Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
Departamento de Radiologia e Oncologia

Alexandre Sarmento Queiroga

**Um modelo espacial estocástico para o crescimento e tratamento do
câncer *in situ* em fase avascular**

São Paulo - SP

2017

Alexandre Sarmento Queiroga

**Um modelo espacial estocástico para o crescimento e tratamento do
câncer *in situ* em fase avascular**

Tese apresentada a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Programa de Oncologia Orientador: Prof. Dr.
Alexandre Ferreira Ramos

São Paulo - SP

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Queiroga, Alexandre Sarmiento

Um modelo espacial estocástico para crescimento e tratamento do câncer *in situ*
em fase avascular / Alexandre Sarmiento Queiroga. -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientador: Alexandre Ferreira Ramos.

Descritores: 1. Metástase neoplásica 2.Quimioterapia 3.Computação
matemática 4.Cadeias de Markov 5.Carcinogênese

USP/FM/DBD-073/17

*Eu sou apenas um rapaz latino
americano, sem dinheiro no banco,
sem parentes importantes e vindo
do interior.*

Belchior

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Alexandre Ramos, pela paciência e dedicação durante esse tempo de convivência, aprendi muito sobre ciência e a vida. A lição sobre aprender a fazer um bom gráfico nunca será esquecida.

Ao meu co-orientador Prof. Roger Chammas, por ter me dado a oportunidade de estar em um lugar inspirador para fazer ciência, por ter acreditado na minha capacidade e pela interlocução enriquecedora sobre biologia do câncer.

Ao Dr. Ariosto Silva, por ter me recebido no Moffitt Câncer Center, aprendi bastante neste ambiente incrível.

À minha família pelo apoio dado, estiveram sempre ao meu lado e acreditaram nas minhas escolhas.

À Bartira Gorgulho e família por terem me acolhido e ajudado incondicionalmente nessa caminhada.

À todos os funcionários do ICESP e Faculdade de Medicina pelo auxílio prestado, em especial a Denise Cappi que sempre foi muito carinhosa e muito amiga comigo.

Aos funcionários do bandeirão, pelas refeições durante esse tempo

Aos meus amigos do grupo de Métodos Matemáticos em Ciências. Ao Mauro pelo auxílio e pelas boas conversas científicas durante os cafés que muito contribuíram para este trabalho. William com seu eterno coração juvenil sempre sentindo feliz nas boas ocasiões. Quero agradecer também a Misaki, Sophia, Denilson, Suzy, Alan, Bruno, Júlio, Marcela, Maira, Ana Caroline e Miguel que sempre riram educadamente das minhas péssimas piadas.

Aos meus amigos do Grupo de Oncologia Experimental. Ao Tharcísio pelos conselhos, pela ajuda com o projeto e por me ajudar na organização do evento ciência com cerveja. A Mayara, Ana Roberta, Silvia e o Adalberto, que sempre estiveram ao meu lado nas alegrias e na tristeza. Quero agradecer também Silvina, Ana Carolina, Karina, Mariana, Carol Rosal, Tuty, Priscila Cirilo, Camila Moraes, Jânio, Rafael Ikemori, Michelle Tomitão, Sofia, Luisa, Hélder Latorraca, Felipe, Renata, Andréia e Luciana pela agradável convivência durante esse tempo.

À CAPES pelo apoio financeiro para realização deste projeto

Resumo

Queiroga, A.S. **Um modelo espacial estocástico para o crescimento e tratamento do câncer *in situ* em fase avascular.** [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução. A perda da resposta aos mecanismos que regulam o crescimento da população celular em tecidos normais, as alterações em níveis genéticos e epigenéticos, induzem a carcinogênese. Durante o crescimento, seja tumor primário ou metástase, geralmente há uma fase avascular, caracterizada por tumores pequenos onde os recursos necessário para proliferação da população são oriundos dos tecidos adjacentes. Ademais, um aspecto marcante é a heterogeneidade intratumoral, que é desencadeada por fatores intrínseco e ambientais às células, desempenhando papéis importante no crescimento e resposta ao tratamento. **Métodos.** Foi proposto um modelo estocástico espacial em termos de Cadeia de Markov para simular a dinâmica de populações de um câncer *in situ* em fase avascular e o tratamento quimioterápico. As transições de estado das células consideradas foram duplicação, migração, morte, geração de variação na população e quiescência. Assumimos que as taxas de duplicação, migração e morte, dependem do tamanho da população, onde a taxa de duplicação diminui conforme a população aumenta e as taxas de migração e morte aumentam conforme a população cresce. As taxas dependente do tamanho da população foram descritos em termos de funções sigmóidais onde a suavidade da transição entre os valores mínimos e máximos das taxas foi dado pelo parâmetro k , o tamanho da população na qual a taxa de duplicação cai na metade do valor máximo foi dado por $\overline{N}$ e a taxa de duplicação na qual as taxa de migração/morte atingem a metade do valor máximo por $\overline{\alpha}$. A heterogeneidade do tumor foi representada como um conjunto de duas subpopulações (1) mais proliferativa e (2) mais migratória. Em seguida, foi acoplado um modelo de difusão de drogas e um modelo farmacodinâmico para avaliar a repopulação no tratamento com uma única droga. **Resultados.** As simulações acerca do crescimento tumoral mostram que a população atingiu a densidade

de saturação de acordo com os valores do parâmetro k . A densidade das variantes proliferativas e migratórias não foram diretamente relacionadas a taxa de geração de variação, mas sim pelos parâmetros $\bar{N}$ e $\bar{\alpha}$. Para determinado conjunto de valores atribuídos aos parâmetros k e $\bar{N}$, espacialmente observou-se crescimento difuso da população. No que tange ao tratamento, houve emergência da resistência, todavia observou-se padrões diferentes na repopulação de acordo com os valores da taxa de geração de variação, k e $\bar{N}$. Espacialmente, observa-se que as células resistentes vão ao gradiente droga. O modelo no estágio atual consegue recuperar qualitativamente algumas evidências experimentais atreladas coexistência de duas subpopulações onde uma cresce mais do que a outra, crescimento difuso da população e migração da população resistente para o gradiente de droga.

Descritores: metástase neoplásica; quimioterapia; computação matemática

Abstract

Queiroga, A.S. **A stochastic spatial model for *in situ* cancer growth and treatment.** [Thesis]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introduction. The loss of response to the mechanism which regulates the growth of cell population in normal tissue, the changes at both genetic and epigenetic level lead to carcinogenesis. During the growth of primary tumor or metastasis often there is an avascular phase which is featured by small tumor where the resource necessary to proliferation and survival come from surrounding tissues. Furthermore, a remarkable aspect of carcinogenesis is intratumoral heterogeneity which is fueled by both intrinsic and environmental factor, playing a crucial role in the growth and treatment response. **Methods** Here we propose a stochastic spatial model in term of Markov Chain to simulate the population dynamic of *in situ* cancer in avascular phase and the chemotherapeutic treatment. The cells state transition considered was duplication, migration, death, generation of new variants in population and quiescence. We are assuming that duplication, migration and death rates depend on population size, where duplication rates decrease as long as population increase but both migration and death rates, in it turn increase. Theses population size-dependent rates were described in terms of sigmoidal function where the smoothness of transition between maximal e minimum values was indicated by k , the size of population at which duplication rates falls on half of it maximal value was indicated by $\bar{N}$ and the duplication rate where both migration and death rates goes to half of it maximal value was indicated by $\bar{\alpha}$. The heterogeneity was featured as a set of a (1) highly proliferative and (2) highly migratory cells. In doing so, we coupled a drug diffusion drug and a pharmacodynamical model in order to evaluate the repopulation in the single drug treatment. The simulations about tumor growth showed that population reached a saturation density accordingly with values of the parameter k . The density of both proliferative and migratory variants was not directed related to the generation of variants rates but by the parameter $\bar{N}$ and $\bar{\alpha}$. To some specific set of assigned values to the parameters k and $\bar{N}$, spatially was observed that diffuse growth of population. Concerning to the treatment, there was

resistance emergence, however, we observed different patterns in the repopulation according to the generation of variants rates, k and $\overline{N}$. Spatially, we observed the resistant cells go to drug gradient. The model, currently, has recovered qualitatively some experimental evidence linked to the co-existence of two subpopulations where one of them grows more than the other, diffuse growth of population and migration of resistant population to drug gradient.

Descriptors: neoplastic metastasis; drug therapy; mathematical computing

Sumário

1	Introdução	14
2	Objetivos	15
3	Revisão da Literatura	16
3.1	Tumor e Câncer: Fundamentos	16
3.2	Carcinogênese: modelos qualitativos e heterogeneidade tumoral	18
3.3	Modelo de Evolução Clonal	19
3.4	Modelo Hierarquico	19
3.5	Modelo da Evolução por limitação de substrato	21
3.6	Modelo sobre heterogeneidade 'go or growth'	22
3.7	Resistência ao Tratamento: quimioterapia e repopulação	23
3.7.1	Tratamento do Câncer	23
3.7.2	Quimiorresistência	24
3.7.3	Repopulação	25
3.7.4	Ferramentas de Modelamento	26
3.7.5	Cadeias de Markov	28
4	Métodos	29
4.1	Um Modelo Estocástico para o crescimento tumoral	29
4.2	Premissas	30
4.3	Taxa de duplicação celular	30
4.4	Taxa de migração e de morte	31
4.5	Escala temporal	31
4.6	Taxa de Geração de Variantes	32
4.7	Algoritmo	32
4.8	Probabilidades de transição da dinâmica de população	33

4.9	Modelo de Difusão de droga	34
4.10	Modelo Farmacodinâmico	36
4.11	Simulações	36
5	Resultados	39
5.1	A densidade de saturação da população é regulada pelos parâmetro k . .	39
5.2	O aumento na densidade de novas variantes não depende somente de ν . .	39
5.3	O parâmetro $\bar{\alpha}$ modula o aumento na taxa de migração	40
5.4	Os mapas de calor mostraram dois padrões espaciais de crescimento.. .	42
5.5	Repopulação	47
6	Discussão	55
7	Conclusão	58
	Referências Bibliográficas	59

Lista de Figuras

1	Extraída de [1], modelo qualitativo de evolução clonal	20
2	Extraída de [2], as células troncos tumorais (CTC) podem se autorrenovar bem como se diferenciar em células progenitoras	20
3	Extraída de [3]. Modelo qualitativo da evolução da carcinogêneses baseado na limitação de substrato. Em róseo claro estão as células hiperproliferativa, em azul células hipóxicas, em verdes células com metabolismo glicolítico, em amarelo células resistentes a acidez.	22
4	Extraída de [4], a emergência de duas população distintas, em verde uma população mais proliferativa, em vermelho uma população mais invasiva.	23
5	Extraído de [5], estudo experimental demonstrando a relação de ancestralidade entre as subpopulações dentro de um tumor primário e os sítios metastáticos. . .	25
6	Extraída de [6], a esquerda vê-se células ao redor de um vaso sanguíneo em um xenoenxerto de câncer cervical, a direita células ao redor de um vaso sanguíneo em um xenoenxerto de câncer de cólon, em preto células em proliferação marcada com Bromodeoxyuridina e em verde as células sob hipóxia marcada com pimonidazole.	26
7	Extraída de [6], representação ilustrativa do radientes de oxigênio, nutrientes e drogas.	27
8	Diagrama para representar as transições da dinâmica de população, as letras em grego indicam as taxas de cada uma das transições celulares.	29
10	Representação qualitativa da Eq. 4.3 conforme o valor do parâmetro $\bar{\alpha}_i$	31
11	Fluxograma representativo do algoritmo elaborado para simulação da dinâmica de população.	33
12	Representação da difusão da droga no espaço e tempo.	35

13	No gráfico 13a modelo farmacodinâmicos ajustado aos dados experimentais das células sensíveis à cisplatina. No gráfico 13b modelo farmacodinâmicos ajustado aos dados experimentais das células resistentes à cisplatina.	37
14	Gráficos mostrando a densidade de saturação da população em simulações com diferentes valores para os parâmetros $\bar{N}, \bar{\alpha}_i$ e k . (a) $\bar{\alpha}_i = A_i/5$ e $k = 1$. (b) $\bar{\alpha}_i = A_i/100$ e $k = 1$. (c) $\bar{\alpha}_i = A_i/5$ e $k = 10$. (d) $\bar{\alpha}_i = A_i/100$ e $k = 10$	40
15	Espaço de fase da densidade das variantes proliferativas e migratórias.	41
16	Espaço de fases das taxas de duplicação, migração e morte nas simulações acerca do crescimento. Na abscissa estão os valores de $\alpha_1(N), \delta_1(N)$ e $\rho_1(N)$ no tempo, na coordenada estão os valores de $\alpha_2(N), \delta_2(N)$ e $\rho_2(N)$ no tempo. . .	43
17	Mapas de calor referente as simulações no qual $k = 1$, $\nu = 1e-5$, $\bar{N} = 0.3N_T$, $\bar{\alpha} = A_i/5$. Quando aumenta o valor de $\bar{N}$ observa-se aumento de variantes proliferativas.	44
18	Mapas de calor referente as simulações no qual $k = 10$, $\nu = 1e-7$, $\bar{N} = 0.05N_T$, $\bar{\alpha} = A_i/5$. Observa-se que as células sobreviventes apresentam distribuição espacial difusa.	45
19	Mapas de calor referente as simulações no qual $k = 10$, $\nu = 1e-7$, $\bar{N} = 0.3N_T$, $\bar{\alpha} = A_i/100$. O aumento do valor de $\bar{N}$ neste contexto permitiu aumento na densidade das variantes migratória.	46
20	20a, 20b, 20c, 20d densidade total da população no tratamento no protocolo 1. 20e, 20f, 20g, 20h, densidade total da população no tratamento no protocolo 2.	49
21	21a, 21b, 21c e 21d, espaço de fases das densidades das variantes proliferativas e migratórias no protocolo 1. 21e, 21f, 21g e 21h, espaço de fases das densidades das variantes proliferativas e migratórias no protocolo 2.	50
22	Espaço de fases das taxas de duplicação, migração e morte, nas simulações acerca do tratamento. As figuras 22a, 22b, 22c e 22d se referem ao protocolo 1. As figuras 22e, 22f, 22g e 22h se referem ao protocolo 2. Na abscissa estão os valores de $\alpha_1(N), \delta_1(N)$ e $\rho_1(N)$ no tempo, na coordenada estão os valores de $\alpha_2(N), \delta_2(N)$ e $\rho_2(N)$ no tempo.	51

