

MODELO COMPUTACIONAL DE CRECIMIENTO TUMORAL PARA ESFEROIDES MULTICELULARES DE LA LÍNEA CELULAR MCF7

Samuel Ruiz Arrebola

Trabajo fin de máster

**Máster universitario en avances en radiología diagnóstica y terapéutica y
medicina física**

Tutora:

Mercedes Villalobos Torres

Director:

Damián Guirado Llorente



Abstract

Purpose: To develop a general model of the kinetics of growth of multicellular tumor spheroids by computer simulation and applying this model to the multicellular tumor spheroids of cell line MCF-7 of human breast cancer with the variables obtained of the experimental model.

Material and Methods: The computational model was developed with the programming language Fortran. The program consists of a main routine which modifies the state of the cells (proliferative cycle, hypoxia or cell death state) and a set of functions and subroutines that calculate the distances between positions of a cubic lattice, the number of neighbors cells, the distance of each cell to the nutrient source, the probability of dividing each grid position at each instant, the number of cells to proliferate by each layer in each iteration, seeking a empty position where it can place a new cell after division and calculate the probability that cells on the periphery which are not closely associated with the spheroid, they leave it.

Results: It is possible computer a simulation successfully of the proliferation kinetics of multicellular spheroids line of breast cancer with a reduced number of parameters.

Conclusions: There are extremely complex simulation models that it are difficult to use in the study of the results of cancer treatments for common clinical situations. In this paper we opted for simplicity, by computer simulation of tumor growth with a small number of parameters.

Keywords: Computational model, multicellular spheroids, tumor growth

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Modelo biológico de esferoides tumorales multicelulares

I.1.1. Modelos *in vitro* de tumores sólidos

Los esferoides tumorales multicelulares (MTS) son agregados de células tumorales que crecen *in vitro* en suspensión con condiciones mecánicas y nutricionales altamente controladas, véase Figura 1. Los MTS son frecuentemente utilizados para modelar el crecimiento de un tumor en el que todavía no se han desarrollado vasos sanguíneos, el microambiente y las perturbaciones fisiológicas que ocurren en su seno. Como resultados experimentales de estos estudios se obtienen diversos parámetros de los esferoides, tales como el volumen, el número de células, las fracciones de células vivas y necróticas y el tamaño máximo. Los esferoides desarrollan una serie de características típicamente observadas en los tumores avasculares: metabolismo alterado, perturbaciones en las expresiones de los genes y las proteínas, núcleo necrótico y resistencia a las terapias. Las curvas de crecimiento de los esferoides muestran, en general, la misma cinética de crecimiento que los tumores nodulares *in vivo*. Estas curvas de crecimiento pueden describirse mediante el modelo de Gompertz [Lai64]. Los nutrientes llegan al esferoide por difusión e ingresan en él por su superficie. Las células cercanas a la superficie del esferoide están en contacto con los nutrientes y el oxígeno que lo rodean. Esta abundancia hace que las células de la periferia consuman una gran cantidad de alimentos y que proliferen activamente. Debido a este factor y al hecho de que los nutrientes penetren en el esferoide sólo por difusión se desarrollan regiones internas que están privadas de oxígeno y alimentos, generando, posteriormente, un núcleo necrótico. Estas características hacen que dentro de los modelos experimentales, el modelo de MTS *in vitro* constituya un modelo con ciertas analogías con los tumores *in vivo*, que no presentan otros modelos experimentales como los cultivos en monocapa. Todo esto sin olvidar que también presenta muchas de las limitaciones que conlleva un

modelo experimental *in vitro* ya que los tumores reales son más complejos que los modelos biológicos *in vitro*. Por ejemplo, una característica que los diferencia es que, ante la ausencia de alimentos, los tumores reales promueven la formación de vasos sanguíneos para nutrirse (angiogénesis), fenómeno que no ocurre en esferoides hechos crecer *in vitro*. Debido a estas y otras diferencias, como la carencia de estroma, algunos tipos de terapias, como la antiangiogénesis o la inmunoterapia no puede ser bien estudiadas desde modelos *in vitro* [Men07].

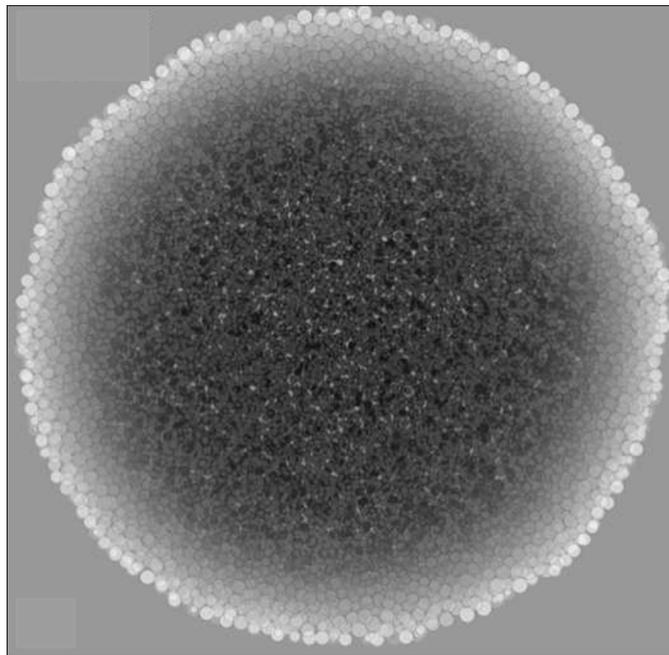


FIG. 1: Se muestra la imagen de la sección central de un esferoide de $230 \mu\text{m}$ de radio [Chi10]. Se puede observar en escala de grises la concentración de oxígeno: blanco, alta concentración; negro, baja concentración.

Uno de los aspectos más importantes de estos modelos de esferoides es la interacción de las células del esferoide entre sí, que se pone de manifiesto por la existencia de resistencia multicelular (multicellularresistance, MCR) [Gil10].

Las características que presenta el modelo de MTS lo convierten en un modelo útil

en estudios de biología tumoral (migración, invasión y angiogénesis) y en aplicaciones biomédicas y clínicas. La base de este éxito radica en la combinación de la organización tisular con el ambiente controlado por la metodología *in vitro* [Bat00, Gal06].

La utilización de estos modelos permite el abaratamiento de los costos de laboratorios en ensayos fármaco-toxicológicos, ya que reduce el número de animales requeridos en el laboratorio al permitir diseñar los experimentos con datos más precisos. Un modelo que además permite predecir la eficacia de terapias antitumorales en los correspondientes tumores *in vivo* [Gil10].

Los esferoides, además, presentan una resistencia a la radioterapia similar a la de los tumores sólidos *in vivo*, de manera que se puede incluir el efecto de la radioterapia en el crecimiento del tumor. Esta característica ha dado lugar a estudios generales de respuesta de MTS a la radiación [Ber10, Gui03] y a otros más específicos relacionados con la hipersensibilidad a bajas dosis en MTS [Gui12b].

