

Desarrollo de un modelo unidimensional para simulación de respuesta a DOX de esferoides de cáncer de mama triple negativo

Felipe Betrán-Royo¹, Vira Sharko^{1,2}, Manuel Doblaré^{1,2,3}, Jacobo Ayensa-Jiménez¹,

¹ Tissue Microenvironment Lab (TME Lab), Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A) Universidad de Zaragoza, Mariano Esquillor s/n, 50018, Zaragoza, España.

² Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IISA), Zaragoza, España.

³ Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Zaragoza.

RESUMEN

A partir de datos experimentales de microscopía de fluorescencia de una serie de esferoides de tumores de mama, cultivados in vitro, tratados con Doxorrubicina (DOX) y sin tratar, se realiza el ajuste paramétrico de un modelo matemático de invasión. Se comprueba la validez del modelo, verificando que los parámetros obtenidos entre los grupos de réplicas analizados no presentan diferencias significativas. De esta manera, el modelo se considera robusto y puede usarse para realizar simulaciones *in silico* que sirvan en contextos terapéuticos

EXPERIMENTO

El experimento en que se basa este trabajo consiste en cultivos de esferoides [1] de células MDA-MB-231, derivada de un adenocarcinoma de mama triple negativo humano, y modificadas de manera que expresan de forma estable la proteína verde fluorescente (GFP).

Tratamiento: Doxorrubicina (DOX) 700 ng/mL aplicado sobre el cultivo durante 24 horas. Dosis basada en concentraciones plasmáticas observadas en pacientes sometidos a un régimen de dosificación clínica estándar [2].

Pautas ensayadas: Tratamiento temprano (desde día 0) y tratamiento tardío (desde día 4).

Réplicas: Para cada pauta de tratamiento (temprano y tardío) se realizaron 3 réplicas biológicas tratadas y 3 de control, cada una de ellas compuesta de 3 réplicas técnicas.

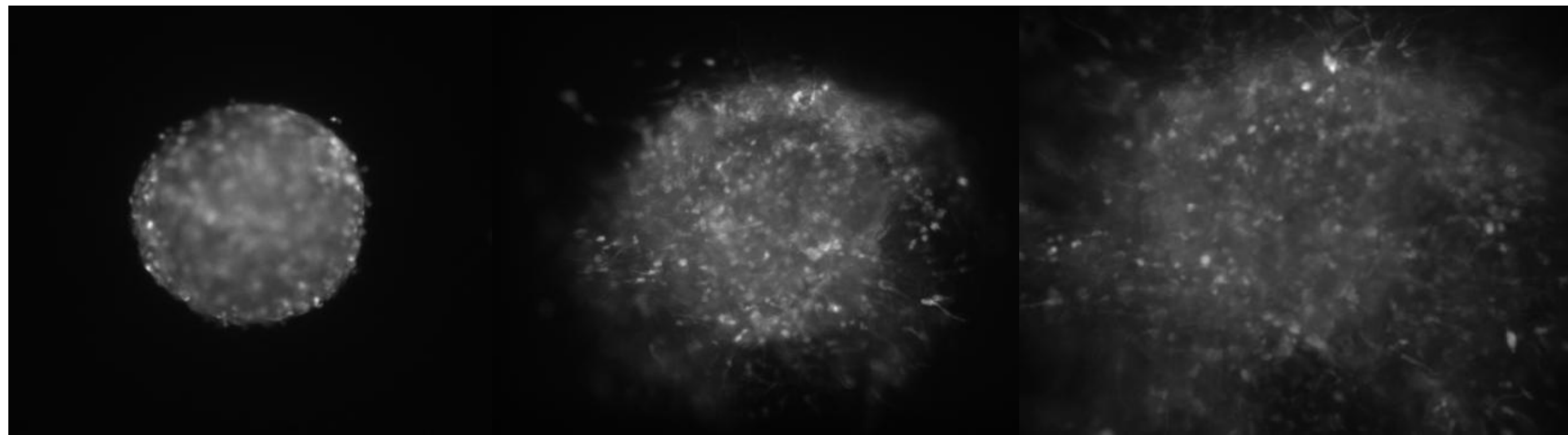


Figura 1. Fotografías realizadas en días 0, 4 y 7 (de izquierda a derecha).

