



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN COMPUTACIÓN

**“Estudio de la dinámica de células cancerosas
utilizando oncología matemática”**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias de la Computación

Presenta:

M. en C. Erandi Castillo Montiel

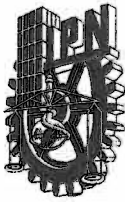
Directores:

Dr. Juan Carlos Chimal Eguía
Dr. José Ignacio Tello del Castillo



México, D. F.

Agosto, 2015



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 12:00 horas del día 25 del mes de junio de 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del:

Centro de Investigación en Computación

para examinar la tesis titulada:

“Estudio de la dinámica de células cancerosas utilizando oncología matemática”

Presentada por el alumno:

CASTILLO

Apellido paterno

MONTIEL

Apellido materno

ERANDI

Nombre(s)

Con registro:

B	1	1	0	8	8	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de: **DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA COMPUTACIÓN**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Juan Carlos Chimal Egua

Dr. José Ignacio Tello del Castillo

Dr. Sergio Suárez Guerra

Dr. Carlos Fernando Aguilar Ibáñez

Dr. Ricardo Barrón Fernández

Dr. Marco Antonio Moreno Ibarra

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Luis Alfonso Villa Vargas



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN COMPUTACIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 20 de Julio del año 2015, el (la) que suscribe Erandi Castillo Montiel alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias de la Computación con número de registro B110886, abscrito a Centro de Investigación en Computación, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Juan Carlos Chimal Eguía y Dr. José Ignacio Tello del Castillo y cede los derechos del trabajo intitulado Estudio de la dinámica de células cancerosas utilizando ongología matemática, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección erandicm@gmail.com. Sin el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Erandi Castillo Montiel

Nombre y firma

RESUMEN

El uso de las ciencias computacionales y las matemáticas, han permitido el desarrollo de aplicaciones que son utilizadas en áreas tan complejas como las ciencias biomédicas, donde a pesar de la complejidad del campo, se ha logrado ayudar a médicos y biólogos en la gran tarea de entender los mecanismos de funcionamiento de enfermedades tales como el VIH o el virus de la influenza, la gripe aviar entre otros.

Un ejemplo de estas aplicaciones, es el diseño de modelos matemáticos para el estudio de enfermedades como el cáncer, que en los últimos años han mostrado ser de utilidad para tratar de entender, explicar, predecir el comportamiento de esta enfermedad y proponer estrategias de intervención en el proceso.

La investigación presentada en esta tesis, se enfoca en el estudio del melanoma, un tipo de cáncer de piel muy agresivo con una tasa de incidencia que ha aumentando en los últimos años. Los estudios presentados en la tesis, utilizan un nuevo paradigma de trabajo llamado oncológica matemática [1].

Este paradigma de trabajo, es el conjunto de tres grandes áreas de la ciencias como lo son las ciencias de la computación, las matemáticas y las ciencias médico biológicas, trabajando sobre un mismo objetivo. En esta tesis, se desarrollaron dos modelos matemáticos cuya finalidad es estudiar el desarrollo del melanoma en ratones al recibir una terapia con células dendríticas (CDs) para aumentar su respuesta inmune y así lograr la erradicación de las células de tumorales. Este tipo de terapia también es llamado inmunoterapia pues su objetivo es tratar de estimular el sistema inmune contra el cáncer.

El primer modelo es un modelo de cuatro ecuaciones diferenciales ordinarias (EDOs) que nos permitió estudiar los protocolos de infusión de CDs, utilizados en inmunoterapias en ratones con melanoma. El segundo modelo propuesto es un modelo de cinco ecuaciones diferenciales con retardos (EDRs) que tiene por objetivo buscar una terapia con células dendríticas (CDs) más eficiente, proponiendo nuevos protocolos de infusión de CDs.

Los resultados son validados con datos biológicos obtenidos del Laboratorio de Inmunoterapia

e Ingeniería de Tejidos de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México, donde se realizan estudios sobre el cáncer de piel en ratones y su respuesta a la inmunoterapia con CDs.

Estos modelos muestran una visión simplificada de los mecanismos de funcionamiento que ocurren dentro del sistema inmune de los ratones con melanoma al recibir la inmunoterapia, sin embargo pueden ser utilizados para predecir el comportamiento del crecimiento del cáncer teniendo en cuenta su proximidad a los datos biológicos reales.

A lo largo de esta tesis se muestra el desarrollo de estos dos modelos, las pruebas que se realizaron, su comparación con datos biológicos y las conclusiones obtenidas de la investigación realizada.

ABSTRACT

Using the computer sciences and the mathematics in areas such as biomedical sciences has developed applications with the objective to understand the behaviour of very dangerous diseases such as HIV (human immunodeficiency virus) or avian flu.

An example of this application are the mathematical models developed to study cancer. Previously, some important results have been obtained in order to explain and predict the behaviour of this disease.

The investigation presented in this thesis focuses on the study of Melanoma which is the most dangerous form of skin cancer. Recently, studies show that the rate of people suffering melanoma is increasing throughout the world.

Two mathematical models were developed during the thesis, whose objective was to study the growth of melanoma in mice which received an immunotherapy with dendritic cells (DCs) in order to enhance the immune response of the mice and eradicated the tumor cells.

The first model is four ordinary differential equations (ODEs), which allowed studying the protocols infusion of DCs used in the immunotherapy in mice with melanoma. The second model developed is five delay differential equations (DDEs) where their main objective was to search for a better immunotherapy than that currently used by investigators of UNAM.

The results were validated comparing the computer simulation results with biological trial results of the Experimental Immunotherapy Laboratory of the Medicine Faculty in the Universidad Autonoma de Mexico (UNAM).

These models represent a simplified view of the complex immunotherapy mechanisms that occur in mice. However, they could be used to predict the behaviour of the tumor cell growth taking into consideration the approximation with the real data error.

DEDICATORIA

A mis padres:

Luciano Castillo Rodríguez y Margarita Montiel Galicia

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Luciano y Margarita por su cariño, amor y ejemplo en la vida para continuar luchando por mis sueños.

A mis hermanos Ahui, María Dolores, Tania y Emiliano por estar conmigo, por creer en mí, ustedes saben que tienen mi admiración y amor.

A la gran familia que tengo en especial a mis tías Ema e Hilda que han estado junto a mí, cuidándome y apoyándome siempre.

A mis directores de tesis el Dr. Juan Carlos Chimal Eguía y el Dr. José Ignacio Tello del Castillo por su apoyo incondicional, su confianza depositada en mi otorgándome su experiencia, conocimientos y consejos para llevar a cabo esta tesis. Creando a través de todo este tiempo una amistad muy especial para mi.

A los miembros del comité de evaluación, el Dr. Barron, el Dr. Aguilar, el Dr. Torres y el Dr. Suárez por todas sus valiosas sugerencias y observaciones que enriquecieron esta tesis.

A Yaneth Rios, Iliac Huerta y Urbelino Herrera por su amistad, consejos, pláticas y por construir juntos momentos inolvidables para mi a lo largo de estos años.

Finalmente agradecer al Centro de Investigación en Computación, al Instituto Politécnico Nacional y en especial a CONACYT por todo el apoyo recibido durante mis estudios de Doctorado.

ÍNDICE GENERAL

Índice general	1
Índice de cuadros	3
Índice de figuras	4
1 Introducción	7
1.1. Planteamiento del problema	9
1.2. Objetivo	9
1.2.1. Objetivos específicos	9
2 Marco teórico	11
2.1. Cáncer	11
2.2. Melanoma	11
2.3. Inmunología	12
2.3.1. Respuesta inmune adaptativa	13
2.4. Inmunoterapia contra el cáncer utilizando células dendríticas	14
3 Modelación matemática	17
3.1. Modelación	17
3.1.1. Modelos continuos de población	18
3.1.2. Modelos con retardo	19
3.1.3. Modelación matemática y el cáncer	19
3.1.4. Inmunoterapia aplicada contra gliomas malignos (GM) y glioblastomas malignos(GBM) (Aproximación a un problema similar)	20
4 Modelación de la inmunoterapia con CD para ratones con melanoma asumiendo una respuesta inmediata	23
4.1. Modelo de EDOs	24
4.2. Simulación y pruebas	26
5 Modelación de la inmunoterapia con CDs en ratones con melanoma	31