I.1.2. Simetría radial

Se puede considerar al esferoide tumoral multicelular como una mezcla de estados y compartimentos celulares. Se distingue una capa externa o proliferativa, otra capa media o quiescente, que interaccionan entre sí, y una última capa interna o centro necrótico. Se pueden distinguir estas capas en la Figura 1. Se puede observar una clara analogía entre las células de los tejidos tumorales y las de los MTS puesto que las células en proliferación se localizan a unas pocas capas celulares de distancia de los vasos sanguíneos, mientras que las células quiescentes y necróticas lo hacen a mayores distancias de los vasos. La distancia entre los vasos y las áreas necróticas, en tumores humanos, varía entre 50 y 250 μm , que es aproximadamente la misma que se observa en esferoides, desde la periferia hasta la zona de necrosis. Esta distancia es dependiente del tipo celular, su tasa metabólica, el grado de empaquetamiento celular y las concentraciones de sustratos en el medio de cultivo. En relación con las células de tejidos normales, el número de capas de

células viables que rodean los núcleos necróticos es de 10 a 20, correspondiendo a una distancias entre 100 y 220 μm , con volúmenes extracelulares del 35 al 55%. Estos valores son similares a los que se pueden observar en tumores *in vivo* y corresponden a regiones en las que se muestran gradientes de nutrientes, de presiones parciales de O_2 y de pH [Sut88]. Las células en ciclo proliferativo se encuentran en las capas más externas del esferoide, hasta aproximadamente la quinta capa. En capas más internas encontramos las células quiescentes, de las cuales una importante proporción son viables y capaces de proliferar cuando se las saca de este entorno [Mul85, Gro91].

I.2. Modelos computacionales de crecimiento tumoral

Los modelos computacionales permiten simular experimentos y analizar los datos obtenidos sin el coste que supondría la realización de estos en las condiciones experimentales reales. Además es posible dilucidar resultados que no se podrían poner de manifiesto experimentalmente. Con estos modelos se van a poder generar poblaciones virtuales de esferoides y simular ciertas condiciones experimentales que se quieran estudiar.

La evaluación de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer, antes de su aplicación en tumores *in vivo*, es posible realizarla con estos modelos computacionales de MTS virtuales. Esto va a permitir diseñar estudios que no son posibles en ensayos clínicos reales, bien porque sólo se disponen de datos de estudios retrospectivos no diseñados para el análisis de cualquier cuestión específica, bien porque por cuestiones éticas supondría diseñar estudios prospectivos en los que las variables relevantes suponen un perjuicio para el paciente, como ocurría si quisiésemos estudiar diferentes esquemas de fraccionamiento, o ensayarse los efectos de interrupciones o demoras, en un tratamiento de radioterapia.

Estos modelos se basan en técnicas Monte Carlo que hacen posible simular en poblaciones virtuales objeto de ensayo, la variabilidad observada en los experimentos reales. Tras una correcta sintonización, ajuste de parámetros del modelo computacional con los datos que ofrecen los estudios reales de laboratorio, se podrían realizar simulaciones in-

introduciendo variabilidad sólo en los parámetros motivo de estudio [Gui12a].

Los modelos computacionales los podemos clasificar del siguiente modo: basados en autómatas celulares y basados en ecuaciones diferenciales.

I.2.1. Basados en autómatas celulares

Un *Autómata Celular* es un sistema dinámico discreto gobernado por reglas simples deterministas. En él se considera al espacio y al tiempo de manera discreta. El autómata consiste en una red uniforme y regular, cuyas posiciones denominamos sitio o “célula”.

Los primeros autómatas, desarrollados por Von Neumann, datan de 1947 [Von66]. Düchting y colaboradores proponen los primeros modelos computacionales basados en autómatas celulares aplicados a MTS [Duc85, Duc89]. Estos autores modelan el crecimiento de un esferoide tumoral a partir de la proliferación de las células tumorales individuales que lo constituyen. Los datos de entrada que el modelo de simulación necesita son los tiempos de las fases del ciclo celular de cada célula tumoral específica. El modelo cinético celular a partir del cual se simula el crecimiento del esferoide, consiste en considerar el ciclo celular de G1 a M (G1, S, G2 y M), la fase G₀ y el estado de necrosis. La célula que se encuentra en ciclo proliferativo puede realizar de nuevo el ciclo, o pasar a la fase G₀. A continuación puede pasar a estado de muerte celular o a la realización de otro nuevo ciclo proliferativo. Las simulaciones comienzan con una célula, y por las limitaciones en la capacidad de computación, sólo podían trabajar con matrices de $42 \times 42 \times 42$. Pudieron simular hasta 104 células, 15 veces menos células que un esferoide de unas 150 micras de diámetro. Emplearon el modelo de Gompertz para describir el crecimiento en la simulación computarizada.

Los autómatas individuales, células tumorales, se fijan según una topología (estructura regular) en la que se distribuyen formando el autómata celular. La interacción entre células se simula, de manera que el comportamiento de una célula está afectada por el de sus vecinas. Además cada célula estará en estados y la célula pasará de uno a otro

con una cierta probabilidad. Un autómata celular se define a partir de una matriz (n dimensional), la asignación de un conjunto de estados iniciales a cada autómata de la matriz, el conjunto de estados posibles de cada autómata, una función de transición que asigna un nuevo estado a un autómata teniendo en cuenta el estado de todos sus vecinos, una función que asigna a cada autómata el conjunto de sus vecinos (función vecindario), una distribución de probabilidades para cada posición de la matriz y momento determinado, y un conjunto opcional de estados finales. Las posiciones dentro de la estructura regular están definidas por índices sobre los cuales es posible especificar las posiciones permitidas [Wol94]. De manera que las células, localizadas en una red espacial, progresarán en su ciclo reproductivo y vital dependiendo de su acceso a los nutrientes. La división de una célula supondrá la necesidad de ubicarla en una nueva posición, mientras que la muerte de alguna de ellas puede hacerla desaparecer del agregado celular y generar el movimiento de las células que la rodean.

Ya hemos visto las características que ha de cumplir un sistema complejo para considerarse un autómata celular, pero se han de tener en cuenta otros aspectos importantes en relación con la cinética de crecimiento de las células tumorales para, finalmente, poder simular el crecimiento de un esferoide tumoral multicelular. Es así preciso conocer el tiempo de duplicación de las células tumorales la fracción de crecimiento (proporción de células de una población que se encuentran en ciclo proliferativo) y el desequilibrio entre producción y pérdida de células, acumulación de células tumorales que justifica el crecimiento progresivo.

I.2.2. Basados en ecuaciones diferenciales

Los modelos basados en ecuaciones diferenciales pretenden hacer una descripción detallada de procesos del metabolismo celular, aspectos bioquímicos y biomecánicos, e incluso se llegan a considerar propiedades del medio como la concentración de metabolitos y nutrientes. Asumen unidades de medida que pueden ser comparadas con datos exper-

imentales. La consideración de procesos metabólicos de diferentes escalas temporales exigen a estos modelos descripciones matemáticas complejas. Para esferoides de 1 mm de diámetro y 25 parámetros por células se necesitan 10^7 - 10^8 ecuaciones diferenciales, y requieren 10^{20} - 10^{21} bytes/esferoide para llevar a cabo simulaciones *ab initio* de un esferoide de estas características. En estos modelos se consideran la aleatoriedad de sucesos discretos como la mitosis, muerte celular, partición de orgánulos subcelulares, etc. [Chi10]. Además, utilizan modelos basados en redes complejas; redes que, por ejemplo, preservan su estructura gracias a fuerzas viscoelásticas entre células vecinas [Chi04, Mil10].

I.2.3. Objetivos

Los objetivos de este trabajo son dos:

- Desarrollar un modelo general de la cinética de proliferación de MTS mediante simulación computacional.
- Aplicar este modelo a los MTS de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 con variables obtenidas del modelo experimental.

Este trabajo de investigación está fundamentado en el paralelismo que presentan la simulación computacional y la experimentación con clulas tumorales. Se simula el crecimiento de los MTS de la línea celular MCF-7 atendiendo a los parámetros obtenidos del crecimiento de los esferoides cultivados en el Laboratorio del Investigaciones Médicas del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1. Esferoides multicelulares de la línea MCF-7

Se ha utilizado en este trabajo la línea celular MCF-7 de origen tumoral. Fue obtenida en 1973 a partir de un derrame pleural metastásico de una enferma de adenocarcinoma mamario [Sou73]. Se trata de la primera línea celular documentada como receptor estrogénico positivo que responde con cambios metabólicos y estructurales a la acción de los estrógenos [Lip75, Hor78].

El mantenimiento en suspensión de las células MCF-7, formando agregados multicelulares, se consiguió con aceptable eficacia, impidiendo la adherencia celular al soporte sólido del cultivo. Se utilizaron cajas de cultivo con paredes de plástico no adherente unas veces y cajas de cultivo con el fondo tratado con una fina capa de agar semisólido al 1% de concentración final en medio esencial mínimo (MEM), otras. El medio de cultivo celular utilizado comúnmente fue MEM suplementado con 10% de suero bobino fetal (FBS). Transcurridas unas horas después de la siembra, la observación con microscopio de los discos Petri donde se prepararon los cultivos, nos permitió distinguir agregados flotantes formados por un número variable de células, que alcanzaron formas globulares (ovoidea, cilíndrica y, predominantemente, esférica) en el curso de las 24-48 horas siguientes. El crecimiento de los esferoides se sometió a observación de manera individualizada en discos de Petri de 35 mm o cajas de 48 pocillos. A intervalos de tiempo variables según las necesidades de los diferentes protocolos experimentales, se efectuó después la medida de dos diámetros ortogonales y se calculó el volumen de los esferoides. La periodicidad mínima y máxima de las medidas osciló entre 48 y 96 horas [Vil96].

La observación al microscopio invertido de contraste de fase, con ayuda de una rejilla graduada aplicada al ocular, previamente calibrada, nos ha permitido medir los diámetros ortogonales de los agregados celulares aparentemente esféricos y calcular su volumen mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$V = \frac{a \cdot b^2 \cdot \pi}{6}. \quad (1)$$

donde a es el diámetro mayor medido y b es el diámetro menor [Ole92].

II.2. Modelo computacional

El modelo computacional se ha desarrollado con el lenguaje de programación Fortran. Se trata de un programa estructurado que consta de un cuerpo de programa, que contiene la rutina principal, además de cuatro funciones y cuatro subrutinas. Las funciones se emplean para el cálculo de las distancias entre posiciones de una red cúbica de posiciones fijas, el número de vecinas o células que ocupan una posición en las cercanías de otra, la profundidad a la que se encuentra una célula del medio exterior, es decir, la distancia al aporte de nutrientes, y para el cálculo de la probabilidad de división de cada posición de la red en cada instante. En cuanto a las subrutinas, una calcula el radio del esferoide y el volumen en cada iteración, otra calcula el número de células que van a proliferar por cada capa en cada iteración, una tercera busca una posición vacía donde pueda ubicar la nueva célula tras una división y, por último, una subrutina en la que se sorteán las células de la periferia que no están muy ligadas al esferoide y lo van a abandonar (exfoliación).

Se define una matriz 3D en cuyas posiciones se irán colocando las células tras cada iteración, que haremos corresponder a un tiempo de ciclo celular. Se comienza la simulación con una configuración inicial de posiciones ocupadas de la red. Aquí hacemos notar que, experimentalmente, se comienza el seguimiento del crecimiento del esferoide a partir de un número de células que inicialmente forman un agregado. Se le asigna un número a cada estado celular: 1 para las células en ciclo proliferativo, 2 para el estado de muerte celular y 3 para el estado de quiescencia. La configuración inicial está constituida por 188 células en ciclo.

Ya se ha comentado que los nutrientes llegan al esferoide por difusión y penetran en él por su superficie. Las células cercanas a la superficie del esferoide están en contacto con los nutrientes y el oxígeno que lo rodean y, por lo tanto, tienen un buen acceso a estos; lo cual hace que proliferen activamente. Las células más internas del esferoide, que se encuentran en regiones que están privadas de oxígeno y alimentos, constituyen el núcleo

necrótico. Entre la periferia y el núcleo necrótico se encuentra una región con un gradiente de nutrientes y oxígeno que tendrá una pendiente determinada y que condicionará la actividad proliferativa de las células de esta zona. La forma de este gradiente puede depender de la línea celular y de las condiciones de cultivo de los esferoides.

La probabilidad de división de las células según la capa celular a la que pertenezcan depende de la profundidad de la capa, de la línea celular y de las condiciones de cultivo como ya se ha comentado. Se presenta un gradiente en esta probabilidad de división que está principalmente condicionado por el gradiente de concentración de O_2 . Se entiende que tendrá una forma similar a este gradiente de concentración. En la Figura 2, tomada de [Tim04], podemos ver uno de estos perfiles de concentración de oxígeno en una sección de unos esferoides de líneas celulares diferentes (líneas HepG2 y HCT116). Podemos observar un perfil similar para la línea tumoral DU-145 de cáncer de próstata humano ???. Todos estos perfiles de O_2 se miden con microelectrodos sensibles a oxígeno.

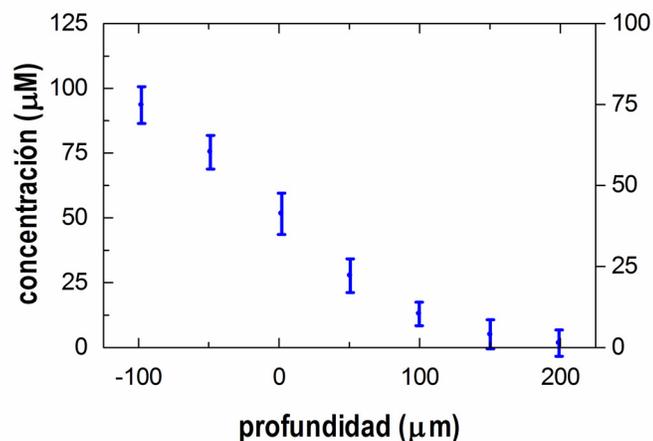


FIG. 2: Gradientes de concentración de oxígeno en MTS de las líneas celulares HepG2 (círculos negros) y HCT116 (círculos blancos). El valor cero de profundidad señala la superficie del esferoide. La concentración de O_2 es prácticamente cero en la región central de los esferoides, a unas $200 \mu\text{m}$ de la superficie.