23	Evolução do valor do k ao ser modulado conforme a droga entra no sistema no protocolo 2.	52
24	Mapas de calor referente ao protocolo 1. Simulação cujo valores dos parâmetros foram $\nu = 10^{-7}$, $\overline{N} = 0.05N_T$ e $\overline{\alpha}_i = A_i/5$	53
25	Mapas de calor referente ao protocolo 1. Simulação cujo valores dos parâmetros foram $\nu = 10^{-7}$, $\overline{N} = 0.3N_T$ e $\overline{\alpha}_i = A_i/5$	54
26	Gráficos referentes a densidade de saturação da população conforme os valores dos parâmetros k , $\overline{N}$, $\overline{\alpha}_i$ e $\nu = 1e-7$ e $\nu = 3e-7$	65
27	Gráficos referentes a densidade de saturação da população conforme os valores dos parâmetros k , $\overline{N}$, $\overline{\alpha}_i$ e $\nu = 1e-5$ e $\nu = 1e-6$	66
28	Gráficos referentes a densidade de saturação da população conforme os valores dos parâmetros k , $\overline{N}$, $\overline{\alpha}_i$ e $\nu = 3e-5$ e $\nu = 3e-6$	67
29	Gráficos referentes a densidade das variantes proliferativa e migratória conforme os valores dos parâmetros k , $\overline{N}$, $\overline{\alpha}_i$ e $\nu = 1e-7$	68
30	Gráficos referentes a densidade das variantes proliferativa e migratória conforme os valores dos parâmetros k , $\overline{N}$, $\overline{\alpha}_i$ e $\nu = 3e-7$	69
31	Gráficos referentes a densidade das variantes proliferativa e migratória conforme os valores dos parâmetros k , $\overline{N}$, $\overline{\alpha}_i$ e $\nu = 1e-7$	70
32	Gráficos referentes a densidade das variantes proliferativa e migratória conforme os valores dos parâmetros k , $\overline{N}$, $\overline{\alpha}_i$ e $\nu = 3e-7$	71
33	Gráficos referentes a densidade das variantes proliferativa e migratória conforme os valores dos parâmetros k , $\overline{N}$, $\overline{\alpha}_i$ e $\nu = 3e-5$	72
34	Gráficos referentes a densidade das variantes proliferativa e migratória conforme os valores dos parâmetros k , $\overline{N}$, $\overline{\alpha}_i$ e $\nu = 3 \times 10^{-6}$	73
35	Gráficos referentes as taxas de duplicação, migração e morte, das duas variantes, conforme os valores dos parâmetros k , $\overline{N}$, $\overline{\alpha}_i$ e $\nu = 10^{-7}$	74
36	Gráficos referentes as taxas de duplicação, migração e morte, das duas variantes, conforme os valores dos parâmetros k , $\overline{N}$, $\overline{\alpha}_i$ e $\nu = 3 \times 10^{-7}$	75

37	Gráficos referentes as taxas de duplicação, migração e morte, das duas variantes, conforme os valores dos parâmetros k , $\overline{N}$, $\overline{\alpha}_i$ e $\nu = 10^{-5}$	76
38	Gráficos referentes as taxas de duplicação, migração e morte, das duas variantes, conforme os valores dos parâmetros k , $\overline{N}$, $\overline{\alpha}_i$ e $\nu = 10^{-6}$	77
39	Gráficos referentes as taxas de duplicação, migração e morte, das duas variantes, conforme os valores dos parâmetros k , $\overline{N}$, $\overline{\alpha}_i$ e $\nu = 3 \times 10^{-5}$	78
40	Gráficos referentes as taxas de duplicação, migração e morte, das duas variantes, conforme os valores dos parâmetros k , $\overline{N}$, $\overline{\alpha}_i$ e $\nu = 3 \times 10^{-6}$	79

*

Introdução

Charles Darwin em seu livro *A origem das espécies* escreveu – *lamento profundamente não ter me esforçado minimamente para entender os princípios da matemática, pois esta, parece dotar os homens de um sentido extra.*

A utilização de modelos matemáticos no estudo de fenômenos biológicos, em particular o câncer, tem sido cada vez mais frequente. A formulação de modelos teóricos demanda uma interação intensa com a comunidade de experimentalistas. Essa interação possibilita a identificação do fenômeno a ser estudado bem como a formulação de hipótese sobre os mecanismos subjacentes. A investigação dos mecanismos nem sempre é possível de ser realizada experimentalmente e, um modelo teórico constitui uma ferramenta complementar na corroboração de uma hipótese. Para tal uso dos modelos, é necessário validá-los na descrição de experimentos cujos fenômenos e mecanismos sejam conhecidos. Em seguida, pode-se extrapolar o uso do modelo sob novas condições experimentais.

Esta tese contempla o desenvolvimento um modelo descritivo acerca da dinâmica de população no câncer *in situ* no crescimento tumoral e tratamento. A novidade deste trabalho seria propor que a proliferação celular é regulada pelo tamanho da população, modulando as taxas com as quais as células duplicam, migram e morrem. Os resultados refletem qualitativamente nas evidências experimentais, no entanto, há limitações no tocante ao significado biológico de determinados parâmetros, deste modo abre-se uma perspectiva para o desenvolvimento de trabalhos visando aperfeiçoar o modelo permitindo a integração das abordagens teóricas e experimentais.

Objetivos

- Propor um algoritmo que simule o crescimento tumoral, em espaço bi-dimensional, onde as taxas de dinâmica populacional dependem do tamanho da população.
- Acoplar um modelo de difusão de drogas e um modelo farmacodinâmico, afim de avaliar o processo de repopulação.
- Ajustar modelo de resposta efetiva à droga aos dados experimentais de avaliação da viabilidade de células de câncer de pulmão à cisplatina.

Revisão da Literatura

Tumor e Câncer: Fundamentos

A palavra *karkinos*, que em grego significa "caranguejo", foi a primeira designação para câncer, proposta por volta de 400 a.C. por Hipócrates. Essa designação surgiu pela observação de um inchaço localizado com vasos sanguíneos em seu torno, que fez Hipócrates pensar num caranguejo enterrado na areia com as patas abertas em círculos [7]. Os *karkinos* de Hipócrates possivelmente eram inchaços – tumores – grandes, superficiais e visíveis a olho nu como cânceres de mama, de pele, de mandíbula, de pescoço e de língua [7]

Atualmente, define-se um *tumor* como o aumento no volume dos tecidos, quando se deve ao acúmulo de líquidos se chama *cisto*, quando há um aumento do número de células com crescimento autônomo, denomina-se *neoplasia* [8], [9], [10]. Do ponto-de-vista histológico¹, as neoplasias são caracterizadas por massas celulares cuja arquitetura apresenta menor nível de organização e estruturação quando comparadas aos tecidos normais.

Os tumores podem ser classificados de acordo com sua agressividade, isto é, o quão rápido invadem outros tecidos. Os tumores benignos são aqueles que crescem localizados, ou seja, não há invasão dos tecidos adjacentes. Acaso houver invasão dos tecidos adjacentes, o tumor é denominado de maligno, já temos neste ponto um quadro de câncer. Quando há disseminação para sítios distantes, configura-se *metástase* [10], [8], [11].

Pode-se também classificar os tumores com relação ao tecido de origem, assim temos os tumores epiteliais e não epiteliais. Os tumores epiteliais são denominados de carcinomas. Por exemplo, o epitélio de pulmões, fígado, vesícula biliar, pâncreas, esôfago, estômago e intestino são provenientes da camada celular interna, o endoderma.

¹Histologia é a disciplina dedicada ao estudo e caracterização dos tecidos.

A pele se forma a partir da camada celular embrionária externa, chamada de ectoderma, enquanto os ovários se originam da camada do meio, o mesoderma [10], [9], [11], [8], [2], [12].

A maior parte dos carcinomas podem ser divididos em dois grandes grupos: (1) carcinoma pavimento-celular, originado de células cuja função é a formação de uma camada celular para proteção; (2) adenocarcinomas, originado de células cuja função é secretar substâncias para ductos e cavidades [2].

A principal classe de cânceres não epiteliais deriva dos tecidos conjuntivos, são denominamos-os sarcomas, representam 1% dos tumores observado em oncologia clínica [2], [12]. Os sarcomas são derivados de diversos tipos de células mesenquimais ², tais como os fibroblastos, que secretam colágeno (componente da matriz extracelular), os adipócitos que armazenam gorduras, os osteoblastos que retém fosfato de cálcio na matriz de colágeno e os miócitos, os quais formam o músculo. Alguns tipos de sarcomas são os osteossarcoma, que acometem os ossos, e o liposarcoma que acometem as cartilagens [2], [10].

O segundo grupo de tumores não epiteliais são as leucemias que surgem nos tecidos que constituem o sangue, ou seja, tecidos hematopoiéticos. O termo leucemia significa "sangue branco" e refere-se as células malignas do tecido sanguíneo que circulam livremente e não são pigmentadas. Além disso, as leucemias podem ser classificadas de acordo com a linhagem de origem como sendo mielóide e linfóide. A leucemia mielóide ocorre quando há transformações malignas nos precursores dos eritrócitos ³; por sua vez, as leucemias linfóides ocorre quando há transformações malignas nos precursores dos linfócitos B e T [2], [10], [12], [8].

O terceiro e último grupos de tumores não epiteliais se desenvolvem a partir de células que formam diversos componentes do sistema nervoso central e periférico. Devido à origem embrionárias das suas células, são comumente denominado de neuroectodermas; alguns exemplos desses tumores são os glioblastomas [2], [10], [12], [8].

²células que possuem a capacidade de se diferenciar gerando outros tipos de células

³também chamado de hemácias, sua função primordial é transportar oxigênio pelo corpo

Carcinogênese: modelos qualitativos e heterogeneidade tumoral

O câncer é causado por alterações na estrutura ou na sequência de nucleotídeos do DNA, e/ou por alterações epigenéticas, e se desenvolve a partir do crescimento da população de *clones* ⁴ oriundos de uma célula fundadora, e, em decorrência de mutações adquiridas, promove a ramificação de subclones [13], [2], [5].

O processo de formação do câncer é denominado carcinogênese. Divide-se a carcinogênese em três etapas: (1) iniciação, ocorre quando algumas células sofrem mudanças irreversíveis na estrutura do DNA ou alguma mudança epigenética; (2) promoção, ocorre quando há a expansão de clones iniciados sob pressões seletivas microambientais; (3) progressão, ocorre quando surgem subpopulações com fenótipos malignos, isto é, presença de instabilidade genética ⁵, proliferação descontrolada e invasão tecidual [10], [14], [11].

À medida que a neoplasia cresce, aumenta a diversidade de clones de células tumorais. Portanto, afloram subpopulações de clones com diferentes genótipos e fenótipos tornando a massa tumoral heterogênea. Weinberg and Hanahan [15], [16], descreveram essas subpopulações propondo estruturalmente um conjunto de fenótipos observáveis durante o desenvolvimento do câncer, tais como sustentação de sinais proliferativos, evasão de supressores de tumor, resistência a morte celular, capacitação de imortalidade replicativa, indução de angiogênese, ativação da invasão e metástase, reprogramação do metabolismo e evasão do sistema imune.

Diversos modelos foram proposto ao longo do tempo para descrever a heterogeneidade tumoral, obviamente os modelos proposto não abarcam todas variáveis que explicam os fenótipos mencionados anteriormente. Mesmo assim, são úteis para compreensão da carcinogênese e trazem *insight* acerca da abordagem de tratamento.

⁴células geneticamente idênticas

⁵alta frequência de alteração tanto em nível de nucleotídeo do DNA quanto em nível de cromossomo, podendo ser reversível ou não

Modelo de Evolução Clonal

Evolução, em biologia, significa descendência com modificação. Os processos que geram modificações ao longo das gerações são classificados em aleatórios e adaptativos. [17], [18].

A mutação e a deriva genética são os principais mecanismos aleatório da evolução. A primeira é a força motriz que gera variabilidade na população, a segunda atua removendo a variabilidade. Dessa forma, ainda que novas variações na população sejam perdidas pela deriva genética, a mutação pode atuar adicionando variações [19], [20].

A seleção natural é o mecanismo adaptativo, o substrato da seleção natural são as variações herdadas que conferem sobrevivência e reprodução diferencial entre os indivíduos, isto é, o *fitness* [17], [18], [19], [20]. No caso específico do câncer, fala-se em evolução somática, isto é, acúmulo de variação na população que afeta capacidade de sobrevivência e proliferação [21].

Neste modelo, sugere-se que a instabilidade genética e a aquisição sequencial de mutações constituem a base da carcinogênese, caracterizada pela seleção de subpopulações derivadas de uma única célula de origem. Desse modo, a alteração genética inicial em uma célula normal induzida por um carcinógeno, por exemplo, poderia conferir uma vantagem seletiva para a célula. Ao longo do tempo, surgem outras variantes celulares com novas alterações genéticas que favorecem a proliferação, a sobrevivência e o crescimento invasivo [1]. Fig. 1.

Portanto, assim como foi proposto por Charles Darwin na teoria da seleção natural, pressões seletivas existentes no microambiente tumoral permitem a expansão de clones de maior *fitness*, enquanto outros são eliminados ou entram em dormência [2].

Modelo Hierarquico

O modelo evolução clonal estabelecia que todas as células tumorais tinham potencial tumorigênico, porém estudos a técnica de separação de células ativadas por fluo-

Figura 1: Extraída de [1], modelo qualitativo de evolução clonal

rescência (FACS)⁶ revelaram em tumores de mama, cérebro e leucemia, que havia uma população minoritária e outra majoritárias, as populações minoritárias ao serem transplantada para camundongos conseguiam gerar tumor, enquanto que as populações majoritárias não conseguiram [22], [23].

