constantes e variáveis da cadeia leve. O procedimento completo descrito, desde o rearranjo até a formação da cadeia peptídica final pode ser visto na figura 2.15, quadro à esquerda.

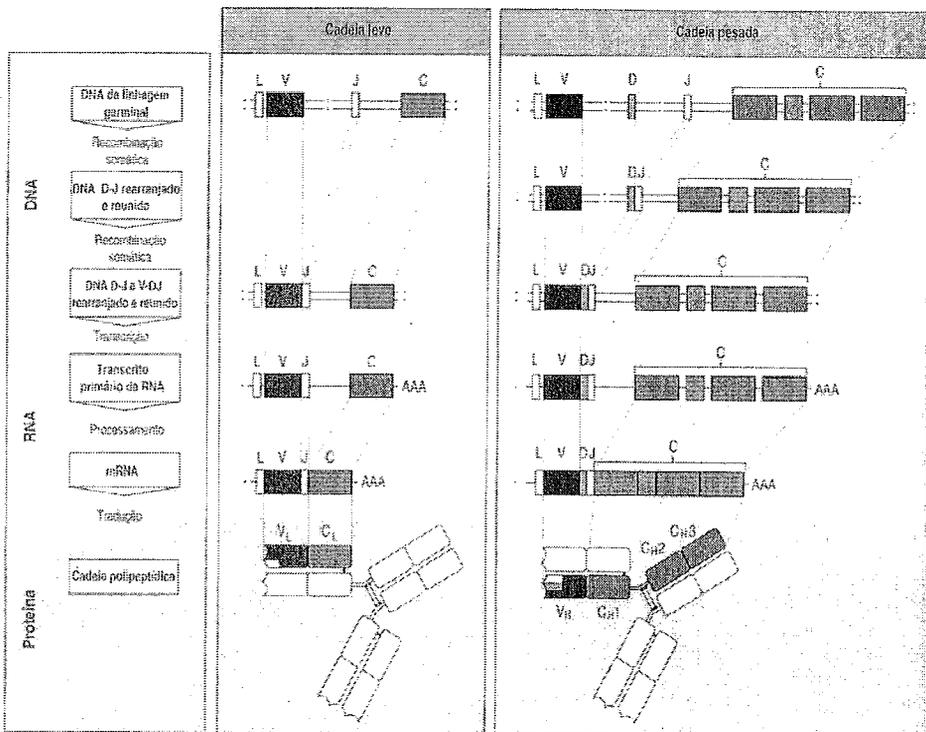


Figura 2.15: A geração da diversidade das regiões V do anticorpo (adaptado de [20]).

A cadeia pesada é codificada por três segmentos gênicos V_H , J_H e D_H ⁹. O segmento novo D_H , conhecido como segmento gênico de diversidade fica localizado entre os segmentos V_H e J_H . A recombinação somática que produz regiões V da cadeia pesada ocorre em duas etapas. Na primeira, D_H é reunido a J_H seguido pelo rearranjo que une V_H ao combinado D_HJ_H . Novamente, o processamento do RNA junta as seqüências das regiões V e C, como pode ser visto na figura 2.15, quadro à

⁹A designação dos segmentos V, D e J vem acompanhada da letra H - do inglês *heavy* - para deixar explícita a distinção entre os segmentos codificadores da cadeia leve e pesada.

direita.

Os Segmentos Gênicos da Região V

Existem múltiplas variações dentro de cada segmento gênico V, D, J e C, o que proporciona uma maior diversidade na seleção aleatória de cada integrante codificador das regiões V da imunoglobulina. Os segmentos gênicos são organizados em três grupos. São os genes de cadeias leves κ e λ e de cadeias pesadas H. Os grupos possuem organizações internas diferentes e se localizam em cromossomos distintos, como mostrado no quadro da figura 2.16. A peculiaridade de cada grupo com relação à ordem interna está relacionada à disposição dos segmentos V, D, J, e C. A distribuição dos segmentos dentro de cada grupo está ilustrada na figura 2.17. É possível observar na mesma figura que há pedaços de genes entre os segmentos codificadores da região V. Estes fragmentos representam segmentos não funcionais, conhecidos como pseudogenes e cuja recombinação gera codificadores inválidos.

Número de segmentos gênicos funcionais nos loci de imunoglobina humana			
Segmento	Cadeias leves		Cadeia pesada
	κ	λ	H
Variável (V)	40	30	65
Diversidade (D)	0	0	27
Junção (J)	5	4	6

Figura 2.16: Organização dos segmentos gênicos de cadeias leve e pesada dentro dos grupos λ (cromossomo 22), κ (cromossomo 2) e H (cromossomo 14) em humanos (adaptado de [20]).

Há uma divisão dos segmentos gênicos V humanos em famílias. Membros da mesma família devem possuir obrigatoriamente um mínimo de 80% de semelhança entre si. Os segmentos VH e V_{κ} pertencem a sete famílias distintas e os segmentos V_{λ} a oito. Dentro de cada família pode ainda haver uma divisão em clãs. Nos

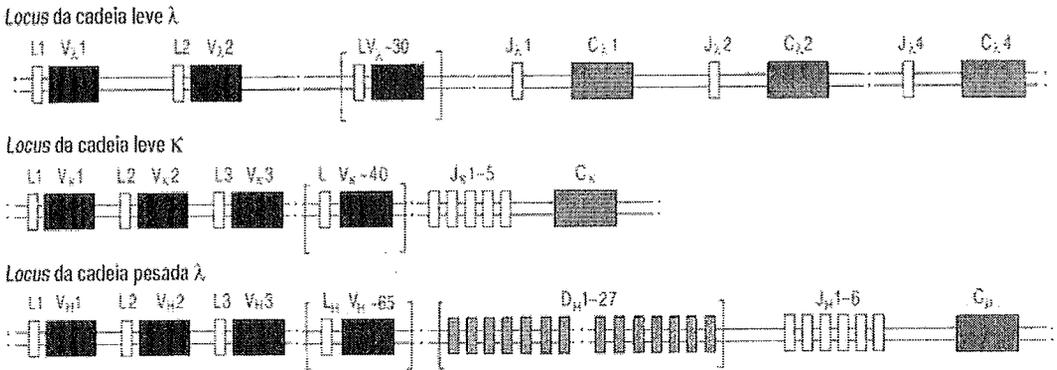


Figura 2.17: Disposição dos segmentos gênicos de cadeias leves e pesadas em humanos (adaptado de [20]).

humanos, os segmentos VH se inserem em três clãs.

2.11.2 Processos Geradores da Diversidade dos Anticorpos

Há quatro mecanismos de geração da diversidade dos anticorpos. O primeiro já foi discutido anteriormente e decorre do processo de recombinação somática. Envolve a multiplicidade de segmentos gênicos da região V e o número grande de combinações que podem ser utilizadas nos rearranjos. O segundo mecanismo, denominado diversidade juncional, é conseqüência da adição e subtração de nucleotídeos nas junções entre os diferentes segmentos gênicos durante o processo de recombinação. Em seguida têm-se as muitas possibilidades de combinação entre as cadeias leve e pesada para obtenção da molécula completa do anticorpo. Finalmente, já nos linfócitos B maduros, ocorre a hipermutação somática, que introduz mutações nos genes de regiões V rearranjados [20].

2.11.3 Hipermutações Somáticas

As hipermutações, além de serem um mecanismo gerador de diversidade na população de anticorpos, são responsáveis também pelo refinamento da afinidade do anticorpo com relação ao seu antígeno específico. Elas operam sobre células B maduras localizadas nos órgãos linfóides secundários. Sua função é introduzir mu-

tações pontuais nas regiões V dos genes rearranjados que codificam as cadeias leves e pesadas, em uma taxa muito elevada [20].

O objetivo desse mecanismo é produzir imunoglobulinas mutantes na superfície das células B, a fim de que algumas dessas variações resultem em anticorpos de maior conformidade físico-química contra o antígeno quando comparados à imunoglobulina original. Aqueles linfócitos capazes de produzir imunoglobulinas com poder de neutralização superior tendem a ser privilegiados no processo de escolha das células B que irão se diferenciar em plasmócitos. Este fenômeno de seleção dos melhores anticorpos é chamado maturação de afinidade.

Mecanismo Regulador das Hipermutações Somáticas

As hipermutações somáticas ocorrem nos centros germinativos, que são locais que proporcionam um ambiente facilitador da maturação da afinidade das células B. Supõe-se que as hipermutações ocorram aleatoriamente ao longo de toda a região V, apesar de haver certos pontos com maior tendência às mutações. Dado esse caráter aleatório, há a possibilidade de ocorrer modificação em alguns dos 600-700 pares de bases disponíveis nas regiões V. A probabilidade de haver hipermutação é de 1×10^{-3} por par-base das regiões variáveis, o que equivale a dizer que, em média, é introduzida uma mutação a cada divisão celular. Ocorre que, a maioria das alterações produzidas nesses genes das células B geraria imunoglobulinas de baixa-afinidade, inválidas ou auto-reativas. A questão levantada em [29] está em entender como um número relativamente limitado de hipermutações produtoras de alta afinidade pode ainda assim sobreviver com tanta frequência dentro do organismo.

Para responder a esta questão, Perelson e Oprea [29] desenvolveram um modelo de expansão das células B e mutação somática que mostra que a reciclagem frequente de centrócitos ¹⁰ antígeno-selecionados em centroblastos ¹¹ pode levar a uma matura-

¹⁰Centrócitos são pequenas células B, não proliferantes nos centros germinativos, que derivam dos centroblastos. Eles amadurecem em células plasmáticas formadoras de anticorpos, células B de memória ou ainda podem sofrer apoptose, dependendo da inter-relação de seu receptor com o antígeno [20].

¹¹Centroblastos são células grandes, em rápida divisão, encontradas nos centros germinativos, nas quais se acredita ocorrer a hipermutação somática. Os plasmócitos e as células B de memória

ração de afinidade eficiente. O modelo sugere uma reação no centro germinativo na qual a saída das células é reduzida a uma dissociação do centro germinativo, seguida pela liberação de centrócitos na sua periferia. Isto seria vantajoso para a geração de memória de alta afinidade. Outros modelos que tentam explicar o sucesso do processo de maturação da afinidade podem ser vistos em [36, 28].

Um outro ponto ainda não esclarecido está em como preservar as boas combinações de genes havendo uma probabilidade de mutação tão alta. Uma célula portadora de combinação de alta afinidade antigênica, ao longo de sua reprodução, sob a mesma taxa de mutação, pode ter sua afinidade destruída pelo acúmulo de novas mutações indesejadas. Dessa forma, acredita-se que o processo de hipermutação somática seja constituído por um curto pico de mutação, seguido de um período de intervalo para a seleção e expansão clonal. A seleção deve regular o processo de hipermutação para preservar as células de alta afinidade e permitir que células de baixa afinidade permaneçam sendo mutadas [23, 24].

2.12 A Geração de Diversidade dos TCR

Como pode ser visto na figura 2.18, a geração da diversidade dos TCR é muito semelhante à das imunoglobulinas. As cadeias α contêm segmentos gênicos V_α e J_α . Os genes da cadeia β têm segmentos V_β , D_β e J_β . O rearranjo dos genes que codificam os receptores dos linfócitos T ocorre no timo.

A principal diferença entre os genes codificadores dos TCR e das imunoglobulinas está na complexidade dos genes das regiões constantes. As imunoglobulinas, além de se ligarem a antígenos, ativam mecanismos efetores através dos isótipos das regiões constantes. Como os TCR não medeiam diretamente as funções efetoras das células T, os genes codificadores das regiões constantes são mais simples do que aqueles das imunoglobulinas.

derivam dessas células [20].

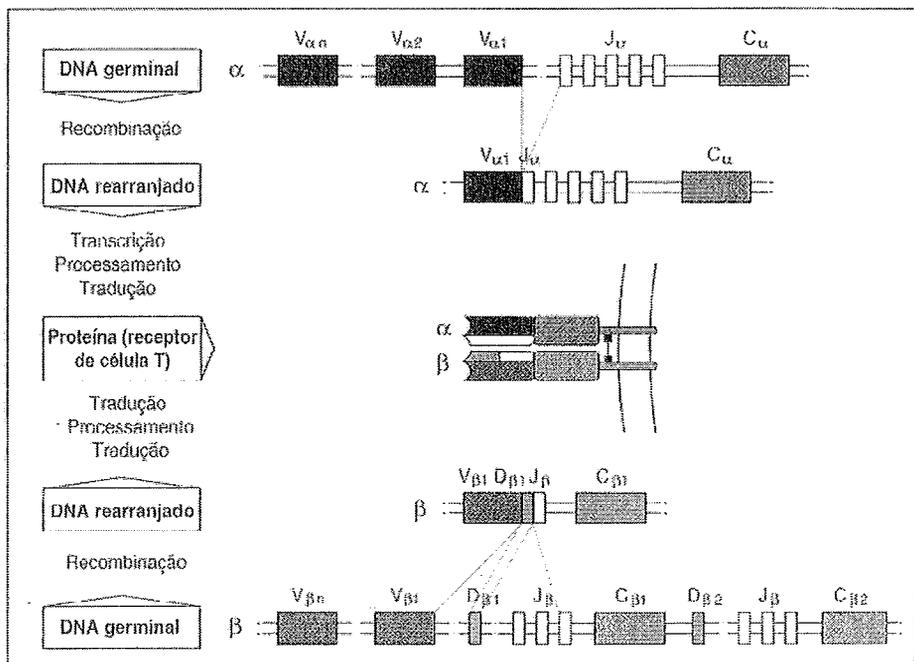


Figura 2.18: Geração da diversidade dos TCR (adaptado de [20]).

2.13 Distinção Próprio/Não Próprio

O repertório de linfócitos presente no organismo é amplo o suficiente para reconhecer todos os possíveis invasores que apareçam ao longo de sua existência. A especificidade dos linfócitos é determinada nas primeiras etapas de sua diferenciação, quando o RNA mensageiro codificador dos receptores das células B e T é montado a partir de segmentos gênicos rearranjados. Dado potencial criador dos rearranjos gênicos, associado a outros fatores que geram diversidade, é possível admitir três classes de repertórios celulares [10]. O *repertório potencial* representa tudo que pode ser gerado pelos mecanismos de expressão genética associados às variações obtidas pelas mutações. O *repertório expresso* engloba moléculas disponíveis para tornarem-se receptores e o *repertório ativo* são os linfócitos que participam nas respostas imunes.

Em uma fase seguinte à expressão do receptor antigênico na superfície do linfócito, há uma avaliação que verifica as propriedades de reconhecimento antigênico da célula com relação às moléculas do ambiente. Os resultados desse teste de es-

pecificidade e afinidade do receptor determinam se o linfócito está apto a sobreviver ou se deve ser eliminado.

Em geral, linfócitos em desenvolvimento que interagem fracamente com antígenos próprios recebem sinais de sobrevivência. A escolha dos linfócitos que permanecerão vivos é chamada seleção positiva. Particularmente para as células T, a seleção positiva escolhe aquelas cujos receptores são capazes de reconhecer e se ligar a moléculas de MHC-próprio [10], o que constitui uma premissa para que uma célula T seja capaz de armar uma resposta contra um antígeno. A seleção positiva nas células B maduras ocorre após a hipermutação, quando a célula filha mutante é mais eficiente na neutralização do anticorpo e é preferida para expansão. Produtos ineficientes da hipermutação sofrem apoptose, que é a morte celular programada.

Linfócitos de alta reatividade com antígenos próprios são sinalizados para morte, o que caracteriza a seleção negativa. Desta forma, linfócitos auto-agressivos são removidos do repertório antes de amadurecerem e desencadearem reações auto-imunes. Esta seleção estabelece a tolerância imunológica para auto-antígenos.

A sobrevivência dos linfócitos para a fase de ativação é condicionada a sinais enviados para os seus receptores. Aqueles que não receberem esses sinais são programados para a morte. A maior parte das combinações dos genes codificadores gera linfócitos auto-reativos, desta forma, somente uma pequena parcela de linfócitos estão destinados a amadurecer e compor o repertório linfocitário do sistema adaptativo. Ainda assim, esta pequena fração restante é capaz de responder, em termos práticos, a qualquer antígeno apresentado.

2.14 A Teoria da Seleção Clonal

A teoria da Seleção Clonal [5] conjecturou que o antígeno, ao penetrar no corpo do hospedeiro, recrutaria um subconjunto de linfócitos capazes de reconhecê-lo. Linfócitos com maior reatividade com o antígeno seriam selecionados para expansão em clones em detrimento daqueles com menor capacidade de neutralização. Cada clone seria portador de um único tipo de receptor que não estaria presente em

nenhum outro clone.

Uma das contribuições mais importantes dessa teoria foi a profetização, em 1957, de que clones auto-reativos deveriam ser destruídos durante a seleção [34]. Esta foi a primeira vez que o paradigma da distinção entre o que é próprio e o que é estranho foi mencionado na Imunologia. Em [39], há um ensaio muito interessante contextualizando a teoria burnetiana hoje, seus erros e acertos, o porquê de ainda ser adotada e como seria uma nova teoria para substituí-la.

Partindo da idéia da deleção de clones de células que agrediriam o próprio organismo, Burnet bloqueou qualquer possibilidade de reações auto-imunes e interações dos linfócitos entre si e com elementos do que é próprio. Hoje em dia, sabe-se que há doenças auto-imunes e que os linfócitos B e T comunicam entre si. Os linfócitos T precisam do MHC para reconhecerem o antígeno. Por isso, são auto-reativos. A questão levantada em [39] foi como, mesmo com tantos exemplos contrários o modelo se mantém firme, orientando a pesquisa e o ensino da imunologia. A resposta dada foi que essa teoria inseriu a Imunologia no Neodarwinismo, sugerindo os princípios de seleção natural e casualidade [7]. Desta forma, rejeitar a teoria de Burnet seria negar a teoria evolutiva dominante na biologia. Vaz [39] acredita na sedimentação de uma teoria mais moderna como consequência de novas descobertas envolvendo a organização global do SI auxiliadas por pesquisas interdisciplinares.

2.15 A Arquitetura do SI e o Sistema Global de Defesa

A união de todos os componentes descritos nas seções anteriores constitui o sistema global de defesa dos mamíferos contra patógenos. Observando o SI já como um todo, é possível distinguir em sua arquitetura um esquema de múltiplas camadas contendo mecanismos defensivos e reguladores espalhados por todo seu domínio [10].

A camada que constitui a primeira linha global de defesa do organismo, as *barreiras físicas*, é formada por órgãos e sistemas que terão o primeiro contato com o

antígeno. Sua função é impedir que o antígeno penetre o interior do organismo. É composta pela pele, que trabalha como um escudo protetor contra qualquer invasor; pelo sistema respiratório, onde há apreensão de partículas através dos pêlos, mucosas nasais e ativação de mecanismos de tosse e espirro; e pelas mucosas do trato digestivo.

Em seguida, é possível identificar *barreiras bioquímicas*, como a saliva, suco gástrico, lágrima, pH e temperatura corporais que ajudam a eliminar e proporcionar um ambiente desfavorável para o estabelecimento dos antígenos no hospedeiro. As duas camadas seguintes são representadas pelas partes inata e adaptativa do SI.

As APCs do sistema inato percorrem o organismo a procura de patógenos que porventura tenham conseguido superar barreiras físicas e bioquímicas do organismo. Quando um antígeno é detectado, a APC o fagocita e digere em peptídeos. Parte desses peptídeos se liga a proteínas do MHC, formando um complexo MHC/peptídeo que se dirige para a superfície da membrana da APC. A APC migra para os órgãos linfóides secundários e apresenta esse complexo MHC/peptídeo aos linfócitos T. Aqueles linfócitos cujos receptores forem capazes de reconhecer a combinação exibida se tornam ativados, proliferam e secretam linfocinas capazes de mobilizarem outros elementos do sistema imune, dentre os quais estão os linfócitos B. As células B ativadas se expandem em clones de plasmócitos que secretarão anticorpos contra o antígeno. Os anticorpos secretados têm tanto a função de neutralizar o antígeno como ativar mecanismos efetores responsáveis pela eliminação desse agente agressor. Algumas células B e T, durante a sua expansão, transformam-se em células de memória capazes de potencializar a reação imune frente a uma segunda invasão desse patógeno. Em certos casos, os linfócitos B são capazes de reconhecer o antígeno sem a necessidade das linfocinas liberadas pelas células T.

2.16 Modelos do Sistema Imunológico

2.16.1 A Teoria das Redes Idiotípicas

Em sua teoria, Jerne [21] partiu da premissa de que dentro do sistema imune de um indivíduo, qualquer idiótopo dos anticorpos pode ser reconhecido por um conjunto de parátomos, e qualquer parátomo pode reconhecer um conjunto de idiótopos. Havendo repertórios suficientemente grandes de parátomos e idiótopos, o sistema imune pode ser visto como uma rede. Haverá sempre parátomos que reconhecem grupos de idiótopos, e idiótopos reconhecidos por conjuntos de parátomos. Quando um antígeno penetra no organismo do indivíduo, ele passa a fazer parte da rede. Outros modelos baseados nesta idéia, como o Modelo B e Shape Space podem ser vistos em [31, 2].

2.16.2 Modelos Evolucionários em SI

Em [12], Forrest e Perelson propuseram um modelo de SI foi desenvolvido utilizando antígenos e anticorpos representados por strings binárias. Tinha como objetivo estudar reconhecimento de padrões em indivíduos e espécie. Para isto, anticorpos e antígenos eram inicializados aleatoriamente. Um algoritmo genético (AG) ficaria responsável por determinar quais anticorpos seriam úteis ao SI. A avaliação dos anticorpos era dada segundo uma função que determina a sua capacidade de ligação contra os antígenos. Identificando populações de antígenos contendo segmentos binários em comum, a meta do modelo era obter um anticorpo capaz de reconhecer padrões existente na população de patógenos.

Um aprimoramento deste modelo, descrito em [16] por Forrest, Perelson e Hightower, introduziu o conceito de bibliotecas genéticas para gerar anticorpos. Foram utilizadas quatro bibliotecas compostas por oito elementos de 16 bits. Um segmento de cada biblioteca era escolhido aleatoriamente, e sua junção com os outros três determinava o anticorpo. A aptidão do anticorpo foi definida como sua capacidade geral de reconhecer antígenos.

Em um terceiro trabalho [27] de Oprea e Forrest, cada indivíduo era constituído de uma biblioteca de A anticorpos de tamanho L bits. Os antígenos possuíam igualmente cromossomo de tamanho L . Para cada patógeno, o anticorpo responsável pela sua neutralização era aquele com maior energia de ligação. No AG utilizado, foi construída uma população inicial aleatória de 50 bibliotecas de mesmo tamanho. Cada biblioteca representava um anticorpo. Para produzir uma geração seguinte, a seleção era feita por *rank* e o esquema de substituição geracional. A avaliação do indivíduo era dada pela energia de ligação entre o patógeno e o anticorpo, definida por uma curva de Gauss.

2.17 SI e Complexidade

Segundo a teoria de sistemas [9], podemos definir um sistema complexo como aquele onde seus indivíduos coletivamente apresentam características e comportamentos diferentes dos apresentados quando somente um integrante do sistema é analisado individualmente. Isto significa que a dinâmica de um sistema complexo emerge das diversas interações entre as suas partes e do papel que cada uma desempenha para uma resposta coletiva e manutenção da estabilidade do conjunto. O Sistema Imune é um exemplo de sistema complexo, onde, observando cada um de seus integrantes, é impossível ter idéia da dimensão da sua atuação dentro do organismo. A ação cooperativa dos subsistemas inato e adaptativo é o que lhe confere a capacidade de proteger um indivíduo das agressões externas.

O interessante de analisar o SI sob o ponto de vista sistêmico está na possibilidade de enquadrá-lo em categorias e identificar semelhanças a sistemas já analisados, na tentativa de extrair mais informação sobre o seu funcionamento. Sabe-se que, pelo fato do SI ser capaz de interagir com outros sistemas dentro do organismo e com agentes invasores, sob o ponto de vista das fronteiras, ele pode ser classificado como um sistema aberto.

A reinfestação do organismo por um antígeno obtém uma segunda resposta imunológica mais rápida e eficiente contra esse patógeno. A filtragem da linfa ao

passar pelos linfonodos tem sua eficácia condicionada ao número de macrófagos presentes no momento, fato que determina respostas imunes com intensidades diferentes, dependendo da disposição e estado geral dos integrantes do SI. Os linfócitos, de uma forma genérica, são antígeno-específicos e estão presentes em quase todos os sistemas do organismo. Estes são exemplos que conferem ao SI um caráter não-linear, ou seja, a resposta de cada elemento do sistema nem sempre é proporcional ao estímulo que o mesmo recebe do meio ou de outro elemento. O fato das respostas imunes não partirem ou serem controladas por um elemento central destaca no SI a qualidade de ser espacialmente distribuído.

O SI também é classificado como dinâmico, probabilístico e auto-organizável. É dinâmico porque evolui com o tempo e tem a capacidade de muitas vezes se adaptar a novas circunstâncias. A questão da diversidade dos anticorpos e dos receptores das células T, juntamente com as mutações somáticas, são responsáveis pelo seu caráter aleatório.

Auto-organização é o processo no qual a ordem do sistema aumenta gradativamente por meio da ajuda mútua entre seus elementos. Esta cooperação surge da necessidade de uma resposta a estímulos externos ou para satisfazer propriedades naturais de seus elementos. Muitas vezes, para que se estabeleça uma ordem satisfatória do sistema dentro de um certo contexto, é necessário que algumas partes do sistema não funcionem, ou percam parcialmente suas funções, para que outras possam desempenhar seu papel mais adequadamente. Nota-se, portanto, que é possível haver no sistema estágios de cooperação e competição entre os indivíduos, objetivando a evolução do sistema global.

Essas três últimas características serviram como motivação para a elaboração das simulações que deram origem aos modelos evolucionários do presente trabalho. Aqui, é estudada a dinâmica coevolucionária existente entre famílias de anticorpos codificadas por genes de uma espécie e o conjunto de antígenos apresentado a essa espécie, ao longo do seu processo evolutivo. A meta é tentar entender e descobrir, através destes modelos artificiais, pistas de como pode ter se dado a evolução das bibliotecas genéticas responsáveis pela diversidade e capacidade de reconhecimento

do SI dos mamíferos. Um outro ponto observado é como estas bibliotecas convergiram para um mecanismo capaz de gerar combinações aleatórias que resolvem o problema de cobertura dos antígenos e realizam a distinção próprio/não-próprio.

Capítulo 3

Algoritmos Genéticos

3.1 Algoritmos Genéticos

Os Algoritmos Genéticos (AGs) são técnicas de otimização e busca fundamentadas na teoria da “Seleção Natural” dos seres vivos, concebida por Charles Darwin [7]. Foram introduzidos em 1975 por John Holland [19] e difundidos por David Goldberg [13].

Diferentemente dos métodos tradicionais de busca pela solução ótima, os AGs apresentam certas peculiaridades que lhe conferem a possibilidade de explorar espaços de busca mais complexos de forma elegante e robusta:

1. trabalham com uma codificação das possíveis soluções (genótipos) e não com as próprias soluções (fenótipos);
2. manipulam um conjunto (população) de soluções candidatas simultaneamente;
3. utilizam informações de custo e recompensa e não requerem derivadas de funções, por exemplo;
4. empregam regras de transição probabilísticas.

Segundo a terminologia dos AGs, cada solução candidata é denominada indivíduo. Os indivíduos são compostos, basicamente, por um cromossomo – que é a

codificação de uma possível solução – e um valor de aptidão que determina sua qualidade dentro da população.

Apesar do seu caráter probabilístico, os AGs não se direcionam para uma solução ótima de forma desordenada, pois, ao decorrer de suas iterações (gerações), armazenam informações históricas para definição de novos pontos dentro do espaço de busca a serem explorados. É também durante cada geração que são aplicados os princípios de seleção e reprodução dos indivíduos. Desta forma, espera-se que seja possível a obtenção de soluções ótimas (ou aproximações destas soluções) ao longo de um determinado número de gerações do AG [4].

Os AGs nem sempre garantem a otimalidade de uma solução. Mas são capazes, na maioria dos casos, de encontrar soluções próximas do ótimo em tempo hábil. Esquemáticamente, um AG genérico poderia ser definido conforme a figura 3.1.

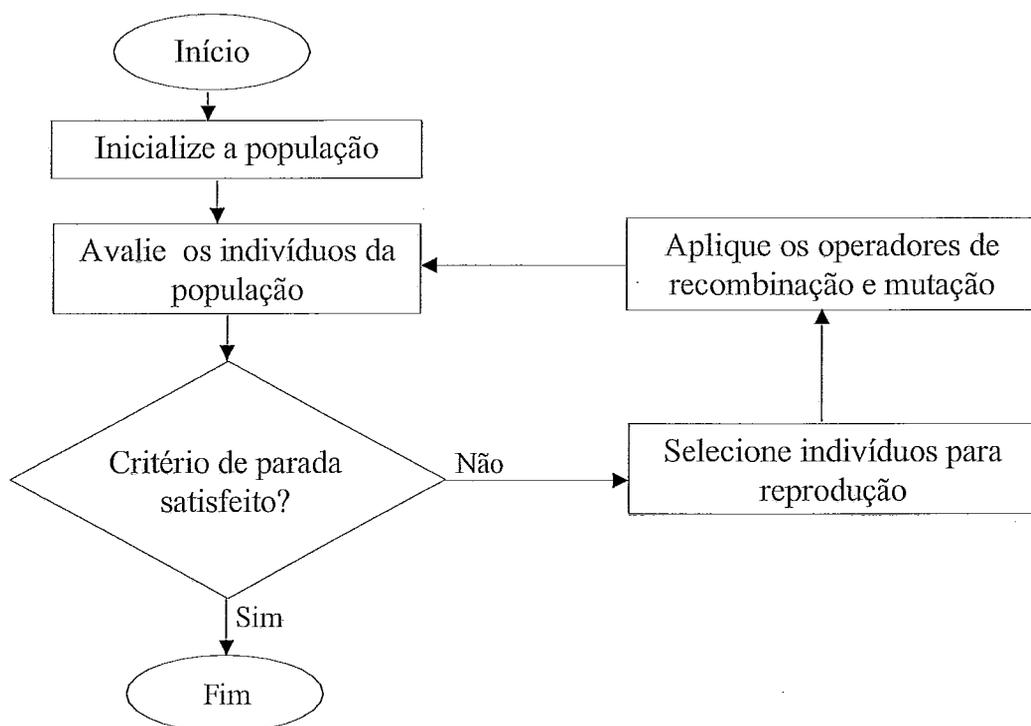


Figura 3.1: Esquema de um AG genérico

Após a definição de uma codificação apropriada para a representação das soluções, são atribuídos valores iniciais aos indivíduos que serão manipulados pelos opera-

dores genéticos. A cada geração, os indivíduos são avaliados segundo uma função de aptidão, e lhes é atribuída uma nota que define o seu grau de adaptabilidade dentro do ambiente proposto. Uma parcela dos melhores indivíduos é mantida para gerações futuras ou selecionada para evolução (Darwinismo), ao passo que aqueles “mal adaptados” são descartados.

Apesar de sua estrutura ser bastante simples do ponto de vista biológico, os AGs são ferramentas muito poderosas que fornecem mecanismos de buscas adaptativas [13].

As seções seguintes mostram com mais detalhes cada uma das etapas dos AGs descritas na figura 3.1.

3.1.1 Representação e Codificação

Um ponto importante a ser observado quando um AG é utilizado na resolução de um problema é a forma como se dará a representação das possíveis soluções, ou seja, qual a estrutura de dados será utilizada para compor o cromossomo. Através de uma boa codificação garante-se que os algoritmos atuarão de forma adequada.

Dentro da terminologia da genética, estas codificações/representações que serão manipuladas pelos AGs são chamadas genótipos. Às soluções propriamente ditas (ou genótipos decodificados) dá-se o nome de fenótipos.

A forma mais comum de codificação consiste em uma cadeia binária de comprimento L em que cada elemento denotaria (0) a ausência, ou (1) a presença de uma determinada característica. Desta forma, se L assumir o valor 10, tem-se $2^{10} = 1024$ possíveis representações para soluções candidatas, o que constitui o espaço de busca a ser explorado pelo AG.

Esta codificação se tornou popular por ser simples e abrangente. Através de uma cadeia binária é possível a representação de diversos tipos diferentes de fenótipos, tais como valores inteiros e reais, matrizes, grafos, árvores, entre outros. Outras formas de representação como inteira, real, etc., também são utilizadas a depender

do tipo de problema abordado.

3.1.2 Inicialização

A atribuição de valores iniciais aos cromossomos é geralmente feita de forma aleatória¹, porém, em certos casos, faz-se necessária a introdução de bons indivíduos em parte da população logo no início da resolução. Há também a possibilidade da realização de inicializações direcionadas, onde certos genes devem assumir um valor específico².

3.1.3 Seleção

Através do processo de seleção são escolhidos os indivíduos que farão parte da fase de reprodução. Esta técnica tende a privilegiar os seres mais adaptados, ou seja, os indivíduos com valores de aptidão mais altos dentro da população terão maior probabilidade de serem selecionados. Os métodos de seleção mais comuns são roleta, *rank* e torneio.

No método da roleta, cada indivíduo ocupa, em uma roleta, uma área proporcional ao seu valor de aptidão. Esta área é definida por sua aptidão relativa, segundo a equação:

$$p_i = \frac{f_i}{\sum_{j=1}^m f_j}$$

onde:

- p_i é a probabilidade de um determinado indivíduo i ser selecionado,
- f_i corresponde à nota de i , $f_i \geq 0$, e

¹Os valores de inicialização são fornecidos por uma rotina geradora de números pseudo-aleatórios.

²Este tipo de inicialização ocorre, por exemplo, na definição de cromossomos como topologias de Redes Neurais Artificiais [35] [25].

- m é o número de indivíduos da população.

Durante a geração, a roleta é “girada”, selecionando um indivíduo para reprodução. Aqueles que possuírem notas mais altas terão fatias maiores dentro da roleta e, por conseqüência, mais chances de serem escolhidos. A figura 3.2 ilustra a definição da roleta para um conjunto de indivíduos, com sua classificação de notas disposta na tabela 3.1.

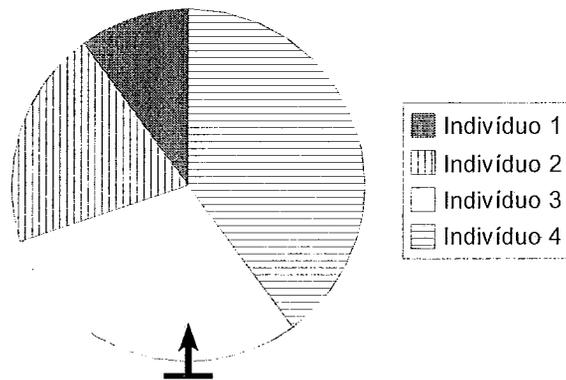


Figura 3.2: Seleção utilizando o método da roleta.

Indivíduo i	Aptidão $f(\text{Indivíduo}_i)$	Aptidão Relativa
Indivíduo 1	1	0.1
Indivíduo 2	2	0.2
Indivíduo 3	3	0.3
Indivíduo 4	4	0.4

$$\sum_{i=1}^4 f(\text{Indivíduo}_i) = 10$$

Tabela 3.1: Notas dos indivíduos de uma população juntamente com sua aptidão relativa.

Um problema que pode haver com este método é a chamada “convergência prematura”. Ocorre quando nas primeiras gerações aparece um indivíduo medíocre, porém, com aptidão relativa alta, o que faz com que ele domine a população e o AG se direcione para uma solução insatisfatória. Outra deficiência surge em momentos onde a função de avaliação atribui valores muito próximos aos indivíduos, tornando suas fatias dentro da roleta aproximadamente iguais. Isto pode ocorrer mais ao final

do processo evolutivo, quando as f_i se assemelham e há perda de pressão seletiva, o que causa uma estagnação na busca. Desta forma, não se tem a garantia de que os mais aptos serão escolhidos. Uma técnica utilizada para resolver estes problemas é a seleção por *ranking*.

Na técnica de *ranking*, os indivíduos são selecionados segundo sua posição relativa (“ou *rank*”) dentro da população. Esta posição é dada de acordo com uma ordem decrescente de valores de aptidão, ou seja, cada indivíduo possui uma probabilidade de ser sorteado definida pelo seu índice no *rank* de todas as notas³. Assim, o indivíduo com mais chances de ser escolhido é aquele que ocupa a primeira posição no *ranking*.

Outro método utilizado é a seleção por torneio, onde são sorteados, com probabilidades iguais, n indivíduos e é escolhido aquele com o maior valor de aptidão.

Existem casos onde nem sempre é vantajoso privilegiar indivíduos mais aptos. Certos esquemas de seleção atuam de forma a sempre manter uma diversidade populacional; outros tendem a eliminar valores extremos de aptidão. A escolha do critério de seleção, assim como ocorre com o tipo de codificação, dependerá da aplicação e objetivos do problema.

3.1.4 Operadores de Recombinação

Após selecionados, os indivíduos passam para a etapa de reprodução, onde seus genes são combinados ou alterados por operadores genéticos, dando origem a uma nova população. Estes operadores constituem os principais mecanismos dos quais os AGs dispõem para a exploração de regiões desconhecidas do espaço de busca. Basicamente, os operadores de recombinação utilizados são os chamados *crossovers*.