Se propone una función gradiente similar a las que hemos mostrado, ver Figura 3.

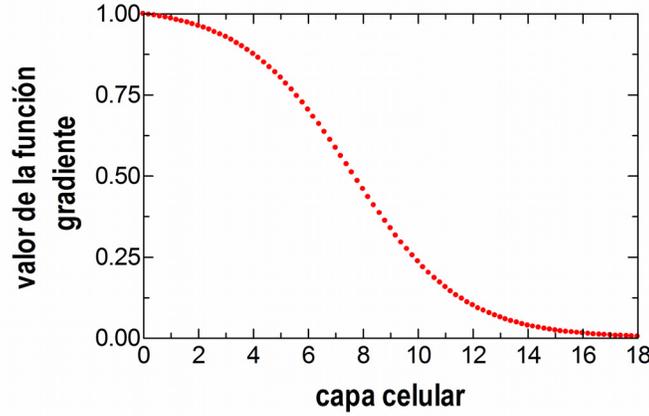


FIG. 3: Función gradiente de nutrientes, O_2 y pH.

La expresión matemática de esta función gradiente viene dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{1 + \exp(l_0 - p_0)}{1 + \exp(i - l_0) \cdot p_0} \quad (2)$$

donde l_0 y p_0 son parámetros de la función y l es la profundidad de cada una de las posiciones del esferoide medida desde el exterior.

El programa comienza realizando un sorteo que determinará si cada célula de las que conforman la configuración inicial se divide o no, ver Figura 4. La probabilidad de que cada célula se divida o no depende del producto de parámetro, P_{div} , y la función gradiente de nutrientes, oxígeno y pH que hayamos definido, que a su vez dependerá de la profundidad a la que esté posicionada esa célula en concreto.

El valor máximo de la probabilidad de división lo determina el valor del parámetro P_{div} . La probabilidad de división será cada vez menor a medida que la posición celular esté más alejada de la superficie del esferoide, y es la función gradiente de nutrientes y O_2 la que determina este gradiente en la probabilidad de división celular. Una vez realizado

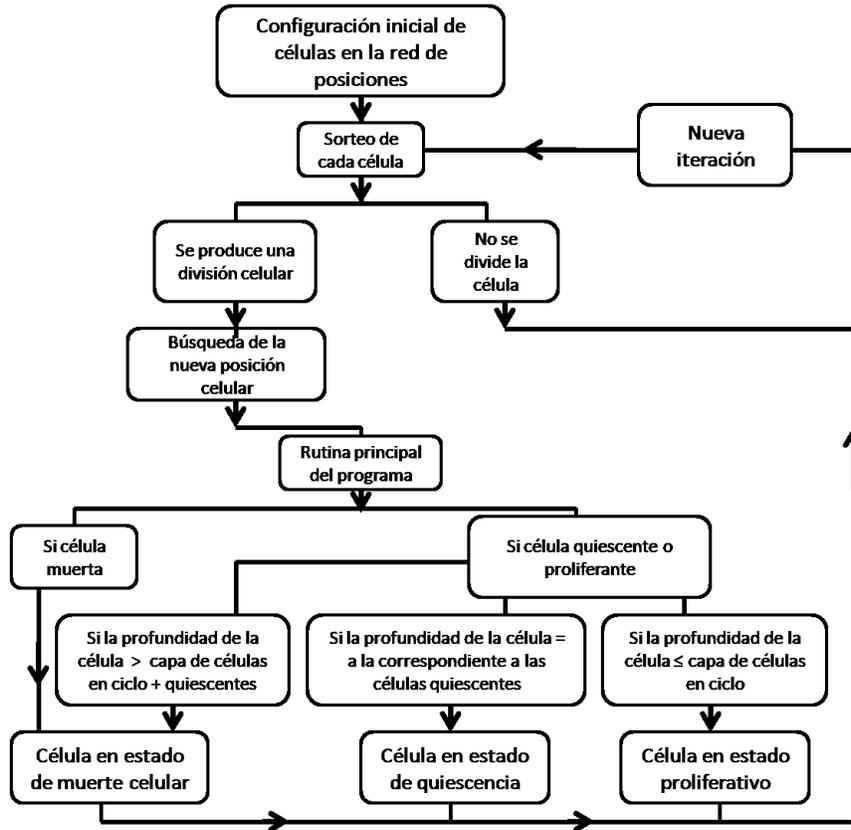


FIG. 4: Diagrama jerárquico que representa el flujo de trabajo del programa.

el sorteo se guardan las posiciones de las células que se van a dividir en esa iteración. El sorteo al que se somete cada célula seguirá una distribución binomial.

Una subrutina, a la que hemos llamado UBICACIÓN, es la encargada de buscar una posición de la red vacía en la que ubicar la nueva célula. La subrutina realiza una búsqueda en 98 direcciones diferentes. Estas direcciones corresponden a los vértices de cuatro cubos colocados en cada uno de los ocho cuadrantes de una esfera virtual entorno a la posición de la célula que se va a dividir. El fijar las direcciones de crecimiento disminuye el orden de complejidad del algoritmo. Todas las direcciones de búsqueda tiene el origen en la célula que, por sorteo, va a dividirse en una iteración concreta. En cada dirección se busca la primera posición de la red vacía que se encuentre en la zona de células en ciclo

proliferativo; es decir, no se colocará una célula nueva en la zona de necrosis o de hipoxia. Se hará una exigencia más a este algoritmo de búsqueda: de todas las posiciones posibles se seleccionará para colocar la nueva célula, la más cercana que tenga un mayor número de células vecinas. La función que realiza la búsqueda del número de vecinas lo hace en las 125 posiciones más cercanas a la posición analizada.

En cada iteración, y una vez que se han colocado las nuevas células, se actualiza el estado de cada célula según la posición relativa que ocupa en la red, ya que al colocarse nuevas células estas posiciones relativas se han modificado. Si la posición de una célula tiene una profundidad asociada, distancia al exterior del esferoide, mayor que lo que hemos determinado mediante un parámetro, al que hemos denominado L_{layer} , y que corresponde a la zona de células en ciclo proliferativo, el estado de la célula cambia. El nuevo estado corresponde al de las células en hipoxia, quiescentes. La profundidad de la capa de células en hipoxia también se define mediante un parámetro, L_{hipox} . Si la profundidad de una posición es mayor que la suma de las capas de células en ciclo y quiescentes, el nuevo estado de la célula será el de muerte celular. Una célula en estado de muerte celular no modificará su estado a partir de ese momento. Una célula en estado quiescente si puede modificar su estado a estado proliferativo, si tras la ubicación de células de cada iteración su profundidad así lo indica.

La función que determina la profundidad de cada posición de la matriz, busca dos posiciones consecutivas seguidas vacías y calcula la distancia entre la posición analizada y la posición no vacía anterior a las dos vacías consecutivas. Tiene definidas 42 direcciones de búsqueda y el origen de todas estas direcciones es la posición de la red que se está analizando.

