



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

GUILHERME CARDOSO AGOSTINETTI

**MODELO MATEMÁTICO PARA PREVISÃO DA
INFECCÃO EXPERIMENTAL DO VÍRUS hRSV EM
CULTURA DE CÉLULAS A549**

GUILHERME CARDOSO AGOSTINETTI

**MODELO MATEMÁTICO PARA PREVISÃO DA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL DO VÍRUS hRSV EM
CULTURA DE CÉLULAS A549**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Matemática da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do Título de MESTRE em Matemática Aplicada e Computacional.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Juliana de Oliveira

Londrina
Julho/2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

A275m Agostinetti, Guilherme Cardoso.

MODELO MATEMÁTICO PARA PREVISÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DO VÍRUS hRSV EM CULTURA DE CÉLULAS A549

Guilherme Cardoso Agostinetti. - Londrina, 2025.

63 f. :li

Orientadora: Juliana de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Matemática Aplicada e Computacional) Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Matemática Aplicada e Computacional, 2025.

Inclui Bibliografia.

1. Modelagem Matemática - Teses. 2. Modelo de Lotka-Volterra - Teses. 3. Método das integrais - Teses. 4. hRSV - Teses. I. Oliveira, Juliana de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Matemática Aplicada e Computacional. III. Título.

CDU 51

GUILHERME CARDOSO AGOSTINETTI

MODELO MATEMÁTICO PARA PREVISÃO DA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL DO VÍRUS hRSV EM CULTURA DE
CÉLULAS A549

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Matemática da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do Título de MESTRE em Matemática Aplicada e Computacional.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Juliana de Oliveira
Universidade Estadual Paulista - Assis

Prof. Dr. Eliandro Rodrigues Cirilo
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Edson Marcelino Alves
Instituto Federal do Triângulo Mineiro

Londrina, 30 de Julho de 2025.

À minha namorada Júlia e aos meus pais Manoel e Lúcia.

AGRADECIMENTOS

Nunca imaginei me deparar com um problema de modelagem biológica durante meu percurso no mestrado; contudo, foi justamente esse desafio que me mostrou como cada interação e cada célula são únicas, revelando a perfeição da criação de Deus. Assim, gostaria, primeiramente, de expressar minha profunda gratidão a Deus por esta oportunidade e por me conceder forças para seguir até o final.

Agradeço à minha namorada, Júlia Ortiz Araújo, pelo apoio, carinho e dedicação constantes. Sua presença e incentivo estiveram presentes em todos os momentos desta trajetória, tornando este percurso mais leve e significativo.

Dedico também um agradecimento especial aos meus pais, Manoel e Lúcia. Sem o apoio incondicional de vocês, nada disso seria possível. A cada tombo ou desafio, estiveram presentes para me levantar e orientar, ensinando-me a perseverar e a não temer os obstáculos.

Irmãos são como árvores: podem crescer em direções diferentes, mas suas raízes permanecem entrelaçadas. Meu irmão, Eduardo, agradeço por tudo que fez e continua fazendo por mim, e peço desculpas por, em algumas ocasiões, não ter sido o irmão mais velho que você merecia.

Augusto Curry afirma que bons professores são mestres temporários, enquanto professores fascinantes são mestres inesquecíveis. Seguindo esse pensamento, sou imensamente grato à minha orientadora, Doutora Juliana de Oliveira, cuja orientação constante me despertou fascínio pelo mundo das ciências e pelo universo fascinante da matemática.

Expresso ainda minha gratidão ao colegiado do Programa PGMAC-UEL, em especial ao Doutor Paulo Laerte Natti, pelo apoio e dedicação durante toda a minha trajetória acadêmica. Cada lição compartilhada por vocês ultrapassa os limites da matemática e será levada comigo ao longo da carreira. Agradeço também à CAPES pelo imprescindível auxílio financeiro durante este percurso.

Agradeço ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da Faculdade de Ciências e Letras de Assis (FCLA) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), com especial destaque para a Prof^ª. Dr^ª. Karina Alves de Toledo, e registro meu agradecimento à sua equipe, em particular à aluna de iniciação científica Gabriela Kimi Okamoto Ohashi, pela cessão dos dados experimentais utilizados neste trabalho.

Agradeço igualmente aos amigos e colegas, que, mesmo com pequenas conversas e gestos, contribuíram de forma significativa para meu desenvolvimento e bem-estar durante o mestrado.

Por fim, agradeço ao meu anjo da guarda, que esteve ao meu lado desde o dia do meu nascimento, protegendo-me e guiando meus passos ao longo desta jornada.

"Nada é pequeno se feito com amor."

"Se o céu me cobria de graças, não era porque merecia, era ainda muito imperfeita."

Santa Teresinha do Menino Jesus

AGOSTINETTI, Guilherme Cardoso. **Modelo Matemático para Previsão da Infecção Experimental do Vírus hRSV em Cultura de Células A549**. 2025. 63. Dissertação (Mestrado em Matemática Aplicada e Computacional) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo modelar matematicamente a infecção experimental do Vírus Respiratório Sincicial Humano hRSV em culturas de células A549. A dinâmica populacional do vírus (hRSV) e das células A549 foi analisada ao longo de 10 dias, utilizando a quantidade inicial de 5×10^4 , $2,5 \times 10^4$ e 1×10^4 células, com Multiplicidades de infecção (MOI) de 1, 0.5 e 0.1. Os dados foram coletados no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da Faculdade de Ciências e Letras de Assis (UNESP). A modelagem empregou o sistema de equações de Lotka-Volterra e variações deste modelo, cujos parâmetros foram determinados pelo Método das Integrais. A solução numérica foi obtida por meio do método de Runge-Kutta de 4ª ordem. Os resultados demonstram que foi possível determinar os parâmetros dos modelos pelo método das integrais e simular a dinâmica da interação entre os vírus e as células hospedeiras.

Palavras-chave: Modelagem matemática, Modelo presa-predador, Lotka-Volterra, hRSV, Cultura celular, Células A549, Método das Integrais.

AGOSTINETTI, Guilherme Cardoso. **Mathematical Modeling for Predicting hRSV Experimental Infection in A549 Cell Cultures**. 2025. 63. Dissertation (Master's Degree in Applied and Computational Mathematics) – State University of Londrina, Londrina, 2025.

ABSTRACT

This work aims to mathematically model the experimental infection of Human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) in A549 cell cultures. The population dynamics of the virus (hRSV) and A549 cells were analyzed over 10 days, using the initial numbers of 5×10^4 , 2.5×10^4 and 1×10^4 cells, with MOI of 1, 0.5 and 0.1. The data were collected at the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology of the Faculty of Sciences and Letters of Assis (UNESP). The modeling employed the Lotka-Volterra system of equations and variations of this model, whose parameters were determined by the Integral Method. The numerical solution was obtained through the 4th-order Runge-Kutta method. The results demonstrate that it was possible to determine the parameters of the models using the integral method and simulate the dynamics of the interaction between viruses and host cells.

Keywords: Mathematical modeling, Predator-prey model, Lotka-Volterra, hRSV, Cell culture, A549 cells, Integral Method.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Vírus Sincicial Respiratório Humano	18
2.2	Modelagem Matemática	20
2.3	Modelo de Lotka-Volterra	21
2.4	Modelo de Lotka-Volterra com Extinção	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	Coleta de dados	31
3.2	Processamento de dados	32
3.3	Modelos	35
3.4	Método das Integrais	36
3.5	Runge-Kutta de quarta ordem	38
3.6	Raiz Quadrada do Erro Quadrático Médio	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1	Dados experimentais	41
4.2	Resultados do Modelo de Lotka-Volterra	45
4.3	Resultados do Modelo de Lotka-Volterra com saturação na equação das Células	49
4.4	Resultados do Modelo de Lotka-Volterra com saturação nas equações das Cé- lulas e Vírus	54
4.5	Análise Estatística	57
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
	REFERÊNCIAS	61

LISTA DE FIGURAS

2.1	Organização genômica do hRSV.	18
2.2	Representação esquemática do hRSV.	19
2.3	Replicação do hRSV.	20
2.4	Diagrama de Fases - Modelo de Lotka-Volterra para diferentes condições iniciais.	24
2.5	Modelo do Lotka-Volterra com condições iniciais correspondentes ao ponto crítico.	25
2.6	Modelo do Lotka-Volterra com condições iniciais próximas ao ponto de equilíbrio.	26
2.7	Modelo do Lotka-Volterra com condições iniciais distantes do ponto de equilíbrio.	27
2.8	Diagrama de fases do Modelo de Lotka-Volterra com termo de saturação na equação das células para diversas condições iniciais.	28
2.9	Dinâmica temporal do Modelo de Lotka-Volterra com termo de saturação na equação das presas para diferentes condições iniciais.	29
2.10	Diagrama de fases do modelo de Lotka-Volterra com termo de saturação em ambas as equações.	30
2.11	Dinâmica temporal do Modelo de Lotka-Volterra com termo de saturação em ambas as equações.	30
4.1	Resultados experimentais da dinâmica populacional das células e PFU dos vírus para a quantidade inicial de 5×10^4 células.	43
4.2	Resultados experimentais da dinâmica populacional das células e PFU dos vírus para a quantidade inicial de $2,5 \times 10^4$ células.	44
4.3	Resultados experimentais da dinâmica populacional das células e PFU dos vírus para a quantidade inicial de 1×10^4 células.	44
4.4	Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 5×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do modelo de Lotka-Volterra.	46
4.5	Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de $2,5 \times 10^4$ células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra.	47
4.6	Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 1×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra.	48

4.7	Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 5×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra com saturação na equação das células.	51
4.8	Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 2.5×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra com saturação na equação das células.	52
4.9	Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 1×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra com saturação na equação das células.	53
4.10	Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 5×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações.	55
4.11	Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 2.5×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações.	56
4.12	Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 1×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações.	57

LISTA DE TABELAS

3.1	Média da viabilidade (%) para diferentes condições de densidade celular (CC) e multiplicidade de infecção (MOI).	33
3.2	Morte celular (%) para diferentes condições de densidade celular (CC) e multiplicidade de infecção (MOI).	35
4.1	Evolução das populações de células e vírus ao longo de 10 dias, com condição inicial de 1×10^4 para diferentes valores de MOI	41
4.2	Evolução das populações de células e vírus ao longo de 10 dias, com condição inicial de $2,5 \times 10^4$ para diferentes valores de MOI	42
4.3	Evolução das populações de células e vírus ao longo de 10 dias, com condição inicial de 5×10^4 para diferentes valores de MOI	42
4.4	Valores de α e β para diferentes condições de MOI e concentrações iniciais para o Modelo de Lotka-Volterra.	45
4.5	Valores de γ e θ para diferentes condições de MOI e concentrações iniciais para o Modelo de Lotka-Volterra.	45
4.6	Valores de α , β e ω para diferentes condições de MOI e concentrações iniciais para o Modelo de Lotka-Volterra com saturação na equação das células.	49
4.7	Valores de γ e θ para diferentes condições de MOI e concentrações iniciais para o Modelo de Lotka-Volterra com saturação na equação das células.	50
4.8	Valores de α , β e ω para diferentes condições de MOI e concentrações iniciais para o Modelo de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações.	54
4.9	Valores de γ , θ e κ para diferentes condições de MOI e concentrações iniciais para o Modelo de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações.	54
4.10	RMSE da equação das Células para os Modelos.	58
4.11	RMSE da equação dos Vírus para os Modelos.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

- hRSV** Vírus Respiratório Sincicial Humano
- SRAG** Síndrome Respiratória Aguda Grave
- H1N1** Vírus da Influenza A H1N1
- HIV** Vírus da Imunodeficiência Humana
- AIDS** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- SARS-CoV-2** Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
- Covid-19** Doença do Coronavírus 2019
- TMV** Vírus do Mosaico do Tabaco
- RNA** Ácido ribonucleico
- FCLA** Faculdade de Ciências e Letras de Assis
- SFB** Soro fetal bovino
- MMQ** Método dos Mínimos Quadrados
- PVI** Problema de Valor Inicial
- EDOs** Equações Diferenciais Ordinárias
- RMSE** Raiz do erro Quadrático Médio
- MOI** Multiplicidades de infecção
- DMEM/F-12** Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12
- DMSO** Dimetilsulfóxido
- TCID₅₀** Tissue Culture Infectious Dose 50
- PFU** Plaque Forming Unit
- RMSE** Raiz Quadrada do Erro Quadrático Médio

1 INTRODUÇÃO

Desde o início da humanidade, a interação entre homem e vírus sempre esteve presente. No início, apesar da virulência, os vírus não eram capazes de se manter infecciosos por muito tempo. Porém, conforme as civilizações se estruturaram, os vírus conseguiram se reproduzir com maior rapidez e ter maior infectividade [22].

O primeiro vírus foi descoberto pelo cientista russo Dmitri Ivanovsky em 1892, durante o estudo da doença do mosaico do tabaco, uma patologia que afetava plantas de tabaco. Ivanovsky observou que um agente infeccioso, capaz de passar por filtros que retinham bactérias, era responsável pela doença [12]. Este foi o marco inicial da virologia como campo científico. Mais tarde, em 1898, Martinus Beijerinck confirmou que o agente era um "*contagium vivum fluidum*" (um fluido contagioso vivo), denominando-o de "vírus" [3].

Desde então, muitos vírus foram descobertos, abrangendo um vasto espectro de organismos hospedeiros, incluindo humanos, plantas, animais e até bactérias (infectadas por vírus conhecidos como bacteriófagos). Estes patógenos variam em estrutura, genoma e mecanismos de infecção, desempenhando papéis importantes tanto em doenças como na ecologia global [9].

No decorrer da história, muitas pandemias e epidemias foram causadas por vírus, que infectaram parte da população, como, a peste de Atenas (430 a.C), a gripe espanhola (1919), AIDS (década de 80 até os dias atuais) e mais recentemente a Covid-19 (2019). Especula-se que os vírus da varíola e do sarampo são os agentes patogênicos responsáveis pela peste de Atenas, já a gripe espanhola e a Covid-19 tem como agentes patogênicos vírus respiratórios, H1N1 e o SARS-CoV-2, respectivamente [23].

Outro vírus respiratório, motivo de preocupação constante das organizações mundiais de saúde, é o Vírus Respiratório Sincicial Humano (hRSV). Este vírus é uma das principais causas de infecções no trato respiratório em crianças, menores de 5 anos, idosos e pessoas imunossuprimidas. Estimasse um total de 33 milhões de novos casos ao ano, levando um total de 3 milhões de hospitalizações anuais e pelo menos 199.000 mortes [13] [25]. No Brasil, até a semana epidemiológica número 18: 27/04/2025 a 03/05/2025 de 2025 [10], foram notificados 22.235 casos positivos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), destes 40,4% foram causados pelo hRSV.

Além do principal problema que o hRSV pode trazer, no caso, sua letalidade em crianças, principalmente até os 6 meses, outros problemas podem ser causados, como a bronquiolite e pneumonia. Nas regiões em desenvolvimento, a taxa de mortalidade associada ao hRSV é notavelmente elevada, principalmente devido à escassez de recursos para diagnóstico e tratamento adequados [24].

A história do hRSV demonstra a importância contínua da investigação virológica para compreender e combater doenças infecciosas. Apesar dos avanços e investimentos direcionados à busca por respostas, tratamentos e contramedidas eficazes contra o hRSV, ainda existem

lacunas no entendimento da interação entre o vírus e o hospedeiro, afetando diretamente as estratégias e ações voltadas ao desenvolvimento de uma imunidade duradoura.

Uma forma de investigar os processos e problemas reais pode ocorrer através da modelagem matemática, importante ferramenta que tem contribuído na predição de desafios biológicos e das ciências da saúde, em particular para as pesquisas epidemiológicas [33].

Os modelos matemáticos que envolvem o hRSV apresentam, em sua maioria, por objetivos explorar a transmissão, individual ou em grupo, do vírus, avaliar o desempenho das vacinas e anticorpos monoclonais, analisar o custo-efetividade dos tratamentos existentes e daqueles em estudo, prever a efetividade da imunidade parcial e o risco de reinfecção com diminuição da imunidade ao longo do tempo [19, 15].

Até o momento, a literatura científica tem se mostrado inconclusa e falha no que diz respeito ao estudo e aplicação da modelagem matemática, alimentada por dados experimentais, e que descreva o processo de infecção e disseminação das partículas virais do hRSV *in vitro*, ou seja, um sistema que indique a progressão do processo de infecção viral na cultura celular, de forma que os pesquisadores possam determinar tempo, carga viral e virulência para o vírus colapsar o sistema de células ou estas se recuperarem da infecção. O monitoramento e o controle dos parâmetros citados são de extrema importância no desenvolvimento de estudos que visam a testagem de novas drogas antivirais, os quais se iniciam em sistemas mais simples de cultura celular e avançam para sistemas mais complexos, *in vivo*, quando promissores.

Um dos modelos matemáticos mais usados para representar a dinâmica da interação entre populações em um ecossistema, o modelo matemático de Lotka-Volterra, que permite uma avaliação da competição de duas espécies em diferentes condições [1, 20].

Modelos do tipo presa-predador, como os de Lotka-Volterra, podem modelar a interação entre as espécies no ambiente em que convivem [1, 20]. Portanto, considerando que a interação entre células e vírus representa a dinâmica entre duas populações, de tal forma que células e vírus permitem a analogia como presas e predadores [23], respectivamente, um sistema de equações diferenciais ordinárias, que dispõe das equações do modelo de Lotka-Volterra, pode vir a modelar tal situação.

Assim, ajustar um modelo conhecido, baseado em dados experimentais reais, com a hipótese de prever as interações entre células e vírus, poderá apontar características subliminares da dinâmica que envolve células e vírus e assim contribuir com a área da virologia.

Portanto, este trabalho adaptou um modelo matemático, do tipo Lotka-Volterra, aos dados experimentais da infecção de células de origem pulmonar humana, A549, provocadas pelo vírus hRSV.

Para atingir os objetivos gerais, os seguintes objetivos específicos foram atendidos:

- Adaptar o modelo Lotka-Volterra;
- Ajustar os parâmetros vinculados aos dados experimentais laboratoriais em diferentes situações;

- Implementar o modelo numericamente;
- Analisar e confrontar a resposta do modelo obtido com os dados experimentais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO

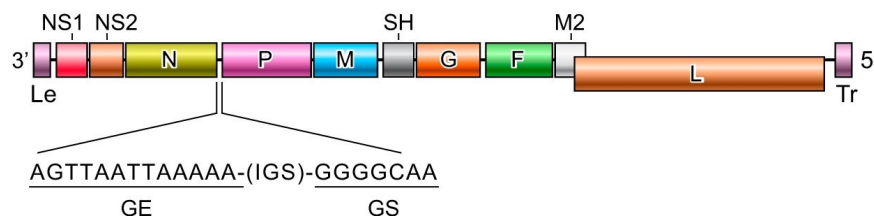
As SRAG são as principais causas de morbidade e mortalidade em crianças menores de 5 anos, idosos e indivíduos imunocomprometidos em todo o mundo. O hRSV é um dos principais agentes microbianos conhecidos por causar as SRAG [11].

A infecção provocada pelo hRSV é altamente contagiosa e pode chegar a afetar quase 70% dos bebês antes do primeiro ano de vida e quase 100% das crianças com até 2 anos. Este vírus se espalha rapidamente via inalação de gotículas aerossolizadas de partículas virais infecciosas, ou diretamente através do contato dessas gotículas com a mucosa ocular [11].

O hRSV é responsável por cerca de 45% das hospitalizações e óbitos em crianças com menos de 6 meses [28], sendo considerado a principal causa de internações pediátricas e a segunda maior causa de mortalidade infantil no mundo [27]. No Brasil, até a semana epidemiológica número 18: 27/04/2025 a 03/05/2025 de 2025, foram notificados 1.289 óbitos de SRAG, destes 5,3% foram causadas pelo hRSV [10].

A Figura 2.1 representa a organização genômica do hRSV, cujo genoma de RNA de fita única negativa, possui 10 genes e codifica 11 proteínas. As proteínas NS1 e NS2 inibem a resposta imune do hospedeiro; M2-1/2 tem papéis de regulação na replicação do RNA; F é essencial para a entrada do vírus nas células; G atua como um receptor, contribuindo para a evasão imune; M colabora para a liberação de novas partículas virais; N, P e L são fundamentais para a replicação do genoma viral; SH está envolvida na modulação (controle e regulação) da resposta imune do hospedeiro [6].

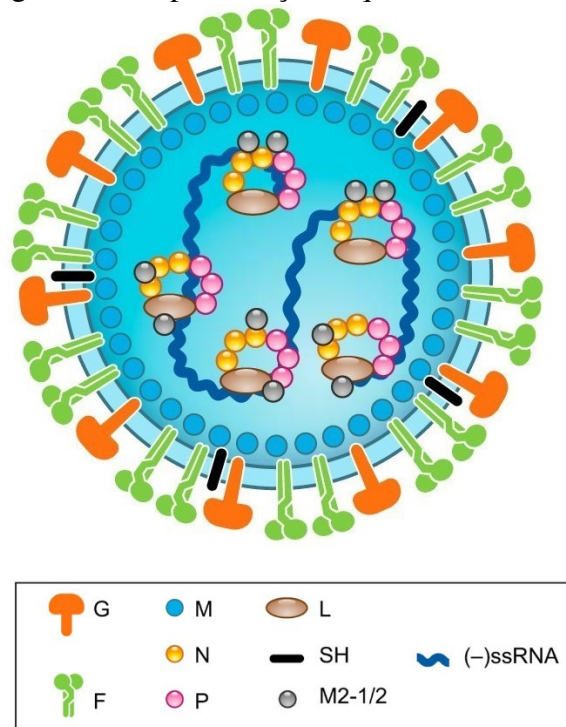
Figura 2.1: Organização genômica do hRSV.



Fonte: Adaptado [8].

Observe que a figura 2.2 mostra as proteínas G (glicoproteína de adesão), F (proteína de fusão) e SH (proteína pequena hidrofóbica), que desempenham papéis fundamentais para a infecção do vírus hRSV em sua célula hospedeira e para a evasão da resposta imune. E dentro do vírus estão os segmentos de RNA genômico de fita simples negativa (–ssRNA), além das demais proteínas [6].

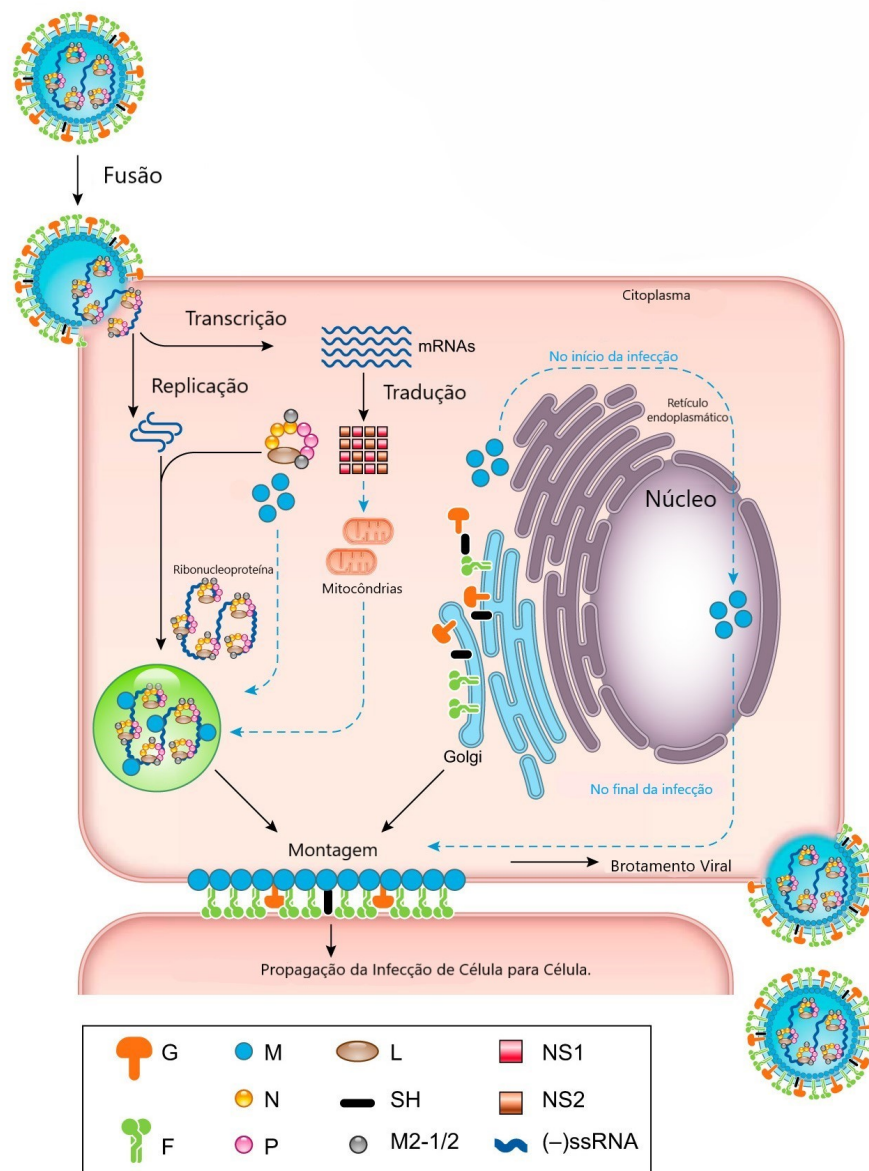
Figura 2.2: Representação esquemática do hRSV.



Fonte: Adaptado [8].

A Figura 2.3 ilustra o ciclo replicativo do hRSV em uma célula hospedeira. O processo inicia-se com a adesão do vírus à membrana celular por meio da proteína G, seguida pela fusão mediada pela proteína F, permitindo a entrada do conteúdo viral no citoplasma. Uma vez dentro da célula, o RNA genômico é liberado e associado a proteínas virais como N, P, L e M2-1. Dessa forma inicia-se o processo de cópia para uma versão positiva. As proteínas estruturais são processadas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. A montagem do vírus ocorre na membrana plasmática, onde os componentes virais se organizam e o vírion é liberado por brotamento. Finalmente, o hRSV pode se espalhar diretamente para células vizinhas, facilitando a propagação da infecção no tecido respiratório [6].

Figura 2.3: Replicação do hRSV.



Fonte: Adaptado [8].

2.2 MODELAGEM MATEMÁTICA

Um modelo matemático é uma representação matemática baseada em um fenômeno do mundo real, permitindo prever resultados e compará-los com dados reais [30]. Um sistema de equações diferenciais que descreve um processo físico, químico, biológico, entre outros, é muitas vezes chamado de um modelo matemático [4].

Uma importante característica dos modelos matemáticos, é que estes podem ser mais facilmente manipulados do que os sistemas reais, ou seja, é possível analisar o fenômeno de maneira simplificada, sendo assim, inicialmente é importante identificar as partes fundamentais do sistema real, para ser considerada no modelo. O processo de resolução de problemas reais é

o objetivo final da modelagem matemática [7, 17].

Na biologia a modelagem matemática é aplicada com o intuito de investigar a relação natural que existe entre a biologia e a matemática [32].

Um dos fenômenos mais estudados em biologia é a dinâmica entre populações. A dinâmica populacional trata das mudanças na densidade e no tamanho populacional ao longo do tempo e do espaço, para compreender melhor o número de indivíduos em uma determinada população e os fatores que podem influenciar [2].

Portanto, o estudo de modelos de populações biológicas tem por finalidade compreender as relações entre as espécies e seu ambiente, competição, recursos renováveis e assim, conseguir realizar previsões práticas [20]. A lista de aplicações de modelos matemáticos na ecologia são inúmeras e cada fator ecológico pode ser escrito matematicamente no modelo para torná-lo mais próximo da realidade.

Em específico, na virologia, a modelagem matemática é aplicada para compreender e prever a dinâmica das infecções virais. Por meio de equações e modelos computacionais, é possível simular a propagação de vírus em populações, avaliar o impacto de intervenções médicas, como vacinas e tratamentos, e estudar a evolução dos patógenos. Essa abordagem quantitativa permite uma análise mais precisa dos dados epidemiológicos, ajudando a tomar decisões informadas sobre estratégias de controle e prevenção de doenças virais [29].

Assim, a aplicação de um modelo matemático refinado por meio de dados experimentais reais tem o caráter de auxiliar no monitoramento de culturas de células expostas ao vírus hRSV.

2.3 MODELO DE LOTKA-VOLTERRA

As equações de Lotka-Volterra foram propostas, individualmente, por Lotka em 1910 e por Volterra em 1926. Volterra apresentou o modelo, em seu trabalho *Variazioni e fluttuazioni del numero d'individui in specie animali conviventi*. Ele utilizou como motivação para seu trabalho a predação de uma espécie por outra para explicar os níveis oscilatórios de certas capturas de peixes no mar Adriático, para desta forma apresentar um modelo abstrato, mostrando as interações de duas populações de animais coexistentes [31]. Enquanto Lotka apresentou, em seu trabalho *Contribution to the Theory of Periodic Reactions*, o modelo em um contexto químico, descrevendo reações periódicas em sistemas químicos autocatalíticos, usando equações diferenciais que são estruturalmente similares ao que depois ficou conhecido como o modelo Lotka-Volterra [18].

O modelo de Lotka-Volterra consiste em um conjunto de duas equações diferenciais de primeira ordem e não linear que descrevem a interação entre duas espécies em um ecossistema [4].

Considerando $x(t)$ como a população de presas e $y(t)$ como a população de predadores e as inter-relações entre as populações, obtém-se que [4]:

- Na ausência de predadores, a população de presas aumenta a uma taxa proporcional à população atual, crescendo exponencialmente;
- Na ausência das presas, os predadores irão à extinção, pois estas são a sua única fonte de alimento;
- O número de encontros entre predadores e presas é proporcional ao produto das duas populações. Cada um desses encontros tende a ser benéfico ao crescimento da população de predadores e a inibir o crescimento da população de presas.

Dessa forma, as equações diferenciais do modelo de Lotka-Volterra são dadas por:

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = \alpha x - \beta xy \\ \frac{dy}{dt} = -\gamma y + \theta xy \end{cases} \quad (2.1)$$

em que:

- x corresponde a população de presas;
- y corresponde a população de predadores;
- α representa a taxa efetiva de crescimento da população de presas na ausência de predadores;
- γ é a taxa de mortalidade da população de predadores na ausência de presas;
- β é a taxa de decréscimo da população de presas em decorrência dos encontros com os predadores;
- θ é a taxa de crescimento populacional dos predadores devido à predação.

Os pontos críticos do sistema de equações 2.1 são dados pelas soluções de:

$$x(\alpha - \beta y) = 0 \quad \text{e} \quad y(\gamma - \theta x) = 0, \quad (2.2)$$

sendo assim, tem-se os seguintes pontos críticos $(0, 0)$ e $\left(\frac{\gamma}{\theta}, \frac{\alpha}{\beta}\right)$.

Examinando a vizinhança do ponto crítico $(0, 0)$, pode-se escrever o sistema na forma

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha & 0 \\ 0 & \gamma \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix}, \quad (2.3)$$

assim, os autovalores e autovetores são:

$$r_1 = \alpha \quad \xi^{(1)} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix} \quad r_2 = -\gamma \quad \xi^{(2)} = \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix}, \quad (2.4)$$

de modo que a solução geral, é dada por:

$$\begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix} = c_1 \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix} e^{at} + c_2 \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix} e^{-ct}, \quad (2.5)$$

e observando a dinâmica na vizinhança de $\left(\frac{\gamma}{\theta}, \frac{\alpha}{\beta}\right)$, obtém-se a matriz Jacobiana:

$$J = \begin{bmatrix} \alpha - \beta y & -\alpha x \\ \theta y & -\gamma + \theta x \end{bmatrix}. \quad (2.6)$$

Considerando $u = x - \left(\frac{\gamma}{\theta}\right)$ e $v = y - \left(\frac{\alpha}{\beta}\right)$, e calculando J em $\left(\frac{\gamma}{\theta}, \frac{\alpha}{\beta}\right)$, chega-se ao sistema linear aproximado

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} u \\ v \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & \frac{-\beta\gamma}{\theta} \\ \frac{\theta\alpha}{\beta} & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} u \\ v \end{bmatrix}. \quad (2.7)$$

Do sistema 2.7, obtém-se os autovalores $r = \pm\sqrt{\alpha\gamma}$, de modo que o ponto crítico é um centro estável para o sistema linear. Para encontrar as trajetórias do sistema 2.7, pode-se dividir a segunda equação pela primeira:

$$\frac{dv}{du} = \frac{\frac{dv}{dt}}{\frac{du}{dt}} = -\frac{\left(\frac{\theta\alpha}{\beta}\right)u}{\left(\frac{\beta\gamma}{\theta}\right)v} \quad (2.8)$$

ou

$$\theta^2 \alpha u du + \beta^2 \gamma v dv = 0, \quad (2.9)$$

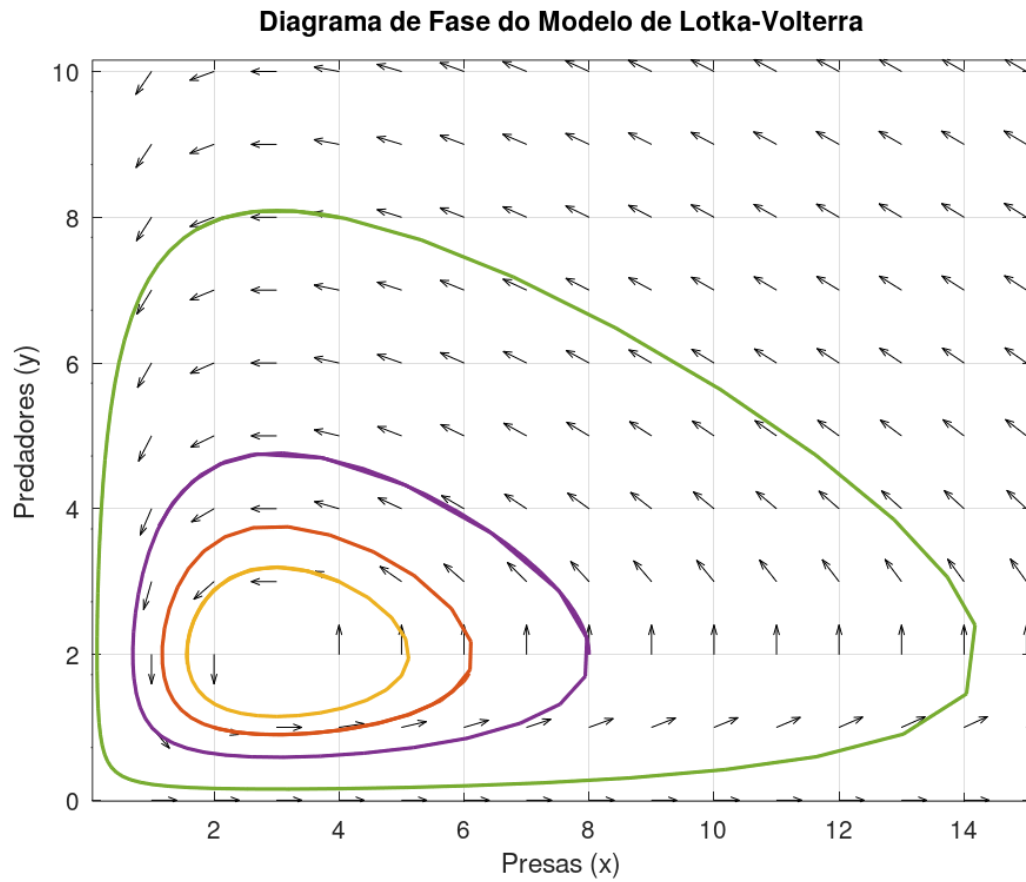
em consequência,

$$\theta^2 \alpha u + \beta^2 \gamma v = k, \quad (2.10)$$

em que k denota uma constante de integração não negativa.

A Figura 2.4 apresenta o diagrama de fase para o sistema descrito na Equação 2.1. Observa-se que, para condições iniciais próximas ao centro do vórtice do campo vetorial, as oscilações populacionais de presas e predadores são relativamente pequenas. Entretanto, à medida que o ponto inicial se afasta do equilíbrio, as oscilações tornam-se mais pronunciadas, com amplitudes significativamente maiores, evidenciando a sensibilidade do sistema às condições iniciais e a dinâmica não linear característica do modelo de Lotka-Volterra.

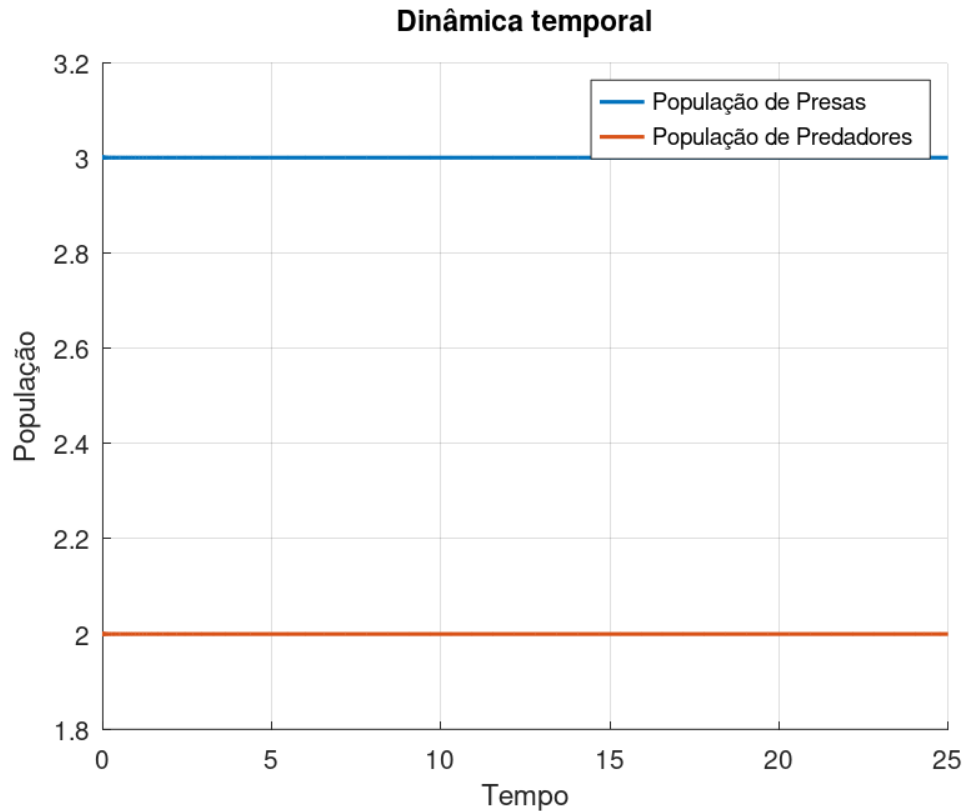
Figura 2.4: Diagrama de Fases - Modelo de Lotka-Volterra para diferentes condições iniciais.



Fonte: Adaptado [4].

As Figuras 2.5, 2.6 e 2.7 demonstram o comportamento das presas e dos predadores para diferentes condições iniciais. A Figura 2.5 mostra o comportamento com as populações iniciais sendo as coordenadas do ponto crítico, neste caso não há alteração populacional, uma vez que este ponto é a estabilidade deste sistema.

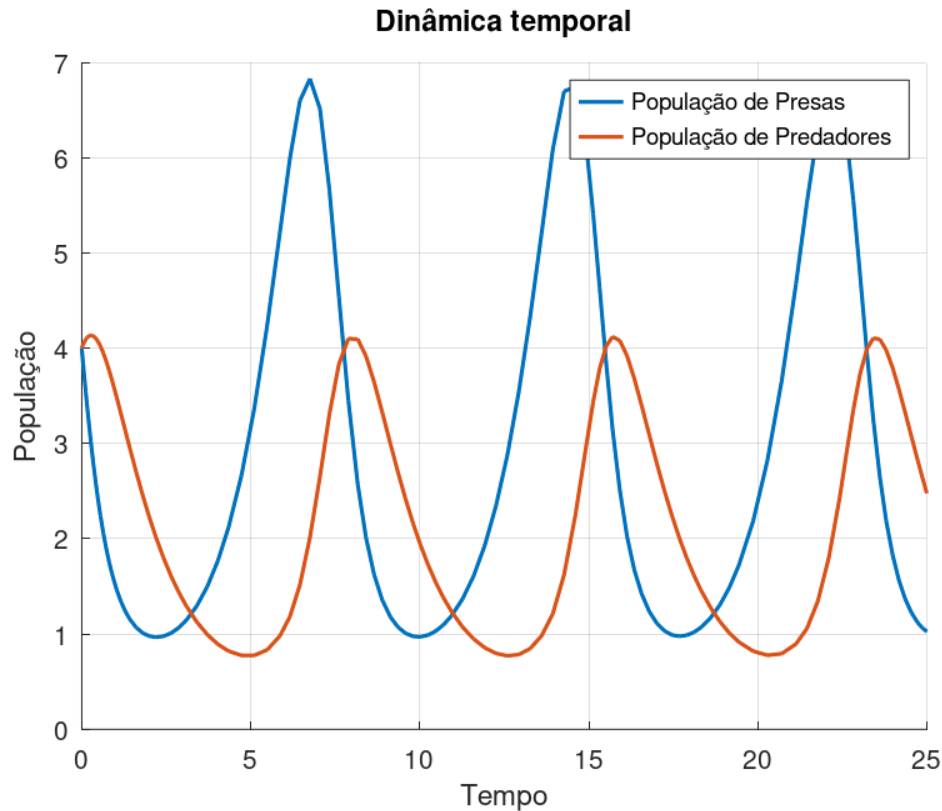
Figura 2.5: Modelo do Lotka-Volterra com condições iniciais correspondentes ao ponto crítico.



Fonte: Adaptado [4].

Distanciando-se do ponto crítico, ou seja, as populações iniciando fora do ponto de equilíbrio, observa-se que o sistema Lotka-Volterra manifesta oscilações características em torno do equilíbrio, Figura 2.6. Essas oscilações refletem a interação dinâmica entre as populações de presas e predadores, em que ambas crescem e diminuem ciclicamente ao longo do tempo. Isso significa que, mesmo começando de uma posição não ideal, o sistema segue trajetórias fechadas no espaço de fase, refletindo sua natureza conservativa. À medida que o tempo avança, o comportamento oscilatório torna-se mais evidente, com o sistema exibindo ciclos que ilustram o aumento das presas seguido pelo crescimento dos predadores, e subsequente declínio de ambas as populações. Esse comportamento reforça a sensibilidade das trajetórias às condições iniciais e destaca como o afastamento do equilíbrio pode alterar temporariamente a amplitude e a forma das oscilações, sem comprometer a estabilidade global do sistema.

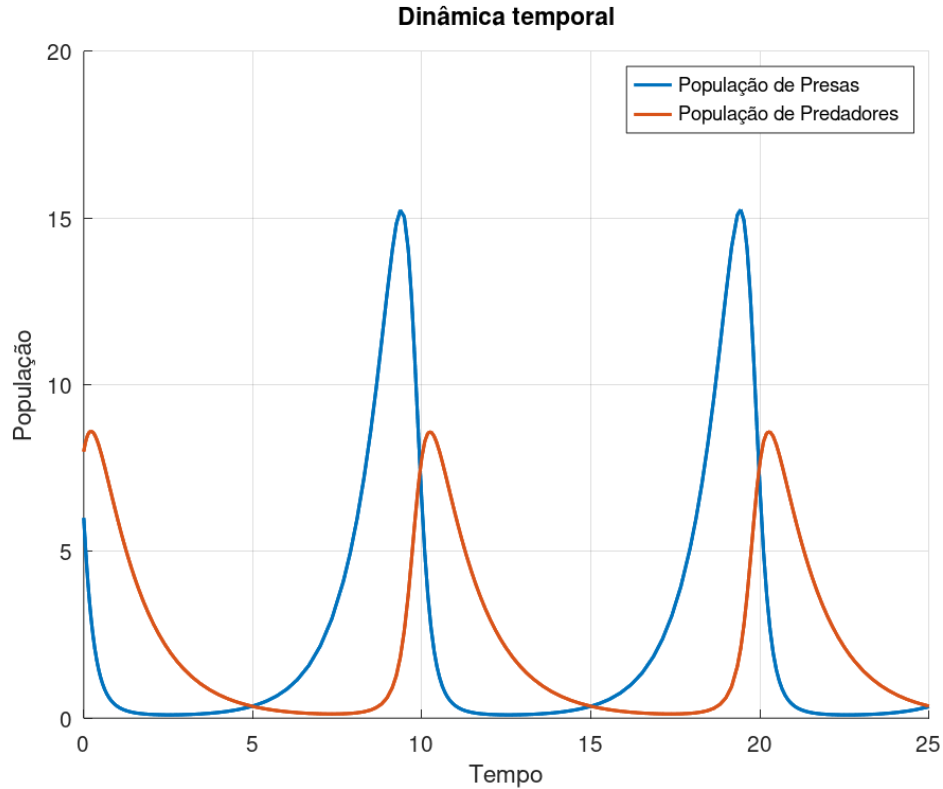
Figura 2.6: Modelo do Lotka-Volterra com condições iniciais próximas ao ponto de equilíbrio.



Fonte: Adaptado [4].

Quando o ponto inicial se afasta do ponto crítico, como ilustrado na Figura 2.7, observa-se que a característica cíclica do sistema é preservada. No entanto, as oscilações passam a exibir amplitudes significativamente maiores, resultando em máximos e mínimos mais acentuados nas populações de presas e predadores. Esse comportamento evidencia que, quanto mais distante do equilíbrio inicial, maior é a intensidade das flutuações, destacando extremos que refletem períodos de abundância seguidos por quedas mais drásticas. Esse padrão reforça a dinâmica não linear do modelo Lotka-Volterra, em que a energia do sistema é redistribuída ao longo de ciclos de amplitude variável.

Figura 2.7: Modelo do Lotka-Volterra com condições iniciais distantes do ponto de equilíbrio.



Fonte: Adaptado [4].

2.4 MODELO DE LOTKA-VOLTERRA COM EXTINÇÃO

O modelo de Lotka-Volterra com extinção, consiste na utilização de um termo de saturação para inibir o crescimento das espécies, dessa forma, o modelo pode apresentar extinção nas presas, nos predadores ou em ambos, dependendo da equação em que o termo for acrescentado [21].

O modelo de Lotka-Volterra com extinção das presas, apresenta o termo de saturação $-\omega x^2$ na primeira equação, que consiste em:

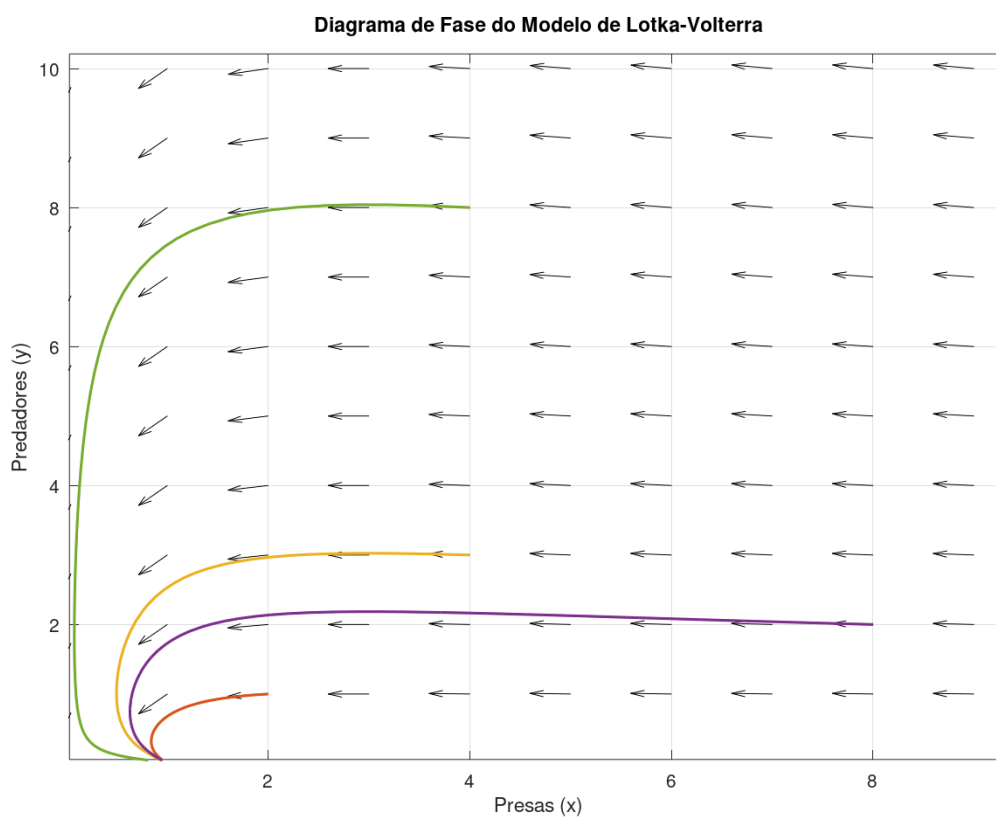
$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = \alpha x - \beta xy - \omega x^2 \\ \frac{dy}{dt} = -\gamma y + \theta xy \end{cases}, \quad (2.11)$$

em que $\alpha, \beta, \gamma, \theta$ seguem as definições apresentadas para a equação 2.1 e ω é o termo de saturação das presas.

O valor de ω deve ser o suficiente para prever a extinção das presas, uma vez que, valores baixos fazem com que o sistema busque por estabilidade populacional das espécies [21].

A figura 2.8 mostra o diagrama de fases para diversas condições iniciais, observa-se a tendência de estabilidade está no ponto de intersecção das curvas.

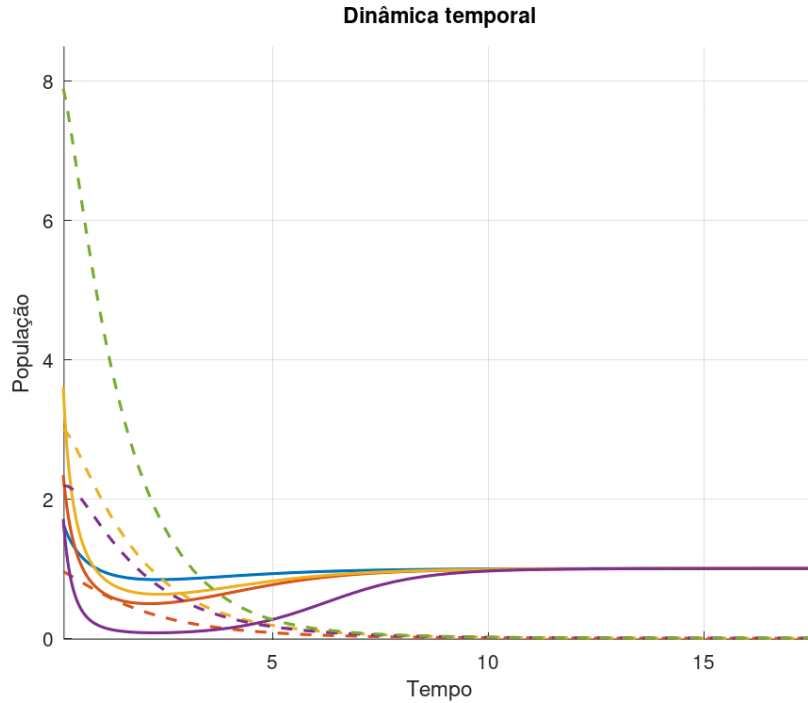
Figura 2.8: Diagrama de fases do Modelo de Lotka-Volterra com termo de saturação na equação das células para diversas condições iniciais.



Fonte: Autor.

A Figura 2.9 apresenta a evolução das populações de presas e predadores ao longo do tempo. Observa-se que, os predadores tendem progressivamente a extinção devido à taxa de mortalidade. Em contrapartida, a população de presas cresce até atingir um nível de saturação.

Figura 2.9: Dinâmica temporal do Modelo de Lotka-Volterra com termo de saturação na equação das presas para diferentes condições iniciais, em que linhas contínuas indicam populações de presas e linhas descontínuas indicam populações de predadores.



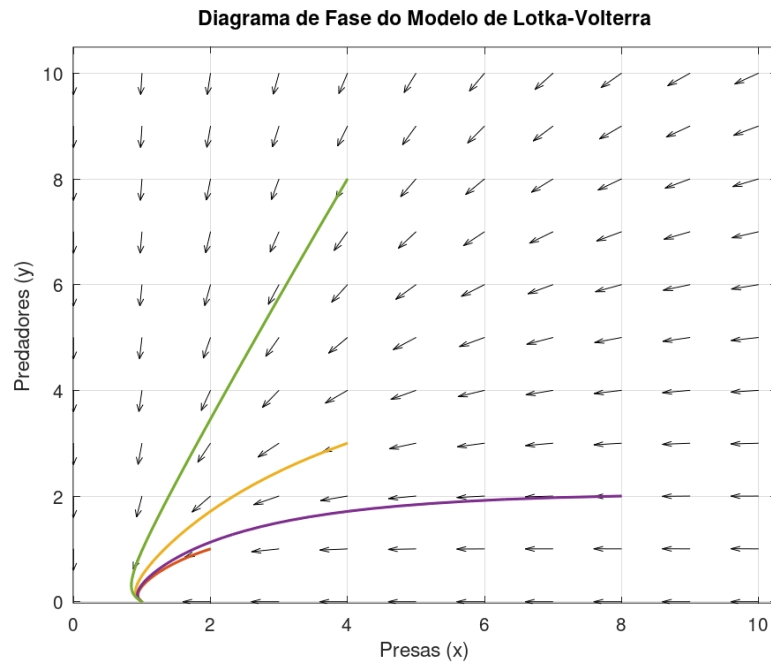
Fonte: Autor.

Outra possibilidade para o modelo de Lotka-Volterra com extinção é utilizar o termo de saturação em ambas as equações, dessa forma, os termos $-\omega x^2$ e $-\kappa y^2$ são adicionados na primeira e segunda equação, respectivamente, logo o sistema é dado por:

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = \alpha x - \beta xy - \omega x^2 \\ \frac{dy}{dt} = -\gamma y + \theta xy - \kappa y^2 \end{cases} \quad (2.12)$$

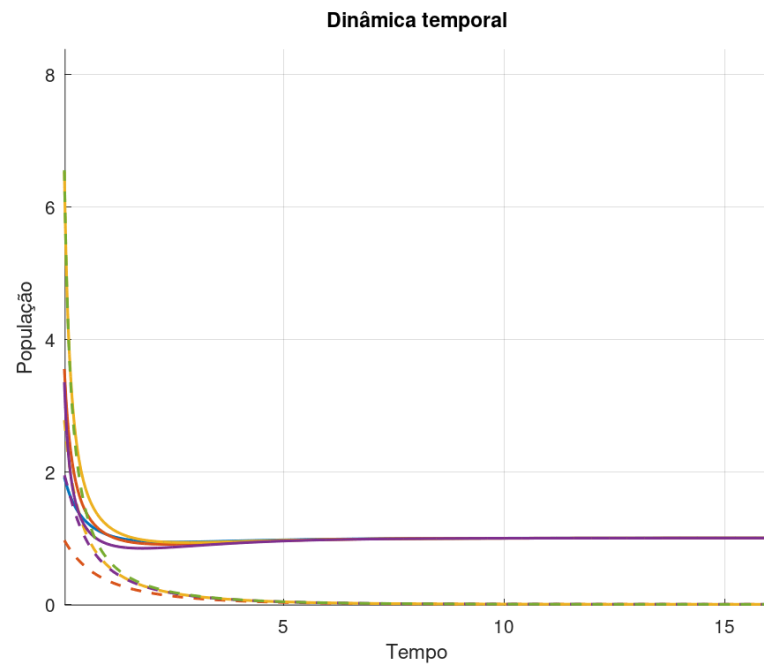
A dinâmica do sistema 2.12 é semelhante ao sistema 2.11, em que ambos os principais pontos de equilíbrio são semelhantes, sendo eles, $(x, y) = (0, 0)$, $(x, y) = (1, 0)$, porém, com o termo de saturação na segunda equação, a extinção da população de predadores e a estabilidade da população de presas acontece de forma mais rápida, as figuras 2.10 e 2.11 mostram essas situações.

Figura 2.10: Diagrama de fases do modelo de Lotka-Volterra com termo de saturação em ambas as equações.



Fonte: Autor.

Figura 2.11: Dinâmica temporal do Modelo de Lotka-Volterra com termo de saturação em ambas as equações, em que linhas contínuas indicam populações de presas e linhas descontínuas indicam populações de predadores.



Fonte: Autor.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados experimentais utilizados neste trabalho foram cedidos pelo Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da Faculdade de Ciências e Letras de Assis (FCLA), da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Unesp/Assis, sob a coordenação da Prof^a. Dr^a. Karina Alves de Toledo. Os experimentos laboratoriais foram executados pela aluna de iniciação científica Gabriela Kimi Okamoto Ohashi, do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da FCLA-Unesp, sob a orientação da Profa. Dra. Karina Alves de Toledo.

Para a modelagem matemática, desenvolvimento e programação dos algoritmos, experimentos computacionais e análises estatísticas foi utilizado o software Octave 10.2.0.

3.1 COLETA DE DADOS

Cultura celular

Foram utilizadas células da linhagem A549, de origem do epitélio pulmonar humano derivadas de adenocarcinoma, obtidas a partir do Banco de Dados de Células do Rio de Janeiro (BCRJ ref. 0101). As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 25cm², em estufa umedecida a 37°C e 5% de CO₂ e meio de cultura DMEM F12 (Sigma ref. D8900-10X1L), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab ref. 0521-500) e acrescido de antibióticos e antimicóticos (Life ref. 15240-062). As células A549 foram escolhidas com base na literatura, por serem células oriundas do trato respiratório humano e por serem permissivas à infecção pelo vírus hRSV [19].

Estoque viral

Foi utilizada cepa Long do vírus hRSV, cedido pelo Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP). O vírus foi amplificado em cultura de células A549 e os estoques virais foram preparados em meio de cultivo DMEM- F12, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). Após a coleta, as alíquotas virais foram congeladas na presença de Trealose 10%, tituladas e mantidas em freezer -80°C até o momento de uso. O título viral foi estabelecido pelo método de formação de placas de lise como descrito por McKimm-Breschkin [20] e confirmado pelo ensaio de TCID₅₀ [21].

Protocolo de infecção

As células A549 foram cultivadas em placas de 96 poços, com 1×10^4 , $2,5 \times 10^4$ ou 5×10^4 células por poço. Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com o vírus (Multiplicidade de infecção (MOI) 0.1, 0.5 e 1) 37°C e 5% de CO₂. Passadas as duas horas de incubação, os poços foram completados com meio DMEM-F12 sem SFB e a placa foi devolvida à estufa.

Avaliação da Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi medida a cada dia de infecção ao longo de um período de 10

dias. A viabilidade foi medida utilizando um ensaio colorimétrico com sal de MTT (1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-Diphenylformazan Thiazolyl blue formazan, Sigma ref. M2003). O MTT foi diluído em PBS seguindo a concentração recomendada pelo fabricante (0,5 mg/ml) num volume final de 50 μ l/poço. Para a realização do ensaio, o meio de cultivo foi removido e o sobrenadante foi congelado para futura determinação do título viral. Foram adicionados 50 μ l/poço da solução com sal de MTT, com a qual as células foram incubadas por 1h em estufa a 37°C. Em seguida, a solução de MTT foi removida e foram adicionados 50 μ l de dimetilsulfóxido puro (DMSO, Sigma ref. D4540-1L) para solubilização dos cristais de formazana, que resultam da metabolização do MTT pela mitocôndria das células. A absorbância da solução foi mensurada utilizando equipamento de espectrofotometria (MultiskanTM FC Microplate Photometer, ref. 51119000) a 560 nm (referente a coloração azulada resultante da metabolização do sal). A viabilidade celular é inferida através da absorbância, porque o sal de MTT é metabolizado na mitocôndria de células viáveis. Desse modo, quanto maior a metabolização mais intensa será a cor arroxeada da solução, resultante dos cristais de formazana, produto dessa metabolização. Como controle, foram utilizadas células não infectadas e sua viabilidade celular foi considerada de 100%.

Protocolo de congelamento dos sobrenadantes

Os sobrenadantes coletados nos ensaios de viabilidade celular foram congelados para futura determinação do título viral. O meio de congelamento foi preparado utilizando DMEM-F12 com fenol, 20% de soro fetal bovino e 20% trealose. Após a preparação, o meio de cultura foi esterilizado por filtração, uma vez que, devido à presença de açúcares, não é possível submetê-lo à autoclavagem. As alíquotas foram coletadas em eppendorfs de 1,5mL identificados com a concentração inicial de células/poço, com o MOI e com o dia de infecção. O sobrenadante e o meio de congelamento foram adicionados em partes iguais e as alíquotas foram congeladas em freezer -80°C até o momento do ensaio da avaliação do título viral.

Avaliação do Título Viral

O título viral foi mensurado em ensaios de placa observando-se o efeito citopático ao final de 3 dias. Para isso, as células A549 foram cultivadas em placas de 96 poços. Após 24h de plaqueamento, as células foram inoculadas com uma diluição de 15 μ l das alíquotas congeladas e 5 μ l de DMEM-F12, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), com volume total de 20 μ l em estufa a 37°C. Foi utilizada essa diluição (1:4) pois ela apresentou valores de mortalidade celular próximos a 50%. Após 2h de incubação, os poços foram completados com 180 μ l de meio de cultivo DMEM-F12, sem SFB. Para o controle, foram utilizadas células não infectadas. A cultura foi mantida por três dias e o efeito citopático avaliado usando o método de adição do sal de MTT [21].

3.2 PROCESSAMENTO DE DADOS

Dados das células

Para os cinco primeiros dias de infecção analisados, foram realizados 4 experimentos em duplicata. Para os cinco últimos dias de infecção analisados, foram realizados 2 experimentos em duplicata. Como resultado do ensaio colorimétrico com sal de MTT, são obtidas absorvâncias a partir da leitura do espectrofotômetro. As absorvâncias devem ser convertidas em porcentagem de viabilidade celular. Para isso, uma leitura de um poço vazio com DMSO foi realizada, que resultou em absorvância de 0,049. Essa absorvância foi descontada das leituras dos poços com células. Assim, a porcentagem de viabilidade celular foi calculada como na equação:

$$\text{viabilidade} = \frac{100(\text{absorvância} - 0,049)}{(\text{média do controle} - 0,049)} \quad (3.1)$$

Tabela 3.1: Média da viabilidade (%) para diferentes condições de densidade celular (CC) e multiplicidade de infecção (MOI).

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
CC 1×10^4										
MOI 0.1	112,53	87,15	74,33	77,55	76,08	81,51	91,42	94,16	144,79	107,32
MOI 0.5	125,07	114,62	64,36	72,01	70,48	136,98	142,88	150,00	177,80	136,17
MOI 1	116,99	102,57	63,26	55,23	64,18	169,18	163,94	154,01	176,45	129,60
CC $2,5 \times 10^4$										
MOI 0.1	88,01	71,37	76,31	74,47	58,73	77,29	72,45	88,08	74,59	88,38
MOI 0.5	63,60	74,29	67,25	72,56	80,25	90,24	79,48	75,20	80,86	92,22
MOI 1	79,02	76,80	71,18	47,59	61,85	80,48	90,85	80,14	83,61	102,69
CC 5×10^4										
MOI 0.1	87,24	92,16	75,91	88,91	53,85	104,55	78,17	80,04	99,09	95,80
MOI 0.5	81,29	71,43	58,33	65,36	61,62	106,25	91,09	82,65	99,43	104,89
MOI 1	77,01	80,75	70,46	73,00	62,20	91,48	94,63	90,87	104,68	111,70

Fonte: Autor.

Na equação 3.1, a média do controle é obtida a partir das médias das duplicatas das absorvâncias do primeiro dia em específico, dos grupos controle, não infectados. O valor subtraído de 0,049 é a absorvância do poço vazio com DMSO, teoricamente equivalente a um poço com todas as células mortas, já que nesses poços não haveria atividade mitocondrial e o sal de MTT não seria metabolizado, adquirindo coloração roxa. Em seguida, multiplicando a viabilidade celular pela concentração de células, foi determinada a população de células para cada experimento. E por fim, pela média dos experimentos, foi determinada a quantidade da população de células por dia.

Dados dos vírus

Para determinar o título viral, também foi necessário converter as absorbâncias obtidas em dados de porcentagem de viabilidade celular, utilizando a equação 3.1, de forma análoga a descrita nos dados da célula. Em seguida, a viabilidade celular é então convertida em mortalidade celular, subtraindo-se a porcentagem de viabilidade celular de 100%. Os valores negativos de mortalidade são indicativos de crescimento celular e foram substituídos por zero, pois a variável mortalidade não pode ser negativa. A partir da mortalidade é calculada a $TCID_{50}$, a concentração de vírus que mata 50% das células. O Método Melhorado de Kärber foi utilizado para o cálculo da $TCID_{50}$ [16]. Apesar do Método de Reed–Muench ser o mais aplicado para esse tipo de cálculo, não foi possível utilizá-lo, pois nenhuma diluição apresentou uma taxa de infecção acima de 50%. O Método Melhorado de Kärber também fornece uma $TCID_{50}$ precisa, com um intervalo de confiança de 95% [16]. O Método Melhorado de Kärber, utiliza o logaritmo da diluição com maior efeito citopático, subtraindo dele o logaritmo do fator de diluição multiplicado pelo somatório das taxas de infecção menos 0,5, de modo a obter o valor de $logID_{50}$:

$$logID_{50} = \log(a) - \log(b) \times \left(\sum(c) - 0,5 \right) \quad (3.2)$$

em que:

- a : diluição com maior efeito citopático ¹;
- b : fator de diluição;
- c : taxa de infecção;

e tem-se que, $a = 2^{-1}$ (diluição do maior CPE); $b = 2$; e c é a mortalidade celular [28].

A $TCID_{50}$ é obtida elevando 10 ao $logID_{50}$ e dividindo o valor obtido pelo volume de inóculo utilizado, 20 μ l (0,02 ml):

$$TCID_{50} = \frac{10^{logID_{50}}}{0,02} \quad (3.3)$$

Por fim, o valor da Unidade Formadora de Placas (Plaque-Forming Unit) (PFU)/ml, usada para medir a quantidade de partículas virais infecciosas, pode ser obtido multiplicando a $TCID_{50}$ por 0,69:

$$PFU/ml = TCID_{50} \times 0,69. \quad (3.4)$$

¹Citopático é um termo referido ao efeito citopático (CPE), ou seja, as alterações morfológicas que ocorrem nas células hospedeiras quando infectadas por vírus.

Para se obter a generalização, a taxa de infecção foi considerada de 0 a 100, em intervalos de 10, em seguida o equacionamento apresentado pelas equações (3.2), (3.3) e (3.4) foi aplicado para a determinação do PFU/ml. Desta maneira foi possível obter uma curva polinomial de ajuste e fazer a correspondência das taxas de infecção e PFU/ml dos experimentos. O algoritmo implementado interpolou polinômios de grau 1 a 10 para verificar qual curva se ajustava melhor aos dados. Considerando $R^2 = 1$ e $RMSE = 0,0915$ entre taxa de infecção versus PFU/ml e o polinômio interpolador, processamento e simplicidade, o polinômio do segundo grau foi considerado para determinar os valores de PFU/ml dos experimentos:

$$y = 0,0016 + 0,3177x + 48,9245x^2, \quad (3.5)$$

sendo, y: PFU/ml e x: taxa de infecção.

Tabela 3.2: Morte celular (%) para diferentes condições de densidade celular (CC) e multiplicidade de infecção (MOI).

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
CC 1×10^4										
MOI 0.1	-12,53	12,85	25,67	22,45	23,92	18,49	8,58	5,84	-44,79	-7,32
MOI 0.5	-25,07	-14,62	35,64	27,99	29,52	-36,98	-42,88	-50,00	-77,80	-36,17
MOI 1	-16,99	-2,57	36,74	44,77	35,82	-69,18	-63,94	-54,01	-76,45	-29,60
CC $2,5 \times 10^4$										
MOI 0.1	11,99	28,63	23,69	25,53	41,27	22,71	27,55	11,92	25,41	11,62
MOI 0.5	36,40	25,71	32,75	27,44	19,75	9,76	20,52	24,80	19,14	7,78
MOI 1	20,98	23,20	28,82	52,41	38,15	19,52	9,15	19,86	16,39	-2,69
CC 5×10^4										
MOI 0.1	12,76	7,84	24,09	11,09	46,15	-4,55	21,83	19,96	0,91	4,20
MOI 0.5	18,71	28,57	41,67	34,64	38,38	-6,25	8,91	17,35	0,57	-4,89
MOI 1	22,99	19,25	29,54	27,00	37,80	8,52	5,37	9,13	-4,68	-11,70

Fonte: Autor.

3.3 MODELOS

Neste trabalho foram usados os modelos de Lotka-Volterra (2.1), Lotka-Volterra com extinção das presas (2.11) e Lotka-Volterra com extinção das presas e predadores (2.12). Sendo as presas as células e os predadores os vírus.

O modelo de Lotka-Volterra com extinção dos predadores não foi considerado uma vez que não foi observado nos experimentos laboratoriais a extinção dos vírus mesmo com a existência das células.

A seção 2 nos item 2.3 e 2.4 apresenta detalhes sobre tais modelos que foram utilizados.

3.4 MÉTODO DAS INTEGRAIS

Os parâmetros dos modelos de Lotka-Volterra foram estimados pelo método das integrais tendo como base os resultados dos experimentos laboratoriais.

A apresentação do método das integrais e a dedução abaixo foram baseados em [14]. Seja o sistema de Lotka-Volterra para n Espécies:

$$\frac{dX_i}{dt} = X_i(a_{i0} + \sum_{r=1}^n a_{i,r}X_r), \quad (3.6)$$

sendo $i = 1, 2, \dots, n$.

As taxas de mudança no tamanho populacional de cada uma das n espécies são representadas por $\frac{dX_i}{dt}$. Os parâmetros a_{i0} descrevem o crescimento populacional intrínseco ($a_{i0} > 0$) ou declínio ($a_{i0} < 0$) na ausência das outras espécies. Já os parâmetros $a_{i,r}$ poderiam ser positivos, negativos ou zero, e refletiriam se as espécies interagem em termos de predação, competição, mutualismo ou sem interação.

Integrando ambos os lados da equação 3.6 em relação a t , no intervalo $[t_0, t_k]$, obtém-se:

$$\int_{t_0}^{t_k} \frac{dX_i}{dt} dt = X_i(t)|_{t_0}^{t_k} = \int_{t_0}^{t_k} X_i(t)(a_{i0} + a_{i1}X_1 + a_{i2}X_2 + \dots + a_{in}X_n) dt \quad (3.7)$$

sendo $i = 1, 2, \dots, n$.

O intervalo $[t_0, t_k]$ pode ser dividido em k subintervalos:

$$X_i(t)|_{t_j}^{t_{j+1}} = \int_{t_j}^{t_{j+1}} X_i(t)(a_{i0} + a_{i1}X_1 + a_{i2}X_2 + \dots + a_{in}X_n) dt \quad (3.8)$$

sendo $i = 1, 2, \dots, n$ e $j = 0, 1, 2, \dots, (k-1)$.

Então:

$$\begin{aligned} X_i(t_{j+1}) - X_i(t_j) = & a_{i0} \int_{t_j}^{t_{j+1}} X_i(t) dt + a_{i1} \int_{t_j}^{t_{j+1}} X_i(t)X_1 dt + a_{i2} \int_{t_j}^{t_{j+1}} X_i(t)X_2 dt + \\ & \dots + a_{in} \int_{t_j}^{t_{j+1}} X_i(t)X_n dt \end{aligned} \quad (3.9)$$

sendo $i = 1, 2, \dots, n$ e $j = 0, 1, 2, \dots, (k-1)$.

Neste trabalho, o experimento consistiu em medições diárias, sendo $t_{j+1} - t_j = 1$. Utilizando o método do trapézio para calcular as integrais, obtém-se:

$$\begin{aligned}
a_{i0} \int_{t_j}^{t_{j+1}} X_i(t) dt &\approx \frac{(t_{j+1} - t_j)}{2} [a_{i0}(X_i(t_{j+1}) + X_i(t_j))] \\
&= \frac{a_{i0}}{2} [X_i(t_{j+1}) + X_i(t_j)]; \\
a_{i1} \int_{t_j}^{t_{j+1}} X_i(t) X_1(t) dt &\approx \frac{(t_{j+1} - t_j)}{2} [a_{i1}(X_i(t_{j+1})X_1(t_{j+1}) + X_i(t_j)X_1(t_j))] ; \\
&= \frac{a_{i1}}{2} [X_i(t_{j+1})X_1(t_{j+1}) + X_i(t_j)X_1(t_j)]; \\
a_{i2} \int_{t_j}^{t_{j+1}} X_i(t) X_2(t) dt &\approx \frac{(t_{j+1} - t_j)}{2} [a_{i2}(X_i(t_{j+1})X_2(t_{j+1}) + X_i(t_j)X_2(t_j))] ; \\
&= \frac{a_{i2}}{2} [X_i(t_{j+1})X_2(t_{j+1}) + X_i(t_j)X_2(t_j)]; \\
&\vdots \\
a_{in} \int_{t_j}^{t_{j+1}} X_i(t) X_n(t) dt &\approx \frac{(t_{j+1} - t_j)}{2} [a_{in}(X_i(t_{j+1})X_n(t_{j+1}) + X_i(t_j)X_n(t_j))] \\
&= \frac{a_{in}}{2} [X_i(t_{j+1})X_n(t_{j+1}) + X_i(t_j)X_n(t_j)].
\end{aligned} \tag{3.10}$$

Com o conjunto de dados de X_1, X_2, \dots, X_n , o sistema de equações lineares pode ser representado em notação matricial como:

$$\begin{bmatrix} d_{i(1,0)} \\ d_{i(2,1)} \\ \vdots \\ d_{i(j+1,j)} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \overline{X_i(1,0)} & \overline{X_i X_1(1,0)} & \dots & \overline{X_i X_i(1,0)} & \dots & \overline{X_i X_n(1,0)} \\ \overline{X_i(2,1)} & \overline{X_i X_2(2,1)} & \dots & \overline{X_i X_i(2,1)} & \dots & \overline{X_i X_n(2,1)} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \overline{X_i(j+1,j)} & \overline{X_i X_n(j+1,j)} & \dots & \overline{X_i X_i(j+1,j)} & \dots & \overline{X_i X_n(j+1,j)} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_{i0} \\ a_{i1} \\ \vdots \\ a_{in} \end{bmatrix} \tag{3.11}$$

em que,

$$\begin{aligned}
\overline{X_i(j+1,j)} &= \frac{X_i(t_{j+1}) + X_i(t_j)}{2}; \\
\overline{X_i X_1(j+1,j)} &= \frac{X_i(t_{j+1})X_1(t_{j+1}) + X_i(t_j)X_1(t_j)}{2}; \\
\overline{X_i X_2(j+1,j)} &= \frac{X_i(t_{j+1})X_2(t_{j+1}) + X_i(t_j)X_2(t_j)}{2}; \\
&\vdots \\
\overline{X_i X_n(j+1,j)} &= \frac{X_i(t_{j+1})X_n(t_{j+1}) + X_i(t_j)X_n(t_j)}{2},
\end{aligned} \tag{3.12}$$

sendo $i = 1, 2, \dots, n$ corresponde aos parâmetros de cada equação diferencial referente a população da espécie X_i , $j = 0, 1, \dots, (k-1)$, corresponde ao índice dos intervalos e $d_{j+1,j} =$

$$X_i(t_{j+1}) - X_i(t_j),$$

Logo, o sistema matricial 3.11 pode ser escrito na seguinte forma:

$$d_i = X_i a_i \quad (3.13)$$

sendo $i = 1, 2, \dots, n$.

A matriz X tem k linhas e n colunas que são linearmente independentes e resolvendo esse sistema linear pode-se encontrar os parâmetros. Enquanto o vetor a_i contém os parâmetros desejados.

Assim, deve-se resolver o sistema e determinar o vetor $a = [a_{i0} \ a_{i1} \ \dots \ a_n]^T$, ou seja, a matriz a_i em $d_i = X_i a_i$. Para encontrar todos os parâmetros, tem-se n sistemas lineares para resolver, sendo cada sistema referente aos parâmetros da equação diferencial $\frac{dX_i}{dt}$ com $i = 1, 2, \dots, n$.

Considerado o sistema de equações 3.13. Seja a matriz X_i^T como a matriz transposta da matriz X , multiplicando a igualdade por X_i^T , obtém-se

$$X_i^T d_i = X_i^T X_i a_i. \quad (3.14)$$

Note que X_i é uma matriz de $k \times n$ com $\text{posto}(X_i) = k$, X_i^T é uma matriz $n \times k$ com $\text{posto}(X_i^T) = n$, sendo assim, $X_i^T X_i$ é uma matriz $n \times n$ com $\text{posto}(X_i^T X_i) = n$, logo, a matriz inversa $(X_i^T X_i)^{-1}$ existe. Com isso, é possível escrever a equação 3.14 como:

$$a_i = (X_i^T X_i)^{-1} X_i^T d_i. \quad (3.15)$$

Basta, então, utilizar os dados experimentais para cada equação diferencial e resolver os n sistemas lineares para encontrar os parâmetros necessários.

3.5 RUNGE-KUTTA DE QUARTA ORDEM

Com os parâmetros estimados, faz-se necessário implementar o modelo e resolvê-lo, observa-se que o modelo junto com suas condições iniciais enquadra-se como um problema de valor inicial. Escolheu-se o método de Runge-Kutta de quarta ordem para resolvê-lo, devido a sua precisão e ser um modelo de passo simples, uma vez que o experimento apresenta um tamanho de passo único.

A apresentação do método de Runge-Kutta de quarta ordem e a dedução abaixo foi baseada em [5], generalizando para as n equações.

Um Problema de Valor Inicial (PVI) é um sistema matemático constituído por n Equações Diferenciais Ordinárias (EDOs) de primeira ordem, juntamente com n condições iniciais,

especificadas para determinar o comportamento do sistema em um único valor da variável independente. Essas condições iniciais permitem resolver o sistema numericamente ou analiticamente.

Matematicamente, o problema de valor inicial para um sistema de n EDOs pode ser formulado da seguinte forma:

$$\begin{cases} \mathbf{y}'(x) = \mathbf{f}(x, \mathbf{y}(x)) \\ \mathbf{y}(x_0) = \mathbf{y}_0 \end{cases}, \quad (3.16)$$

em que:

- $\mathbf{y}(x) = [y_1(x), y_2(x), \dots, y_n(x)]^T$ é o vetor solução;
- $\mathbf{f}(x, \mathbf{y}) = [f_1(x, \mathbf{y}), f_2(x, \mathbf{y}), \dots, f_n(x, \mathbf{y})]^T$ é o vetor de funções que define o sistema;
- $\mathbf{y}_0 = [y_1(x_0), y_2(x_0), \dots, y_n(x_0)]^T$ são as condições iniciais do sistema.

Para resolver numericamente o sistema, utiliza-se o método de Runge-Kutta de quarta ordem, que pode ser generalizado para um vetor de equações da seguinte forma:

$$\mathbf{y}_{i+1} = \mathbf{y}_i + \frac{1}{6}(\mathbf{k}_1 + 2\mathbf{k}_2 + 2\mathbf{k}_3 + \mathbf{k}_4), \quad (3.17)$$

os vetores intermediários \mathbf{k}_1 , \mathbf{k}_2 , \mathbf{k}_3 e \mathbf{k}_4 são dados por:

$$\begin{aligned} \mathbf{k}_1 &= h \mathbf{f}(x_i, \mathbf{y}_i); \\ \mathbf{k}_2 &= h \mathbf{f}\left(x_i + \frac{h}{2}, \mathbf{y}_i + \frac{\mathbf{k}_1}{2}\right); \\ \mathbf{k}_3 &= h \mathbf{f}\left(x_i + \frac{h}{2}, \mathbf{y}_i + \frac{\mathbf{k}_2}{2}\right); \\ \mathbf{k}_4 &= h \mathbf{f}(x_i + h, \mathbf{y}_i + \mathbf{k}_3), \end{aligned} \quad (3.18)$$

em que:

- h é o passo de integração;
- x_i é o valor atual da variável independente;
- \mathbf{y}_i é o vetor solução no ponto x_i ;
- \mathbf{y}_{i+1} é o vetor solução no próximo ponto $x_{i+1} = x_i + h$.

Com esse método, o erro de truncamento local é da ordem $O(h^5)$, garantindo boa precisão para n -EDOs.

3.6 RAIZ QUADRADA DO ERRO QUADRÁTICO MÉDIO

Para análise dos resultados obtidos será utilizado a Raiz Quadrada do Erro Quadrático Médio (RMSE, do inglês *Root Mean Squared Error*), uma vez que os modelos não são lineares.

O RMSE é uma métrica utilizada para avaliar o desempenho de modelos de regressão. Ele mede a média dos quadrados das diferenças entre os valores observados (y_i) e os valores previstos (\hat{y}_i) [26], sendo definido pela seguinte fórmula:

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (3.19)$$

em que:

- y_i : Valor real ou observado;
- \hat{y}_i : Valor previsto pelo modelo;
- n : Número total de observações.

O RMSE é sempre um valor não negativo ($\text{RMSE} \geq 0$). Quanto menor o RMSE, melhor o desempenho do modelo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, são apresentados os resultados dos experimentos laboratoriais, bem como das simulações realizadas com os modelos de Lotka-Volterra propostos.

4.1 DADOS EXPERIMENTAIS

Os dados obtidos a partir dos experimentos laboratoriais estão apresentados nas tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 obtidos de acordo com a seção 3.1 e 3.2 do capítulo de Materias e Métodos.

As Tabelas apresentam os dados referentes aos experimentos laboratoriais com quantidade inicial de 1×10^4 e $2,5 \times 10^4$ e 5×10^4 células para as diferentes quantidades iniciais de vírus, sendo elas MOI 0.1 (10% de vírus em relação à quantidade inicial de células), MOI 0.5 (50% de vírus em relação à quantidade inicial de células) e MOI 1 (100% de vírus em relação à quantidade inicial de células).

Tabela 4.1: Evolução das populações de células e vírus ao longo de 10 dias, com condição inicial de 1×10^4 para diferentes valores de MOI, em que as colunas das células indicam a população de células e as colunas dos vírus indicam as partículas livres de vírus (PFU).

Dia	MOI 0.1		MOI 0.5		MOI 1	
	Célula (População)	Vírus (PFU)	Célula (População)	Vírus (PFU)	Célula (População)	Vírus (PFU)
1	9169,885	48,92459	8589,072	48,92459	9064,712	48,92459
2	7790,743	53,28201	7584,920	48,92459	5548,753	48,92459
3	6339,884	58,18284	3725,898	62,37616	1608,853	62,85669
4	4380,362	56,89938	2888,954	59,13074	1405,887	66,50226
5	1802,544	57,48220	1203,516	59,76276	701,6391	62,45395
6	3115,091	55,37092	0,000	48,92459	0,0000	48,92459
7	2194,509	51,77268	0,000	48,92459	421,6218	48,92459
8	1133,209	50,83687	0,000	48,92459	196,0784	48,92459
9	2111,253	48,92459	165,8927	48,92459	968,650	48,92459
10	272,3945	48,92459	403,029	48,92459	255,8857	48,92459

Fonte: Autor.

Tabela 4.2: Evolução das populações de células e vírus ao longo de 10 dias, com condição inicial de $2,5 \times 10^4$ para diferentes valores de MOI, em que as colunas das células indicam a população de células e as colunas dos vírus indicam as partículas livres de vírus (PFU).

Dia	MOI 0.1		MOI 0.5		MOI 1	
	Célula (População)	Vírus (PFU)	Célula (População)	Vírus (PFU)	Célula (População)	Vírus (PFU)
1	25871,38	52,97333	23108,49	62,70894	26454,98	56,32561
2	26009,03	59,39317	22463,93	58,19747	21240,77	57,1954
3	23518,45	57,39052	16249,23	61,12548	12005,34	59,47173
4	21883,69	58,1275	15467,16	58,90112	9935,604	70,17289
5	14121,7	64,88685	5300,826	55,85244	2979,903	63,48145
6	16183,4	57,00121	3963,04	52,1843	1830,351	55,76286
7	15246,43	58,94922	1824,944	56,14887	16,57729	51,9725
8	10523,01	52,94778	523,6794	57,83386	133,7133	55,89402
9	7341,239	58,07745	425,2381	55,61935	261,7008	54,58327
10	5313,688	52,84357	512,7768	51,49798	33,5751	48,92459

Fonte: Autor.

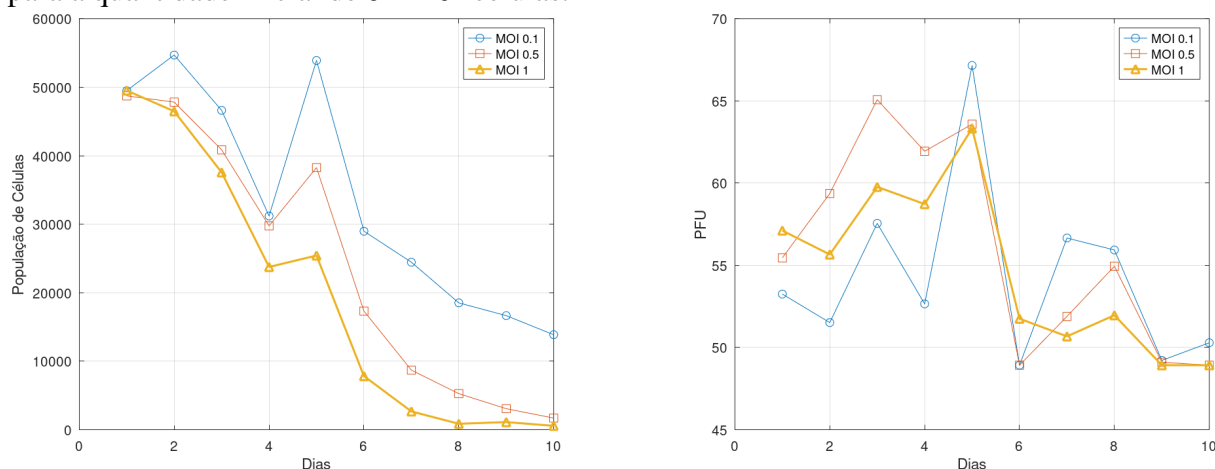
Tabela 4.3: Evolução das populações de células e vírus ao longo de 10 dias, com condição inicial de 5×10^4 para diferentes valores de MOI, em que as colunas das células indicam a população de células e as colunas dos vírus indicam as partículas livres de vírus (PFU).

Dia	MOI 0.1		MOI 0.5		MOI 1	
	Célula (População)	Vírus (PFU)	Célula (População)	Vírus (PFU)	Célula (População)	Vírus (PFU)
1	49499,79	53,25186	48728,06	55,45346	49507,69	57,11324
2	54695,55	51,51735	47823,46	59,36848	46480,61	55,65923
3	46616,83	57,55057	40860,70	65,06877	37564,25	59,76958
4	31202,63	52,65413	29762,87	61,93713	23760,75	58,72303
5	53898,59	67,15411	38259,64	63,5836	25426,9	63,32581
6	28980,32	48,92459	17319,62	48,92459	7832,439	51,75388
7	24451,79	56,6573	8702,427	51,88971	2673,691	50,67941
8	18516,78	55,93287	5267,895	54,94146	869,631	51,96385
9	16653,74	49,21613	3074,508	49,10648	1118,416	48,92459
10	13869,16	50,28998	1703,321	48,92459	568,7204	48,92459

Fonte: Autor.

Observe pelas figuras 4.1, 4.2 e 4.3 que o comportamento da célula se mostrou dependente do MOI, no início da infecção a quantidade de células permanece relativamente alta, com uma leve variação entre os dias, principalmente para MOIs menores (quantidade de vírus menor), prosseguindo para um decrescimento acentuado, principalmente entre os dias 2 ao 4. Além disso, o decrescimento, mostrou-se dependente, também, da quantidade inicial de células, uma vez que, para menor quantidade de células, o decrescimento se mostrou mais acentuado. Dessa forma, pode-se entender o padrão como, maior decrescimento das células para MOIs mais altos e concentrações iniciais mais baixas, indicando a rapidez que a infecção ocorre para abundantes quantidades iniciais de vírus.

Figura 4.1: Resultados experimentais da dinâmica populacional das células e PFU dos vírus para a quantidade inicial de 5×10^4 células.



Fonte: Autor.

Entre os dias 4 e 6, após o decrescimento, a quantidade de células volta a aumentar significativamente, principalmente para MOIs mais baixos e concentrações mais altas.

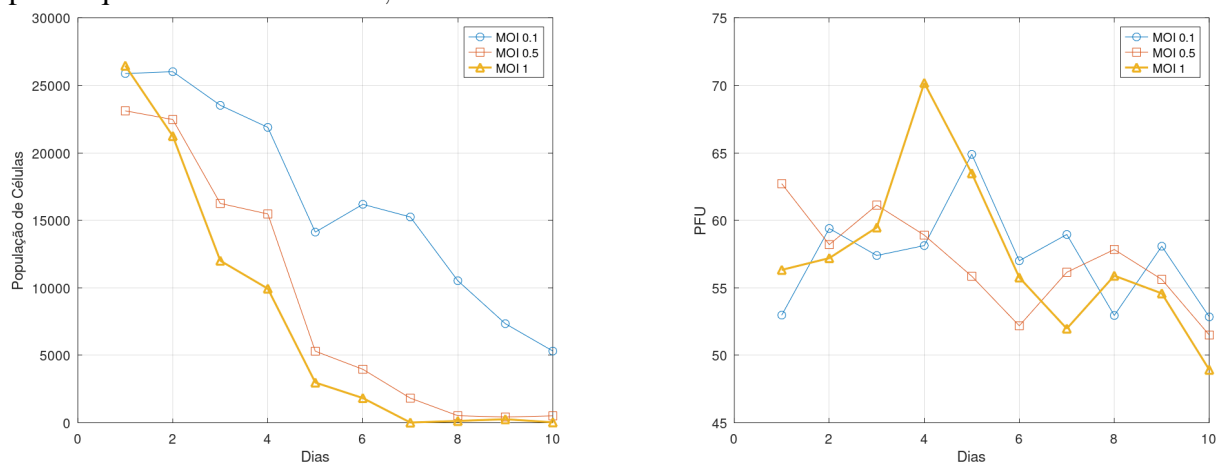
Em seguida, as células apresentam um decrescimento menor, com a tendência para extinção, assim, ao longo dos 10 dias, observa-se a diminuição no número de células, sendo nítida nos maiores MOIs, devido a uma maior quantidade de infecção viral e consequentemente um maior efeito citopático sobre as células.

A quantidade de vírus, por sua vez, não segue um padrão uniforme, pois é medido de maneira indireta através da mortalidade celular, porém, é possível notar, mesmo com grandes variações nos dados, em que o vírus apresenta um crescimento inicial seguido por seu decrescimento e tendendo a extinção.

As figuras 4.1, 4.2 e 4.3 mostram uma grande variação no PFU, principalmente nos experimentos de 5×10^4 e $2,5 \times 10^4$ células, porém observa-se que no início do experimento, há crescimento viral, isso reflete que a infecção está produzindo efeito positivo para os vírus, e mostrando a capacidade de se replicar no meio celular, com picos máximos entre os dias 3 e 5, para todas as concentrações.

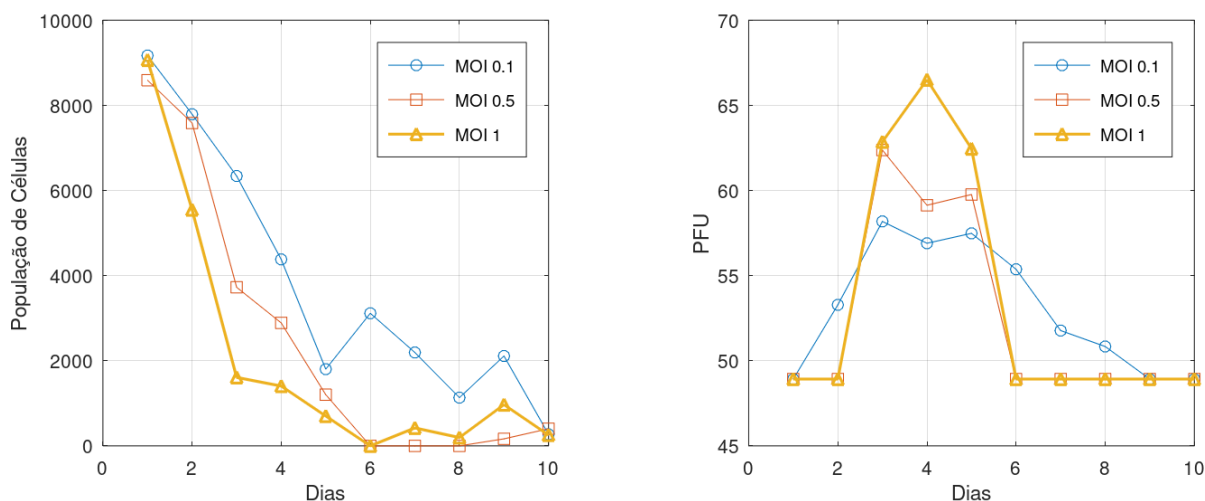
Após esse crescimento, há um decrescimento, com tendência a extinção, isso mostra, como a mortalidade das células, afeta negativamente o vírus, uma vez que o vírus necessita da célula para sua sobrevivência.

Figura 4.2: Resultados experimentais da dinâmica populacional das células e PFU dos vírus para a quantidade inicial de $2,5 \times 10^4$ células.



Fonte: Autor.

Figura 4.3: Resultados experimentais da dinâmica populacional das células e PFU dos vírus para a quantidade inicial de 1×10^4 células.



Fonte: Autor.

Os resultados das tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 foram utilizados para determinar os parâmetros referentes aos modelos de Lotka-Volterra adotados nesse trabalho, sistemas de equações 2.1, 2.11 e 2.12.

4.2 RESULTADOS DO MODELO DE LOTKA-VOLTERRA

Aplicando o Método das Integrais (capítulo 3, seção 3.4), através do sistema 3.11, utilizando o software Octave, determinou-se os parâmetros α , β , γ e θ do Modelo de Lotka-Volterra (Sistemas de equações 2.1). Em seguida, as equações foram implementadas e resolvidas numericamente pelo método de Runge-Kutta 4ª Ordem, em que, os dados de entrada são os parâmetros do modelo, os valores de x_0 (população inicial de células) e y_0 (partículas livres de vírus) foram determinados pelos dados experimentais, resolvidos em uma malha unitária, o software utilizado também foi o octave. Os valores encontrados estão nas tabelas 4.4 e 4.5.

Tabela 4.4: Valores de α e β para diferentes condições de MOI e concentrações iniciais para o Modelo de Lotka-Volterra.

MOI - Concentração	α	β
MOI 0.1 - 5×10^4	-0,538153662600144	0,007947123202883
MOI 0.5 - 5×10^4	-1,220765680855384	0,017675767686843
MOI 1 - 5×10^4	2,423809908281541	-0,045474506768853
MOI 0.1 - $2,5 \times 10^4$	0,951692794278728	-0,018337955131434
MOI 0.5 - $2,5 \times 10^4$	-10,129251846683102	0,166091160566952
MOI 1 - $2,5 \times 10^4$	1,352381561761407	-0,029026698131301
MOI 0.1 - 1×10^4	1,020706772182613	-0,023285975558795
MOI 0.5 - 1×10^4	1,668329110398169	-0,03852351996635029
MOI 1 - 1×10^4	-0,06838004861865482	-0,01021282418798803

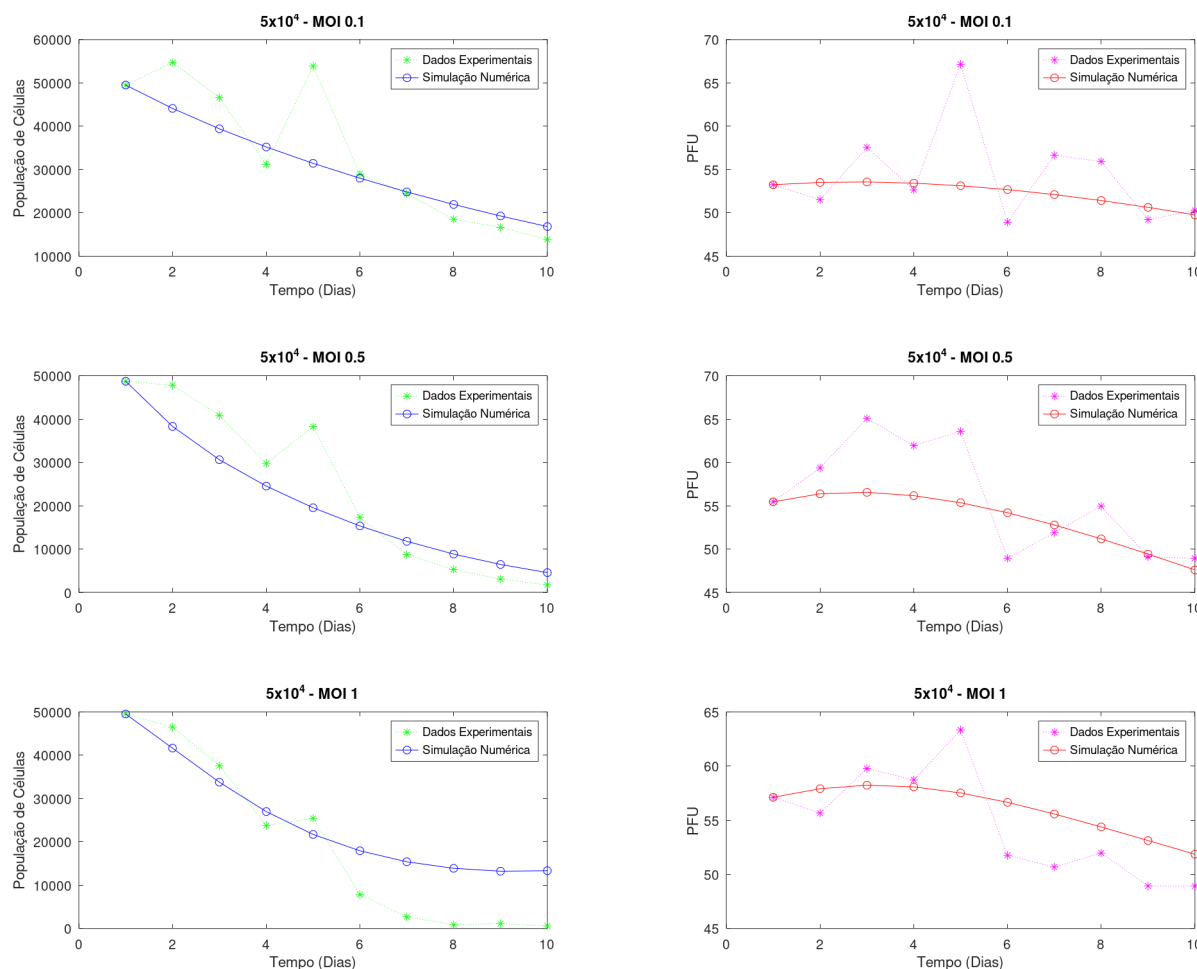
Fonte: Autor.

Tabela 4.5: Valores de γ e θ para diferentes condições de MOI e concentrações iniciais para o Modelo de Lotka-Volterra.

MOI - Concentração	γ	θ
MOI 0.1 - 5×10^4	-0,031606507925460	0,000000738082715
MOI 0.5 - 5×10^4	-0,046056430146568	0,000001281785067
MOI 1 - 5×10^4	-0,037851876147438	0,000001043082289
MOI 0.1 - $2,5 \times 10^4$	-0,081813383644510	0,000004846017285
MOI 0.5 - $2,5 \times 10^4$	-0,16349433313381	-0,000000592080868
MOI 1 - $2,5 \times 10^4$	-0,049511089611317	0,000005043741092
MOI 0.1 - 1×10^4	-0,063333639029728	0,000016631933146
MOI 0.5 - 1×10^4	-0,04231899473012712	0,000018277316607
MOI 1 - 1×10^4	-0,03697639795251023	0,000022325693225

Fonte: Autor.

Figura 4.4: Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 5×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do modelo de Lotka-Volterra.



Fonte: Autor.

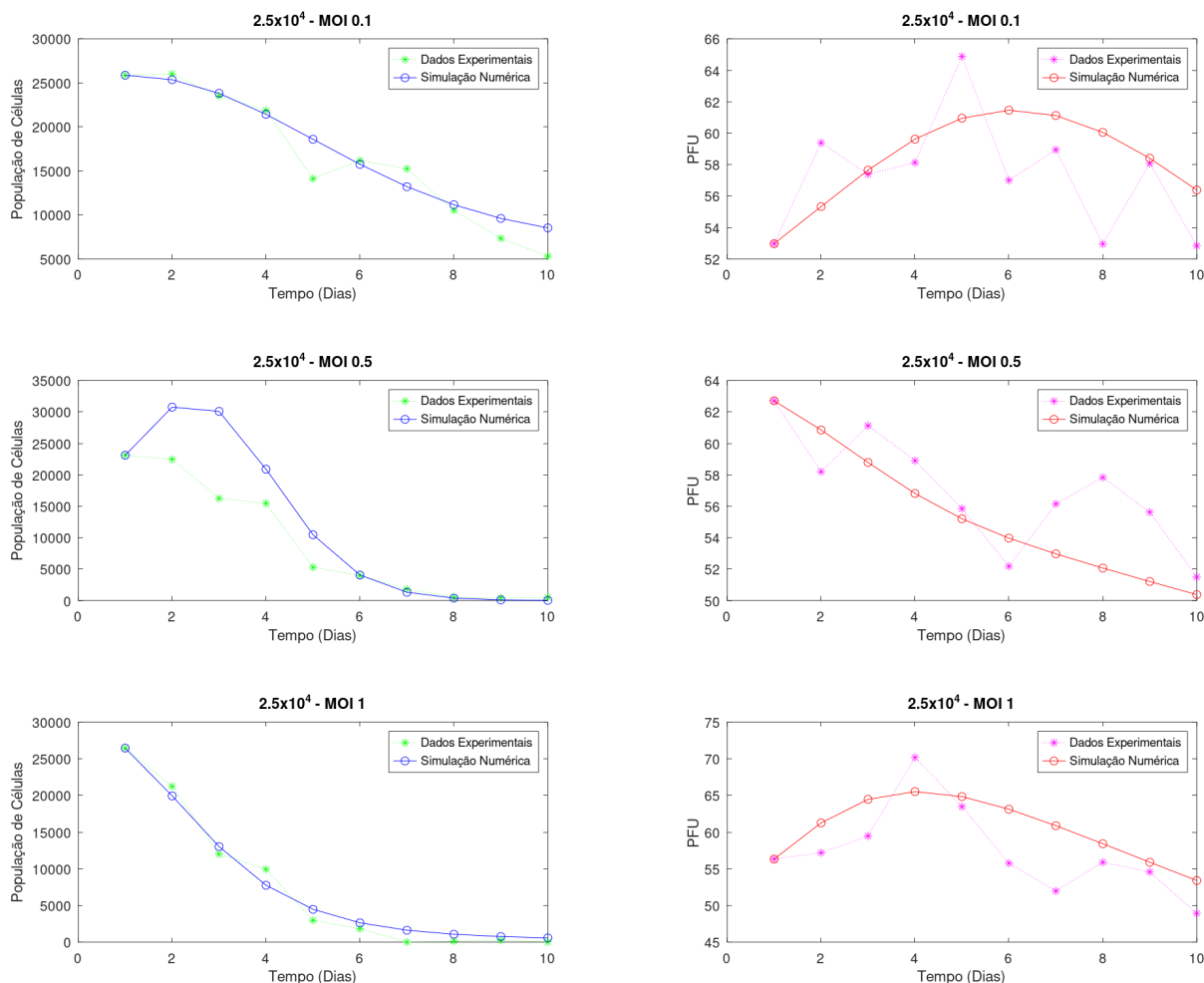
A Figura 4.4, apresenta os resultados numéricos em comparação aos dados experimentais para 5×10^4 células e MOI 0.1, 0.5 e 1.

Os resultados da simulação para o primeiro modelo, segue a dinâmica dos dados experimentais, porém de modo suavizado, sem identificar a variação, além disso, principalmente para a concentração inicial de 5×10^4 células. Observa-se um decrescimento pequeno, seguido por um decrescimento acentuado e estabilização. Para concentrações menores, $2,5 \times 10^4$ e 1×10^4 , esse comportamento aparece nitidamente.

A Figura 4.5, apresenta os resultados numéricos em comparação aos dados experimentais para $2,5 \times 10^4$ e MOI 0.1, 0.5 e 1. Os dados experimentais das células na concentração de $2,5 \times 10^4$ mostram semelhança com o comportamento das células do experimento com 5×10^4 , porém, é interessante notar algumas particularidades. Devido à menor quantidade de células, o crescimento inicial não é tão acentuado, além disso, o efeito de reação das células é suave e com uma menor alteração da taxa de variação. O comportamento dos vírus demonstrou oscilações entre crescimento e decrescimento, porém a sua tendência é ao decrescimento da sua

população.

Figura 4.5: Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 2.5×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra.



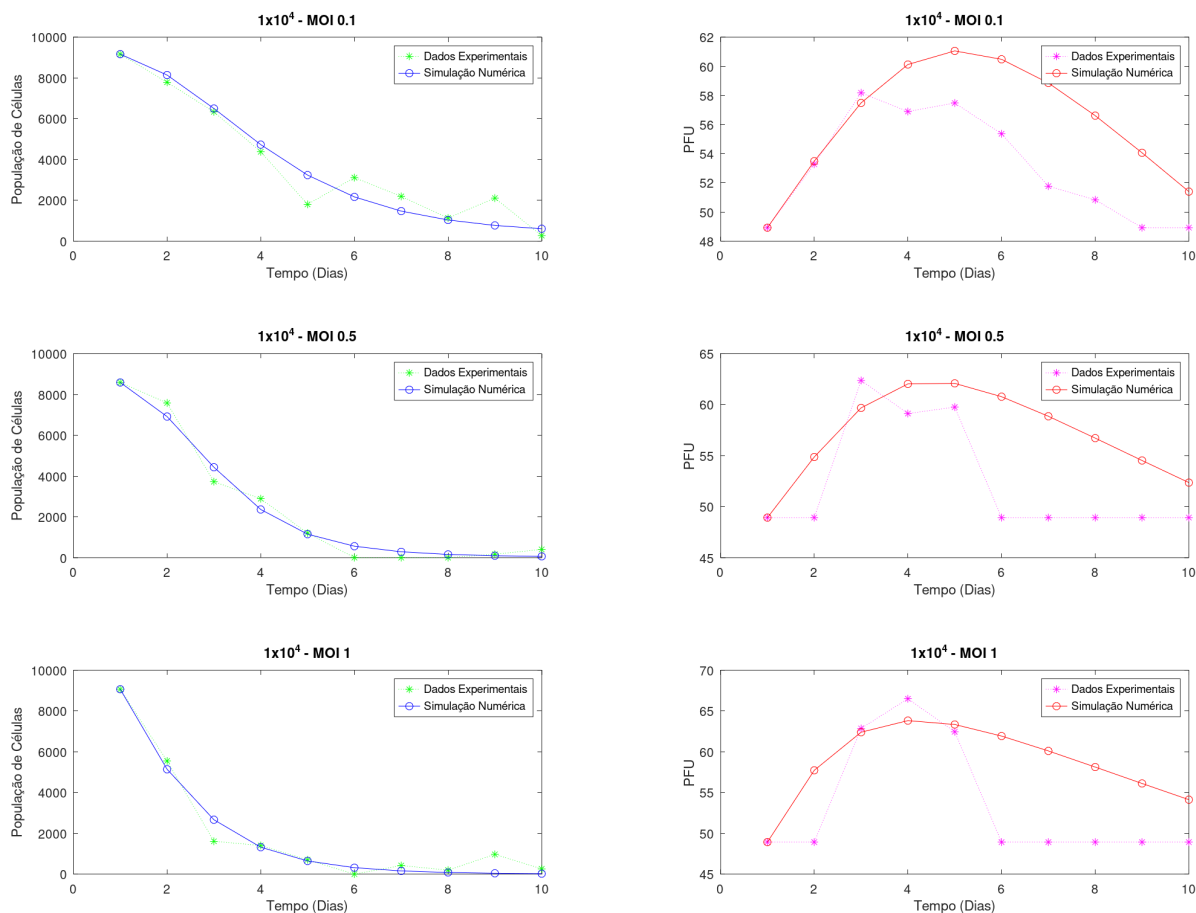
Fonte: Autor.

Com uma carga inicial intermediária $2,5 \times 10^4$ (Figura 4.5), a simulação das células apresentam curvas com características similares entre os dados da simulação numérica e os dados experimentais, especialmente para o MOI 0.1 e 1, para o MOI 0.5, a simulação segue a tendência semelhante dos dados experimentais, porém, com um crescimento acentuado no primeiro dia. O crescimento existe, mas não exacerbado.

A carga viral apresenta suavização no comportamento, característica do modelo de Lotka-Volterra, porém com crescimento inicial e decrescimento no momento em que as células estão em menor população. Para o MOI 1, há um pico entre o dia 4 e 6 seguido de decrescimento.

A Figura 4.6, apresenta os resultados numéricos em comparação aos dados experimentais para 1×10^4 e MOI 0.1, 0.5 e 1.

Figura 4.6: Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 1×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra.



Fonte: Autor.

Para a concentração de células de 1×10^4 (figura 4.6), o modelo apresenta o decréscimo da população de células mais acentuado em concentrações menores, além disso, para a dinâmica dos vírus o modelo simula os picos, o crescimento até o dia 5 e o decréscimo até o dia 10.

4.3 RESULTADOS DO MODELO DE LOTKA-VOLTERRA COM SATURAÇÃO NA EQUAÇÃO DAS CÉLULAS

Aplicando o Método das Integrais (capítulo 3, seção 3.4), através do sistema 3.11, utilizando o software Octave, os parâmetros α , β , γ , θ e ω do Modelo de Lotka-Volterra com saturação na equação das células (Sistema de equações 2.11) foram determinados. Em seguida, as equações foram implementadas e resolvidas numericamente pelo método de Runge-Kutta 4ª Ordem, em que os dados de entrada são os parâmetros do modelo, os valores de x_0 (população inicial de células) e y_0 (partículas livres de vírus) determinados pelos dados experimentais, resolvidos em uma malha unitária, o software utilizado também foi o Octave. Os valores encontrados são apresentados nas tabelas 4.6 e 4.7.

Tabela 4.6: Valores de α , β e ω para diferentes condições de MOI e concentrações iniciais para o Modelo de Lotka-Volterra com saturação na equação das células.

MOI - Concentração	α	β	ω
MOI 0.1 - 5×10^4	-0,808733948922213	0,006832181062995	0,000007530766306
MOI 0.5 - 5×10^4	-1,874091335905064	0,018082472105090	0,000015509897431
MOI 1 - 5×10^4	-4,751007017436851	0,062020753639946	0,000023904174373
MOI 0.1 - $2,5 \times 10^4$	0,248106783281723	-0,010761213503341	0,000012505616622
MOI 0.5 - $2,5 \times 10^4$	-9,747817603949988	0,158923989173763	0,000002421215610
MOI 1 - $2,5 \times 10^4$	-2,527698082322823	0,024867271412044	0,000036246615277
MOI 0.1 - 1×10^4	0,649884722392679	-0,018157645922314	0,000014061653865
MOI 0.5 - 1×10^4	-2,7218519719521	0,026149520588902	0,000150940991449
MOI 1 - 1×10^4	-3,498549040974844	0,042051919224964	0,000118490298671

Fonte: Autor.

Tabela 4.7: Valores de γ e θ para diferentes condições de MOI e concentrações iniciais para o Modelo de Lotka-Volterra com saturação na equação das células.

MOI - Concentração	γ	θ
MOI 0.1 - 5×10^4	-0,031606507925460	0,000000738082715
MOI 0.5 - 5×10^4	-0,046056430146568	0,000001281785067
MOI 1 - 5×10^4	-0,037851876147438	0,000001043082289
MOI 0.1 - $2,5 \times 10^4$	-0,081813383644510	0,000004846017285
MOI 0.5 - $2,5 \times 10^4$	-0,016349433313381	-0,000000592080868
MOI 1 - $2,5 \times 10^4$	-0,049511089611317	0,000005043741092
MOI 0.1 - 1×10^4	-0,063333639029728	0,000016631933146
MOI 0.5 - 1×10^4	-0,042318994730127	0,000018277316607
MOI 1 - 1×10^4	-0,036976397952510	0,000022325693225

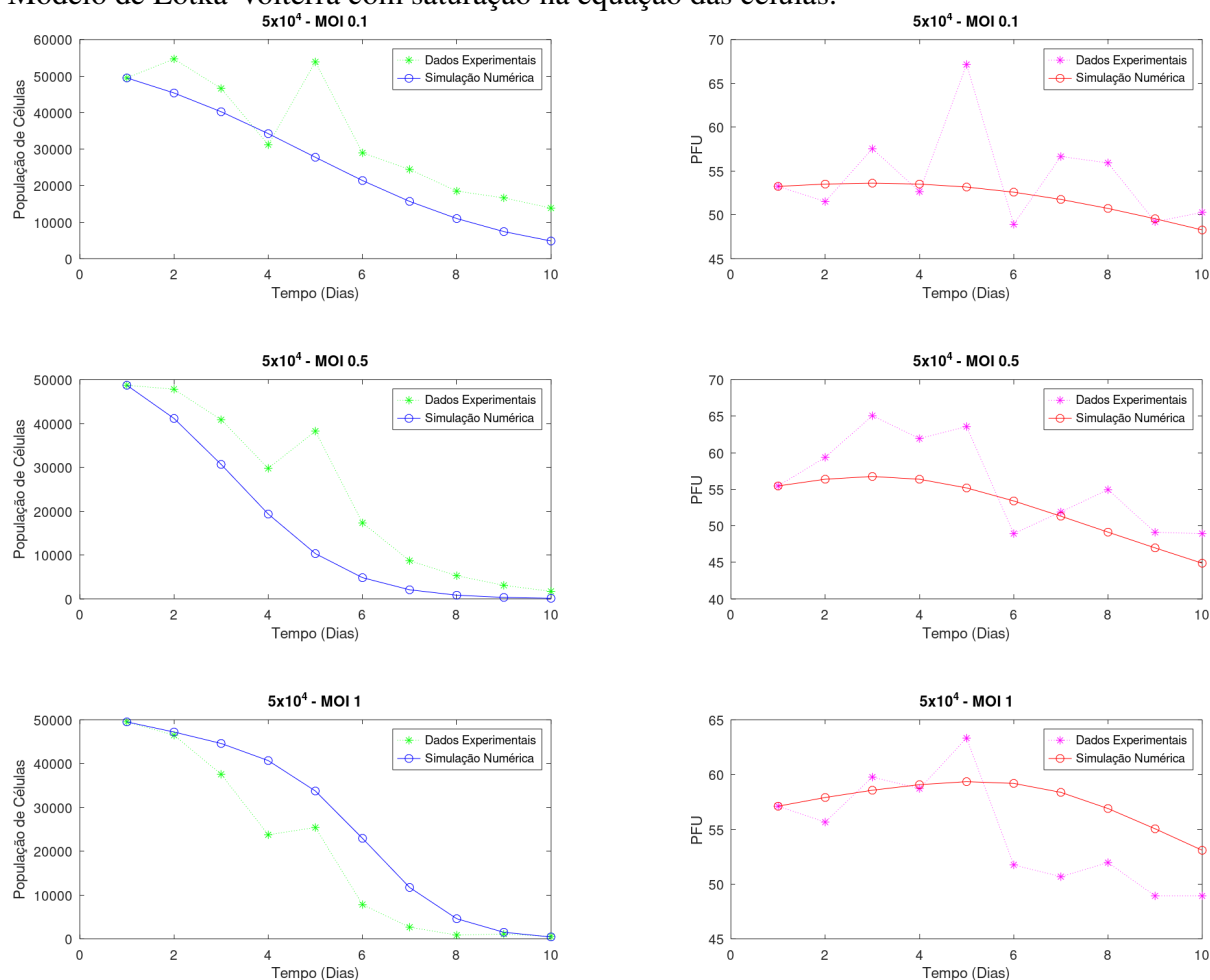
Fonte: Autor.

A dinâmica populacional dos dados experimentais em comparação com a simulação numérica está presente nas figuras 4.7, 4.8 e 4.9.

O comportamento da população de células com concentração inicial de 5×10^4 (figura 4.7) independentemente do MOI, possui curvas com características similares, porém com traços acima ou abaixo da curva experimental.

A dinâmica do vírus para essa concentração, acompanha o comportamento real de crescimento moderado seguido de decrescimento. O modelo não acompanha o maior pico do vírus para o MOI 0.1, isso devido a maior concentração de dados entre 50 e 60, fazendo que o modelo suavize para esses valores.

Figura 4.7: Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 5×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra com saturação na equação das células.



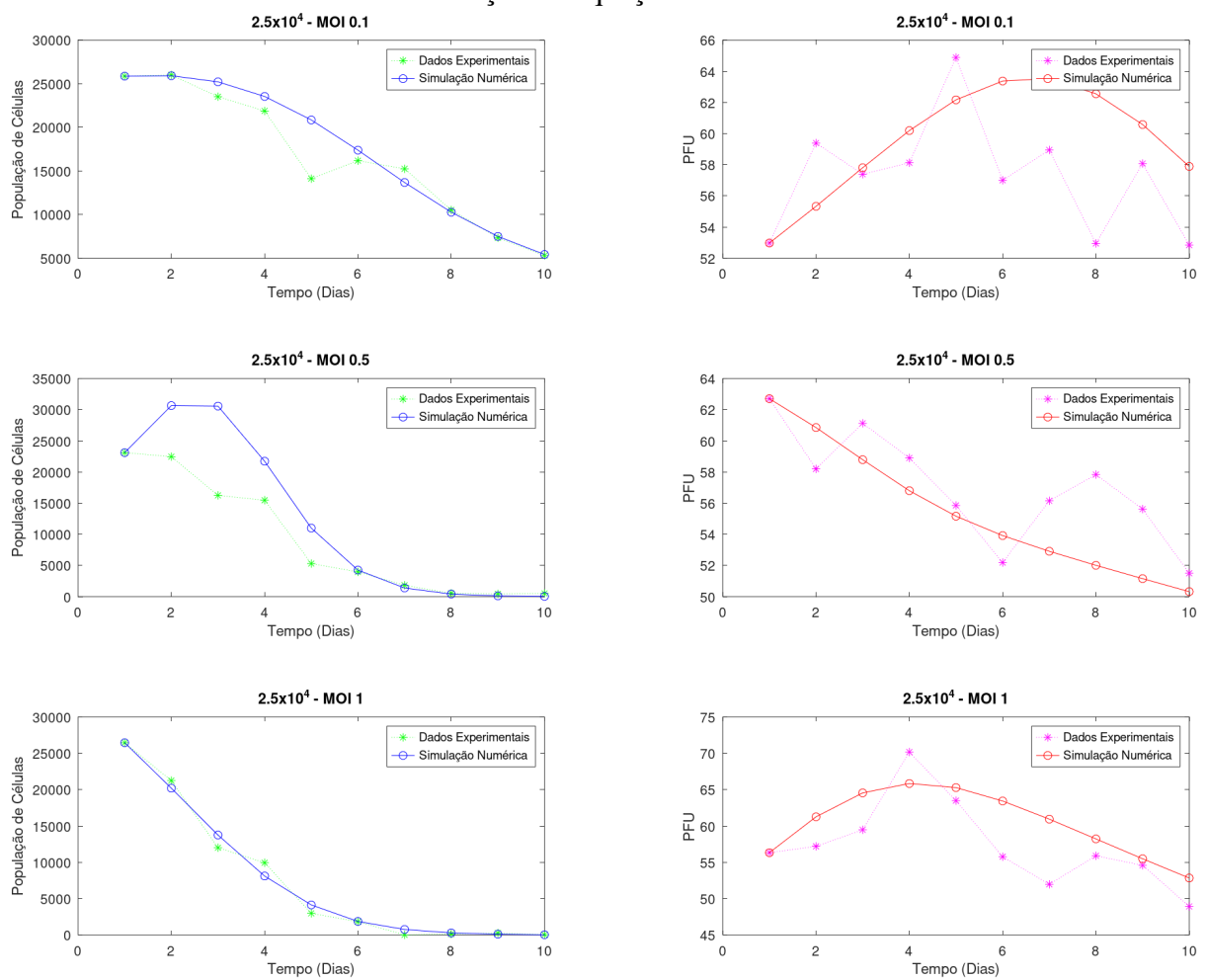
Fonte: Autor.

Para a simulação numérica com concentração de $2,5 \times 10^4$ (figura 4.8), o comportamento das células apresenta melhor resultado comparado ao de concentração 5×10^4 , com exceção do MOI 0.5.

Para a concentração de $2,5 \times 10^4$, o vírus segue a tendência dos resultados com concentração 5×10^4 , com exceção do MOI 0.5, que desde o início apresenta uma curva com decrescimento.

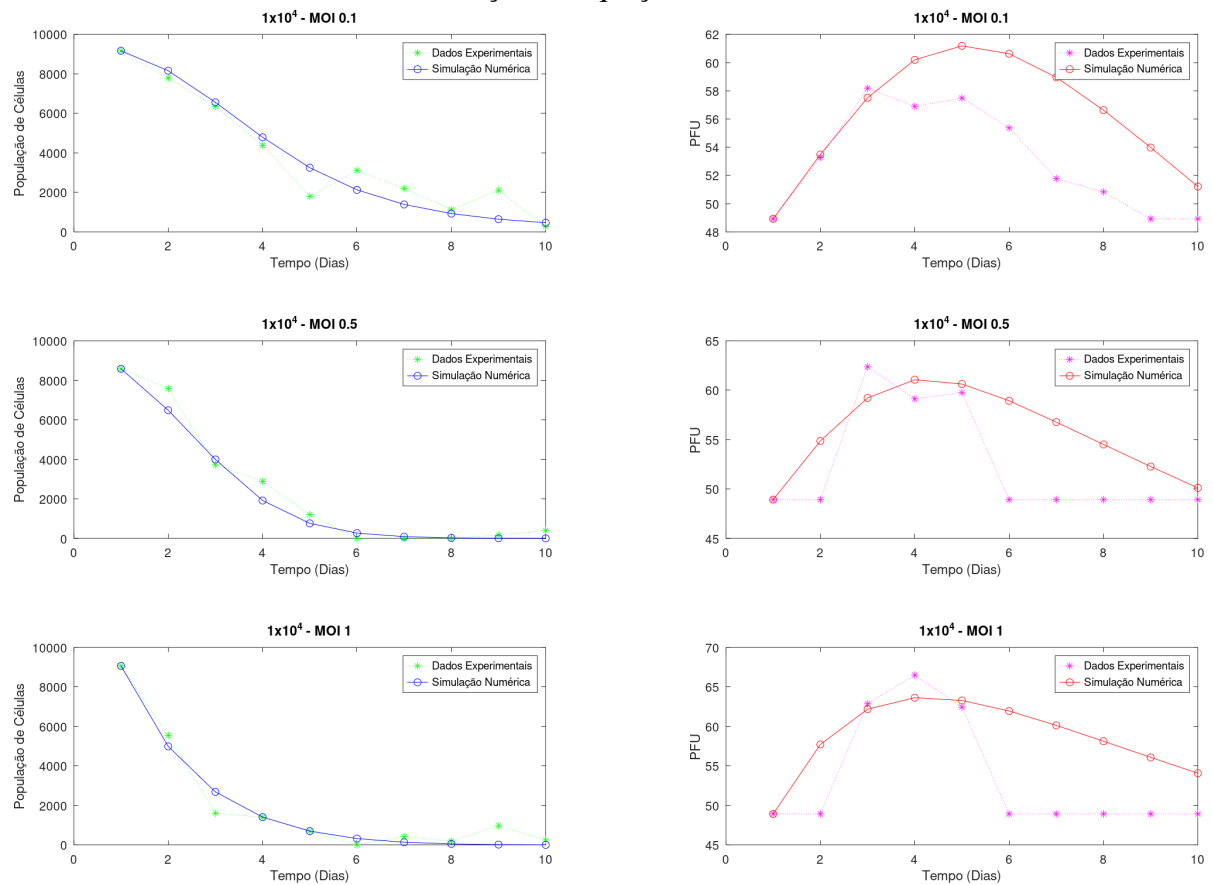
A figura 4.9 mostra os dados para a concentração inicial de 1×10^4 que seguem a tendência das concentrações anteriores, tanto para células quanto para vírus.

Figura 4.8: Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 2.5×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra com saturação na equação das células.



Fonte: Autor.

Figura 4.9: Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 1×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra com saturação na equação das células.



Fonte: Autor.

4.4 RESULTADOS DO MODELO DE LOTKA-VOLTERRA COM SATURAÇÃO NAS EQUAÇÕES DAS CÉLULAS E VÍRUS

O Método das Integrais calculou os parâmetros α , β , γ , θ , ω e κ do Modelo de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações (Sistema 2.12). Em seguida, as equações foram implementadas e resolvidas numericamente pelo método de Runge-Kutta 4ª Ordem, em que os dados de entrada são os parâmetros do modelo, os valores de x_0 (população inicial de células) e y_0 (partículas livres de vírus) determinados pelos dados experimentais, resolvidos em uma malha unitária, o software utilizado também foi o Octave. Os valores dos parâmetros encontrados são apresentados nas tabelas 4.8 e 4.9.

Tabela 4.8: Valores de α , β e ω para diferentes condições de MOI e concentrações iniciais para o Modelo de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações.

MOI - Concentração	α	β	ω
MOI 0.1 - 5×10^4	-0.808733948922213	0.006832181062995	0.000007530766306
MOI 0.5 - 5×10^4	-1.874091335905064	0.018082472105090	0.000015509897431
MOI 1 - 5×10^4	-4.751007017436851	0.062020753639946	0.000023904174373
MOI 0.1 - $2,5 \times 10^4$	0.248106783281723	-0.010761213503341	0.000012505616622
MOI 0.5 - $2,5 \times 10^4$	-9.747817603949988	0.158923989173763	0.000002421215610
MOI 1 - $2,5 \times 10^4$	-2.527698082322823	0.024867271412044	0.000036246615277
MOI 0.1 - 1×10^4	0.649884722392679	-0.018157645922314	0.000014061653865
MOI 0.5 - 1×10^4	-2.7218519719521	0.026149520588902	0.000150940991449
MOI 1 - 1×10^4	-3.498549040974844	0.042051919224964	0.000118490298671

Fonte: Autor.

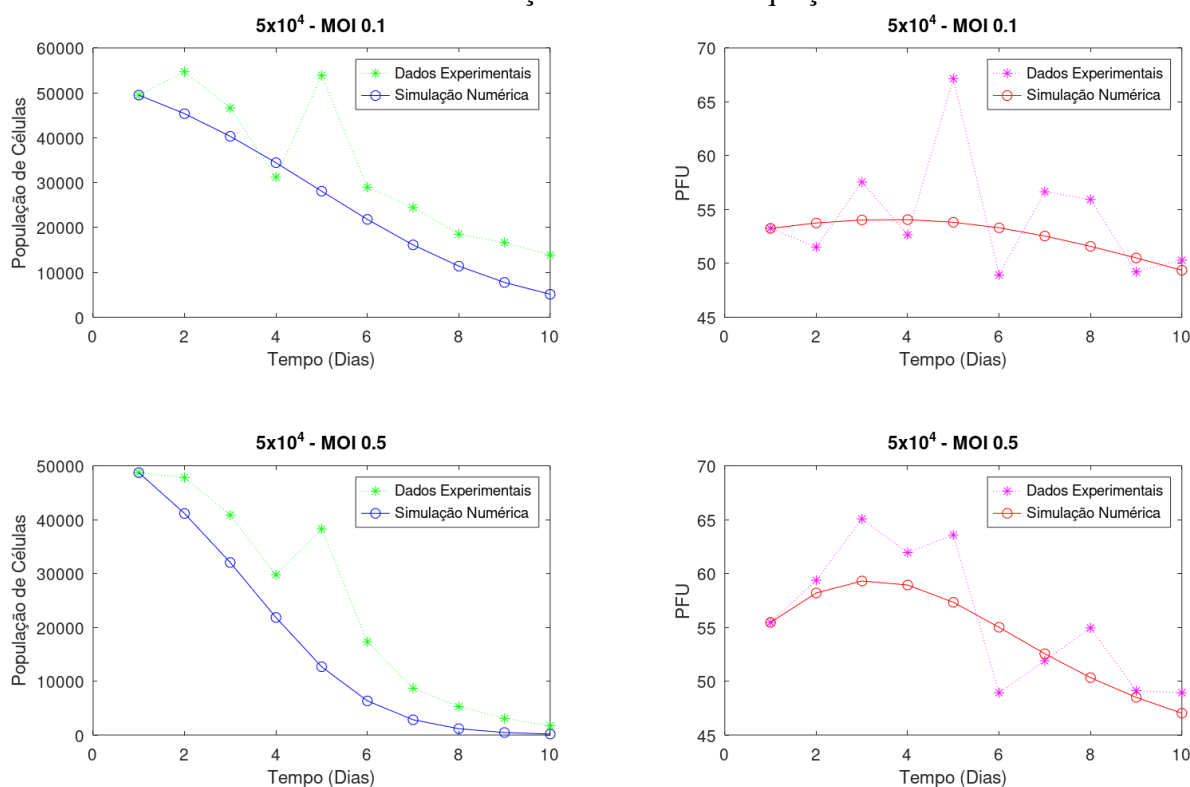
Tabela 4.9: Valores de γ , θ e κ para diferentes condições de MOI e concentrações iniciais para o Modelo de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações.

MOI - Concentração	γ	θ	κ
MOI 0.1 - 5×10^4	0.034700021956751	0.000000885167236	-0.001292386696488
MOI 0.5 - 5×10^4	0.208704716136250	0.000002591111302	-0.005042641579196
MOI 1 - 5×10^4	0.095856720253110	0.000001495025153	-0.002576002078056
MOI 0.1 - $2,5 \times 10^4$	0.137699910302907	0.000005207647210	-0.003888302692480
MOI 0.5 - $2,5 \times 10^4$	-0.328169573885650	-0.000002051584444	0.005682127997431
MOI 1 - $2,5 \times 10^4$	-0.110331185035483	0.000004856517752	0.001056262437781
MOI 0.1 - 1×10^4	0.143396362973452	0.000018095647611	-0.003937523734260
MOI 0.5 - 1×10^4	0.071184641112549	0.0000192605297650	-0.00215381369784
MOI 1 - 1×10^4	-0.077167342544834	0.0000225747789092	0.000714506090658

Fonte: Autor.

As Figuras 4.10, 4.11 e 4.12 apresentam a dinâmica entre a população de células e a população de vírus ao longo do tempo, para diferentes valores de MOI. As simulações numéricas apresentam curvas com características similares ao modelo de Lotka-Volterra sem saturação, tanto para células como para vírus, com exceção da quantidade inicial de 5×10^4 com MOI 1, em que os parâmetros não foram eficientes, acarretando divergência nos dados.

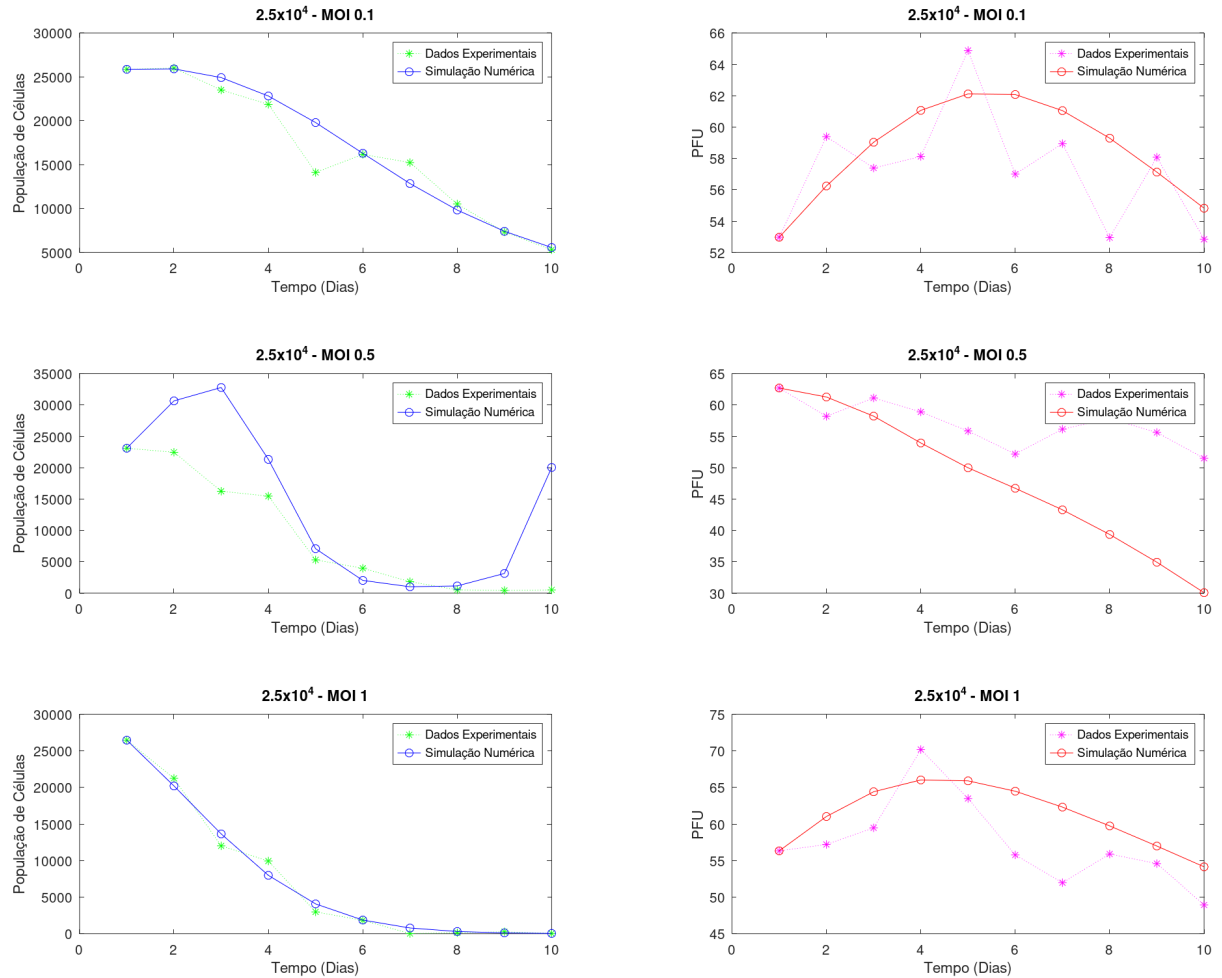
Figura 4.10: Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 5×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações.



Fonte: Autor.

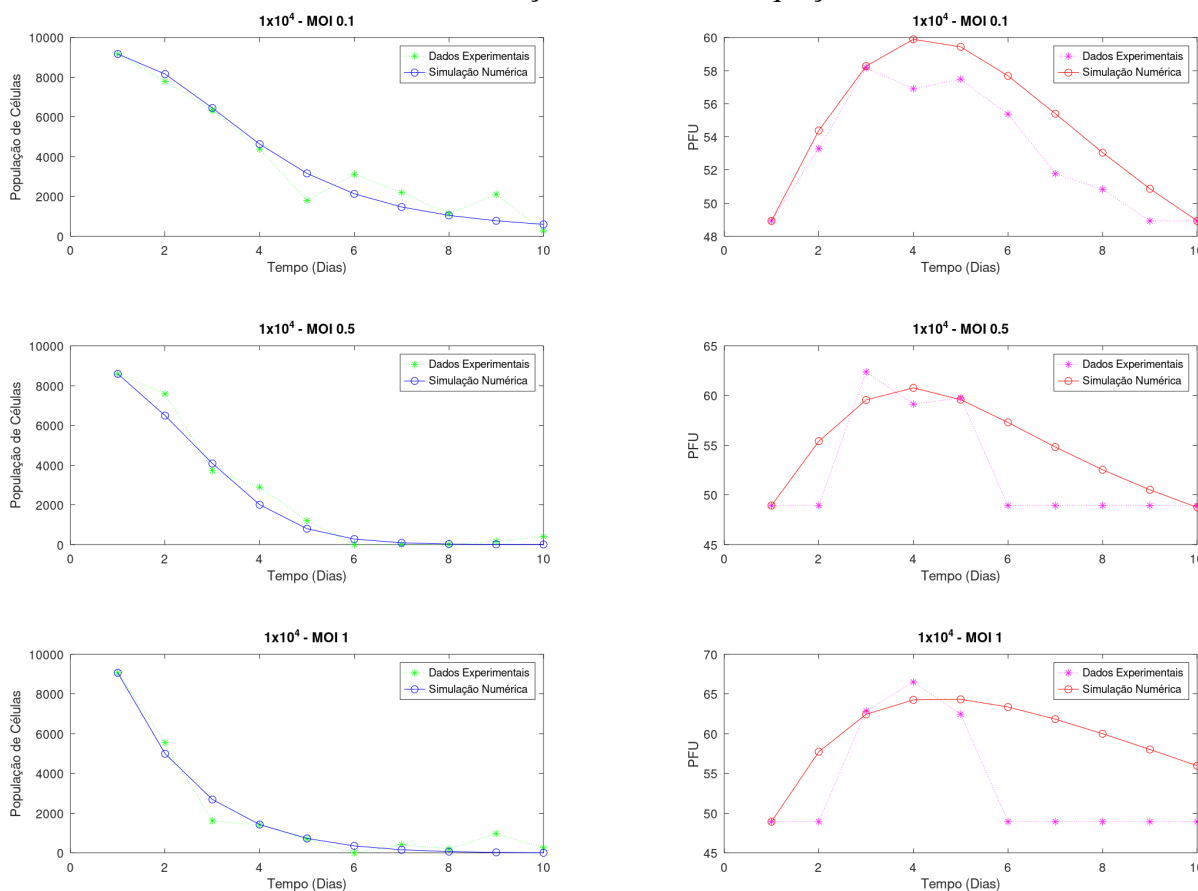
Com ressalva, para a quantidade inicial de $2,5 \times 10^4$ de células MOI 0.5, que apresentou divergência com crescimento na porção final da curva, dias 8-10, e também inconsistências na simulação dos vírus com decaimento acentuado a partir do dia 4.

Figura 4.11: Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 2.5×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações.



Fonte: Autor.

Figura 4.12: Dinâmica da população de células e PFU do vírus sob diferentes MOIs e quantidade inicial de 1×10^4 células: Comparação entre dados experimentais e simulação numérica do Modelo de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações.



Fonte: Autor.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar o desempenho dos modelos frente aos dados experimentais foi calculado o RMSE, conforme a seção 3 item 3.6 do capítulo materiais e métodos.

A Tabela 4.10 apresenta o RMSE referente à comparação entre a simulação numérica e os dados experimentais para a população de células em cada modelo analisado. Dessa forma, tendo como base a raiz quadrada do erro quadrático médio, para a concentração de 5×10^4 , o modelo que apresentou o melhor ajuste foi o de Lotka-Volterra. Para a concentração de $2,5 \times 10^4$ MOI 0.1 e 0.5 o modelo que melhor se adequou ao conjunto de dados foi o de Lotka-Volterra e para o MOI 1, o modelo com melhor resultado foi o de Lotka-Volterra com termo de Saturação na equação das Células. Por fim, para concentração 1×10^4 o modelo de Lotka-Volterra foi o que obteve melhor ajuste no caso de MOI 0.5 e 1, enquanto no MOI 0.1 o melhor ajuste foi com o modelo de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações.

Isso indica que, considerando a regularidade dos dados populacionais das células, o modelo de Lotka-Volterra apresentou o melhor ajuste.

Tabela 4.10: RMSE da equação das Células para os Modelos. Considere (I) o Modelo de Lotka-Volterra, (II) o Modelo de Lotka-Volterra com termo de Saturação na equação das Células e (III) o Modelo de Lotka-Volterra com Saturação em Ambas as equações.

MOI - Concentração	I	II	III
MOI 0.1 - 5×10^4	8389,77	10466,04	10265,59
MOI 0.5 - 5×10^4	7818,84	11250,78	10093,04
MOI 1 - 5×10^4	8011,54	8547,36	<i>NaN</i>
MOI 0.1 - $2,5 \times 10^4$	1749,70	2344,49	2034,84
MOI 0.5 - $2,5 \times 10^4$	5630,18	5869,39	6248,93
MOI 1 - $2,5 \times 10^4$	1189,54	971,22	971,86
MOI 0.1 - 1×10^4	745,95	792,11	730,17
MOI 0.5 - 1×10^4	406,22	500,74	487,77
MOI 1 - 1×10^4	483,82	507,88	507,37

Fonte: Autor.

No que se refere à equação diferencial que descreve a dinâmica dos vírus, a Tabela 4.11 apresenta o valor do RMSE obtido a partir da comparação entre as soluções numéricas e os dados experimentais. Para a concentração de 5×10^4 o modelo de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações obteve os melhores ajustes, independente do MOI. No caso da concentração $2,5 \times 10^4$ o modelo de Lotka-Volterra teve os melhores ajustes, com exceção do MOI 0.1, no qual o modelo com melhor ajuste foi o de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações. Já para a concentração 1×10^4 o modelo de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações obteve os melhores resultados, com exceção do MOI 1, no qual o modelo com melhor ajuste foi o de Lotka-Volterra com termo de Saturação na equação das Células.

Tabela 4.11: RMSE da equação dos Vírus para os Modelos. Considere (I) o Modelo de Lotka-Volterra, (II) o Modelo de Lotka-Volterra com termo de Saturação na equação das Células e (III) o Modelo de Lotka-Volterra com Saturação em Ambas as equações.

MOI - MOI - Concentração	I	II	III
MOI 0.1 - 5×10^4	5,236	5,292	5,038
MOI 0.5 - 5×10^4	4,752	4,884	3,767
MOI 1 - 5×10^4	3,360	4,460	3,168
MOI 0.1 - $2,5 \times 10^4$	3,309	4,342	3,168
MOI 0.5 - $2,5 \times 10^4$	2,885	2,912	10,207
MOI 1 - $2,5 \times 10^4$	4,545	4,579	5,150
MOI 0.1 - 1×10^4	3,998	4,044	2,029
MOI 0.5 - 1×10^4	6,229	5,041	4,155
MOI 1 - 1×10^4	7,218	7,197	8,161

Fonte: Autor.

Sendo assim, analisando o RMSE tanto para a equação da dinâmica das células quanto para a equação do PFU dos vírus, não é possível destacar um modelo ideal de maneira definitiva, sendo necessário verificar as informações de condições iniciais, consistência e acurácia para situação.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, os modelos matemáticos, apresentados neste trabalho, ajustaram-se aos dados experimentais da interação entre as células A549 e vírus hRSV, suavizando seus comportamentos, eliminando os picos de crescimento e decrescimento intermediários.

O Modelo de Lotka-Volterra mostrou, pelas análises estatísticas, um desempenho melhor para células, com um RMSE menor em sete das nove condições apresentadas. Para o vírus, o modelo de Lotka-Volterra com saturação em ambas as equações demonstrou melhor desempenho em 6 das condições.

Um ponto relevante da modelagem matemática baseada em dados experimentais é a determinação dos parâmetros das equações envolvidas. Neste trabalho, o Método da Integral apresentou bons resultados, através de uma implementação simples e de baixo custo computacional.

Concluindo, através dos resultados obtidos, nenhum dos modelos se sobressai absolutamente, sendo necessário, para a escolha do modelo, não considerar apenas os dados do RMSE, mas também as concentrações iniciais, a estabilidade numérica e a coerência do modelo em frente as hipóteses e premissas iniciais.

Como sugestão para trabalhos futuros, pode-se intensificar a calibração dos parâmetros, analisar o modelo frente a maior número de dias, analisar numericamente a estabilidade do método, desenvolver estratégias para regularização, garantindo maior robustez e observar a necessidade de colocar termos de sazonalidade na equação dos vírus, de forma a garantir maior precisão na desarmonia dos dados virais.

REFERÊNCIAS

- [1] ABOITES, V., ET AL. Interpretation and dynamics of the lotka–volterra model in the description of a three-level laser. *Photonics* 9, 16 (2021), 1–13.
- [2] BEGON, M., HARPER, J. L., AND TOWNSEND, C. R. *Ecologia: Indivíduos, Populações e Comunidades*, 3 ed. Artmed, Porto Alegre, 2006.
- [3] BEIJERINCK, M. W. Concerning a contagium vivum fluidum as cause of the spot disease of tobacco leaves. *Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Proceedings I* (1898), 3–21.
- [4] BOYCE, W. E., AND DIPRIMA, R. C. *Equações diferenciais elementares e problemas de valores de contorno*, vol. 10. LTC Rio de Janeiro, 2010.
- [5] BURDEN, R. L., FAIRES, J. D., AND BURDEN, A. M. *Análise numérica*. Cengage Learning, 2016.
- [6] CAO, D., GAO, Y., AND LIANG, B. Structural insights into the respiratory syncytial virus rna synthesis complexes. *Viruses* 13, 5 (2021), 834.
- [7] CHAACHOUA, H., AND SAGLAM, A. Modelling by differential equations. *ResearchGate* (2004). Acesso em: 28 ago. 2025.
- [8] COLLINS, P. L., MCINTOSH, K., AND CHANOCK, R. M. Respiratory syncytial virus. In *Fields Virology*, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus, Eds., 4 ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001, pp. 1443–1485.
- [9] FLINT, S. J., ENQUIST, L. W., RACANIELLO, V. R., AND SKALKA, A. M. *Principles of Virology*, 5th ed. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 2020. Comprehensive coverage of virus diversity and biology.
- [10] FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Resumo do boletim infogripe - semana epidemiológica 18 de 2025, 2025. Disponível em: https://agencia.fiocruz.br/sites/agencia.fiocruz.br/files/Resumo_InfoGripe_2025_18.pdf. Acesso em: 12 ago. 2025.
- [11] HALL, C. B., WEINBERG, G. K., IWANE, K. M., HABER, P., AND ORENSTEIN, A. A. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *New England Journal of Medicine* 368, 1 (2013), 32–39.

- [12] IVANOVSKY, D. I. On the mosaic disease of tobacco. *Bulletin of the Imperial Academy of Sciences of St. Petersburg* 35 (1892), 67–70. Original discovery of virus-like infectious agents.
- [13] JHA, A., JARVIS, H., FRASER, C., AND OPENSHAW, P. Respiratory syncytial virus. *SARS, MERS and other viral lung infections* (2016).
- [14] KLOPPERS, P., AND GREEFF, J. Lotka–volterra model parameter estimation using exponential data. *Mathematical Biosciences* 225, 2 (2010), 119–130.
- [15] LANG, J. C. Use of mathematical modelling to assess respiratory syncytial virus epidemiology and interventions: a literature review. *Journal of Mathematical Biology* 84, 26 (2022), 1–31.
- [16] LEI, C., YANG, J., HU, J., AND SUN, X. On the calculation of $TCID_{50}$ for quantitation of virus infectivity. *Virologica Sinica* 36, 1 (May 2020), 141–144.
- [17] LIU, M. Applications of ordinary differential equations in mathematical modeling. *International Journal of New Developments in Engineering and Society* 4, 2 (2020), 102–107.
- [18] LOTKA, A. J. Contribution to the theory of periodic reactions. *Journal of Physical Chemistry* 14, 3 (1910), 271–274.
- [19] MEZEIA, A., ET AL. Mathematical modelling of respiratory syncytial virus (rsv) in low- and middle-income countries: A systematic review. *Epidemics* 35 (2024), 100444–100453.
- [20] MURRAY, J. D. *Mathematical Biology: an introduction*, vol. 3. 2001.
- [21] NATTI, P. L., ROMEIRO, N. M. L., CIRILO, E. R., NATTI, R. T., OLIVEIRA, C. F. D., SOBRINHO, A. S. D. O., AND KITA, C. M. Modelagem matemática e estabilidade de sistemas predador-presa. *A produção do conhecimento nas Ciências Exatas e da Terra* 2 (2019), 162–177.
- [22] NORMA SUELY DE OLIVEIRA SANTOS, MARIA TERESA VILLELA ROMANOS, M. D. W. *Virologia Humana*, vol. 3. Editora Atheneu, 2015.
- [23] NOWAK, M. A., AND MAY, R. M. *Virus Dynamics: Mathematical Principles of Immunology and Virology*. Oxford University Press, Oxford, 2000.
- [24] ORGANIZATION, W. H. Who preferred product characteristics for respiratory syncytial virus (rsv) vaccines, 2017. Acessado em: 26 de junho de 2024.
- [25] ORGANIZATION, W. H. Preferred product characteristics for respiratory syncytial virus (rsv) vaccines, 2024. Global estimates of RSV impact and vaccine development priorities.

- [26] SCIENCE DIRECT. Root mean square error, 2023. Acessado em: 30 jun. 2025.
- [27] SHANG, Z., TAN, S., AND MA, D. Respiratory syncytial virus: from pathogenesis to potential therapeutic strategies. *International Journal of Biological Sciences* 17, 14 (2021), 4073.
- [28] SHI, T., MCALLISTER, D. A., O'BRIEN, K. L., SIMOES, E. A., MADHI, S. A., GESSNER, B. D., POLACK, F. P., BALSELLS, E., ACACIO, S., AGUAYO, C., ET AL. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *The Lancet* 390, 10098 (2017), 946–958.
- [29] SOCIEDADE BRASILEIRA DE MATEMÁTICA APLICADA E COMPUTACIONAL. Técnicas de modelagem de processos epidêmicos e evolucionários, 2006.
- [30] STEWART, J. *cálculo*, vol. 2. Cengage Learning São Paulo, 2010.
- [31] VOLTERRA, V. Variazioni e fluttuazioni del numero d'individui in specie animali conviventi. *Memorie della Regia Accademia Nazionale dei Lincei* 2 (1926), 31–113.
- [32] YEARGERS, E. K., HEROD, J. V., AND SHONKWEILER, R. W. *An introduction to the mathematics of biology: with computer algebra models*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [33] ZINO, L., AND CAO, M. Analysis, prediction, and control of epidemics: A survey from scalar to dynamic network models. *arXiv 1703.00181* (2021). Open access preprint.