5.1. Experimentación biológica	31
5.2. Modelo matemático de EDRs	32
5.2.1. Células tumorales, “ T ”	32
5.2.2. Células dendríticas, “ D ”	33
5.2.3. Linfocitos T Citotóxicos activados, “ C_a ”	34
5.2.4. Linfocitos T citotóxicos inactivados, “ C_i ”	35
5.2.5. Factor de crecimiento transformante beta, “ F_β ”	35
5.3. Simulación computacional	36
5.4. Ajuste por mínimos cuadrados	36
5.5. Parámetros del modelo	37
6 Resultados	43
6.1. Simulación y validación del crecimiento de las células tumorales	43
6.1.1. Simulación del protocolo de control para la inmunoterapia con CDs	43
6.1.2. Simulación del protocolo de la inmunoterapia con CDs	45
6.2. Protocolos de inmunoterapia propuestos	47
6.2.1. Modificación de la cantidad de CDs inyectadas	48
6.2.2. Modificación de intervalo de inmunoterapia	50
6.2.3. Modificación de las dosis de CDs y el intervalo de aplicación de la inmunoterapia	51
6.2.4. Porcentaje de CDs que inducen la respuesta inmune	52
6.2.5. Importancia de la citocina $TGF - \beta$	54
6.2.6. Análisis de sensibilidad de los parámetros	54
6.3. Análisis de resultados	56
7 Conclusiones	59
7.1. Trabajo futuro	60
8 Anexo	63
Bibliografía	67

ÍNDICE DE CUADROS

4.1. Protocolos de inducción de melanoma en ratones	23
4.2. Tratamientos hipotéticos 1 para el modelo de EDOs	28
4.3. Tratamientos hipotéticos 1 para el modelo de EDOs	29
4.4. Tratamientos hipotéticos 1 para el modelo de EDOs	29
5.1. Protocolo de la inmunoterapia con células dendriticas (CDs)	32
6.1. Protocolos hipotéticos para la inmunoterapia con CDs	48
6.2. Protocolos hipotéticos modificando el intervalo de inyección de las CDs	50
6.3. Protocolos hipotéticos el % de CDs inician la respuesta inmune	53
6.4. Análisis de sensibilidad local paramétrico	56
8.1. Condiciones iniciales del modelo	63
8.2. Parámetros utilizados en el modelo EDOs	64
8.3. Parámetros utilizados en el modelo EDRs	65

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1. Esquema de la respuesta inmune adaptativa [2]	14
2.2. Inmunoterapia con CDs [2]	15
3.1. Esquema de simulación para las terapias hipotéticas	20
3.2. Inmunoterapia para gliomas malignos	21
3.3. Simulación experimental, con los siguientes parámetros $T(0) = 2$, $C(0) = 2$ para grado III $r = 0,00035$ (línea azul) y para grado IV del MG $r = 0,001$ (línea verde)	22
4.1. Esquema de simulación para las terapias hipotéticas	26
4.2. Esquema de selección de la terapia hipotética a probar	26
4.3. Terapia 1×10^3 CDs cada 120 horas, aplicada a 100 condiciones iniciales diferentes. Se observa en <i>color rojo</i> , la células tumorales que recibieron inmunoterapia y en <i>color azul</i> el crecimiento de las células tumorales sin inmunoterapia	27
4.4. Terapia 1×10^7 CDs cada 72 horas, aplicada a 100 condiciones iniciales diferentes. Se observa en <i>color rojo</i> , la células tumorales que recibieron inmunoterapia y en <i>color azul</i> el crecimiento de las células tumorales sin inmunoterapia	28
4.5. Terapia 1×10^8 CDs cada 144 horas, aplicada a 100 condiciones iniciales diferentes. Se observa en <i>color rojo</i> , la células tumorales que recibieron inmunoterapia y en <i>color azul</i> el crecimiento de las células tumorales sin inmunoterapia	29
5.1. Ajuste por mínimos cuadrados a los datos reales (<i>línea roja</i>) utilizando la ecuación logística (<i>línea verde</i>) y a la ecuación de Gompertz (<i>línea roja</i>).	37
5.2. Búsqueda exhaustiva del parámetro a_T . Se muestran los datos reales de las células tumorales (<i>línea azul</i>), células tumorales a las que se les aplicó la inmunoterapia utilizando diferentes valores de a_T (<i>líneas verdes</i>), resultado de la mejor aproximación a los datos reales (<i>línea roja</i>).	39
5.3. Búsqueda exhaustiva del parámetro " r_a ". Se muestran los datos reales de las células tumorales (<i>línea azul</i>), células tumorales a las que se les aplicó la inmunoterapia utilizando diferentes valores de " r_a " (<i>líneas verdes</i>) y el resultado de la mejor aproximación a los datos reales (<i>línea roja</i>).	39

5.4. Búsqueda exhaustiva del parámetro “ r_e ”. Se muestran los datos reales de las células tumorales (<i>línea azul</i>), células tumorales a las que se les aplicó la inmunoterapia utilizando diferentes valores de “ r_e ” (<i>líneas verdes</i>) y el resultado de la mejor aproximación a los datos reales (<i>línea roja</i>).	40
5.5. Búsqueda exhaustiva del parámetro “ τ ”. Se muestran los datos reales de las células tumorales (<i>línea azul</i>), células tumorales a las que se les aplicó la inmunoterapia utilizando diferentes retardos de tiempo (<i>líneas verdes</i>), resultado de la mejor aproximación a los datos reales (<i>línea roja</i>).	41
6.1. Simulación del crecimiento de las células tumorales (control de la inmunoterapia). Duración de la simulación 700 h, $T(0) = 6 \times 10^4$, $r = 0,00106h^{-1}$ y $K = 6,754^{15} cells$ (Table 5.1)	44
6.2. Simulación del crecimiento de las CDs y las CTLs activadas (control de la inmunoterapia). Duración de la simulación 700 h, $T(0) = 6 \times 10^4$, $r = 0,00106h^{-1}$ y $K = 6,754^{15} cells$ (Table 5.1)	44
6.3. Simulación del crecimiento de las CTLs inactivadas y la expresión del $TGF - \beta$ (control de la inmunoterapia). Duración de la simulación 700 h, $T(0) = 6 \times 10^4$, $r = 0,00106h^{-1}$ y $K = 6,754^{15} cells$ (Table 5.1)	45
6.4. Simulación de la inmunoterapia (Protocolo 1). Duración de la simulación 1000 h con $T(0) = 6 \times 10^4$, $r = 0,00106h^{-1}$ y $K = 6,754^{15} cells$ (Tabla 5.1)	46
6.5. Simulación de la inmunoterapia (Protocolo 1), crecimiento las CTLs activadas y la infusión de las CDs. Duración de la simulación 1000 h con $T(0) = 6 \times 10^4$, $r = 0,00106h^{-1}$ y $K = 6,754^{15} cells$ (Tabla 5.1)	46
6.6. Simulación de la inmunoterapia (Protocolo 1), dinámica de las CTLs inactivadas. Duración de la simulación 1000 h con $T(0) = 6 \times 10^4$, $r = 0,00106h^{-1}$ y $K = 6,754^{15} cells$ (Tabla 5.1)	47
6.7. Simulación de la inmunoterapia (Protocolo 1), dinámica de la citocina $TGF - \beta$. Duración de la simulación 1000 h con $T(0) = 6 \times 10^4$, $r = 0,00106h^{-1}$ y $K = 6,754^{15} cells$ (Tabla 5.1)	47
6.8. