



UNIVERSIDAD DE GRANADA

MODELO COMPUTACIONAL DE ESFEROIDES TUMORALES MULTICELULARES

Tesis doctoral

Samuel Ruiz Arrebola

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Samuel Ruiz Arrebola
ISBN: 978-84-1117-001-7
URI: <http://hdl.handle.net/10481/70405>



UNIVERSIDAD DE GRANADA

MODELO COMPUTACIONAL DE
ESFEROIDES TUMORALES
MULTICELULARES

Tesis doctoral

Samuel Ruiz Arrebola

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

2021

Modelo computacional de esferoides tumorales multicelulares

Autor de la tesis doctoral: Samuel Ruiz Arrebola (Servicio de Oncología Radioterápica y Radiofísica. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander)

Director: Dr. Damián Guirado Llorente (Unidad de Radiofísica. Hospital Universitario San Cecilio, Granada)

Directora: Dra. Mercedes Villalobos Torres (Departamento de Radiología y Medicina Física. Universidad de Granada)

Texto impreso en Santander
junio 2021

Dedicado a Marián y Julia

Resumen

Propósito: El objetivo de este trabajo es desarrollar y validar un modelo en red basado en agentes que describa el crecimiento de esferoides tumorales multicelulares utilizando herramientas Monte Carlo sencillas, que también simule la evolución de estos esferoides cuando son irradiados, y que nos permita analizar la diferencia entre distintos esquemas de fraccionamiento en radioterapia en diferentes situaciones, además de poder comparar las capacidades predictivas de diferentes modelos matemáticos de crecimiento clásicos.

Métodos: El modelo computacional consta de celdas situadas en los vértices de una cuadrícula cúbica. Se incluyen diferentes estados celulares (proliferativo, hipóxico y muerte celular), reglas de evolución celular gobernadas por 14 parámetros y la influencia de la distancia al medio de cultivo. Se cultivaron alrededor de 200 esferoides de la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7; parte de ellos fueron irradiados a diferentes dosis y otros fueron usados como datos de control. Los datos experimentales se utilizaron para ajustar los parámetros en el proceso de sintonización del modelo y para su validación. Como aplicación, hemos reproducido micro metástasis de cáncer de mama a partir de una imagen de microscopio, y las simulaciones de su evolución nos han permitido comparar su crecimiento con el de agregados tumoral del mismo número de células iniciales. Estas metástasis y agregados han sido sometidos a diferentes esquemas de fraccionamiento. Además, hemos usado los esferoides simulados como pseudo-datos para estudiar tanto la capacidad predictiva como retrospectiva (ajustando a la totalidad de las curvas de crecimiento y también a parte de ellas) de los modelos clásicos de crecimiento exponencial, Gompertz,

logístico, potencial y Bertalanffy.

Resultados: Los esferoides simulados mostraron características de crecimiento y estructurales, como el tamaño de las diferentes regiones en las que se dividen (proliferativa, hipóxica y núcleo necrótico), que se corresponden con los esferoides experimentales. Además, la relación entre el radio del núcleo necrótico y el radio total del esferoide, así como el número de células, proliferativas e hipóxicas, en función del volumen, coinciden para los esferoides experimentales y simulados. La variabilidad estadística del modelo Monte Carlo no describió todo el rango de volúmenes observados para los esferoides experimentales. Suponiendo que los parámetros del modelo varían dentro de distribuciones gaussianas, se obtuvo una muestra de esferoides que sí reproducía los hallazgos experimentales. Los esferoides irradiados simulados también mostraron un crecimiento adecuado desde el día de la irradiación, imitando razonablemente el crecimiento de los esferoides experimentales. La fracción de supervivencia calculada de los esferoides simulados muestra muy buena concordancia con los datos experimentales. En las simulaciones de patrones reales de micrometástasis, hemos observado diferencias en su evolución tras someterse a diferentes esquemas de fraccionamiento, respecto a agregados únicos de igual número de células. En cuanto a los modelos clásicos, el modelo de Gompertz proporcionó los mejores ajustes para todas las curvas de crecimiento, es decir resultó ser el que tenía las mejores capacidades para describir los datos de crecimiento simulados, arrojando un mejor valor promedio de χ^2 por grado de libertad, un orden de magnitud menor que los encontrados para los otros modelos. Los modelos de Gompertz y Bertalanffy dieron una capacidad de predicción retrospectiva similar. En lo que se refiere al poder de predicción prospectivo, el modelo de Gompertz mostró, con mucho, el mejor desempeño.

Conclusiones: El modelo desarrollado permite describir el crecimiento de esferoides tumorales multicelulares *in vitro*, incluso si son sometidos a irradiación. Reproduce muy bien la variabilidad experimental y permite aumentar el período de seguimiento con respecto a los

períodos habituales en los experimentos. La flexibilidad del modelo permite variar tanto los agentes implicados (tipos de células, características del medio, etc.) como las reglas que rigen el crecimiento del esferoide. Se pueden estudiar situaciones más generales, por ejemplo, vascularización tumoral, efectos de la radioterapia sobre tumores sólidos o la validez de los modelos matemáticos de crecimiento tumoral. De todos los modelos analizados, el modelo de Gompertz muestra el mejor poder predictivo. La flexibilidad del modelo también permite reproducir diferentes patrones de micro metástasis y tumores localizados, y someterlos a diferentes fracciones de radioterapia. Se han encontrado diferencias en el comportamiento de metástasis y agregados irradiados.

Abstract

Purpose: The objective of this work is to develop and validate an agent-based network model that describes the growth of multicellular tumor spheroids using simple Monte Carlo tools, that also simulates the evolution of these spheroids when they are irradiated, and that allows us to analyze the difference. between different radiotherapy fractionation schemes in different situations, in addition to being able to compare the predictive capacities of different classical mathematical growth models.

Methods: The computational model consists of cells located at the vertices of a cubic grid. Different cell states (proliferative, hypoxic and cell death), cell evolution rules governed by 14 parameters and the influence of the culture medium are included. About 200 spheroids of the human breast cancer cell line MCF-7 were cultured, some of them being irradiated at different doses and others were used as control data. The experimental data were used to adjust the parameters in the model tuning process, and for its validation. As an application, we have reproduced breast cancer micro-metastases from a microscope image, and simulations of their evolution have allowed us to compare their growth with that of tumor aggregates of the same number of initial cells. These metastases and aggregates have been subjected to different fractionation schemes. In addition, we have used the simulated spheroids as pseudo-data to study both the predictive and retrospective capacity (adjusting to the totality of the growth curves and also to part of them) of the classic models of exponential growth, Gompertz, logistic, potential and Bertalanffy.

Results: The simulated spheroids showed growth and structural characteristics, such as the size of the different regions in which they divide (proliferative, hypoxic and necrotic nucleus), which correspond to the experimental spheroids. Furthermore, the relationship between the radius of the necrotic nucleus and the total radius of the spheroid, as well as the number of cells, proliferative and hypoxic, as a function of volume, coincide for the experimental and simulated spheroids. The statistical variability of the Monte Carlo model did not describe the entire range of volumes observed for the experimental spheroids. Assuming that the model parameters vary within Gaussian distributions, a sample of spheroids was obtained that did reproduce the experimental findings. The simulated irradiated spheroids also showed adequate growth from the day of irradiation, reasonably mimicking the growth of the experimental spheroids. The calculated survival fraction of the simulated spheroids shows very good agreement with the experimental data. In the simulations of real micrometastasis patterns, we have observed differences in their evolution after undergoing different fractionation schemes, with respect to single aggregates of the same number of cells. Regarding the classical models, the Gompertz model provided the best fits for all growth curves, that is, it turned out to be the one with the best capabilities to describe the simulated growth data, yielding a better average value of χ^2 per degree of freedom, an order of magnitude less than those found for the other models. The Gompertz and Bertalanffy models gave a similar retrospective predictive ability. In terms of forward-looking predictive power, the Gompertz model showed by far the best performance.

Conclusions: The developed model makes it possible to describe the growth of multicellular tumor spheroids *in vitro*, even if they are subjected to irradiation. It reproduces experimental variability very well and allows the follow-up period to be increased with respect to the usual periods in experiments. The flexibility of the model makes it possible to vary both the agents involved (cell types, characteristics of the environment, etc.) and the rules governing the growth of the

spheroid. More general situations can be studied, for example, tumor vascularization, effects of radiotherapy on solid tumors or the validity of mathematical models of tumor growth. Of all the models analyzed, the Gompertz model shows the best predictive power. The flexibility of the model also allows different patterns of micro-metastases and localized tumors to be reproduced and subjected to different radiotherapy fractions. Differences have been found in the behavior of metastases and irradiated aggregates.

Prólogo y agradecimientos

Experiencias como la de haber vivido en diferentes países, haberme casado con mi mujer, haber nacido mi primera hija y haber conformado nuestro nuevo hogar, han marcado mi vida en los últimos años. En todo este período vital me ha acompañado esta tesis doctoral, que ha sido testigo y partícipe de cada momento. Pero comencemos por el principio.

Hace ya once años, mientras realizaba la residencia de la especialidad en radiofísica hospitalaria en el Hospital Universitario San Cecilio (Granada), comencé a interesarme por la línea de investigación en la que trabaja mi amigo Damián Guirado, que en esos momentos era tutor de residentes en el Servicio de Radiofísica y Protección Radiológica. Debido a la atracción que siempre despertó en mi la biología, y por el nuevo rumbo profesional que había iniciado, surgió la oportunidad de una nueva etapa de crecimiento científico en el ámbito de la radiobiología, que une estas dos áreas de conocimiento y que ha dado lugar a la redacción de este trabajo.

Así, tras el Máster en Avances en Radiología Diagnóstica y Terapéutica y Medicina Física que cursé en la Universidad de Granada, y cuya directora era Mercedes Villalobos, comencé el doctorado tras acabar mi residencia y prácticamente de camino a Santiago de Chile donde empecé a trabajar como radiofísico en la Clínica Santa María. Desde allí leí el Plan de Investigación de título “Modelo computacional de esferoides tumorales multicelulares”, mientras comenzábamos mi mujer y yo recién casados una nueva vida a 10.000 km y con la máxima ilusión de descubrir un nuevo mundo.

De esta suerte surge la oportunidad de ahondar y seguir desarrollando una línea de investigación comenzada por el grupo de investigación al que pertenecía Damián, además de Mercedes (ambos, mis directores de tesis) y Antonio Miguel Lallena, al que todos llamamos “el maestro” y sin el que esta tesis no hubiera sido posible.

Además de unir la biología con la física, como radiofísico hospitalario, sentía la necesidad de poner el foco en aportar conocimiento para la mejora en el tratamiento de los pacientes, ya que este es un asunto complejo, con el que me enfrento a diario, y al que me quería aproximar con prudencia y humildad, pero con decisión. Podemos decir que la resolución de problemas clínicos a través de estas dos disciplinas es la base de este trabajo.

En la práctica clínica, concretamente en radioterapia externa, la interrupción o alteración de la planificación inicial de un tratamiento es algo frecuente que puede disminuir su eficacia. Poder estudiar este efecto en tumores cultivados posibilita ensayar nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer, antes de su aplicación en tumores *in vivo*. Una de las aspiraciones de esta investigación ha sido la simulación de diferentes escenarios en los que se somete a tumores experimentales a tratamientos radioterápicos, mediante el desarrollo de un modelo computacional de crecimiento tumoral de esferoides tumorales multicelulares virtuales.

Transcurrido un año en Chile, volvemos a España, comenzando una nueva etapa en la que compatibilizo mis estudios con el ejercicio de la profesión en el Hospital Universitario Doctor Josep Trueta de Gerona y el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, donde trabajo actualmente. En ese tiempo comenzamos una revisión del código del programa que permitiese la optimización de los tiempos de cálculo y otros aspectos fundamentales de computación, que es posible gracias a la colaboración de Antonio.

Así han pasado los años entre simulación y simulación, mudanzas y más simulaciones, pañales, ajustes, medidas y más simulaciones. No puedo negar que recordaré por siempre las simulaciones y los ajustes, pero mucho más la satisfacción de compartir con Antonio, Damián y Mercedes esos momentos y desarrollar una herramienta que resulte útil para la práctica clínica permitiéndonos avanzar como profesionales, en beneficio del paciente, y en pro de la propia sociedad.

Debo mi máximo agradecimiento a Damián, Mercedes y Antonio por la aportación de conocimiento y apoyo en todo este tiempo.

Gracias Mercedes por los ánimos en los tiempos más difíciles y por confiar en mí y en este proyecto, además de por compartir conmigo trocitos de tu vida personal que tanto nos han hecho sonreír a mi mujer y a mí.

Antonio, no sé qué aspecto tiene el documento por el que a un director de una tesis doctoral se le reconoce tal actividad, pero sí sé el agradecimiento que uno siente hacia sus directores, y ese es exactamente el que yo siento hacia ti. No pocas horas de Skype hemos pasado arreglando los entuertos computacionales que yo he ido gobernado. Gracias por tu dedicación incondicional.

A Damián agradezco su confianza, apoyo y una más que amistad que tan bien me han hecho a nivel personal y profesional. Espero que nuestra relación nos acompañe toda la vida, porque voy a echar de menos estar al otro lado del teléfono en días y horarios intempestivos.

Quisiera agradecer por supuesto a mi familia, mi madre y mis hermanos por el apoyo que siempre me dieron. Gracias Mamá por confiar en mí y perdonar mis ausencias, gracias Verónica y Susana por estar siempre a mi lado, gracias a mis cuñados y sobrinos por valorar el esfuerzo que esta tesis ha supuesto.

Un especial agradecimiento a mi abuela Pepita, por el apoyo que siempre mostró en mis estudios y por aguantar mis bromas. También a su hija Transi, un ejemplo de lucha a la que agradezco su cariño, y el de su marido e hijos.

Agradezco a Araceli su confianza e interés en este trabajo, y sirva de recuerdo a su sabio y entrañable marido Antonio.

Marián, sin ti nada tiene sentido y no puedo más que agradecer infinitamente tu compañía y apoyo incondicional en todos y cada uno de estos años. Perdona por haberte robado tantas y tantas horas, por consentir que esta tesis se convirtiese en lo prioritario en muchos momentos. Esta tesis también lleva tu nombre, gracias por hacerme feliz y acompañarme de manera ejemplar en esta investigación que no ha sido más que una ruta en el camino de nuestra vida, esa que recorreremos juntos cada día.

Y gracias a mi Julia por tenerme paciencia, por dejarme dedicar tantas horas “al ordenador” y por alegrarme con su risa cada día a cada hora. Gracias por enseñarme lo que significa ser padre y por inspirarme fuerzas en días de flaqueza.

Samuel Ruiz Arrebola
Junio de 2021
Santander

Índice general

Introducción	1
Oncología matemática	1
Modelos experimentales	6
Hipotesis, objetivos y estructura	8
1 Modelo computacional	11
1.1 Estructura del modelo	11
1.1.1 Regiones y capas	14
1.1.2 Exfoliación	16
1.2 Proliferación	16
1.3 Irradiación	18
1.3.1 Irradiación de MTS	18
1.3.2 Probabilidad de supervivencia tras irradiación	20
1.3.3 Desocupación de posiciones de células estériles	20
1.3.4 Compactación	21
1.3.5 Fracción de supervivencia	22
1.4 Reasignación de estados	25
1.5 Cálculo de características	26
1.6 Resumen de parámetros del modelo	27
1.7 Capacidades del modelo	27

ÍNDICE GENERAL

2	Modelo experimental y sintonización	29
2.1	Modelo experimental	29
2.1.1	Formación y seguimiento de los esferoides	29
2.1.2	Irradiación de cultivos	31
2.1.3	Evolución de esferoides	31
2.2	Sintonización	33
2.2.1	Parámetros	34
2.2.2	Esferoides de control	36
2.2.3	Esferoides irradiados	38
3	Validación	45
3.1	Cumplimiento de criterios	45
3.2	Comparación de características específicas	47
3.2.1	Estructura de capas	47
3.2.2	Relación entre radios	50
3.2.3	Número de células	50
3.2.4	Fracción de supervivencia	52
3.3	Variabilidad	55
4	Aplicación clínica	61
4.1	Metástasis	62
4.1.1	Metodología	63
4.2	Resultados y discusión	63
4.2.1	Metástasis y agregado simulados	63
4.2.2	Análisis	64
4.2.3	Probabilidad de control tumoral	67
5	Evaluación de modelos	69
5.1	Modelos clásicos	69
5.2	Métodos estadísticos	72
5.3	Capacidad predictiva	74
5.3.1	Análisis	77
5.3.2	Prospección y retrospección	80
5.4	Discusión	85

6 Conclusiones y perspectivas	87
6.1 Conclusiones	87
6.2 Perspectivas	89
Bibliografía	91

Introducción

El término cáncer engloba un conjunto de enfermedades de carácter grave, que tienen en común la falta de control de la proliferación celular y la capacidad de producir metástasis. Es, por tanto, una enfermedad no local que afecta al individuo en conjunto aunque puede manifestarse a nivel local según el órgano donde se asiente. La incidencia del cáncer es cada vez mayor, y la mortalidad es también alta a pesar de los numerosos tratamientos que se van desarrollando conforme van evolucionando las técnicas de biología molecular, cada vez más sofisticadas, que a su vez aportan nuevos conocimientos de la biología tumoral.

Por otra parte, la estructura tumoral suele ser muy heterogénea ya en el momento del diagnóstico, tanto en lo que se refiere al tipo celular, como a las alteraciones moleculares o a la oxigenación, nutrición y distribución en las distintas fases del ciclo celular, todo lo cual influye en mayor o menor medida en la cinética de proliferación, y por ende, en la posibilidad de control tumoral con los distintos tratamientos. Estas son algunas de las variables que se intentan modelar, así como el comportamiento del tumor desde su origen, en el ámbito del modelado matemático.

Oncología matemática

El interés sobre modelos matemáticos en el ámbito oncológico, campo de la oncología matemática, puesto de manifiesto en el aumento del número de publicaciones, está sufriendo un gran crecimiento en los últimos años [Bra19]. En esta área han contribuido muchos trabajos (ver por ejemplo [Nor77, Nor88, Hah99, And00, Mic05, And06, Ben14]), y son numerosos los autores que han hecho revisiones de modelos matemático [Ara04, Fri04, Low10, Alt15].

Algunos modelos se han centrado en propiedades de determinados tipos de cáncer, como la leucemia [Mic05] y el glioma, [Eik10] o cánceres de mama [End06], próstata [Swa01] o vejiga [Bun08] entre otros. El éxito de estos modelos de crecimiento tumoral exige que sus parámetros se ajusten cuidadosamente a partir de los valores obtenidos de los datos experimentales y clínicos. Determinadas publicaciones en oncología matemática destacan por su naturaleza verdaderamente integradora y su esfuerzo deliberado e interdisciplinario de sintonización y validación de sus modelos [Koz01, And09, Led13, Mar14, Pro15, Pol18, End18, Kaz19].

Uno de los principales objetivos de la oncología matemática es el modelado de diversos estudios preclínicos, clínicos, biológicos y moleculares, así como la influencia de tratamientos oncológicos específicos de cirugía [End05, Han15], de radioterapia [McA07, Kem10, Gao13, Alf14], quimioterapia [Pow07, Cas09, Hin09, Vai11, Pow12, Pow13], terapia antiangiogénica [Sac01, Pol11, Hut11, Pol15], viroterapia [Din06, Fri06, Mah17, San17] e inmunoterapia [Nan00, Kuz01, Cas07, Kir09, Eli11, Kog12], así como sus posibles combinaciones [Bun11, Haw15, Alf19].

Existen grupos de investigación dentro del campo de la oncología matemática [Gat09, Cun11, Led13, Pro15, Zha17, Gat18, Alf18] que han desarrollado modelos de los que ha derivado la evaluación de protocolos de tratamiento en ensayos clínicos prospectivos [NCT21, NCT33, NCT56, NCT72]. El éxito de muchos de ellos ha dado lugar a que los oncólogos comiencen a adoptarlos como una metodología valiosa. Con esto, la comunidad de oncología matemática tiene la oportunidad y la responsabilidad de identificar claramente el propósito de los modelos desarrollados, y evaluar y discutir críticamente si sus predicciones son de naturaleza meramente “académica” o realmente “traslacional” [Bra19]. Si los modelos no están debidamente sintonizados y validados, no deben usarse para sugerir protocolos de tratamiento no probados, proponer combinaciones de terapia optimizadas o desarrollar enfoques terapéuticos personalizados, ya que corren el riesgo de simular el crecimiento de tumores y la dinámica de respuesta a tratamientos que son, aunque interesantes, biológica y clínicamente poco realistas.

Sin embargo, el creciente conocimiento biológico ha hecho que se usen, cada vez con más frecuencia, modelos que requieren de un mayor número de parámetros, que a su vez necesitan múltiples fuentes experimentales. A menudo, esto lleva a considerar inadecuadamente conjuntos de datos experimentales en los que se

mezclan tipos de tumores, se consideran diferentes condiciones experimentales e incluso valoran distintas escalas espacio-temporales de forma inadecuada según nuestro criterio y el de otros autores [Bra19].

A pesar de su naturaleza compleja, la cinética del crecimiento tumoral parece seguir leyes relativamente simples que pueden expresarse a través de una gran variedad de modelos matemáticos. Entre ellos, los modelos clásicos, como el exponencial, han sido ampliamente utilizados [Mar94, Ben14].

Todos estos modelos matemáticos incluyen varios parámetros libres que se ajustan a los correspondientes datos de tumores *in vivo* [Vai82, Ben14] o *in vitro* [Ole93, Mar94, Wal13]. Los modelos ajustados se han aplicado para determinar las dosis y la programación de medicamentos contra el cáncer [Bar03, Swi09, Sim13], o para predecir los efectos citotóxicos o antiangiogénicos de los medicamentos sobre el crecimiento tumoral [Sim04, Rib11]. Otra aplicación común en la práctica clínica es la evaluación de las modificaciones que deben incluirse en el plan de tratamiento cuando se producen retrasos o interrupciones en la radioterapia. Hasta donde sabemos, solo se ha utilizado y se sigue utilizando el modelo exponencial para este propósito y no tenemos conocimiento de que se esté considerando para esta tarea ningún otro de los modelos antes mencionados [Roy19].

Sin embargo, consideramos que no se ha estudiado en profundidad la capacidad predictiva de estos modelos; es decir, cómo describen el crecimiento de tumores *in vivo* o *in vitro* en momentos posteriores y anteriores a los utilizados en el procedimiento de ajuste que permite establecer los valores de sus parámetros característicos. Esto puede deberse al hecho de que, por lo general, solo se analizan unas pocas curvas de crecimiento, en las que la cantidad de datos de volumen disponible suele ser muy pequeña [Ben14, Mur16, Bil19, Wei19, Vag20, Nic20]. Por ejemplo, Benzekry et al. ([Ben14]) estudiaron la evolución de cánceres de pulmón y de mama xenoinjertados en modelos animales *in vivo*, probando las capacidades predictivas de varios modelos matemáticos de crecimiento. Su serie de datos mostró un seguimiento de aproximadamente 15 días con más de 10 observaciones; ajustaron el modelo utilizando los primeros 3-9 datos y compararon su predicción con la observación experimental encontrada entre 1 y 7 días después. Podemos mencionar también el trabajo de Murphy et al. ([Mur16]) en el que utilizaron una única curva

de crecimiento que incluía 14 puntos de datos y que abarcaba 114 días. La situación es similar en muchos otros trabajos ([Bil19, Wei19, Vag20, Nic20]).

Siguiendo los resultados encontrados en estudios clínicos, biológicos y moleculares, se ha demostrado que los modelos computacionales del crecimiento tumoral y de los efectos de la radiación en las células pueden servir para predecir la eficacia de la radioterapia para tumores *in vivo*. Una ventaja de casi todos los modelos computacionales es su capacidad para describir adecuadamente la evolución del tumor en intervalos de tiempo más largos que los que se observan habitualmente en experimentos llevados a cabo con modelos tumorales *in vivo* o *in vitro*.

Según Roose *et al.* [Roo07], los modelos computacionales que describen sistemas biológicos pueden clasificarse en tres grupos: los modelos matemáticos continuos, los modelos de población celular discreta y los híbridos. Por lo general, los modelos matemáticos continuos describen los ingredientes principales, como las matrices extracelulares de los tejidos tumorales, medios continuos y algunos de ellos tienen una base matemática muy compleja [War97, Fer02, Chi04, Jia05, Chi10, Mil10, Ber10]. Estos modelos incluyen sistemas de ecuaciones diferenciales basados en leyes de conservación de masas, con el objetivo de realizar una descripción detallada de los procesos del metabolismo celular, así como varios aspectos bioquímicos y biomecánicos. Sin embargo, el hecho de que estos procesos metabólicos tengan diferentes escalas de tiempo impone descripciones matemáticas no triviales que involucran un gran número de ecuaciones, con numerosos parámetros, cuya solución y evaluación es difícil debido a su complejidad [War97, Fer10]. En cualquier caso, existen modelos continuos relativamente simples, basados en ecuaciones de difusión-convección, que son capaces de describir tanto el crecimiento como la infiltración de micro-tumores en un entorno 3D [Luj16, Luj18] y la evolución de gliomas con buenas perspectivas en la práctica clínica [Sua12, Jac15]. Hoy en día, los modelos de sistemas biológicos de este tipo se benefician de las estrategias de computación de alto rendimiento y *clusters* con una gran cantidad de nodos de computación.

Los modelos de población celular discreta consideran procesos a nivel celular, con interacciones de célula a célula, y describen tanto el espacio como el tiempo como variables discretas. Estos modelos pueden clasificarse en aquellos que se centran en los volúmenes o superficies de las células, los denominados “modelos en

red”, que sitúan las células en posiciones definidas en una red rígida (ver referencia [Met19] para más detalles). Dentro de este grupo se encuentran los autómatas celulares y los modelos basados en agentes (*agent based model*, ABM). Estos modelos tratan con una población de células discreta cuyos estados se caracterizan por variables vectoriales que involucran la posición de la célula, la fase del ciclo celular en la que se encuentra, los detalles sobre cómo interactúa con el ambiente, etc. [Roo07, Ben14].

Los autómatas celulares fueron introducidos por Von Neumann y Ulam en 1940 [Von66]. En estos modelos discretos, las celdas están situadas en las posiciones de una red regular. Cada célula puede estar en un número de ciertos estados (por ejemplo, proliferativo, inactivo o hipóxico, de muerte celular, etc.) y está conectada con un cierto número de células vecinas que influyen en su evolución ulterior de acuerdo con reglas fijas dadas. [Tof87, Mat07]. Las reglas que impulsan las modificaciones del estado de las celdas no cambian con el tiempo y se aplican simultáneamente en toda la red [Sch11]. Más recientemente, estos modelos han introducido procesos estocásticos en las reglas antes mencionadas [Mat07, Rej11].

Los modelos ABM simulan operaciones simultáneas de entidades múltiples (agentes) en un intento de recrear y predecir las acciones de fenómenos complejos. Los agentes pueden ser genes, proteínas, metabolitos, subcomponentes celulares o las propias células [Wan08, Jea16, Jea18]. Los agentes interactúan entre sí según reglas predefinidas que dependen de su situación espacial y del instante de evolución del sistema que se analiza, y todos los procesos involucrados pueden incluir aleatoriedad. Estos modelos están especialmente adaptados para estudiar metástasis, heterogeneidades de tejidos, vascularización/angiogénesis, señales de transducción y mutagénesis, etc. [Mat07]. Utilizando estos modelos se ha estudiado la quimiotaxis bacteriana [Emo05], la dependencia del calcio de la migración celular en la cicatrización de heridas [Wal04] o la predicción de los resultados de ensayos clínicos de diferentes tratamientos anticitoquinas para la sepsis [An04].

Algunos de los primeros ABM aplicados a tumores *in vivo* fueron propuestos por Düchting *et al.* [Duc81, Duc83, Duc85, Duc90]. Estos autores modelaron el crecimiento de tumores *in vivo* a partir de células tumorales individuales y estudiaron el efecto de radioterapia fraccionada en ellos [AI01, AI04]. Las limitaciones en

la capacidad de cálculo hace 30 años no habían permitido que estos modelos funcionaran con redes lo suficientemente grandes para simular tumores con un número de células similar al observado experimentalmente.

También se han utilizado ampliamente modelos híbridos [Mat07, Wan08, End09, Dei09, Rej11]. En estos modelos se persigue un equilibrio entre el número de células consideradas y el nivel de detalle celular aplicado, permitiendo incluso estudios moleculares. Con ellos puede analizarse la influencia de factores intra y extracelulares en el crecimiento tumoral, utilizando diversas escalas de tiempo y espacio.

En oncología matemática para nuevas terapias contra el cáncer se exigen una serie de requisitos al modelo matemático para que pueda realizar predicciones confiables, comprobables y directamente aplicables o traslacionales sobre nuevas dosis terapéuticas, protocolos de tratamiento o terapias combinadas [Bra19]. Estos requisitos hacen referencia a la necesidad de contar con un biomarcador de la carga tumoral, al desarrollo de un modelo mecanicista que describa su evolución a lo largo del tiempo, a la calibración o sintonización del modelo con datos experimentales existentes, validación del modelo con datos experimentales no usados para su sintonización, evaluación de la capacidad predictiva de un tratamiento conocido, y simulación y predicción de tratamientos no probados.

Modelos experimentales

El estudio del comportamiento de las células tumorales y su cinética requiere de modelos experimentales, porque permiten comprobar la consistencia de las hipótesis biológicas con menores costes de tiempo y dinero.

Tradicionalmente, una primera aproximación al problema se realizó utilizando células de diferentes líneas cultivadas en monocapa, es decir, modelos 2D. Sin embargo, el crecimiento de tumores sólidos *in vivo* ocurre en 3D, con contactos célula a célula, la presencia de una matriz extracelular y una distribución irregular de oxígeno y nutrientes, además de desarrollarse en un ambiente tisular con estroma y estar sometido a la influencia del sistema inmunológico.

Los esferoides tumorales multicelulares (*multicellular tumor spheroids*, MTS) son agregados de células que adquieren una conformación esferoidal y que crecen

en suspensión en condiciones de cultivo controladas [Sut88, Cui17]. Los MTS pueden considerarse como una estructura celular 3D *in vitro* con una complejidad similar en algunos aspectos a la de los tumores *in vivo* o micro-metástasis con tamaños similares [Okt06, Pam07, Fri09, Lab12, Pac16]. En este sentido, cabe señalar que la cinética de crecimiento de los MTS es similar a la de los tumores *in vivo* en sus primeros estadios avasculares [Con83], mostrando la fisiopatología de las microrregiones y metástasis tumorales y otras características como metabolismo alterado, perturbaciones en la expresión de genes y proteínas, núcleos necróticos o resistencias a terapias [Sut88, Mue00]. Las propiedades de los MTS hacen que sean útiles para estudios de biología tumoral, así como para aplicaciones biomédicas y clínicas [Mue97, Mue00, Bat00, Kun04].

El crecimiento de los MTS está relacionado principalmente con células clonogénicas tumorales que desempeñan un papel similar a las células madre de tumores reales (*cancer stem cells*, CSC). La expresión de las características clonogénicas de ambos tipos de células requiere que estén situadas cerca de nutrientes y oxígeno, donde muestran una mayor actividad proliferativa que las más alejadas [Mue86, Cas92, Mic18]. De hecho, los nutrientes y el oxígeno penetran en la estructura del MTS solo por difusión y esto significa que, a distancias entre 50 y 250 μm de la superficie del esferoide, las células se encuentran en un estado hipóxico o incluso necrótico debido al déficit de nutrientes y O_2 [Fre80, Mue87]. En los tumores las regiones hipóxicas aparecen a distancias similares de los capilares [Con83, Sut86, Sut88, Mue00]. Estas células inactivas, no proliferativas, también pueden contribuir al crecimiento del MTS si su situación con respecto a los nutrientes y el oxígeno se vuelve favorable en algún momento.

Los MTS permiten también estudiar cómo su cinética de proliferación se ve afectada por las estrategias de tratamiento, como quimioterapia, hormonoterapia o radioterapia [Oli94, Stu95, Fri96, Gui03, Gui12b, Wan14, McM16, Sos18, Son18, Ver18].

En los MTS, como en los tumores reales, los contactos entre células, que permiten intercambios de señales y un mantenimiento de la estructura física del ADN diferente a los del cultivo monocapa, pueden tener una influencia importante en la respuesta celular a la radiación [Dur01]. Gran parte del trabajo realizado en este campo se ha centrado en la determinación de la radiosensibilidad celular,

expresada en términos de la fracción de supervivencia celular (*survival fraction*, SF). Este parece ser uno de los parámetros más importantes para fines de tratamiento, porque la radiosensibilidad de las células tumorales humanas en cultivo [Fer81, Dea84, Buf01] y la respuesta a la radiación de los MTS se han correlacionado con la radiocurabilidad clínica del tipo de tumor correspondiente [Wei84].

En este modelo experimental también se han probado fenómenos más específicos, como la hipersensibilidad a bajas dosis [Gui12] o los efectos de diferentes estrategias de fraccionamiento de radioterapia [Ara03].

Sin embargo, los tumores reales son más complejos que los modelos biológicos *in vitro*, y los MTS muestran limitaciones porque no tienen estroma ni vasos sanguíneos. Al mismo tiempo, la regulación supra-tisular los hace insuficientes para el estudio de la angiogénesis o la respuesta inmune. De hecho, algunos autores como [Oli19] utilizan modelo más complejos como esferas de células clonogénicas de MCF-7 y otras líneas celulares, o cultivos con IrECM (matriz extra-celular rica en laminina) para estudiar la importancia de las células madre tumorales o de las metaloproteasas u otras variables en la respuesta a la radiación, o incluso xenoinjertos en animales también utilizados por [Ben14] como base para el desarrollo del modelo computacional.

Es por tanto fundamental elegir el modelo adecuado, tanto biológico como computacional, que permita obtener resultados acordes con los objetivos propuestos; es así obligatorio un equilibrio entre el nivel de complejidad del modelo y el costo computacional [Wan08, Byr10].

Hipótesis, objetivos y estructura de esta tesis doctoral

La **hipótesis** que fundamenta esta tesis doctoral es: un modelo computacional basado en autómatas celulares sencillo, es decir con un número reducido de parámetros, permitiría simular la cinética de crecimiento de los MTS y su evolución, también al ser sometidos a irradiación, sin la complejidad, tiempos de computación ni soporte computacional que requieren los modelos basados en ecuaciones diferenciales.

El **objetivo principal** del presente trabajo ha sido desarrollar y validar un ABM que describa el crecimiento de los MTS de la línea celular de cáncer de mama MCF-

7, utilizando herramientas matemáticas simples para la descripción de su evolución celular, además de permitir el estudio del crecimiento de los MTS cuando fuesen irradiados, abordando así las capacidades de diferentes estrategias terapéuticas para tumores sólidos, estudiando los efectos de la radiación en células tumorales *in vitro* e *in vivo*, además de predecir la eficacia de los tratamientos de radioterapia.

Objetivos secundarios son:

1. Analizar el comportamiento general de los MTS simulados y su evolución tras ser sometidos a diferentes esquemas de irradiación. En concreto, comparar los resultados de las simulaciones con las curvas de crecimiento, la variabilidad de los volúmenes, los radios de los núcleos necróticos y su dependencia con el radio total de los esferoides, y el número de células proliferativas e hipóxicas en función del volumen de los MTS, las curvas de crecimiento tras la irradiación de los esferoides y la fracción de supervivencia de los MTS experimentales. Además, valorar la influencia de los parámetros del modelo en la variabilidad general de las curvas de crecimiento.
2. Estudiar, en el modelo desarrollado, los efectos de diferentes esquemas de fraccionamiento, dosis totales, fracciones de dosis o interrupciones y retrasos del tratamiento; cuestiones todas ellas de fundamental importancia para evitar las limitaciones técnicas, económicas y éticas que conlleva el análisis de estos aspectos en los ensayos clínicos reales.
3. Analizar, con nuestro modelo, el efecto de diferentes esquemas de radioterapia fraccionada, sobre una metástasis, a partir de una imagen de un ganglio linfático de una paciente con cáncer de mama, y compararlo con el efecto que se produce cuando se trata de un único agregado que tiene el mismo número de células que la metástasis. Este análisis nos permitirá estudiar diferentes formas de Radioterapia en el tratamiento de metástasis o etapas iniciales del desarrollo tumoral, así como el del crecimiento de las células tumorales que quedan tras cirugía.

4. Por último, determinar cuantitativamente las capacidades predictivas de distintos modelos clásicos de crecimiento tumoral: modelo exponencial, Gompertz, logístico, potencial y Bertalanffy. Al ajustar los modelos a parte de las curvas de crecimiento generadas por nuestro ABM, correspondientes a los datos simulados o pseudo-datos experimentales, se puede analizar la capacidad de estos modelos matemáticos clásicos para reproducir el crecimiento pasado y futuro de los tumores. Los resultados obtenidos en este análisis podrían ayudar a establecer las potenciales capacidades pronósticas de los modelos matemáticos, si las tuvieran, en la clínica.

Esta tesis doctoral está **estructurada** en capítulos, y estos están ordenados respondiendo a los **objetivos** descritos desarrollando los **resultados** obtenidos y la **discusión** que ha dado origen a los artículos publicados. Un total de seis capítulos completan el trabajo, de los cuales tres se han dedicado al modelo desarrollado, dos a aplicaciones, y un último capítulo dedicado a las conclusiones.

En el primer capítulo de la tesis se describe el modelo computacional, su estructura, mecanismos de proliferación celular, irradiación de los MTS, cálculo de características, además de sus capacidades y **limitaciones**. El desarrollo de la parte experimental, metodología e irradiación de cultivos, así como la descripción del proceso de sintonización del modelo, ocupan el segundo capítulo. El tercer capítulo está dedicado íntegramente a la validación del modelo. En el cuarto capítulo nos hemos centrado en las aplicaciones clínicas, hemos analizado las diferencias entre fraccionamientos de radioterapia en el caso de metástasis dispersas y agregados únicos. El uso de los MTS simulados como pseudo datos experimentales para la evaluación de la capacidad predictiva de modelos clásicos de crecimiento tumoral, nos ha ocupado el quinto capítulo. Por último, el sexto capítulo lo hemos dedicado a las conclusiones de la tesis y las perspectivas del modelo desarrollado.

Modelo computacional

En este capítulo se describe la estructura del modelo computacional desarrollado. En particular se detallan los aspectos fundamentales del programa principal y de las subrutinas que gobiernan todos los procesos, sus parámetros, así como el origen de los mismos; las funciones que calculan propiedades de los MTS como el volumen, el radio y la fracción de supervivencia. Además, y como consecuencia de su diseño, se analizan el alcance y posibilidades del modelo. El programa está escrito en el lenguaje de programación Fortran 77. Parte de estos resultados están publicados en el artículo [\[Rui20\]](#).

En primer lugar, analizamos el modelo básico que permite reproducir el crecimiento de los MTS. Seguidamente, describimos las modificaciones necesarias para poder incorporar el proceso de irradiación. Además, se discuten las capacidades del modelo y sus limitaciones debido a su diseño.

1.1 Estructura del modelo

El modelo computacional que hemos desarrollado se basa en una red cúbica fija de $512 \times 512 \times 512$ vértices en los que se sitúan las células del MTS. El algoritmo considera una matriz S cuyos elementos $S(i, j, k)$ son etiquetados según el estado de la célula situada en la posición $P \equiv (i, j, k)$. Así, se asigna $S = p$ en el caso de

células proliferativas, $S = d$ si las células están en un estado de muerte celular o $S = h$ para las hipóxicas o células inactivas. Los vértices desocupados se etiquetan con $S = 0$. Los estados celulares se determinan empleando reglas simples de evolución, como veremos más adelante, de acuerdo con la distancia desde la posición que ocupan hasta los nutrientes y el O_2 .

La simulación consta de una rutina principal, que incluye un algoritmo iterativo que gobierna la dinámica de duplicación de las células del MTS, y un paquete de subrutinas que permiten identificar las células que proliferan o que pueden salir del MTS desde su periferia, dando lugar a la denominada exfoliación (subrutina EXFOLIACION); buscar posiciones libres en la red donde se puedan ubicar nuevas células una vez que se hayan generado después de la división (subrutina UBICACION); y realizar el cálculo de todas las cantidades de interés, como el radio y el volumen del MTS (subrutina RADIO). La figura 1.1 muestra los cuatro bloques principales del modelo desarrollado.

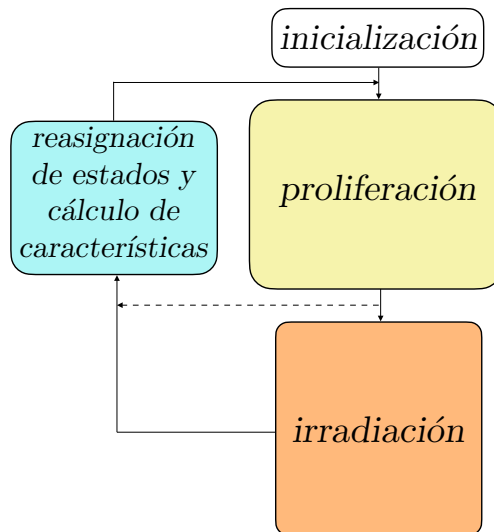


Figura 1.1: Bloques principales del modelo desarrollado.

Algunas subrutinas adicionales permiten determinar diferentes propiedades de la red celular: la distancia entre dos posiciones (subrutina DIST), el número de posiciones vecinas ocupadas alrededor de una determinada (subrutina VECINDARIO), o la distancia de una posición a la superficie del MTS, que da cuenta de la

1.1. ESTRUCTURA DEL MODELO

distancia al medio de cultivo, incluyendo los nutrientes y O_2 (subrutina PROFUNDIDAD).

Otro paquete de subrutinas permite manejar la información vinculada a las células que forman el MTS, como la probabilidad de división de las mismas según la posición dada en el momento dado de la evolución del esferoide (función PDIV), o los cambios en los estados de la célula de acuerdo con las reglas que se describen más adelante.

En lo que se muestran a continuación, solo se simulan esferoides individuales, pero se puede realizar la simulación de la evolución simultánea de varios MTS como veremos en el capítulo 4.

Nuestras simulaciones parten de un agregado inicial de $N_p = 7$ células proliferativas situadas en el centro de la red 3D, $(i, k, j) \equiv (0, 0, 0)$, y en las seis posiciones vecinas, $(i, j, k) \equiv (\pm 1, 0, 0), (0, \pm 1, 0), (0, 0, \pm 1)$. Por tanto, $S(i, j, k) = p$ en esas siete posiciones y $S(i, j, k) = 0$ en el resto de vértices de la red. Este agregado inicial es el mismo para todos los MTS simulados y no incluye ni células muertas, $N_d = 0$, ni hipóxicas, $N_h = 0$.

La simulación se desarrolla de forma iterativa. La figura 1.2 muestra el diagrama de bloques correspondiente a la inicialización, la proliferación y la reasignación de estados. Las operaciones que se realizan en cada iteración son las siguientes:

- i. se decide por muestreo aleatorio si cada una de las células proliferativas que hay en el MTS se divide o no;
- ii. si la célula se divide, la posición que ocupará la nueva célula se determina observando las posiciones desocupadas alrededor de la célula madre;
- iii. se decide mediante muestreo aleatorio si las células periféricas desaparecen o no del MTS por exfoliación;
- iv. se actualiza el estado de cada una de las células en la nueva configuración del MTS, y
- v. se evalúan las cantidades que caracterizan el crecimiento de MTS para seguir su evolución.

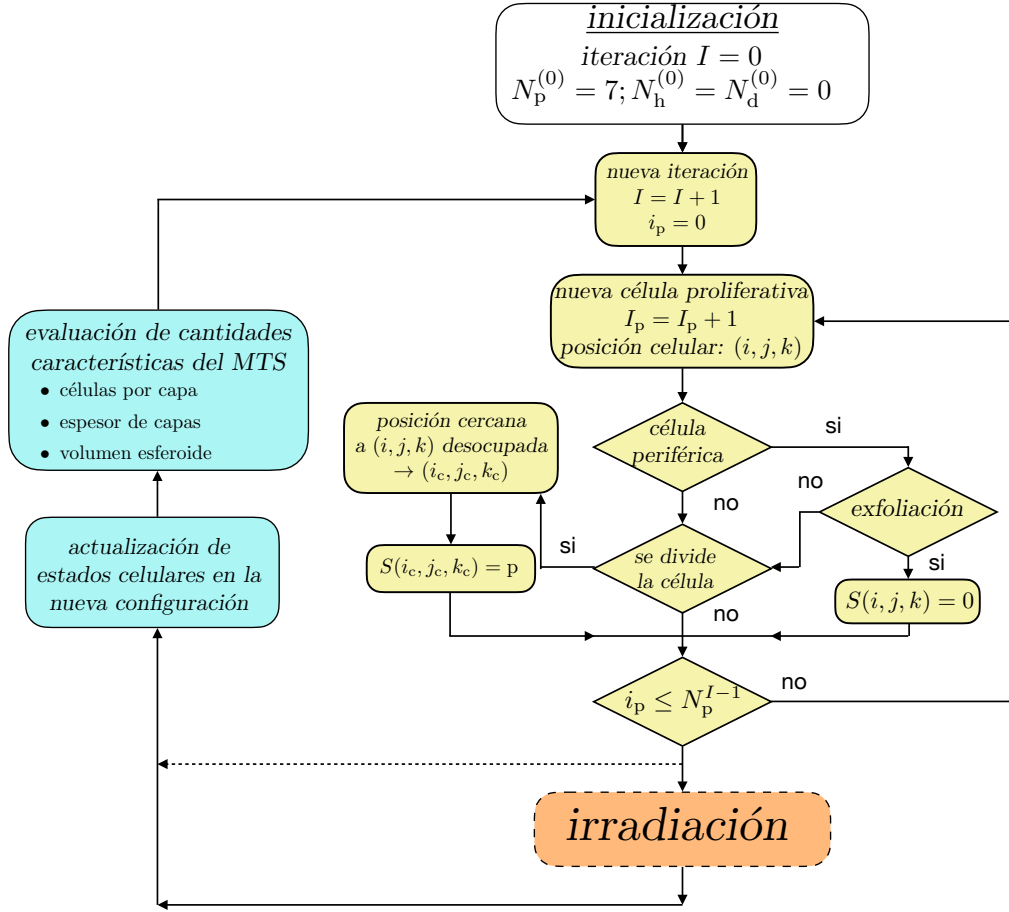


Figura 1.2: Diagrama de bloques de la inicialización, proliferación y reasignación de estados.

En el diagrama de bloques de la figura 1.2, I etiqueta las iteraciones sucesivas que están vinculadas al tiempo transcurrido en el crecimiento del MTS (ver sección 1.2) e i_p es un índice que corre sobre todas las células proliferativas en cada iteración.

1.1.1 Regiones y capas

Experimentalmente, las células en los MTS se organizan en capas que forman regiones según su carácter proliferativo, hipóxico o necrótico [Ole92]. Se pueden ver las diferentes regiones de un MTS simulado en la figura 1.3. En el modelo computacional, para determinar si una posición $P \equiv (i, j, k)$, y la célula que eventualmente puede ocuparla, se encuentra en una determinada región, es necesario

determinar su distancia a los nutrientes y O_2 .

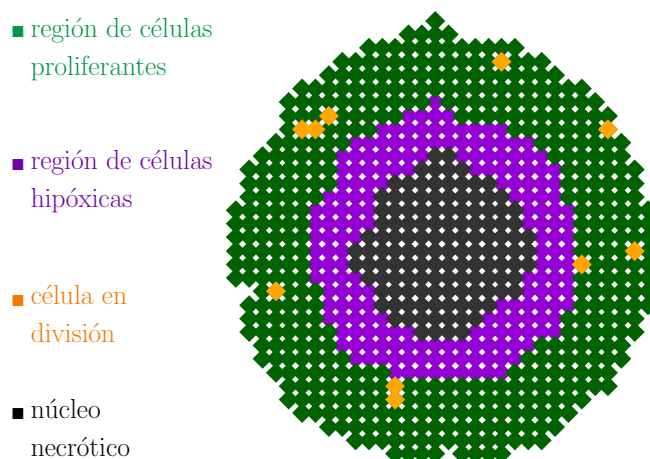


Figura 1.3: Se muestran las regiones de un MTS simulado tras 30 días de evolución. Se puede observar una región externa de células proliferativas (región en verde en la figura), junto con una región interna correspondiente a las células hipóxicas (dibujadas en violeta) y una región central que muestra el núcleo necrótico (en negro en la figura). También se pueden apreciar células que se encuentran en división en esa iteración (color naranja en figura).

En nuestro programa la determinación de esta distancia se realiza en la subrutina PROFUNDIDAD, que comienza buscando dos posiciones desocupadas consecutivas en cada una de las 26 direcciones definidas como $(i + nl_i, j + nl_j, k + nl_k)$, con $n = 1, 2, 3, \dots$ y $l_m = 0, \pm 1$ ($m = i, j, k$), excepto $(l_i, l_j, l_k) = (0, 0, 0)$. El número de células entre la posición analizada, P , y la posición anterior a las dos posiciones desocupadas consecutivas, se almacena para cada una de las direcciones de búsqueda. Finalmente, el menor de estos valores define la distancia a los nutrientes o la profundidad de la posición P .

Hemos comprobado que el aumento del número de direcciones de búsqueda no mejora los resultados de la simulación, mientras que el uso de un valor por debajo de 26 produce artefactos en las formas del MTS simulado. El número máximo de capas proliferativas (L_p) e hipóxicas (L_h) son datos de entrada y sus valores se mantienen durante toda la simulación.

1.1.2 Exfoliación

La exfoliación, que es el proceso por el cual las células periféricas pueden abandonar el MTS, se implementa en la simulación mediante la subrutina EXFOLIACION.

La exfoliación ocurre con una probabilidad que viene dada por p_{exfol} . Todas las células proliferativas que se encuentran en la capa más externa son evaluadas, de tal manera que si $\xi \leq p_{\text{exfol}}$, con $\xi \in U(0, 1)$, la célula abandona el MTS y su posición queda vacante ($S = 0$).

El p_{exfol} es un parámetro de entrada del modelo cuyo valor es constante para todos los MTS simulados.

1.2 Proliferación

Una célula proliferativa ($S = p$) es una célula que puede dividirse. La división ocurre con una probabilidad que viene dada por la siguiente expresión

$$p_{\text{div}} = p_{\text{max}} g. \quad (1.1)$$

Aquí p_{max} es la probabilidad de división de las células del MTS externas que tienen libre acceso a los nutrientes y O_2 proporcionados por el medio de cultivo y muestran, como consecuencia, una probabilidad de división máxima. Por otro lado, g describe el gradiente de nutrientes dentro del MTS. En nuestro caso elegimos la siguiente expresión:

$$g(d; d_0, \kappa) = \frac{1 + \exp(-\kappa d_0)}{1 + \exp[\kappa(d - d_0)]}. \quad (1.2)$$

En la ecuación anterior d indica el número de capas entre aquella en la que se encuentra la célula y la capa superficial; d_0 y κ son parámetros que se utilizan para ajustar el modelo computacional a la línea celular tumoral específica investigada. La ecuación (1.2) produce un gradiente de nutrientes con una forma similar a la citada para la distribución de la tensión de O_2 de diferentes líneas celulares [Mue84, Sut86, War01, Tim04]. También vale la pena señalar que la suposición de una probabilidad de división proporcional a la concentración de nutrientes y la presión de O_2 está respaldada por varios resultados experimentales ([Roo07, Ole92, Vi196, Fre80, Dur82, Kwo85, Kwo87]).

En el experimento que usamos para ajustar el modelo computacional (ver capítulo 3), el medio de cultivo, la concentración de nutrientes y la presión parcial de O_2 se mantuvieron constantes durante todo el período de crecimiento de los MTS. Esto justifica tener un valor constante p_{\max} en nuestras simulaciones. Sin embargo, otras situaciones en las que estas circunstancias experimentales cambien pueden incluirse en el modelo de forma sencilla.

Una célula proliferativa se dividirá si $\xi \leq p_{\text{div}}$, donde ξ es un número aleatorio muestreado de la distribución uniforme $U(0, 1)$. Supongamos que una de estas células proliferativas en división es la situada en $P \equiv (i, j, k)$. Entonces es necesario encontrar la posición donde se ubicará la nueva célula. Para hacer eso, en la subrutina UBICACION, determinamos posiciones desocupadas, $P_s \equiv (i_s, j_s, k_s)$, a lo largo de cada una de las 98 direcciones definidas como $(i + nl_i, j + nl_j, k + nl_k)$, con $n = 1, 2, 3, \dots$ y $l_m = 0, \pm 1, \pm 2$ ($m = i, j, k$), excepto aquellas ya incluidas en otras direcciones con valores l menores, $(l_i, l_j, l_k) = (0, \pm 2, 0), (0, 0, \pm 2), (\pm 2, 0, 0), (0, \pm 2, \pm 2), (\pm 2, 0, \pm 2), (\pm 2, \pm 2, 0), (\pm 2, \pm 2, \pm 2)$, y $(l_i, l_j, l_k) = (0, 0, 0)$.

La razón por la cual esta búsqueda es más precisa que la realizada para determinar la profundidad de una posición dada, que solo considera 26 direcciones, es la necesidad de garantizar un crecimiento bien compacto del MTS. Si se reduce el número de direcciones, aparece un número relativamente grande de posiciones vacías dentro de las capas.

La posición de la nueva célula es la más cercana a P , situada dentro de una de las capas proliferativas del MTS y que muestra el mayor número de vecinos ocupados entre los definidos como $(i_s + n \cdot l_i, j_s + n \cdot l_j, k_s + n \cdot l_k)$ con $n = 1$ y 2 . Si varias de las posiciones P_s que se encuentran en las 98 direcciones de búsqueda verifican estas condiciones, una de ellas se elige al azar. Cabe señalar que, para mantener la forma esférica que muestra el MTS experimental, también se elige aleatoriamente el orden en el que se analiza cada una de las células en división.

El procedimiento descrito anteriormente permite ahorrar tiempo de computación. Desde una perspectiva realista, la nueva célula generada después de una división estaría realmente situada en una de las posiciones vecinas de la que ocupa la célula que se divide, de tal manera que esta nueva célula empujaría al resto de células que están en la dirección que muestra algún vértice desocupado en la red

[Roo07, Duc85]. En lugar de mover todas las células entre la que se divide y la posición desocupada, es más eficiente, desde el punto de vista computacional, situar la nueva célula directamente en el vértice vacío seleccionado como se ha descrito anteriormente.

La simplicidad del modelo permite simular todo el historial de MTS en tiempos de CPU cortos, y evita el soporte computacional requerido por otros modelos matemáticos complejos basados en sistemas de ecuaciones diferenciales. El tiempo de simulación de un esferoide del orden del milímetro en un procesador de 3.4 GHz (Intel Core i5) es aproximadamente 300s.

1.3 Irradiación

En esta sección vamos a describir el proceso de irradiación de los esferoides simulados. Para ello, hemos introducido 4 parámetros adicionales al modelo ya descrito. Estos parámetros están relacionados con la supervivencia de las células del esferoide irradiado, y con la velocidad con la que las células irradiadas abandonan su posición, que puede ser ocupada por células resultado de nuevas divisiones o por otras células proliferativas cercanas.

1.3.1 Irradiación de MTS

La irradiación del esferoide simulado tiene lugar, en la iteración que corresponda, una vez finalizado todo el proceso de crecimiento descrito en la sección anterior, es decir, una vez completadas la duplicación de las células proliferativas, la ubicación de las células originadas en dicha división y la exfoliación de células de la periferia. La actualización o reasignación de estados tendrá lugar una vez que se ha finalizado el procedimiento de irradiación.

En la figura [I.4] podemos ver el diagrama de bloques correspondiente a esta parte del modelo computacional que hemos desarrollado, y que se ha agregado al modelo de la sección [I.1].

En nuestro modelo, el efecto de la irradiación de los esferoides se ha tenido en cuenta mediante un procedimiento aleatorio sencillo que permite cambiar el estado

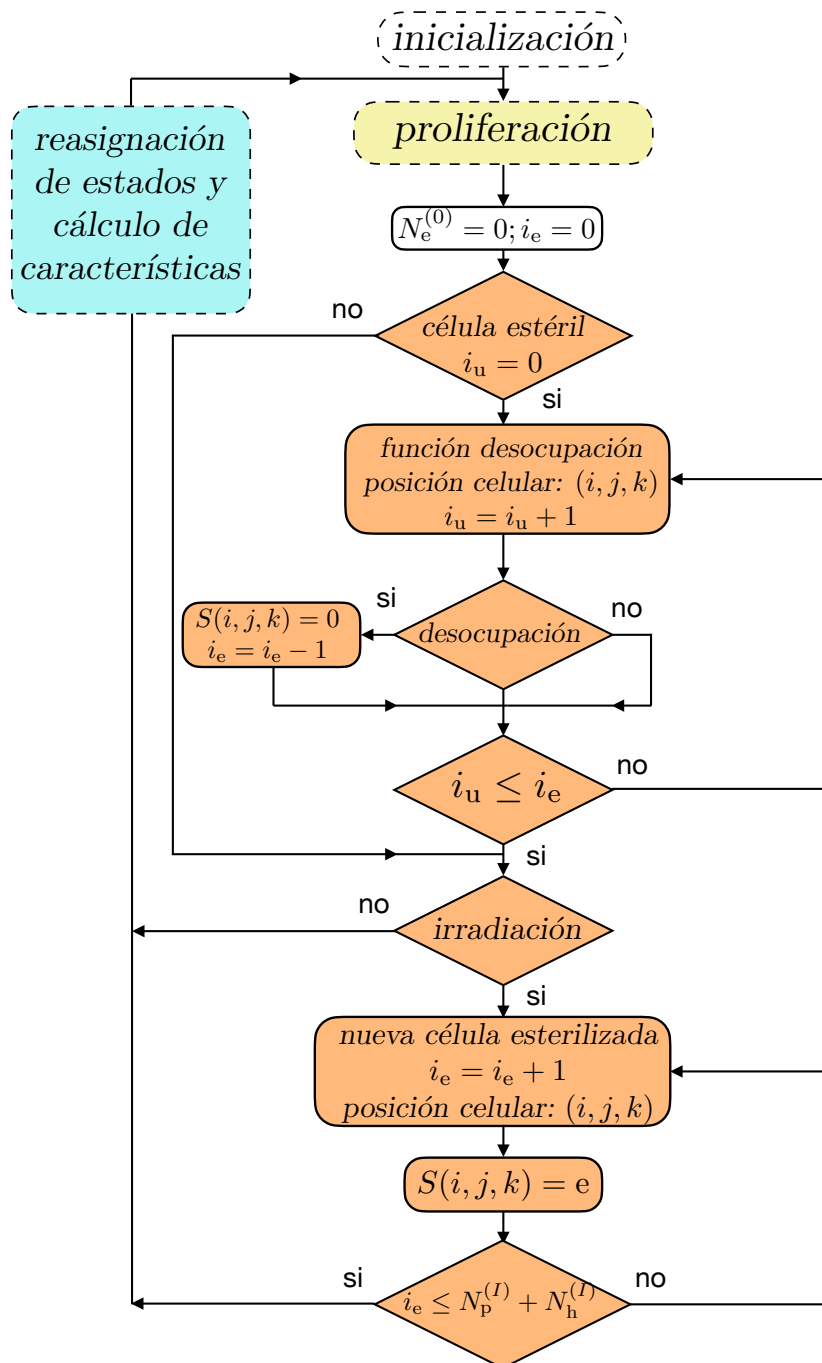


Figura 1.4: Diagrama de bloques correspondiente a la irradiación de nuestro modelo. Los bloques naranjas corresponden a los bloques que hemos añadido para permitir la irradiación de los esferoides simulados.

de las células proliferativas e hipóxicas del esferoide. Para ello se utiliza la función $PSUPERV$, que asigna el estado estéril, $S(i, j, k) = e$, a determinadas células.

Las células estériles son aquellas que han sufrido daños irreparables por irradiación, que no se pueden duplicar, y que terminan muriendo en las sucesivas iteraciones. Este proceso se modula mediante la subrutina $DESOCUPAC$, que describiremos más adelante y que permite que las células irradiadas que eventualmente mueren se “descompongan” y ocupen “espacio intercelular”, dejando su posición libre para ser ocupada por otra célula. Después de la desocupación tiene lugar un proceso de compactación mediante la ocupación por células de las posiciones vacías, que permite que el esferoide no pierda su forma y estructura, y que es modulado por la subrutina $COMPACTACION$ que también describiremos más adelante.

1.3.2 Probabilidad de supervivencia tras irradiación

La probabilidad de supervivencia de cada célula irradiada se determina de acuerdo con su distancia a la superficie, mediante la función de gradiente de nutrientes y O_2 , g , dada por la ecuación (1.2). En nuestro modelo la función de supervivencia s tiene la siguiente expresión matemática

$$s(d; d_0, \kappa, s_{O_2}, s_{N_2}) = s_{N_2} - [g(s_{N_2} - s_{O_2})], \quad (1.3)$$

donde los valores de los parámetros s_{O_2} y s_{N_2} dependen de la dosis de irradiación. Concretamente, s_{O_2} indica la probabilidad de supervivencia de las células que se encuentran en la superficie del esferoide, y s_{N_2} es la probabilidad de supervivencia de las células más alejadas de la superficie del esferoide, es decir, con menor acceso a nutrientes y O_2 (ver figura 1.3).

Una célula proliferativa o hipóxica cambiará su estado a estéril si $\xi \geq s$, siendo ξ un número aleatorio muestreado de la distribución uniforme $U(0, 1)$. Las células esterilizadas mantendrán ese estado hasta que desocupen su posición en un proceso que se describe en la sección siguiente.

1.3.3 Desocupación de posiciones de células estériles

Tal y como se observa en el experimento, las células estériles van dejando libre su posición en los días sucesivos a la irradiación, puesto que el modelo de esfe-

roide desarrollado no tiene sistema inmunológico, y por lo tanto no se dispone de macrófagos. El mayor número de desocupaciones tiene lugar días después de la irradiación, como se puede apreciar en los datos experimentales analizados por Wheldon *et al* [Whe86], siendo este efecto más manifiesto a valores de dosis de irradiación elevados. Para modelar esta disminución del volumen hemos introducido una distribución de probabilidad que gobierna la desocupación y que describiremos a continuación.

En la iteración en la que se produce la irradiación, una subrutina llamada DES-OCUPACION asigna a cada célula estéril un valor $S(i, j, k) \geq 1$. El valor máximo de $S(i, j, k)$ asignado a cada célula estéril, así como el número de células estériles a las que se les asigna un determinado valor, se define mediante una distribución de probabilidad normalizada de tipo gaussiano:

$$d(t; u_1, u_2) = \exp \left\{ \frac{-(t - u_1)^2}{2 \cdot u_2^2} \right\}, \quad (1.4)$$

donde u_1 y u_2 son parámetros que se emplean para sintonizar el modelo, y t es el tiempo en días transcurrido desde el día siguiente a la irradiación ($t = 0$). El proceso de asignación del valor $S(i, j, k) \geq 1$ a cada célula estéril se realiza obteniendo por sorteo un número de la distribución, y asignando a cada célula el valor entero de ese número más una unidad. De tal manera que, al finalizar el proceso de asignación de todas las células estériles, el porcentaje de células estériles con valor $S(i, j, k) = 1$ corresponde a $d(t = 0)$, el porcentaje de células estériles con valor $S(i, j, k) = 5$ corresponde a $d(t = 1)$, y así sucesivamente hasta que t toma el valor t_{\max} . Este valor de t_{\max} es el primer valor para el que $d(t) \leq 0.01$.

En cada iteración posterior a la irradiación, cada uno de estos grupos de células estériles disminuirá el valor de $S(i, j, k)$ en una unidad, de tal manera que solo el grupo de células que alcance el valor $S(i, j, k) = 0$ estará desocupado.

1.3.4 Compactación

Experimentalmente hemos observado que los esferoides irradiados no pierden su forma de agregado celular, por lo que hemos creado una subrutina que garantiza

que las células que componen el esferoide no se separen después de cada irradiación. Esta subrutina, que se denomina `COMPACTACION`, permite colocar células proliferativas de la periferia en los espacios desocupados por las células estériles.

El procedimiento de compactación se inicia recorriendo la matriz de posiciones que han sido desocupadas en la misma iteración, y buscando aleatoriamente una posición ocupada y cercana de la periferia. A continuación, la célula de la periferia deja libre su posición y pasa a ocupar la posición inicialmente desocupada. Es importante aclarar que este desplazamiento de las células de posiciones periféricas a posiciones vacías interiores es equivalente al empuje de células desde el exterior hacia el interior del esferoide.

1.3.5 Fracción de supervivencia

La fracción de supervivencia (SF) describe la relación entre el número de células que mantienen su integridad reproductiva después de ser irradiadas y el total de células presentes en el MTS. La representación de la SF para distintos valores de dosis es lo que se conoce como curva de supervivencia. La radiosensibilidad de las células tumorales humanas en cultivo [Fer81, Dea84, Buf01], expresada en términos de la SF, y la respuesta a la radiación de los MTS [Wei84], se han correlacionado con la radiocurabilidad clínica del tumor.

En este trabajo hemos calculado la SF mediante dos métodos. En el primero se determina directamente la fracción de células que sobreviven a la irradiación. En el otro se utilizan los ajustes a las curvas de crecimiento de una función Gompertz [Gui03] en la que se considera una normalización a un volumen inicial común, que permite comparaciones significativas entre los resultados obtenidos para cada esferoide, y que incluye un término adicional para tener en cuenta las células esterilizadas tras la irradiación.

El valor de la SF de los esferoides simulados irradiados, calculado como la fracción de células que sobreviven, se obtiene mediante la expresión matemática:

$$s = \frac{N_p^d + N_h^d}{N_p^a + N_h^a}, \quad (1.5)$$

donde N_p^a y N_h^a son los valores del número de células proliferativas e hipóxicas en el instante antes de la irradiación, y N_p^d y N_h^d en el instante después de la irradiación.

Las células esterilizadas no están en el balance de células puesto que son células que sabemos van a desaparecer tras la irradiación.

El procedimiento para obtener la fracción de supervivencia a partir del análisis del crecimiento del esferoide mediante el modelo de Gompertz es el descrito en las referencias [Gui03, Gui12]. En esta metodología, cada MTS se considera individualmente, de tal manera que la curva de crecimiento de cada esferoide se puede normalizar a un volumen inicial dado, lo que permite realizar comparaciones válidas, y además tiene en cuenta la coexistencia de dos poblaciones celulares diferentes después de la irradiación: células esterilizadas y supervivientes. Las células esterilizadas no proliferan, ya que incluye tanto a las células muerta como a las que han perdido su capacidad para dividirse [Odo97]. Por lo tanto, el volumen total del sistema puede expresarse como la suma de los volúmenes de cada uno de estos subsistemas y, consecuentemente, la forma en que el volumen total varía en el tiempo dependerá de la forma en que lo hagan los volúmenes de cada uno de los subsistemas.

$$V(t) = V^{\text{sup}}(t) + V^{\text{est}}(t), \quad (1.6)$$

donde V^{sup} es el volumen de las células supervivientes y V^{est} el de las células esterilizadas.

Suponiendo la hipótesis de que la población superviviente crece según el modelo gompertziano:

$$V^{\text{sup}}(t) = V_0^{\text{sup}} \exp[A(1 - \exp(-at))], \quad (1.7)$$

donde $V_0^{\text{sup}} \equiv V^{\text{sup}}(t = 0)$ es el volumen de células supervivientes justo después de la irradiación.

Para establecer la evolución de la población esterilizada, que no crecerá porque, o bien se estanca y ocupa un volumen constante mientras el sistema exista, o bien disminuye con un ritmo más o menos rápido, adoptamos una forma funcional empírica que permite describir de manera sencilla ritmos de pérdida de elementos muy distintos para esta subpoblación. La expresión propuesta para el volumen de los esferoides irradiados es:

$$V(t) = \frac{M}{1 + \exp[k(t - T)]} + V_0^{\text{sup}} \exp \{A[1 - \exp(-at)]\}, \quad (1.8)$$

como antes, V_0^{sup} es el volumen de la población superviviente que produce el crecimiento del sistema, A y a son los parámetros del modelo de Gompertz para el crecimiento de dicha población y M , k y T son constantes que indican la evolución de la población esterilizada.

Si llamamos V_0 al volumen en el momento de la irradiación, ha de cumplirse que $V(t = 0) = V_0$, esto es:

$$V(t) = (V_0 - V_0^{\text{sup}}) \frac{1 + \exp(-kT)}{1 + \exp[k(t - T)]} + V_0^{\text{sup}} \exp \{A[1 - \exp(-at)]\}. \quad (1.9)$$

El modelo expresado mediante la ecuación (1.9) da cuenta de varias situaciones distintas, ya que los ritmos de pérdida celular para la población esterilizada pueden ser muy diferentes, con lo que el resultado para la evolución de la población completa cambia de unas situaciones a otras. De tal manera que es posible considerar tanto la situación en la que población en su conjunto crece en todo momento, aunque lentamente al principio, como aquella situación en la que la población decrece desde el momento de la irradiación para recuperar después un crecimiento neto positivo.

Si suponemos que el volumen de la población esterilizada no cambia con el tiempo, lo cual se ha observado para esferoides de la línea MCF-7 y dosis menores de 3.25Gy; esto es, $T \rightarrow \infty$, es decir que la pérdida de elementos celulares observada tras la irradiación es muy pequeña, el modelo simplificado que emplearemos en nuestro análisis se escribe como sigue:

$$V(t) = (V_0 - V_0^{\text{sup}}) + V_0^{\text{sup}} \exp \{(A - \ln(V_0^{\text{sup}}/V_{\text{IC}}))[1 - \exp(-at)]\}, \quad (1.10)$$

donde se ha incluido también la normalización al volumen inicial común.

Para esferoides de pequeño tamaño (diámetro inferior a unos 300 μm), las células clonogénicas se distribuyen homogéneamente en todo su volumen, y no se aprecian signos de hipoxia ni gradiente de unidades proliferantes con la profundidad (profundizaremos en este asunto en el capítulo 3). En estas condiciones, el tamaño de los esferoides en el momento de la irradiación permite suponer que sus volúmenes son proporcionales al número de células clonogénicas que contienen y, por tanto, el volumen de la población proliferante no es más que un reflejo del número de clonógenos supervivientes tras la irradiación. Esto es, el esferoide recrece de

1.4. REASIGNACIÓN DE ESTADOS

manera que los responsables del aumento de volumen son los clonógenos supervivientes [Whe85]. Estas condiciones no se dan cuando aparece el núcleo necrótico, de tal manera que el número de células proliferantes no es proporcional al volumen.

Tras lo discutido, la fracción de supervivencia puede escribirse así:

$$s = \frac{V_0^{\text{sup}}}{V_0}. \quad (1.11)$$

A partir de los datos de supervivencia medidos y simulados puede obtenerse la curva de supervivencia del modelo lineal cuadrático (*linear-quadratic*, LQ) que viene dado por:

$$s = \exp(-\alpha d - \beta d^2) \quad (1.12)$$

Los parámetros α y β son característicos de la línea celular considerada. Este modelo LQ ha sido ampliamente utilizado [Cha81, Haw00] y, a pesar de su simplicidad, proporciona una descripción satisfactoria de la curva de supervivencia de una población celular homogénea.

1.4 Reasignación de estados

En nuestra simulación, cada iteración corresponde a un ciclo celular completo y para permitir la comparación con el experimento asumimos que equivale a 24 horas. Una vez que se completa cada iteración, el estado de todas las células en el agregado se actualiza de acuerdo con la distancia desde la posición que ocupan hasta los nutrientes y O_2 . Esto se hace usando la subrutina PROFUNDIDAD (ver sección 1.1.1).

Vale la pena señalar que las células pueden cambiar su estado simplemente como resultado de la dinámica del MTS. Aquellas que yacen en una región hipóxica pueden pasar a un estado proliferativo en caso de que su distancia a los nutrientes y O_2 cambie, debido, por ejemplo, a cualquier intervención terapéutica o la aparición de un nuevo vaso sanguíneo (angiogénesis); también pueden permanecer como células inactivas o alcanzar un estado de muerte. Las posiciones situadas en el núcleo necrótico suelen permanecer como tales a menos que ocurran circunstancias similares a las descritas para las células hipóxicas.

En el caso en el que se irradie al esferoide, como se dijo anteriormente, las células estériles cambian su estado a $S(i, j, k) = e$. En el caso en el que en la

nueva configuración una célula estéril pase al núcleo necrótico, su estado cambia a $S(i, j, k) = n$.

1.5 Cálculo de características

Todas las cantidades que caracterizan el crecimiento de los MTS simuladas se obtienen al final de cada iteración. Específicamente, se determina el grosor de cada una de las regiones, el número de células que hay en ellas y el volumen del esferoide.

Para calcular el espesor de cada región en el MTS, se determina la posición de la red que muestra la mayor profundidad en el seno del esferoide, es decir, la que está a la mayor distancia de la superficie del MTS. Luego, a partir de esa posición, se cuenta el número de células de cada uno de los tres estados considerados a lo largo de las tres direcciones ortogonales (en ambos sentidos) y se calculan los promedios correspondientes, \bar{n}_n , \bar{n}_h y \bar{n}_p . Los espesores de las regiones necrótica, T_n , hipóxica, T_h y proliferativa, T_p , se calculan como:

$$T_k = T \bar{n}_k, \quad k \equiv p, h, n. \quad (1.13)$$

Aquí T es un factor de escala que tiene en cuenta el tamaño de la célula. Es otro de los parámetros de entrada del modelo.

El volumen del MTS simulado viene dado por:

$$V = \frac{4\pi}{3} \left(\frac{T_p}{f_p^{1/3}} + \frac{T_h}{f_h^{1/3}} + \frac{T_n}{f_n^{1/3}} \right)^3, \quad (1.14)$$

donde f_p , f_h y f_n son factores de empaquetamiento característicos de los tipos de célula, que tienen en cuenta el espacio intercelular y la compresión celular en cada región del MTS [Fre80, Dur80, Bel01, Kha06]. Es importante señalar que la red 3D cúbica no cambia durante la simulación y que estos factores de empaquetamiento solo se utilizan para el cálculo del volumen del MTS simulado.

La modificación que hemos introducido para considerar la irradiación de los esferoides simulados es que en el recuento de los estados correspondientes a cada región (región de células proliferativas, región de células en hipoxia y núcleo necrótico), agregamos un estado más, el estado de células estériles, de tal manera

1.6. RESUMEN DE PARÁMETROS DEL MODELO

que las posiciones de las células en estado estéril contribuyan a cada una de las capas en las que se encuentran, de la misma forma que lo haría cualquier célula de la región correspondiente.

1.6 Resumen de parámetros del modelo

Un resumen de los parámetros que el modelo requiere, y cuya descripción y origen hemos abordado en las secciones anteriores, se pueden ver en la tabla [1.1](#). El número total de parámetros es de 14, incluyendo los necesarios para la irradiación de los MTS, y los valores de la mayoría de ellos se han establecido a partir de la información experimental disponible con respecto a la división celular, las probabilidades de exfoliación, el tamaño y estructura de las diferentes regiones del MTS, y a la fracción de supervivencia.

Proliferación		Irradiación	
prob. división	p_{max}, k, d_0		
número de capas por región	L_p, L_h	prob. supervivencia	s_{O_2}, s_{N_2}
prob. exfoliación	p_{exfol}		
factor de escala	T	desocupación	u_1, u_2
factor de empaquetamiento	f_p, f_h, f_n		

Tabla 1.1: Parámetros utilizados en la simulación de MTS. Los parámetros de la izquierda corresponden a la evolución normal de los MTS, y los parámetros de la derecha son los necesarios para considerar la irradiación de estos MTS.

1.7 Capacidades del modelo

Cabe señalar que este modelo trata con variables celulares reales, como el diámetro celular, la probabilidad de división celular, el número de capas con células hipóxicas y proliferativas, la probabilidad de exfoliación o la probabilidad de supervivencia, y muestra suficiente flexibilidad para permitir la consideración de elementos adicionales, como la heterogeneidad celular en el MTS o la presencia de vasos sanguíneos.

Además, tiene una estructura modular que permite aumentar su complejidad si se consideran condiciones más generales. Por ejemplo, la siembra de células dispersas donde se forman varios agregados celulares en lugar de un solo esferoide se puede simular de una manera sencilla, como se verá en el capítulo 5. Asimismo, los cambios en la dinámica de crecimiento que se producen cuando aparecen vasos sanguíneos dentro de la estructura tumoral, o se producen deformaciones del MTS debido a límites anatómicos, pueden incorporarse fácilmente al modelo mediante las reglas de evolución antes mencionadas.

También permite nuestro modelo la consideración de otros estados celulares diferentes, junto con las nuevas reglas que impulsan su evolución. También es posible tener en cuenta nuevas posibilidades asociadas, por ejemplo, a la existencia de estroma, el medio de cultivo o diversos grados de hipoxia sin necesidad de recurrir a modelos experimentales más complejos [Oli19]. Además, los posibles estados de las células se pueden ampliar para tener en cuenta las células en cada una de las diversas fases del ciclo celular. En otros modelos computacionales no se han tenido en cuenta estas variables de influencia en la cinética de proliferación claramente probada experimentalmente.

Como ya hemos comentado, la simplicidad del modelo permite simular todo el historial del MTS en tiempos de CPU cortos, y evita el soporte computacional requerido por otros modelos matemáticos complejos basados en sistemas de ecuaciones diferenciales.

Por tanto, a pesar de las dificultades inherentes a los modelos discretos en lo que se refiere a la reproducción del crecimiento celular real y sus bases biológicas y físicas, así como procesos de difusión, optamos por un ABM porque nos permite estudiar MTS con tamaños del orden de unos milímetros o mayores y, además, incluir procesos de difusión de nutrientes y O_2 de forma sencilla, sin necesidad de un enfoque híbrido. Nuestro ABM en red utiliza una base matemática simple y permite reproducir la cinética de crecimiento de los MTS.

Modelo experimental y sintonización

En este capítulo, en primer lugar, hacemos una descripción del trabajo de laboratorio que ha sido necesario para la generación y cultivo de los MTS de cuyo seguimiento se han obtenido los datos experimentales que nos han permitido sintonizar el modelo computacional. Discutimos también las características de la irradiación de los MTS. En segundo lugar, describimos el proceso de sintonización del modelo computacional a los datos experimentales y mostramos los resultados alcanzados. Parte de estos resultados están publicados [Rui20].

2.1 Modelo experimental

En esta sección vamos a distinguir dos grupos de experimentos, los de generación y seguimiento de evolución de los MTS y los relacionados con su irradiación.

2.1.1 Formación y seguimiento de los esferoides

El modelo computacional descrito anteriormente se ha desarrollado para simular el crecimiento de MTS. Nosotros hemos aplicado el modelo a una línea celu-

lar concreta de MTS, ya que es esencial tener datos experimentales disponibles que permitan respaldar los resultados de la simulación [Rej11]. En nuestro caso, se realizaron experimentos de crecimiento de MTS de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama humano [Sou73, Rag16], siguiendo el procedimiento desarrollado en [Ole92, Ara03, Gui12b], que permite generar esferoides de tamaño uniforme.

Las células de la línea MCF-7, que se hacen crecer en un cultivo monocapa, se disgregan hasta obtener una suspensión unicelular; posteriormente, soluciones de alrededor de 1000 células cada una se siembran en *Dulbecco modified of Eagle médium* (DMEM) con un 10 % adicional de suero fetal bovino, garantizando así el aporte óptimo de nutrientes. La siembra se realizó en pocillos individuales de cajas de cultivo previamente preparadas con una base de agar DMEM al 1 % para evitar la adherencia del agregado celular a las superficies. Para favorecer la agregación celular, se mantuvo una leve agitación durante las primeras horas de cultivo a 37°C, en un medio con 5 % de CO₂ y con pH = 7. De esta forma se formaron esferoides de tamaños similares. A la 48 horas los esferoides alcanzan un diámetro de 90 – 100 μm . El medio se cambió cada 72 horas para mantener una concentración de nutrientes y una presión de O₂ casi constante entorno a los MTS durante todo el experimento [Ole92].

Durante el seguimiento se midieron dos diámetros ortogonales de cada MTS cada 2 o 3 días, utilizando una escala micrométrica acoplada al ocular de un microscopio invertido de contraste de fase [Vi196]. Esto permitió determinar la evolución de sus respectivos volúmenes asumiendo que su forma era aproximadamente esférica y su radio era el valor promedio, \bar{R} , obtenido de los dos diámetros ortogonales medidos directamente en cada MTS. La incertidumbre asociada a este volumen se debió a la escala micrométrica, cuya precisión es de 10 μm . Según la norma ISO / TAG 4 / WG [ISO08] esta incertidumbre viene dada por:

$$\sigma(V) = \pi 20 \mu\text{m} \sqrt{\frac{2}{3}} \bar{R}^2. \quad (2.1)$$

Se descartaron todos los MTS con una forma clara no esferoidal. Tampoco consideramos aquellos MTS formados después de la fusión de dos o más esferoides individuales originados en la siembra inicial o que tuviesen fibras de agar o cualquier otro elemento extraño en su interior. Finalmente se pudieron considerar 22 esferoides de control.

2.1.2 Irradiación de cultivos

Se utilizaron 12 cajas de cultivo (576 MTS) para el experimento de irradiación. Una de las cajas se utilizó como control, manteniéndose sin irradiar, y las 11 restantes se irradiaron con fracciones de dosis que oscilaron entre 0.08 Gy y 3.23 Gy. Una vez irradiadas, las muestras se siguieron durante 16 días. El número de MTSs supervivientes tras este tiempo (y las dosis absorbidas) fueron 13 (0.08 Gy), 5 (0.15 Gy), 20 (0.23 Gy), 14 (0.31 Gy), 13 (0.48 Gy), 18 (0.65 Gy), 15 (0.77 Gy), 9 (1.15 Gy), 21 (1.54 Gy), 20 (2.42 Gy) y 14 (3.23 Gy), lo que supuso un número total de 162 esferoides finalmente analizados. Estas dosis absorbidas se determinaron mediante dosímetros TLD.

En el momento de la irradiación, los MTS presentaban diámetros inferiores a $300 \mu\text{m}$. Esto nos permitió asegurarnos de que su composición era homogénea, que no existían núcleos necróticos en su interior y que el acceso a oxígeno y nutrientes era similar para todas las células que formaban el agregado [Gui12]. En estas condiciones se puede esperar que todas las células presenten una respuesta más homogénea a la irradiación, y también que pueda asumirse la proporcionalidad entre el volumen del esferoide y el número de células que incluye.

2.1.3 Evolución de esferoides

Se muestra en la figura 2.1 el comportamiento general, en función del tiempo transcurrido desde la siembra inicial, de los 22 MTS utilizados para sintonizar la parte de proliferación del modelo computacional. Los datos correspondientes a MTS cuyos volúmenes corresponden a valores máximo y mínimo, bien al inicio o bien al final del período de seguimiento, se muestran con símbolos. Cuando se realizó la primera medición, dos días después de la siembra, el volumen de los esferoides osciló entre 3.1 y $4.2 \cdot 10^7 \mu\text{m}^3$; después de los 16 días de seguimiento, los MTS alcanzaron volúmenes entre 3.7 y $5.1 \cdot 10^8 \mu\text{m}^3$.

En la figura 2.1 también podemos observar la variabilidad de las curvas de crecimiento experimental de los MTS (área gris) que corresponde a los 22 MTS de control considerados en este trabajo. Se han representado los valores experimentales de cuatro de los MTS para resaltar el hecho de que, a pesar de que el procedimiento de siembra y las condiciones de cultivo fueron iguales para todos los MTS

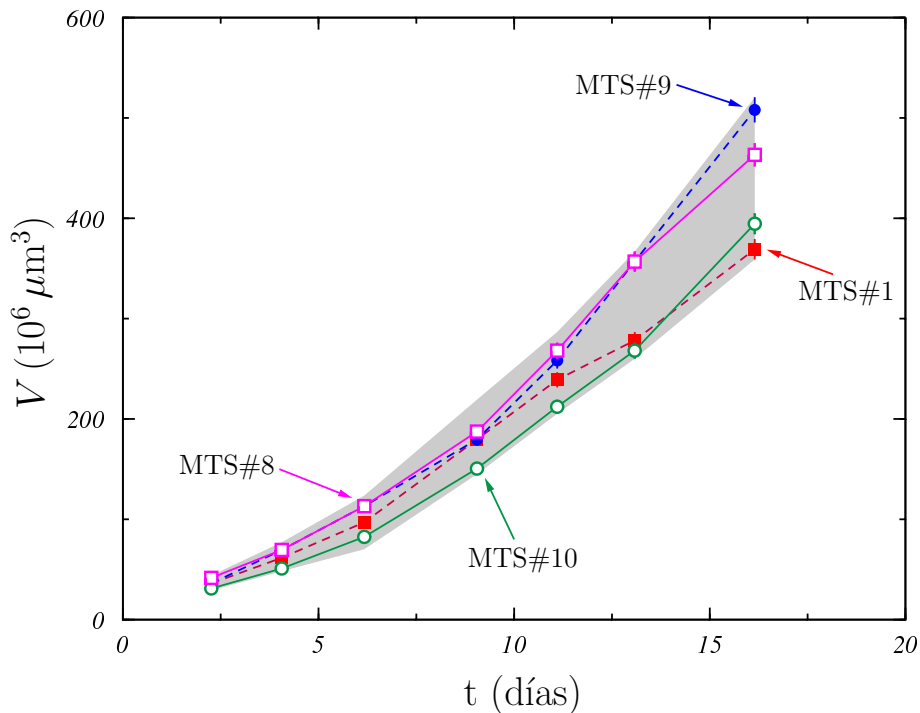


Figura 2.1: Variación del volumen de los MTS de control considerados en el presente trabajo en función del tiempo transcurrido desde la siembra inicial. Los símbolos corresponden a los MTS indicados, y cuyos volúmenes son máximos y mínimos al principio y el final del período de medición considerado. Las incertidumbres experimentales corresponden a un factor de cobertura $k = 1$ y se incluyen en el área gris.

de la muestra, estos evolucionan en su crecimiento de tal manera que se aprecian cruces de las líneas que unen los datos experimentales.

Los esferoides experimentales irradiados siguieron el protocolo descrito en la sección 2.1 durante toda su evolución, antes y después de la irradiación. El número de esferoides irradiados fue de 528 MTS de los cuales pudieron analizarse 162. En la figura 2.2 la zona gris oscuro muestra el comportamiento general de estos MTS tras ser irradiados, en función del tiempo transcurrido desde la siembra inicial. Los datos de los MTS cuyos volúmenes corresponden a los valores máximo y mínimo en el inicio y en el final del período de seguimiento se muestran y están etiquetados con su correspondiente número.

En la figura 2.2 también podemos observar, como en los esferoides experimen-

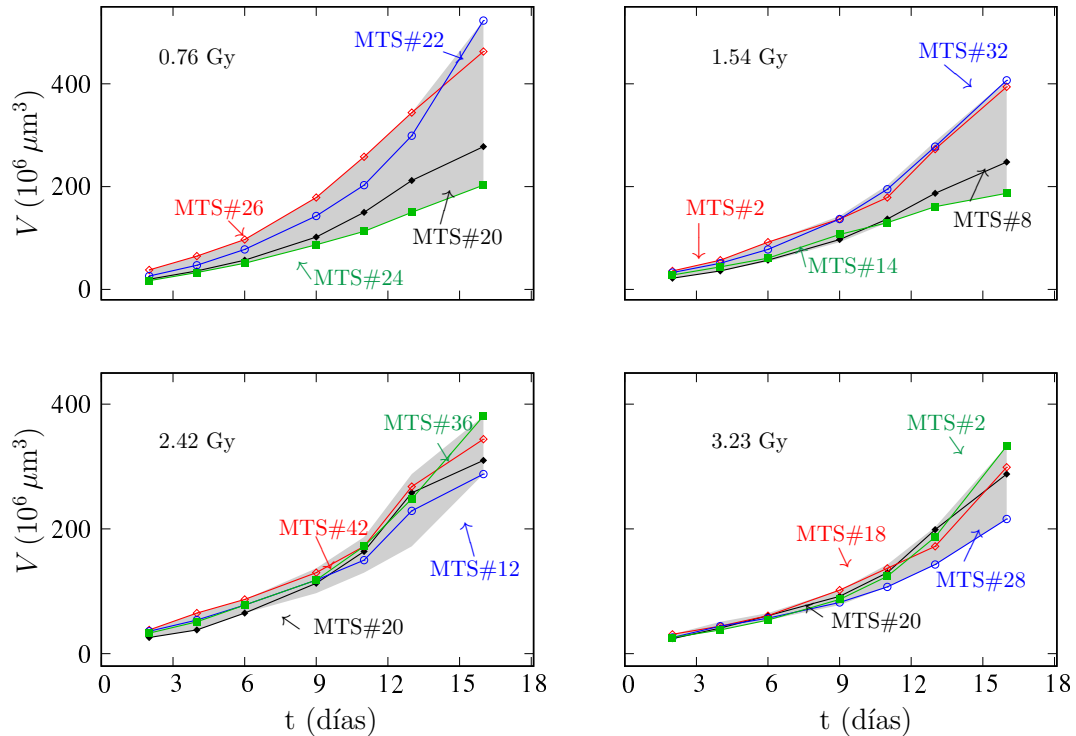


Figura 2.2: Variación del volumen de los MTS experimentales irradiados que pudieron ser analizados en el presente trabajo, en función del tiempo transcurrido desde la siembra inicial. Los símbolos corresponden a los MTS que se indican (cuya numeración es diferente para cada grupo de esferoides irradiados con distintos valores de dosis), y sus volúmenes son los valores máximos y mínimos del inicio y el final del período de medición considerado. La fracción de dosis de irradiación se indica en cada figura y la irradiación tiene lugar el día 0. Las incertidumbres experimentales corresponden a un factor de cobertura $k = 1$.

tales no irradiados, la variabilidad de las curvas de crecimiento experimental de los MTS, área gris, que corresponde a los MTS experimentales irradiados considerados en este trabajo.

2.2 Sintonización

Fundamentalmente, la sintonización ha consistido en la variación de aquellos parámetros del modelo que no han sido tomados de datos experimentales. Se han considerado dos aspectos fundamentalmente a la hora de considerar una buena sintonización.

nización del modelo computacional. Por un lado, hemos buscado el mejor acuerdo entre la banda de datos experimentales formada por los valores de volumen extremos, de cada día de seguimiento, desde el inicio de la siembra hasta el último día, y la banda de datos correspondiente a los MTS simulados. También se ha evaluado la variabilidad obtenida en las curvas de crecimiento de los MTS simulados, y se ha comparado con la variabilidad observada en la muestra experimental. Hemos considerado el mismo criterio tanto para los esferoides de control como para los irradiados.

2.2.1 Parámetros

Los parámetros del modelo computacional que utilizamos para realizar estas simulaciones son los indicados en la tabla [2.1](#). Se trata de 14 parámetros de los cuales 7 se han tomado a partir de valores experimentales y no se han variado en el proceso de sintonización del modelo. Los otros 7 sí han permitido la sintonización del modelo computacional y, concretamente, 5 de ellos han tomado valores razonables desde el punto de vista experimental. Podríamos decir que los valores de 12 de estos parámetros se han establecido a partir de la información experimental disponible con respecto a la división celular, las probabilidades de exfoliación, el tamaño y estructura de las diferentes regiones del MTS y la supervivencia celular. Es preciso añadir que no se han considerado otras variables de posible influencia como la distribución en el ciclo celular, pues en el grupo control, y para ese tamaño, la distribución es similar. Los valores de los parámetros correspondientes a la probabilidad de supervivencia son dependientes de la dosis de irradiación, por eso no tiene definido un valor como el resto de parámetros.

El valor de p_{\max} es el mismo que el de las células con mejor acceso a nutrientes y O_2 en los MTS experimentales que, por otro lado, es del mismo orden que el valor obtenido en cultivos monocapa. Para la línea celular MCF-7, en condiciones de cultivo estándar y para una densidad celular intermedia, la probabilidad de división es $p_{\text{div}} = 0.37$ [\[Ole92\]](#).

Los parámetros N_p y N_h , así como el factor de escala, T , se eligieron de acuerdo con la información experimental proporcionada en [\[Ara03\]](#).

2.2. SINTONIZACIÓN

crecimiento tumoral	probabilidad de división	$p_{\max} = 0.37$	*
		$\kappa = 0, 8$	
		$d_0 = 6.0$	
	número máximo de capas	$L_p = 6$	*
		$L_h = 3$	*
	probabilidad de exfoliación	$p_{\text{exfol}} = 0.01$	*
irradiación	factor de escala	$T = 15.0 \mu\text{m}$	*
	factor de empaquetamiento	$f_p = 0.9$	**
		$f_h = 1.0$	**
		$f_n = 1.1$	**
	subrutina DESOCUPACION	$u_1 = 2.0$	
		$u_2 = 2.0$	
probabilidad de supervivencia		$s_{O_2}(d)$	**
	$s_{N_2}(d)$	**	

Tabla 2.1: Valores de los parámetros utilizados en la simulación de MTS de la línea celular MCF-7. Los marcados con un asterisco (*) se han tomado de otros experimentos (ver texto) y los marcados con doble asterisco (**) se han tomado de datos experimentales como se describe en texto. Los valores de los parámetros correspondientes a la probabilidad de supervivencia son dependientes de la fracción de dosis que se quiera considerar.

El pequeño valor usado para la probabilidad p_{exfol} en nuestras simulaciones coincide con el encontrado experimentalmente en [Vi196], ya que no se observaron señales relevantes de exfoliación en los MTS seguidos.

Los parámetros restantes, κ y d_0 , que definen la función de gradiente de nutrientes dentro del MTS (ver ecuación (1.2)), y los factores de empaquetamiento, f_p , f_h y f_n , se ajustaron con el fin de hacer que el modelo computacional reprodujera los resultados experimentales obtenidos para la línea celular tumoral específica investigada. No obstante estos últimos fueron sujetos a evidencias experimentales. De hecho, f_p y f_h deben ser similares y no grandes, porque las regiones de células proliferativas y quiescentes no están particularmente compactadas, como se observó para los esferoides del glioma humano U-118 MG, células tiroideas HTh7 y os-

teosarcoma OS-393 [Car84]. Por otro lado, f_n debe ser mayor que f_p y f_h porque el núcleo necrótico parece ser más compacto en esferoides de la línea celular que estamos considerando aquí [Gon15].

El valor de los parámetros u_1 y u_2 es el que nos ha permitido que la subrutina DESOCUPACION dé lugar a una disminución del volumen días posteriores a la irradiación y a fracciones de dosis superiores a 2 Gy, que coincide razonablemente bien con los obtenidos en diferentes experimentos llevados a cabo con otras líneas celulares [Rof89, Pal84, Joi93, Lie19].

Los valores de los parámetros s_{O_2} y s_{N_2} son específicos para cada fracción de dosis y se verán en la sección 2.2.3.

2.2.2 Esferoides de control

Para la sintonización del modelo en el caso de los esferoides no irradiados, fuimos variando cada uno de los parámetros κ , d_0 , f_p , f_h y f_n manteniendo el resto con valores constantes. Esto permitió estudiar el efecto de cada uno de estos parámetros sobre la evolución de los MTS simulados. Finalmente, los valores que daban lugar al mejor acuerdo entre las bandas experimental y simulada, y que además mostraba una variabilidad adecuada para el crecimiento de los esferoides, fueron los que aparecen en la tabla 1.1. En la figura 2.3 podemos ver una imagen 3D en la que se distinguen las diferentes regiones de un MTS simulado tras una evolución de 30 días.

En la figura 2.4 se muestra el crecimiento de 1000 MTS simulados (área salmón), y los experimentales (área gris de la figura insertada), con los valores de los parámetros citados en la tabla 2.1. Los símbolos corresponden a los esferoides con los volúmenes máximo y mínimo al final del período de simulación. Es importante señalar que el MTS simulado alcanza dimensiones del orden de 1 mm en tiempos de CPU entorno a 300s.

La variabilidad asociada al crecimiento de los MTS es la variación observada en la evolución de los propios esferoides. En el inserto de la figura 2.4, el área de variabilidad experimental (gris) se compara con la simulada (salmón). Para ello, la primera de estas áreas se desplazó en el tiempo hasta que coincidieron el volumen

promedio del MTS experimental en el último día de medición y el volumen promedio del MTS simulado en un instante dado de su crecimiento. Como podemos ver, la variabilidad estadística de la simulación parece ser suficiente para explicar la variabilidad total observada en la muestra experimental. En principio, no se requeriría ninguna variación adicional en los parámetros de simulación.

Antes de continuar, vamos a describir el procedimiento que seguimos para estimar las incertidumbres de los volúmenes simulados. Comenzamos seleccionando una configuración de celdas inicial que corresponde a una iteración de crecimiento de un esferoide elegido al azar, y llevamos a cabo una sola iteración a partir de esta configuración. Esto se repite 150 veces y se calcula el promedio y la desviación estándar correspondiente de los volúmenes resultantes, de tal manera que tenemos la variabilidad de la evolución del esferoide para una sola iteración de nuestro modelo. Repetimos este proceso para diferentes configuraciones iniciales, de tal manera que pudimos barrer todo el rango de volúmenes observado en nuestras simulaciones. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2.5. Allí, la curva sólida representa el ajuste a los datos de la función indicada en el recuadro de la figura. En lo que sigue usamos esta función ajustada para estimar las incertidumbres de los volúmenes simulados.

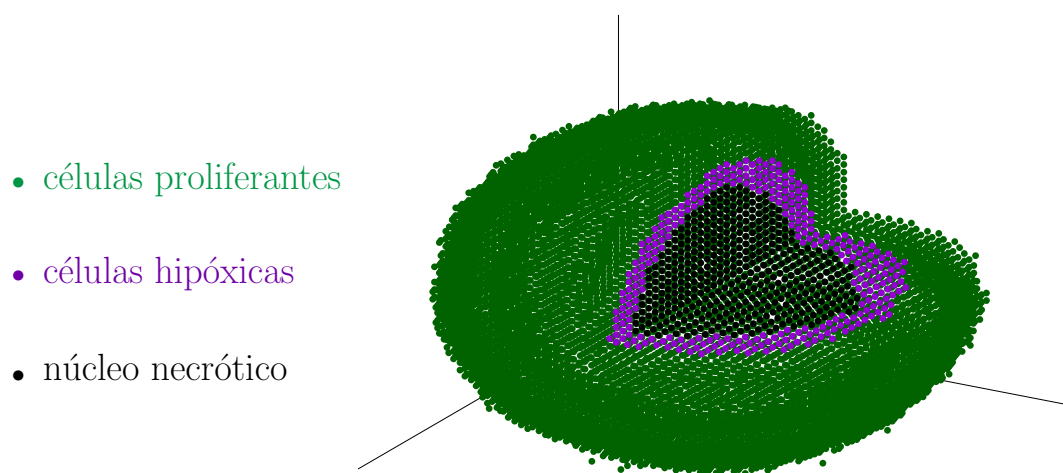


Figura 2.3: Imagen 3D en la que se distinguen las diferentes regiones de un MTS simulado tras una evolución de 30 días.

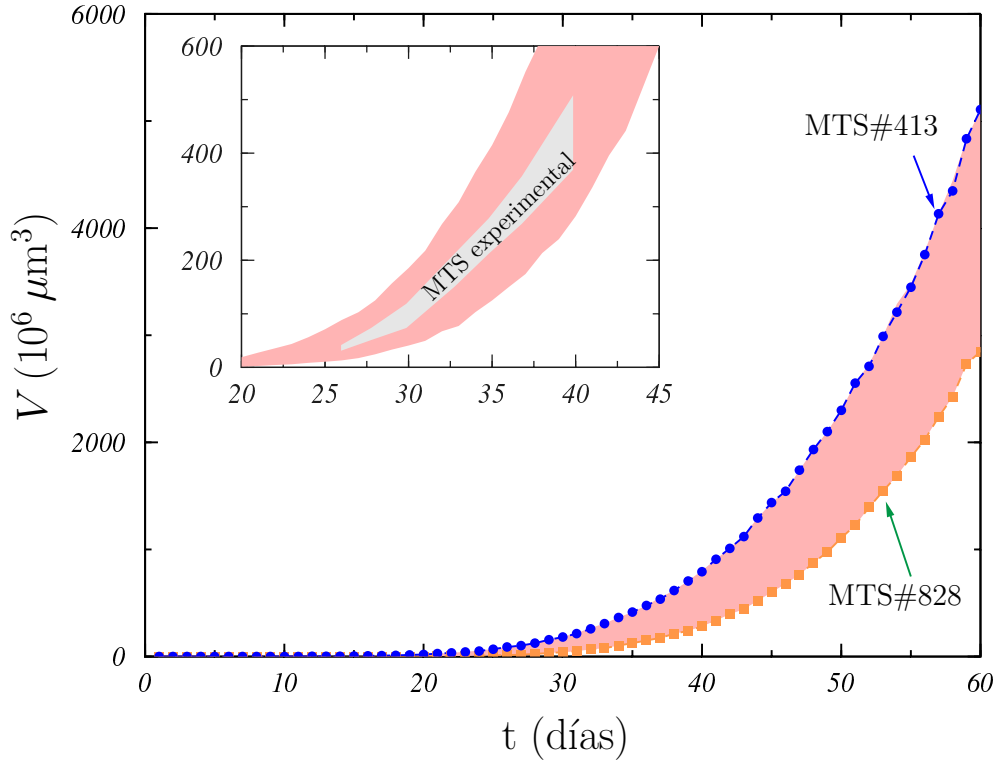


Figura 2.4: Variación del volumen de los MTS simulados en el presente trabajo en función del tiempo. Los símbolos corresponden al MTS con los volúmenes máximo y mínimo al final del período de simulación. En el recuadro, los resultados experimentales se comparan con los simulados.

2.2.3 Esferoides irradiados

Como en la sección anterior, la mejor sintonía es la que da una concordancia razonable entre los datos de crecimiento de los esferoides experimentales, irradiados para las diferentes fracciones de dosis, y los datos de crecimiento de los esferoides simulados.

De los dos grupos de parámetros del modelo relacionados con la irradiación de los esferoides simulados, los parámetros de la función de supervivencia, s_{O_2} y s_{N_2} , tomaron valores dentro de los márgenes experimentales en el proceso de sintonización del modelo, como se puede consultar en otros trabajos que presentaremos más adelante; mientras que los valores de los parámetros de la subrutina DESOCUPACION, que son los correspondientes a u_1 y u_2 , se fueron variando en el proceso

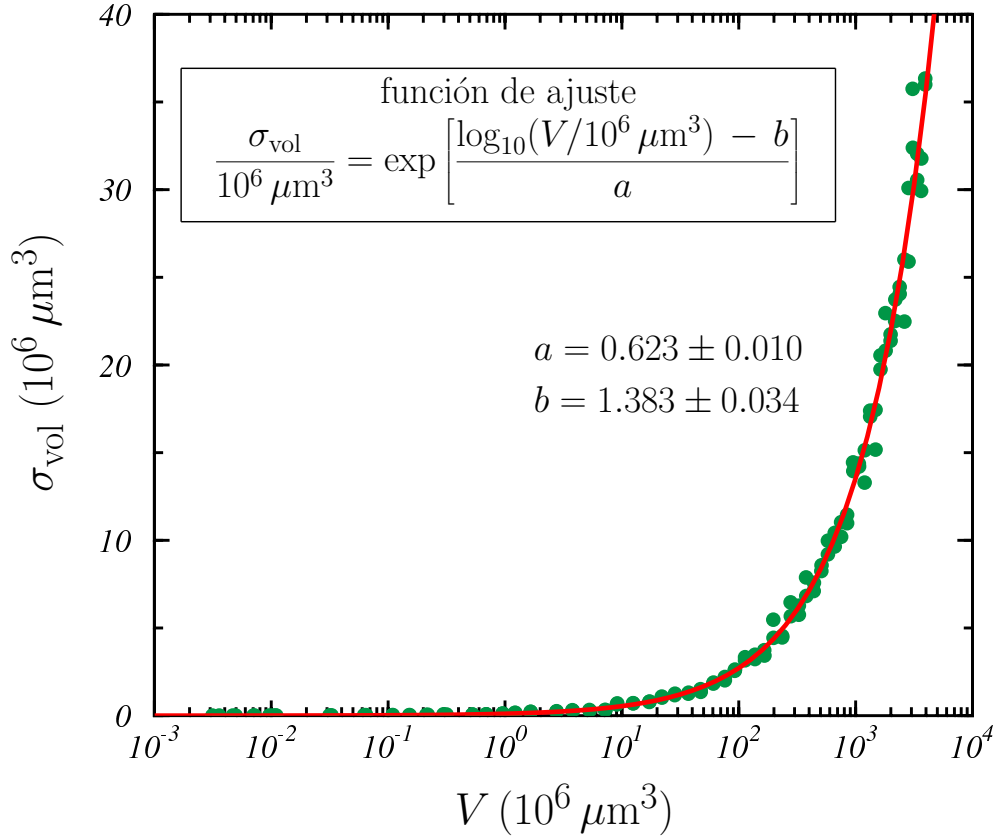


Figura 2.5: Desviación estándar de los volúmenes de los MTS simulados utilizados para estimar las incertidumbres correspondientes. La función de ajuste se da en el recuadro. El ajuste resultante se muestra con una curva sólida y también se dan los valores de los parámetros de ajuste. Sus incertidumbres corresponden a un factor de cobertura $k = 1$.

de sintonización sin que estos tuviesen base experimental. Es decir, sólo se variaron libremente los parámetros u_1 y u_2 , los parámetros s_{O_2} y s_{N_2} se variaron en los rangos experimentales consultados, y el resto de parámetros, p_{max} , κ , d_0 , L_p , L_h , p_{exfol} , T , f_p , f_h y f_n , se mantuvieron constantes [2.1](#).

La figura [2.6](#) muestra el crecimiento de un esferoide simulado que fue irradiado en la iteración 22. La imagen 2D del esferoide simulado se puede ver en varias etapas de su crecimiento, incluidos los días posteriores a la irradiación (figura insertada). Se distinguen células en ciclo proliferativo (puntos verdes), células hipóxicas (puntos morados), núcleo necrótico (región negra) y células estériles (puntos na-

ranjas). La estructura de los esferoides simulados, tanto antes como después de su irradiación, muestra una buena concordancia con la observada en los esferoides experimentales.

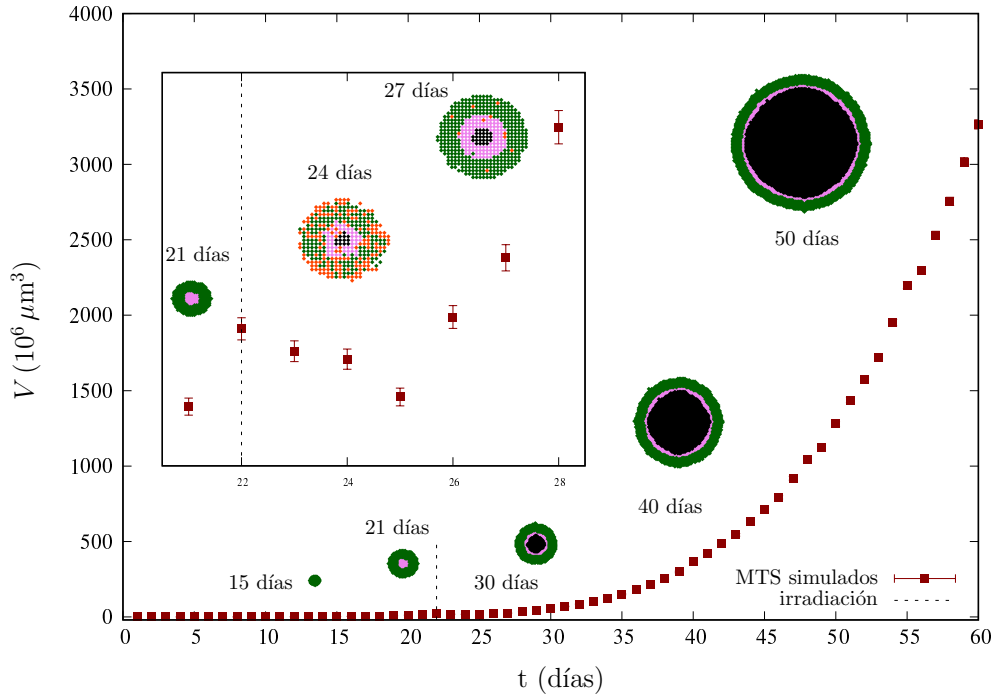


Figura 2.6: La figura muestra el crecimiento de un esferoide simulado irradiado en la iteración 22 (día 22). Se puede ver en varias etapas de su crecimiento, incluidos los días posteriores a la irradiación (figura insertada). Se distinguen células en ciclo proliferativo (puntos verdes), células hipóxicas (puntos morados), núcleo necrótico (región negra) y células estériles (puntos naranjas). En el inserto se amplía un intervalo temporal para observar con mejor detalle esa zona.

Supervivencia

Para llegar a los valores de los parámetros de la función de supervivencia, ecuación (1.3), s_{O_2} y s_{N_2} , que dieron lugar a la mejor sintonización del modelo, y que aparecen en la tabla (2.2), partimos de valores que se encontraban en los rangos experimentales de los estudios [Rof89, Pal84, Joi93, Lie19]. En estos estudios se consideraron valores de supervivencia medidos de cultivos 2D y de MTS, sometidos a diferentes fracciones de dosis de irradiación y en diferentes condiciones de

oxigenación. En la figura 2.7, hemos representado los valores de supervivencia celular de los estudios citados (puntos rojos), además de los valores de s_{O_2} y s_{N_2} y su ajuste lineal, que dieron lugar a la mejor sintonización. Los valores de la relación lineal y el grado de ajuste se pueden ver en la tabla 2.3.

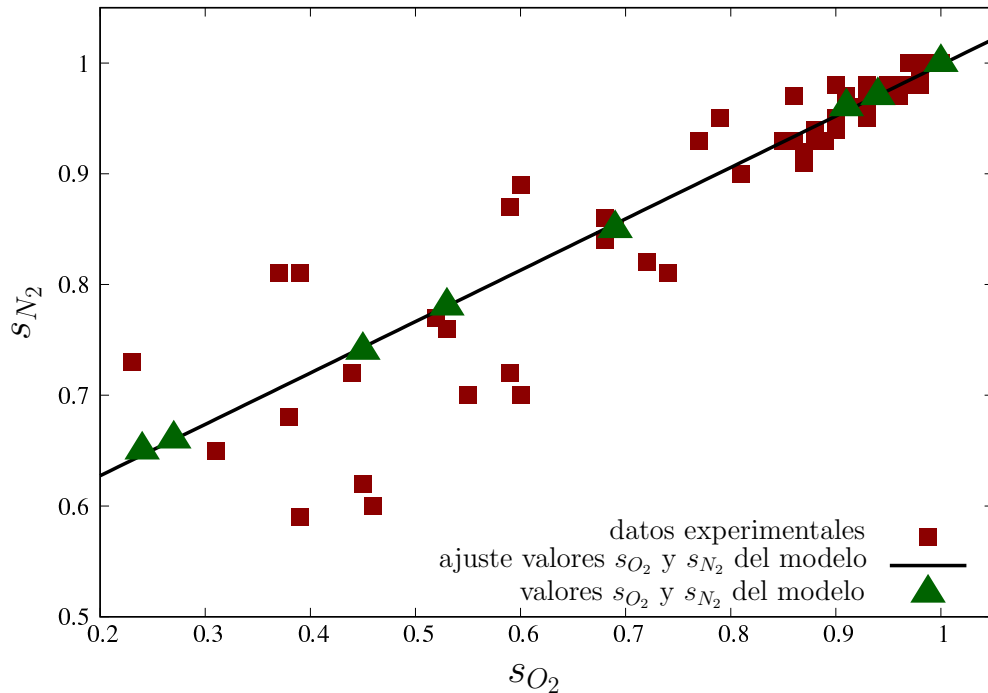


Figura 2.7: Datos de supervivencia celular de los estudios [Rof89, Pal84, Joi93, Lie19] (cuadrados rojos). Se representa el ajuste lineal (línea negra) de los valores de s_{O_2} y s_{N_2} (triángulos verdes) de la tabla (2.2).

Necesitamos saber los valores de los parámetros s_{O_2} y s_{N_2} que corresponden a cada dosis de irradiación para poder seleccionar en el modelo los valores adecuados de los parámetros, y asegurar que la irradiación de los esferoides simulados se produce con el valor de dosis concreto deseado. En la figura 2.8 se muestran los valores de s_{O_2} y s_{N_2} y las fracciones de dosis correspondientes, además del modelo de ajuste usado para cada uno de los dos casos. Los resultados de estos ajustes, así como la expresión matemática del modelo usado, se muestran en la tabla 2.3. En ambos casos se presentan buenos ajustes como indican los valores de χ^2/m .

La figura 2.9 muestra los datos de crecimiento de los esferoides experimentales y de los esferoides simulados. Se muestran los volúmenes de esferoides no irradiados

Tabla 2.2: Valores de s_{O_2} y s_{N_2} del modelo para cada fracción de dosis.

dosis (Gy)	s_{O_2}	s_{N_2}
0.00	1.00	1.00
0.15	0.94	0.97
0.23	0.91	0.96
0.76	0.69	0.85
1.15	0.53	0.78
1.54	0.45	0.74
2.42	0.27	0.66
3.23	0.24	0.65

Tabla 2.3: En la primera fila, se muestra la relación lineal entre los valores de s_{O_2} y s_{N_2} que han dado lugar a la mejor sintonización de nuestro modelo. En la segunda y tercera fila, se muestra la relación lineal entre estos valores y la dosis medida en Gy. El valor de χ^2 por grado de libertad y los valores de los parámetros de ajuste con sus incertidumbres, para un factor de cobertura $k = 1$

	x	y	a	b	R^2	χ^2/m
$y = a \cdot x + b$	s_{O_2}	s_{N_2}	0.463 ± 0.004	0.534 ± 0.002	1.0000	0.00324
$y = \exp(-a \cdot x)$	d	s_{O_2}	0.507 ± 0.016	-	-	0.02433
	d	s_{N_2}	0.165 ± 0.011	-	-	0.03517

dos y los irradiados con fracciones de dosis absorbidas de 0.76, 1.54, 2.42 y 3.23 Gy. En cada caso se han simulado 1000 esferoides, y en todas las simulaciones se ha tenido en cuenta únicamente la variabilidad ligada a la aleatoriedad de los diferentes procesos implicados en la simulación.

Desocupación

En la figura 2.10 se ha representado la función que modula el proceso de desocupación del modelo (subrutina DESOCUPACION), y que ha producido la mejor sin-

2.2. SINTONIZACIÓN

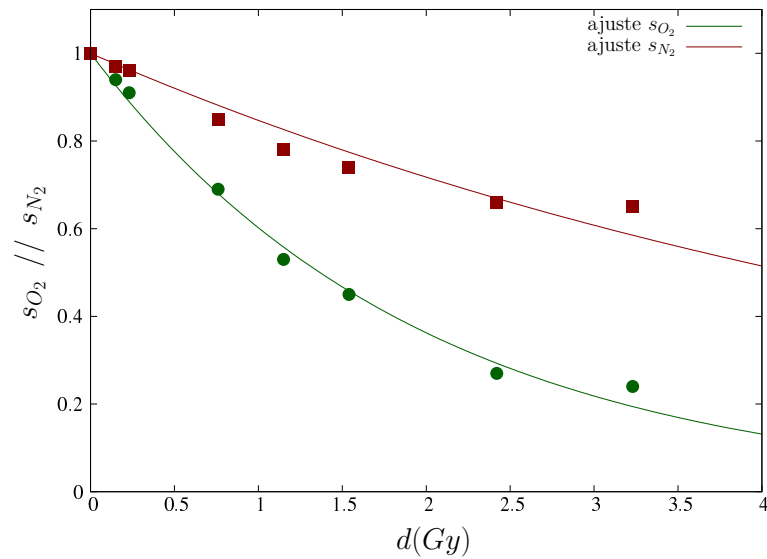


Figura 2.8: Se muestra la relación de cada uno de los parámetros de supervivencia del modelo, s_{O_2} y s_{N_2} , frente a la dosis, además del ajuste del modelo (ver tabla [2.3](#)) y para cada uno de los dos casos.

tonización, desde el día después de la irradiación hasta el décimo día. Se puede observar que el segundo día, después de la irradiación, es el día en que más células estériles desocupan su posición. Además, el último día de desocupación es el octavo día. Este comportamiento de los esferoides simulados es necesario para poder sintonizar el modelo principalmente a valores de fracciones de dosis altas, entre 2.42 y 3.23 Gy. Para estas dosis, sin la modulación desocupación los esferoides simulados presentarían un crecimiento sobreestimado.

MODELO COMPUTACIONAL DE ESFEROIDES TUMORALES MULTICELULARES

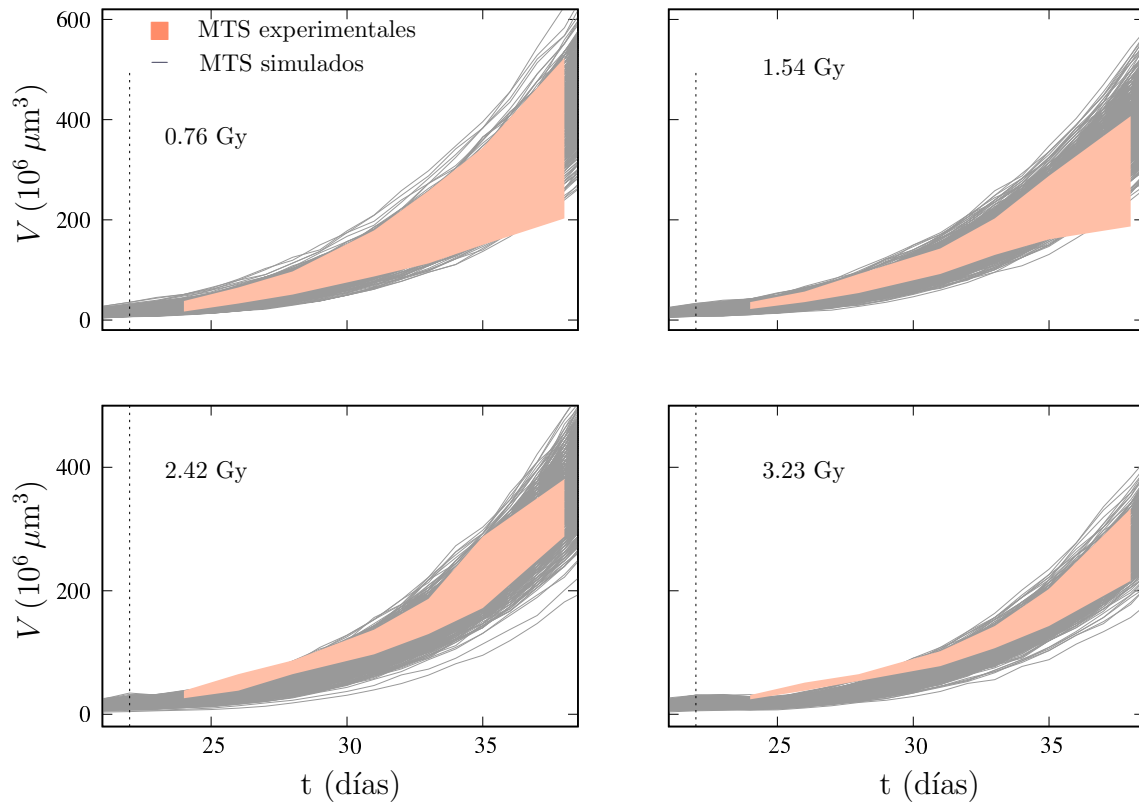


Figura 2.9: La figura muestra los rangos de crecimiento de los esferoides experimentales con valores extremos (bandas salmón) y los datos de crecimiento de los esferoides simulados (líneas grises). La fracción de dosis de irradiación se indica en cada figura. En cada caso se han simulado 1000 esferoides.

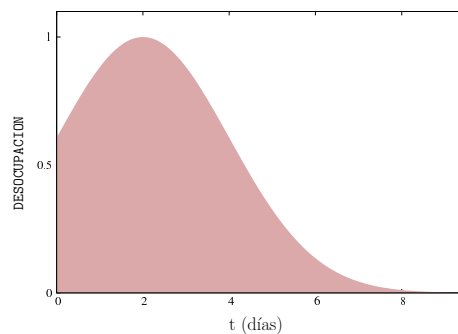


Figura 2.10: La función que modula el proceso de desocupación del modelo, desde el día después de la irradiación hasta el octavo día.

Validación

Para validar el modelo que hemos desarrollado, y justificar el contexto de aplicabilidad del mismo, se obtuvo un conjunto de datos experimentales de MTS de la línea celular MCF-7 y los resultados se compararon con los obtenidos en la simulación. La descripción de los datos empíricos que proporciona el ABM es bastante buena. Concretamente, la relación entre el radio del núcleo necrótico y el radio del MTS completo y la relación entre el número de células hipóxicas más el de proliferativas y el volumen del MTS resultaron ser bastante similares a las observadas en el experimento. Parte de estos resultados están publicados en el artículo [Rui20].

3.1 Cumplimiento de criterios

Todo modelo matemático que esté diseñado para reproducir datos empíricos de crecimiento tumoral debe cumplir una serie de requisitos, o criterios de validación, para que pueda realizar predicciones confiables, comprobables y trasladables sobre nuevas dosis terapéuticas, protocolos de tratamiento o terapias combinadas [Bra19]. En esta sección analizaremos estos requisitos en el caso concreto de nuestro modelo:

- Necesidad de contar con un biomarcador putativo: nuestro modelo considera el volumen los MTS y el número de células tumorales como biomarcadores de la carga tumoral.
- Desarrollo de un modelo mecanicista que describa la evolución del biomarcador a lo largo del tiempo: el ABM es el modelo que hemos desarrollado para describir esta evolución. El número de variables y parámetros del modelo se ha determinado y limitado según los datos disponibles. Nosotros hemos considerado un modelo basado en agente en red con 14 parámetros.
- Calibración o sintonización del modelo con datos experimentales existentes: la sintonización del ABM se ha realizado con datos experimentales de crecimiento de MTS cultivados en el laboratorio, algunos de los cuales fueron sometidos a diferentes dosis de irradiación. Según lo dicho, el modelo ABM que hemos desarrollado en este trabajo es adecuado para simular y predecir nuevos protocolos de tratamiento de MTS dando luz a determinados aspectos relevantes en el caso de tumores avasculares de pequeño tamaño.
- Validación del modelo con datos experimentales no usados para su sintonización: en estas condiciones se ha validado con datos experimentales, o relaciones entre estos, que no se han usado para la sintonización del modelo. En este sentido, en el capítulo analizaremos algunas características de los MTS simulados, como la estructura de los esferoides, la relación del número de células frente al volumen, la relación entre los radios del núcleo necrótico y el radio total del esferoide, la fracción de supervivencia, además de la variabilidad.
- Evaluación de la capacidad predictiva de un tratamiento conocido: la capacidad del modelo desarrollado en este trabajo para ajustar los datos experimentales no implica que sea predictivo. Nosotros solamente hemos aplicado nuestro modelo en las mismas condiciones en las que se sintonizó, de tal manera que no podemos garantizar la validez del mismo en intervalos de tiempo largos en comparación con los de seguimiento experimental. Una de las aplicaciones interesantes del modelo consiste en usar los esferoides simulados como series de datos pseudo-experimentales para evaluar la capacidad

3.2. COMPARACIÓN DE CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS

predictiva y retrospectiva de modelos matemáticos, como por ejemplo los modelos clásicos que son usados en contextos clínicos. Este análisis, que no trata de validar el modelo, se ha llevado a cabo en el capítulo [4](#).

- Simulación y predicción de tratamientos no probados: el modelo ABM desarrollado en este trabajo es una herramienta muy útil para simular tratamientos de radioterapia no probados, puesto que no es posible disponer de datos clínicos para determinados protocolos de tratamiento debido a cuestiones éticas, como es el caso, por ejemplo, de los retrasos o las interrupciones en los tratamientos. En este sentido, se podría evaluar la influencia en los tratamientos de sesiones de radioterapia administradas más de dos veces al día o en fin de semana.

3.2 Comparación de características específicas

En esta sección vamos a comparar determinadas características de los MTS experimentales de la línea MCF-7 con nuestros esferoides simulados. Para validar nuestro modelo computacional nos centraremos en la concordancia de la estructura de capas del MTS, la relación entre el radio necrótico y el total del MTS, la relación entre el número de células y el volumen, y la fracción de supervivencia a diferentes dosis.

3.2.1 Estructura de capas

En la figura [1.3](#) se mostró un corte 2D de uno de los MTS simulados. Esta estructura resulta ser muy similar a la observada en esferoides experimentales y, de hecho, las formas de los MTS simulados no son esferas perfectas como ocurre con las experimentales [\[Ole92, Ole93, Gri13\]](#). En la figura [3.1](#) se muestran autorradiografías para esferoides de diferentes tamaños [\[Ole92\]](#), viéndose que las células proliferantes se localizan en las capas más externas (de 3 a 10 capas celulares que suponen menos de $250 \mu\text{m}$ de espesor). Si progresamos hacia el interior del esferoide muchas de las células con que nos encontramos están en estado quiescente, aunque bastantes de entre ellas pueden ser viables si las condiciones ambientales cambian, como ya hemos comentado. Para esferoides de suficiente tamaño (más de $500 \mu\text{m}$

de diámetro) el centro está ocupado por el núcleo necrótico de células muertas y restos celulares. El análisis mediante autorradiografías tras la incorporación de timidina tritiada ($^3\text{HTdR}$)¹, permite evaluar qué células se encuentran dentro del ciclo de proliferación en función de la distancia a la superficie.

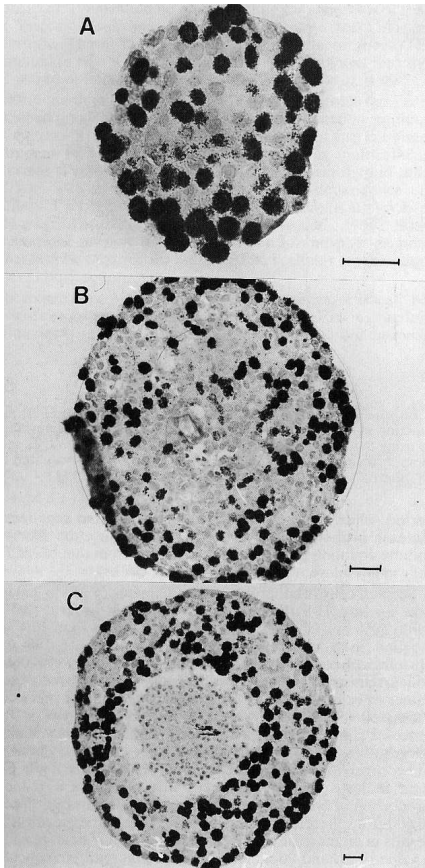


Figura 3.1: Autorradiografías de esferoides de la línea celular humana MCF-7. (A) Esferoide de $200\ \mu\text{m}$ de diámetro; (B) esferoide de $500\ \mu\text{m}$ de diámetro que muestra el gradiente de proliferación, la capa de células viables (de $150\ \mu\text{m}$) y el núcleo necrótico; (C) esferoide de $800\ \mu\text{m}$ de diámetro, aquí el tamaño ha producido un artefacto que consiste en la entrada de medio de cultivo al interior del esferoide y la eliminación del gradiente de proliferación en la corteza externa. Los esferoides fueron mantenidos en un medio de cultivo en el que se incorporó $^3\text{HTdR}$. La barra de escala corresponde a $50\ \mu\text{m}$. Tomado de [Ole92].

Uno de los ingredientes principales de nuestro modelo de simulación es la función gradiente g que, según su definición en la ecuación (1.2), depende de d , el número de capas de células entre una célula dada y los nutrientes. Para comparar con determinadas cantidades similares que pueden encontrarse en la bibliografía, es conveniente expresar g en función de la distancia entre la posición de la celda y el centro del esferoide, r . En nuestro caso, esto es fácil de hacer si, para una iteración dada en el crecimiento de un esferoide se muestran los factores de escala

¹La timidina es un nucleósido que forma parte del ADN; si está presente en el medio de cultivo durante la fase de síntesis del ADN, antes de la división celular, las células la incorporarán y quedarán marcadas.

3.2. COMPARACIÓN DE CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS

y empaquetamiento (ver tabla [1.1](#)), así como el número de capas de los diferentes tipos. En la figura [3.2](#) se muestran los resultados obtenidos de la simulación de un esferoide. En el recuadro de esa figura se muestra los resultados obtenidos para las iteraciones cuyos cortes se han trazado. Ahí podemos observar cómo g aumenta con r . Cuando el esferoide es grande, g alcanza el valor máximo en alrededor de $200 \mu\text{m}$, comenzando desde 0. En el caso del esferoide de 15 días, el gradiente en su centro es aproximadamente el 60 % del valor máximo. Estos resultados son similares a las distribuciones de presión parcial de oxígeno citadas en [\[Mue84\]](#), o a la dependencia con el radio del MTS de la medida de glucosa y el consumo de O_2 [\[Cas92\]](#), en ambos casos para los esferoides celulares EMT6/R₀.

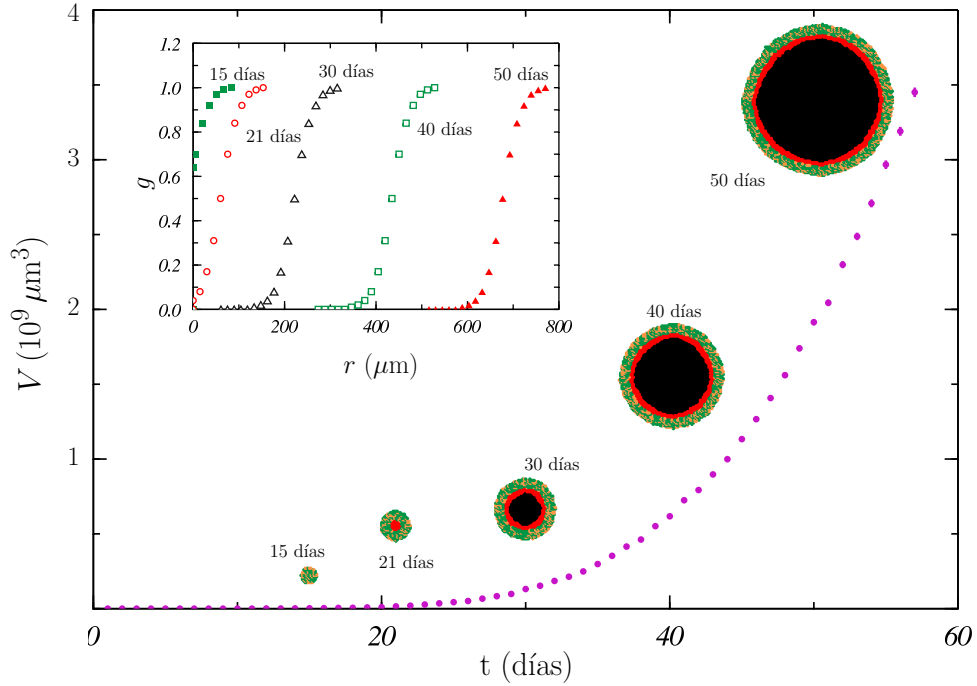


Figura 3.2: Variación del volumen de un MTS simulado con el tiempo. Los cortes del MTS se muestran en diferentes etapas de crecimiento. Las áreas negras y rojas indican las regiones necrótica e hipóxica del MTS. El verde corresponde a las células proliferativas, de las que se indican en naranja las que realmente se dividen en la iteración particular que se muestra. El recuadro muestra el gradiente g de la ecuación [\(1.2\)](#), normalizado al máximo, en función de la distancia al centro del esferoide, r .

Si bien los parámetros κ y d_0 son parámetros de ajuste de nuestro modelo, la

función gradiente obtenida en las simulaciones coincide razonablemente bien con las obtenidas en diferentes experimentos llevados a cabo con otras líneas celulares. Esto permite asegurar que los valores fijados en nuestras simulaciones están respaldados indirectamente por la información experimental disponible.

3.2.2 Relación entre radios

Centrándonos en la comparación con los datos experimentales, analizamos la relación entre el radio del núcleo necrótico, R_n , y el de todo el MTS, R . La figura 3.3 muestra los resultados obtenidos para los esferoides experimentales (cuadrados verdes) y simulados (círculos violetas). Los datos experimentales se tomaron de la referencia [Vi196] y corresponden a esferoides de la línea MCF-7, mientras que los simulados corresponden a los valores promedio calculados para los 1000 MTS que incluimos en nuestro análisis. Los datos simulados indican que R_n está correlacionado linealmente con R . Un ajuste mediante regresión lineal a estos datos muestra (línea continua) una pendiente de 1.006 ± 0.001 ($k = 1$). Los datos experimentales también indican una dependencia lineal entre ambos radios. El ajuste lineal correspondiente (línea discontinua) tiene una pendiente de 1.078 ± 0.048 ($k = 1$). El valor de la pendiente encontrado para los esferoides simulados está dentro de 2σ del obtenido para los datos experimentales, lo que indica que nuestro modelo Monte Carlo reproduce razonablemente bien el comportamiento experimental.

3.2.3 Número de células

La dependencia del número de células proliferativas más las hipóxicas con el volumen del MTS también se ha medido en el experimento de la referencia [Vi196]. La figura 3.4 muestra estos resultados con cuadrados verdes. Los puntos violetas corresponden a los valores obtenidos para los 1000 esferoides simulados. Si bien las grandes incertidumbres en los valores experimentales hacen que los datos encontrados en la simulación estén de acuerdo con ellos, se observa una cierta sobreestimación del número de células para un volumen dado en la simulación.

Un aspecto de particular interés es que el MTS simulado reproduzca correctamente el número de células de cada tipo en las sucesivas iteraciones de crecimiento, con vistas al análisis de los efectos de la irradiación del esferoide mediante

3.2. COMPARACIÓN DE CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS

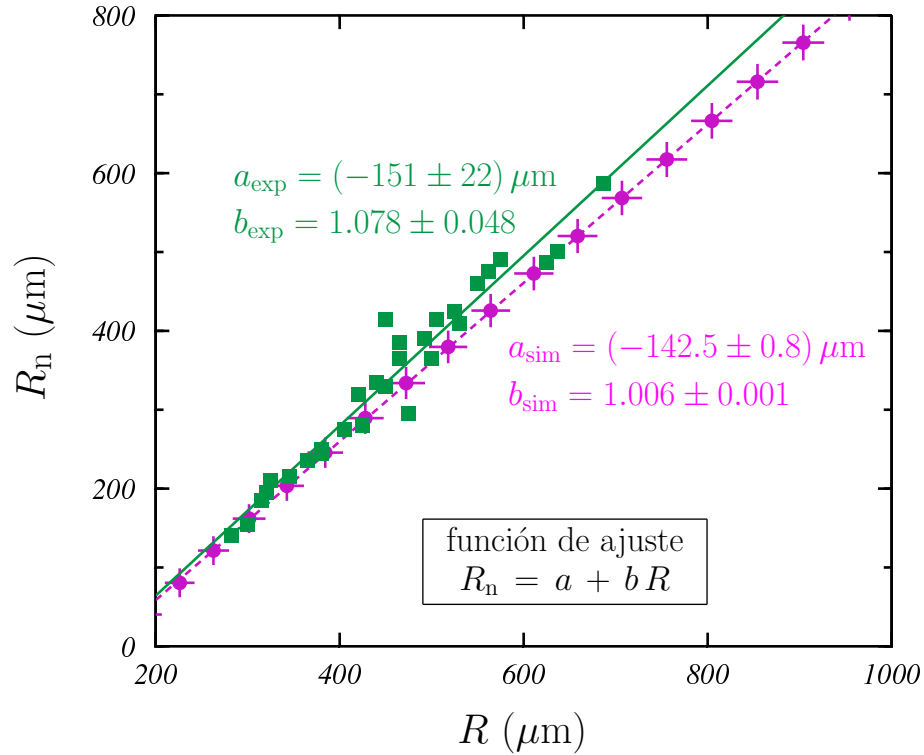


Figura 3.3: Relación entre el radio de la región necrótica, R_n , y el de todo el MTS, R . Los datos experimentales (cuadrados verdes) se tomaron de la referencia [Vi196]. Los datos simulados (círculos violetas) corresponden a la media de los valores obtenidos para los 1000 esferoides utilizados en nuestro análisis. Las incertidumbres en los parámetros de ajuste corresponden a un factor de cobertura $k = 1$.

el modelo de simulación, porque tiene especial relevancia en la estimación de la supervivencia celular.

En nuestro modelo de simulación Monte Carlo, la dinámica que experimenta el crecimiento del esferoide se centra en la cantidad de células que contiene y el estado en el que se encuentran en cada paso de ese crecimiento. Esto abre la posibilidad de abordar una variedad de situaciones que serían difíciles de considerar con otros enfoques, cuya base está en mecanismos celulares a nivel molecular. Los detalles sobre algunos de los problemas que se pueden estudiar con nuestro modelo de manera sencilla y cómo abordarlos se dan en el capítulo 4.

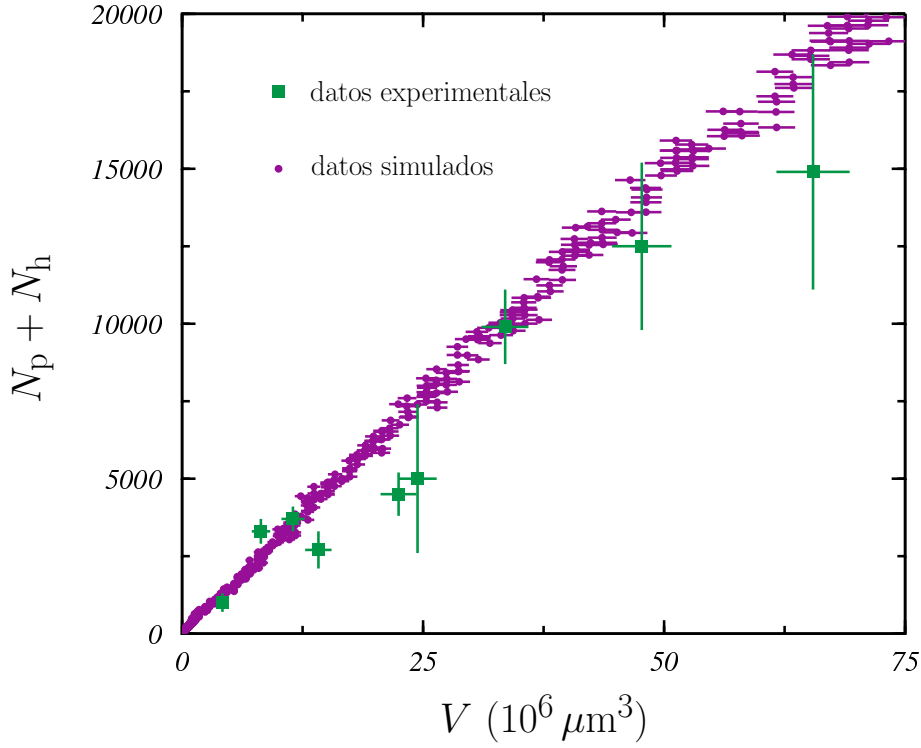


Figura 3.4: Número de células proliferativas más hipóxicas, $N_p + N_h$, en función del volumen del MTS. Los valores obtenidos para cada uno de los esferoides simulados se muestran con círculos violetas. Los datos experimentales se tomaron de la referencia [Vi196] y se indican con cuadrados verdes. Las incertidumbres corresponden a un factor de cobertura $k = 1$. Las del número de células de los esferoides simulados son más pequeñas que los símbolos utilizados.

3.2.4 Fracción de supervivencia

La medida de la SF mediante el **cálculo por conteo** implica el recuento de células esterilizadas, tanto proliferativas como hipóxicas, con respecto al total de células irradiadas, y su expresión matemática viene dada por la ecuación (1.5). La SF se calcula para cada iteración en la que se produce una irradiación, y para cada dosis y esferoide de manera independiente. Si consideramos un conjunto de esferoides, y calculamos el valor promedio de los valores de SF para cada dosis, podemos ajustar el modelo LQ a estos valores de supervivencia promedios. El resultado de este ajuste es una curva que denominamos curva de supervivencia.

En la figura 3.5 (figura superior izquierda), podemos ver los valores de supervi-

3.2. COMPARACIÓN DE CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS

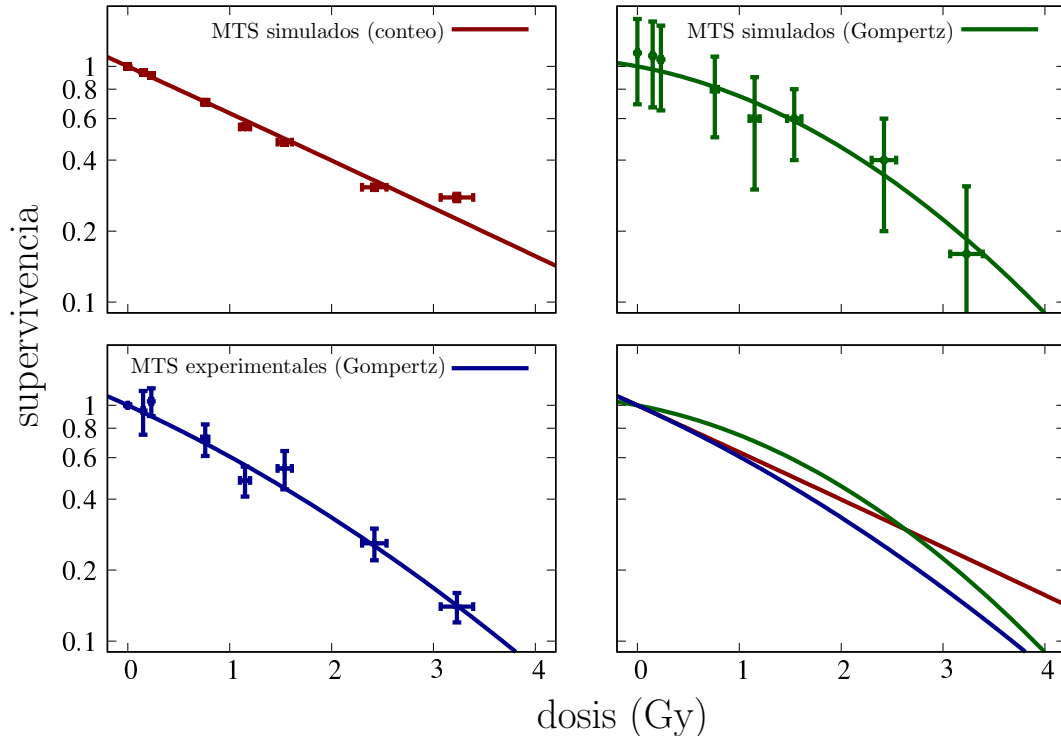


Figura 3.5: Curva de supervivencia según dos métodos de cálculo (cálculo por conteo y modelo de Gompertz) para dos conjuntos de datos (experimentales y simulados). Las dos figuras superiores y la figura inferior de la izquierda representan los valores de SF promedio de 1000 esferoides simulados, y los ajustes del modelo correspondientes, calculados por conteo (cuadrados burdeos), mediante el modelo de Gompertz modificado de la referencia [Gui03] (puntos verdes), y los correspondientes a los 162 esferoides experimentales calculados por el modelo de Gompertz modificado de la referencia [Gui03] (cruces azules). En la figura derecha inferior se muestran los tres ajustes. Las incertidumbres corresponden a un factor de cobertura $k = 1$.

vencia promedio y sus incertidumbres (cuadrados burdeos) para 1000 esferoides simulados y valores de dosis 0.0, 0.15, 0.23, 0.77, 1.15, 1.54, 2.42 y 3.23 Gy, además de la curva de supervivencia calculada (línea burdeos). Podemos observar un valor de χ^2 por grado de libertad razonable de la curva de supervivencia respecto a los valores promedio [3.1], excepto para el valor de 3.25Gy (dato más a la derecha de la figura), donde la curva parece subestimar la supervivencia.

Los histogramas de distribución de los valores de la fracción de supervivencia obtenidos en los esferoides simulados, s_n , se muestran en la figura [3.6]. Se trata de

MODELO COMPUTACIONAL DE ESFEROIDES TUMORALES MULTICELULARES

Tabla 3.1: Resultados del ajuste del modelo LQ al conjunto de datos de supervivencia simulados obtenidos por dos métodos, método del conteo y modelo de Gompertz modificado de la referencia [Gui03], y datos de supervivencia experimentales obtenidos por el modelo de Gompertz modificado de la referencia [Gui03]. También se muestran el valor de χ^2 por grado de libertad y los valores de los parámetros de ajuste con sus incertidumbres para un factor de cobertura $k = 1$.

método de cálculo	esferoides	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	χ^2/m
conteo de células	simulados	0.45 ± 0.03	0.0018 ± 0.0192	3.84
Gompertz modificado	simulados	0.18 ± 0.09	0.10 ± 0.04	0.28
Gompertz modificado	experimentales	0.45 ± 0.08	0.04 ± 0.03	0.73

distribuciones de anchura parecida y sesgadas hacia la izquierda.

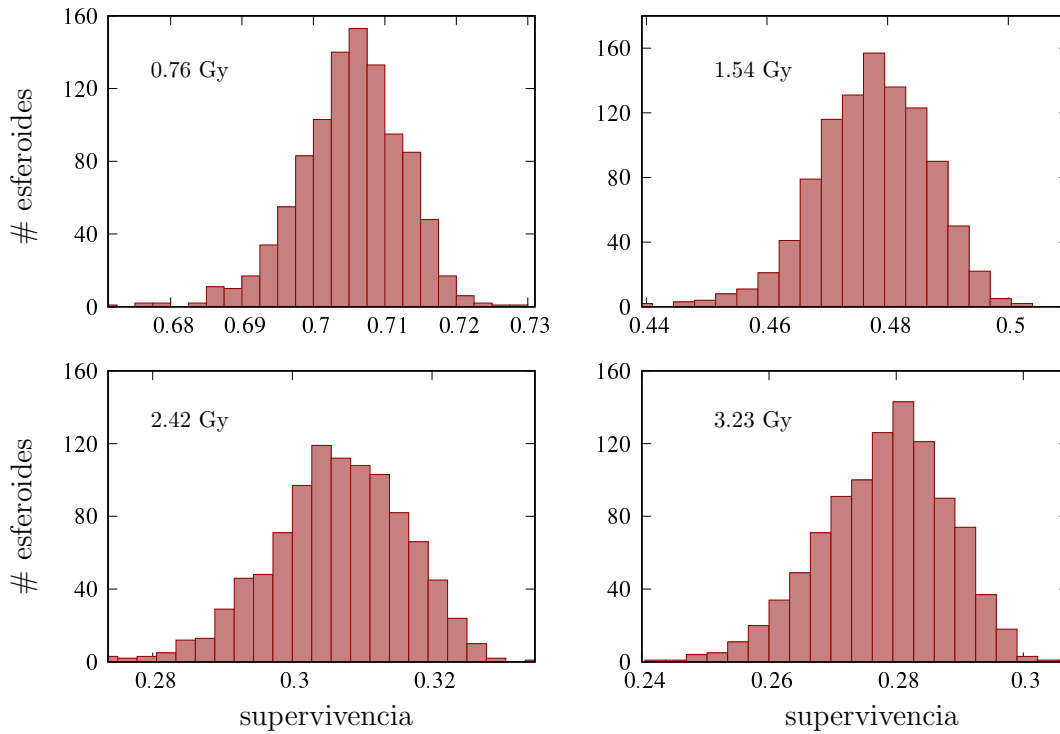


Figura 3.6: Histogramas de distribución de los valores de la fracción de supervivencia s_n obtenidos de los esferoides simulados.

Por otro lado, la medida de la SF mediante el **cálculo a partir del modelo de crecimiento** permite obtenerla para cada valor de dosis, a partir del ajuste del modelo de Gompertz modificado [Gui03] a los volúmenes de crecimiento de cada esferoide. El ajuste nos da unos valores para los parámetros A , a , V_0 y V_{surv} . La expresión matemática que permite el cálculo de SF es la ecuación (1.10). La SF se calcula para cada iteración en la que se produce una irradiación, y para cada dosis y esferoide de manera independiente.

En la figura 3.5 (figura superior derecha), podemos observar los valores de supervivencia promedio y sus incertidumbres (puntos verdes) para 1000 esferoides simulados y valores de dosis 0.0, 0.15, 0.23, 0.75, 1.15, 1.54, 2.42 y 3.23 Gy, además de la curva de supervivencia calculada (línea verde). Los valores de los parámetros de ajuste y el valor de χ^2/m se pueden ver en la tabla 3.1.

Se ha reproducido este mismo análisis para el grupo de 162 esferoides experimentales irradiados y los resultados se muestran en la figura 3.5 (figura inferior izquierda). Podemos observar cómo la curva de ajuste (línea azul) queda dentro de las barras de incertidumbre de los valores promedio (cruces azules). Los valores de los parámetros de ajuste y el valor de χ^2/m se pueden ver en la tabla 3.1.

3.3 Variabilidad

Como se puede ver en la figura 2.1, existe una variabilidad significativa entre las curvas de crecimiento de los esferoides experimentales, a pesar de que el procedimiento de siembra y las condiciones de cultivo fueron iguales para todos los MTS de la muestra. Entonces, cualquier modelo computacional que pretenda describir el crecimiento de MTS reales debe reproducir esta característica fundamental que se manifiesta en muchos aspectos de la biología y radiobiología [Gui12b].

A pesar de que, como se muestra en el recuadro de la figura 2.4, los volúmenes del MTS experimental se encuentran dentro de los de la muestra obtenida en la simulación, esta presenta una escasa variabilidad en lo que se refiere a los volúmenes de los MTS. La importancia de la variabilidad en este contexto ya ha sido señalada en diferentes trabajos [Smo98, Zan16, Lee18]. En nuestras simulaciones, las curvas de crecimiento obtenidas son esencialmente paralelas y no se observa ningún cruce

entre ellas. Esto se puede ver en el recuadro de la figura 3.7 donde se muestran los volúmenes de varios esferoides simulados en función del tiempo de crecimiento.

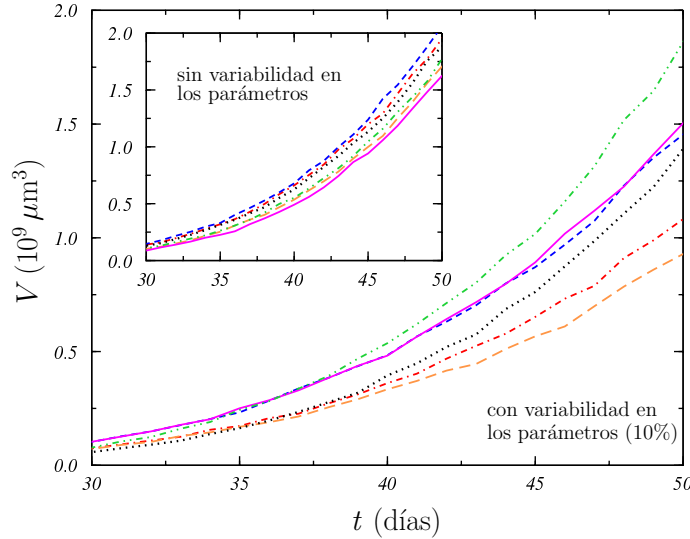


Figura 3.7: Variación de los volúmenes de varios MTS en función del tiempo de crecimiento. Los resultados mostrados en la figura corresponden a la simulación realizada asumiendo una variabilidad del 10% en todos los parámetros del modelo. Las curvas en el recuadro corresponden a MTS de la simulación sin variabilidad en los parámetros. Los esferoides cuyas curvas de crecimiento se muestran en esta figura se eligieron al azar.

De manera directa, y por su naturaleza probabilística, como hemos comentado, la simulación introduce variabilidad en el crecimiento de los esferoides. Poder aumentar esta variabilidad hace que el modelo sea útil en otras situaciones, por ejemplo a la hora de considerar esferoides de diferentes líneas celulares. Para introducir una mayor variabilidad general en los volúmenes de los MTS simulados, y tratar de reproducir mejor los cruces de las curvas de crecimiento de diferentes esferoides, se introduce una variabilidad en los parámetros del modelo. Para ello, hemos considerado que los valores de estos parámetros para cada esferoide simulado se muestrean realmente dentro de distribuciones gaussianas centradas en los valores indicados en la tabla 1.1 y con los valores σ dados por un porcentaje de estos valores promedio. Como se puede observar en la figura 3.7, la variabilidad produce curvas de crecimiento que describen de mejor manera los cruces mostrados por los datos experimentales.

3.3. VARIABILIDAD

Estudiamos distintas posibilidades para el porcentaje de los valores σ , y realizamos simulaciones asumiendo dispersiones del 3, 5 y 10 % en todos los parámetros simultáneamente y en cada uno de ellos individualmente. En cada simulación se siguió el crecimiento de 300 esferoides. Para evaluar el efecto de interés, calculamos, en una iteración dada, el coeficiente de variación como la razón σ_V/\bar{V} entre la desviación estándar, σ_V , y el promedio, \bar{V} , de los volúmenes de los 300 esferoides simulados. Consideramos la 50^a iteración de crecimiento como la representativa para evaluar el efecto de la variabilidad en los parámetros. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3.2.

Cuando todos los parámetros se modifican simultáneamente, el coeficiente de variación aumenta cuando aumenta el porcentaje de dispersión en los parámetros. Sin embargo, la contribución de cada parámetro individual a esta variabilidad general es diferente. De hecho, para p_{\max} y T el coeficiente de variación alcanza valores alrededor de 0.44 y 0.29, respectivamente, para un margen del 10 %, mientras que para los demás parámetros ese coeficiente permanece por debajo de 0.12. Esto in-

	coeficiente de variación del volumen		
	3 %	5 %	10 %
todos los parámetros	0.193	0.268	0.612
p_{\max}	0.163	0.247	0.438
κ	0.084	0.087	0.091
d_0	0.094	0.100	0.115
p_{exfol}	0.088	0.085	0.090
T	0.122	0.165	0.288
f_p	0.088	0.094	0.087
f_h	0.091	0.089	0.095
f_n	0.086	0.098	0.117

Tabla 3.2: Coeficientes de variación para el volumen obtenidos para la 50^a iteración en los esferoides simulados cuando los parámetros se eligen aleatoriamente como se describe en el texto. Aquí se muestran los resultados obtenidos para una variación del 3 %, 5 % y 10 % de cada parámetro individual y para todos ellos simultáneamente.

dica que los parámetros que más influyen en los resultados de la simulación son la probabilidad de división y luego el factor de escala.

Veamos otro ejemplo en el que se han simulado dos muestras con 1000 MTS virtuales cada una. En la muestra #1, solo se ha tenido en cuenta la variabilidad ligada a la aleatoriedad Monte Carlo de los diferentes procesos involucrados en la simulación. Los valores elegidos para los parámetros del modelo fueron los citados en la tabla 2.1. En la muestra #2 se muestrearon los parámetros del modelo para cada MTS virtual asumiendo distribuciones gaussianas centradas en los valores considerados en la primera simulación y con anchos iguales al 10 % de los respectivos centroides.

La figura 3.8 muestra el volumen frente al tiempo del crecimiento correspondientes a estas dos muestras. El volumen de algunos de los MTS simulados se ha representado con líneas continuas. Toda la región cubierta por las dos muestras se traza con colores claros. Se vuelve a evidenciar el gran aumento en los rangos de volumen producido por el 10 % adicional de variabilidad en los parámetros de simulación. Además, los cruces entre las curvas de crecimiento en la muestra #2 ocurren con más frecuencia que en la muestra #1, reproduciendo así mejor las observaciones experimentales.

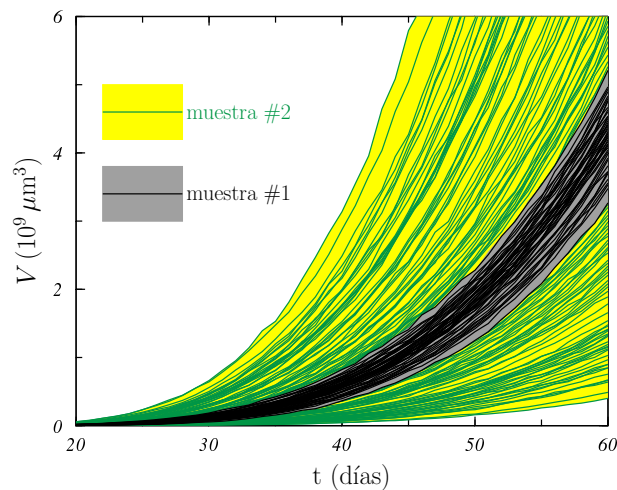


Figura 3.8: Volumen frente al tiempo de crecimiento (en días) correspondiente a las dos muestras generadas con el ABM. Todas las regiones cubiertas por las muestras #1 y #2 se indican en gris y amarillo, respectivamente. Las líneas continuas muestran algunas de las curvas de crecimiento de MTS simulados.

3.3. VARIABILIDAD

Para estudiar el efecto de la variabilidad en el crecimiento de los esferoides irradiados, se han generado dos conjuntos con 300 MTS virtuales cada uno, irradiando ambos conjuntos. En el primero, se ha tenido en cuenta únicamente la variabilidad ligada a la aleatoriedad Monte Carlo de los diferentes procesos implicados en la simulación. Los valores elegidos para los parámetros del modelo fueron los indicados en la tabla [2.1](#). En el segundo, se muestrearon los parámetros del modelo para cada MTS virtual asumiendo distribuciones gaussianas centradas en los mismos valores que en la primera simulación y con anchos del 10 % de los respectivos centroides. Los resultados pueden verse en la figura [3.9](#). Esta figura muestra las gráficas de volumen frente al día de crecimiento correspondientes a estas dos muestras y para una dosis de irradiación de 1.54 Gy. Algunos de los MTS simulados se muestran con líneas grises continuas. Los MTS experimentales se muestran con una banda de color salmón. Es evidente el gran aumento en los rangos de volumen que se produce al incluir el 10 % de variabilidad en los parámetros de simulación, reproduciendo así mejor los cruces de las curvas. Ese aumento en los rangos de volumen representaría mejor, por ejemplo, una muestra de tumores de una población de pacientes virtuales.

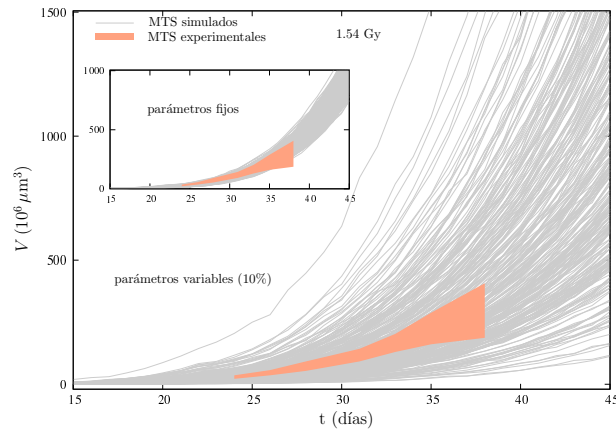


Figura 3.9: Volumen vs día de crecimiento correspondientes a dos muestras, una con valores de parámetros fijos (figura insertada) y la otra con una variabilidad en los parámetros del 10 %, ambas para una dosis de irradiación de 1.54 Gy.

MODELO COMPUTACIONAL DE ESFEROIDES TUMORALES MULTICELULARES

Aplicación clínica

Como se ha mostrado en este trabajo, el modelo de simulación Monte Carlo desarrollado para describir el crecimiento de los MTS se basa en una dinámica simple, que no incluye interacciones a nivel molecular y se ocupa de las células y sus estados, y su influencia en la proliferación del conjunto del tumor. Los cambios en el estado de las células se producen de acuerdo con la distancia entre la posición de la célula y los nutrientes y el suministro de O_2 . Un total de 14 parámetros gobiernan el crecimiento de cada MTS y su evolución tras irradiación. Sin embargo, esta simplicidad no impone ninguna limitación para abordar una amplia variedad de problemas. Por ejemplo, las siembras de células dispersas en las que se forman varios agregados de células en lugar de un solo esferoide se pueden considerar de una manera sencilla.

En este capítulo hemos analizado las diferencias que, en el crecimiento y evolución tras irradiación, presentan ciertos esferoides que inicialmente formaron un único agregado y otros cuyas células, iguales en número que en el caso anterior, constituían inicialmente siembras dispersas, como ocurre en la situación en que se producen las metástasis avasculares. También hemos hecho un estudio de la repercusión en la supervivencia de MTS irradiados que han sufrido alguna alteración en su pauta de tratamiento inicial, como alguna interrupción o retraso en el inicio

del tratamiento. También analizamos la repercusión del día de la semana en que comienza la radioterapia.

4.1 Metástasis

Uno de los objetivos de esta tesis es reproducir un conjunto de micrometástasis de cáncer de mama, y para ello hemos considerado la imagen de microscopio de la figura 4.1 que muestra tres micrometástasis de una paciente con carcinoma de mama. El tamaño del grupo de micrometástasis de uno de los ganglios sometidos a tinción inmunohistoquímica (IHC), mediante el antígeno de membrana epitelial (EMA) como marcador, es de 1.7 mm [Nai18].

Hemos simulado el crecimiento de estas micrometástasis y lo hemos comparado con la situación en que el mismo número de células iniciales forman un solo agregado. En cada situación analizada hemos considerado 150 esferoides virtuales. Para reproducir la forma de las micrometástasis de la imagen 4.1, hemos necesitado 71 células iniciales con una distribución espacial concreta. El número de células se ha elegido para obtener la forma buscada con el menor número de células de partida.

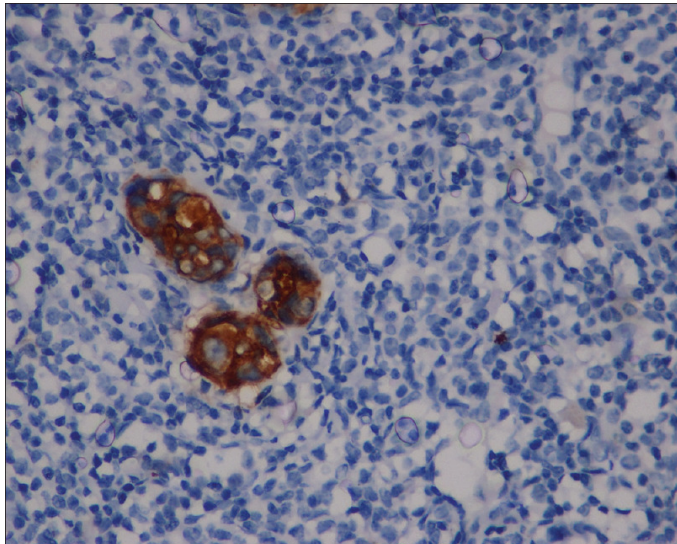


Figura 4.1: La imagen muestra un grupo de tres micrometástasis de una paciente con carcinoma de mama [Nai18]. El tamaño del grupo de micrometástasis es de 1.7mm.

4.1.1 Metodología

Además de la simulación de las metástasis y de un agregado único, hemos analizado la evolución de las mismas al ser irradiadas con un fraccionamiento de radioterapia externa convencional. El esquema de fraccionamiento ha consistido en la administración de una dosis de 2Gy al día, durante cinco días consecutivos (días entre semana), seguidos de dos días de descanso (fin de semana), repitiendo esta cadencia hasta que todas las células proliferativas y en estado hipóxico quedaron esterilizadas por la radiación.

También hemos analizado el comportamiento de ambos grupos de simulaciones, agregados y metástasis, al ser irradiados con esquemas de fraccionamiento que han sido alterados respecto al planteamiento inicial. Concretamente hemos estudiado el efecto del retraso del inicio de la irradiación en 10 y 20 días, el efecto de comenzar la irradiación un jueves en vez de un lunes (fraccionamiento estándar), y por último una interrupción de cinco días consecutivos tras la 1^o y la 4^o semana desde el inicio de la irradiación.

Con el fin de cuantificar las diferencias entre las situaciones estudiadas hemos usado la probabilidad de control tumoral (*tumor control probability*, TCP), que es la probabilidad de que todas las células del tumor, o en este caso esferoide, queden estériles tras recibir un determinado esquema de tratamiento en unas determinadas condiciones (definido por su dosis total, dosis por fracción, tiempo de tratamiento, etc.).

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Metástasis y agregado simulados

En la figura 4.2 se muestra una imagen de la simulación de una micrometástasis de una paciente con carcinoma de mama, semejante a la que se muestra en la figura 4.1 de [Nai18]. Se pueden ver cinco etapas diferentes de crecimiento en imágenes 2D, la tercera de ellas es la que corresponde a la figura 4.1. En la imagen inferior derecha de la figura 4.2 se ve una representación 3D de una etapa de crecimiento avanzada de la evolución de la micrometástasis. La forma alargada se diferencia

claramente de la esferoidal que adquieren los esferoides que evolucionan a partir de un único agregado.

Los agregados simulados no difieren en cuanto a su forma del resto de esferoides simulados en este trabajo, es decir mantienen su forma esférica, además de su estructura de capas proliferativa, hipóxica y núcleo necrótico que vimos en la figura 2.3.

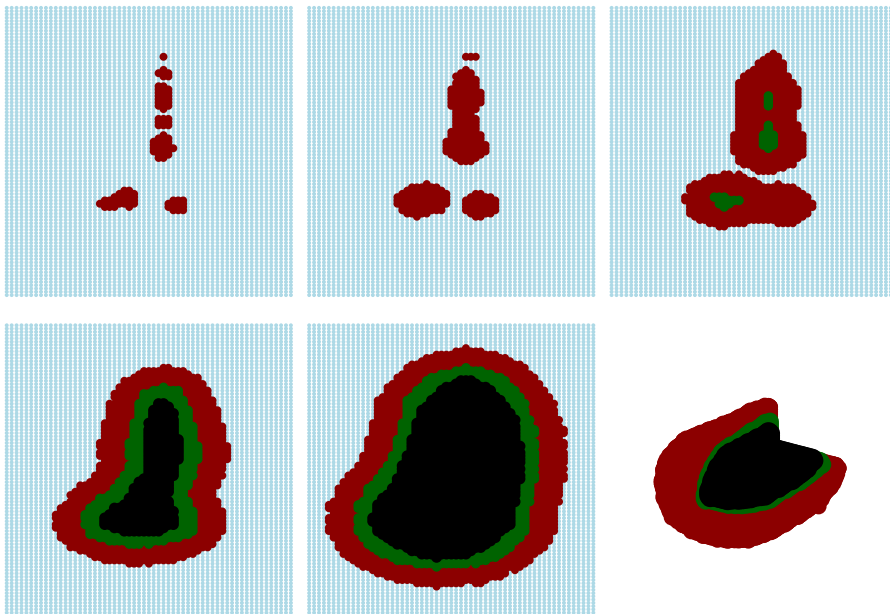


Figura 4.2: Se muestra la simulación mediante nuestro modelo computacional de la micrometástasis de la figura 4.1 [Nai18]. La figura superior derecha es la que muestra la mayor similitud con la imagen. Pueden verse cinco etapas diferentes de crecimiento en imágenes 2D y una imagen 3D de las últimas etapas de crecimiento.

4.2.2 Análisis

En la tabla 4.1 se muestran los resultados del análisis de las simulaciones de agregados y metástasis que han sido irradiados con diferentes esquema de fraccionamiento. Se pueden ver las dosis promedio, d , que se han necesitado para la esterilización de las células proliferativas e hipóxicas, tanto de los agregados como de las metástasis. En la última columna hemos representado la diferencia porcentual relativa de

4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

las dosis promedio, Δd , necesarias para la esterilización de las metástasis respecto a las necesarias para los agregados en cada caso analizado. También se pueden ver en la tabla los resultados de la diferencia porcentual de las dosis promedio, δd , necesarias para la esterilización de agregados y metástasis respecto a las necesarias en los casos del fraccionamiento estándar, o casos de control, respectivamente.

Se muestran en la tabla 4.1 en primer lugar los resultados del fraccionamiento estándar, que corresponden al caso de control, seguidos de los correspondientes a retrasos de 10 y 20 días respecto al inicio estándar. A continuación el resultado de haber iniciado el fraccionamiento un jueves, y por último se representan los resultados correspondientes a interrupciones de 5 días consecutivos tras terminar la primera semana de tratamiento, y tras completar la cuarta semana de tratamiento.

Analicemos, a continuación, estos escenarios por separado.

Caso de control

Como se puede ver en la tabla 4.1, la dosis media necesaria para la esterilización de todas las células proliferativas e hipóxicas en el caso de los agregados virtuales es de 69 Gy, algo menos que las dosis necesaria para las metástasis, 72 Gy, lo que supone una diferencia porcentual relativa del 4.39 %.

Retraso en el inicio

En la tabla 4.1 se puede observar que hay un aumento de la dosis necesaria para la esterilización total de las células de 17.81 y 18.62 % respectivamente para agregados, y de 13.76 y 21.58 % respectivamente para metástasis. Además, también se observa un mayor valor de la dosis necesaria en el caso de las metástasis respecto del agregado, 0.81 y 7.00 % para los casos de retraso en el inicio de 10 y 20 días respecto al caso de control respectivamente.

Día de inicio

Tanto en el caso de un único agregado, como en las metástasis, se requiere de menos dosis para esterilizar todas las células de los MTS simulados cuando se empieza un jueves respecto al comienzo en un lunes, concretamente 3.66 y 4.01 %, tabla 4.1. En este sentido hay que decir que no es un resultado esperable puesto que en general

MODELO COMPUTACIONAL DE ESFEROIDES TUMORALES MULTICELULARES

Esquema	Caso	Agregado	Metástasis	Δd [%]
		d [Gy]	d [Gy]	
Estándar	control	69 (17)	72 (16)	4.39 (0.08)
		δd [%]	δd [%]	
Retraso del inicio	+10 días	17.81 (0.09)	13.76 (0.08)	0.81 (0.08)
	+20 días	18.62 (0.12)	21.58 (0.09)	7.00 (0.19)
Inicio fraccionamiento	jueves	-3.66 (0.11)	-4.06 (0.09)	3.9 (0.2)
Interrupción de 5 días	1° semana	6.72 (0.08)	0.19 (0.07)	-2.0 (0.08)
	4° semana	6.99 (0.10)	6.75 (0.08)	4.16 (0.12)

Tabla 4.1: Resultados del análisis de las simulaciones de agregados y metástasis que han sido irradiados con diferentes esquema de fraccionamiento. d son las dosis promedio que se han necesitado para la esterilización de las células proliferativas e hipóxicas, tanto de los agregados como de las metástasis. En la última columna hemos representado la diferencia porcentual relativa de la dosis promedio, Δd , necesaria para la esterilización de metástasis respecto a la necesaria para los agregados en cada caso analizado. δd es la diferencia porcentual relativa de la dosis promedio necesaria para la esterilización de agregados y metástasis respecto a la necesaria en cada caso de control. Se muestran en primer lugar los resultados del fraccionamiento estándar, que corresponden al caso de control, seguidos de los correspondientes a retrasos de 10 y 20 días respecto al inicio estándar. A continuación el resultado de haber iniciado el fraccionamiento un jueves, y por último se representan los resultados correspondientes a interrupciones de 5 días consecutivos tras terminar la primera semana de tratamiento, y tras completar la cuarta semana de tratamiento. En cada caso se han simulado 150 esferoides. La incertidumbre se ha expresado entre paréntesis con factor de cobertura $k = 1$.

el fraccionamiento contará con mas días de descanso en los que no se irradia el tumor, pero puede deberse a una mayor dispersión de las medidas. Igual que en los casos anteriores, las dosis necesarias para las metástasis son mayores, en concreto un 3.9 %.

Interrupciones

En el caso de la interrupción de 5 días tras la 1° semana del comienzo del fraccionamiento, se necesitan 6.72 y 0.19 % para el caso de los agregados y metástasis

respectivamente, tabla 4.1. Es decir, en el caso de las metástasis, el valor de la media no muestra un necesario aumento de dosis para la esterilización de las células. En este caso, además el resultado muestra un mayor valor de dosis necesario para el agregado, 2.0 %, y no la metástasis como en los casos anteriores.

Si la interrupción tiene lugar en la 4^a semana, requiere de dosis adicional para esterilizar todas las células del MTS que en el caso de una interrupción tras la primera semana, concretamente 6.99 y 6.75 % para los casos de agregado y metástasis respectivamente respecto al caso de control. Para esta situación el porcentaje de dosis necesario para la esterilización total sería de 4.16 % más de dosis en las metástasis respecto a los agregados.

4.2.3 Probabilidad de control tumoral

En la figura 4.3 se muestra la probabilidad de control tumoral (TCP) del caso control y el resto de fraccionamientos analizados, tanto para los agregados (paneles superiores) como las metástasis virtuales (paneles inferiores). En los paneles superiores de la figura se muestran los resultados de los agregados y en los paneles inferiores los de las metástasis.

Los paneles de la izquierda de la la figura 4.3 corresponden a los fraccionamientos en los que se fuerza un retraso de 10 y 20 días respecto al caso control. Podemos apreciar un desplazamiento hacia la derecha de las curvas de puntos en los casos de los retrasos, más evidente en el caso del mayor retraso. Este efecto es apreciable tanto en los agregados como en las metástasis. En los paneles centrales mostramos los resultados cuando se inicia el tratamiento un jueves, observándose una mayor pendiente en las curvas de puntos de los esferoides en los que se inicia el fraccionamiento un jueves, de tal manera que se necesita mayor dosis para alcanzar el mismo valor de control tumoral para los valores de dosis altos. Este resultado parece no estar en acuerdo con un valor de dosis promedio más bajo, pero como hemos comentado entendemos que puede deberse a una mayor dispersión de los datos. El efecto contrario se observa en los valores bajos de dosis. Por último, en los paneles de la derecha se muestran los casos en los que se ha simulado una interrupción tras la primera semana de tratamiento y tras la semana cuarta. En este

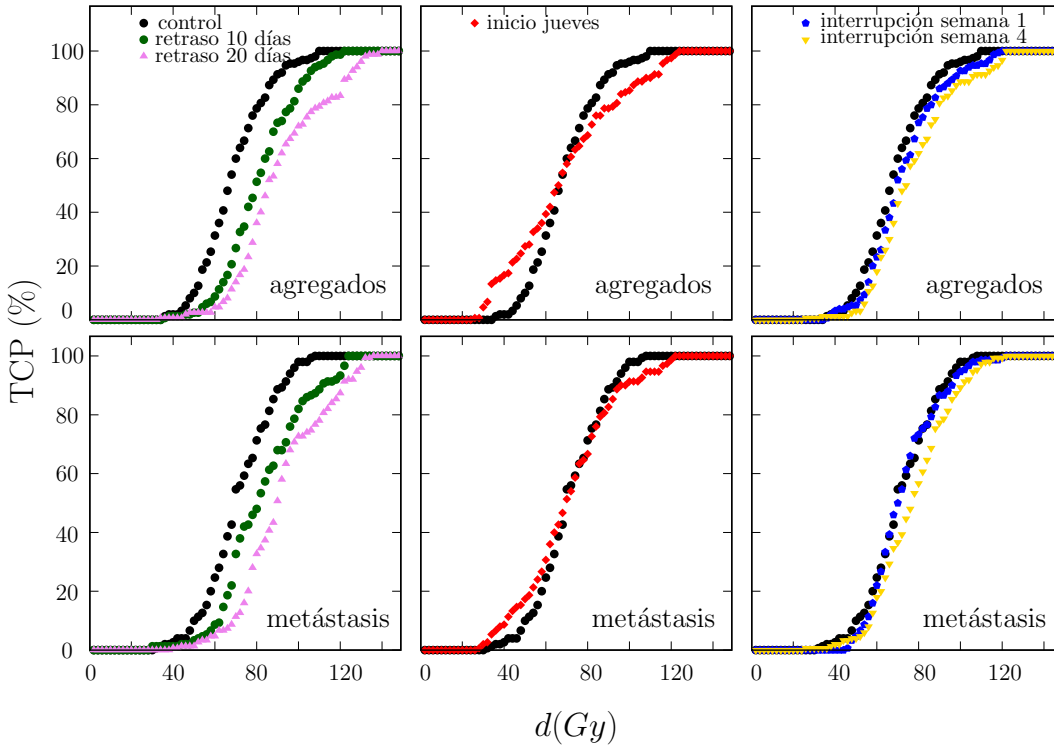


Figura 4.3: Se muestra la TCP del caso control y del resto de fraccionamientos analizados en esta sección, tanto para los agregados (paneles superiores) como las metástasis virtuales (paneles inferiores). Los paneles de la izquierda corresponden a los fraccionamientos en los que se introduce un retraso de 10 y 20 días en el inicio del tratamiento respecto al caso control. En los paneles centrales mostramos los resultados cuando se inicia el tratamiento un jueves, y en los paneles de la derecha los casos en los que se ha simulado una interrupción tras la primera semana de tratamiento y tras la semana cuarta.

caso se observa un desplazamiento hacia la derecha de la curva de puntos de ambos grupos respecto del control, resultando mas evidente para el caso en el que la interrupción se produce la semana cuarta.

Evaluación de modelos

En este capítulo haremos una evaluación de modelos matemáticos clásicos de crecimiento tumoral utilizando el modelo ABM que hemos desarrollado, considerando a los MTS simulados como pseudo-datos experimentales. Para ello ajustaremos estos modelos a los pseudo-datos experimentales de tal manera que podamos analizar su capacidad predictiva. Parte de estos resultados están publicados en [\[Rui21\]](#).

5.1 Modelos clásicos

En los modelos matemáticos clásicos de crecimiento tumoral considerados en el presente trabajo, la variable descrita es el volumen total del tumor, V , en función del tiempo, t . Además, es importante apuntar que el volumen total del MTS es proporcional al número total de células del tumor. Para simplificar el etiquetado, E, G, L, P y B se han utilizado para referirse a los modelos exponencial, Gompertz, logístico, potencial y Bertalanffy, respectivamente, que se describen a continuación.

Modelo exponencial

El modelo exponencial asume que todas las células dentro del MTS proliferan con un ciclo celular de una duración constante [Yor93]. El mismo comportamiento de crecimiento ocurre si se supone que la proliferación celular se debe a una fracción constante del volumen del MTS [Vai82] o si la duración del ciclo celular es una variable aleatoria que sigue una distribución exponencial. La expresión matemática que describe este modelo es:

$$V(t) = V_0 \exp(E \cdot t), \quad (5.1)$$

donde $V_0 \equiv V(t = 0)$ y E es el parámetro del modelo. También podemos expresar este parámetro como:

$$E = \frac{\text{Ln } 2}{T_D}, \quad (5.2)$$

donde T_D es el tiempo de duplicación, que es el tiempo requerido para que se duplique la población celular.

Modelo de Gompertz

La observación de tiempos de duplicación no constantes en algunos tumores llevó a considerar modelos más elaborados. Uno de los más extendidos y aceptados es el modelo de Gompertz, que se ha utilizado para describir el crecimiento de poblaciones en muchas ramas diferentes del conocimiento [Vai82, Bi119, Vag20]. El modelo de Gompertz muestra una forma sigmoidea, es decir, una curva ascendente con un punto de inflexión que converge asintóticamente a un volumen máximo. Esto reproduce cualitativamente la desaceleración del crecimiento observada experimentalmente [Spr93, Vag20] y es consistente con los patrones generales de crecimiento de órganos y organismos. La característica esencial del modelo de Gompertz es que muestra una tasa de crecimiento relativo que se reduce exponencialmente cuando aumenta el volumen. Una de las principales críticas al modelo de Gompertz es que la tasa relativa de crecimiento puede volverse arbitrariamente grande (o lo que es equivalente, que el tiempo de duplicación del volumen puede alcanzar valores arbitrariamente pequeños) para volúmenes tumorales pequeños. En el presente trabajo

se ha utilizado la siguiente expresión para este modelo:

$$V(t) = V_0 \exp \{A [1 - \exp(-a \cdot t)]\} . \quad (5.3)$$

En este modelo V_0 es el volumen del MTS en $t = 0$, A y a son los parámetros del modelo.

Modelo logístico

El modelo logístico también muestra una forma sigmoidea [Vai82, Mar94]. Se basa en el equilibrio de los procesos metabólicos y se define asumiendo que la tasa de crecimiento relativa se reduce linealmente con el volumen. En este trabajo se ha considerado la siguiente expresión analítica:

$$V(t) = \frac{V_0 \cdot B}{V_0 + (B - V_0) \exp(-b \cdot t)} . \quad (5.4)$$

En este caso, los parámetros del modelo son $V_0 \equiv V(t = 0)$, B y b .

Modelo de Von Bertalanffy

Von Bertalanffy (1957) y otros, propusieron derivar las leyes generales que gobiernan el crecimiento orgánico a partir de principios básicos que involucran la energía [Wes01]. Establecieron que la tasa de crecimiento neta debería ser el resultado del equilibrio de síntesis y destrucción, señalando que las tasas metabólicas a menudo siguen la ley de la alometría, es decir, crecen con una potencia del tamaño total del sistema analizado, mientras que las tasas catabólicas son proporcionales a ese volumen total. El modelo de Bertalanffy ya se ha aplicado con éxito para describir el crecimiento tumoral [Gui03, Her11]. La función matemática correspondiente a este modelo es:

$$V(t) = \frac{V_0}{(1 - C)^3} (1 - C \exp(-c \cdot t))^3 . \quad (5.5)$$

Aquí los parámetros del modelo son el volumen en $t = 0$, V_0 , C y c .

Modelo potencial

El modelo potencial se derivó del modelo de Bertalanffy [Von57] y no muestra una fase de saturación clara. El crecimiento del tumor es proporcional al número de células en proliferación, asumiendo una duración constante del ciclo celular. Es un modelo que produce un crecimiento tumoral con una fracción de crecimiento decreciente y, por tanto, una tasa de crecimiento relativo decreciente, lo que también proporciona una descripción en términos de una característica geométrica del tejido proliferativo. La dependencia temporal del volumen en este modelo viene dada por:

$$V(t) = [(V_0)^p - p \cdot P \cdot t]^{1/p} . \quad (5.6)$$

Los parámetros del modelo son V_0 , el volumen en $t = 0$, P y p .

5.2 Métodos estadísticos

Los diversos modelos matemáticos descritos en la sección anterior se han ajustado al conjunto de datos de volumen frente tiempo obtenidos con el ABM que hemos desarrollado para cada uno de los MTS simulados. Estos ajustes se han realizado mediante el método de Levenberg-Marquardt [Pre95], en el que los parámetros del modelo se modifican adecuadamente hasta que es alcanzado el mínimo de la función

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(V_i - V(t_i))^2}{\sigma_i^2} \quad (5.7)$$

En la ecuación anterior t_i indica los valores de tiempo en los que se obtienen los volúmenes de los MTS V_i en la simulación, σ_i es la incertidumbre del volumen correspondiente proporcionada por la simulación y $V(t_i)$ es la estimación del volumen del MTS obtenido con el modelo matemático específico. El resultado del procedimiento proporciona los parámetros que producen el mejor ajuste del modelo a los datos simulados y sus incertidumbres, que se calculan siguiendo los procedimientos habituales [Pre95].

Para medir la bondad del ajuste se ha utilizado la función χ , que se define como:

$$\chi = \frac{\chi^2}{\nu} . \quad (5.8)$$

5.2. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Aquí $\nu = N - n_{\text{par}}$ indica el número de grados de libertad en el ajuste, que se calcula como la diferencia entre el número de datos en la muestra a los que el modelo está ajustado, N , y el número de parámetros del modelo, n_{par} . En este caso $n_{\text{par}} = 2$ para el modelo E y $n_{\text{par}} = 3$ para los otros modelos. La cantidad χ representa el valor χ^2 por grado de libertad y vale la pena señalar que se pueden suponer buenos ajustes si $\chi = 1$ [Pre95].

La configuración inicial fue la misma para todos los esferoides simulados: siete células proliferativas situadas en el centro de la red 3D y en las seis posiciones vecinas mas cercanas. Cada MTS simulado se ha seguido durante 60 días. Así, se obtuvieron conjuntos de volúmenes V_i , $i = 1, 2, \dots, 60$ para cada esferoide.

Un primer análisis consistió en evaluar las capacidades de los modelos matemáticos para reproducir el comportamiento del volumen del MTS simulado en todo el período de crecimiento. Sin embargo, los esferoides mostraron cambios de volumen significativos en los primeros días de crecimiento y los datos fueron demasiado ruidosos. Para evitar problemas numéricos en el procedimiento de ajuste, los modelos matemáticos se ajustaron a los datos V_i en el intervalo $i \equiv [6, 60]$. En este caso, la función que mide la bondad de los ajustes realizados se etiquetó como χ_{all} .

También se analizó la capacidad predictiva de estos modelos. Primero, se estudió el poder predictivo “retrospectivo” ajustando los modelos a los volúmenes V_i , $i = [40, 60]$, y calculando el correspondiente $\chi_{\text{ret}}^{\text{fit}}$; después se calculó la función $\chi_{\text{ret}}^{\text{pr}}$ utilizando el modelo ajustado y los datos V_i , $i = [20, 39]$, que no se incluyeron en el ajuste. De manera similar, la capacidad de predicción “prospectiva” se analizó ajustando el modelo a los datos de volumen MTS simulados V_i , $i = [20, 40]$ y calculando la función correspondiente para los volúmenes V_i , $i = [41, 60]$, que no se incluyeron en el ajuste. De esta forma se obtuvieron las cantidades $\chi_{\text{pro}}^{\text{fit}}$ y $\chi_{\text{pro}}^{\text{pr}}$. Se eligieron conjuntos de 21 valores de volumen consecutivos porque los seguimientos entre 20 y 30 días son habituales en los experimentos con MTS.

Para completar el análisis, se realizó una comparación entre la función χ_{reg} obtenida cuando los distintos modelos se ajustaron a diferentes regiones de los datos de crecimiento de MTS. Se realizaron ajustes a subconjuntos de datos de volumen $\{V_i, i = k, k + 1 \dots k + 19\}$, con k variando entre 6 y 41.

Para todos los ajustes realizados, se calcularon las distribuciones de los valores χ obtenidos para las dos muestras de MTS simuladas consideradas. Además, se obtuvieron los valores promedio correspondientes, $\bar{\chi}$, así como el intervalo de confianza (IC) del 95 % para cada una de estas distribuciones. El IC del 95 % se da como $[l,u]$, con l y u los límites superior e inferior del intervalo.

5.3 Capacidad predictiva

Para tener una estimación inicial de cómo se comportan los distintos modelos matemáticos que hemos considerado en este trabajo, la figura 5.1 muestra los resultados de varios ajustes realizados con tres MTS diferentes de la muestra #1 de la sección 3.3 del capítulo 5. Los volúmenes del MTS simulado se muestran con puntos negros sólidos. El panel (a) muestra los resultados del MTS #278, que es el esferoide para el que el modelo G presenta el mejor ajuste. El resultado de este ajuste se muestra con una línea negra punteada. Los ajustes obtenidos con los modelos L, P y B se muestran con líneas de color verde sólido, azul punteado y rojo punteado, respectivamente. El modelo E se analiza de forma independiente debido a sus características particulares.

En el recuadro, las diferencias entre estos ajustes y los volúmenes simulados se representan con cuadrados negros abiertos, círculos verdes sólidos, cuadrados azules sólidos y círculos rojos abiertos para los modelos G, L, P y B respectivamente. El panel (b) muestra los resultados correspondientes al MTS #179, que es el esferoide que se describe mejor con el modelo L. Finalmente, los resultados mostrados en el panel (c) corresponden al MTS #138; este es el esferoide mejor descrito por los modelos P y B. En la tabla que se muestra en la figura 5.1 se incluyen los valores de χ_{all} obtenidos en todos los ajustes de esta figura.

Los modelos G, P y B proporcionan una descripción razonable de los datos en todos los casos. Sin embargo, es evidente que el modelo L no puede producir un buen ajuste de todos los datos simultáneamente, incluso en el caso del MTS # 179 (ver panel (b)) para el que mejor se ajusta este modelo.

Esto es aún más claro si se observan los datos χ_{all} que se muestran en la tabla incrustada en la figura 5.1. Los valores obtenidos para el modelo G son un orden de magnitud menores que los encontrados en los ajustes de los modelos P y B,

5.3. CAPACIDAD PREDICTIVA

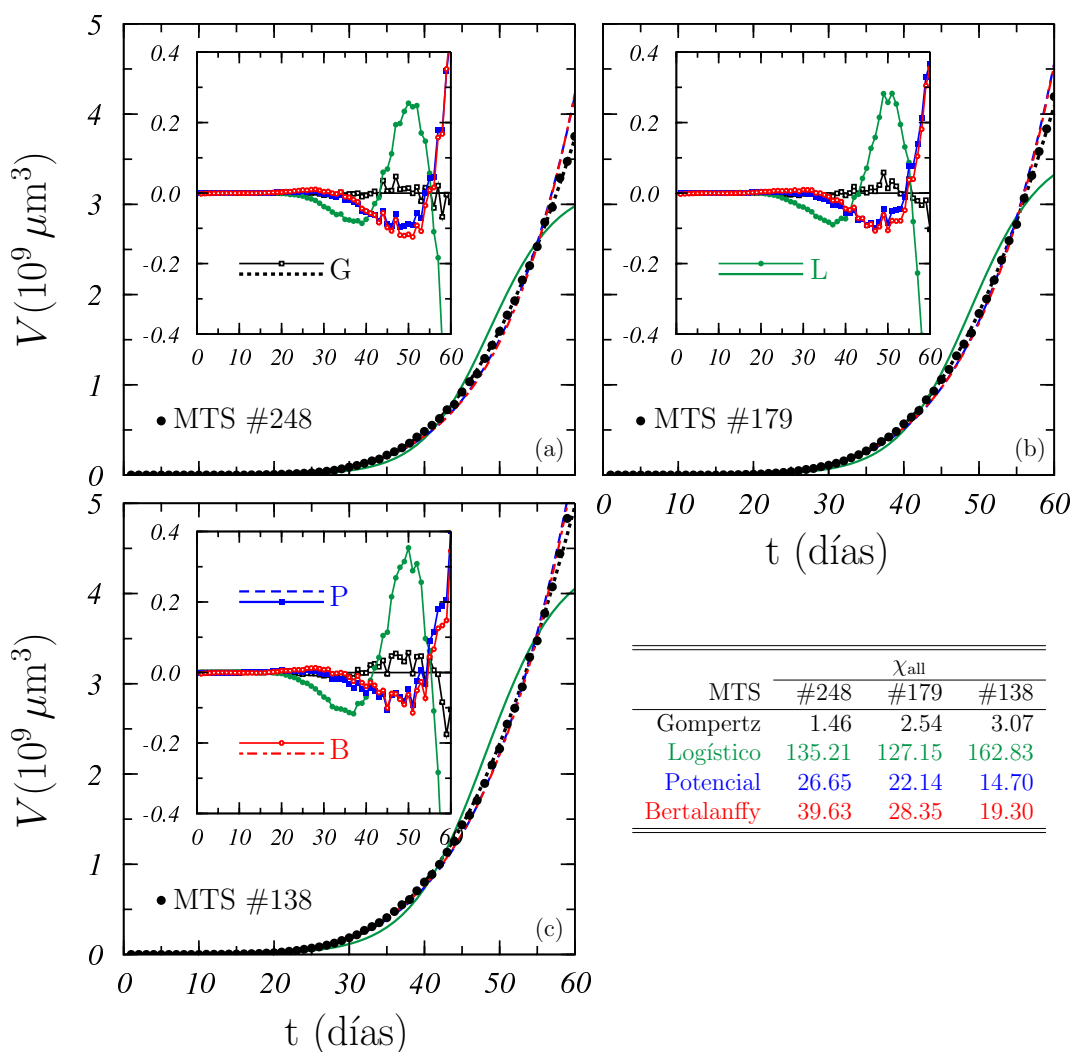


Figura 5.1: Esferoides simulados, #, que muestran los valores más pequeños de χ_{all} para los diversos modelos considerados. Los círculos negros sólidos muestran los volúmenes simulados obtenidos para el MTS #248 (panel (a)), #179 (panel (b)) y #138 (panel (c)) de la muestra #1. Estos son los esferoides que mejor se describen mediante el modelo de Gompertz, el modelo logístico y los modelos potencial y Bertalanffy, respectivamente. En cada panel, los mejores ajustes obtenidos con estos cuatro modelos se muestran con líneas punteadas en negro, verde sólido, azul punteado y rojo punteado, respectivamente. Los recuadros muestran las diferencias entre los mejores ajustes y los datos de volumen simulado. Los valores de la tabla indican los χ_{all} obtenidos en todos los ajustes que se muestran en la figura.

mientras que los encontrados para el modelo L son entre ~ 40 y ~ 100 veces más grandes.

Es interesante discutir aquí sobre el modelo exponencial. La figura 5.2 muestra los resultados obtenidos cuando el modelo E se ajusta a los datos del MTS #1 (simulado en la muestra #1). El primer punto que debe tenerse en cuenta es que este modelo no puede dar una descripción razonable de los datos de volumen. Como se puede ver en el recuadro (donde se muestra una gráfica semilogarítmica), estos datos no muestran una pendiente constante como lo hace el modelo E. Como consecuencia, solo se pueden describir conjuntos parciales de datos. En este caso, los ajustes que se muestran son los obtenidos cuando se eligen tres intervalos de datos diferentes, [10, 40] días, [40, 60] días y [30, 50] días.

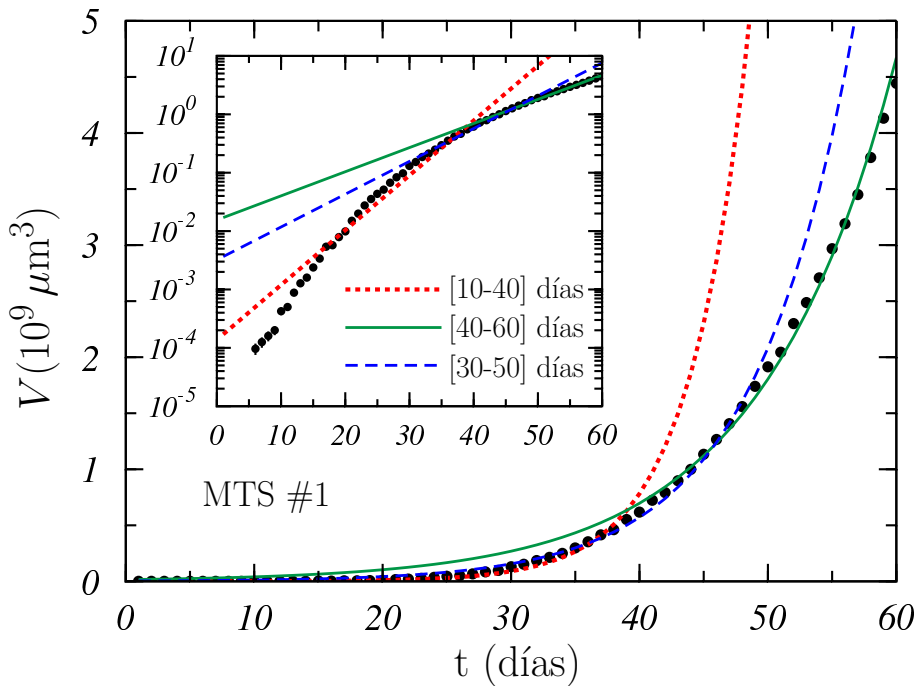


Figura 5.2: Ajuste del modelo exponencial al MTS #1 de la muestra #1 de la sección 3.3. Los círculos negros sólidos indican los volúmenes de este esferoide a lo largo del período de tiempo estudiado. Se obtuvieron curvas de puntos rojos, verde sólido y azul discontinuo ajustando los intervalos de tiempo [10, 40] días, [40, 60] días y [30, 50] días, respectivamente. El recuadro muestra la gráfica semilogarítmica correspondiente para enfatizar el comportamiento del volumen del MTS.

Aunque los datos en un período de tiempo dado pueden reproducirse muy bien, el modelo E no describe por completo los valores de volumen fuera de ese período. El hecho de que los datos experimentales de crecimiento tumoral o MTS estén generalmente disponibles durante períodos de tiempo relativamente cortos (debido a las obvias dificultades inherentes al seguimiento experimental de muestras), puede ser una de las principales razones por las que este modelo ha sido ampliamente utilizado para describir el crecimiento de tumores.

La figura 5.3 muestra las distribuciones de los valores χ_{all} obtenidos en el análisis realizado y que acabamos de describir. En este caso, los modelos matemáticos se han ajustado a todos los conjuntos de datos de volumen obtenidos en las simulaciones. Los ajustes se han realizado a dos conjunto de datos, uno en el que las simulaciones se hicieron con valores constantes de los parámetros, y otro en el que se introdujo una variabilidad del 10 % en los parámetros del ABM para reproducir mejor las observaciones experimentales, como se comentó extensamente en el apartado 3.3. Los ajustes a los datos en la muestra #1 (aquellos sin variabilidad en los parámetros ABM) produjeron las distribuciones mostradas con colores oscuros, mientras que aquellos trazados con colores claros (y delineados en negro) corresponden a la muestra #2 en la cual una variabilidad del 10 % en los valores de los parámetros del ABM se incluyó en las simulaciones. Se puede encontrar un resumen de estos resultados en la tercera columna de la tabla 5.1 donde se indican los valores promedio $\bar{\chi}_{\text{all}}$ y el intervalo de confianza (IC) del 95 % de las distribuciones que se muestran en 5.3. Las cifras se dan para los cuatro modelos y las dos muestras de MTS.

5.3.1 Análisis

En relación con lo descrito anteriormente en esta sección, destacaremos los siguientes hechos:

- Para todos los modelos, las distribuciones correspondientes a la muestra #2 eran más anchas, como se esperaba, que las de la muestra #1. Esto se ve en la figura 5.3 y también en la tabla 5.1. Los tamaños del IC del 95 % citados en la tabla para la muestra #2 son mayores que los de la muestra #1 por factores entre ~ 2 para el modelo G y ~ 5 para el modelo P. Además, el

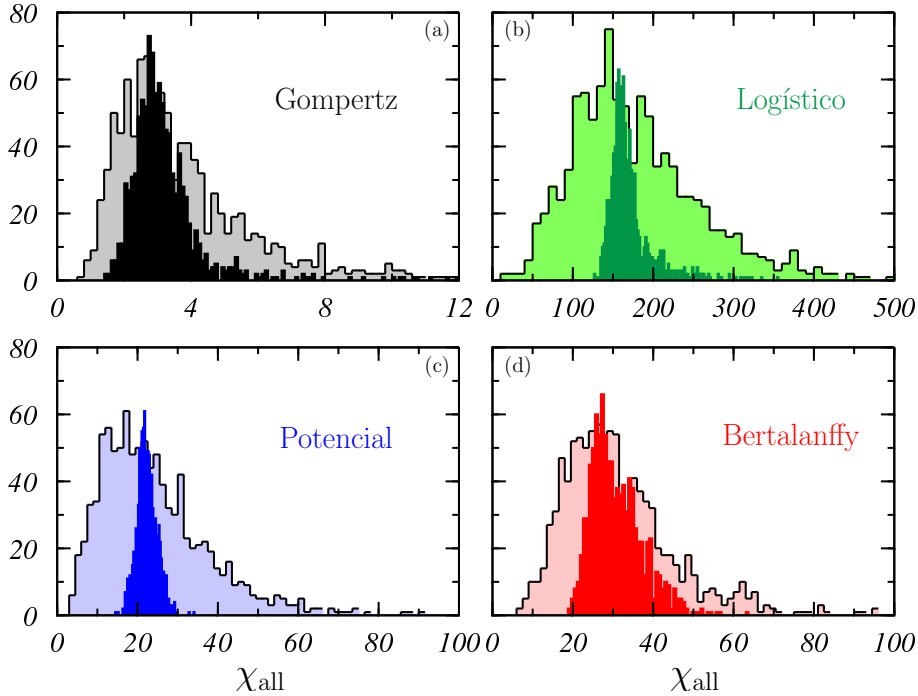


Figura 5.3: Histogramas de distribución de los valores de χ_{all} obtenidos en los ajustes de los cuatro modelos matemáticos considerados a todos los MTS simulados en las muestras #1 (colores oscuros y sin variabilidad en los parámetros del ABM) y #2 (colores claros y variabilidad del 10 % en los parámetros del ABM) de la sección 3.3.

$\bar{\chi}_{all}$ encontrado para la muestra #2 es mayor que el correspondiente para la muestra #1, el aumento oscila entre 0.2 % y 17 % para el modelo G y el modelo B, respectivamente.

La variabilidad en los parámetros del ABM que se consideró en la generación de la muestra #2 produce formas de crecimiento más diferenciadas entre sí del MTS, y esto da como resultado mejores ajustes (aquellos con valores χ_{all}^2 más pequeños) y peores (aquellos con ajustes mayores de χ_{all}^2) independientemente del modelo matemático específico considerado.

- La menor diferencia entre las distribuciones de #1 y #2 son para G y B.
- En general, los mejores ajustes para todas las curvas de crecimiento fueron proporcionados por el modelo G. Como se muestra en la tabla 5.1, los $\bar{\chi}_{all}$

5.3. CAPACIDAD PREDICTIVA

obtenidos para este modelo son un orden de magnitud menor que los correspondientes a los otros modelos considerados. En el caso de la muestra #1, el IC del 95 % obtenido para el modelo G está claramente por debajo de los encontrados para los otros modelos. Para la muestra #2, existe una ligera superposición entre el IC de los modelos G y P.

- Se notan los grandes valores χ_{all} obtenidos para el modelo L. Los valores de $\bar{\chi}_{\text{all}}$ están por encima de 170 en ambas muestras y el IC del 95 % respectivo comienza en 139 y 56, respectivamente. Esto señala, nuevamente, el hecho ya discutido en relación con la figura 5.1 acerca de las dificultades de este modelo para describir el crecimiento total de MTS.
- Una curiosidad de estos resultados es que todas las distribuciones están sesgadas hacia la derecha (a un alto χ_{all}), excepto la encontrada para el modelo P en el caso de la muestra #1 donde se observa un comportamiento casi gaussiano.

Tabla 5.1: Valores medios e IC 95 % de las distribuciones χ obtenidas en los distintos ajustes realizados en el presente estudio.

muestra	modelo	todos los datos		retrospectivo		prospectivo	
		χ_{all}	$\chi_{\text{ret}}^{\text{fit}}$	$\chi_{\text{ret}}^{\text{PR}}$	$\chi_{\text{pro}}^{\text{fit}}$	$\chi_{\text{pro}}^{\text{PR}}$	
#1	G	3.23	1.09	29.08	1.04	50.49	
		[1.89 : 6.29]	[0.51 : 1.82]	[5.47 : 68.67]	[0.49 : 1.87]	[3.78 : 126.70]	
	L	171.49	1.77	478.86	3.58	1050.98	
		[139.06 : 258.91]	[0.81 : 2.95]	[360.00 : 613.40]	[1.97 : 5.51]	[956.80 : 1140.00]	
P	22.39	2.56	64.59	2.35	340.05		
	[17.50 : 27.41]	[1.34 : 4.18]	[44.49 : 87.20]	[1.12 : 3.91]	[212.30 : 501.50]		
B	30.94	1.08	22.99	1.40	304.76		
	[21.74 : 46.02]	[0.50 : 1.78]	[4.74 : 48.63]	[0.64 : 2.52]	[92.49 : 694.50]		
#2	G	3.79	1.11	29.76	1.11	58.79	
		[1.29 : 9.83]	[0.45 : 2.19]	[1.46 : 94.18]	[0.44 : 2.12]	[1.35 : 183.90]	
	L	179.48	1.80	480.19	3.75	1061.00	
		[56.72 : 378.29]	[0.74 : 3.55]	[147.10 : 959.40]	[1.14 : 8.28]	[467.80 : 1833.00]	
P	24.17	2.60	65.14	2.65	340.71		
	[6.22 : 57.37]	[1.12 : 4.85]	[15.11 : 139.60]	[0.71 : 6.36]	[54.31 : 835.20]		
B	31.02	1.08	23.37	1.44	315.34		
	[11.46 : 64.49]	[0.46 : 2.17]	[4.18 : 52.42]	[0.57 : 2.76]	[67.76 : 836.80]		

5.3.2 Prospección y retrospección

El poder predictivo de los modelos se analizó observando su capacidad, tras ajustarlos para reproducir una parte de las curvas de crecimiento, para describir los datos de volumen restantes. Las distribuciones de χ obtenidas se muestran en las figuras 5.4 y 5.5 y se resumen en la tabla 5.1 en términos de los valores correspondientes de $\bar{\chi}$ y de IC del 95 %. En las dos figuras, las distribuciones que se muestran en los paneles de la izquierda son las que se encuentran en los ajustes, mientras que las calculadas para los datos predichos se trazan en los paneles de la derecha. Nuevamente, las distribuciones mostradas con colores claros corresponden a la muestra #2, en la que se tiene en cuenta variabilidad en los parámetros, mientras que aquellas con colores oscuros se obtuvieron para la muestra #1 en la que no se considera esa variabilidad.

Analicemos los resultados presentados en las figuras 5.4 y 5.5:

- Los mejores ajustes son ahora mucho mejores que los encontrados cuando se incluyeron todos los datos de volumen. El máximo $\bar{\chi}^{\text{fit}}$ fue $\bar{\chi}_{\text{pro}}^{\text{fit}} = 3.75$, que corresponde al modelo L. Estos valores relativamente bajos se deben al hecho de que el número de datos ajustados es ahora 21 en lugar de los 55 considerados antes.

Vale la pena señalar que también los límites bajos de χ^{fit} con un IC del 95 % fueron mucho más bajos que en el caso de χ_{all} . En todos los casos los valores obtenidos son cercanos a 1, con la única excepción del 1.97 encontrado para el modelo L en la predicción prospectiva (ver tabla 5.1). Esto significa que, *a priori*, todos los modelos matemáticos podrían producir una descripción razonable de una sección de datos más o menos corta de un esferoide dado. Sin embargo, como se indica en la figura 5.3, no todos los modelos pueden dar una descripción de la curva de crecimiento completa de algunos de los MTS simulados incluidos en las muestras. En este sentido, es importante señalar que, en la práctica, estos modelos matemáticos se ajustan a un pequeño número de datos de volumen experimental cercanos en el tiempo y para pocos esferoides o tumores en la muestra, y que el modelo que mejor se ajusta a los datos existentes puede no ser el que mejor describe el crecimiento posterior [Mur16].

5.3. CAPACIDAD PREDICTIVA

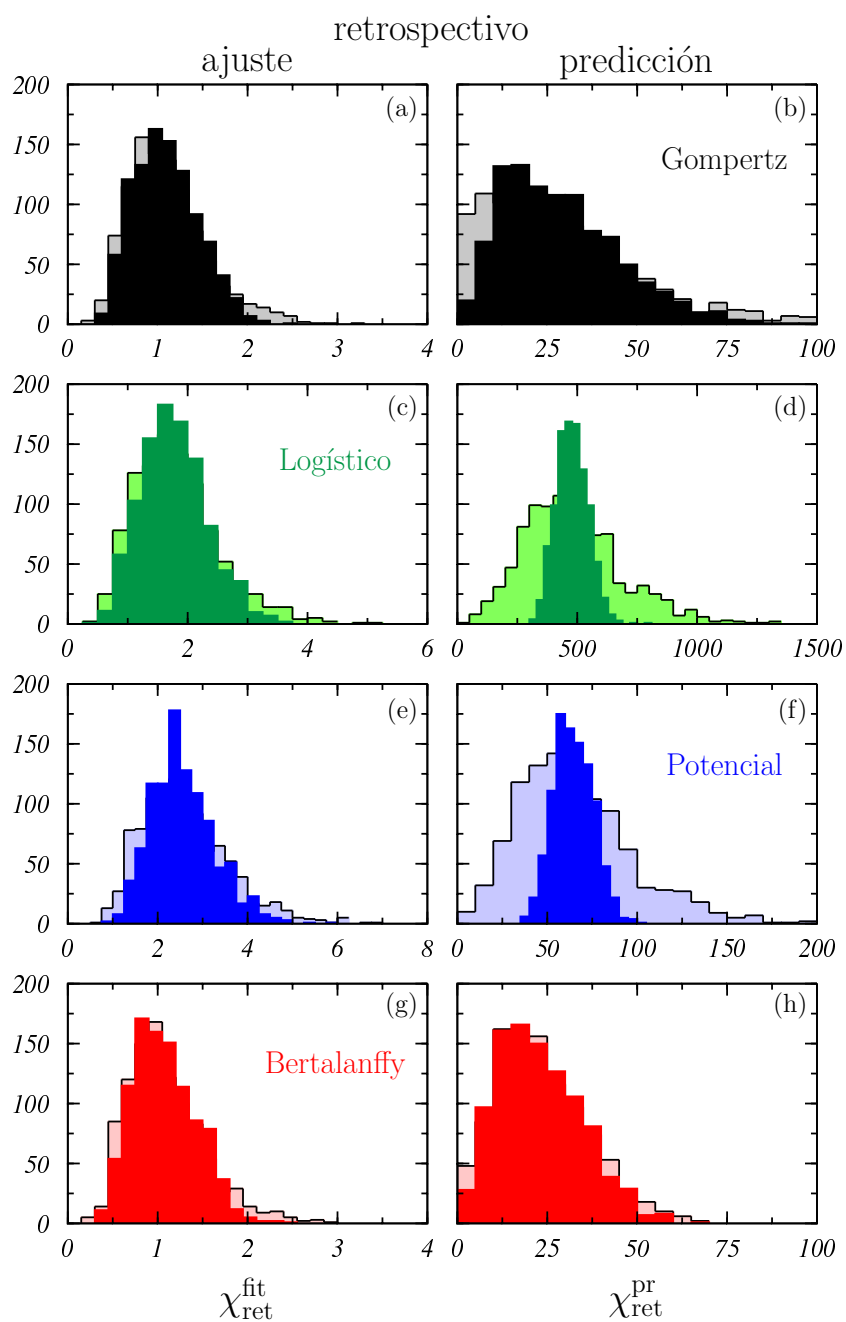


Figura 5.4: Histogramas de distribución de los valores de χ_{ret} obtenidos en los ajustes retrospectivos de los cuatro modelos matemáticos considerados para los MTS simulados en las muestras #1 (colores oscuros) y #2 (colores claros).

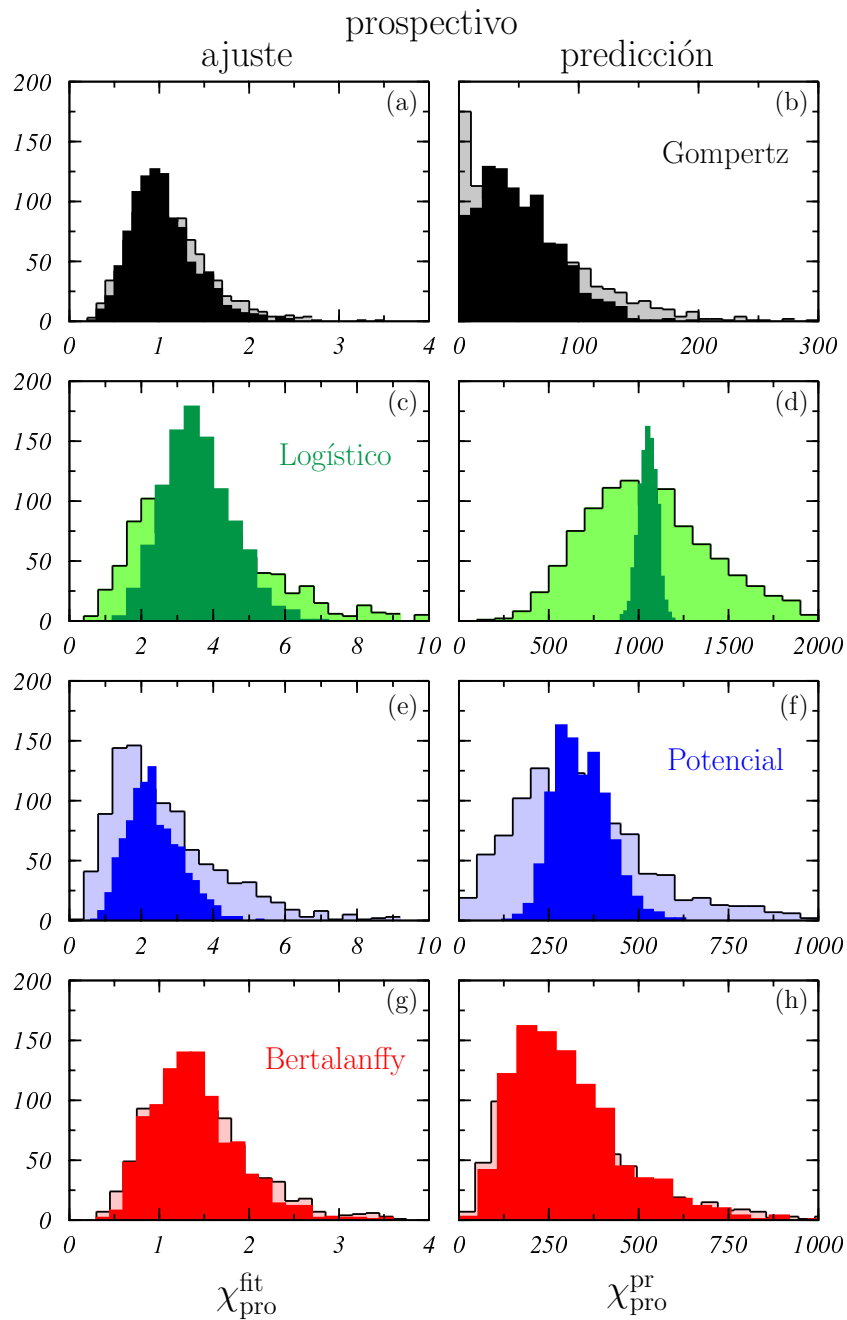


Figura 5.5: Histogramas de distribución de los valores de χ_{pro} obtenidos en los ajustes prospectivos de los cuatro modelos matemáticos considerados para los MTS simulados en las muestras #1 (colores oscuros) y #2 (colores claros).

5.3. CAPACIDAD PREDICTIVA

- Al contrario de lo observado en la figura 5.3, las distribuciones χ obtenidas para la muestra #2 son bastante similares a las obtenidas para la muestra #1. Esto está corroborado por los resultados citados en la tabla 5.1 y puede indicar que el ingrediente principal que controla los resultados del ajuste es el pequeño número de puntos cercanos en el tiempo que se van a ajustar.

Una excepción a esto parece ocurrir para los modelos L y P en el caso de los ajustes prospectivos (ver figuras 5.5 (c) y (e)). El posible efecto debido a la región de datos ajustados se analiza a continuación.

- Como se puede comprobar comparando los paneles de la derecha en las figuras 5.4 y 5.5, los modelos son más eficientes en las predicciones retrospectivas que en las predicciones prospectivas. Como se puede observar, las distribuciones obtenidas en el último caso se extienden a valores que son al menos dos veces mayores que los resultantes para el primero. La mejor situación es la del modelo B en el que la relación $\bar{\chi}_{\text{pro}}^{\text{pr}}/\bar{\chi}_{\text{ret}}^{\text{pr}} \sim 1$. Esta razón es ~ 2 para los modelos G y L y ~ 5 para el modelo P.

El poder predictivo retrospectivo de los modelos estudiados puede ser de interés clínico cuando se analiza la respuesta de los tumores a los tratamientos. De hecho, la evolución de la regresión de los tumores irradiados podría ser similar a mirar hacia atrás en el crecimiento del tumor, y lo que se ha observado en el presente análisis podría proporcionar pistas significativas al respecto. Obviamente, los tratamientos pueden perturbar las tendencias de crecimiento, por lo que resultaría conveniente analizar el efecto de la irradiación en el ABM.

- Los mejores resultados en lo que se refiere a predicciones retrospectivas fueron proporcionados por el modelo B, para el cual el promedio $\bar{\chi}_{\text{ret}}^{\text{pr}} \sim 23$ (ver tabla 5.1). Se encontró un valor ligeramente mayor, ~ 30 , para el modelo G, mientras que para los otros dos modelos se logran valores mucho más altos, en particular para el modelo L, $\bar{\chi}_{\text{ret}}^{\text{pr}} \sim 480$.
- El modelo G parece ser el más robusto en lo que se refiere a la capacidad predictiva prospectiva. En este caso $\bar{\chi}_{\text{pro}}^{\text{pr}} < 60$ (un poco más grande para la muestra #2 que para la muestra #1). Para los modelos P y B este promedio fue

de ~ 300 , mientras que para el modelo L se encontraron valores superiores a 1000.

- En cualquier caso, los valores obtenidos tanto para χ_{pro}^{pr} y χ_{ret}^{pr} indican que las capacidades predictivas de los modelos aquí considerados son discretas.

Para finalizar el análisis del desempeño de los distintos modelos matemáticos con respecto a la descripción del MTS simulado, se estudió la bondad de los ajustes cuando se realizan en diferentes regiones de las curvas de crecimiento. La figura 5.6 muestra los valores promedio de χ_{reg} y el IC del 95 % correspondiente obtenido para los cuatro modelos matemáticos en función del día inicial de la región de datos ajustada (que incluye 20 datos consecutivos). Los círculos sólidos y las barras de incertidumbre corresponden a la muestra #1, mientras que las curvas sólidas y las áreas de colores claros representan la muestra #2.

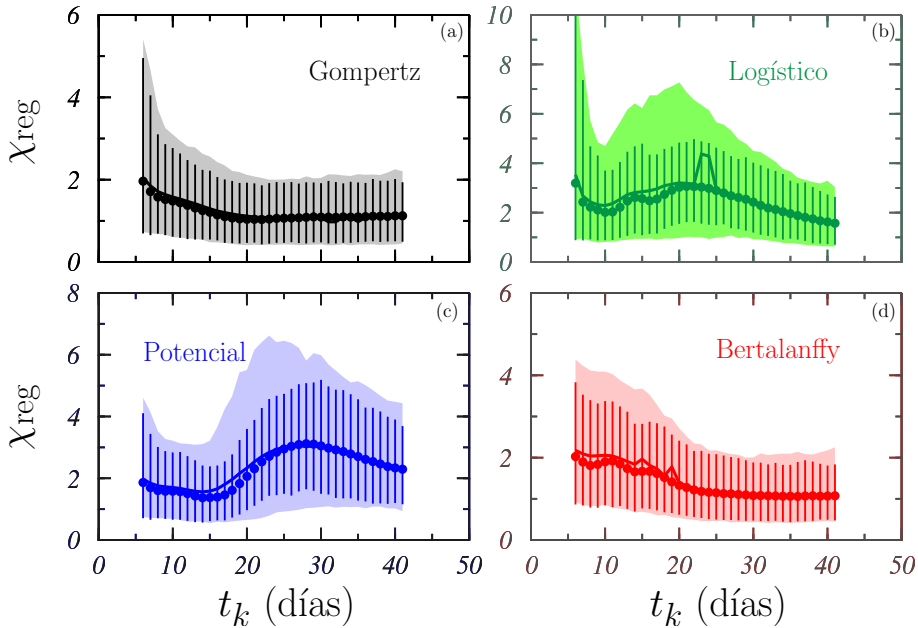


Figura 5.6: Valores de χ_{reg} obtenidos en los ajustes de los cuatro modelos matemáticos considerados a los datos de volumen MTS simulados V_i , $i = k, \dots, k + 19$ con k variando entre 6 y 41. Los círculos sólidos representan los valores promedio y las barras de incertidumbre indican el correspondiente IC del 95 % calculado para los 1000 esferoides en la muestra #1. Las curvas sólidas y las áreas de color claro indican lo mismo pero para la muestra #2.

Del análisis de la figura 5.6 pueden extraerse los siguientes resultados:

- Se encontraron resultados similares para los modelos G y B que mostraron valores promedio que tienden a 1 al aumentar t_k . El primero pareció ser ligeramente más robusto en este sentido, mostrando un comportamiento menos ruidoso para $t_k < 20$ días.
- Para los modelos L y P se produjo una dependencia no despreciable de la región de datos ajustada. Vale la pena señalar el comportamiento fluctuante con t_k observado en ambos casos.
- Esto también hace que las diferencias entre las dos muestras estudiadas sean mayores para los modelos L y P que para los modelos G y B.

5.4 Discusión

El análisis que se ha realizado puede ayudar a comprender cómo evolucionan los tumores, en particular los tumores pequeños que podrían quedar como residuos quirúrgicos o micro-metástasis, antes o durante la radioterapia; también en la investigación de los efectos provocados por los retrasos e interrupciones que suelen ocurrir a lo largo del tratamiento. En el caso de retrasos en el inicio de la radioterapia, el poder predictivo prospectivo de los modelos es de gran interés. Para las interrupciones, tanto la capacidad de retrosección, si se conserva la tendencia de crecimiento, como la proyección son relevantes. Estos problemas se pueden analizar con el modelo ABM y luego se podría ver si los modelos clásicos son capaces de describir lo que sucede en estos casos.

En principio, es posible encontrar un número determinado (reducido) de esferoides de modo que uno de los modelos analizados en este capítulo pueda ajustarse para describir correctamente una parte específica de sus curvas de crecimiento. Sin embargo, este modelo ajustado no describe adecuadamente ni los datos de volumen restantes de los esferoides incluidos en el ajuste ni los datos correspondientes a otros esferoides en la muestra. Por lo general, los experimentos de MTS o crecimiento tumoral involucran a bastantes individuos que son seguidos durante un

período relativamente corto y esto puede explicar el “éxito” de algunos modelos matemáticos en la descripción de las curvas de crecimiento correspondientes.

El modelo E merece un comentario particular. Como se ha demostrado, este modelo puede reproducir las curvas de crecimiento solo cuando los datos considerados para el ajuste se limitan a un período de tiempo corto. Por otro lado, sus capacidades predictivas son muy deficientes. Sin embargo, en las aplicaciones clínicas de la radiobiología tumoral en radioterapia, solo se utiliza en la práctica el modelo de crecimiento exponencial. Un ejemplo relevante de esto es el manejo de las interrupciones y retrasos que ocurren en la radioterapia fraccionada, un problema clínico importante por su efecto sobre la efectividad del tratamiento [Roy19]. En este caso, el modelo de crecimiento exponencial se utiliza para tener en cuenta el aumento de las células tumorales cuando se amplía el tiempo total de tratamiento y para estimar los efectos de esta prolongación, como única solución, se incluye la llamada *tiempo de inicio*. Con esto se intenta describir, en esencia, el período aparente de lento crecimiento de los tumores que va seguido de un aumento en la tasa de proliferación [Wit88], y que se produce como consecuencia de la reducción de las células tumorales producida por la radiación después de unas semanas desde el inicio del tratamiento [Fow10].

Es evidente que los MTS son sistemas mucho más simples que los tumores *in-vivo*. Aunque los MTS son capaces de reproducir las primeras etapas del crecimiento de los tumores reales, no incluyen varios de los elementos que más influyen en el crecimiento de estos últimos. Los resultados de este trabajo muestran que el modelo E, incluso para un “abordaje” tan simple, es claramente ineficaz para predecir la proliferación tumoral y que, por el contrario, otros modelos, como el modelo G, constituyen un escenario mucho más adecuado. El modelo G también incluye, de forma sencilla, la variación de la tasa de crecimiento con el tamaño del tumor y, por tanto, puede dar cuenta del fenómeno de repoblación acelerada. Nuestros resultados indican claramente que debería abandonarse el modelo E en favor del modelo G en aplicaciones clínicas, de manera que se produzcan estimaciones más realistas de las cantidades calculadas.

Conclusiones y perspectivas

6.1 Conclusiones

- i. En este trabajo se ha desarrollado y validado un modelo ABM computacional que describe el crecimiento de MTS sin irradiar y su evolución tras ser irradiados con diferentes dosis conservando en todo momento la forma compacta de los esferoides simulados, de forma similar al caso experimental.
- ii. La simplicidad del modelo permite simular todo el historial de los MTS en tiempos cortos de computación o CPU, y evita el soporte computacional requerido por otros modelos matemáticos complejos como los basados en ecuaciones diferenciales. Utilizando nuestro enfoque, el crecimiento del esferoide se puede seguir durante períodos de tiempo significativamente largos, evitando así las limitaciones inherentes al experimento
- iii. La variabilidad estadística encontrada en la simulación de cada grupo de esferoides irradiados y no irradiados permitió dar cuenta de lo observado en los experimentos de MTS. La variación adicional provocada al muestrear los valores de los parámetros del modelo, dentro de distribuciones gaussianas de diferentes anchuras, permitió obtener una muestra de esferoides que reproducía mucho mejor algunos de los detalles experimentales. Esto también

permitió identificar los parámetros de simulación que más influyen en los resultados globales: la probabilidad de división y el factor de escala. Hay que añadir que la fracción de supervivencia obtenida mediante los esferoides simulados irradiados está en buen acuerdo con los resultados experimentales.

- iv. La mejor descripción de todos los datos de crecimiento fue proporcionada por el modelo de Gompertz, que mostró un valor de $\bar{\chi}_{all}$ un orden de magnitud más pequeño que los otros modelos. En lo que se refiere al poder predictivo, los modelos de Gompertz y Bertalanffy proporcionaron las mejores predicciones retrospectivas y el modelo de Gompertz fue el que dio las mejores predicciones prospectivas. Los modelos logístico y potencial tuvieron dificultades para ajustar los datos, incluso cuando se consideraron subconjuntos restringidos.
- v. El modelo de Gompertz debe considerarse en las aplicaciones clínicas en lugar del modelo exponencial que se utiliza actualmente para estudiar la respuesta clínica de los distintos tipos de tumores.
- vi. El modelo desarrollado ha permitido analizar otros aspectos y situaciones clínicas de interés, como el caso de la evolución de metástasis avasculares y su desarrollo tras irradiación, así como su comparación con situaciones en las que se parte del mismo número de células pero dispersas, y no formando un solo agregado inicial.
- vii. El modelo también ha resultado útil para comparar las ventajas de unos esquemas de fraccionamiento sobre otros. La importancia clínica de estas ventajas radica en su influencia en la probabilidad de control tumoral. El modelo nos permitirá valorar nuevos esquemas de hipofraccionamiento o de intensidad modulada.
- viii. Por último, con el modelo que proponemos podríamos simular el comportamiento del tumor ante esquemas de fraccionamiento o interrupciones del mismo que no pueden analizarse mediante ensayos clínicos por cuestiones éticas, ya que supondría un perjuicio en la salud de los pacientes sometidos a estudio.

6.2 Perspectivas

A pesar de que, como ya hemos comentado, nuestro modelo goza de una gran simplicidad, esta no impone ninguna limitación para abordar una amplia variedad de problemas. Un ejemplo estaría relacionado con el análisis del efecto producido por la radiación ionizante en el crecimiento de los esferoides, visto en el capítulo [2](#), ya que, como nuestro modelo tiene una base celular, los efectos de la irradiación se pueden evaluar controlando cómo interactúan las radiaciones ionizantes con las células individuales, existiendo incluso la posibilidad de considerar células irradiadas con sensibilidades celulares diferentes.

Otros ejemplos de aplicación son el estudio de la evolución de células dispersas en las que se forman varios agregados de células en lugar de un solo esferoide, como se ha estudiado en el capítulo [5](#), o el impacto en los tratamientos cuando se producen interrupciones de la radioterapia fraccionada, retrasos en los inicios u otras situaciones que también se han abordado en el mismo capítulo. Las deformaciones de esferoides debidas a límites anatómicos se pueden incorporar fácilmente al modelo; también se pueden introducir estados de las células distintos de los ya incluidos, junto con nuevas reglas que gobiernen la dinámica de los cambios de estado, sin modificaciones complejas debido a la estructura modular del código del propio modelo. Así, se podría incluir, de forma sencilla, la existencia de estroma, el medio de cultivo o diversos grados de hipoxia sin necesidad de recurrir a modelos experimentales tales como el cultivo en matrigel o microtejidos más complejos.

La angiogénesis es otro fenómeno que se puede simular de forma sencilla identificando los nodos de la cuadrícula donde aparecen los vasos sanguíneos (siguiendo las reglas correspondientes) y considerando estas posiciones a la hora de calcular la distancia entre células y nutrientes. Así mismo, se podría considerar el efecto *bystander* que quedaría modelado por una función de distribución.

Las aplicaciones clínicas del modelo que proponemos arrojan unas perspectivas muy interesantes. Sabemos que las interrupciones de los tratamientos no son tan infrecuentes como desearíamos y que estas repercuten en el control de la enfermedad. Así, sea por la toxicidad, sea por el sistema, sea por retrasos en el inicio y día de la semana de comienzo o por cualquier otro motivo, estas interrupciones obligan a recalcular la dosis de los tratamientos para que el impacto en la probabilidad de

MODELO COMPUTACIONAL DE ESFEROIDES TUMORALES MULTICELULARES

control tumoral sea el mínimo posible. En este sentido se ha podido cuantificar la diferencia en la TCP de tratamientos comenzados un lunes frente al comienzo de los mismos un jueves, dos días antes de un descanso en la irradiación de dos días consecutivos, así como la diferencia en la TCP de tratamientos interrumpidos a su inicio o en su parte final. Con el modelo que proponemos podríamos simular el comportamiento del tumor ante esquemas de fraccionamiento e interrupciones que no pueden analizarse mediante ensayos clínicos por cuestiones éticas, ya que supondría un perjuicio en la salud de los pacientes sometidos a estudio.

Bibliografía

- [Al01] Al-Dweri, F.M.O., Guirado, D., Lallena, A.M., 2001. Simulación de programas fraccionados de radioterapia. Estudio del control tumoral y del efecto de la interrupción del tratamiento. *Rev Fis Med* 2, 17-20. [5](#)
- [Al04] Al-Dweri, F.M.O., Guirado, D., Lallena, A.M., Pedraza, V., 2004. Effect on tumour control of time interval between surgery and postoperative radiotherapy: an empirical approach using Monte Carlo Simulation. *Phys Med Biol* 49, 2827-39. [5](#)
- [Alf14] Alfonso, J., Jagiella, N., Núñez, L., Herrero, M.A., Drasdo, D., 2014. Estimating dose painting effects in radiotherapy: a mathematical model. *PLoS ONE* 9:e89380. [2](#)
- [Alf18] Alfonso, J., Parsai, S., Joshi, N., Godley, A., Shah, C., Koyfman, S.A., Caudell, J.J., Fuller, C.D., Enderling, H., Scott, J.G., 2018. Temporally feathered intensity-modulated radiation therapy: A planning technique to reduce normal tissue toxicity. *Med Phys* 45, 3466–74. [2](#)
- [Alf19] Alfonso, J., Poleszczuk, J., Walker, R., Kim, S., Pilon-Thomas, S., Conejo-Garcia, J.J., Soliman, H., Czerniecki, B., Harrison, L.B., Enderling, H., 2019. Immunologic consequences of sequencing cancer radiotherapy and surgery. *JCO Clin Cancer Inform.* [2](#)
- [Alt15] Altrock, P.M., Liu, LL., Michor, F., 2015. The mathematics of cancer: integrating quantitative models. *Nat Rev Cancer* 15, 730–45. [1](#)

BIBLIOGRAFÍA

- [An04] An, G., 2004. In silico experiments of existing and hypothetical cytokine-directed clinical trials using agent-based modeling. *Crit Care Med* 32, 2050-60. [5](#)
- [And00] Anderson, A.R.A., Chaplain, M.A.J., Newman, E.L., Steele, R.J.C., Thompson, A.M., 2000. "Mathematical Modelling of Tumour Invasion and Metastasis". *Comput Math Methods Med* 2, 490902. [1](#)
- [And06] Anderson, A.R., Weaver, A.M., Cummings, P.T., Quaranta, V., 2006. Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. *Cell* 127, 905-15. [1](#)
- [And09] Anderson, A.R., Hassanein, M., Branch, K.M., Lu, J., Lobdell, N.A., Maier, J., Basanta, D., Weidow, B., Narasanna, A., Arteaga, C.L., Reynolds, A.B., Quaranta, V., Estrada, L., Weaver, A.M., 2009. Microenvironmental independence associated with tumor progression. *Cancer Res* 69, 8797–806. [2](#)
- [Ara03] Aranda, M., 2003. Los esferoides multicelulares como test predictivo de radiosensibilidad y radiocurabilidad tumoral. PhD Thesis. University of Granada (Spain). [8](#), [30](#), [34](#)
- [Ara04] Araujo, R., McElwain, D., 2004. A history of the study of solid tumour growth: the contribution of mathematical modelling. *Bull Math Biol* 66, 1039–91. [1](#)
- [Bar03] Barbolosi, D., Freyer, G., Ciccolini, J., Iliadis, A., 2003. Optimisation de la posologie et des modalités d'administration des agents cytotoxiques à l'aide d'un modèle mathématique. *Bulletin du Cancer* 90, 167-75. [3](#)
- [Bat00] Bates, R.C., Edwards, N.S., Yates, J.D., 2000. Spheroids and cell survival. *Critical Rev Oncol Hematol* 36, 61-74. [7](#)
- [Bel01] Bell, H.S., Whittle, I.R., Walker, M., Leaver, H.A., Wharton, S.B., 2010. The development of necrosis and apoptosis in glioma: experimental findings using spheroid culture systems. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27, 291-304. [26](#)

- [Ben14] Benzekry, S., Lamont, C., Beheshti, A., Tracz, A., Ebos, J.M.L., Hlatky, L., Hahnfeldt, P., 2014. Classical mathematical models for description and prediction of experimental tumor growth. *PLOS Comput Biol* 10, e1003800. [1](#), [3](#), [5](#), [8](#)
- [Ber10] Bertuzzi, A., Bruni, C., Fasano, A., Gandolfi, A., Papa, F., Sinisgalli, C., 2010. Response of tumor spheroids to radiation: modeling and parameter estimation. *Bull Math Biol* 72, 1069-91. [4](#)
- [Bil19] Bilous, M., Serdjebi, C., Boyer, A., Tomasini, P., Pouypoudat, C., Barbolosi, D., Barlesi, F., Chomy, F., Benzekry, S., 2019. Quantitative mathematical modeling of clinical brain metastasis dynamics in non-small cell lung cancer. *Sci Rep* 9, 13018. [3](#), [4](#), [70](#)
- [Bra19] Brady, R., et al., 2019. Mathematical Models of Cancer: When to Predict Novel Therapies, and When Not to. *Bull Math Biol* 81, 3722–31. [1](#), [2](#), [3](#), [6](#), [45](#)
- [Buf01] Buffa, F.M., Davidson, S.E., Hunter, R.D., Nahum, A.E., West, C.M.L., 2001. Incorporating biologic measurements (SF2,CFE) into tumour control probability model increases their prognostic significance: a study in cervical carcinoma treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50, 1113–22. [8](#), [22](#)
- [Bun08] Bunimovich-Mendrazitsky, S., Byrne, H., Stone, L., 2008. Mathematical model of pulsed immunotherapy for superficial bladder cancer. *Bull Math Biol* 70, 2055–76. [2](#)
- [Bun11] Bunimovich-Mendrazitsky, S., Gluckman, J., Chaskalovic, J., 2011. A mathematical model of combined bacillus Calmette-Guerin (BCG) and interleukin (IL)-2 immunotherapy of superficial bladder cancer. *J Theor Biol* 277, 27–40. [2](#)
- [Byr10] Byrne, H.M., 2010. Dissecting cancer through mathematics: from the cell to the animal model. *Nat Rev Cancer* 10, 221-30. [8](#)

BIBLIOGRAFÍA

- [Cas92] Casciari, J.J., Sotirchos, S.V., Sutherland, R.M., 1992. Mathematical modelling of microenvironment and growth in EMT6/Ro multicellular tumour spheroids. *Cell Prolif* 25, 1-22. [7](#), [49](#)
- [Cas07] Castiglione, F., Piccoli, B., 2007. Cancer immunotherapy, mathematical modeling and optimal control. *J Theor Biol* 247, 723–32. [2](#)
- [Cas09] Castorina, P., Carcò, D., Guiot, C., Deisboeck, T.S., 2009. Tumor growth instability and its implications for chemotherapy. *Cancer Res* 69, 8507–15. [2](#)
- [Car84] Carlsson, J., Yuhás, J.M., 1984. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res* 95, 1-23. [36](#)
- [Cha81] Chadwick, K.H., Leenhouts, H.P., 1981. *A Molecular Theory of Radiation Biology*. Springer-Verlag. [25](#)
- [Chi04] Chignola, R., Milotti, E., 2004. Numerical simulation of tumor spheroid dynamics. *Physica A* 338, 261-6. [4](#)
- [Chi10] Chignola, R., Del Fabbro, A., Farina, M., Militti, E., 2010. Computational challenges of tumor spheroid. *J Bioinform Comput Biol* 9, 559-77. [4](#)
- [Con83] Conger, A.D., Ziskin, M.C., 1983. Growth of mammalian multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 43, 556-60. [7](#)
- [Cui17] Cui, X., Hartanto, Y., Zhang, H., 2017. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface* 14, 20160877. [7](#)
- [Cun11] Cunningham, J.J., Gatenby, R.A., Brown, J.S., 2011. Evolutionary dynamics in cancer therapy. *Mol Pharm* 8, 2094–100. [2](#)
- [Dea84] Deacon, J., Peckham, M.J., Steell, G.G., 1984. The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother Oncol* 2, 317–23. [8](#), [22](#)
- [Dei09] Deisboeck, T.S., Zhang, L., Yoon, J., Costa, J., 2009. In silico cancer modeling: is it ready for prime time?. *Nat Clin Pract Oncol* 6, 34-42. [6](#)

- [Din06] Dingli, D., Cascino, M.D., Josić, K., Russell, S.J., Bajzer, Ž., 2006. Mathematical modeling of cancer radiovirotherapy. *Math Biosci* 199, 55–78. [2](#)
- [Duc81] Düchting, W., Vogelsaenger, T., 1981. Three-dimensional pattern generation applied to spheroidal tumor growth in a nutrient medium. *Int J Biomed Comput* 12, 377-92. [5](#)
- [Duc83] Düchting, W., Vogelsaenger, T., 1983. Aspects of modelling and simulating tumor growth and treatment. *J Cancer Res Clin Oncol* 105, 1-12. [5](#)
- [Duc85] Düchting, W., Vogelsaenger, T., 1985. Recent progress in modelling and simulation of three-dimensional tumor growth and treatment. *Bio Systems* 18, 79-91. [5](#), [18](#)
- [Duc89] Düchting, W., Lehrig, R., Rademacher, G., Ulmer, W., 1989. Computer simulation of clinical irradiation schemes applied to in vitro tumor spheroids. *Strahlenther Onkol* 165, 873-8.
- [Duc90] Düchting, W., 1990. Tumor growth simulation. *Comput & Graphics* 14, 505-8. [5](#)
- [Duc96] Düchting, W., Ulmer, W., Ginsberg, T., 1996. Cancer: A challenge for control theory and computer modelling. *Eur J Cancer* 32A, 8, 1283-92.
- [Duc96a] Düchting, W., Ginsberg, T., 1996. Computer simulation applied to radiation therapy in cancer research. *Appl Math Comput* 74, 191-207.
- [Dur80] Durand, R.E., 1980. Variable radiobiological responses of spheroids. *Radiat Res* 81, 85-99. [26](#)
- [Dur82] Durand, R.E., 1982. Use of Hoechst 33342 for cels selection from multi-cell systems. *J Histochem Cytochem* 30, 117-22. [16](#)
- [Dur01] Durand, R., Olive, P.L., 2001. Resistance of tumour cells to chemo and radiotherapy modulated by the three-dimensional architecture of solid tumours and spheroids. *Method Cell Biol* 64, 211–29. [7](#)

BIBLIOGRAFÍA

- [Eik10] Eikenberry, S.E., Nagy, J.D., Kuang, Y., 2010. The evolutionary impact of androgen levels on prostate cancer in a multi-scale mathematical model. *Biol Direct* 5, 24. [2](#)
- [Eis17] Eisenberg, M.C., Jain, H.V., 2017. A confidence building exercise in data and identifiability: Modeling cancer chemotherapy as a case study. *J Theor Biol* 431, 63–78.
- [Eli11] Elishmereni, M., Kheifetz, Y., Søndergaard, H., Overgaard, R., Agur, Z., 2011. An integrated disease/ pharmacokinetic/pharmacodynamic model suggests improved interleukin-21 regimens validated prospectively for mouse solid cancers. *PLoS Comput Biol* 7, e1002206. [2](#)
- [Emo05] Emonet, T., Macal, C.M., North, M.J., 2005. AgentCell: a digital single-cell assay for bacterial chemotaxis. *Bioinformatics* 21, 2714-21. [5](#)
- [End05] Enderling, H., Anderson, A.R., Chaplain, M.A., Munro, A.J., Vaidya, J.S., 2005. Mathematical modelling of radiotherapy strategies for early breast cancer. *J Theor Biol* 241, 158–71. [2](#)
- [End06] Enderling, H., Chaplain, M.A., Anderson, A.R., Vaidya, J.S., 2006. A mathematical model of breast cancer development, local treatment and recurrence. *J Theor Biol* 246, 245–59. [2](#)
- [End09] Enderling, H., Hlatky, L., Hahnfeldt., 2009. Migration rules: tumours are conglomerates of self-metastases. *Br J Cancer* 100, 1917-25. [6](#)
- [End18] Enderling, H., Kim, S., Pilon-Thomas, S., 2018. The accelerating quest for optimal radiation and immunotherapy combinations for local and systemic tumor control. *Ther Radiol Oncol* 2, 33. [2](#)
- [Fer81] Fertil, B., Malaise, E.P., 1981. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumour radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 7, 621–9. [8](#), [22](#)
- [Fer10] Fernández, S.D., Suárez, C., Cecchi, G.A., Marshall, G., Stolovitzky, G., 2010. When the optimal is not the best: Parameter estimation in complex biological models. *PLoS ONE* 5, e13283. [4](#)

- [Fer02] Ferreira Jr., S.C., Martins, M.L., Vilela, M.J., 2002. Reaction-diffusion model for the growth of avascular tumor. *Phys Rev E* 65, 021907. [4](#)
- [Fre80] Freyer, J.P., Sutherland, R.M., 1980. Selective dissociation and characterization of cells from different regions of multicell tumor spheroids. *Cancer Res* 40, 3956-65. [7](#), [16](#), [26](#)
- [Fri96] Fritz, P., Weber, K.J., Frank, C., Flentje, M., 1996. Differential effects of dose rate and superfractionation on survival and cell cycle of V79 cells from spheroid and monolayer culture. *Radiother Oncol* 39, 73-79. [7](#)
- [Fri04] Friedman, A., 2004. A hierarchy of cancer models and their mathematical challenges. *Discrete Contin Dyn Syst Ser B* 4, 147–60. [1](#)
- [Fri06] Friedman, A., Tian, J., Fulci, G., Chiocca, A.E., Wang, J., 2006. Glioma virotherapy: effects of innate immune suppression and increased viral replication capacity. *Can Res* 66, 2314–19. [2](#)
- [Fri09] Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., Kunz-Schughart, L.A., 2009. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc* 4, 309-24. [7](#)
- [Fow10] Fowler J.F., 2010. 21 years of biologically effective dose. *Br J Radiol* 83, 554-68. [86](#)
- [Gao13] Gao, X., McDonald, T.J., Hlatky, L., Enderling, H., 2013. Acute and fractionated irradiation differentially modulate glioma stem cell division kinetics. *Cancer Res* 73, 1481–90. [2](#)
- [Gat09] Gatenby, R.A., Brown, J., Vincent, T., 2009. Lessons from applied ecology: cancer control using an evolutionary double bind. *Can Res* 69, 7499–502. [2](#)
- [Gat18] Gatenby, R.A., Brown, J., 2018. The evolution and ecology of resistance in cancer therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, 2. [2](#)
- [Gon15] Gong, X., Lin, C., Cheng, J., Su, J., Zhao, H., Liu, T., Wen, X., Zhao, P., 2015. Generation of multicellular tumor spheroids with microwell-based agarose xcaffolds for drug testing. *PLoS ONE* 10, e0130348. [36](#)

BIBLIOGRAFÍA

- [Gri13] Grimes, D.R., Kelly, C., Bloch, K., Partridge, M., 2014. A method for estimating the oxygen consumption rate in multicellular tumour spheroids. *J R Soc Interface* 11, 20131124 [47](#)
- [Gui03b] Guiot, C., Degiorgis, P.G., Delsanto, P.P., Gabriele, P., Deisboeck, T.S., 2003. Does tumor growth follow a “universal law”? *J of Theor Biol* 225, 147-51.
- [Gui03] Guirado, D., Aranda, M., Vilches, M., Villalobos, M., Lallena, A.M., 2003. Dose dependence of the growth rate of multicellular tumour spheroids after irradiation. *Br J Radiol* 76, 109-16. [7](#), [22](#), [23](#), [53](#), [54](#), [55](#), [71](#)
- [Gui12] Guirado, D., Aranda, M., Ortiz, M., Mesa, J.A., Zamora, L.I., Amaya, E., Villalobos, M., Lallena, A.M., 2012. Low-dose radiation hyper-radiosensitivity in multicellular tumour spheroids. *Br J Radiol* 85, 1398-406. [8](#), [23](#), [31](#)
- [Gui12b] Guirado, D., 2012. Variabilidad en radiobiología. PhD Thesis. University of Granada (Spain). [7](#), [30](#), [55](#)
- [Hah99] Hahnfeldt, P., Panigrahy, D., Folkman, J., Hlatky, L., 1999. Tumor development under angiogenic signaling: a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy. *Cancer Res* 59, 4770-5. [1](#)
- [Han15] Hanin, L., Seidel, K., Stoevesandt, D., 2015. A “universal” model of metastatic cancer, its parametric forms and their identification: what can be learned from site-specific volumes of metastases Leonid Hanin, Karen Seidel & Dietrich Stoevesandt. *J Math Biol* 72, 1633–62. [2](#)
- [Haw00] Hawkins, R.B., 2000. Survival of a mixture of cells of variable linear-quadratic sensitivity to radiation. *Radiat Res* 153, 840–3. [25](#)
- [Haw15] Hawkins-Daarud, A.J., Rockne, R.C., Corwin, D., Anderson, A.R., Kinahan, P., Swanson, K.R., 2015. In silico analysis suggests differential response to bevacizumab and radiation combination therapy in newly diagnosed glioblastoma. *J R Soc Interface* 12, 20150388. [2](#)

- [Her11] Herman, A.B., Savage, V.M., West, G.B., 2011. A quantitative theory of solid tumor growth, metabolic rate and vascularization. *PLOS One* 6, e22973. [71](#)
- [Hin09] Hinow, P., Gerlee, P., McCawley, L.J., Quaranta, V., Ciobanu, M., Wang, S., Graham, J.M., Ayati, B.P., Claridge, J., Swanson, K.R., Loveless, M., Anderson, A.R., 2009. Aspatial model of tumor-host interaction: application of chemotherapy. *Math Biosci Eng* 6, 521–46 [2](#)
- [Hut11] Hutchinson, L., Mueller, H.-J., Gaffney, E., Maini, P., Wagg, J., Phipps, A., Boetsch, C., Byrne, H., Ribba, B., 2011. Modeling longitudinal preclinical tumor size data to identify transient dynamics in tumor response to antiangiogenic drugs. *CPT: Pharmacom Syst Pharmacol* 5, 636–45. [2](#)
- [ISO08] Working Group 1 of the Joint Committee for Guides in Metrology., 2008. Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement. *JCGM 100*. [30](#)
- [Jac15] Jackson, P.R., Juliano, J., Hawkins-Daarud, A., Rockne, R.C., Swanson, K.R., 2015. Patient-specific mathematical neuro-oncology: Using a simple proliferation and invasion tumor model to inform clinical practice. *Bull Math Biol* 77, 846-56. [4](#)
- [Jea16] Jeanquartier, F., Jean-Quartier, C., Jurisica, I., Holzinger, A., 2016. In silico modeling for tumor growth visualization. *BMC Syst Biol* 10, 59. [5](#)
- [Jea18] Jean-Quartier, C., Jeanquartier, F., Cemernek, D., Holzinger, A., 2018. In silico cancer research towards 3R. *BMC Cancer* 18, 408. [5](#)
- [Jia05] Jiang, Y., Pjesivac-Grbovic, J., Cantrell, C., Freyer, J.P., 2005. A multiscale model for avascular tumor growth. *Biophys J* 89, 3884-94. [4](#)
- [Joi93] Joiner, M. and Kogel, A.v.d., 2009. *Basic Clinical Radiobiology*. Edward Arnold. [36](#), [40](#), [41](#)
- [Kaz19] Kaznatcheev, A., Peacock, J., Basanta, D., Marusyk, A., Scott, J.G., 2019. Fibroblasts and alectinib switch the evolutionary games played by non-small cell lung cancer. *Nat Ecol Evol* 3, 450–456. [2](#)

BIBLIOGRAFÍA

- [Kem10] Kempf, H., Bleicher, M., Meyer-Hermann, M., 2010. Spatio-temporal cell dynamics in tumour spheroid irradiation. *Eur Phys J D* 60:177–93. [2](#)
- [Kha06] Khaitan, D., Chandna, D., Arya, M.B., Dwarakanath, B.S., 2006. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. *J Transl Med* 4, 12. [26](#)
- [Kir09] Kirschner, D., Tsygvintsev, A., 2009. On the global dynamics of a model for tumor immunotherapy. *Math Biosci Eng* 6:573–83. [2](#)
- [Kog12] Kogan, Y., Halevi-Tobias, K., Elishmereni, M., Vuk-Pavlović, S., Agur, Z., 2012. Reconsidering the paradigm of cancer immunotherapy by computationally aided real-time personalization. *Can Res* 72, 2218–27. [2](#)
- [Koz01] Kozusko, F., Chen, P.-H., Grant, S.G., Day, B.W., Panetta, J., 2001. A mathematical model of in vitro cancer cell growth and treatment with the antimetabolic agent curacin A. *Math Biosci* 170, 1–16. [2](#)
- [Kun04] Kunz-Schughart, L.A., Freyer, J.P., Hofstaedter, F., Ebner, R., 2004. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: The multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* 9, 273-85. [7](#)
- [Kuz01] Kuznetsov, V., Knott, G., 2001. Modeling tumor regrowth and immunotherapy. *Math Comput Model* 33, 1275–87. [2](#)
- [Kwo85] Kwok, T.T., Twentyman, P.R., 1985. The relationship between tumour geometry and the response of tumour cells to cytotoxic drugs - an in vitro study using EMT6 multicellular spheroids. *Int J Cancer* 35, 675-82. [16](#)
- [Kwo87] Kwok, T.T., Twentyman, P.R., 1987. Use of a tritiated thymidine suicide technique in the study of the cytotoxic drug response of cells located at different depths within multicellular spheroids. *Br J Cancer* 55, 367-74. [16](#)
- [Lab12] Labarbera, D.V., Reid, B.G., Yoo, B.H., 2012. The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 7, 819-30. [7](#)

- [Led13] Leder, K., Pitter, K., Laplant, Q., Hambarzumyan, D., Ross, B.D., Chan, T.A., Holland, E.C., Michor, F., 2013. Mathematical modeling of PDGF-driven glioblastoma reveals optimized radiation dosing schedules. *Cell* 156, 603–16. [2](#)
- [Lee18] Lee, J.M., Park, D.Y., Yang, L., Kim, E.-J., Ahrberg, C.D., Lee, K.-B., Chung, B.G., 2018. Generation of uniform-sized multicellular tumor spheroids using hydrogel microwells for advanced drug screening. *Sci Reports* 8, 17145. [55](#)
- [Lie19] Liew, H., Klein, C., Zenke, F.T., Abdollahi, A., Debus, J., Dokic, I., Mairani, A., 2019. Modeling the Effect of Hypoxia and DNA Repair Inhibition on Cell Survival after Photon Irradiation. *Int J Mol Sci* 20, 6054. [36](#), [40](#), [41](#)
- [Low10] Lowengrub, J., Frieboes, H., Jin, F., Chuang, Y.-LL., Li, X., Macklin, P., Wise, S., Cristini, V., 2010. Nonlinear modelling of cancer: bridging the gap between cells and tumours. *Nonlinearity* 23, R1–R9. [1](#)
- [Luj16] Luján, E., Guerra, L.N., Soba, A., VosacovsKy, N., Gandía, D., Calvo, J.C., Suárez, C., 2016. Mathematical modelling of microtumour infiltration based on in vitro experiments. *Integr Biol* 8, 879-85. [4](#)
- [Luj18] Luján, E., Soto, D., Rosito, M.S., Soba, A., Guerra, L.N., Calvo, J.C., Marshall, G., Suárez, C., 2018. Microenvironmental influence on microtumour infiltration patterns: 3D-mathematical modelling supported by in vitro studies. *Integr Biol* 10, 325-34. [4](#)
- [Mah17] Mahasa, K., Eladdadi, A., Pillis, L.G., Ouifki, R., 2017. Oncolytic potency and reduced virus tumor-specificity in oncolytic virotherapy. A mathematical modelling approach. *PloS one*. 12, e0184347-26. [2](#)
- [Mar94] Marušić, M., Bajzer, Z., Freyer, J.P., Vuk-Pavlović, S., 1994. Analysis of growth of multicellular tumour spheroids by mathematical models. *Cell Prolif* 27, 73-94. [3](#), [71](#)

BIBLIOGRAFÍA

- [Mar14] Marusyk, A., Tabassum, D.P., Altrock, P.M., Almendro, V., Michor, F., Polyak, K., 2014. Non-cell-autonomous driving of tumour growth supports sub-clonal heterogeneity. *Nature* 514, 54. [2](#)
- [Mat07] Materi, W., Wishart, D.S., 2007. Computational systems biology in cancer: Modeling methods and applications. *Gene Regul Syst Bio* 1, 91-110. [5](#), [6](#)
- [McA07] McAneney, H., O'Rourke, S.F.C., 2007. Investigation of various growth mechanisms of solid tumour growth within the linear-quadratic model for radiotherapy. *Phys Med Biol* 52, 1039–54. [2](#)
- [McM16] McMillan, K.S., McCluskey, A.G., Sorensen, A., Boyd M, Zagnoni M., 2016. Emulsion technologies for multicellular tumour spheroid radiation assays. *Analyst* 141, 100-10. [7](#)
- [Met19] Metzcar, J., Wang, Y.M.S., Heiland, R., Macklin, P., 2019. A review of cell-based computational modelling in cancer biology. *JCO Clin Cancer Inform* 3, 1-13. [5](#)
- [Mic05] Michor y col., *Nature* 435: 1267–1270, 2005. Michor, F., Hughes, T.P., Iwasa, Y., Branford, S., Shah, N.P., Sawyers, C.L., Nowak, M.A., 2005. Dynamics of chronic myeloid leukaemia. *Nature* 435, 1267-70. [1](#), [2](#)
- [Mic18] Michel, T., Fehrenbach, J., Lobjois, V., Laurent, J., Gomes, A., Colin, T., Pognard, C., 2018. Mathematical modeling of the proliferation gradient in multicellular tumor spheroids. *J Theor Biol* 458, 133-147. [7](#)
- [Mil10] Milotti, E., Chignola, R., 2010. Emergent properties of tumor microenvironment in a real life model of multicell tumor spheroids. *PLoS ONE* 5, e13942. [4](#)
- [Mue84] Mueller-Klieser, W., 1984. Method for the determination of oxygen consumption rates and diffusion coefficients in multicellular spheroids. *Biophys J* 46, 343-48. [16](#), [49](#)

- [Mue86] Mueller-Klieser, W., Freyer, J.P., Sutherland, R.M., 1986. Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids. *Br J Cancer* 53, 345-53. [7](#)
- [Mue87] Mueller-Klieser, W., 1987. Multicellular spheroids: A review on cellular aggregates in cancer research. *J Cancer Res Clin Oncol* 113, 101-122. [7](#)
- [Mue97] Mueller-Klieser, W., 1997. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol* 273, C1109-23. [7](#)
- [Mue00] Mueller-Klieser, W., 2000. Tumor biology and experimental therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol* 36, 123-39. [7](#)
- [Mur16] Murphy H., Jaafari H., Dobrovolny H.M., 2016. Differences in predictions of ODE models of tumor growth: a cautionary example. *BMC Cancer* 16, 163. [3](#), [80](#)
- [Nai18] Nair IR, Mathew AJ, Kottarathil VD., 2018. Detection of micrometastasis in axillary lymph nodes of breast carcinoma patients and its association with clinical outcome. *Indian J Pathol Microbiol* 61, 330-3. [62](#), [63](#), [64](#)
- [Nan00] Nani, F., Freedman, H., 2000. A mathematical model of cancer treatment by immunotherapy. *Math Biosci* 163, 159–99. [2](#)
- [Nic20] Nicolás, C., Périer, C., Prague, M., Bellera, C., MacGrogan, G., Saut, O., Benzekry, S., 2020. Machine learning and mechanistic modeling for prediction of metastatic relapse in early-stage breast cancer. *JCO Clin Cancer Inform* 4, 259-74. [3](#), [4](#)
- [Nor77] : Norton, L., Simon, R., 1977. Growth Curve of an Experimental Solid Tumor Following Radiotherapy. *J Natl Cancer Inst* 58, 1735–41. [1](#)
- [Nor88] Norton, L., 1988. A Gompertzian Model of Human Breast Cancer Growth. *Can Res* 48, 7067-71. [1](#)
- [Odo97] O’Donoghue, J.A., 1997. The response of tumours with Gompertzian growth characteristics to fractionated radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 72, 325-39. [23](#)

BIBLIOGRAFÍA

- [Okt06] Oktem, G., Vatansever, S., Ayla, S., Uysal, A., Aktas, S., Karabulut, B., Bilir, A., 2006. Effect of apoptosis and response of extracellular matrix proteins after chemotherapy application on human breast cancer cell spheroids. *Oncol Rep* 15, 335-40. [7](#)
- [Ole92] Olea, N., Villalobos, M., Ruiz de Almodóvar, J.M., Pedraza, V., 1992. MCF-7 breast cancer cells grown as multicellular spheroids in vitro: effect of 17β -estradiol. *Int J Cancer* 50, 112-7. [14](#), [16](#), [30](#), [34](#), [47](#), [48](#)
- [Ole93] Olea, N., Villalobos, M., Nuñez, J., Elvira, J., Ruiz de Almodóvar, J.M. and Pedraza, V., 1993. Evaluation of the growth rate of MCF-7 breast cancer multicellular spheroids using three mathematical models. *Cell Prolif* 27, 213-23. [3](#), [47](#)
- [Oli94] Olive, P.L., Durand, R.E., 1994. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev* 13, 121-38. [7](#)
- [Oli19] Olivares-Urbano, M.A., Griñán-Lisón, C., Ríos-Arrabal, S., Artacho-Cordón, F., Torralbo, A.I., López-Ruiz, E., Marchal, J.A., Núñez, M.i., 2019. Radiation and Stemness Phenotype May Influence Individual Breast Cancer Outcomes: The Crucial Role of MMPs and Microenvironment. *Cancers* 11, 1781. [8](#), [28](#)
- [Pac16] Pacheco-Marín, R., Melendez-Zajgla, J., Castillo-Rojas, G., Mandujano-Tinoco, E., Garcia-Venzor, A., Uribe-Carvajal, S., Cabrera-Orefice, A., Gonzalez-Torres, C., Gaytan-Cervantes, J., Mitre-Aguilar, I.B., Maldonado, V., 2016. Transcriptome profile of the early stages of breast cancer tumoral spheroids. *Sci Rep* 6, 23373. [7](#)
- [Pal84] Palcic, B., and Skarsgard, L.D., 1984. Reduced Oxygen Enhancement Ratio at Low Doses of Ionizing Radiation. *Radiat Res* 100, 328-39. [36](#), [40](#), [41](#)
- [Pam07] Pampaloni, F., Reynaud, E.G., Stelzer, E.H., 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 839-45. [7](#)

- [Pol11] Poleszczuk, J., Bodnar, M., Foryś, U., 2011. New approach to modeling of antiangiogenic treatment on the basis of Hahnfeldt et al. model. *Math Biosci Eng* 8, 591–603. [2](#)
- [Pol15] Poleszczuk, J., Hahnfeldt, P., Enderling, H., 2015. Therapeutic implications from sensitivity analysis of tumor angiogenesis models. *PLoS ONE* 10, e0120007. [2](#)
- [Pol18] Poleszczuk, J., Enderling, H., 2018. The optimal radiation dose to induce robust systemic anti-tumor immunity. *Int J Mol Sci* 19, 3377. [2](#)
- [Pow07] Powathil, G., Kohandel, M., Sivaloganathan, S., Oza, A., Milosevic, M., 2007. Mathematical modeling of brain tumors: Effects of radiotherapy and chemotherapy. *Phy Med Biol* 52, 3291-306. [2](#)
- [Pow12] Powathil, G.G., Gordon, K.E., Hill, L.A., Chaplain, M.A.J., 2012. Modelling the effects of cell-cycle heterogeneity on the response of a solid tumour to chemotherapy: biological insights from a hybrid multiscale cellular automaton model. *J Theor Biol* 308, 1-19. [2](#)
- [Pow13] Powathil, G.G., Adamson, D.J.A., Chaplain, M.A.J., 2013. Towards predicting the response of a solid tumour to chemotherapy and radiotherapy treatments: clinical insights from a computational model. *PLoS Comput Biol* 9, e1003120. [2](#)
- [Pre95] Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., Flannery, B.P., 1995. *Numerical recipes in FORTRAN. The art of scientific computing.* Cambridge University Press. [72](#), [73](#)
- [Pro15] Prokopiou, S., Moros, E.G., Poleszczuk, J., Caudell, J., Torres-Roca, J.F., Latifi, K., Lee, J.K., Myerson, R.J., Harrison, L.B., Enderling, H., 2015. A proliferation saturation index to predict radiation response and personalize radiotherapy fractionation. *Radiat Oncol* 10, 159. [2](#)
- [Rag16] Raghavan, S., Mehta, P., Horst, E.N., Ward, M.R., Rowley, K.R., Mehta, G., 2016. Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. *Oncotarget* 7, 16948-61. [30](#)

BIBLIOGRAFÍA

- [Rej11] Rejniak, K.A., Anderson, A.R.A., 2011. Hybrid models of tumor growth. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med 3, 115-25. [5](#), [6](#), [30](#)
- [Rib11] Ribba, B., Watkin, E., Tod, M., Girard, P., Grenier, E., You B., Guiraud, E., Freyer, G., 2011. A model of vascular tumour growth in mice combining longitudinal tumour size data with histological biomarkers. Eur J Cancer 47, 479-90. [3](#)
- [Rof89] Rofstad, E.K., & Sutherland, R.M., 1989. Growth and radiation sensitivity of the MLS human ovarian carcinoma cell line grown as multicellular spheroids and xenografted tumours. Br J Cancer 59, 28-35. [36](#), [40](#), [41](#)
- [Roo07] Roose, T., Chapman, S.J., Maini, P.K., 2007. Mathematical models of avascular tumor growth. SIAM Rev 49, 179-208. [4](#), [5](#), [16](#), [18](#)
- [Roy19] The Royal College of Radiologists, 2019. Timely delivery of radical radiotherapy: guidelines for the management of unscheduled treatment interruptions. The Royal College of Radiologists. Fourth edition. Ref No. BF-CO(19)1. [3](#), [86](#)
- [Rui20] Ruiz-Arrebola, S., Tornero-López, A.M., Guirado, D., Villalobos, M., Lallena, A.M., 2020. An on-lattice agent-based Monte Carlo model simulating the growth kinetics of multicellular tumor spheroids. Phys Med 77, 194-203. [11](#), [29](#), [45](#)
- [Rui21] Ruiz-Arrebola, S., Guirado, D., Villalobos, M., Lallena, A.M., 2021. Evaluation of classical mathematical models of tumor growth using an on-lattice agent-based Monte Carlo model. Appl Sci 11, 5241. [69](#)
- [Sac01] Sachs, R., Hlatky, L., Hahnfeldt, P., 2001. SimpleODE models of tumor growth and anti-angiogenic or radiation treatment. Math Comput Model 33, 1297–305. [2](#)
- [San17] Santiago, D.N., Heidbuechel, J.P., Kandell, W.M., Walker, R., Djeu, J., Engeland, C.E., Abate-Daga, D., Enderling, H., 2017. Fighting cancer with mathematics and viruses. Viruses 9, 239. [2](#)

- [Sch11] Schiff, J.L., 2011. Cellular Automata: A Discrete View of the World. Wiley & Sons Inc. [5](#)
- [Sim04] Simeoni, M., Magni, P., Cammia, C., De Nicolao, G., Croci, V., Presenti, E., Germani, M., Poggesi, I., Rocchetti, M., 2004. Predictive pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tumor growth kinetics in xenograft models after administration of anticancer agents. *Cancer Res* 64, 1094-101. [3](#)
- [Sim13] Simeoni, M., De Nicolao, G., Magni, P., Rocchetti, M., Poggesi, I., 2013. Modeling of human tumor xenografts and dose rationale in oncology. *Drug Discov Today Technol* 10, e365-72. [3](#)
- [Smo98] Smolle, J., 1998. Cellular automaton simulation of tumour growth - equivocal relationships between simulation parameters and morphologic pattern features. *Anal Cell Path* 17, 71-82 [55](#)
- [Son18] Song, Y., Kim, J.-S., Kim, S.-H., Park, Y.K., Yu, E., Kim, K.-H., Seo, E.-J., Oh, H.-B., Lee HC, Kim KM, Seo HR., 2018. Patient-derived multicellular tumor spheroids towards optimized treatment for patients with hepatocellular carcinoma. *J Exper Clin Cancer Res* 37, 109. [7](#)
- [Sos18] Sosa, I.V., Theys, J., Groot, A.J., Barbeau, L.M.O., Lemmens, A., Yaromina, A., Losen, M., Houben, R., Dubois, L., Vooijs, M., 2018. Synergistic effects of NOTCH/ γ -secretase inhibition and standard of care treatment modalities in non-small cell lung cancer cells. *Frontiers Oncol* 8, 460. [7](#)
- [Sou73] Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M., 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer* 51, 1409-16. [30](#)
- [Spr93] Spratt, J.A., Von Fournier, D., Spratt, J.S., Weber, E.E., 1993. Decelerating growth and human breast cancer. *Cancer* 71, 2013-19. [70](#)
- [Stu95] Stuschke, M., Budach, V., Stüben, G., Streffer, C., Sack, H., 1995. Heterogeneity in the fractionation sensitivities of human tumor cell lines: studies in

BIBLIOGRAFÍA

- a three-dimensional model system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32, 395-408. [7](#)
- [Sua12] Suárez, C., Maglietti, F., Colonna, M., Breitbart, K., Marshall, G., 2012. Mathematical modeling of human glioma growth based on brain topological structures: Study of two clinical cases. *PLoS ONE* 7, e39616. [4](#)
- [Sut86] Sutherland, R.M., Sordat, B., Bamat, J., Gabbert, H., Bourrat, B., Mueller-Klieser, W., 1986. Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. *Cancer Res* 46, 5320-9. [7](#), [16](#)
- [Sut88] Sutherland, R.M., 1988. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240, 177-184. [7](#)
- [Swa01] Swanson, K.R., True, L.D., Lin, D.W., Buhler, K.R., Vessella, R., Murray, J.D., 2001. A quantitative model for the dynamics of serum prostate-specific antigen as a marker for cancerous growth: an explanation for a medical anomaly. *Am J Pathol* 158(6), 2195–99. [2](#)
- [Swi09] Swierniak, A., Kimmel, M., Smieja, J., 2009. Mathematical modeling as a tool for planning anticancer therapy. *Eur J Pharmacol* 625, 108-21. [3](#)
- [Tim04] Timmins, N.E., Dietmair, S., Nielsen, L.K., 2004. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis* 7, 97-103. [16](#)
- [Tof87] Toffoli, T., Margolus, N., 1987. *Cellular Automata Machines: A New Environment for Modeling*. MIT Press. [5](#)
- [Vag20] Vaghi, C., Rodallec, A., Fanciullino, R., Ciccolini, J., Mochel, J.P., Mastri, P., Pognard, C., Ebos, J.L.M., Benzekry, S., 2020. Population modeling of tumor growth curves and the reduced Gompertz model improve prediction of the age of experimental tumors. *PLoS Comput Biol* 16, e1007178. [3](#), [4](#), [70](#)
- [Vai82] Vaidya, V.G., Alexandro, F.J., 1982. Evaluation of some mathematical models for tumor growth. *Int J Bio-Med Comput* 13, 19-36. [3](#), [70](#), [71](#)

- [Vai11] Vainstein, V., Kirnasovsky, O.U., Kogan, Y., Agur, Z., 2011. Strategies for cancer stem cell elimination: insights from mathematical modeling. *J Theor Biol* 298, 32–41. [2](#)
- [Ver18] Verjans E-T, Doijen J, Luyten W, Landuyt B, Schoofs L, 2018. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort? *J Cell Physiol* 233, 2993-3003 [7](#)
- [Vil96] Villalobos, M., 1996. Modelos tumorales en oncología: los esferoides multicelulares en el estudio del cáncer hormonodependiente. PhD Thesis. University of Granada (Spain). [16](#), [30](#), [35](#), [50](#), [51](#), [52](#)
- [Von57] Von Bertalanffy, L., 1957. Quantitative laws in metabolism and growth. *Q Rev Biol* 32, 217-31. [72](#)
- [Von66] Von Neumann, J., Burks, A.W., 1966. Theory of self-reproducing automata. Univ Illinois Press. [5](#)
- [Wal13] Wallace, D.I., Guo, X., 2013. Properties of tumor spheroid growth exhibited by simple mathematical models. *Front Oncol* 3, 51. [3](#)
- [Wan08] Wang, Z., Deisboeck, T.S., 2008. Computational modeling of brain tumors: discrete, continuum or hybrid? *Sci Model Simul* 15, 381-393. [5](#), [6](#), [8](#)
- [Wan14] Wang, C., Tang, Z., Zhao, Y., Yao, R., Li, L., Sun, W., 2014. Three-dimensional in vitro cancer models: a short review. *Biofabrication* 6, 022001. [7](#)
- [Wal04] Walker, D.C., Hill, G., Wood, S.M., 2004. Agent-based computational modeling of wounded epithelial cell monolayers. *IEEE Trans Nanobioscience* 3, 153-63. [5](#)
- [War97] Ward, J.P., King, J.R., 1997. Mathematical modelling of avascular tumour growth. *IMA J Math Appl Med Biol* 14, 39-69. [4](#)

BIBLIOGRAFÍA

- [War01] Wartenberg, M., Dönmez, F., Ling, F.C., Acker, H., Hescheler, J., Sauer, H., 2001. Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *FASEB J* 15, 995-1005. [16](#)
- [Wei84] Weichselbaum, R.R., Little, J.B., Tomkison, K., et al., 1984. Repair of fractionated radiation in plateau phase cultures of human tumour cells and human multicellular tumour spheroids. *Radiother Oncol* 2, 41-7. [8](#), [22](#)
- [Wei19] Wei H.C., 2019. Mathematical modeling of tumor growth: the MCF-7 breast cancer cell line. *Math Biosci Eng* 16, 6512-35. [3](#), [4](#)
- [Wes01] West, G.B., Brown, J.H., Enquist, B.J., 2001. A general model for ontogenetic growth. *Nature* 413, 628-31. [71](#)
- [Whe85] Wheldon, T.E., Livingstone, A., Wilson, L., O'Donoghue, J., Gregor, A., 1985. The radiosensitivity of human neuroblastoma cells estimated from regrowth curves of multicellular tumour spheroids. *Br J Radiol* 58:661-4. [25](#)
- [Whe86] Wheldon, T.E., Wilson, L., Livingstone, A., Russell, J., O'Donoghue, J., Gregor, A., 1986. Radiation studies on multicellular tumour spheroids derived from human neuroblastoma: Absence of sparing effect of dose fractionation. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22, 563-6. [21](#)
- [Wit88] Withers H.R., Taylor J.M., Maciejewski B., 1988. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol* 27, 131-46. [86](#)
- [Yor93] Yorke, E.D., Fuks, Z., Norton, L., Whitmore, W., Ling, C.C., 1993. Modeling the development of metastases from primary and locally recurrent tumors: comparison with a clinical data base for prostatic cancer. *Cancer Res* 53, 2987-93. [70](#)
- [Zan16] Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A., Tesei, A., 2016. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Reports* 6, 19103. [55](#)

- [Zha17] Zhang, J., Cunningham, J.J., Brown, J.S., Gatenby, R.A., 2017. Integrating evolutionary dynamics into treatment of metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Nature communications*. 8, 1–9. [2](#)
- [NCT72] Tanguturi, S., 2018-2020. Mathematical Model-Adapted Radiation Fractionation Schedule for Patients With Recurrent Glioblastoma (MARS-Glio). National Library of Medicine - National Institutes of Health, NCT03557372. [2](#)
- [NCT56] CCCC, 2018-2020. Feasibility Study of Temporally Feathered Radiation Therapy (TFRT) for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Means of Toxicity. National Library of Medicine - National Institutes of Health, NCT03768856. [2](#)
- [NCT33] Caudel, J., 2018-2022. Use of a Proliferation Saturation Index to Determine Personalized Radiotherapy Fractionation for Patients With HPV+ Oropharyngeal Cancers. National Library of Medicine - National Institutes of Health, NCT03656133. [2](#)
- [NCT21] Zhang, J., 2015-2019. A Pilot Study of Adaptive Abiraterone Therapy for Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer. National Library of Medicine - National Institutes of Health, NCT02415621. [2](#)