A partir de cada imagen se extrae un perfil de fluorescencia, usando la función *Radial Profile Angle* del programa *Fiji*. Consiste en dividir la imagen en anillos, y para cada anillo promediar la fluorescencia, obteniendo además una desviación estándar.

Para cada réplica biológica (es decir, a partir de tres réplicas técnicas) se obtiene un único perfil radial de fluorescencia, compuesto por media y desviación estándar en cada punto. Dicha desviación estándar proviene de la composición de las varianzas internas de cada imagen (obtenida al promediar cada anillo) con la varianza entre las tres imágenes para cada punto.

MODELO

El modelo utilizado se basa en ecuaciones de tipo Fisher-KPP, modelando dos poblaciones celulares (proliferativas e invasivas) y la concentración de oxígeno como único nutriente. Se asume simetría esférica, de forma que las ecuaciones del modelo que se obtienen tienen carácter unidimensional en la coordenada radial. Además, se asume una relación directa entre unidades de fluorescencia y concentración celular, por medio de la constante α .

$$\begin{aligned} \frac{\partial F_p}{\partial t} &= \frac{D_p}{\rho^2} \frac{\partial}{\partial \rho} \left(\rho^2 \frac{\partial F_p}{\partial \rho} \right) + \alpha_p H(h - D) F_p \left(1 - \alpha \cdot \frac{F_p + F_m}{C_{sat}} \right) - \beta F_p - G(N) F_p \\ \frac{\partial F_m}{\partial t} &= \frac{1}{\rho^2} \frac{\partial}{\partial \rho} \left[\rho^2 \left(D_m \frac{\partial F_m}{\partial \rho} + \chi_m F_m \frac{\partial N}{\partial \rho} \right) \right] + \alpha_m H(h - D) F_m \left(1 - \alpha \cdot \frac{F_p + F_m}{C_{sat}} \right) + \beta F_p - G(N) F_m \\ \frac{\partial N}{\partial t} &= \frac{D_n}{\rho^2} \frac{\partial}{\partial \rho} \left(\rho^2 \frac{\partial N}{\partial \rho} \right) - \alpha \left(\frac{\mu_p F_p + \mu_m F_m}{N + N_m} \right) N \end{aligned}$$

Figura 2. Ecuaciones del modelo.

Hipótesis del modelo:

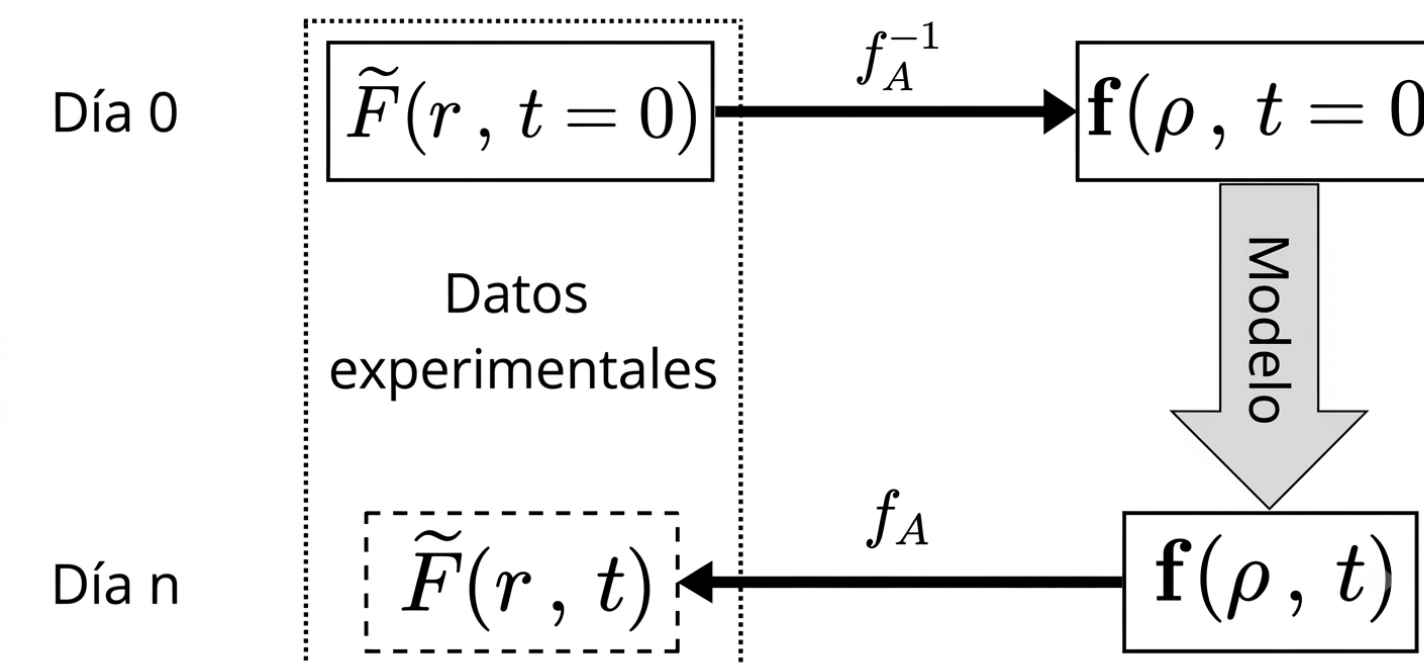
- Esferoide compuesto por **dos poblaciones celulares**, proliferativas e invasivas
- El **único nutriente** es el oxígeno.
- Las células **invasivas** tienen la capacidad de moverse según el gradiente de concentración (**quimiotaxis**)
- Inicialmente no** existe población **invasiva** (ausencia de estratificación en la condición inicial)
- Se asume **despreciable** el **decaimiento** del **marcador** fluorescente en el tiempo
- Ambas poblaciones sufren muerte celular como combinación de **necrosis** y **apoptosis** (muerte programada)
- Existen **mutaciones** de células proliferativas a invasivas

CONCLUSIONES

- ✓ El análisis estadístico de los parámetros obtenidos revela **algunas diferencias significativas**, pero es necesario tener en cuenta la **baja potencia** que tienen los tests utilizados para **muestras tan pequeñas**.
- ✓ **Es necesario obtener más datos experimentales para seguir contrastando el modelo**. En el futuro, este modelo podría ser utilizado para realizar experimentos *in silico* en **diferentes condiciones**, para diseñar **pautas de tratamiento** o como base para **nuevos diseños experimentales in vitro**.

AJUSTE

Para poder comparar los datos experimentales (obtenidos sin microscopio confocal) con la solución del modelo, es necesario recurrir a la transformada de Abel, que permite obtener el perfil proyectado en el plano correspondiente a una distribución de densidad con simetría esférica [3].



Para la condición inicial se aplica la transformada inversa a los datos experimentales, y en las sucesivas observaciones se transforma la solución del modelo, de forma que los resultados sean comparables.

Figura 3. Uso de la transformada de Abel

Ajustando por mínimos cuadrados no lineales, con seis parámetros libres (difusión y crecimiento de cada población, quimiotaxis de invasivas y constante de fluorescencia), se validaron todos los ajustes por la prueba χ^2 , salvo una de las réplicas del grupo de tratamiento tardío, descartada por considerarse atípica.

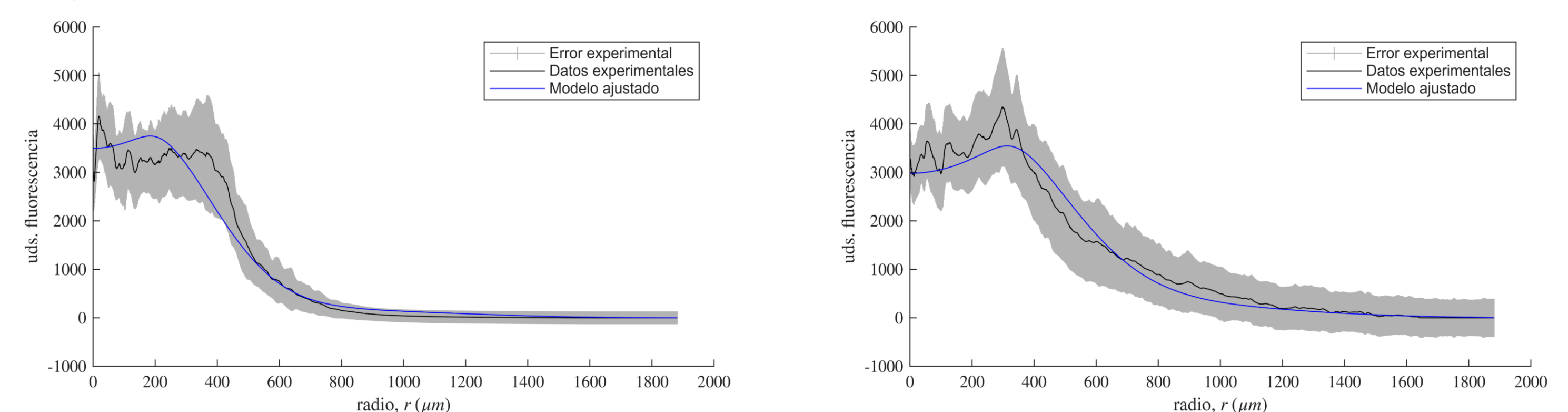


Figura 4. Ejemplo de ajuste a réplica del grupo Early Control (Figura 1), en los días 4 (izda.) y 7 (dcha.).

RESULTADOS

Del ajuste de cada réplica se obtiene un valor para cada parámetro. De esta manera, para cada parámetro y grupo de réplicas se obtiene un set de 3 valores (excepto para las de tratamiento tardío, que sólo tiene dos valores), que puede tratarse estadísticamente como una muestra.

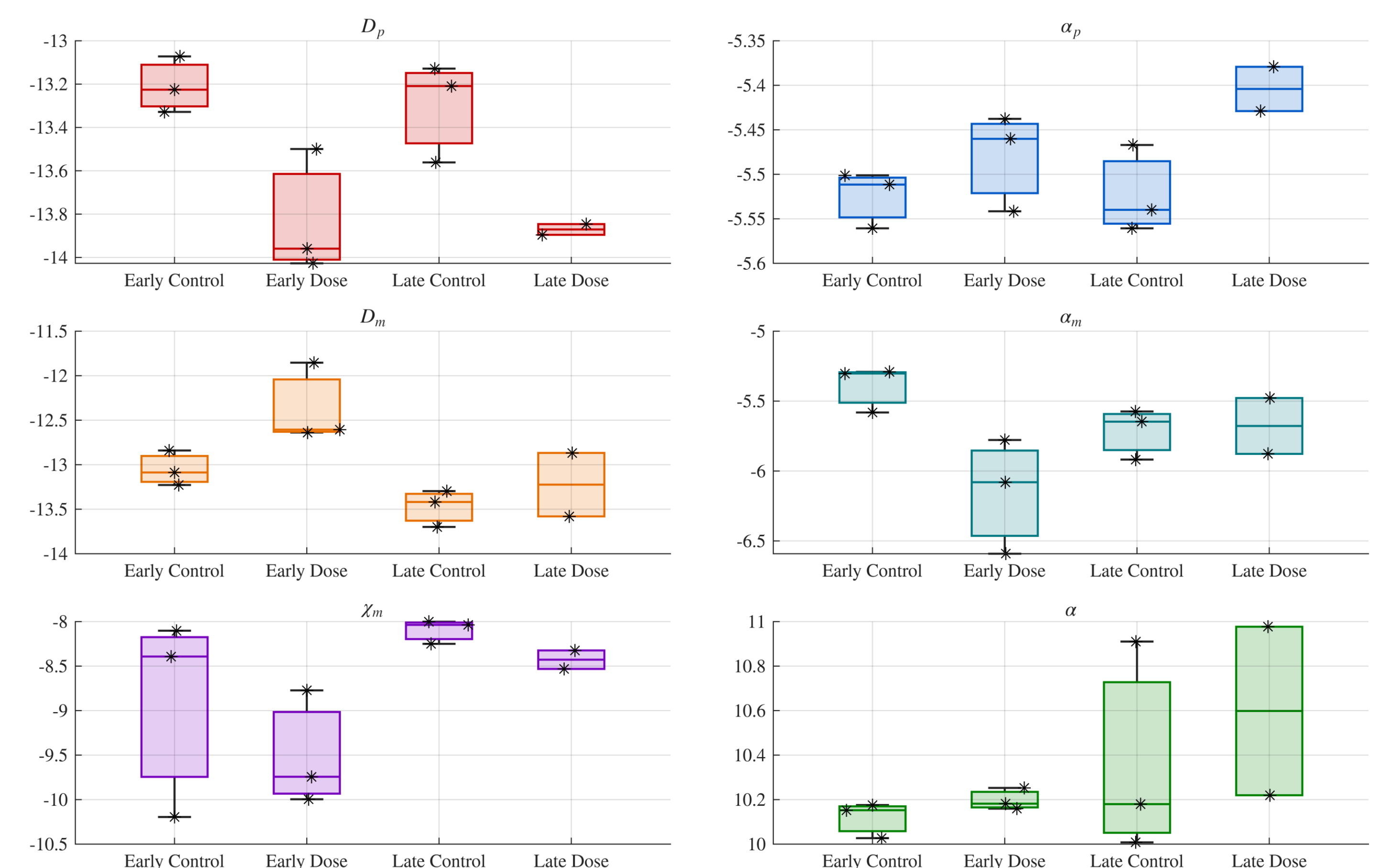


Figura 5. Diagramas de caja de los parámetros obtenidos en los ajustes. Escala logarítmica decimal.

El bajo número de datos por muestra limita enormemente las herramientas de análisis estadístico aplicables. La ausencia de normalidad en la mayoría de los casos hace imposible usar un ANOVA clásico, mientras que en comparaciones uno a uno esta misma ausencia de normalidad obliga a usar tests no paramétricos, de muy baja potencia en estos tamaños de muestra.

REFERENCIAS

- [1] NATH, Sritama y DEVI, Gayathri R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. Pharmacology & therapeutics. 2016.
- [2] BARPE, Deise Raquel, ROSA, Daniela Dornelles y FROEHLICH, Pedro Eduardo. Pharmacokinetic evaluation of doxorubicin plasma levels in normal and overweight patients with breast cancer and simulation of dose adjustment by different indexes of body mass. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2010.
- [3] BRACEWELL, Ronald N. The Fourier Transform and Its Applications

AGRADECIMIENTOS

This project is supported by the Chips Joint Undertaking (Grant Agreement No. 101140192) and its members including the top-up funding of Belgium, Germany, Hungary, Ireland, Italy, the Netherlands, Portugal, Romania and Spain. This work has received funding from the Swiss State Secretariat for Education, Research and Innovation (SERI). The authors are also grateful for the support of the Government of Aragón (DGA, T62_23R). V.S. additionally acknowledges its support.



**GOBIERNO
DE ARAGON**