Figura 2: Extraída de [2], as células troncos tumorais (CTC) podem se autorrenovar bem como se diferenciar em células progenitoras

Assim, a hierarquia tecidual observada em tecidos normais, na qual uma célula com potencial pluripotente diferencia-se gradualmente nos outros tipos celulares, poderia ser observada também em tumores. Neste modelo, destaca-se às células tronco tumorais, que são responsáveis pela manutenção do tumor por apresentar capacidade de autorrenovação, mas também pode diferenciar em células progenitoras, estas podem se diferen-

⁶abreviação do inglês para Fluorescence Activated Cell Sorting

ciar também até que células com baixa capacidade proliferativa sejam geradas [24], [2]. Portanto, neste caso a autorrenovação e diferenciação celular dirigiriam a carcinogêneses

Modelo da Evolução por limitação de substrato

O modelo de evolução clonal propunha que a aquisição sequencial de mutações conferiria vantagem seletiva para os clones frente as pressões seletivas. Todavia, este modelo não considera as pressões seletivas específicas no microambiente tumoral, os fenótipos que conferem sobrevivência e reprodução, e, por fim, mudanças ambientais provocadas pelas células tumorais.

Em câncer, mesmo as células com disponibilidade de oxigênio podem realizar glicólise, fenômeno conhecido como glicólise aeróbia ou Efeito de Warbug. A glicólise ⁷, converte glicose em piruvato, isto realizado, as mitocôndria oxidam piruvato gerando CO_2 e H_2O , e, o rendimento energético permite manutenção das funções. No entanto, quando há baixa tensão de oxigênio (hipóxia), há conversão do piruvato em ácido láctico e o rendimento energético é baixo [25], [3] [11].

Estudos de tomografia com emissão de pósitrons usando o análogo da glicose ¹⁸Fluorodeoxiglicose demonstraram que células tumorais captam mais glicose que células normais e, adicionalmente, a capacidade de captação de glicose se correlaciona com agressividade do tumor [26]. Curiosamente, ensaios *in vitro* conseguem recuperar o que é observado *in vivo*; por exemplo, a linhagem de tumor mamário não invasiva MCF-7 apresenta baixas taxas de glicólise aeróbia quando comparada a MDA-MB-231 que é muito invasiva. Isso indica que o metabolismo da glicose não é somente uma adaptação a hipóxia mas uma assinatura de agressividade [3], [27].

Em decorrência do crescimento da população, algumas células alcançam o limiar de difusão do oxigênio. Desse modo, a hipóxia induz a apoptose ou adaptação pela sobre-regulação da glicólise; conseqüentemente, há acidificação do meio extracelular, em seguida há seleção para fenótipos que conferem motilidade as células ou que superexpressam transportadores de membrana que expõem H^+ , além disso, a acidez gerada

⁷literalmente quebra da glicóse.

pode degradar a matriz extracelular permitindo a invasão tecidual [3], [27]. Portanto, a limitação dos substratos induziria a geração de um conjunto de células proliferativas, glicolíticas (sobre-regula a glicólise), hipóxicas e ácido-láticas (produzem ácido láctico), caracterizando assim a heterogeneidade.

Figura 3: Extraída de [3]. Modelo qualitativo da evolução da carcinogênese baseado na limitação de substrato. Em róseo claro estão as células hiperproliferativas, em azul células hipóxicas, em verdes células com metabolismo glicolítico, em amarelo células resistentes à acidez.

Modelo sobre heterogeneidade 'go or growth'

Baseado no conceito de que a duplicação do DNA e o citoesqueleto não poderiam ser usados para divisão e migração simultaneamente, logo hipotetizou-se que a migração e a divisão celular são mutuamente exclusivas [28]. Adicionalmente, os estudos com esferóides provenientes de tumores de cérebro pós-operatório, em co-cultura com agregados de fetos murinos e sob observação de microscopia confocal, mostraram não haver relação entre invasão e índice de divisão celular [29].

Dados oriundos de *microarray*, metodologia que nos permite avaliar quais genes estão expressos em tecido, mostram que no contexto de melanoma parece haver subpopulações com assinaturas de expressão gênica típica de divisão e subpopulações com assinatura de expressão gênica típica de invasão. Estas subpopulações, ao serem injetadas em modelos murinos, apenas as que têm assinaturas típicas de divisão celular conseguem gerar tumores em curto prazo, enquanto que as que têm assinatura de invasão só conseguem gerar tumores em longo prazo [30]. Adicionalmente, existem fatores

de transcrição, tais como MITF (Microftalmia Transcriptor Factor), que desempenha papel fundamental na proliferação, diferenciação e invasão no contexto do melanoma/melanócitos, funcionando como um reostato, conforme a quantidade de fatores microambientais e fatores de transcrições que o regulam, tais como o Brn-2 [31], [4]

Os achados experimentais mostram que quando MITF promove a diferenciação e, sofre regulação negativa mediada por Brn-2, a célula passa a se duplicar, no entanto quando MITF promove duplicação, a regulação negativa mediada por Brn-2, a célula passa a ser invasiva [4, 30, 31]. Assim, a heterogeneidade pode ser caracterizada como um conjunto de células que predominantemente duplicam e um conjunto de células que invadem tecidos.

Figura 4: Extraída de [4], a emergência de duas população distintas, em verde uma população mais proliferativa, em vermelho uma população mais invasiva.

Resistência ao Tratamento: quimioterapia e repopulação

Tratamento do Câncer

As modalidades de tratamento do câncer são; quimioterapia, radioterapia, cirurgia, terapia alvo dirigida e imunoterapia. Pode haver combinações entre as modalidades; o critério de escolhas das modalidade é decorrente dos ensaios clínicos e do estadiamento do paciente. O estadiamento nos diz o tipo de tumor, o tamanho, se há preseça de nódulos linfáticos e presença de metástase [2], [9].

As quimioterapias podem ser citotóxicas, ou seja, drogas que causam danos ao DNA induzindo à morte celular, ou citoestáticas, quando apenas reduzem o crescimento da po-

pulação da população sem necessariamente causar danos ao DNA. A administração da quimioterapia é sistêmica, contudo costuma-se ser indicada tanto para tumores primários quanto para metástase. Eventualmente, no contexto de tumores sólidos, usa-se a quimioterapia no tratamento adjuvante, isto é, depois da cirurgia, e, no tratamento neoadjuvante, isto é, antes da cirurgia [2], [9].

Quimiorresistência

A quimiorresistência⁸ ocorre devido a fatores intrínsecos às células ou a fatores micro-ambiental, deste modo classificaremos a quimiorresistência em intrínseca ou ambiental.

Fatores intrínsecos. (1) Genótipo, algumas células são capazes de bombear drogas para o meio externo devido aos receptores de resistência à múltiplas drogas (MDR, sigla em inglês) e aumento do reparo do DNA. (2) Citocinética, algumas drogas só conseguem matar células que estão em divisão celular, portanto tumores com uma pequena fração de células passando por mitose são relativamente resistentes. (3) Evolução; a população tumoral é heterogênea, esta última, revela uma filogenia, ou seja, há uma relação de ancestralidade entre as subpopulações dentro de um tumor primário, e, entre tumor primário e metástase, logo, uma terapia poderia eliminar um determinado *clados*⁹ enquanto outros sobreviveriam.

Fatores extrínsecos. (1) Perfusão, as estruturas e arquiteturas dos vasos sanguíneos em tumores são diferentes dos tecidos normais, isto exerce influência na distribuição de recursos, desta forma aumentaria a fração cujo o acesso a droga se torna difícil. (2) Pressão Intersticial, em tecidos normais uma parte do conteúdo do plasma¹⁰ saem do vasos sanguíneos, é absorvido pelas células no interstício e a outra parte é absorvida por vasos linfáticos, em tumores não há absorção apropriada do plasma, logo, reduz-se o fluxo de droga dentro das células. (3) Hipóxia, muitos quimioterápicos requerem a intermediação de radicais de oxigênio para exercer atividade citotóxica. (4) Acidez extracelular, aumenta a expressão de glicoproteína-p e algumas drogas precisam de um

⁸resistência a quimioterapia

⁹é um grupo de células originadas de um ancestral comum

¹⁰o plasma é a parte líquida do sangue onde se encontra dissolvido nutrientes e hormônios

Figura 5: Extraído de [5], estudo experimental demonstrando a relação de ancestralidade entre as subpopulações dentro de um tumor primário e os sítios metastáticos.

pH ótimo para exercer sua atividade.

Repopulação

No contexto da radioterapia, fora proposto uma sequência de processos presentes na resposta ao tratamento, os 5 r's: (1) radiorresistência, (2) reparo, (3) repopulação, (4) redistribuição e (5) reoxigenação. A radiorresistência e reparo diz respeito às características intrínsecas da célula como, por exemplo, reparo ao DNA, a repopulação é a proliferação de células sobreviventes entre os intervalos de tratamento, a redistribuição trata-se de células que passam a estar em fase do ciclo celular mais favorável à ação da radiação e, por fim, a reoxigenação permite as células resistentes à radiação, por estarem localizadas em região de hipóxia, terem acesso ao oxigênio tornando-as mais sensíveis. Estes processos ocorrem também na quimioterapia, haja vista que ambas modalidades de tratamento estão sujeitas a protocolos, sobretudo intervalos entre tratamento [32], [33], [34]. Ver figuras 6 e 7.

A quimioterapia é administrada a cada três semanas, permitindo que as células dos tecidos normais, sobretudo as células precursoras dos elementos do sistema imune na medula óssea, possam recuperar-se dos danos sub-letais, e assim repopularem [32],

[33], [34]. Portanto, assim como células normais, as células tumorais sobreviventes ao danos dos quimioterápicos repopulam. Assim, há um aumento da quantidade de célula que a quimioterapia tem que erradicar, contribuindo para falha do tratamento.

Existem alguns mecanismos que disparam a repopulação, tais como; (1) **Proliferação de células distante do vaso sanguíneo**, as células distante são poupadas da quimioterapia e passam a ter espaço e recursos para sobrevivência e proliferação [35], [36], [37]. (2) **Alças de sobrevivência**; a ação das drogas podem induzir apoptose ¹¹, alguns sub-produtos oriundos da apoptose; tais como prostagladina (PGE) ou Fator Ativador de Plaquetas (PAF), são secretados e estimulam as células sobreviventes a proliferarem [38], [39]. (3) **Células-troncos tumorais**: esta são células resistentes ao tratamento e estariam por trás da repopulação.

Figura 6: Extraída de [6], a esquerda vê-se células ao redor de um vaso sanguíneo em um xenoenxerto de câncer cervical, a direita células ao redor de um vaso sanguíneo em um xenoenxerto de câncer de cólon, em preto células em proliferação marcada com Bromodeoxyuridina e em verde as células sob hipóxia marcada com pimonidazole.

Ferramentas de Modelamento

Na abordagem teórica usa-se ferramentas oriundas dos vários ramos da matemática, tais como Álgebra, Geometria, Cálculo, Probabilidades, etc. Em posse de tais ferramentas, podemos desenvolver modelos Determinísticos ou Estocásticos. Nos modelos determinístico, dadas as condições iniciais e os parâmetros, só há uma condição final. Nos modelos estocásticos, dadas as condições iniciais e os parâmetros, considerando

¹¹ processo de morte celular programada

Figura 7: Extraída de [6], representação ilustrativa do radientes de oxigênio, nutrientes e drogas.

a aleatoriedade do sistema, haverá várias condições finais. Algumas das ferramentas usadas nos modelos determinístico são as *Equações Diferenciais Ordinárias* (EDO)¹², as *Equações Diferenciais Parciais* (PDE)¹³, *Autômato Celular*¹⁴ e *Probabilidades*.

A Teoria de Probabilidades é um ramo da matemática que analisa fenômenos aleatórios mediante estudo das probabilidades. Probabilidade é uma quantidade atribuída a ocorrência de algum evento, representada por um número entre 0 e 1. O objeto central das probabilidades são as *Variáveis Aleatórias* e os *Processos Estocásticos*. Uma variável aleatória é um evento na qual uma probabilidade lhe é atribuída, podendo ser discreta, por exemplo, número de filhos, ou contínua, por exemplo, temperatura. Um processo estocástico é uma conjunto de variáveis aleatórias cuja probabilidade atribuída está sujeita à variações ao longo do tempo e/ou espaço. As mudanças de estados das variáveis aleatórias são denominadas de transição de estado e à probabilidade associada a mudança de estado são denominadas de probabilidades de transição.

O desenvolvimento de um modelo passa por algumas etapas: (1) levantamento da hipótese, (2) identificação de processos que regulam a dinâmica do sistema, (3) proposição de uma ferramenta matemática, considerando os parâmetros representativos dos processos e as variáveis do sistema, (4) resolução do modelo matemático através de técnicas numéricas e analíticas e (5) verificação da consistência dos resultados com a hipótese e com os dados experimentais [40], [41], [42].

¹²trata-se de equações que relacionam uma função desconhecida com sua derivada

¹³equações que relacionam duas ou mais funções desconhecida com suas derivadas parciais

¹⁴autômatos são máquinas abstratas que carregam instruções arbitrárias, um autômato celular é um conjunto de autômatos arranjados em uma grade, onde cada autômato ocupa um nó na grade

Cadeias de Markov

As cadeias de Markov são um processo estocástico baseado em probabilidade condicional, ou seja, a probabilidade de um evento acontecer dado a ocorrência de um evento subjacente. Desta forma, na Cadeias de Markov, a probabilidade de transição para o estado futuro de uma variável depende somente do estado atual, conforme a Eq.3.1.

$$\mathbb{P}(X_n = x_n \mid X_{n-1} = x_{n-1}, X_{n-2} = x_{n-2}, \dots, X_0 = x_0) = Pr(X_{n+1} = x \mid X_n = x_n) \quad (3.1)$$

Tomemos um conjunto de variáveis aleatórias representado por $X = \{X_1, \dots, X_n\}$, e um conjunto de estados representado por $n = \{n_1, \dots, n_j\}$. A cada variável aleatória é atribuída uma probabilidade de transição presente no conjunto $x = \{x_1, \dots, x_n\}$. Portanto, dado uma variável aleatória, a transição para o estado X_{n+1} cuja probabilidade de transição é x_{n+1} depende da ocorrência do estado X_n , cuja probabilidade de transição é x_n . Modelos estocásticos são importantes no estudo de dinâmica de células tumorais e têm sido propostos com base em dados clínicos de pacientes com câncer de pâncreas. Haeno e Michor [43] estimaram a probabilidade de formação de metástase antes do diagnóstico bem como a quantidade e distribuição da metástase entre os órgãos. Por meio da utilização de Cadeias de Markov os autores estimaram a taxa de transição de tumor primário para metástase entre os órgãos, sugerindo que, reduzindo-se as taxas de crescimento nos estágios iniciais poderia ser mais efetivo do que a realização de cirurgia.