Os *crossovers* são os responsáveis pela recombinação das características genéticas dos pais durante a reprodução, dando origem a descendentes que preservarão parte das propriedades de seus genitores. As formas mais comuns de utilização deste operador são:

³A probabilidade relativa entre as posições no *rank* se mantém fixa durante toda a evolução.

- *crossover* de um ponto;
- *crossover* multiponto;
- *crossover* uniforme.

No *crossover* de um ponto, um valor aleatório compreendido no intervalo $[0, L]$, onde L é o comprimento do cromossomo, é sorteado definindo um ponto de cruzamento. Os valores do cromossomo de um pai localizados à direita deste ponto serão herdados pelo primeiro filho enquanto a segunda fração à esquerda é designada ao outro filho. A figura 3.3 ilustra a atuação deste operador.

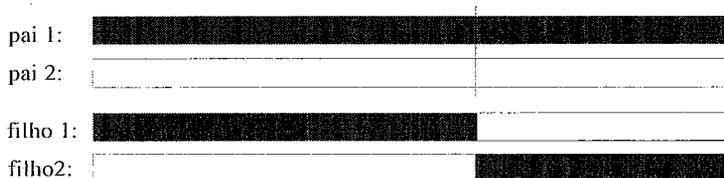


Figura 3.3: *Crossover* de um ponto.

Uma generalização deste método é o *crossover* multiponto, no qual mais de um ponto de corte é sorteado para as combinações genéticas. Esta forma de recombinação é mostrada na figura 3.4⁴.

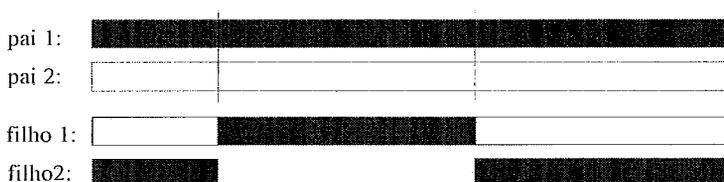


Figura 3.4: *Crossover* multiponto com dois pontos de corte.

O *crossover* uniforme consiste na definição de uma “máscara” de bits de tamanho igual ao do cromossomo. Esta máscara é gerada aleatoriamente, segundo uma determinada taxa de ocorrência do bit 1. A forma como se dão as trocas de material genético podem ser observadas na figura 3.5.

⁴O *Crossover* da figura 3.4 é bastante utilizado, sendo mais comumente denominado *crossover* de dois pontos.

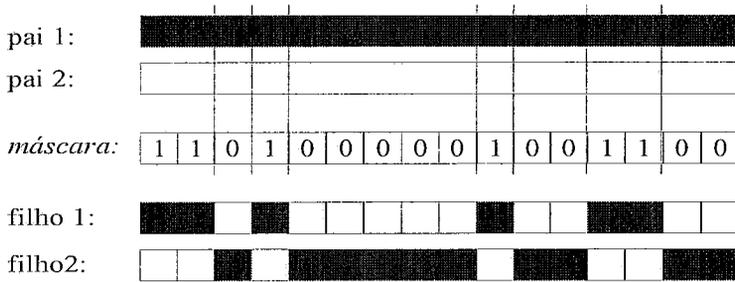


Figura 3.5: *Crossover* uniforme.

Ao primeiro filho gerado são designados os valores do primeiro pai nas posições equivalentes, somente onde a máscara possuir o valor 1. Nos locais da máscara de valor 0, atribui-se a este filho o material do segundo pai. O mesmo procedimento é adotado para o segundo filho, invertendo-se a associação dos bits da máscara aos pais.

3.1.5 Operadores de Mutação

Apesar de exercerem um papel secundário nos AGs, as mutações aumentam a diversidade genética da população e evitam que o algoritmo se afunile para pontos de máximo ou mínimo locais. Diferentemente dos operadores de recombinação, a mutação ocorre sobre apenas um indivíduo de cada vez, atuando de maneira a provocar pequenas perturbações no genótipo que irão se refletir no fenótipo.

Existem inúmeras maneiras de se implementar a mutação. As definições dos tipos de implementação que serão utilizados dependem da codificação estabelecida para o AG. Um exemplo de mutação sobre codificação binária é mostrado na figura 3.6. Nesta ilustração, uma posição do cromossomo é selecionada segundo uma probabilidade de mutação e o valor do bit é invertido. O mais comum é que haja uma taxa de mutação pequena e que se percorra todos os bits do cromossomo testando a probabilidade de haver mutação. Neste caso, pode ser que haja até mais de uma mutação por cromossomo.

Outras operações genéticas unárias (envolvendo apenas um indivíduo) que po-

Exemplo: Um ponto do cromossomo é selecionado aleatoriamente e seu valor é invertido.

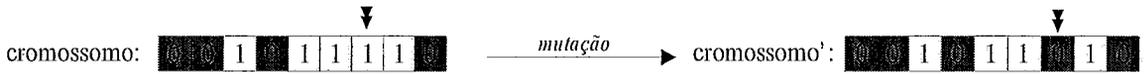


Figura 3.6: Um exemplo de mutação.

dem ser implementadas em um AG, com o nome genérico de mutação, estão ilustradas na figura 3.7⁵.

Exemplo 1: Um ponto do cromossomo é sorteado a parte contida neste ponto é suprimida.



Exemplo 2: Duas posições dentro do cromossomo são sorteadas e seus valores trocados.



Figura 3.7: Outras formas de mutação.

3.1.6 A Função de Aptidão

Para que se possa efetuar a seleção dos indivíduos, é necessário antes que eles sejam classificados segundo seu nível de adaptação dentro do ambiente proposto. Esta avaliação, feita diretamente sobre os cromossomos decodificados, é realizada pela função de aptidão que determina uma nota para cada indivíduo.

Esta nota deve ser suficiente para indicar o quão distantes estes indivíduos estão entre si e guiar a busca para soluções sempre melhores.

⁵Estes casos se aplicam a outras formas de codificação além da binária. Um exemplo seria a codificação inteira.

3.1.7 Reprodução

Com relação à maneira como os indivíduos são gerados e inseridos na população, dois tipos de AG podem ser considerados⁶: o geracional e o *steady-state*.

No primeiro, toda a população é substituída por novos indivíduos gerados. Aqui, uma técnica introduzida por DeJong [11] – elitismo – pode ser aplicada. Consiste na cópia exata dos k melhores indivíduos para a população seguinte, prevenindo que sejam eliminados pelos operadores genéticos.

Na substituição *steady-state*, apenas um indivíduo é criado de cada vez, substituindo um outro (frequentemente o pior) cromossomo da população. Esta abordagem utiliza os filhos para o *crossover* tão logo eles são gerados, podendo ocorrer “incesto”. Aqui, a idéia usual de gerações desaparece. Esta abordagem tem apresentado bons resultados [8].

3.1.8 Critério de Parada

A maioria dos algoritmos de busca, e em específico os AGs, procura uma resolução para um problema que seja satisfatória, mas que não necessariamente seja a solução ótima. Portanto, na maior parte dos casos, ter como critério de fim de execução do algoritmo a sua convergência para a melhor solução poderia acarretar em um processo infinito. Com o objetivo de se garantir, então, que a busca tenha um término, adotam-se outros critérios de parada para o AG.

O critério mais comum e mais simples consiste em definir um valor finito para o seu número de gerações/iterações, e a solução seria dada pelo melhor indivíduo presente na população produzida a partir da última iteração. Uma outra forma se baseia na observação da convergência da população para um determinado valor, ou seja, o processamento chega ao fim quando mais ou menos 90% dos indivíduos apresentarem a mesma solução (ou cromossomos iguais).

⁶Existem outros tipos de AG, porém os citados no presente trabalho são mais utilizados.

3.1.9 Parâmetros do Algoritmo

A configuração dos parâmetros de um AG pode influenciar bastante no seu comportamento, portanto, é importante estabelecê-los de forma consciente, conforme o problema e os recursos disponíveis. Segundo o trabalho apresentado em [22], os principais parâmetros e suas influências são descritos abaixo.

Tamanho da população: afeta o desempenho e eficiência do AG. Um valor pequeno para este parâmetro pode impedir a convergência do AG por limitar demais o número de pontos cobertos no espaço de busca. Já com valores maiores, este problema não ocorre. Mas em contrapartida, o consumo de recursos computacionais aumenta.

Taxa de cruzamento: é a probabilidade de ocorrência de *crossover*. Quanto maior a taxa, mais rápida a introdução de novas estruturas na população, o que nem sempre é vantajoso, pois boas combinações podem desaparecer. Este valor também não deve ser muito baixo porque pode causar estagnação na busca.

Taxa de mutação: deve assumir um valor que permita a produção de diversidade genética na população, sem destruir as características dos bons indivíduos. Geralmente este valor é da ordem de $\frac{1}{L}$, sendo L o comprimento do cromossomo.

Apesar de se ter procurado determinar números ideais para os parâmetros acima descritos, chegou-se à conclusão que isto é conseguido, na maioria das vezes, apenas de forma empírica ou através de experiências em problemas semelhantes.

3.2 Coevolução

Coevolução é a seleção recíproca entre organismos interdependentes. Segundo Darwin, as espécies vivem um constante processo de seleção natural que determinará a sua permanência ou extinção. Aqueles indivíduos mais aptos disseminarão seus genes a um maior número de descendentes, encarregados de dar continuidade à espécie.

Os artifícios encontrados na natureza para a sobrevivência dos seres vivos são muitos. Para superar os obstáculos naturais, como as variações climáticas, luz, umidade e a competição por recursos, as espécies passam por um conjunto de transformações sucessivas, determinadas pelas mutações genéticas, que podem torná-las resistentes e, por conseqüência, mais aptas a um certo biótopo. Pode-se dizer que todas as espécies encontradas hoje na biosfera representam boas soluções para o problema da "luta pela vida".

Dentro do processo de evolução, os organismos assumem comportamentos que, em sua maioria envolvem inter-relações com outros indivíduos. Formam-se as populações como um aglomerado de seres da mesma espécie, e as comunidades, definidas por um grupo de populações. Por fim, os ecossistemas, conjuntos de comunidades interagindo entre si, agindo sobre e sofrendo a ação dos fatores abióticos. Estas inter-relações entre os componentes bióticos podem se dar de diversas formas, e são elas que proporcionam a coevolução das espécies. Na próxima seção serão mostradas as associações biológicas mais comuns que serviram de inspiração para o desenvolvimento de métodos computacionais para resolução de problemas, dentre os quais se inclui o presente trabalho.

3.3 Simbiose

O termo simbiose, criado em 1879 por De Bary, designa toda e qualquer associação permanente entre indivíduos de espécies diferentes que, normalmente, exerce influência recíproca no metabolismo. Entretanto, em [26] chega-se a uma outra

definição, mais atual, e que parece ser bastante apropriada:

"Simbiose é uma relação entre dois indivíduos onde a aptidão de um afeta diretamente a aptidão do outro."

O que há de interessante neste conceito é que a simbiose pode ocorrer também entre seres da mesma espécie. Assim, haverá simbiose tanto entre um camaleão e um gafanhoto (como um caso de inter-relação predador-presa), abelhas que disseminam o pólen das flores e um bando de formigas que se unem para carregar pedaços de um besouro morto até o formigueiro.

Existem vários tipos diferentes de inter-relações, ou coevolução, entre os seres vivos. Elas são classificadas como harmônicas, onde não há prejuízo para nenhum indivíduo da associação; ou desarmônicas, quando pelo menos um indivíduo da população sai prejudicado. Podem ser intra-específicas, se envolverem indivíduos da mesma espécie ou interespecíficas, com seres de espécies distintas.

3.3.1 Relações Intra-específicas Harmônicas

Sociedades

Os indivíduos vivem juntos, dividindo as tarefas e cooperando entre si. Exemplos de sociedades são as formigas, abelhas e cupins.

Colônias

Há uma união anatômica entre os indivíduos, formando uma unidade funcional e estrutural, como acontece com os corais.

3.3.2 Relações Intra-específicas Desarmônicas

Canibalismo

Um indivíduo mata e se alimenta de outro.

Competição Intra-específica

Há uma disputa pelo domínio, liderança do bando ou mesmo por recursos do ecossistema, quando são insuficientes para todos os indivíduos.

3.3.3 Relações Interespecíficas Harmônicas

Mutualismo

É uma relação obrigatória onde os participantes se beneficiam mutuamente, criando uma interdependência. Os líquens são um caso de mutualismo. Eles são formados pela associação entre fungos e algas, onde o fungo abriga a alga e é alimentado por ela.

Protocooperação

A diferença entre protocooperação e mutualismo é que a primeira não é uma associação obrigatória, ou seja, na sobrevivência de um dos indivíduos envolvidos não é indispensável à existência do outro.

Inquilinismo e Comensalismo

Nestes tipos de associação apenas um indivíduo é beneficiado, sem que haja prejuízo para o outro. No inquilinismo um indivíduo se associa a outro para obter proteção, como ocorre com o ferasfer, um pequeno peixe que vive dentro do pepino do mar e só sai para se alimentar. Já no comensalismo, a união dos indivíduos é pela busca do alimento. Um exemplo seriam os peixes-pilotos que vivem ao redor do tubarão para se alimentarem dos restos de comida que caem da sua boca quando ele ataca a sua presa.

3.3.4 Relações Interespecíficas Desarmônicas

Predatismo

Foi visto no exemplo de comensalismo que as rêmoras se alimentam dos pedaços do corpo da presa que o tubarão não aproveita. É notório que há também uma inter-relação entre o tubarão e a sua presa – denominada predatismo [26]. Aqui, o predador se beneficia matando e se alimentando de um outro indivíduo pertencente a uma outra espécie.

Parasitismo

No parasitismo, assim como no predadorismo, um indivíduo parasita se beneficia em detrimento do hospedeiro. Entretanto, neste caso, raramente há a morte do hospedeiro. Os parasitas vivem no corpo do hospedeiro e retiram dele o seu alimento.

3.3.5 Competição Interespecífica

Amensalismo ou Antibiose

O amensalismo é uma relação entre dois indivíduos onde um prejudica o outro de forma indireta e involuntária. Em alguns casos, elementos de uma população secretam substâncias que inibem ou impedem o desenvolvimento de indivíduos de populações de outras espécies. Os antibióticos, produzidos por fungos e largamente usados na medicina, inibem a proliferação de bactérias. Na chamada "maré vermelha, sob determinadas condições ambientais, certas algas marinhas microscópicas, do grupo dos dinoflagelados, produtores de substâncias altamente tóxicas, apresentam intensa proliferação, formando enormes manchas vermelhas no oceano. A concentração dessas substâncias tóxicas aumenta, provocando grande mortalidade de animais marinhos. Uma outra forma de amensalismo é muito comum em ecossistemas que têm sua estrutura modificada pelo homem, como o desvio de rios, construção de barragens e queimadas que acabam pondo em risco a sobrevivência de várias

espécies e muitas vezes trazendo desequilíbrio às comunidades do ecossistema.

Sinfilia

A sinfilia é um tipo de associação exemplificado na relação existente entre determinadas formigas e os pulgões de plantas. É também conhecida como escravagismo. Os pulgões extraem alimentos diretamente dos vasos liberianos da planta. Retiram, portanto, seiva elaborada, rica em matéria orgânica, principalmente carboidratos. Como consequência da digestão dos carboidratos, os pulgões produzem excessiva quantidade de material açucarado, grande parte do qual eliminam com as fezes. Esse material é muito apreciado pelas formigas, que, como forma de obter alimento, mantêm pulgões cativos em seu formigueiro, fornecendo-lhes partes vivas de plantas e chegando até mesmo a acariciá-los para estimular a eliminação do açúcar.

As relações coevolutivas citadas servem como inspiração para o desenvolvimento de diversas estratégias de otimização, como na evolução de Redes Neurais Artificiais [30], otimização de estruturas e jogos [33, 3]

Em particular, interessa-nos a utilização de Algoritmos Genéticos Coevolucionários (AGCs) para resolução de problemas, que serão vistos nas próximas seções.

3.4 Algoritmos Genéticos Coevolucionários

Os AGs avaliam os indivíduos segundo uma função de aptidão que se mantém fixa durante toda a resolução do problema. Na natureza, os indivíduos são avaliados de diversas formas, ao longo de toda a sua vida. Isto exige que uma espécie esteja em constante evolução, para que possa se adaptar às variações de ambiente, ou à evolução de uma outra espécie que lhe é simbiótica. A fim de simular transformações da função de avaliação ao longo das gerações, uma evolução dos AGs, os AGs Coevolucionários (AGCs) foram desenvolvidos. A particularidade dos AGCs é que a avaliação também evolui ao longo das gerações. Portanto, tem-se pelo menos duas populações a evoluir, uma em função da outra.

Admitem-se dois tipos principais de coevolução, a cooperativa e a competitiva. A cooperação proporciona ajuda mútua entre as populações para que elas melhorem sua aptidão. Já a coevolução competitiva é do tipo predador-presa, e a melhora da adaptação dos indivíduos de uma população incorre na piora da aptidão geral da segunda população. Ao longo das gerações, têm-se então uma corrida armamentista entre as duas populações. Isto gera soluções para problemas complexos de qualidade superior [17, 32].

3.4.1 Um AGC Competitivo Genérico

Início

```
Inicializar População1 e População2
Avaliar População1 em função da População2
Avaliar População2 em função da População1
Loop
```

Loop

```
Evoluir População1
Avaliar População1 em função da População2
Até critério de parada 1 satisfeito
```

Loop

```
Evoluir População2
Avaliar População2 em função da População1
Até critério de parada 2 satisfeito
```

Até critério de parada 3 satisfeito

Fim Algoritmo

Figura 3.8: Um AGC competitivo genérico.

Definidos estrutura e tipo de dados dos cromossomos, a inicialização dos indivíduos é feita da mesma forma como se dá nos AGs. As populações serão avaliadas uma em função da outra. Para a avaliação de uma das populações, podem ser utilizados todos os demais indivíduos da outra, ou apenas uma amostra já capaz de determinar a adaptação do indivíduo[30]. Em casos de competição, as populações evoluem no sentido da diminuição da aptidão da população oponente.

O próximo capítulo apresenta a descrição dos modelos propostos. Como já foi dito anteriormente, eles tratam da evolução de populações de agentes de defesa do SI com a meta de otimizar a cobertura de um conjunto de antígenos. Exemplificam a utilização das técnicas evolucionárias e coevolucionárias descritas neste capítulo.