La subrutina que elimina del agregado aquellas células que se encuentran en la superficie, según un sorteo aleatorio, depende de un parámetro que determina la probabilidad de exfoliación. A este parámetro lo hemos denominado P_{exf} .

La última subrutina que aparece en cada iteración de la rutina principal es la que calcula el volumen del esferoide. Esta subrutina calcula la posición de la matriz sobre la

que están las células que a de mayor profundidad, es decir la posición a mayor distancia de la periferia. Esta posición es la considerada como origen, de manera que a partir de ella y según tres direcciones ortogonales, seis sentidos, se cuenta el número de capas de células que hay en cada región del esferoide, ver Figura 5. El valor del volumen calculado depende de un parámetro de escala, que denominaremos F_{scal} , y de unos factores de compactación que denominaremos FS_C , FS_H y FS_N . El factor de escala tiene en cuenta el espacio asociado a cada célula y el espacio intercelular, asigna una distancia al espacio entre dos posiciones consecutivas de la matriz. Los factores de compactación tienen en cuenta la diferente compactación de las tres regiones diferenciadas del esferoide, la región de células en ciclo, en hipoxia y del núcleo necrótico. Ambos factores serán característicos de cada línea celular. El volumen del agregado se calcula según la siguiente ecuación:

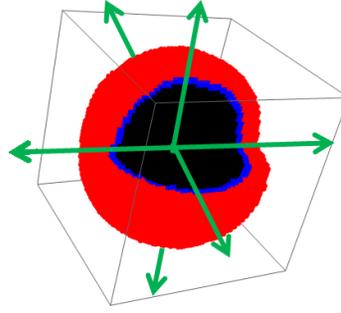


FIG. 5: En este gráfico se muestran las 6 sentidos de búsqueda que permiten el conteo del número de células por capa de un esferoide tumoral multicelular simulado.

$$V = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{R_{cc}}{FS_C} + \frac{R_{hh}}{FS_H} + \frac{R_{nn}}{FS_N} \right). \quad (3)$$

con:

$$R_{cc} = (R_c + R_h + R_n)^3 - (R_h + R_n)^3$$

$$R_{hh} = (R_h + R_n)^3 - (R_n)^3$$

$$R_{nn} = (R_n)^3$$

donde R_c , R_h y R_n son el número de capas de células en ciclo, hipoxia y muerte celular respectivamente, multiplicado, por el factor de escala.

Los pasos de la simulación no corresponden a un día, corresponden al tiempo de ciclo de las células objeto de estudio. En el caso de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama el tiempo de ciclo se estima en 20 horas y, por lo tanto, habrá que considerar un factor de 1.2 para poder hablar en términos de días y no en términos de iteraciones de la simulación.

Es posible simular la siembra de células en distintos puntos de la red y, por lo tanto, analizar diferentes patrones de crecimiento. Se han simulado hasta seis esferoides separados unas 20 posiciones de la red cúbica, simultáneamente.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Estructura de los esferoides simulados

En la Figura 6 se ha representado una secuencia de ocho imágenes que muestran la evolución de un esferoide simulado. Se reproduce la estructura de los esferoides reales cultivados en el laboratorio: un núcleo necrótico (cuando el tamaño alcanzado es suficiente para ello), una capa interior en hipoxia (capa intermedia) y una capa externa con células en proliferación.

Los tiempos empleados en las simulaciones de MTS de unas $700 \mu\text{m}$ de radio, son de unos 15 minutos. Esto corresponde a unos 30 iteraciones.

El modelo computacional nos permite la simulación de más de un esferoide y, por tanto, el análisis en el crecimiento de un agregado de esferoides que evoluciona inicialmente de manera independiente pero que, finalmente, constituyen un solo agregado, ver Figura 7.

III.2. Sintonización de parámetros

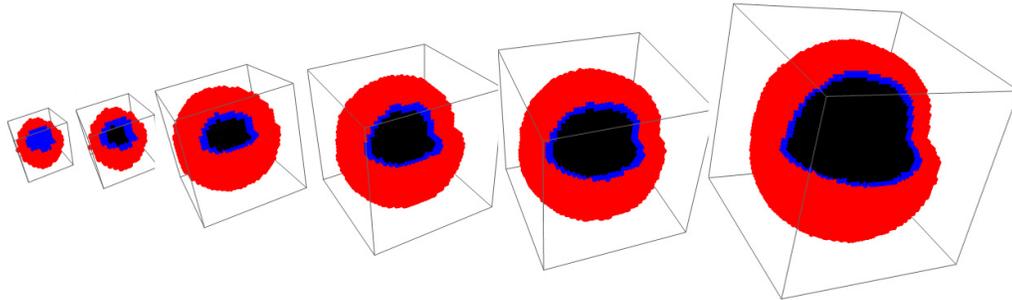


FIG. 6: Se representan ocho iteraciones en secuencia de la formación de un esferoide simulado. Se observa una zona central correspondiente al núcleo necrótico (negro), una región más externa (azul) que corresponde a la región de células en hipoxia, y una capa externa de células en ciclo (roja).

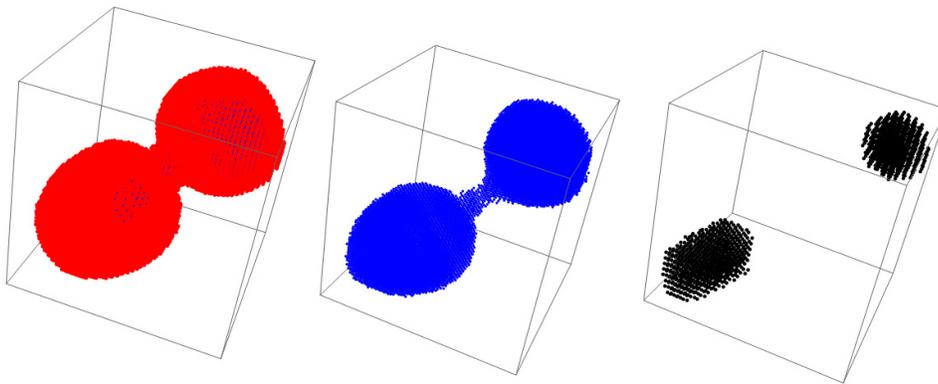


FIG. 7: Etapas iniciales de crecimiento de un agregado constituido por dos esferoides que inicialmente crecen individualmente y que finalmente constituyen un agregado. Visión externa de la capa de células en ciclo (rojo), en hipoxia (azul) y núcleos de células muertas (negro).

Una vez desarrollado el modelo general de cinética de proliferación de MTS mediante simulación computacional, lo aplicamos a los MTS de la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Para aplicar el modelo a esta línea celular concreta se debe sintonizar el mismo, es decir, dar valores a los parámetros del modelo de manera que se obtenga el mejor ajuste entre los resultados simulados, a partir del modelo computacional, y los obtenidos experi-

mentalmente en el laboratorio. Se van a sintonizar la función gradiente, las relaciones radio de la necrosis-radio del esferoide, número de células-diámetro del esferoide y diámetro del esferoide/diámetro inicial-tiempo.

El factor de escala de la red (F_{scal}) y los factores de compactación (FS_C , FS_H , FS_N) están conectados con la relación entre el radio de necrosis y el radio del esferoide, ver Figura 8. En esta figura se representan simulaciones en las que hemos usado un valor del parámetro de la simulación $P_{div} = 0.30$, lo cual supone un tiempo de duplicación (T_D) de 1.9 días. La ecuación que relaciona ambos parámetros es la siguiente:

$$P_{div} = 1 - \exp\left(-\frac{\ln(2)}{T_D}\right). \quad (4)$$

La relación entre el radio de necrosis y el radio del esferoide sólo es función de los parámetros F_{scal} , FS_C , FS_H y FS_N . En las simulaciones el parámetro que se modifica es la P_{div} que hará que el tumor crezca más o menos rápido pero no afectará a la razón entre el radio del esferoide y del núcleo necrótico. Por otro lado cualquiera de las simulaciones realizadas y que se ajustan a los valores de crecimiento experimental, dan los mismos resultados en relación a la relación de radios ya que se han fijados aquellos parámetros relevantes. Para fijar estos parámetros se exige que 10^3 células ocupen un volumen de $(4.19 \pm 1) \times 10^6 \mu\text{m}^3$ según muestran los datos experimentales [Vil96]. Este número de células seleccionado es especialmente relevante ya que es el número de células aproximado que contienen los esferoides que se consiguen en el laboratorio y a partir del cual se comienza el seguimiento de la variación de su volumen. Al fijar estos parámetros también se establece una relación entre el número de células y el diámetro del esferoide, ver Figura 9. En esta figura podemos ver el número de células de cada esferoide frente al diámetro de los mismos. Se representan tanto los datos experimentales como los simulados. En el conteo de células de la simulación se ha considerado, por un lado, el total de células y, por otro, el número de células sin considerar las que están muertas, ya que suponen una fuente de incertidumbre en el contaje experimental. Se han realizado cinco simulaciones

para la representación de los datos experimentales. Hemos usado la simulación con $P_{div} = 0.30$.

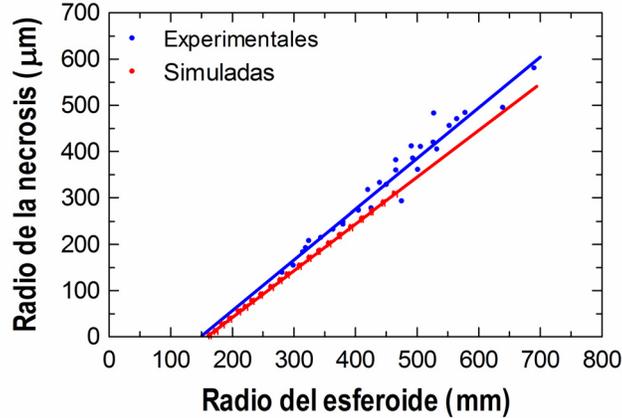


FIG. 8: Representación de puntos experimentales (azul) y simulados (rojo) del radio del núcleo necrótico frente al radio del esferoide. Ajuste de regresión lineal de puntos experimentales (azul) y simulados (rojo). Valor del parámetro $P_{div} = 0.30$. Incertidumbres con factor de cobertura $k = 1$.

El valor del número de células en las capas proliferativa e hipóxica lo hemos obtenido de unos estudios experimentales en los que se emplea uridina yodada en uno y timidina tritiada en otro [Vil96]. Se realizaron sobre unos esferoides de unas $350 \mu\text{m}$ de diámetro. En el primer estudio se obtubieron 8 capas de células en ciclo proliferativo y 2 en hipoxia. Los resultados fueron diferentes para el segundo experimento, ya que la capa de células que proliferaban contenía 4 elementos, mientras que la de células quiescentes contenía 6. En ambos casos la capa de células muertas contenía 3. El modelo computacional que se propone ha considerado un resultado intermedio de los expuestos, se ha tomado un valor de 6 para la capa más externa de células en ciclo y de 2 para las células en hipoxia, correspondiente al primer experimento, porque son los valores que mejores resultados arrojaban.

III.3. Comparación entre esferoides cultivados y esferoides simulados

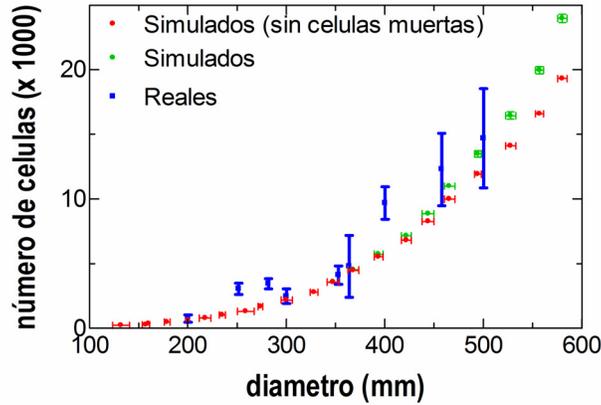


FIG. 9: Datos experimentales (azul) y simulados (rojo y verde) del número de células por esferoide frente al diámetro del mismo. Incertidumbres con factor de cobertura $k = 1$.

A partir de la sintonización, y para comparar los datos medidos en el laboratorio (que muestran variabilidad) es preciso hacer variar el parámetro P_{div} manteniendo los valores del resto de parámetros fijos. Variando el parámetro P_{div} es posible reproducir la variabilidad mostrada por los datos experimentales. El rango de valores que representan bien el crecimiento de los esferoides reales es $[0.16, 0.33]$. Los valores de los parámetros que reproducen los resultados experimentales aparecen en la Tabla I.

TABLE I: Valores de los parámetros usados en el modelo computacional.

l_0	p_0	$F_{scal}(\mu\text{m})$	P_{div}	L_{layer}	P_{exf}	L_{hipox}	FS_C	FS_H	FS_N
7.6	0.5	22.5	$[0.33 - 0.16]$	6	0.01	2	1.42	1.87	3.60

En la Figura 10 se representan los ajustes a la ecuación del modelo de crecimiento de Gompertz [Nor88]. Todas las curvas han sido normalizadas a un valor de volumen igual

a $1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ [Gui12a]. En la ecuación (5) se representa el modelo de Gompertz y en la ecuación (6) la expresión matemática que permite la normalización a volumen común V_0 . Los parámetros de Modelo de Gompertz son A y a .

$$V(t) = V(t_0) \exp(A [1 - \exp -a(t - t_0)]). \quad (5)$$

$$A' = A \ln\left(\frac{V}{V_0}\right). \quad (6)$$

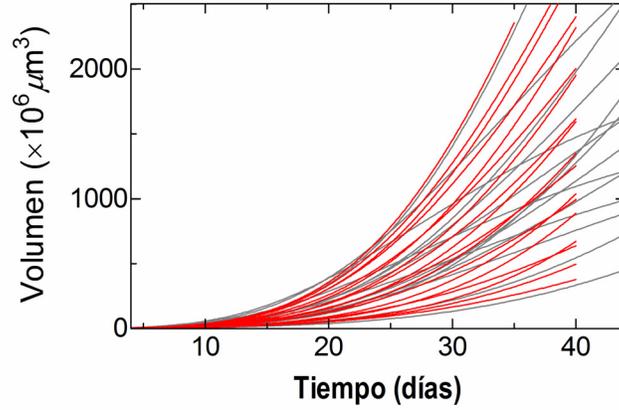


FIG. 10: Se representan los ajustes a la ecuación de Gompertz de los datos de crecimiento de esferoides experimentales (gris) y simulados (rojo) para todos los parámetros del modelo computacional fijados excepto el parámetro P_{div} para el se han considerado valores en el intervalo $[0.16, 0.33]$. Se han representado los valores de 0.16 hasta 0.33 en pasos de 0.01. Todas las curvas han sido normalizadas a un valor de volumen igual a $1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$.

Los valores de los parámetros de los ajustes de Gompertz que reproducen la variabilidad manifestada experimentalmente son representados en las Figura 11 y Figura 12. No se observa correlación en ninguna de las figuras, ni en la que se representan los parámetros de los ajustes de los datos experimentales, ni en la correspondiente a las simulaciones.

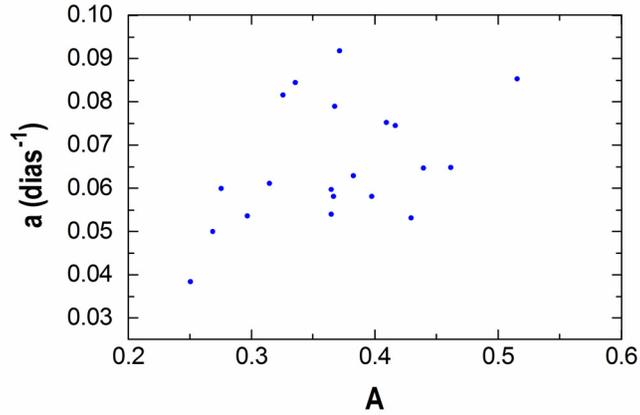


FIG. 11: Valores de los parámetros de los ajustes al Modelo de Gompertz de los datos experimentales.

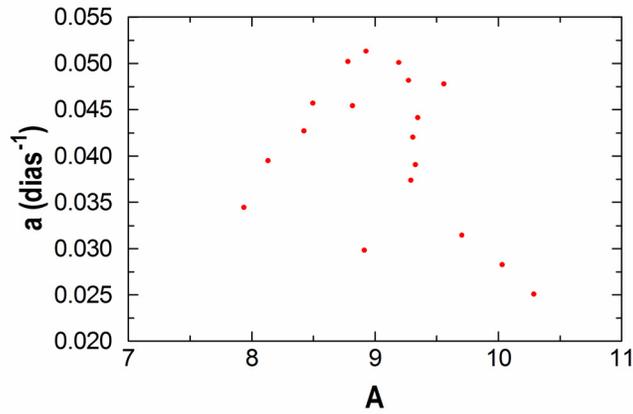


FIG. 12: Valores de los parámetros de los ajustes al Modelo de Gompertz de los datos simulados.

La variabilidad obtenida en las simulaciones una vez fijados todos los parámetros puede observarse en la Figura 13. En esta figura se representan dos conjuntos de 5 simulaciones cada una, correspondientes a los valores de P_{div} 0.25 y 0.30. Esta variabilidad de cada conjunto de simulaciones no es suficiente para explicar los diferentes comportamientos de las curvas experimentales, siendo este el motivo por el que hay que variar el parámetro P_{div} .

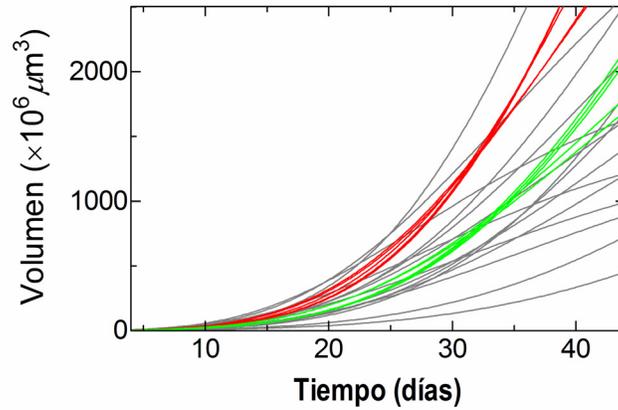


FIG. 13: Se representan dos conjuntos de ajustes al modelo de Gompertz de 5 simulaciones cada uno, correspondientes a los valores de P_{div} 0.25 (verde) y 0.30 (rojo). En gris se representan el conjunto de ajustes al modelo de Gompertz de los datos experimentales.

Del crecimiento de los esferoides podemos añadir además que se observa en las simulaciones un comportamiento lineal del incremento del diámetro relativo (al valor inicial de crecimiento) de los esferoides en función del tiempo de seguimiento, ver Figura 14. De estos resultados se deduce que la fracción de crecimiento no es constante.

En la Figura 15 podemos observar el crecimiento de 6 células clonogénicas separadas diez posiciones celulares entre ellas, inicialmente aisladas, que finalmente forman un agregado debido a que la cercanía y el tiempo transcurrido lo permiten (rojo); también el crecimiento simulado de estos seis clonógenos suficientemente alejados de manera que nunca llegan a agregarse (azul). Se puede observar un mayor crecimiento para el conjunto de clonógenos suficientemente distantes.

IV. CONCLUSIONES

Conclusiones:

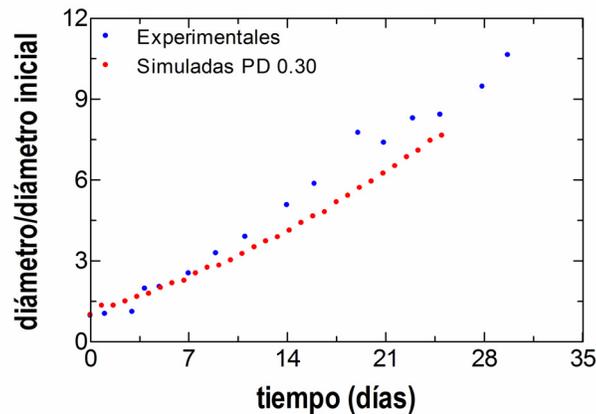


FIG. 14: Se representa el incremento del diámetro relativo (al valor inicial de crecimiento) de los esferoides en función del tiempo de seguimiento.

En este trabajo se ha desarrollado un modelo computacional de crecimiento tumoral basado en autómatas celulares, cuya característica principal ha sido la simplicidad. El número de parámetros del modelo es reducido y esto permitiría un fácil uso en el estudio de los resultados de los tratamientos oncológicos para las situaciones clínicas habituales, a diferencia de otros modelos extremadamente complejos.

Mediante este modelo se describe adecuadamente el crecimiento de los esferoides tumorales multicelulares de la línea MCF-7 cultivados *in vitro* en el laboratorio. Se ha mantenido siempre el paralelismo entre la simulación computacional y la experimentación con MTS de la línea celular MCF-7.

Para reproducir la variabilidad observada en el laboratorio es preciso hacer variar uno de los parámetros, relacionado con la probabilidad de división, manteniendo los valores del resto de parámetros del modelo fijos.

El modelo permite simular situaciones ms generales, como la que se produce cuando existe una siembra dispersa de clulas que no forma un nico agregado. El modelo permite la simulación del crecimiento de diferentes células distantes inicialmente que pueden

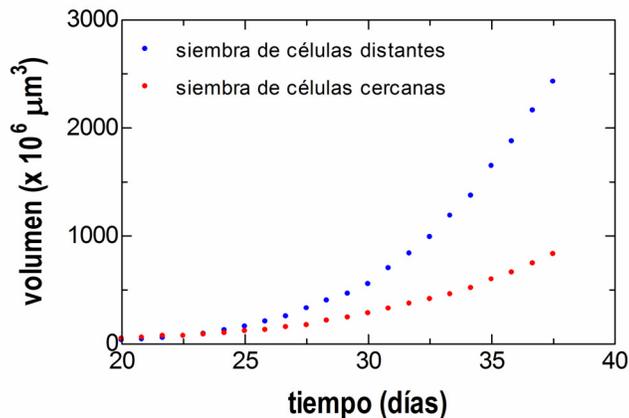


FIG. 15: Crecimiento simulado un conjunto de 6 clonógenos separados diez posiciones celulares, inicialmente aislados, que finalmente forman un agregado (rojo). Crecimiento simulado de estos seis clonógenos que nunca llegan a agregarse (azul).

llegar a formar un único agregado.

Perspectivas:

Estudio de diferentes formas de Radioterapia en el tratamiento de las metstasis o las etapas iniciales del desarrollo tumoral.

Estudio del crecimiento de las clulas tumorales que quedan tras cirugía y como afectaría esto a los resultados obtenidos con los diferentes esquemas de trataminto.

Ampliacin del modelo para incluir la angiogenesis, ya que el modelo nos permite gracias la estructura modular del código, la introducción de diferentes patrones de estructura vascular en un tumor.

-
- [Bat00] Bates RC, Edwards NS, Yates JD. Spheroids and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;36:61-74.
- [Ber10] Bertuzzi A, Bruni C, Fasano A, Gandolfi A, Papa F, Sinisgalli C. Response of tumor spheroids to radiation: modeling and parameter estimation. *Bull Math Biol* 2010;72:1069-91.
- [Chi04] Chignola R, Milotti E. Numerical simulation of tumor spheroid dynamics. *Physica A* 2004;338:261-6.
- [Chi10] Chignola R, Del Fabbro A, Farina Marcello, Militti E. Computational challenges of tumor spheroid. *J Bioinform Comput Biol* 2010;9:559-77.
- [Duc85] Düchting W, Vogelsaenger T. Recent progress in modelling and simulation of three-dimensional tumor growth and treatment. *Biosystems* 1985;18:79-91.
- [Duc89] Düchting W, Lehrig R, Rademacher G, Ulmer W. Computer simulation of clinical irradiation schemes applied to *in vitro* tumor spheroids. *Strahlenther Onkol* 1989;165:873-8.
- [Gal06] Gallardo JCP, Espinosa M C, Meléndez JZ, Maldonado VL. Esferoides tumorales multicelulares en la evaluacin de estrategias terapéuticas anticancerosas. *REB* 2006;25:101-7.
- [Gil10] Gil-Cardeza ML, Villaverde MS, Fiszman GL, Altamirano NA, Cwirenbaum RA, Glikin GC, Finocchiaro LM. Suicide gene therapy on spontaneous canine melanoma: correlations between *in vivo* tumors and their derived multicell spheroids *in vitro*. *Gene Ther* 2010;17:26-36.
- [Gro91] Groebe K, Mueller-Klieser W. Distributions of oxygen, nutrient, and metabolic waste concentrations in multicellular spheroids and their dependence on spheroid parameters. *Eur Biophys* 1991;19:169-81.
- [Gui03] Guirado D, Aranda M, Vilches M, Villalobos M, Lallena AM. Dose dependence of the growth rate of multicellular tumour spheroids after irradiation. *Br J Radiol* 2003;76:109-16.

- [Gui12a] Guirado D. Variabilidad en radiobiología. Tesis de doctorado. Universidad de Granada (España) 2012.
- [Gui12b] Guirado D, Aranda M, Ortiz M, Mesa JA, Zamora LI, Amaya E, Villalobos M, Lalena AM. Low-dose radiation hyper-radiosensitivity in multicellular tumour spheroids. *Br J Radiol* 2012;85:1398-406.
- [Hor78] Horwitz KB, Zava DT, Thilagra AK, Jesen EM, Mcguire WF. Steroid receptor analysis of nine human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1978;38:2434-7.
- [Jia05] Jiang Y, Pjesivac-Grbovic J, Cantrell C, Freyer JP. A multiscale model for avascular tumor growth. *Biophys J* 2005;89:3884-94.
- [Lai64] Laird, AK. Dynamics of tumor growth. *Br J Cancer* 1964;13:490-502.
- [Lip75] Lippman ME, Bolan G. Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture. *Nature* 1975;256:592-3.
- [Men07] Menchn S. Modelado de las diversas etapas del crecimiento del cáncer y de algunas terapias antitumorales. Tesis de Doctorado Universidad Nacional de Córdoba (Argentina) 2012.
- [Mil10] Milotti E, Chignola R. Emergent properties of tumor microenvironment in a real life model of multicell tumor spheroids. *PLoS ONE* 2010;5:el3942.
- [Mul85] Müller-Klieser W. Tumor micromilieu. Experimental and theoretical studies of multicellular tumor spheroids. *Fortschr Med* 1985;103:477-80.
- [Nor88] Norton L. A Gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer Res* 1988;48:7067-71.
- [Ole92] Olea N, Villalobos M, Ruiz de Almodvar JM, Pedraza V. MCF-7 breast cancer cells grown as multicellular spheroids in vitro: effect of 17 β -estradiol. *Int J Cancer* 1992;50:112-7.
- [Sou73] Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer* 1973;51:1409-16.
- [Sut88] Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell

- spheroid model. *Science* 1988;240:177-84.
- [Tim04] Timmins NE, Dietmair S, Nelsen LK. Hanging-drop multicellular spheroids as a model tumour angiogenesis. *Angiogenesis* 2004;7:97-103.
- [Vil96] Villalobos M. Modelos tumorales en oncología: los esferoides multicelulares en el estudio del cáncer hormonodependiente. Tesis de doctorado. Universidad de Granada (España) 1996.
- [Von66] Von Neumann J. The theory of self-reproducing automata. Univ of Illinois Press 1966, Urbana, IL.
- [War01] Wartenberg M, Dönmez F, Ling FC, Acker H, Hescheler J, Sauer H. Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *FASEB J* 2001;15:995-1005.
- [Wol94] Wolfram, S. Cellular Automata and Complexity. Addison-Wesley Publishing Company 1994.