Métodos

Um Modelo Estocástico para o crescimento tumoral

Foi proposto uma aproximação qualitativa para o crescimento tumoral. O tecido tumoral será representado por uma grade bi-dimensional, $n \times n$, com $n = 70$, a quantidade total de nós será representada por N_T , cada célula ocupa um nó da grade, a distância entre dois nós é de 1 unidade arbitrária. Consideramos que as células passam pelos seguintes processos efetivos de dinâmica populacional: duplicação, morte, migração, quiescência e geração de variantes. Portanto, temos que: α_i denota a taxa de duplicação da célula do tipo i ; δ_i denota a taxa de migração da célula do tipo i ; ρ_i denota a taxa de morte da célula do tipo i ; σ_i denota a taxa de quiescência da célula do tipo i e ν denota a taxa de geração de variantes.

Figura 8: Diagrama para representar as transições da dinâmica de população, as letras em grego indicam as taxas de cada uma das transições celulares.

A população será composta de duas variantes representada pelo conjunto $i = \{1, 2\}$, em verde estão as variantes do tipo 1, e, em vermelho, as variantes do tipo 2. A heterogeneidade da população será caracterizada pela diferença entre as taxas onde $\alpha_1 > \alpha_2$,

$\delta_1 < \delta_2$, $\rho_1 > \rho_2$ e $\sigma_1 < \sigma_2$, neste trabalho as variantes do tipo 1 serão denominada de proliferativa, e as do tipo 2 de migratória.

Premissas

- **Premissa 1.** A taxa de duplicação diminui a medida em que a população aumenta, isto é, α_i e N são inversamente proporcionais.
- **Premissa 2.** As taxa de migração e morte aumentam a medida em que a população aumenta, isto é, δ_i e ρ_i são diretamente proporcionais a N e inversamente proporcional a α_i .

Taxa de duplicação celular

Indica-se por $\alpha_i(N)$, a taxa de duplicação da variante do tipo i quando o tamanho da população for N , A_i indica a taxa máxima de duplicação da variante do tipo i , $\bar{N}$ o tamanho da população para qual a $A_i = A_i/2$, por fim, k indica a suavidade de transição entre os valores máximo e mínimo de $\alpha_i(N)$. Nominalmente, temos:

$$\alpha_i(N) = \frac{A_i \bar{N}^k}{\bar{N}^k + N^k}, \quad (4.1)$$

que é uma função sigmoidal. A Eq. 4.1, descreve uma taxa de duplicação que é inversamente proporcional ao tamanho efetivo da população

(a)

Taxa de migração e de morte

Indica-se por D_i a taxa máxima de migração da variante do tipo i , R_i a taxa máxima de morte da variante do tipo i . De acordo com as premissas adotadas, δ_i e ρ_i são inversamente proporcionais a α_i , deste modo propõe-se uma função que descreve a proporcionalidade entre as taxas;

$$f(\alpha_i) = \frac{\bar{\alpha}_i}{\alpha_i + \bar{\alpha}_i} \quad (4.2)$$

Assim, temos que $\delta_i(\alpha_i) = D_i f(\alpha_i)$ e $\rho_i(\alpha_i) = R_i f(\alpha_i)$, logo, plugando a Eq 4.1 na Eq. 4.2 temos a Eq. 4.3.

$$g(N) = \frac{\bar{\alpha}_i(\bar{N}^k + N^k)}{A_i \bar{N}^k + \bar{\alpha}_i(\bar{N}^k + N^k)} \quad (4.3)$$

Conforme a figura 10a, quando $\alpha_i(N)$ atinge um dado valor, indicado por $\bar{\alpha}_i$, a população teria um dado tamanho, logo, $\bar{\alpha}_i$ é a taxa de duplicação na qual $\delta_i = D_i/2$ e $\rho_i = R_i/2$.

Figura 10: Representação qualitativa da Eq. 4.3 conforme o valor do parâmetro $\bar{\alpha}_i$.

Escala temporal

Durante um dado intervalo de tempo Δt a quantidade esperada de células realizando duplicação ($L_\alpha(i)$), migração ($L_\delta(i)$), morte ($L_\rho(i)$) e quiescência ($L_\sigma(i)$) satisfaz: $L_r(i) \propto r_i N_i \Delta t, r = \alpha, \delta, \rho, \sigma; i = \{1, 2\}$ e a quantidade total de transições que

ocorrem durante Δt é $Q = \sum_{i=1}^2 \sum_{r \in T} L_r(i)$, em que $T \equiv \alpha, \delta, \rho, \sigma$. Esta expressão pode ser usada para estimar o intervalo de tempo para uma simples transição ocorrer: $\Delta t \propto \frac{1}{\sum_{i=1}^2 \sum_{r \in T} r_i N_i}$ e a probabilidade de ocorrência de uma transição durante Δt é $N_i r_i \Delta t$ com $i = \{1, 2\}$ e $r \in T$.

Portanto o tempo será incrementado como segue abaixo;

$$t_j = t_{j-1} + \frac{1}{\alpha_1 N_1 + \alpha_2 N_2 + \delta_1 N_1 + \delta_2 N_2 + \rho_1 N_1 + \rho_2 N_2 \sigma_1 N_1 + \sigma_2 N_2}, \quad (4.4)$$

onde j significa iteração. Sumarizando, o tempo necessário para todas as transições ocorrerem é o inverso do produto das taxas com o tamanho da população da variante do tipo i .

Taxa de Geração de Variantes

As variantes proliferativa ao se duplicarem podem gerar duas células filhas migratórias com probabilidade P_ν como mostrado abaixo na Eq.4.5

$$P_\nu = 1 - \exp\left(-\frac{N_1 \nu}{\alpha_1}\right) \quad (4.5)$$

Esta equação foi adaptada de [44], no contexto original esta distribuição exponencial usada para calcular a probabilidade de uma célula com mutação surgir em um dado tempo t quando a população atingir um dado tamanho N . A nossa aproximação é que a medida em que o período necessário para as células duplicarem for diminuindo aumentaria a probabilidade de gerar variantes migratórias. As células do tipo 1 ao se duplicarem podem herdar a variação do tipo 2, enquanto que o inverso não ocorre.

Algoritmo

A cada iteração uma célula é escolhida aleatoriamente e a probabilidade de algumas transições são calculadas. Quando a célula tem um ou mais vizinhos vazios as transições possíveis serão duplicação, migração e morte, todavia quando as células têm

vizinhos vazios, as transições possíveis são quiescência ou morte. As variantes proliferativas apenas geram migratórias quando duplicam, o contrário não ocorre. Sempre que as transições ocorrem o tempo será incrementado de acordo com a Eq. 4.4. O código foi escrito usando a linguagem de programação MatLab R2015a, o algoritmo está disponibilizado no Anexo II.

Figura 11: Fluxograma representativo do algoritmo elaborado para simulação da dinâmica de população.

Probabilidades de transição da dinâmica de população

O cálculo das probabilidades levam em consideração o quanto cada taxa de dinâmica populacional contribui para o crescimento da população tumoral em relação às outras taxas.

As Eq. 4.6, 4.7 4.8 representam as probabilidades das transições da dinâmica populacional possíveis quando há nós vizinhos não ocupados ao redor do nó sorteado,

$$P_{\alpha_i} = \frac{\alpha_i(N)}{\alpha_i(N) + \delta_i(N) + \rho_i(N)}, \quad (4.6)$$

$$P_{\delta_i} = \frac{\delta_i(N)}{\delta_i(N) + \alpha_i(N) + \rho_i(N)}, \quad (4.7)$$

$$P_{\rho_i} = \frac{\rho_i(N)}{\rho_i(N) + \alpha_i(N) + \delta_i(N)}. \quad (4.8)$$

A Eq.4.9 e a Eq. 4.10 representam as probabilidades das transições da dinâmica populacional quando não há vertices vizinhos vazios ao redor do nó sorteado.

$$P_{\rho_i} = \frac{\rho_i}{\rho_i + \sigma_i} \quad (4.9)$$

$$P_{\sigma_i} = \frac{\sigma_i}{\rho_i + \sigma_i} \quad (4.10)$$

Modelo de Difusão de droga

Para estudar o processo de repopulação, foi acoplado um modelo de difusão de drogas. Recorreu-se à equação da difusão, mais especificamente a solução exata. Assume-se que o microambiente tumoral é um meio viscoso em as partículas viajam isotropicamente, isto é, em velocidades iguais.

A Eq. 4.11 descreve a difusão de uma droga num espaço bidimensional ao longo do tempo. Considera-se que no instante inicial, $t = 0$, uma quantidade c_0 de droga é injetada na posição (x_0, y_0) do espaço bidimensional. A concentração da droga no instante de tempo t nas posição (x, y) é indicada por $c(x, y, t)$. A constante de difusão da droga no meio viscoso será indicada por Δ . Abaixo apresentamos a equação que descreve a difusão da droga.

$$c(x, y, t) = \frac{c_0}{4\pi t \Delta} \exp \left[-\frac{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}{4t \Delta} \right] \quad (4.11)$$

Num dado instante de tempo t a concentração de droga possui o perfil de uma distribuição gaussiana centrada em (x_0, y_0) com variância $2t\Delta$. Sabe-se que para $t \approx 0$,

a razão $\left[-\frac{(x-x_0)^2+(y-y_0)^2}{4t\Delta}\right]$ tende ao infinito, assim, $\exp\left[-\frac{(x-x_0)^2+(y-y_0)^2}{4t\Delta}\right]$ tende a zero, isto é, a concentração de droga no entorno do ponto de entrada no sistema seria nula. Por conseguinte, razão $\frac{c_0}{4\pi t\Delta}$ tende ao infinito quando $t \approx 0$, isto é, a concentração de droga no ponto de entrada antes da entrada permanece em valores máximo. Portanto, conforme t aumenta, a concentração de droga diminui no espaço proporcionalmente ao coeficiente de difusão. Neste trabalho, será assumido que $t = 1$, isto é a droga entra e será calculado a probabilidade de morte levando em consideração a concentração de droga em cada ponto da grade.

Salientando que o modelo de difusão de droga somente foi acoplado para avaliar a dinâmica de população no contexto de morte induzida por tratamento quimioterápico, este trabalho não teve como objetivo estudar aspectos específicos da difusão e indução da morte por quimioterapia. Na figura 12 mostramos alguns frames ilustrando qualitativamente a difusão definida na 4.11.

Figura 12: Representação da difusão da droga no espaço e tempo.

Modelo Farmacodinâmico

A Eq. 4.12 descreve a viabilidade da variante do tipo i em função da concentração de droga. Denota-se por $\bar{c}_i$ a concentração de droga que reduz a viabilidade máxima da variante do tipo i na metade, l_i a suavidade da transição entre os valores máximo e mínimo da viabilidade da variante do tipo i .

$$v_i(c) = \frac{\bar{c}_i^{l_i}}{\bar{c}_i^{l_i} + c^{l_i}} \quad (4.12)$$

A Fig. 13a e 13b mostram dados experimentais gentilmente cedidos pelo Dr. Tharcísio Tortelli Jr, pesquisador do Centro de Investigação Translacional do Câncer do ICESP. A Eq. 4.12 foi ajustada a estes dados experimentais usando a função nativa *lsqcurvefit*, baseada no método dos mínimos quadrado, do ambiente de programação MatLab.

O tratamento estudado neste trabalho foi com uma única droga, aplicada a cada 21 unidades de tempo arbitrárias, as variantes proliferativas são consideradas como sensíveis enquanto que as migratórias são consideradas como resistente.

O experimento foi realizado com células de câncer de pulmão NSCLC A549, estas foram cultivadas em meio de cultura HAMF12 suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram plaqueadas em placa de 96 poços (3000 células/poço) sendo tratadas com doses crescente de cisplatina por 72 horas. A resistência a cisplatina foi induzida por tratamento prévio com $1\mu\text{M}$ de cisplatina por 72 horas. A análise da viabilidade celular foi feita através do ensaio de MTT (Cf: 1 mg/ml) onde as células foram incubadas em incubadoras de CO_2 (5%) a 37°C por 2 horas no escuro. Após a incubação, removeu-se a solução com MTT e adicionou-se $150\mu\text{L}$ de DMSO para a completa lise celular. Após a homogeneização dos poços, utilizou-se um leitor de microplaca (540 nm) para a leitura da absorbância.

Simulações

Foram realizadas várias simulações baseado na combinação dos valores entre os parâmetros. Conforme fora explicitado, k , ν e $\bar{N}$ não dependem das variantes, já $\bar{\alpha}$, A , D

Figura 13: No gráfico 13a modelo farmacodinâmicos ajustado aos dados experimentais das células sensíveis à cisplatina. No gráfico 13b modelo farmacodinâmicos ajustado aos dados experimentais das células resistentes à cisplatina.

e R por sua vez, dependem das variantes. Tomando o conjunto $p_s = \{k, \nu, \overline{N}, \overline{\alpha}, A, D, R\}$, foram propostos conjuntos de simulações onde A_i , D_i and R_i foram atribuídos com um único valor, enquanto que k , ν , $\overline{N}$ e $\overline{\alpha}$ foram atribuídos com valores diferentes em cada grupo p_s , onde $s = \{1, \dots, 48\}$, ver tabela 4.11.

As simulações envolvendo o tratamento seguiram o que foi descrito acima, todavia, propõem-se dois protocolos de tratamento. No protocolo 1, somente uma droga entra no sistema a partir do momento em que a população atinge 30% da saturação da grade, depois disso, a droga entra novamente a cada 21 unidades arbitrárias de tempo, por fim, o valor do parâmetro k permanece fixo. No protocolo 2, somente uma droga entra no sistema a partir do momento em que a população atinge 30% da saturação da grade, depois disso, a droga entra novamente a cada 21 unidades arbitrárias de tempo, por fim, ao contrario de anteriormente, o valor do parâmetro k é modulado conforme a Eq. 4.13.

$$k_j = k_{j-1} + \frac{N_{j-1} - N_j}{N_{j-1}} \quad (4.13)$$

Assim, j representaria a iteração após a droga entrar no sistema, enquanto que $j-1$ a iteração antes da droga entrar no sistema. A Eq. 4.13 foi proposta arbitrariamente com objetivo de simular um tratamento onde a droga afetasse o valor de k .

parâmetro	proliferativa	migratória	unidade (U.A)
A	1	1/4	t^{-1}
D	1/4	1	t^{-1}
R	1/10	1/100	t^{-1}
$\bar{N}$	$0.05N_T, 0.3N_T$		N/L^2
$\bar{\alpha}$	$A_i/5, A_i/100$		t^{-1}
k	1,10		-
ν	$10^{-7}, 3 \times 10^{-7}, 10^{-6}, 3 \times 10^{-6}, 10^{-5}, 3 \times 10^{-5}$		-

Tabela 1: Tabela de parâmetros.

Resultados

A densidade de saturação da população é regulada pelos parâmetro k

Observou-se nas simulações que quanto maior o valor do parâmetro k , menor seria a densidade de saturação da população, figura 14d. Além disso, nas simulações em que $k = 1$, $\bar{N} = 0.05N_T$ e $\bar{\alpha} = A_i/5$, observa-se que a densidade da população, em longo prazo, suplanta a densidade da população nas simulação em que $k = 1$, $\bar{N} = 0.3N_T$ e $\bar{\alpha} = A_i/5$, figura 14a. Nas simulações em que $\bar{\alpha}_i = A_i/100$, conforme a figura 14b, a densidade de saturação é maior quando $\bar{N} = 0.3N_T$. Os resultados das simulações presente na figura 14, são referentes as simulações nas quais o valor de $\nu = 1e-5$, os resultados acerca da densidade de saturação em que ν recebe outros valores estão presente nos Anexos I.

O aumento na densidade de novas variantes não depende somente de ν

A figura 15 nos mostra uma síntese dos resultados acerca da densidade das variantes em todas simulações de acordo com os parâmetros ν , k , $\bar{\alpha}$ e $\bar{N}$. Para $k = 1$, $\bar{N} = 0.05N_T$ e $\bar{\alpha}_i = A_i/5$ a densidade de variantes proliferativa crescem até certo limiar, a partir disso, a densidade das variantes migratórias começam a crescer dominando a grade, ver figuras 15a à 15f. Todavia, nas simulações em que $\bar{\alpha}_i = A_i/100$ a densidade das variantes migratórias só ultrapassam as proliferativas nas simulações em que $\nu \geq 3 \times 10^{-6}$, ver figuras 15d à 15f. Nas simulações em que $\bar{N} = 0.3N_T$ e $\bar{\alpha}_i = A_i/5$ as variantes proliferativas dominam para todo $\nu \leq 3 \times 10^{-5}$, ver figuras 15a à 15f, enquanto que, nas simulações em que $\bar{N} = 0.3N_T$ e $\bar{\alpha}_i = A_i/100$ as variantes proliferativas dominam para todo $\nu \leq 10^{-5}$, ver figuras 15a à 15f.

Para $k = 10$, a densidade das variantes migratórias suplantam as proliferativas para todos valores de ν . Além disso, nas simulações em que $\bar{N} = 0.05N_T$ as variantes pro-

Figura 14: Gráficos mostrando a densidade de saturação da população em simulações com diferentes valores para os parâmetros $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e k . (a) $\bar{\alpha}_i = A_i/5$ e $k = 1$. (b) $\bar{\alpha}_i = A_i/100$ e $k = 1$. (c) $\bar{\alpha}_i = A_i/5$ e $k = 10$. (d) $\bar{\alpha}_i = A_i/100$ e $k = 10$.

liferativa tenderam a extinção, enquanto que nas simulações em que $\bar{N} = 0.3N_T$, houve sobrevivência de ambas variantes, ver figuras 15g e 15h. Todas as simulações para $k = 10$ são qualitativamente semelhantes, portanto, o restante poderão ser encontradas juntamente com os gráficos para densidade das variantes no Anexo II.

O parâmetro $\bar{\alpha}$ modula o aumento na taxa de migração

Neste trabalho, o $R_1 > R_2$, isto explicaria a morte massiva das variantes proliferativas nas simulações em que $k = 10$, pois como mostra as figuras 16e, 16f, 16g e 16h, $\rho_1(N)$, aumenta enquanto que $\rho_2(N)$ não aumenta.

Quando $k = 1$, nas simulações onde $\bar{\alpha}_i = A_i/100$, ambos $\delta_1(N)$ e $\delta_2(N)$ atinge valores menores quando comparado as simulações onde $\bar{\alpha}_i = A_i/5$, figuras 16b, 16d.

Figura 15: Espaço de fase da densidade das variantes proliferativas e migratórias.

Todavia, quando $k = 10$, observa-se um aumento no $\delta_1(N)$ e $\delta_2(N)$ independente dos parâmetros $\bar{N}$ e $\bar{\alpha}_i$, figuras 16e, 16f, 16g e 16h.

Salientando que não houve diferença qualitativa/quantitativa na variação dos valores das taxas aqui discutidas em relação aos valores atribuídos a ν . Os gráficos com mais detalhes sobre as taxas de duplicação, migração e morte, para as duas subpopulações em todas as simulações estão presentes no Anexo II, figuras 35 à 40

Os mapas de calor mostraram dois padrões espaciais de crescimento.

Foi observado dois padrões espaciais nos mapas de calor, (1) difuso e (2) denso. Quando $k = 10$ e $\bar{N} = 0.05N_T$, a partir de um certo momento as células se difundem na grade e as células proliferativas morrem, figura 18. Todavia, quando $\bar{N} = 0.3N_T$, a população cresce e as variantes migratórias dominam na grade, figura 19. Quando $k = 1$ a população cresce de maneira densa, figura 17, a variante que dominará na grade depende dos parâmetros $\bar{N}$ e $\bar{\alpha}$ como já foi explicitado na seção 5.2.

Figura 17: Mapas de calor referente as simulações no qual $k = 1$, $\nu = 1\text{e-}5$, $\overline{N} = 0.3N_T$, $\overline{\alpha} = A_i/5$. Quando aumenta o valor de $\overline{N}$ observa-se aumento de variantes proliverativas.

Figura 18: Mapas de calor referente as simulações no qual $k = 10$, $\nu = 1e-7$, $\bar{N} = 0.05N_T$, $\bar{\alpha} = A_i/5$. Observa-se que as células sobreviventes apresentam distribuição espacial difusa.

Figura 19: Mapas de calor referente as simulações no qual $k = 10$, $\nu = 1e-7$, $\bar{N} = 0.3N_T$, $\bar{\alpha} = A_i/100$. O aumento do valor de $\bar{N}$ neste contexto permitiu aumento na densidade das variantes migratória.

Repopulação

No protocolo 1, observa-se que nas simulações em que $\bar{N} = 0.05N_T$ e $\bar{\alpha}_i = A_i/5$, houve emergência da resistência independente do valor atribuído a ν , todavia observa-se que para valores menores de ν a emergência demora a acontecer, figura 20a. Nas simulação em que $\bar{N} = 0.05N_T$ e $\bar{\alpha}_i = A_i/100$, e em todas simulações para $\bar{N} = 0.3N_T$, observa-se que para todos valores atribuídos a ν , não houve diferença quanto ao tempo necessário para emergência da resistência, figuras 20b, 20c e 20d.

No protocolo 2, observa-se que nas simulações em que $\bar{N} = 0.05N_T$, $\bar{\alpha}_i = A_i/5$ ou $\bar{\alpha}_i = A_i/100$, $\nu = 10^{-7}, 3 \times 10^{-7}, 10^{-5}$, a resposta à droga foi semelhante no que diz respeito ao atraso na emergência da resistência, figuras 20e e 20f. No que diz respeito as simulações em que $\bar{N} = 0.3N_T$, $\bar{\alpha}_i = A_i/5$ ou $\bar{\alpha}_i = A_i/100$, $\nu = 10^{-7}, 3 \times 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}$, houve tímida diminuição na densidade da população a partir de um determinado momento, figuras 20g e 20h.

No protocolo 1, para qualquer valor de $\bar{N}$ e $\bar{\alpha}_i$, o aumento na densidade das variantes resistentes em relação as sensíveis após a droga entrar foi dependente do ν , quanto maior o valor de ν maior a densidade das variantes migratória ao final da simulação, figuras 21a, 21b, 21c e 21d. Quanto ao protocolo 2, nas simulações em que $\nu = 10^{-7}, 3 \times 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}$, independente do valor de $\bar{N}$ e $\bar{\alpha}_i$, a relação entre as densidades das variantes sensíveis e resistentes foi qualitativamente similar. No entanto, quando $\nu = 3 \times 10^{-6}$ e 3×10^{-5} , a relação entre as densidades das variantes resistentes e sensíveis dissoaram, de maneira que a geração de variantes foi massiva.

A relação entre as taxas de duplicação, migração e morte, expostas na figura 16, acerca das simulações no contexto do tratamento, mostraram-se bastante semelhantes a das simulações no contexto do crescimento.

No protocolo 2, o valor de k foi modulado, nas simulações em que $\nu = 10^{-7}, 3 \times 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}$, o k atingiu valores maiores, independente de $\bar{N}$ e $\bar{\alpha}_i$. Por outro lado, quando $\nu = 3 \times 10^{-6}$ e 3×10^{-5} , k aumentou muito pouco. Por fim, os mapas de calor mostraram dois padrões espaciais regidos pelo parâmetro $\bar{N}$. Quando $\bar{N} = 0.05N_T$, independente dos valores atribuídos a $\bar{\alpha}_i$ e ν , percebe-se que em dado momento as

variantes resistentes dominam na grade. Por outro lado, também quando $\overline{N} = 0.3N_T$, independente dos valores atribuídos a $\overline{\alpha}_i$ e ν , foi observado que as variantes resistentes ficam confinadas no gradiente de droga.

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

(g)

(h)

Figura 20: 20a, 20b,20c,20d densidade total da população no tratamento no protocolo 1. 20e, 20f,20g,20h, densidade total da população no tratamento no protocolo 2.

Figura 21: 21a, 21b, 21c e 21d, espaço de fases das densidades das variantes proliferativas e migratórias no protocolo 1. 21e, 21f, 21g e 21h, espaço de fases das densidades das variantes proliferativas e migratórias no protocolo 2.

Figura 22: Espaço de fases das taxas de duplicação, migração e morte, nas simulações acerca do tratamento. As figuras 22a, 22b, 22c e 22d se referem ao protocolo 1. As figuras 22e, 22f, 22g e 22h se referem ao protocolo 2. Na abscissa estão os valores de $\alpha_1(N)$, $\delta_1(N)$ e $\rho_1(N)$ no tempo, na coordenada estão os valores de $\alpha_2(N)$, $\delta_2(N)$ e $\rho_2(N)$ no tempo.

Figura 23: Evolução do valor do k ao ser modulado conforme a droga entra no sistema no protocolo 2.

Figura 24: Mapas de calor referente ao protocolo 1. Simulação cujo valores dos parâmetros foram $\nu = 10^{-7}$, $\bar{N} = 0.05N_T$ e $\bar{\alpha}_i = A_i/5$.

Figura 25: Mapas de calor referente ao protocolo 1. Simulação cujo valores dos parâmetros foram $\nu = 10^{-7}$, $\bar{N} = 0.3N_T$ e $\bar{\alpha}_i = A_i/5$.

Discussão

Foi apresentado neste trabalho um modelo espacial estocástico sobre dinâmica de população do câncer *in situ* em fase avascular. A dinâmica de populações foi simulada levando em consideração a duplicação, migração, morte, quiescência e geração de novas variantes, onde a taxa com que ocorrem, são dependente do tamanho da população.

O parâmetro k regula a suavidade das transições entre os valores máximos e mínimos de $\alpha_i(N)$, $\delta_i(N)$ e $\rho_i(N)$, enquanto que $\bar{N}$ regula a velocidade destas transições. Para $k = 1$, a transição entre os valores máximo e mínimo é rápida quando $N < \bar{N}$, todavia quando $N > \bar{N}$ a transição passa a ser lenta. Dado o tamanho máximo que a população pode ocupar na grade, neste caso $\alpha_i(N)$ não atinge valores próximos de zero, figura 4.1. Por outro lado, quando $k = 10$, $\alpha_i(N)$ chega a atingir zero conforme $N > \bar{N}$, enquanto que $\delta_i(N)$ e $\rho_i(N)$ atingem valores máximos, figuras 9a, 10b e 10c. Logo, quanto menor o valor de $\bar{N}$ mais rápido diminui $\alpha_i(N)$, e, $\delta_i(N)$ juntamente com $\rho_i(N)$, por sua vez, mais rápido aumentam.

Além disso, o parâmetro $\bar{\alpha}_i$, regula o tamanho da população na qual $\delta_i(N) = D_i/2$ e $\rho_i(N) = R_i/2$. Quanto maior $\bar{\alpha}_i$, menor será o tamanho da população para que $\delta_i(N) = D_i/2$ e $\rho_i(N) = R_i/2$, porém, quanto menor $\bar{\alpha}_i$, maior será o tamanho da população para que $\delta_i(N) = D_i/2$ e $\rho_i(N) = R_i/2$.

A análise dimensional do modelo mostra que o parâmetro k é adimensional, $\bar{N}$ tem a mesma unidade que N , isto é, número de células por área, e $\bar{\alpha}$ tem a mesma unidade de medida que α , ver tabela 4.11. Além disso, a grade de simulação seria a aproximação de um espaço tecidual limitado, não havendo possibilidade de avaliar, por exemplo, fenômenos como invasão. Portanto, neste estágio do modelo não está definido quais processos específicos da carcinogênese estes parâmetros representariam, no entanto, os resultados são qualitativamente representativo de evidências experimentais acerca do crescimento tumoral.

A heterogeneidade foi caracterizada pelas subpopulações (1) proliferativa e (2) mi-

gratórias, onde $\alpha_1 > \alpha_2$, $\delta_1 < \delta_2$, $\rho_1 > \rho_2$ e $\sigma_1 < \sigma_2$. Em glioblastoma, por exemplo, foi observado em análises histopatológica que baixos níveis de células KI-67 positivas foi correlacionada com pior prognóstico e invasão ???. No que diz respeito ao melanoma, a regulação mútua entre os fatores de transcrição MITF e Brn-2 induz a emergência de duas subpopulações, uma proliferativa e outra invasivas ???.

No entanto, experimentos realizados com video-microscopia em placa de cultura tem mostrado uma forte correlação positiva entre o número de divisões celulares por unidade de tempo e o deslocamento de células em linhagens de melanoma e cancer de pulmão. Além disso, uma tímida correlação positiva foi observada entre o tempo de citocinese e o deslocamento de células em melanoma, o mesmo não foi observado em linhagem celulares de mesotelioma e cancer de pulmão ???. A heterogeneidade, sob a perspectiva logitudinal e em tempo real, avaliada através do indicador de ciclo celular baseado em fluorescência de ubiquitinação (FUCCI) em esferóide de melanoma, teve a caracterização dicotômica desafiada ao ser observado que a invasão pode se dar também por células que duplicam, e, adicionalmente, nas fases S/G2/M do ciclo celular as células podem migrar ???. Dependendo dos valores dos parâmetros nas simulações, as variantes migratórias podem apresentar taxa de duplicação maior que a migração, figura 16d.

Em algumas simulações, de acordo com os valores atribuído aos parâmetros $\bar{N}$, $\bar{\alpha}$, ν e k , houve dominância de umas das variantes na grade. Sabe-se que o crescimento de tumores pode ser dirigido por sub- clones que estimulam a proliferação de outras células frente aos limitantes ambientais através da sinalização parácrina/autócrina de IL-11 ???. Somado a isto, baseado em *construção de nicho*¹, foi demonstrado que estratégias adaptativas dirigem a a evolução intratumoral. Células de câncer de próstata com fenótipo (1) invasivo que produz ambiente ácido pela sobre-regulação da glicólise aeróbia e (2) angiogênico foram injetados conjuntamente em modelos murinos, observou que aumentando o pH com $NaHCO_3$ a subpopulação angiogência crescia mais e não havia formação de metástase, enquanto que a ausência de $NaHCO_3$ permitia diminuição de pH induzindo o aumento da subpopulação invasiva ???.

Foi observado no aspecto espacial das simulações que quando $k = 10$, ao atingir um

¹é um termo ecológico que descreve a modificação do ambiente para beneficiar a espécie que modificou

certo tamanho, a população começa a apresentar um padrão espacial difuso na grade. Alguns tumores apresentam crescimento difusos como gliomas e adenocarcionoma gástrico contendo células em anel de signeto [45], [46]. Além disso, nas simulações em que $\nu = 10^{-7}$, para determinados valores atribuídos a $\overline{N}$ e $\overline{\alpha}$, houve geração considerável de variantes migratórias. Conforme já explicitado, não há neste estágio do trabalho uma interpretação biológica efetiva para estes parâmetros, no entanto, sabe-se que a progressão do câncer não é somente fruto da aquisição de alterações genéticas, por exemplo, em alguns cânceres hematológico dirigido por linfócitos B, a emergência de células com receptores de resistência a múltiplas droga pode ocorrer devido a captação citocinas específicas e adesão as células do estroma [47].

No contexto do tratamento com uma droga conforme proposto, o valor do k ao ser modulado, houve aparente retardo da repopulação, contudo o que poderia ser discutido a luz do experimentos são os aspectos espaciais mostrado na figura 24. Na linhagem de câncer de mama metastático, MDA-MB-231, ², foi realizado experimento em microchip fluídico, onde estabeleceu um gradiente de doxorrubicina variando de 0 a 200 nM e fluxo contínuo de nutrientes. Percebeu-se entre 48 e 72 horas, houve migração enviesada das células resistentes a doxorrubicina em direção ao gradiente de maior concentração da droga, enquanto as sensíveis se dirigiram no sentido contrário [48]. Neste trabalho, os autores hipotetizaram que dada a emergência da resistência, regiões com maior concentração de droga reduziria a competição por espaço e recursos [48].

²considerada como uma célula invasiva, com fenótipo mesênquimal ao invés de epitelial e que usa glicólise aeróbia com frequência maior que fosforilação oxidativa

Conclusão

Embora no atual estágio o modelo não é capaz de abarcar especificidades, tampouco ser ajustado a dados experimentais, foi observado de maneira qualitativos alguns aspectos da carcinogêneses tais como, (1) aumento da densidade de uma subpopulação em relação a outra, (2) em determinadas simulações a subpopulação migratória apresentou taxa de duplicação maior ou igual a taxa de migração,(3) crescimento difuso e (4) no tratamamento com droga única as variantes resistentes migram para o gradiente de droga.

Referências Bibliográficas

- [1] Peter C Nowell. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260):23–28, 1976.
- [2] Saito, Renata de Freitas and outros. *Fundamentos de Oncologia Molecular*. ATHE-NEU, 2015.
- [3] Robert A Gatenby and Robert J Gillies. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*, 4(11):891–899, 2004.
- [4] Jane Goodall, Suzanne Carreira, Laurence Denat, Dominique Kobi, Irwin Davidson, Paolo Nuciforo, Richard A Sturm, Lionel Larue, and Colin R Goding. Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor–negative melanoma cells. *Cancer research*, 68(19):7788–7794, 2008.
- [5] Marco Gerlinger, Andrew J Rowan, Stuart Horswell, James Larkin, David Endesfelder, Eva Gronroos, Pierre Martinez, Nicholas Matthews, Aengus Stewart, Patrick Tarpey, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *New England journal of medicine*, 366(10):883–892, 2012.
- [6] Andrew I Minchinton and Ian F Tannock. Drug penetration in solid tumours. *Nature Reviews Cancer*, 6(8):583–592, 2006.
- [7] Siddhartha Mukherjee. *The emperor of all maladies: a biography of cancer*. Simon and Schuster, 2010.
- [8] Gaspar Banfalvi. *Homeostasis-Tumor-Metastasis*. Springer, 2014.
- [9] Paulo Marcelo Gehm HOFF et al. *Tratado de oncologia*. ATHENEU, 2013.
- [10] Robert Weinberg. *The biology of cancer*. Garland science, 2013.

- [11] Bruce Alberts, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Essential cell biology*. Garland Science, 2013.
- [12] AG Frtiz. International classification of diseases for oncology icd-o, 2000.
- [13] William C Hahn, Christopher M Counter, Ante S Lundberg, Roderick L Beijersbergen, Mary W Brooks, and Robert A Weinberg. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400(6743):464–468, 1999.
- [14] Robert C Bast Jr, Carlo M Croce, William N Hait, Waun Ki Hong, Donald W Kufe, Martine Piccart-Gebhart, Raphael E Pollock, Ralph R Weichselbaum, Hongyang Wang, and James F Holland. *Holland–Frei cancer medicine*. John Wiley & Sons, 2017.
- [15] Douglas Hanahan and Robert A Weinberg. The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1):57–70, 2000.
- [16] Douglas Hanahan and Robert A Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5):646–674, 2011.
- [17] FM Sene. Cada caso, um caso... puro acaso-os processos de evolução biológica dos seres vivos. *Ribeirão Preto: SBG*, 2009.
- [18] Mark Ridley. *Evolution*. malden, 2004.
- [19] John H Gillespie. *Population genetics: a concise guide*. JHU Press, 2010.
- [20] Eva Jablonka and Marion J Lamb. *Evolução em quatro dimensões: DNA, comportamento ea história da vida*. Companhia das Letras, 2010.
- [21] Mel Greaves and Carlo C Maley. Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381):306–313, 2012.
- [22] Sheila K Singh, Ian D Clarke, Mizuhiko Terasaki, Victoria E Bonn, Cynthia Hawkins, Jeremy Squire, and Peter B Dirks. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research*, 63(18):5821–5828, 2003.

- [23] Muhammad Al-Hajj, Max S Wicha, Adalberto Benito-Hernandez, Sean J Morrison, and Michael F Clarke. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7):3983–3988, 2003.
- [24] Franziska Michor, Timothy P Hughes, Yoh Iwasa, Susan Branford, Neil P Shah, Charles L Sawyers, and Martin A Nowak. Dynamics of chronic myeloid leukaemia. *Nature*, 435(7046):1267–1270, 2005.
- [25] David L Nelson, Michael M Cox, and Claudi Cuchillo. *Principípios de bioquímica*. Omega, 2009.
- [26] Reinhard Bos, Jacobus JM van der Hoeven, Elsken van der Wall, Petra van der Groep, Paul J van Diest, Emile FI Comans, Urvi Joshi, Gregg L Semenza, Otto S Hoekstra, Adriaan A Lammertsma, et al. Biologic correlates of 18fluorodeoxyglucose uptake in human breast cancer measured by positron emission tomography. *Journal of Clinical Oncology*, 20(2):379–387, 2002.
- [27] Kieran Smallbone, Robert A Gatenby, Robert J Gillies, Philip K Maini, and David J Gavaghan. Metabolic changes during carcinogenesis: potential impact on invasiveness. *Journal of theoretical biology*, 244(4):703–713, 2007.
- [28] Tamás Garay, Éva Juhász, Eszter Molnár, Maria Eisenbauer, András Czirók, Barbara Dekan, Viktória László, Mir Alireza Hoda, Balázs Döme, József Tímár, et al. Cell migration or cytokinesis and proliferation?—revisiting the “go or grow” hypothesis in cancer cells in vitro. *Experimental cell research*, 319(20):3094–3103, 2013.
- [29] Sami Khoshyomn, Sean Lew, Joseph DeMattia, Elan B Singer, and Paul L Penar. Brain tumor invasion rate measured in vitro does not correlate with ki-67 expression. *Journal of neuro-oncology*, 45(2):111–116, 1999.
- [30] Keith S Hoek, Ossia M Eichhoff, Natalie C Schlegel, Udo Döbbeling, Nikita Kobert, Leo Schaerer, Silvio Hemmi, and Reinhard Dummer. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer research*, 68(3):650–656, 2008.

- [31] Suzanne Carreira, Jane Goodall, Laurence Denat, Mercedes Rodriguez, Paolo Nuciforo, Keith S Hoek, Alessandro Testori, Lionel Larue, and Colin R Goding. Mitf regulation of dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes & development*, 20(24):3426–3439, 2006.
- [32] Alison J Davis and Ian F Tannock. Repopulation of tumour cells between cycles of chemotherapy: a neglected factor. *The lancet oncology*, 1(2):86–93, 2000.
- [33] John J Kim and Ian F Tannock. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nature Reviews Cancer*, 5(7):516–525, 2005.
- [34] Olivier Trédan, Carlos M Galmarini, Krupa Patel, and Ian F Tannock. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(19):1441–1454, 2007.
- [35] Andrew J Primeau, Augusto Rendon, David Hedley, Lothar Lilge, and Ian F Tannock. The distribution of the anticancer drug doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 11(24):8782–8788, 2005.
- [36] Jasdeep K Saggar and Ian F Tannock. Chemotherapy rescues hypoxic tumor cells and induces their reoxygenation and repopulation—an effect that is inhibited by the hypoxia-activated prodrug th-302. *Clinical Cancer Research*, 21(9):2107–2114, 2015.
- [37] Jasdeep K Saggar and Ian F Tannock. Activity of the hypoxia-activated pro-drug th-302 in hypoxic and perivascular regions of solid tumors and its potential to enhance therapeutic effects of chemotherapy. *International journal of cancer*, 134(11):2726–2734, 2014.
- [38] Antonina V Kurtova, Jing Xiao, Qianxing Mo, Senthil Pazhanisamy, Ross Krasnow, Seth P Lerner, Fengju Chen, Terrence T Roh, Erica Lay, Philip Levy Ho, et al. Blocking pge2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance. *Nature*, 517(7533):209–213, 2015.

- [39] Ana Claudia Onuchic, Camila ML Machado, Renata F Saito, Francisco J Rios, Sonia Jancar, and Roger Chammas. Expression of pafr as part of a prosurvival response to chemotherapy: a novel target for combination therapy in melanoma. *Mediators of inflammation*, 2012, 2012.
- [40] Helen M Byrne. Dissecting cancer through mathematics: from the cell to the animal model. *Nature Reviews Cancer*, 10(3):221–230, 2010.
- [41] Philipp M Altrock, Lin L Liu, and Franziska Michor. The mathematics of cancer: integrating quantitative models. *Nature Reviews Cancer*, 15(12):730–745, 2015.
- [42] James W Haefner. *Modeling biological systems: principles and applications*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [43] Hiroshi Haeno and Franziska Michor. The evolution of tumor metastases during clonal expansion. *Journal of theoretical biology*, 263(1):30–44, 2010.
- [44] Martin A Nowak. *Evolutionary dynamics*. Harvard University Press, 2006.
- [45] Simon Pernot, Thibault Voron, Geraldine Perkins, Christine Lagorce-Pages, Anne Berger, and Julien Taieb. Signet-ring cell carcinoma of the stomach: Impact on prognosis and specific therapeutic challenge. *World J Gastroenterol*, 21(40):11428–11438, 2015.
- [46] An Claes, Albert J Idema, and Pieter Wesseling. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta neuropathologica*, 114(5):443–458, 2007.
- [47] KH Shain, WS Dalton, and J Tao. The tumor microenvironment shapes hallmarks of mature b-cell malignancies. *Oncogene*, 34(36):4673–4682, 2015.
- [48] Amy Wu, Kevin Loutherbach, Guillaume Lambert, Luis Estévez-Salmerón, Thea D Tlsty, Robert H Austin, and James C Sturm. Cell motility and drug gradients in the emergence of resistance to chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(40):16103–16108, 2013.

Anexo I

Nesta seção de anexo se encontram os gráficos acerca da densidade de saturação da população, para densidade das variantes da população e, por fim, os gráficos acerca das taxas de duplicação migração e morte.

Figura 26: Gráficos referentes a densidade de saturação da população conforme os valores dos parâmetros k , $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e $\nu = 1e-7$ e $\nu = 3e-7$.

Figura 27: Gráficos referentes a densidade de saturação da população conforme os valores dos parâmetros k , $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e $\nu = 1e-5$ e $\nu = 1e-6$.

Figura 28: Gráficos referentes a densidade de saturação da população conforme os valores dos parâmetros k , $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e $\nu = 3e-5$ e $\nu = 3e-6$.

Figura 29: Gráficos referentes a densidade das variantes proliferativa e migratória conforme os valores dos parâmetros k , $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e $\nu = 1e-7$.

Figura 30: Gráficos referentes a densidade das variantes proliferativa e migratória conforme os valores dos parâmetros k , $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e $\nu = 3e-7$.

Figura 31: Gráficos referentes a densidade das variantes proliferativa e migratória conforme os valores dos parâmetros k , $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e $\nu = 1e-7$.

Figura 32: Gráficos referentes a densidade das variantes proliferativa e migratória conforme os valores dos parâmetros k , $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e $\nu = 3e-7$.

Figura 33: Gráficos referentes a densidade das variantes proliferativa e migratória conforme os valores dos parâmetros k , $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e $\nu = 3e-5$.

Figura 34: Gráficos referentes a densidade das variantes proliferativa e migratória conforme os valores dos parâmetros k , $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e $\nu = 3 \times 10^{-6}$.

Figura 35: Gráficos referentes as taxas de duplicação, migração e morte, das duas variantes, conforme os valores dos parâmetros k , $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e $\nu = 10^{-7}$.

Figura 36: Gráficos referentes as taxas de duplicação, migração e morte, das duas variáveis, conforme os valores dos parâmetros k , $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e $\nu = 3 \times 10^{-7}$.

Figura 37: Gráficos referentes as taxas de duplicação, migração e morte, das duas variáveis, conforme os valores dos parâmetros k , $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e $\nu = 10^{-5}$.

Figura 38: Gráficos referentes as taxas de duplicação, migração e morte, das duas variantes, conforme os valores dos parâmetros k , $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e $\nu = 10^{-6}$.

Figura 39: Gráficos referentes as taxas de duplicação, migração e morte, das duas variáveis, conforme os valores dos parâmetros k , $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e $\nu = 3 \times 10^{-5}$.

Figura 40: Gráficos referentes as taxas de duplicação, migração e morte, das duas variáveis, conforme os valores dos parâmetros k , $\bar{N}$, $\bar{\alpha}_i$ e $\nu = 3 \times 10^{-6}$.

Anexo II

Neste anexo se encontra o código documentado em língua inglesa, tal qual será depositado em repositório on-line para fins de publicações em periódicos.

```
% this script declare variables which going to be used to the
simulation
% population dynamic in the growth phase of cancer in situ

%% preparing input parameter
alpha1 = 1; % duplication rate of variant type 1
alpha2 = alpha1/4; % duplication rate of variant type 2
brr1 = 10; % auxiliar variable to calculate death rates of
variant type 1
brr2 = 1e2; % % auxiliar variable to calculate death rates of
variant type 1
rho1 = alpha1/brr1; % death rate of variant type 1
rho2 = alpha2/brr2; % death rate of variant type 2
nu = [1e-5 1e-6]'; % generation of variation rates
delta = [alpha2 alpha1]; % migration rates from both type 1 and
type 2 variants
sigma = [0 0.1]; % quiescence rates from both type 1 and type 2
variants
popK = [1 10]'; % is going to be useful to generate the values
of k
preX = [5 100]'; % is going to be useful to generate the values
of alpha bar

%% setting struct to population dynamic into domain
popInfo.n = 70; % domain size
```

```

popInfo.Nhalf = [0.05*(popInfo.n)^2 0.3*(popInfo.n)^2]; %
    struct to assign value to the parameter N bar
preNbar = popInfo.Nhalf';

%% struct of auxiliary variables to collect data over
    simulations
toData.niter1 = 1; % initial value to number of iteration
toData.niter2 = 1e6; % maximal number of iteration
toData.nframe = 18; % the number of frames that shall be
    collected from somulation
% taking account of the log10 of iteration
toData.xx = toData.niter1; % auxiliar variable

%% storing data auxiliar variables
auxFi = {'t','f1','f2','f','iter','rprol1','rprol2','rmove1','
    rmove2','rdie1','rdie2'};% auxiliar list of string
% to count how many variables we are interest in analyze
toData.nvar = numel(auxFi); % number of Fi components. Auxiliar
    variable to increment specific Fi component according
% experimental groups
nrepl = 100; % number of trajectories
combo = length(nu)*length(preX)*length(preNbar)*length(popK); %
    how many groups of simulation are we going to have
% from the product of vector length
dup1 = alpha1*ones(combo,1); % duplication rates vector of
    variant type 1
dup2 = alpha2*ones(combo,1); % duplication rates vector of
    variant type 2
death1 = kron(rho1',ones(combo,1)); % death rates vector of
    variant type 1

```

```

death2 = kron(rho2',ones(combo,1)); % death rates vector of
    variant type 2
mut = repmat(kron(nu,ones(combo/(length(nu)^3),1)),4,1); %
    variation generation rates vector
mov = repmat(delta,combo,1); % migration rates vector of both
    variants vector
curve = repmat(kron(popK,ones(combo/(length(popK)^2),1)),2,1);
    % k values vector
quiesce = repmat(sigma,combo,1); % quiescence rates vector from
    both variants
Nbar = repmat(preNbar,combo/length(preNbar),1); % vector of
    Nbar values
X = kron(preX,ones(combo/length(preX),1)); % vector of of alpha
    bar ratio
allPar = [dup1 dup2 death1 death2 mut curve mov quiesce Nbar X
    ]; % matrix which store all of previous vector
dataFi = zeros(1,size(allPar,2),nrepl); % empty matrix destined
    to save Fi componets originally from
% experimental group

for traj = 1:nrepl % loop to tensor layer regard trajectories
    for i = 1:size(allPar,1) % loop to experimental groups
        if (i >= 2)
            currcol = currcol + toData.nvar; % counter variable
                to change columns and rows to habour new Fi
                values
        end
        Fi = crecimientoCA(allPar,popInfo,toData,i); % call
            function that run simulation
        dataFi(1:size(Fi,1),currcol,traj) = Fi; % storage of Fi

```



```

    end

end

save('growthData1.mat','nu','dataFi','allPar') % save results

function Fi = crescimentoCA(allPar,popInfo,toData,i)

% this function run simulation from variables declared
    previously
% through script

%% domain settings
dom = popInfo.n; % grid size
D = int32(zeros(dom,dom)); % grid is going to be initially a
    zeros nxn matrix
D([1:dom 1:dom:dom*dom dom:dom:dom*dom dom*(dom-1):dom*dom]) =
    0; % the boundary will be occupied by empty space
D(round(dom/2),round(dom/2)) = 1; % place initial variants type
    1 in its center

%% parameter input setting
alpha = [allPar(i,1) allPar(i,2)]; % duplication rates from
    both variants 1 and 2 respectively
rho = [allPar(i,3) allPar(i,4)]; % death rates from both
    variants 1 and 2 respectively
pvar = allPar(i,5); % generation of variants rates
k = allPar(i,6); % k values
delta = [allPar(i,7) allPar(i,8)]; % migration rates from both
    variants 1 and 2 respectively
sigma = [allPar(i,9) allPar(i,10)]; % migration rates from both
    variants 1 and 2 respectively

```

```

popInfo.Nhalf = allPar(i,11); % Nbar value
X = allPar(i,12); % alpha bar ratio

%% auxiliar variables setting
Fi = zeros(1,toData.nvar); % array of column about grid graph
    vertices state
dd = 1; % an auxiliary variable into the loop to get state
    frequency
t = 0; % intial time

for iter = 1:toData.niter2

    aux = 0;
    while aux == 0
        vertice = randi([2 dom-1],1,2); % it seek for occupied
            vertex
        row = vertice(1);
        col = vertice(2);
        aux = D(row,col); % then we gonna have our auxiliar
            variable to denominate the value of a given vertex
    end
    neigh = [D(row-1,col-1) D(row,col-1) D(row+1,col-1) D(row
        -1,col)...
        D(row+1,col) D(row-1,col+1) D(row,col+1) D(row+1,col+1)
            ]; % this is the vector of neighbors
    bux = []; % this empty array will determinate how many
        empty neighbor have a given vertex
    theta = 0; % counter to track empty neighboor
    for ii = 1:length(neigh) % loop over neigh vector
        if (neigh(ii) == 0) % does the neighbor grid vertex is

```

```

        empty?
        theta = theta + 1; % increment theta
        bux(theta) = ii; % store the empty neighbor index
    end
end

[rprol,rmov,rdie] = updateRate(D,alpha,delta,rho,X,k,
    popInfo); % from the population size calculate all
% rates values
if (theta >= 1) % if there is 1 or more then first empty
neighbor the cell can duplicate, migrate or die
    [go_grow,pQD] = updateProb(D,row,col,rprol,rmov,rdie,
        sigma); % from the rates values calculate the
        probability of
% duplicate, migrate and die
    dt = (rprol(1)+rmov(1)+rdie(1)+sigma(1))*nnz(D==1)+(
        rprol(2)+rmov(2)+rdie(2)+sigma(2))*nnz(D==2); % from
% rates values calculated the time increment
    TT = rand; % pseudo-random number
    if (TT < go_grow(1)) % compare both pseudo-random
        number and transition probabilities
        t = t + (1/dt); % if transition occur, increment
            time
        cux = randi([1 theta],1); % choose a place at
            random to one of the daughter cells
        if (bux(cux) == 1) % if one of the daughter cells
            goes to neighbor of index 1
            if (D(row,col) == 1) % if the cells choose to
                undergoes a transition is the variant type 1
                % generate a random number
                format long

```

```

rr1 = rand;
% calculate the probability to generate
    variants of
% type 2 accordingly the equation below
var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
if (rr1 < var) % if there was new variant
    generation place one the new cells in the
        most close
        %grid vertex and another one at same
            grid vertex of the cell choosed at
                random toundergo transition
            D(row-1,col-1) = D(row,col)+1;
            D(row,col) = D(row-1,col-1);
        else % if there was not generation of new
            variants place one of the daugther in the
                closest neighbor
                D(row-1,col-1) = D(row,col);
        end
    else % if there was not duplication keep the
        cells at the same state and at the same grid
            vertex
            D(row-1,col-1) = D(row,col);
        end
% from this statement ahead it follow the same
    logic of the
% previous statement. Just highlighting that it
    regard to grid vertex choosed
% at random to place dauthr cells
elseif (bux(cux) == 2)
    if (D(row,col) == 1)

```

```

format long
rr1 = rand;
var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
if (rr1 < var)
    D(row,col-1) = D(row,col)+1;
    D(row,col) = D(row,col-1);
else
    D(row,col-1) = D(row,col);
end
else
    D(row,col-1) = D(row,col);
end
elseif (bux(cux) == 3)
    if (D(row,col) == 1)
        format long
        rr1 = rand;
        var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
        if (rr1 < var)
            D(row+1,col-1) = D(row,col)+1;
            D(row,col) = D(row+1,col-1);
        else
            D(row+1,col-1) = D(row,col);
        end
    else
        D(row+1,col-1) = D(row,col);
    end
elseif (bux(cux) == 4)
    if (D(row,col) == 1)
        format long
        rr1 = rand;

```

```

var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
if (rr1 < var)
    D(row-1,col) = D(row,col)+1;
    D(row,col) = D(row-1,col);
else
    D(row-1,col) = D(row,col);
end
else
    D(row-1,col) = D(row,col);
end
elseif (bux(cux) == 5)
    if (D(row,col) == 1)
        format long
        rr1 = rand;
        var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
        if (rr1 < var)
            D(row+1,col) = D(row,col)+1;
            D(row,col) = D(row+1,col);
        else
            D(row+1,col) = D(row,col);
        end
    else
        D(row+1,col) = D(row,col);
    end
elseif (bux(cux) == 6)
    if (D(row,col) == 1)
        format long
        rr1 = rand;
        var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
        if (rr1 < var)

```

```

        D(row-1,col+1) = D(row,col)+1;
        D(row,col) = D(row-1,col+1);
    else
        D(row-1,col+1) = D(row,col);
    end
else
    D(row-1,col+1) = D(row,col);
end
elseif (bux(cux) == 7)
    if (D(row,col) == 1)
        format long
        rr1 = rand;
        var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
        if (rr1 < var)
            D(row,col+1) = D(row,col)+1;
            D(row,col) = D(row,col+1);
        else
            D(row,col+1) = D(row,col);
        end
    else
        D(row,col+1) = D(row,col);
    end
else
    if (D(row,col) == 1)
        format long
        rr1 = rand;
        var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
        if (rr1 < var)
            D(row+1,col+1) = D(row,col)+1;
            D(row,col) = D(row+1,col+1);

```

```

        else
            D(row+1,col+1) = D(row,col);
        end
    else
        D(row+1,col+1) = D(row,col);
    end
end

% This statement refer to migration
elseif (TT < go_grow(2))
    t = t + (1/dt); % increment time
    cux = randi([1 theta],1); % The variable cux
    indicated
    % which empty grid vertex the cell choosed
    undergoes the transition
    % of migration
    if (bux(cux) == 1)
        D(row-1,col-1) = D(row,col);
    elseif (bux(cux) == 2)
        D(row,col-1) = D(row,col);
    elseif (bux(cux) == 3)
        D(row+1,col-1) = D(row,col);
    elseif (bux(cux) == 4)
        D(row-1,col) = D(row,col);
    elseif (bux(cux) == 5)
        D(row+1,col) = D(row,col);
    elseif (bux(cux) == 6)
        D(row-1,col+1) = D(row,col);
    elseif (bux(cux) == 7)
        D(row,col+1) = D(row,col);
    else

```



```

        D(row+1,col+1) = D(row,col);
    end
    D(row,col) = 0; % once the cell migrate the
        previous grid vertex become empty
else
    t = t + (1/dt); % increment time
    D(row,col) = 0; % if the cell does not migrate so
        it die and the grid vertix become empty
end
end
if (theta == 0) % if there is no empty grid vertex, the
    cell die or quiesce
    TT2 = rand;
    if (TT2 < pQD(1)) % quiesce
        t = t + (1/dt); % increment time
        D(row,col) = D(row,col); % cell remain in the same
            state
    else % cell death
        t = t + (1/dt); % increment time
        D(row,col) = 0; % grid vertex become empty
    end
end
if (toData.niter1 == toData.xx) % the field toData must
    have the value xx changed
    Fi(dd,1) = t; % time
    Fi(dd,2) = Fi(dd,2) + nnz(D == 1)/numel(D); % density
        of variant 1
    Fi(dd,3) = Fi(dd,3) + nnz(D == 2)/numel(D); % density
        of variant 2
    Fi(dd,4) = Fi(dd,2) + Fi(dd,3); % total density

```

```

    Fi(dd,5) = iter; % iteration
    Fi(dd,6) = rprol(1); % duplication rate of variants
        type 1
    Fi(dd,7) = rprol(2); % duplication rate of variants
        type 2
    Fi(dd,8) = rmove(1); % migration rate of variants type
        1
    Fi(dd,9) = rmove(2); % migration rate of variants type
        2
    Fi(dd,10) = rdie(1); % death rate of variants type 1
    Fi(dd,11) = rdie(2); % death rate of variants type 2
    kk = floor(log10(toData.niter1)); % round th log10 of
        value niter1
    dx = int32((10^(kk+1) - 10^(kk))/toData.nframe); % we
        shall increment according a ratio nframe dependent
    toData.xx = toData.xx + round(dx); % increment toData.
        xx
    dd = dd + 1; % as long as xx have a new value we
        increment a new row on each Fi component
end
if (nnz(D(3:dom-2,3:dom-2)) == 0) % once we are working on
    a sthocastic model eventually initial
    % cells die
    break;
end
toData.niter1 = toData.niter1 + 1; % increment toData.
    niter1
end
end

```

```

%% this script is a model to other input parameter set. Here we
    call the fucntion to input drug over grid in protocollo 1
alpha1 = 1; % proliferation rate variant 1
alpha2 = alpha1/4; % proliferation rate variant 2
brr1 = 10; % auxiliari variable to calculate death rates
    ovariant type 1
brr2 = 1e3; % auxiliari variable to calculate death rates
    ovariant type 2
rho1 = alpha1/brr1; % death rate variant type 1
rho2 = alpha2/brr2; % death rate variant type 2
toQui = [0 0.1]; % quiescence rates from both type 1 and type 2
    variants
mov = [alpha2 alpha1];
nu = 1e-5; % variants generation rates
popK = 1; % is going to be useful to generate the values of k
propAhalf = 5; % it the denominator of the maximal duplication
    rates
chooseInt = 21; % choosed treatment interval

%% setting struct to population dynamic into domain

popInfo.n = 70; % domain size
popInfo.Nhalf = 0.05*(popInfo.n)^2; % population size which
    maximal duplication rates fall on half
popInfo.boom = (popInfo.n^2)*0.3; % choose a population size to
    drug get into the system
Nbar = popInfo.Nhalf;
%% treatment auxiliary parameter

```

```

drug.c0 = 3.0111e16; % intial drug concentration in terms in
    terms of number of particle
drug.coefD = 10; % drug diffusion coefficient
drug.cHalf1 = drug.c0/5000; % drug concentration where varaints
    type 1 viability falls on half
drug.cHalf2 = drug.c0; % drug concentration where varaints type
    2 viability falls on half
drug.L1 = 1; % smoothness of the curve about varaints type 1
    viability under drug exposure
drug.L2 = 5; % smoothness of the curve about varaints type 2
    viability under drug exposure
drug.s1 = 1; % maximal viability of variant type 1
drug.s2 = 1; % maximal viability of variant type 2

%% auxiliary parameter

toData.niter1 = 1; % intial iteration
toData.niter2 = 1e6; % final iteration
toData.nframe = 18; % how many frame I want to pick up and
    record proportionally to log10(iteration)?
toData.xx = toData.niter1;
nrepl = 100; % number of trajectories

%% storing data auxiliar variables
auxFi = {'t', 'f1', 'f2', 'f', 'rprol1', 'rprol2', 'rmove1', 'rmove2',
    'rdie1', 'rdie2', 'iter', 'tcd'};
toData.nvar = numel(auxFi); % number of Fi components. Auxiliar
    variable to increment specific Fi component according
    experimental groups
% group simulation with fixed domain size and nu

```

```

allPar = [alpha1 alpha2 rho1 rho2 nu mov toQui popK chooseInt
          propAhalf popInfo.Nhalf]; % list of input parameter
i = 1; % auxiliar variable
dataFi = zeros(1,1,1); % empty matrix destined to save Fi
          componets originally from experimental group
currcol = 1:toData.nvar; % from what coluns shall we store data
          ?

for traj = 1:nrepl
    Fi = ca1(allPar,drug,popInfo,toData,i); % call the function
          to simulate treatment
    dataFi(1:size(Fi,1),currcol,traj) = Fi;
end

%% save result
fileName = strcat('prot1_',num2str(nrepl),'_n',num2str(popInfo.
    n),'_1.mat');
save(fileName,'dataFi','allPar')

function Fi = ca1(allPar,drug,popInfo,toData,i)

% this function is a derivation from crecimientoCA, there is
    sligth difference between
dom = popInfo.n;
D = int32(zeros(dom,dom));
D([1:dom 1:dom:dom*dom dom:dom:dom*dom dom*(dom-1):dom*dom]) =
    0;
D(round(dom/2),round(dom/2)) = 1;

```

```

alpha = [allPar(i,1) allPar(i,2)];
rho = [allPar(i,3) allPar(i,4)];
pvar = allPar(i,5);
delta = [allPar(i,6) allPar(i,7)];
sigma = [allPar(i,8) allPar(i,9)];
k = allPar(i,10);
intVals = allPar(i,11);
X = allPar(i,12);
popInfo.Nhalf = allPar(i,13);

%% auxiliar variables
Fi = zeros(1,toData.nvar);
dd = 1;
t = 0;
countC = 0; % increment a count whenever population size reach
    30% of grid occupancy
deltaT = 0; % increment the treatment interval
tikTak = zeros(1,1);
niter1 = 1;

for iter = 1:toData.niter2

    aux = 0;
    while aux == 0
        vertice = randi([2 dom-1],1,2);
        row = vertice(1);
        col = vertice(2);
        aux = D(row,col);
    end
    neigh = [D(row-1,col-1) D(row,col-1) D(row+1,col-1) D(row

```

```

-1,col) D(row+1,col) D(row-1,col+1) D(row,col+1) D(row+1,
col+1)];
bux = [];
theta = 0;
for ii = 1:length(neigh)
    if (neigh(ii) == 0)
        theta = theta + 1;
        bux(theta) = ii;
    end
end
[rprol,rmov,rdie] = updateRate(D,alpha,delta,rho,X,k,
popInfo);
if (theta >= 1)
    [go_grow,pQD] = updateProb(D,row,col,rprol,rmov,rdie,
sigma);
dt = (rprol(1)+rmov(1)+rdie(1)+sigma(1))*nnz(D==1)+(
rprol(2)+rmov(2)+rdie(2)+sigma(2))*nnz(D==2);
TT = rand;
if (TT < go_grow(1))
    t = t + (1/dt);
    cux = randi([1 theta],1);
    if (bux(cux) == 1)
        if (D(row,col) == 1)
            format long
            rr1 = rand;
            var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
            if (rr1 < var)
                D(row-1,col-1) = D(row,col)+1;
                D(row,col) = D(row-1,col-1);
            else

```

```

        D(row-1,col-1) = D(row,col);
    end
else
    D(row-1,col-1) = D(row,col);
end
elseif (bux(cux) == 2)
    if (D(row,col) == 1)
        format long
        rr1 = rand;
        var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
        if (rr1 < var)
            D(row,col-1) = D(row,col)+1;
            D(row,col) = D(row,col-1);
        else
            D(row,col-1) = D(row,col);
        end
    else
        D(row,col-1) = D(row,col);
    end
elseif (bux(cux) == 3)
    if (D(row,col) == 1)
        format long
        rr1 = rand;
        var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
        if (rr1 < var)
            D(row+1,col-1) = D(row,col)+1;
            D(row,col) = D(row+1,col-1);
        else
            D(row+1,col-1) = D(row,col);
        end
    end
end

```



```

else
    D(row+1,col-1) = D(row,col);
end
elseif (bux(cux) == 4)
    if (D(row,col) == 1)
        format long
        rr1 = rand;
        var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
        if (rr1 < var)
            D(row-1,col) = D(row,col)+1;
            D(row,col) = D(row-1,col);
        else
            D(row-1,col) = D(row,col);
        end
    else
        D(row-1,col) = D(row,col);
    end
elseif (bux(cux) == 5)
    if (D(row,col) == 1)
        format long
        rr1 = rand;
        var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
        if (rr1 < var)
            D(row+1,col) = D(row,col)+1;
            D(row,col) = D(row+1,col);
        else
            D(row+1,col) = D(row,col);
        end
    else
        D(row+1,col) = D(row,col);
    end
end

```

```

        end
elseif (bux(cux) == 6)
    if (D(row,col) == 1)
        format long
        rr1 = rand;
        var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
        if (rr1 < var)
            D(row-1,col+1) = D(row,col)+1;
            D(row,col) = D(row-1,col+1);
        else
            D(row-1,col+1) = D(row,col);
        end
    else
        D(row-1,col+1) = D(row,col);
    end
elseif (bux(cux) == 7)
    if (D(row,col) == 1)
        format long
        rr1 = rand;
        var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
        if (rr1 < var)
            D(row,col+1) = D(row,col)+1;
            D(row,col) = D(row,col+1);
        else
            D(row,col+1) = D(row,col);
        end
    else
        D(row,col+1) = D(row,col);
    end
end
else

```

```

    if (D(row,col) == 1)
        format long
        rr1 = rand;
        var = 1 - exp(-(nnz(D==1)*pvar)/rprol(1));
        if (rr1 < var)
            D(row+1,col+1) = D(row,col)+1;
            D(row,col) = D(row+1,col+1);
        else
            D(row+1,col+1) = D(row,col);
        end
    else
        D(row+1,col+1) = D(row,col);
    end
end
elseif (TT < go_grow(2))
    t = t + (1/dt);
    cux = randi([1 theta],1);
    if (bux(cux) == 1)
        D(row-1,col-1) = D(row,col);
    elseif (bux(cux) == 2)
        D(row,col-1) = D(row,col);
    elseif (bux(cux) == 3)
        D(row+1,col-1) = D(row,col);
    elseif (bux(cux) == 4)
        D(row-1,col) = D(row,col);
    elseif (bux(cux) == 5)
        D(row+1,col) = D(row,col);
    elseif (bux(cux) == 6)
        D(row-1,col+1) = D(row,col);
    elseif (bux(cux) == 7)

```

```

        D(row,col+1) = D(row,col);
    else
        D(row+1,col+1) = D(row,col);
    end
    D(row,col) = 0;
else
    t = t + (1/dt);
    D(row,col) = 0;
end
end
if (theta == 0)
    TT2 = rand;
    if (TT2 < pQD(1))
        t = t + (1/dt);
        D(row,col) = D(row,col);
    else
        t = t + (1/dt);
        D(row,col) = 0;
    end
end
if (nnz(D) == popInfo.boom) % does the population reach
30% of occupancy
    tikTak = t; % record time
    countC = countC + 1; % increment countc
end
if (countC > 0) % whenever countC > 0
    incre = tikTak(1) + deltaT; % only allow drug input
    whenever time count and treatmente interval match
    if ((floor(t) == floor(incre)))
        D = updateDrug(D,dom,drug); % call function which

```

```

        diffuse drug and calculate the viability
        deltaT = deltaT + intVals; % increment time
    end
end
if (niter1 == toData.xx)

    Fi(dd,1) = t;

    Fi(dd,2) = nnz(D == 1)/numel(D);

    Fi(dd,3) = nnz(D == 2)/numel(D);

    Fi(dd,4) = Fi(dd,2) + Fi(dd,3);

    Fi(dd,5) = rprol(1);

    Fi(dd,6) = rprol(2);

    Fi(dd,7) = rmove(1);

    Fi(dd,8) = rmove(2);

    Fi(dd,9) = rdie(1);

    Fi(dd,10) = rdie(2);

    Fi(dd,11) = iter;

    Fi(dd,12) = exp(-(1/(dom^2))*(nnz(D)/(dom^2)));

```

```

kk = floor(log10(niter1));

dx = int32((10^(kk+1) - 10^(kk))/toData.nframe);

toData.xx = toData.xx + round(dx);

dd = dd + 1;
end
if (nnz(D(3:dom-2,3:dom-2)) == 0) % once we are working on
    a sthochastic model eventually population goes to
    extinction than stop
    break;
end
niter1 = niter1 + 1;
end
end

function D = updateDrug(D,dom,drug)

point = floor((dom+1)/2); % arbitrary point of drug diffusion
%% fich law anality solution
for row = 1:dom
    for col = 1:dom
        % cm is the matrix of drug concentration
        cm(row,col) = (drug.c0/(4*pi*drug.coefD))*exp(-((row-
            point)^2 + (col-point)^2)/(4*drug.coefD));
    end
end
end

```

```

viab1 = (drug.s1*drug.cHalf1^drug.L1)./(cm.^drug.L1 + drug.
    cHalf1^drug.L1); % calculate the viability of variant 1 under
    drug
viab2 = (drug.s2*drug.cHalf2^drug.L2)./(cm.^drug.L2 + drug.
    cHalf2^drug.L2); % calculate the viability of variant 2 under
    drug

local = find(D); % which ar the alive cells
RandVec = rand(1,length(local)); % make random number to
    compare with viab1 and viab2
for jj = 1:length(local)
    format long
    if (D(local(jj)) == 1)
        if (RandVec(jj) > viab1(local(jj))) % if the random
            number is greater than viability of variant number 1,
            die
            D(local(jj)) = 0;
        end
    else
        if (RandVec(jj) > viab2(local(jj))) % if the random
            number is greater than viability of variant number 2,
            die
            D(local(jj)) = 0;
        end
    end
end
end
end

```