Capítulo 4

Modelos Propostos

4.1 Introdução

Neste capítulo serão apresentados os modelos desenvolvidos com inspiração nos SIs reais. Foram propostas cinco simulações. A primeira envolve a evolução de uma população de parátomos visando a sua adaptação a uma população fixa de epítomos. A segunda apresenta uma versão mais elaborada dos primeiros testes, onde se trata de anticorpos e regiões antigênicas. Em seguida, na terceira simulação, é introduzido em uma população o conceito de bibliotecas genéticas, para que esta população funcione como codificadora de anticorpos contra um conjunto específico de antígenos. O quarto experimento lida com a questão do surgimento de novos antígenos na população ao longo do tempo, e simula a coevolução das populações de bibliotecas e antígenos. A última simulação adapta o terceiro modelo para que o sistema imune apresente a característica tolerância dos sistemas biológicos. Os detalhes da especificação de cada simulação serão vistos nas seções seguintes.

4.2 O Primeiro Modelo

O SI é capaz de nos proteger de uma infinidade de vírus, bactérias e outros agentes infecciosos. Ele também monitora o organismo, buscando e eliminando

células que apresentem algum tipo de anomalia. Para realizar essas tarefas, o SI deve estar apto a reconhecer uma infinidade de compostos diferentes e distinguir, dentre eles, aqueles que podem permanecer no organismo sem causar danos e quais devem ser eliminados. Estima-se que sua capacidade de reconhecimento abrange cerca de 10^{16} moléculas estranhas, o que, em termos práticos, significa dizer que ele reconhece qualquer molécula que lhe for apresentada [12].

O reconhecimento no SI é feito através das moléculas receptoras de superfície da membrana celular dos linfócitos B e T. A identificação dos antígenos em cada um desses dois tipos de células acontece de forma diferente. No primeiro caso, o reconhecimento fica a cargo das imunoglobulinas de superfície das células B, que podem interagir com antígenos livres em solução. Já os receptores das células T são capazes de reconhecer somente antígenos apresentados por uma célula apresentadora de antígeno. A geração desses receptores e sua capacidade de cobertura de todos os antígenos têm origem em um mecanismo genético bastante sofisticado. Durante o processo de formação, ocorrem diversas associações combinatórias entre os genes codificadores das cadeias dos receptores responsáveis pelo reconhecimento. Um outro fenômeno importante na origem da diversidade dos receptores são as hipermutações dessas bibliotecas de genes.

As hipermutações ocorrem nos centros germinativos dos linfonodos. Desta forma, quando uma célula apresentadora de antígenos penetra no linfonodo e apresenta um antígeno a um linfócito T, ou quando o linfócito B encontra um patógeno e o reconhece, quer dizer que a combinação genética codificadora do receptor foi bem sucedida. Após o reconhecimento, o linfócito torna-se ativado e multiplica-se, gerando os clones. Clones com boa capacidade de reconhecimento tendem a se proliferar. Em contrapartida, clones ruins desaparecem e são substituídos por outros mais eficazes. Fica clara, aqui, a analogia existente entre esta seleção clonal e a teoria da seleção natural de Darwin.

Como já foi dito, após o reconhecimento de um antígeno pelo receptor da célula B e uma sucessão de outros eventos, descritos no capítulo 2, há a formação de clones de plasmócitos responsáveis pela secreção do mesmo receptor na sua forma solúvel

para que se ligue ao antígeno. Esta ligação se dá entre o parátopo do anticorpo e o epítopo correspondente do antígeno. Um parátopo que proporcionar ligação forte contra o epítopo tem maior capacidade de neutralização do antígeno, portanto, para que o SI defenda o organismo com eficácia, os parátomos dos anticorpos produzidos devem ser bem adaptados aos epítomos apresentados. Os conceitos apresentados serviram como base para a construção deste primeiro modelo, que simula a evolução dos parátomos dentro do organismo.

No modelo, uma simplificação do que acontece nos sistemas imunes biológicos, tem-se um conjunto de parátomos que devem se modificar ao longo das gerações de forma a otimizar a cobertura de um conjunto fixo de epítomos. O objetivo é analisar a capacidade de adaptação do sistema a um dado ambiente contendo elementos agressores e, também, o seu comportamento com relação à identificação de padrões dentro das estruturas dos epítomos. Por isso, inicialmente, as simulações são realizadas com parátomos em menor número que os epítomos. Sabe-se que, na maioria dos casos, os anticorpos são antígeno-específicos, o que quer dizer que, teoricamente, existiria apenas um parátomo capaz de se ligar a um certo epítopo do antígeno. Entretanto, assumimos um fato que possivelmente ocorra ou tenha ocorrido com os anticorpos ao longo de sua evolução: epítomos com pequenas diferenças estruturais podem ser inativados por um mesmo parátomo, ainda que isto se dê apenas durante o início da resposta imune, quando as células T de maior especificidade ao antígeno ainda não amadureceram [37]. Esta também é uma forma de tratar do problema da cobertura do SI citado anteriormente.

É possível observar que, em muitos momentos, a questão evolucionária esteve presente nos conceitos expostos, principalmente no que diz respeito à seleção natural dos clones de células B. Desta maneira, a Computação Evolucionária (CE) foi escolhida como ferramenta para a implementação dos modelos estudados neste trabalho. Em específico, foram utilizados Algoritmos Genéticos Coevolucionários para obtenção nichos adaptativos, baseados nas idéias de Goldberg e Wang [14]. Em seu trabalho, Goldberg e Wang propõem um esquema de formação de nichos denominado Coevolutionary Shared Niching (CSN). Sua inspiração surgiu do estudo de um modelo de competição monopolística, proposto por Tullock em 1967 [38] e que,

a princípio, estaria relacionado apenas a problemas na área de Administração de Empresas.

O problema da competição monopolística pode ser definido da seguinte maneira:

Existe uma comunidade de consumidores, com uma função de densidade conhecida, vivendo ao longo de uma estrada. Um grupo de negociantes concorrentes e independentes entre si pretende construir um número de lojas nesta estrada. Uma vez que as lojas foram construídas, os clientes terão preferência por aquelas que minimizarem os seus custos, incluindo transporte. Sabendo disso, os negociantes terão que se espalhar pela estrada de forma que consigam o maior lucro possível. O conjunto dos clientes que um negociante consegue angariar compõe o seu nicho. Um cliente c pertence ao nicho do negociante b se este for o mais próximo, de acordo com uma função de distância pré-estabelecida.

Fazendo uma analogia com os elementos da primeira simulação proposta, podemos identificar os paratópos como sendo os negociantes e os epítapos clientes. Cabe ressaltar que, como a população dos epítapos permanece inalterada, a aptidão dos clientes, por enquanto, não será levada em consideração.

Nos AGs convencionais, os operadores de seleção tendem a privilegiar os indivíduos mais aptos, convergindo os indivíduos da população de maneira que seus fenótipos determinem poucas ou uma única solução. Os métodos de formação de nichos foram desenvolvidos para que se pudesse manter a diversidade da população e tornar possível a investigação de vários picos locais paralelamente, pois eles preservam subpopulações estáveis localizadas na vizinhança das soluções ótimas. Por existirem paratópos de genótipos diferentes que se deseja preservar dentro da população, escolheu-se o CSN em detrimento dos AGs convencionais.

4.2.1 O Algoritmo

Nesta seção será apresentado o algoritmo utilizado (figura 4.1) e em seguida os detalhes de cada uma de suas instruções principais.

```
Início
  Inicializar População de Parátomos
  Inicializar População fixa de Epítomos

  Distribuir Nichos segundo função de distância

  Para i de 1 até Número Máximo de Épocas faça
    Para j de 1 até Tamanho da População de Parátomos faça
      Se há Probabilidade de Mutação
        Então
          Repita
            Realizar Mutação no Cromossomo do Parátomo j
            Redistribuir Nichos
            Se a Aptidão do Parátomo j não diminui
              Então manter a mutação
              Senão desconsiderar a mutação e redistribuir nichos
            Fim Se
          Até atingir o Número Máximo de Mutações permitido
        Fim Se
      Fim Para
    Avaliar estado geral do sistema
  Fim Para
Fim Algoritmo
```

Figura 4.1: Pseudo-código do primeiro modelo.

4.2.2 Codificação

Nos sistemas biológicos reais, sabe-se que as regiões constituintes dos epítomos e parátomos são formadas por cadeias complexas de compostos orgânicos. Entretanto, neste modelo artificial, para fins de simplificação, tanto os epítomos quanto os parátomos são representados como cadeias binárias, conforme as idéias propostas em [12]. Desta forma, para o AG, fenótipos e genótipos terão o mesmo significado. Isto dispensa a decodificação do genótipo na avaliação dos indivíduos.

4.2.3 Inicialização

A inicialização dos Parátomos pode ser feita de forma totalmente aleatória ou, conforme descrito em [12], inserindo no cromossomo alguns blocos binários pré-definidos. Para isto, existe um parâmetro no algoritmo que define um tamanho fixo de cadeias de zeros ou uns que, alternadamente, devem ser inseridas no cromossomo, a fim de que ele assuma uma configuração padrão inicial. Por exemplo, em um cromossomo de tamanho 10 e com um bloco de inicialização com valor igual a cinco, haveria as duas possíveis configurações iniciais:

1. 0000011111
2. 1111100000

A ordem de qual bit aparecerá primeiro será determinada aleatoriamente.

Em casos onde se deseja iniciar a evolução de toda a população a partir de uma única configuração genotípica, basta atribuir ao parâmetro de dimensão de bloco o próprio tamanho do cromossomo. A explicação dada em [12] para este direcionamento genotípico da população inicial é que todos os genes codificadores dos anticorpos surgiram de variações de um único gene. Já no caso dos epítomos, a inicialização é feita apenas de forma aleatória.

4.2.4 Distribuição de Nichos

Na implementação, o número de nichos é sempre igual ao tamanho da população de parátomos, onde a cada parátomo é designado o controle de um nicho. Todos os nichos são habitados por um subconjunto do número total de epítomos. A distribuição dos epítomos entre os nichos é determinada pela menor distância entre eles e os parátomos. Assim, para todos os epítomos, confronta-se cada um com todos os parátomos, determinando qual o mais próximo, e por conseqüência, o nicho ao qual ele irá pertencer. Os indivíduos contidos em um nicho j correspondem aos epítomos que o parátomo j é mais apto a neutralizar, considerando todos os parátomos disponíveis na população.

A capacidade de neutralização de um parátomo é medida através de um cálculo de distância. Aqui, toma-se como valor de distância uma função de equiparação entre os cromossomos dos agressores e dos agentes de defesa, conhecida também com função de *matching*. Existem diversos tipos de funções de *matching*, entretanto, neste modelo, foi escolhida aquela que parece ser bastante fiel ao que acontece nos sistemas biológicos. Os cromossomos são comparados bit a bit, e o valor de matching será determinado pela maior cadeia complementar existente entre eles, como pode ser visto no exemplo abaixo.

Epítomo: 0001111010101000011110

Parátomo: 1111011101010111111110

As cadeias em destaque são tidas como o ponto de ligação molecular entre parátomo e epítomo. Como o objetivo é tornar a distância cada vez menor, o valor de retorno da função teve que ser adaptado para minimização. Assim, a distância será dada pela fórmula:

$$Distancia = TamanhoCromossomoEpitomo - TamanhoMaiorCadeiaEncontrada$$

No exemplo anterior, essa fórmula forneceria um valor para a distância igual a doze.

4.2.5 Mutação

O operador genético utilizado foi a mutação clássica para codificações binárias adotado nos AGs. Consiste no sorteio e inversão de um bit do cromossomo. No algoritmo, seguindo a idéia proposta por Goldberg e Wang [14], há um número máximo de mutações estabelecido para os cromossomos. Contudo, este parâmetro influencia apenas na velocidade com que o sistema evolui. A mutação só é efetivada em um indivíduo se a sua aptidão melhorar, o que dá à busca um caráter parecido com os algoritmos de gradiente. Esta medida foi adotada por não haver no sistema uma função objetivo explícita que determine gradientes para onde os indivíduos devam se direcionar. Portanto, é a avaliação da mutação dos parátomos que garante que os indivíduos tenderão a melhorar sua aptidão ao longo das gerações, e que o sistema se auto-organize da melhor forma para defender o organismo.

4.2.6 Avaliação do Estado Geral do Sistema

Uma questão importante no modelo está em determinar se o sistema obtido, após um número N de gerações, é ou não eficaz no combate aos epítomos apresentados. O que se pode garantir é que, em um dado momento do estágio evolutivo da população dos parátomos, haverá pelo menos um sítio mínimo de ligação para todos os epítomos. Entretanto, é sensato afirmar que ligações fracas não são capazes de produzir neutralizações eficientes, podendo se tornar instáveis e até se desfazerem ao contato com outras moléculas, ou durante pequenas variações no ambiente.

Desta forma, foi estabelecida uma medida de desempenho do sistema que determina o seu grau de eficiência no combate aos agressores. Este parâmetro foi denominado *Limite de Ineficiência*, e seu valor corresponde à porcentagem mínima de um epítomo que deve ser obrigatoriamente reconhecida por um parátomo para que ele possa ser considerado inativo.

O esquema a seguir mostra um exemplo simples de evolução de uma população durante duas gerações. Há um conjunto fixo de 10 epítomos para uma população de três parátomos. O primeiro quadro apresenta as populações tais como elas foram

inicializadas. Os dois seguintes mostram a população de parátomos já com algumas mutações realizadas. Tomando um valor de Limite de Ineficiência igual a 30%, já na primeira rodada, cinco epítomos são bem reconhecidos. O esperado é que, no decorrer da evolução, grande parte seja reconhecida. Caso isto não ocorra, quer dizer que o sistema foi incapaz de se adaptar ao ambiente proposto, o que resultaria na sua "morte".

Na tabela dos epítomos há uma coluna contendo valores de aptidão. Estes valores correspondem ao tamanho da cadeia reconhecida. Estes números só são levados em consideração para o cálculo da adaptação dos parátomos. A avaliação de um parátomo é feita através do somatório da sua aptidão em cada epítomo. No quadro não está sendo levada em consideração a função de distância para minimização descrita anteriormente.

Há casos onde mais de um parátomo teria a mesma capacidade de neutralização em um mesmo epítomo, entretanto, o objetivo é achar apenas um parátomo com capacidade máxima de neutralização. A escolha deste "neutralizador" é feita tomando o primeiro encontrado. Esta observação será uma das motivações para um outro modelo, já envolvendo regiões antigênicas e anticorpos.

Início da Evolução:

Parátapos			
Nicho	Tamanho	Cromossomo	Aptidão
0	6	111111111111	24
1	4	000000000000	13
2	0	000000000000	0
Aptidão Total: 37			

Epítapos		
Nicho	Cromossomo	Aptidão
0	011000010111	4
0	101010010010	2
0	011011000000	6
1	010010111010	3
1	111011011101	3
1	101110010100	3
0	110100011011	3
0	110000101111	4
1	111100010100	4
0	001000100000	5

Primeira Época:

Parátapos			
Nicho	Tamanho	Cromossomo	Aptidão
0	6	011111111111	24
1	3	000000000000	9
2	1	000010000000	5
Aptidão Total: 38			

Epítapos		
Nicho	Cromossomo	Aptidão
0	011000010111	4
0	101010010010	2
0	011011000000	6
1	010010111010	3
1	111011011101	3
1	101110010100	3
0	110100011011	3
0	110000101111	4
2	111100010100	5
0	001000100000	5

Segunda Época:

Parátapos			
Nicho	Tamanho	Cromossomo	Aptidão
0	6	010111111111	26
1	3	000000000000	10
2	1	000010000000	5
Aptidão Total: 41			

Epítapos		
Nicho	Cromossomo	Aptidão
0	011000010111	5
0	101010010010	4
0	011011000000	6
1	010010111010	3
1	111011011101	3
1	101110010100	3
0	110100011011	3
0	110000101111	3
2	111100010100	5
0	001000100000	5

4.2.7 Avaliação dos Parátapos

No modelo, dois tipos de avaliação dos parátapos foram adotados. O primeiro realiza uma avaliação do sistema de acordo com o desempenho global de todos parátapos. Isto quer dizer que uma mutação só será admitida se provocar uma melhora no somatório total das aptidões de todos os parátapos. A idéia aqui seria avaliar o estado geral de uma espécie frente aos agressores que ela possa contrair ao longo de sua evolução. Sabe-se, entretanto, que isto contraria o conceito de sistemas auto-organizáveis, onde cada componente realiza uma função independente do todo. Sua avaliação, por consequência, deve ser medida com relação ao desempenho individual de cada um de seus integrantes.

O segundo tipo de avaliação observa apenas o parátopo individualmente, e não mais o sistema com um todo. Tem-se, portanto, um sistema auto-organizável, onde o esperado é que a ação particular de cada parátopo seja capaz de produzir um sistema de defesa global eficiente.

Segundo a teoria de Darwin, bons sistemas, ou sistemas estáveis em um determi-

nado ambiente, são produzidos através de uma seleção natural. Dentro do sistema, quando as partes cooperam entre si produzindo um complexo robusto, o organismo tenderá a sobreviver por mais tempo, aumentando suas chances de propagar os seus genes pela população. Por outro lado, adotar uma avaliação global não parece tão absurdo, visto que as alterações locais não devem, na pior das hipóteses, resultar em prejuízos para o estado geral do modelo. E uma boa aptidão do sistema global lhe confere mais chances de reprodução.

A idéia da evolução global surgiu da dificuldade de se obter uma linha estável na evolução do sistema, como poderá ser observado na seção de resultados dos experimentos. Entretanto, parece ser natural haver, no curso de evolução de uma espécie, uma pequena instabilidade, visto que boas soluções são fruto do acaso. As oscilações ocorrem, também, devido ao caráter dinâmico do sistema modelado.

4.2.8 Experimentos

Primeiro Exemplo

Este primeiro exemplo mostra a adaptação dos parátapos a uma população fixa de epítapos. É considerada uma população de epítapos maior que a de parátapos. Isto serve para explorar a capacidade do modelo em reconhecer e agrupar os epítapos em nichos. Testes realizados mostraram que probabilidades de mutação variando de 60% a 85% não interferem na evolução dos parátapos, mas somente na velocidade de convergência do modelo. Os resultados apresentados correspondem a uma taxa de mutação igual a 85%. O Limite de Ineficiência foi fixado com o valor de 10%.

Abaixo seguem os gráficos contendo os resultados. O primeiro par mostra a curva de evolução dos anticorpos e do SI considerando a avaliação global. O segundo é referente à avaliação individual.

Como pode ser visto nos gráficos das figuras 4.2 e 4.4, no início da evolução dos parátapos não há uma boa performance do sistema no reconhecimento e neutralização dos epítapos. As curvas iniciam indicando um pequeno número de epítapos

identificados (eixo vertical). Entretanto, ao longo do curso da evolução (eixo horizontal), o mecanismo de hipermutação artificial torna possível que os parátomos cubram a população de epítomos.

Um outro gráfico, apresentado na figura 4.3, mostra a melhora da aptidão global dos parátomos ao longo das gerações e em 4.5 o aumento da aptidão individual. Neste primeiro experimento, o número de épocas foi 200 (valor usado nos demais experimentos), tamanho do cromossomo 65, população de parátomos 10 e população de epítomos 300. A quantidade de indivíduos que compõem a população de epítomos constitui o valor máximo que pode ser alcançado pelo SI, como pode ser visto nos gráficos 4.2 e 4.4.

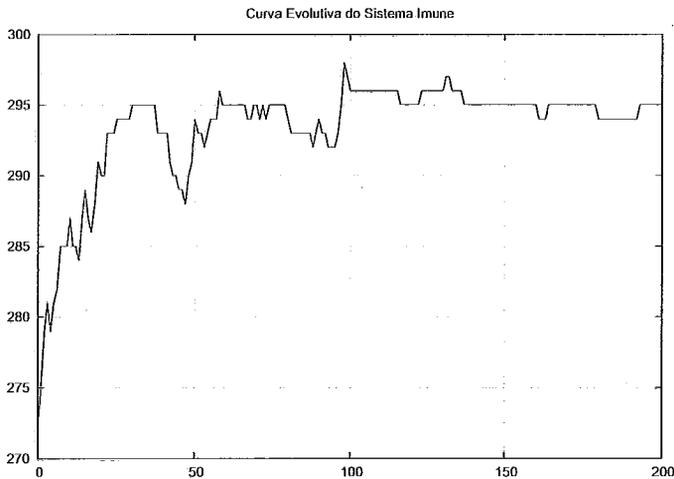


Figura 4.2: Primeiro Exemplo: A evolução do SI do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de tamanhos diferentes e avaliação global.

Conforme ilustrado no gráfico 4.6, variações na taxa de mutação influenciam apenas na velocidade de convergência. Sistemas com taxas de mutação muito baixas ficarão vulneráveis ao ataque dos patógenos por períodos de tempo maiores. A figura 4.7 expõe o mesmo exemplo visto em 4.6 porém com um número maior de épocas.

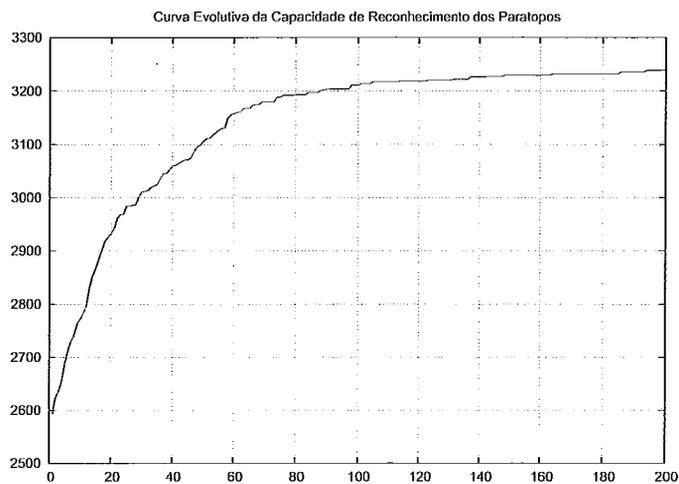


Figura 4.3: Primeiro Exemplo: A evolução da soma das aptidões dos indivíduos do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de tamanhos diferentes e avaliação global.

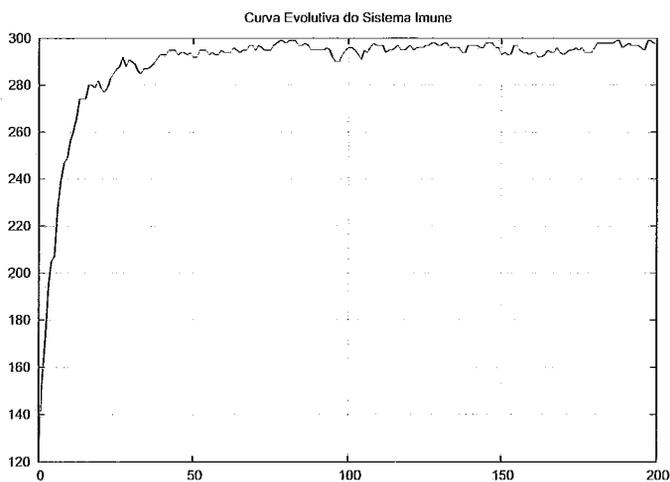


Figura 4.4: Primeiro Exemplo: A evolução do SI do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de tamanhos diferentes e avaliação individual.

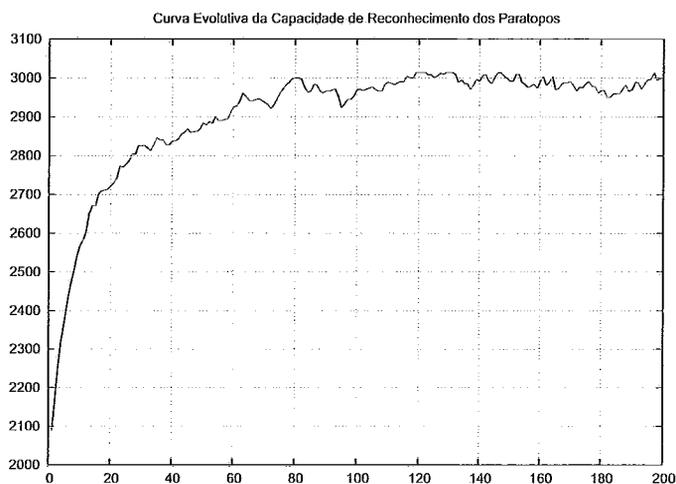


Figura 4.5: Primeiro Exemplo: A evolução da soma das aptidões dos indivíduos do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de tamanhos diferentes e avaliação individual.

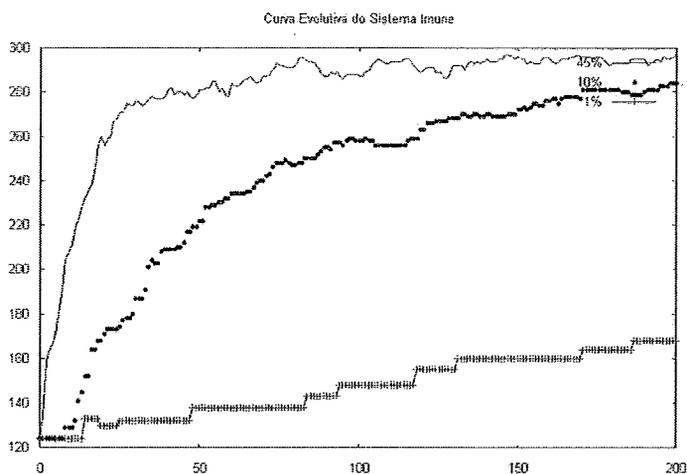
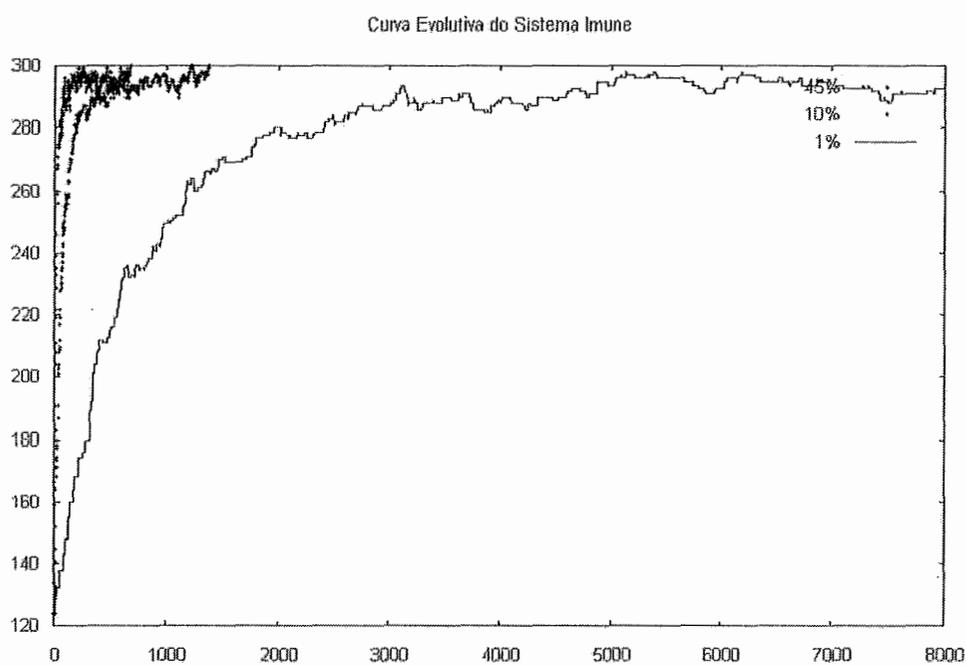


Figura 4.6: Primeiro Exemplo: A evolução de SIs do primeiro modelo considerando variações na taxa de mutação.



Figurã 4.7: Primeiro Exemplo: A evoluçã de SIs do primeiro modelo considerando variações na taxa de mutaçã e nũmero de épocas maior.

Segundo Exemplo

Neste segundo exemplo, as populações de parátomos e epítomos têm o mesmo tamanho. Isto possibilita que o modelo fique mais próximo dos sistemas imunes biológicos. O que é investigado aqui é a capacidade do sistema em neutralizar os epítomos. O Limite de Ineficiência foi aumentado para 50%. O tamanho das populações é igual a 100 e cromossomos de 25 bits. Foram processadas 200 épocas.

As figuras 4.8 e 4.9 contêm os resultados para a avaliação global e em 4.10 e 4.11 os gráficos com avaliação individual.

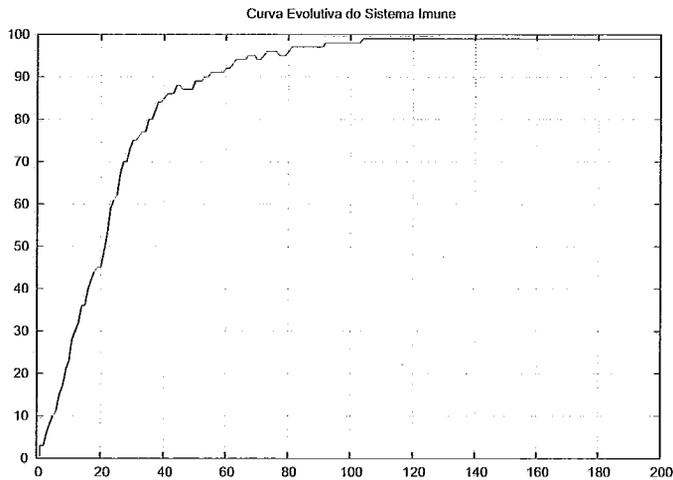


Figura 4.8: Segundo Exemplo: A evolução do SI do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de mesmo tamanho e avaliação global.

Os resultados observados mostram grande similaridade com os sistemas imunes reais. Aqueles capazes de se adaptar a novos patógenos sobreviveram e se multiplicaram.

É possível simular um SI ineficiente em reconhecer epítomos através do aumento do valor do parâmetro Limite de Ineficiência, como pode ser visto na figura 4.12. Neste gráfico, foram utilizadas taxas de ineficiência de 70%, 90% e 100%, e taxa de mutação de 85%. Já no gráfico 4.13, com os mesmos valores para a ineficiência, foi utilizada uma taxa de mutação menor, de 10%. Os exemplos mostram que sistemas imunes com baixo poder de ligação com o antígeno e taxa de hipermutação pequena

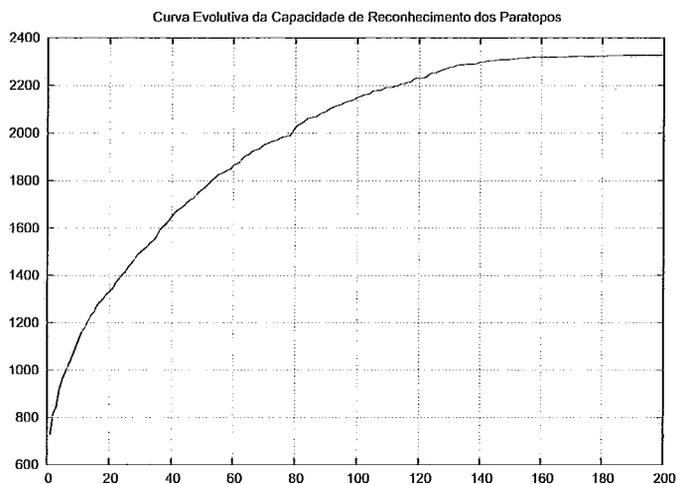


Figura 4.9: Segundo Exemplo: A evolução da aptidão dos indivíduos do primeiro modelo considerando populações de epítotos e parátotos de mesmo tamanho e avaliação global.

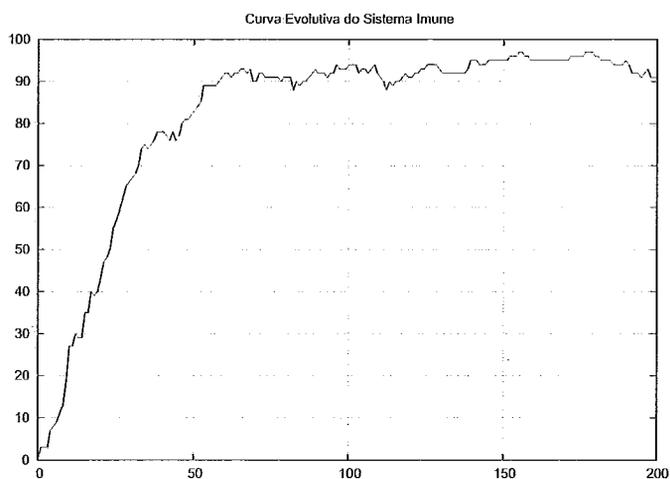


Figura 4.10: Segundo Exemplo: A evolução do SI do primeiro modelo considerando populações de epítotos e parátotos de mesmo tamanho e avaliação individual.

proporcionam ao indivíduo um mecanismo de defesa ineficaz.

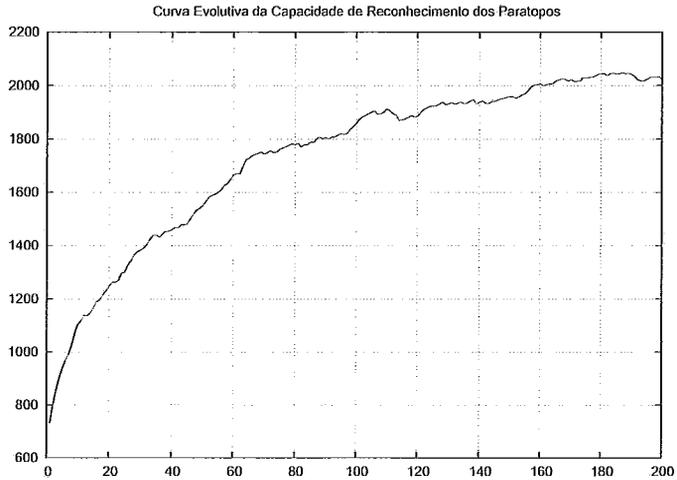


Figura 4.11: Segundo Exemplo: A evolução da aptidão dos indivíduos do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de mesmo tamanho e avaliação individual.

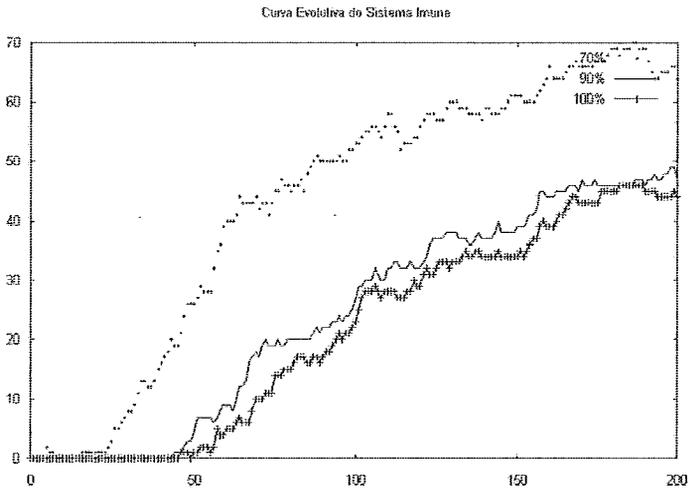


Figura 4.12: Segundo Exemplo: A evolução da aptidão do SI do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de mesmo tamanho, avaliação individual, variações na Taxa de Ineficiência e mutação de 85%.

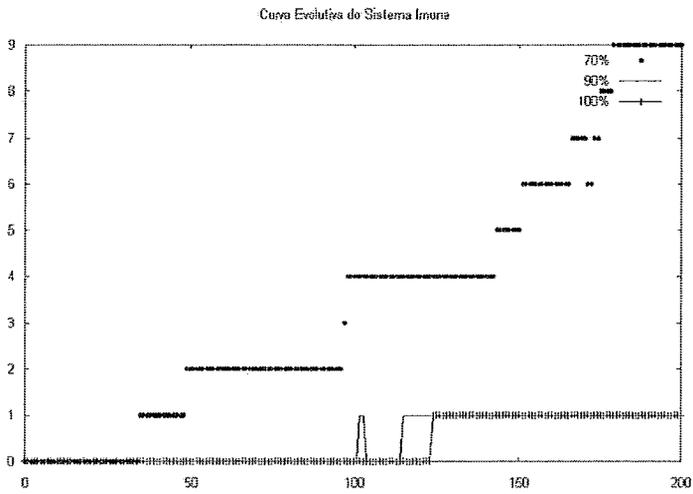


Figura 4.13: Segundo Exemplo: A evolução da aptidão dos indivíduos do primeiro modelo considerando populações de epítomos e parátomos de mesmo tamanho, avaliação individual, variações na Taxa de Ineficiência e mutação de 10%.

4.2.9 Estudo da Oscilação da Aptidão dos Epítomos durante a Evolução do Modelo

A causa das oscilações ocorridas na evolução dos anticorpos no esquema de avaliação individual é que, durante uma época, um parátopo pode sofrer uma mutação que atraia mais epítomos para o seu nicho. Esta mutação pode, como uma espécie de "efeito colateral", diminuir a atração que esse epítopo tem sobre algum elemento já pertencente ao seu nicho. Se um outro parátopo também sofrer mutação e apresentar maior poder de ligação ante os novos integrantes do nicho do parátopo anterior, então estes epítomos migram para o nicho do novo parátopo gerado. Assim, além de perder elementos do nicho, o primeiro parátopo tem sua aptidão piorada.

Através deste estudo, é possível perceber que uma das limitações do modelo é o fato de não haver uma política de armazenamento, ou preservação, de bons parátomos, o que funcionaria como uma espécie de memória imunológica. Portanto, quando os cromossomos sofrem mutação e o programa determina que esta alteração deve se manter, tratando-se de um caso como o exemplificado acima, tem-se a perda de um bom parátopo. A aptidão geral do sistema pode sofrer um pequeno declínio.

4.3 O Segundo Modelo

O primeiro modelo apresenta algumas limitações, dentre as quais a principal é o relaxamento da restrição da especificidade antigênica de cada anticorpo. Ao longo da implementação e análise desse modelo, paralelo ao estudo sobre como se dá a ligação de anticorpos e antígenos nos sistemas biológicos, foi proposta uma evolução do primeiro sistema para uma segunda versão. Seu comportamento apresenta características mais fiéis ao que acontece nos modelos reais.

Sabe-se que, para serem consideradas antigênicas, as moléculas devem ser grandes, rígidas e quimicamente complexas [37]. Organismos patogênicos, tais como bactérias, células nucleadas ou eritrócitos podem desencadear uma resposta imune porque apresentam em sua estrutura um combinado intrincado de várias moléculas que por si só já são antígenos. Portanto, uma bactéria pode ser vista como uma região antigênica contendo vários sítios de ligação de anticorpos, onde cada sítio é um antígeno diferente. Através desses conceitos, foi possível estabelecer os novos requisitos para o melhoramento do primeiro modelo.

A nova variante não trata mais de parátomos e epítomos, e sim, anticorpos e regiões antigênicas. Adotou-se essa premissa para que fosse possível implementar os sítios de ligação das moléculas de patógenos onde os anticorpos pudessem se ligar. Desta forma, representam-se as regiões antigênicas por cadeias de bits maiores. Os anticorpos são constituídos por seqüências de bits menores que se ligam a subcadeias do antígeno. Essas subcadeias equivalem aos determinantes antigênicos da molécula. Para fins de simplificação, as moléculas antigênicas são constituídas apenas de cadeias de determinantes antigênicos.

Considerando apenas uma região antigênica gerada aleatoriamente, o algoritmo poderia produzir uma possível configuração de anticorpos para opsonizar a molécula antigênica, vista em em 4.14.

Neste exemplo, foram gerados quatro anticorpos distintos capazes de reconhecer e neutralizar quatro antígenos dentro da molécula. A porcentagem de *matching* definida para a identificação do determinante antigênico no exemplo foi de cem por

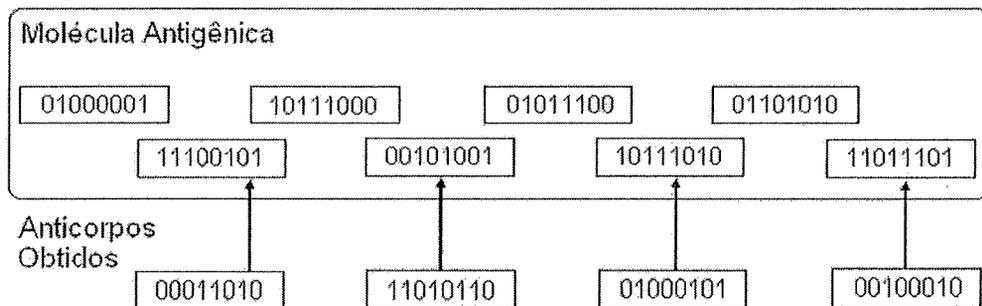


Figura 4.14: Esquema de funcionamento do segundo modelo.

cento. As seções seguintes explicam como o novo algoritmo foi implementado, seus resultados e considerações a respeito do modelo.

4.3.1 O Algoritmo

O algoritmo original sofreu algumas modificações para se adaptar aos requisitos adicionais, como pode ser visto a seguir, na figura 4.15.

4.3.2 Distribuição de Nichos

Neste novo esquema, há uma inversão de papéis entre os anticorpos e as regiões antigênicas. Os donos dos nichos, ou negociantes, segundo o modelo de competição monopolística, agora são as moléculas de antígenos, e os clientes, os anticorpos. Esta decisão de alterar a configuração original surgiu porque o novo sistema possui a capacidade de determinar, para cada molécula antigênica, um conjunto de anticorpos encarregados da sua opsonização. Desta maneira, o número de nichos corresponde ao número de cromossomos que codificam os antígenos da molécula. Cada determinante antigênico, que por simplificação constitui todo o antígeno, ocupa uma porção do cromossomo de comprimento fixo. Todas as porções possuem o mesmo tamanho, que é também igual ao tamanho cromossomo codificador do anticorpo. Isto pode ser visto no exemplo da figura 4.14.

A designação de um anticorpo a um nicho é dada quando esse anticorpo con-

```
Início
  Inicializar População de Anticorpos
  Inicializar População fixa de Regiões Antigênicas

  Distribuir Nichos segundo matching

  Para i de 1 até Número Máximo de Épocas faça
    Para j de 1 até Tamanho da População de Anticorpos faça

      Se há Probabilidade de Mutação
        Então
          Repita
            Realizar Mutação no Cromossomo do Anticorpo j
            Se foi gerado um Anticorpo novo
              Redistribuir Nichos
            Se a Aptidão do Anticorpo j não diminui e Anticorpo novo
              Então manter a mutação
              Senão desconsiderar a mutação e redistribuir nichos
            Fim Se
          Até atingir o Número Máximo de Mutações permitido
        Fim Se
    Fim Para

  Fim Para

  Avaliar estado geral do sistema
Fim Para
Fim Algoritmo
```

Figura 4.15: Pseudo-código do segundo modelo.

segue alcançar uma certa porcentagem da função de *matching* contra algum antígeno presente na molécula. É possível notar uma situação inusitada decorrente desta evolução do modelo. Ocorrerão circunstâncias onde um anticorpo participará de mais de um nicho, ou seja, haverá nichos que se intersectam. Algumas das dificuldades iniciais de convergência dos resultados do modelo para um comportamento esperado foram conseqüências desta característica nova.

Em alguns exemplos rodados em um modelo intermediário, foram utilizadas grandes populações de moléculas antigênicas. Isto fazia com que houvesse no genótipo da população vários padrões iguais de subcadeias de genes dentro dos cromossomos. A população de anticorpos passou a convergir privilegiando as subcadeias mais frequentes. O fato pareceu natural, pois acredita-se que antígenos que ocorrem em maior número suscitem na espécie uma atenção maior dos seus mecanismos de defesa. Entretanto, o modelo não tinha como objetivo a formação vários anticorpos iguais na população. Cada anticorpo representa todo o conjunto de anticorpos secretado por um certo clone de plasmócitos. A fim de solucionar esse tipo de convergência prematura dos anticorpos, foi adotada uma estratégia semelhante àquela mostrada em [14]. No algoritmo somente são aceitas mutações que gerem indivíduos distintos dos demais presentes na população. Esta distinção é dada pela distância de *Hamming*, que deve ser maior que zero.

4.3.3 Avaliação

Para cada vez que o anticorpo satisfaz a função de *matching* contra um dado antígeno, sua aptidão é acrescida de uma unidade. Em casos onde o *matching* não atingiu seu valor mínimo requerido, que estabelece a localização de um ponto de ligação, um valor menor que 1¹ é acrescido à aptidão do anticorpo. Este método foi adotado para não haver perda de combinações que poderiam ser promissoras no decorrer de gerações futuras. É importante ressaltar que se optou por esse estratégia para a preservação de bons indivíduos apenas para melhoria de desempenho computacional. Isto não representa uma analogia direta com o que acontece

¹*Matching* encontrado dividido pelo tamanho do cromossomo menor.

com os mamíferos.

4.3.4 Avaliação do Estado Geral do Sistema

Neste segundo modelo, existe apenas a avaliação individual de cada anticorpo. O sistema se auto-ajusta para cobrir da melhor maneira o conjunto de antígenos da população agressora. Entretanto, o que é relevante não é tão somente a melhora da aptidão dos anticorpos, e sim, a sua capacidade de maximizar a neutralização dos antígenos apresentados. Fica claro que esta característica decorre do aperfeiçoamento dos integrantes do sistema. Contudo, fez-se necessária a mudança do foco da medida de desempenho de aumento da aptidão dos indivíduos para a quantidade de antígenos reconhecidos.

4.3.5 Experimentos

O segundo modelo explora basicamente o reconhecimento de padrões dentro das moléculas antigênicas. Os gráficos seguintes mostram a evolução de dois experimentos contendo números de anticorpos diferentes.

Primeiro Exemplo

O primeiro exemplo representa o modelo utilizando um número menor de anticorpos. Sua tarefa é encontrar blocos construtores iguais dentro dos antígenos, e maximizar a neutralização da população de patógenos. O gráfico da figura 4.16 apresenta a evolução do sistema na produção de anticorpos que se adaptam às moléculas antigênicas dadas. No eixo vertical são mostradas as moléculas reconhecidas pelo sistema. O eixo horizontal representa o número de épocas. O tamanho da população de anticorpos é 50 e de moléculas patogênicas 300. O cromossomo dos anticorpos é de tamanho 8 e dos patógenos 64. Em todos os exemplos o limite de ineficiência foi ajustado para 100%.

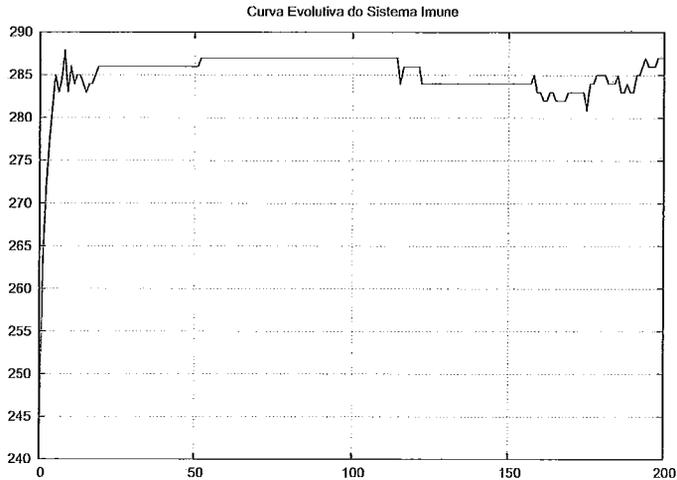


Figura 4.16: Primeiro Exemplo: A evolução do SI do segundo modelo considerando uma população pequena de anticorpos.

Segundo Exemplo

O segundo exemplo, mostrado na figura 4.17 utiliza um número maior de anticorpos e mostra como este aumento pode melhorar o desempenho do sistema imune. O tamanho da população de anticorpos foi fixado em 50 e de patógenos, 200.

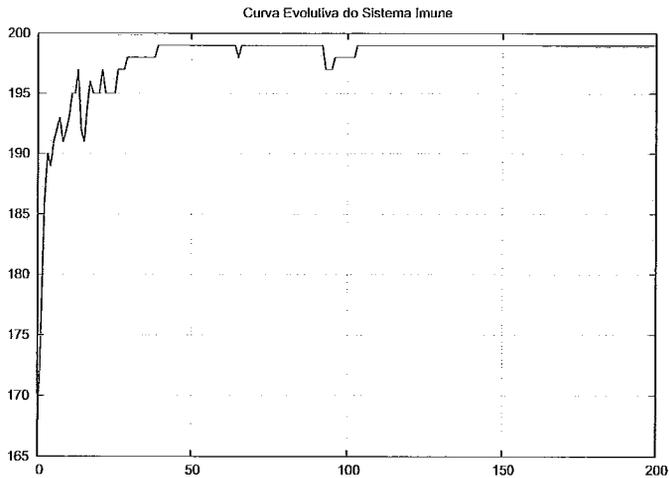


Figura 4.17: Segundo Exemplo: A evolução do SI do segundo modelo considerando uma população grande de anticorpos.

4.3.6 Considerações sobre a Evolução para o Segundo Modelo

O melhoramento da primeira modelagem produziu um protótipo mais fiel aos fundamentos biológicos. Por consequência, na sua fase de implementação, emergiram problemas e questionamentos bastante parecidos com o que possivelmente ocorreu durante a evolução dos SIs nas espécies.

Foi dito em seções anteriores que, em modelos intermediários, o sistema persistiu em uma convergência para antígenos mais freqüentes dentro da população. Um outro ponto também observado é que, paralelo a esse fato, antígenos com uma freqüência muito baixa eram simplesmente ignorados. Fazendo uma analogia com os SIs naturais, a concepção de um certo nível mínimo antigênico necessário para desencadear uma resposta imune parece legítima. E o mesmo provavelmente ocorre nesta situação com relação ao processo evolutivo e seleção natural dos indivíduos.

Um atributo importante a se observar é a capacidade do algoritmo em adaptar uma população de anticorpos para que ela realize o reconhecimento de padrões dentro dos cromossomos das moléculas de antígenos. É possível que, em outros tipos de aplicação envolvendo reconhecimento de padrões, essa técnica também seja eficiente.

4.4 O Terceiro Modelo

Conforme explicado no capítulo 2, a região V dos anticopos é responsável pelo reconhecimento dos antígenos. Sua codificação é realizada por mais de um segmento gênico. A cadeia leve requer dois segmentos de DNA V e J, e a cadeia pesada é codificada por V_H , D_H e J_H (figura 2.15 do capítulo 2, seção 2.11.1). A recombinação somática entre esses segmentos é um dos principais fatores geradores de diversidade dos receptores dos linfócitos, e por conseqüência, da grande variedade de anticorpos.

O terceiro modelo simula a evolução das bibliotecas de genes codificadores dos receptores dos linfócitos B, utilizando AGs. O objetivo é produzir uma biblioteca capaz de criar anticorpos aptos a reconhecer um dado conjunto de antígenos e observar a curva evolutiva dessa biblioteca. Para isto, adotou-se como indivíduo uma biblioteca simplificada composta por três grupos de segmentos V, D e J binários para codificação dos anticorpos. De posse de uma biblioteca candidata, o modelo gera todas as possíveis combinações de anticorpos e as testa contra um dado conjunto de antígenos. O indivíduo é avaliado levando em consideração o seu potencial de reconhecimento e neutralização dos agentes agressores apresentados.

4.4.1 Codificação

O indivíduo será composto de três conjuntos de segmentos gênicos binários V, D e J, conforme mostra a figura 4.18.

V:

000	100	001	101	111	010	110	011
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

D:

001	011	000	100	010	110	101	111
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

J:

100	000	011	110	010	001	101
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Figura 4.18: Exemplo de um indivíduo no terceiro modelo.

Neste exemplo, os segmentos do tipo V são representados por um conjunto de

três bits. No modelo, o tamanho de cada conjunto é parametrizável. O número de segmentos pertencentes a V, D ou J é determinado pelo AG. Para fins de simplificação, o algoritmo não admite segmentos duplicados dentro de um mesmo conjunto ou pseudogenes.

4.4.2 Decodificação

No SI há dois tipos de repertórios de anticorpos. O repertório disponível representa os anticorpos que já estão presentes no organismo do indivíduo e prontos para defesa. O repertório potencial constitui todas as combinações que os segmentos gênicos são capazes de produzir para defesa do organismo. No modelo, será utilizado este segundo tipo. De posse de um indivíduo, os anticorpos que esta biblioteca gera são obtidos por meio da combinatória VDJ, nesta ordem. A seguir, na figura 4.19 é ilustrado um exemplo de geração de anticorpos a partir de um indivíduo hipotético.

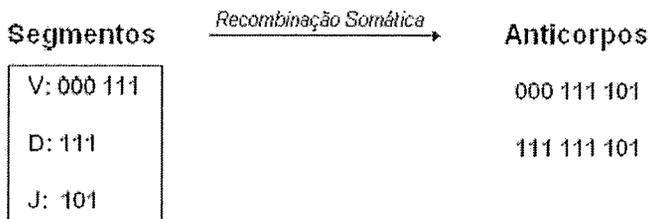


Figura 4.19: Geração dos anticorpos a partir de um indivíduo.

4.4.3 Operadores de Recombinação

O operador escolhido para recombinação do material genético dos indivíduos foi o *crossover*. Seu funcionamento consiste em selecionar um ponto de corte em V, D ou J e trocar este elemento no filho, semelhante ao *crossover* de n pontos, conforme a ilustração da figura 4.20. Neste exemplo, o ponto de cruzamento foi estabelecido em D.

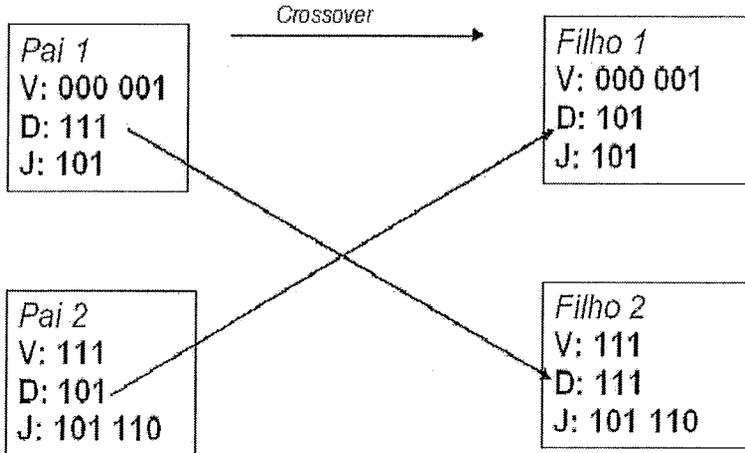


Figura 4.20: Exemplo da utilização do operador de *crossover*.

4.4.4 Operadores de Mutação

Podem ocorrer três tipos de mutação no cromossomo do indivíduo. Inicialmente é selecionado de forma aleatória qual conjunto de segmentos V, D ou J será mutado. A seguir, determina-se também, aleatoriamente, se a mutação será aditiva, substitutiva ou subtrativa.

O operador de mutação de adição gera um segmento genético aleatório e o adiciona ao grupo previamente determinado para sofrer a modificação. A inversão altera os bits de um dos segmentos e a subtração apaga uma seção. A figura 4.21 apresenta um exemplo dos operadores citados.

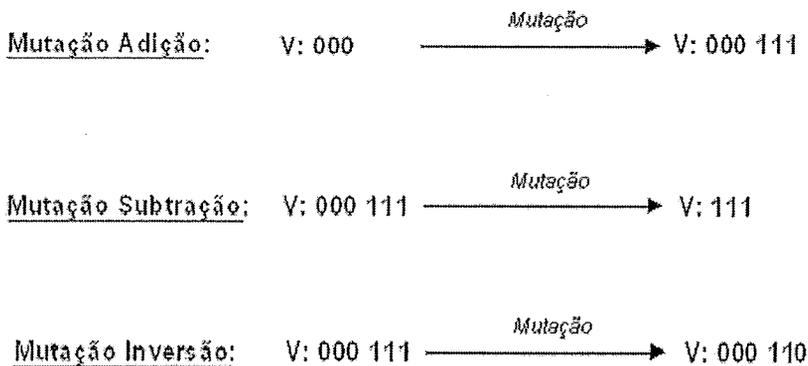


Figura 4.21: Operadores de mutação utilizados no terceiro modelo.

4.4.5 Avaliação

Cada indivíduo é avaliado segundo sua capacidade de neutralização contra os antígenos apresentados. A aptidão é determinada através dos anticorpos que a biblioteca produz. O *matching* antígeno e anticorpo recai no segundo modelo, porém os anticorpos não sofrem hipermutações.

4.4.6 Experimentos

Esta seção contém exemplos de experimentos realizados variando os tamanhos das populações e do cromossomo a fim de verificar o comportamento do sistema. Em todos os casos, o número de épocas estabelecido foi 200.

Primeiro Exemplo

Para realizar este primeiro experimento, foi utilizada uma população de antígenos de 200 indivíduos com cromossomo de 12 bits. A população de bibliotecas ficou com tamanho 10, taxas de crossover e mutação de 85%. Cada tipo de mutação implementado recebeu uma cota de 33% de probabilidade de ocorrência em cada segmento. À mutação aditiva foi atribuído um valor de 20%, subtrativa 10% e inversiva 70%. Estabeleceu-se que apenas um indivíduo seria reservado para a elite. O tamanho de cada segmento gênico recebeu o valor 4, e um limite de ineficiência de 100%.

Assim como nos demais modelos, pode-se observar um baixo reconhecimento dos genes da espécie no início da evolução. Com o passar das épocas, os indivíduos mais aptos ao reconhecimento passam a dominar a população e a espécie tem seu sistema imune bastante melhorado. O gráfico da figura 4.22 mostra a curva evolutiva do primeiro exemplo. O eixo vertical representa os antígenos reconhecidos, e o horizontal as épocas decorridas.

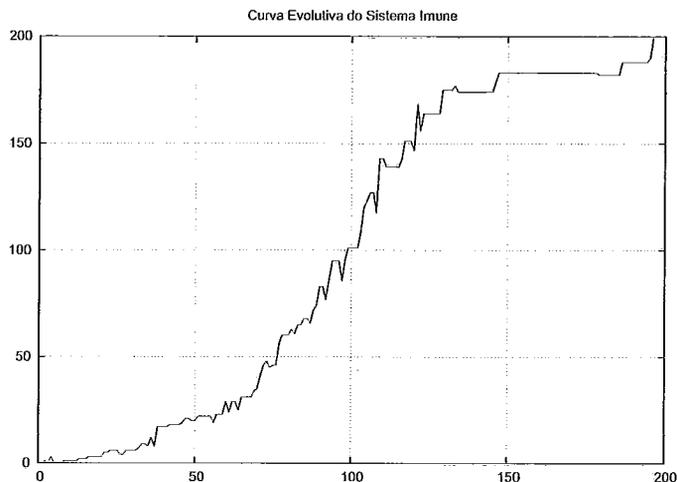


Figura 4.22: Primeiro Exemplo: A evolução do SI do terceiro modelo.

Segundo Exemplo

A diferença entre este exemplo e o primeiro apresentado está no tamanho do cromossomo dos antígenos, que agora é composto de 64 bits. O resultado da evolução pode ser visto na figura 4.23.

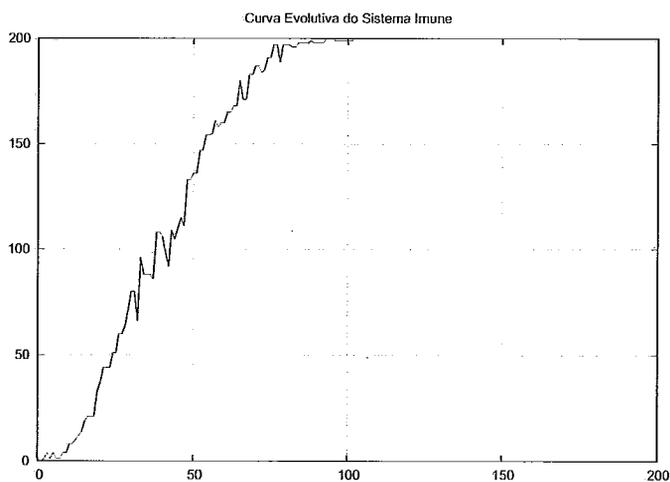


Figura 4.23: Segundo Exemplo: A evolução do SI do terceiro modelo.

Terceiro Exemplo

O terceiro exemplo utiliza uma população maior de antígenos com relação ao segundo experimento. Ela passa a ser constituída de 500 indivíduos.

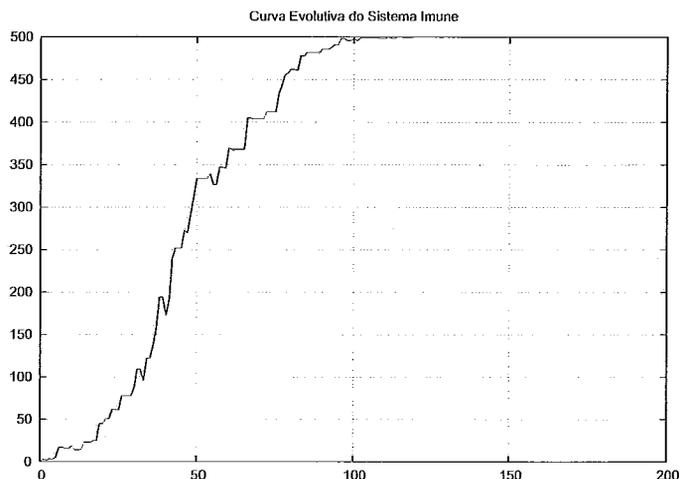


Figura 4.24: Terceiro Exemplo: A evolução do SI do terceiro modelo.

4.5 Quarto Modelo

A quarta simulação representa uma extensão da anterior, onde antígenos também evoluem. Trata-se agora de um modelo coevolucionário, no qual as bibliotecas genéticas e agentes agressores realizam uma "corrida armamentista". Esta coevolução se encaixa no tipo predador-presa. O objetivo da simulação é analisar a estabilidade de uma biblioteca frente às modificações genéticas de um antígeno e observar a curva coevolucionária definida pelo enfrentamento das duas populações.

Com relação à população de bibliotecas, o AG é idêntico ao do terceiro modelo. Porém, o conjunto de antígenos sofre mutações. As mutações antigênicas bem sucedidas, que conseguem reduzir a aptidão de uma biblioteca, são preservadas.

4.5.1 Algoritmo

Início

Inicializar População de Bibliotecas

Inicializar População de Antígenos

Loop

 Evoluir Biblioteca até que consiga reconhecer todos os Antígenos

 Evoluir Antígenos até que reduzam o reconhecimento das Bibliotecas

Até critério de parada satisfeito

Fim.

4.5.2 Inicialização

Assim como nos modelos anteriores, a inicialização tanto da população de bibliotecas como a de antígenos é feita de forma aleatória.

4.5.3 Evolução das Bibliotecas

Conforme descrito no terceiro modelo, a aptidão das bibliotecas é dada pela capacidade de neutralização dos seus anticorpos com relação a um dado conjunto de antígenos. O objetivo na evolução de uma biblioteca é maximizar a sua capacidade genética de produzir anticorpos com capacidade de reconhecimento dos antígenos.

4.5.4 Evolução dos Antígenos

A aptidão dos antígenos é dada pela sua capacidade de agressão ao organismo. Se ele não for reconhecido, certamente não será neutralizado. Para isto, o antígeno sofre mutações e tem sua aptidão aumentada na proporção em que não for reconhecido.

4.5.5 Experimentos

Por se tratar de um modelo coevolucionário, o padrão dos gráficos apresentados nesta seção é diferente daqueles mostrados nos modelos anteriores. Aqui os an-

tígenos também evoluem, e sua aptidão é a mesma dos anticorpos. Porém, a função dos anticorpos é maximizar o *matching* contra os antígenos, e estes últimos visam minimizar a neutralização.

O que se espera deste modelo é que com o passar das gerações as bibliotecas produzam uma estabilidade suficiente para reconhecer qualquer novo antígeno produzido por mutação.

Primeiro Exemplo

Neste primeiro exemplo para o AG dos anticorpos assume-se a seguinte configuração: 120 gerações por época, 10 indivíduos na população, elitismo de 1 indivíduo, 4 bits por segmento e taxas de crossover e mutação de 85%. O AG dos antígenos ficou com 400 gerações, 200 indivíduos, cromossomo de tamanho 64 e 85% de probabilidade de mutação. Os resultados podem ser vistos nos gráficos 4.25 e 4.26.

Ao iniciar-se a evolução, as bibliotecas genéticas ainda se mostram instáveis com relação à inserção de novos antígenos na população. Entretanto, com o evoluir da espécie, os genes vão se multiplicado de modo a possuir um repertório mínimo capaz de produzir receptores capazes de reconhecer qualquer antígeno dado. Isto pode ser visto no primeiro gráfico, 4.25.

O segundo gráfico da figura 4.26 mostra o comportamento dos anticorpos produzidos pela melhor biblioteca frente às mutações dos antígenos. Inicialmente as mutações antigénicas são capazes de reduzir consideravelmente a capacidade de reconhecimento e neutralização dos patógenos. Entretanto, à medida que as bibliotecas vão ficando mais robustas, a aptidão geral dos anticorpos se estabiliza.

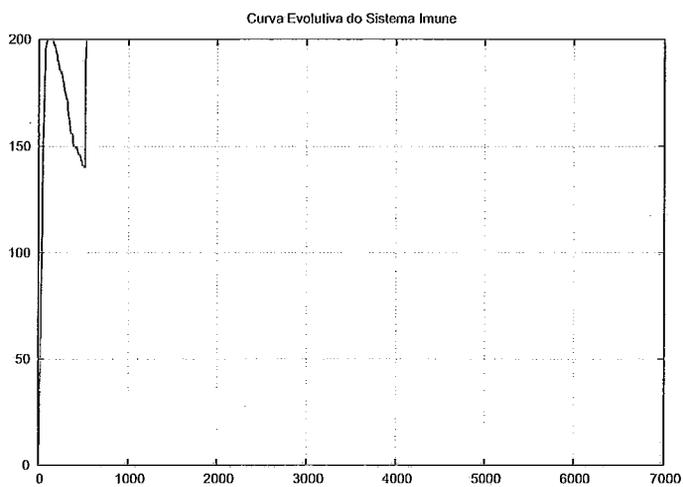


Figura 4.25: Primeiro Exemplo: A evolução do SI do quarto modelo.

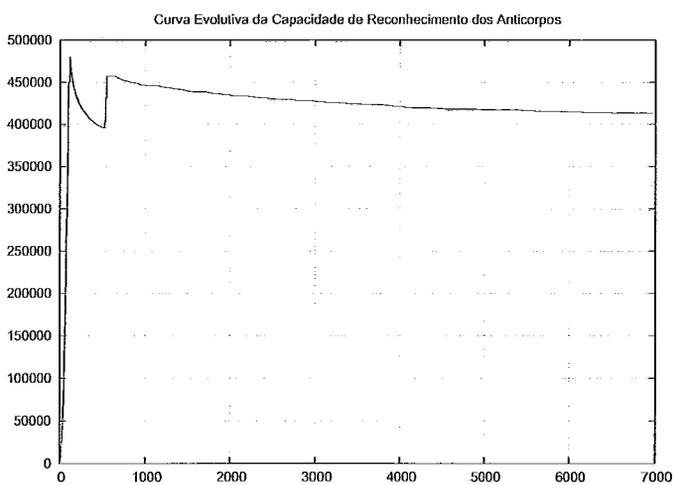


Figura 4.26: Primeiro Exemplo: A evolução da aptidão dos indivíduos do quarto modelo.

Segundo Exemplo

O segundo exemplo utiliza para o AG das bibliotecas 100 gerações e as demais configurações iguais às do primeiro exemplo. O AG dos antígenos possui 200 gerações, 150 indivíduos e 60% de taxa de mutação. Os resultados podem ser vistos nas figuras 4.27 e 4.28.

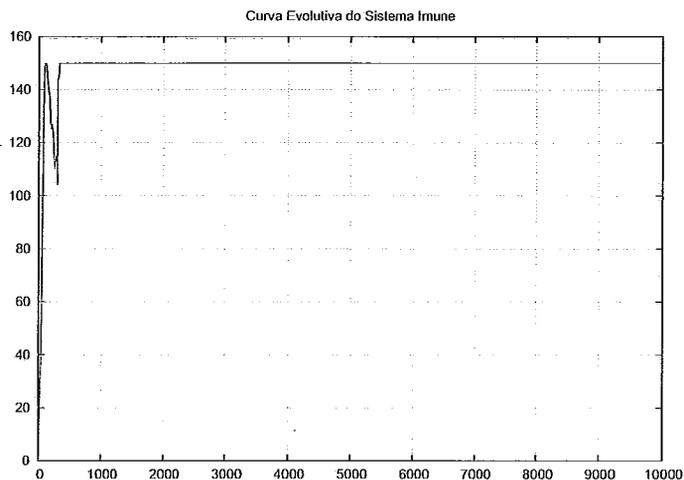


Figura 4.27: Segundo Exemplo: A evolução do SI do quarto modelo.

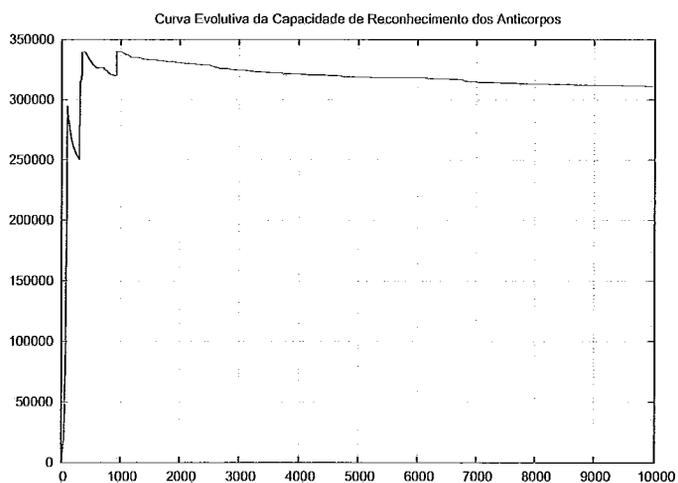


Figura 4.28: Segundo Exemplo: A evolução da aptidão dos indivíduos do quarto modelo.

4.6 Quinto Modelo

O próximo passo na evolução das simulações foi adicionar a característica de tolerância dos sistemas imunes biológicos em um modelo. Para que um sistema imune seja tolerante ao próprio, é necessário que ele consiga distinguir quais moléculas pertencem ao organismo para que não desencadeie auto-reação.

O quinto modelo simula a tolerância acrescentando uma nova população que representa o próprio, ou *self* – moléculas contra as quais o SI não deve atuar. Existe uma população de bibliotecas que tem que evoluir no sentido de maximizar a neutralização de um dado conjunto fixo de antígenos e minimizar o ataque ao *self*.

Esta quinta simulação se difere do terceiro modelo na avaliação, onde há uma penalização para aqueles indivíduos que produzirem anticorpos que reajam contra o *self*. Devido às limitações do alfabeto binário utilizado na codificação do algoritmo, para que o indivíduo seja penalizado, ele deve ser capaz de realizar um matching de cem por cento com um indivíduo *self*.

4.6.1 Avaliação

Na avaliação das bibliotecas dois cálculos de aptidão foram adotados. O primeiro efetua a penalização dos indivíduos toda vez que eles atacam o *self*. Nesta penalização, é subtraído um ponto da nota total da biblioteca para cada anticorpo auto-imune produzido.

A segunda avaliação zera a aptidão do indivíduo, se ele produzir pelo menos um anticorpo auto-imune. Utilizando este método, uma biblioteca produtora de anticorpos auto-ímunes é praticamente eliminada da população. Isto porque a seleção dos indivíduos para reprodução é realizada via ranking.

4.6.2 Experimentos

Os exemplos seguintes ilustram a diferença na evolução da espécie, ao se considerar as duas formas de avaliação. Para isto, em ambos os casos a configuração utilizada foi a seguinte: 500 épocas, população de antígenos, bibliotecas e *self* iguais a 200, 120 e 100, respectivamente. As bibliotecas tiveram 85% de taxas de mutação e *crossover*. Os tamanhos dos cromossomos foram 60 para antígenos e 12 para o *self*. O tamanho dos segmentos das bibliotecas ficou estabelecido como 4.

Primeiro Exemplo

O primeiro exemplo ilustra uma espécie que consegue sobreviver às doenças auto-imunes, mas sem a tendência de erradicar os genes ruins de seu genótipo. Este caso do modelo parece ser semelhante aos sistemas reais, visto que aquelas doenças auto-imunes mais brandas não impedem o indivíduo de reproduzir. Os resultados podem ser vistos nos gráficos 4.29, 4.34 e 4.31. O primeiro gráfico mostra a curva de reconhecimento do SI, o segundo a evolução da aptidão dos anticorpos com relação aos antígenos e o terceiro a evolução dos anticorpos considerando o *self*.

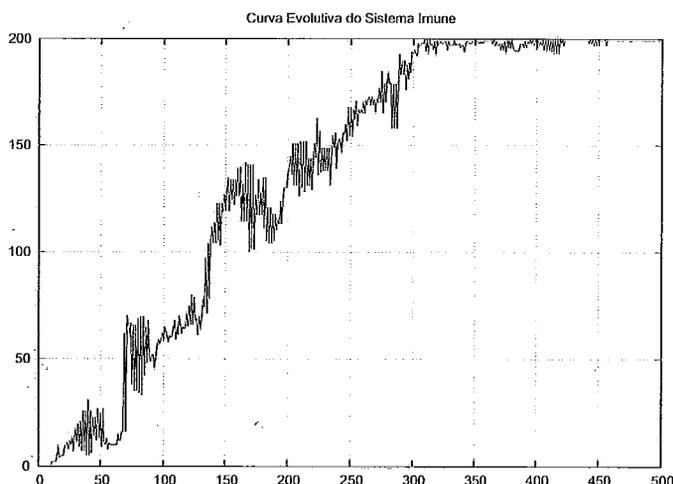


Figura 4.29: Primeiro Exemplo: A evolução do SI do quinto modelo.

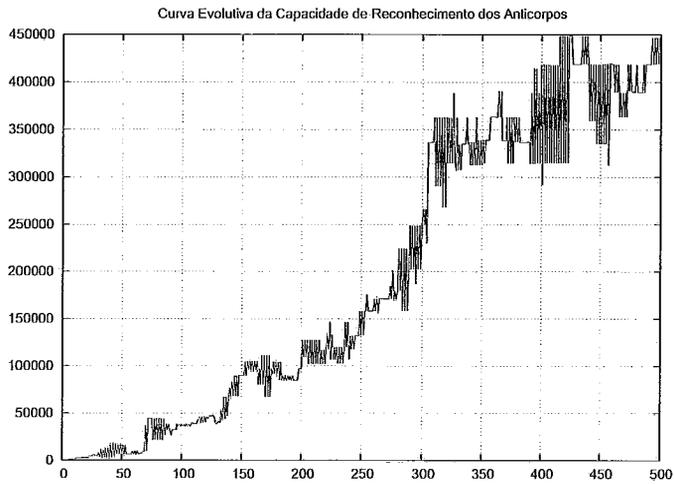


Figura 4.30: Primeiro Exemplo: A evolução da aptidão dos indivíduos do quinto modelo.

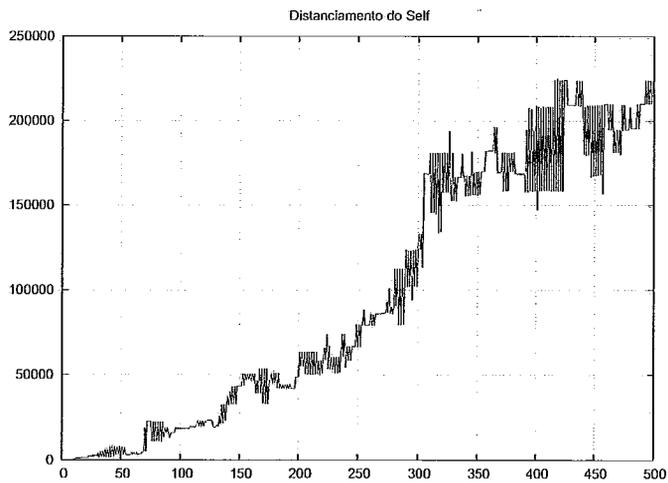


Figura 4.31: Primeiro Exemplo: Aptidão dos indivíduos com relação ao *self*.

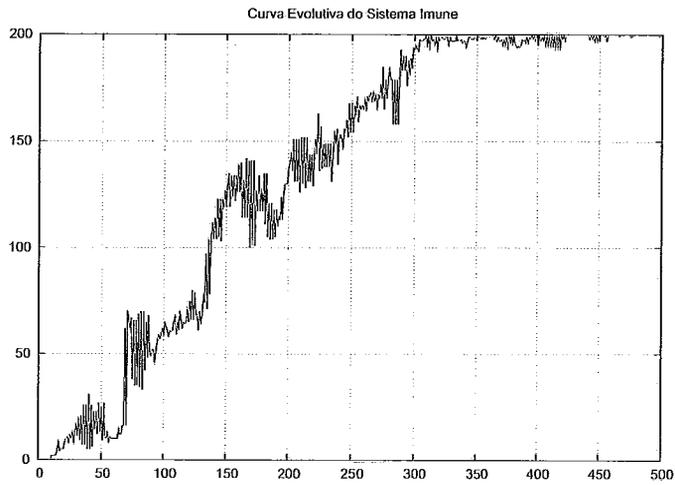


Figura 4.32: Segundo Exemplo: A evolução do SI do quinto modelo.

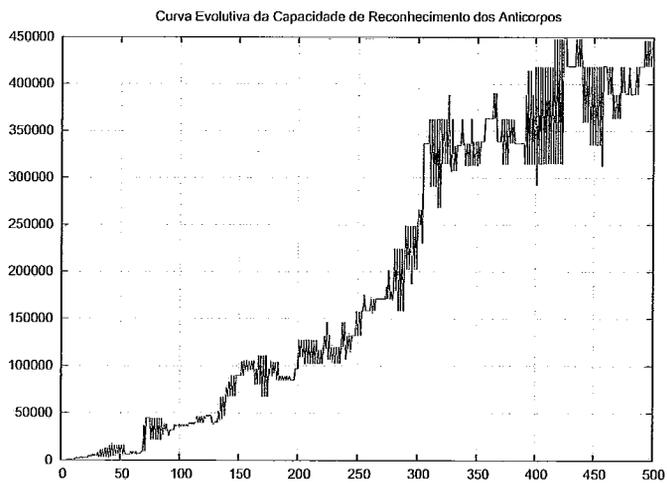


Figura 4.33: Segundo Exemplo: A evolução da aptidão dos indivíduos do quinto modelo.

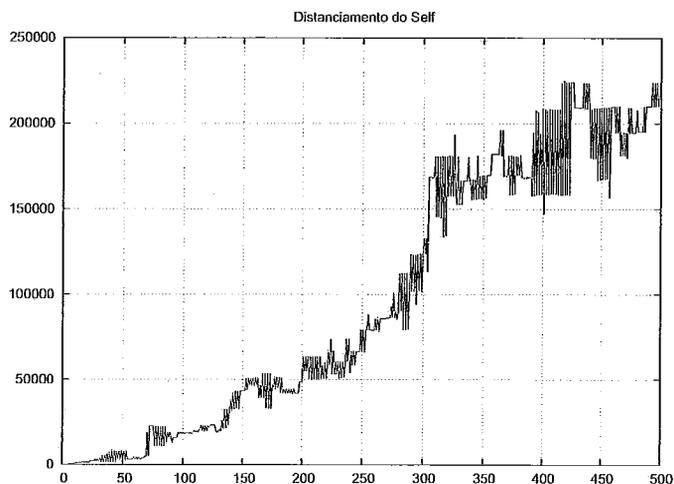


Figura 4.34: Segundo Exemplo: Aptidão dos indivíduos com relação ao *self*.

Segundo Exemplo

É possível observar que este modelo reflete um problema do tipo MinMax, onde se quer maximizar o *matching* contra os antígenos, e minimizá-lo ao confrontado com o *self*. O crescimento da curva de distanciamento do *self* é explicado pela limitação do alfabeto utilizado na construção do *self* e dos anticorpos. Ambos são constituídos de cadeias binárias, o que aumenta a probabilidade de que haja blocos construtores idênticos nas duas populações. Uma forma de resolver este problema seria estabelecer funções de *matching* distintas para determinar o grau de ataque ao *self* e aos patógenos.

Capítulo 5

Considerações Finais

O sistema imunológico apresenta diversas características que lhe permitem detectar e combater um agente invasor no organismo. Dentre os atributos do SI, aquele explorado neste trabalho, foi a capacidade de reconhecimento. O objetivo, modelar um sistema que traduzisse a maneira como o aparato de defesa dos mamíferos evoluiu para um mecanismo de identificação e eliminação robusto.

Foram propostos cinco modelos em graus de complexidade crescentes, porém, mantendo o mesmo fundamento. Cada modelo, para fins de simplificação, ficou responsável por evoluir agentes de defesa constituídos de cadeias binárias. Estes agentes foram contrastados com outras seqüências de bits, os antígenos, e, com o valor obtido através de uma função de pareamento, obtiveram-se as notas de cada promotor de defesa. Quanto melhor a nota de cada agente, maior a capacidade de reconhecimento e neutralização dos patógenos. Para evolução dos grupos de defesa foram utilizados Algoritmos Genéticos.

O primeiro modelo tratou da evolução de parátomos contra epítomos, dando um enfoque no mecanismo de hipermutações somáticas. A fim de explorar a capacidade dos parátomos em reconhecer padrões dentro da população de epítomos, estabeleceu-se um primeiro experimento onde os agentes defensores estariam em menor número. Neste caso, como a relação parátomo e epítomo não foi de um para um, para que cada parátomo evoluísse no sentido da cobertura de um grupo de epítomos, o Algoritmo

Genético foi melhorado para suportar a formação de nichos. Isto garantiu a preservação da diversidade na população de parátomos. Resultados mostraram uma curva evolutiva que partiu de um nível de reconhecimento baixo, mas que ao longo da evolução, aumentou a capacidade de detecção do sistema a um ponto em que todos os epítomos puderam ser identificados. Em um segundo caso, considerando populações de mesmo tamanho, também se obteve o mesmo padrão de curva evolutiva. A diferença ocorrida foi na diminuição da velocidade de convergência do sistema. Isto porque, havendo um parátomo para cada epítomo, o parâmetro que determinava a exigência de reconhecimento entre as cadeias de bits foi aumentado.

O melhoramento do primeiro modelo produziu um segundo com características mais similares aos sistemas imunes reais. Ao invés de parátomos e epítomos, a evolução envolveu um grupo de anticorpos se adaptando a um conjunto de moléculas antigênicas. Os resultados desse segundo sistema também mostraram o crescimento da curva adaptativa. Este modelo convergiu para um aparato de reconhecimento de padrões apto a encontrar blocos iguais dentro de uma população de seqüências de bits. Outro aspecto importante deste modelo foi a sua equivalência aos modelos naturais, onde ocorreu uma convergência em direção aos antígenos mais freqüentes. Antígenos muito raros foram ignorados.

Mantendo-se a filosofia de gradualmente ir evoluindo os modelos para aproximar-se dos sistemas reais, o conceito de bibliotecas de genes foi adotado. Estas bibliotecas seriam a fonte geradora de um bloco de anticorpos capaz de neutralizar um grupo de antígenos. Trabalhou-se com o repertório potencial da biblioteca. Cada anticorpo seria gerado a partir dos segmentos gênicos V, D, e J encontrados na natureza e aqui representados por subcadeias binárias. A curva evolutiva produzida foi semelhante à dos outros modelos. A diferença agora está na maior robustez do modelo, que se tornou resistente a possíveis mutações dos antígenos.

Esta constatação serviu de inspiração para a proposta do quarto modelo. Instaurou-se o conceito de "corrida armamentista", onde houve mutação dos patógenos tentando escapar da vigilância do sistema, e ao mesmo tempo, as bibliotecas tiveram que ir se adaptando a mudanças nocivas concebidas na população adversária. Ocorreu

desta forma, uma dinâmica coevolutiva, implementada por meio de AGs coevolucionários. Os resultados apresentados mostraram uma oscilação no gráfico, onde a aptidão das bibliotecas tem uma elevação inicial, mas que com o passar das gerações, sofre uma queda gradual devido aos novos antígenos. Estes patógenos, por não estarem previstos nos segmentos gênicos da biblioteca, conseguem burlar o sistema de segurança e derrubar a aptidão dos agentes de defesa. Nos passos seguintes do processo coevolutivo, observa-se que a amplitude da oscilação de aptidão das bibliotecas vai diminuindo até um estado de equilíbrio, onde todos os agentes agressores são reconhecidos. Mesmo que haja novas mutações na população de antígenos, a biblioteca tem sua configuração mínima abrangente o suficiente para cobrir todos os patógenos potenciais. Ainda que o antígeno não tenha aparecido anteriormente na população, a biblioteca atingiu uma estrutura ótima de modo a reconhecê-lo quando este surgir. Este fenômeno observado reflete exatamente o que ocorre, por exemplo, nos sistemas imunes do ser humano, onde as bibliotecas de genes executam uma cobertura ótima no reconhecimento dos antígenos. Sem esta propriedade dos sistemas imunes, uma mutação "bem sucedida" em um antígeno poderia aniquilar toda uma espécie, por não suscitar seus mecanismos de defesa.

Ao quinto modelo adicionou-se a característica de tolerância dos sistemas imunes reais. As bibliotecas tiveram que maximizar a cobertura dos antígenos sem afetar suas próprias moléculas. Para isto, foi introduzida uma nova população, denominada self, que representaria o que é do próprio organismo. Os resultados obtidos mostraram uma evolução das bibliotecas mais lenta e cautelosa, para evitar ataques auto-imunes.

Ao fim dessas simulações, este trabalho conseguiu reunir vários aspectos observados na natureza. Chegou-se a um modelo final cuja evolução reflete, com bastante fidelidade, partes do que hoje é conhecido sobre os sistemas imunes biológicos. Principalmente no que diz respeito à sua formação filogenética e à forma como eles conseguiram chegar a um complexo de defesa do organismo eficiente.

Existem algumas ramificações para as quais se pode expandir o trabalho apresentado. Uma possibilidade, ainda envolvendo modelagens do sistema, seria a

tentativa de integrar o aspecto evolutivo às idéias das redes funcionais, iniciadas por Jerne[21]. Uma outra vertente seria definir aplicabilidade prática do modelo na produção de anticorpos artificiais para reconhecimento de padrões cujas variáveis são desconhecidas.

Referências Bibliográficas

- [1] ABBAS A. K., LICHMAN A. H., P. J. S. *Imunologia celular e Molecular*, 2 ed. Rio de Janeiro, Revinter, 1998.
- [2] AGUILAR, E. Um estudo sistêmico de um modelo de sistema imune com evolução da especificidade. Tese de Mestrado, COPPE/UFRJ, 2003.
- [3] BARBOSA, H. A coevolutionary genetic algorithm for a game approach to structural optimization. In *Proc. of the Seventh Int. Conf. on Genetic Algorithms and their Applications* (East Lansing, MI, July 1997), T. Baeck, Ed., pp. 545–552.
- [4] BARBOSA, H. J. C. Uma introdução aos algoritmos genéticos. *Mini-Curso no XX CNMAC, Congresso Nacional de Matemática Aplicada e Computacional, Gramado, RS* (1997).
- [5] BURNET, F. M. A modification of jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Australian Journal of Science* 20 (1957), 67–69.
- [6] CORMACK, D. H. *HAM Histologia*, 9 ed. Guanabara Koogan, 1991.
- [7] DARWIN, C. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*. Murray, London, 1859. 6th (final) ed'n 1872.
- [8] DAVIS, L. *Handbook of Genetic Algorithms*. Van Nostrand Reinhold, 1991.
- [9] DE CARVALHO, L. A. Conceitos de teoria da complexidade. (Notas de aula do curso de Inteligência Artificial - COPPE/UFRJ).

- [10] DE CASTRO, L. N. *Immune Engineering: Development of Computational Tools Inspired by the Artificial Immune Systems (in Portuguese)*. PhD thesis, DCA FEEC/UNICAMP, Campinas/SP, Brazil, August 1998 to May 2001.
- [11] DEJONG, K. *The analysis and behavior of a class of genetic adaptive systems*. PhD thesis, University of Michigan, 1975.
- [12] FORREST, S., SMITH, R. E., JAVORNIK, B., E PERELSON, A. S. Using genetic algorithms to explore pattern recognition in the immune system. *Evolutionary Computation* 1, 3 (1993), 191–211.
- [13] GOLDBERG, D. *Genetic Algorithms in Search, Optimization, and Machine Learning*. Addison-Wesley, Reading, Mass., 1989.
- [14] GOLDBERG, D. E., E WANG, L. Adaptive niching via coevolutionary sharing. *Genetic Algorithms and Evolution Strategy in Engineering and Computer Science* (1998), 21–38.
- [15] GOLUB, E. S. Is the function of the immune system only to protect? In *Theoretical and Experimental Insights into Immunology* (1992), vol. 66 of *H: Cell Biology*, NATO ASI Series, pp. 15–26.
- [16] HIGHTOWER, R., FORREST, S., E PERELSON, A. S. The evolution of emergent organization in immune system gene libraries. In *Proceedings of the Sixth International Conference on Genetic Algorithms* (San Francisco, CA, 1995), L. Eshelman, Ed., Morgan Kaufmann, pp. 344–350.
- [17] HILLIS, W. Co-evolving parasites improve simulated evolution as an optimization procedure. *Physica D* 42 (1990), 228–234.
- [18] HOFMEYR, S. A., E FORREST, S. Architecture for an artificial immune system. *Evolutionary Computation* 8, 4 (2000), 443–473.
- [19] HOLLAND, J. H. *Adaptation in Natural and Artificial Systems*. University of Michigan Press, Ann Arbor, MI, 1975.

- [20] JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., E SHLOMCHIK, M. *Immunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença*, 5 ed. Artes Médicas, 2001.
- [21] JERNE, N. K. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol (Inst. Pasteur) 125C*, 3 (1974), 73–89.
- [22] JONG, K. Adaptative systems design. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics* (1980), 10, 566–574.
- [23] KEPLER, T. B., E PERELSON, A. S. Cyclic reentry of germinal center b cells and the efficiency of affinity maturation. *Immunol. Today 14 14* (1993), 412–415.
- [24] KEPLER, T. B., E PERELSON, A. S. Somatic hypermutation in b cells: An optimal control treatment. *J. Theoret. Biol. 164* (1993), 37–64.
- [25] MANDISCHER, M. Representations and evolution of neural networks. In *Artificial Neural Nets and genetic algorithms* (1993), C. R. R. Albriecht e N. Steele, Eds., Springer Verlag, pp. 643–649.
- [26] MORRISSON, J. Co-evolution and genetic algorithms. Tese de Mestrado, Carleton University, 1998.
- [27] OPREA, M., E FORREST, S. How the immune system generates diversity: Pathogen space coverage with random and evolved antibody libraries. In *Proceedings of the Genetic and Evolutionary Computation Conference* (Orlando, Florida, USA, 13-17 1999), W. Banzhaf, J. Daida, A. E. Eiben, M. H. Garzon, V. Honavar, M. Jakiela, e R. E. Smith, Eds., vol. 2, Morgan Kaufmann, pp. 1651–1656.
- [28] OPREA, M., E KEPLER, T. B. Genetic plasticity of v genes under somatic hypermutation: Statistical analyses using a new resampling-based methodology. *Genome Research 9 (12)* (1999), 1294–1304.

- [29] OPREA, M., E PERELSON, A. Somatic mutation leads to efficient affinity maturation when centrocytes recycle back to centroblasts. *J. Immunol.* 158 (1997), 5155–5162.
- [30] PAREDIS, J. Steps towards co-evolutionary classification neural networks. In *Artificial Life IV* (1994), R. Brooks e P. Maes, Eds., MIT Press/Bradford Books.
- [31] PERELSON, A. S., E WEISBUCH, G. Immunology for physicists. *Reviews of Modern Physics* 69 (1997), 1219.
- [32] ROSIN, C., E BELEW, R. Methods for competitive co-evolution: Finding opponents worth beating. In *Proc. of the Sixth Int. Conf. on Genetic Algorithms and their Applications* (Pittsburgh, PA, July 1995), L. Eshelman, Ed.
- [33] ROSIN, C., E BELEW, R. New methods for competitive coevolution. *Evolutionary Computation* 5, 1 (1997), 1–29.
- [34] RUMJANEK, V. M. Próprio e estranho: é essa a questão? *Ciência Hoje* 29 (2001), 40.
- [35] S. HARP, T. S., E GUHA, A. Towards the genetic synthesis of neural networks. In *3rd International Conference on Genetic Algorithms* (1989), Morgan Kauffman, pp. 360–369.
- [36] SHIMURA, J. Somatic mutations in immunoglobulin v gene determine the structure and function of the protein - an evidence from homology modeling. In *Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium* (1996), L. Hunter e T. Klein, Eds., World Scientific Publishing.
- [37] TIZARD, I. *Introdução à Imunologia Veterinária*, 2 ed. 1985.
- [38] TULLOCK, G. *Towards a mathematics of politics*. The University of Michigan Press, 1967.
- [39] VAZ, N. M. A teoria burnetiana hoje. *Ciência Hoje* 29 (2001), 40.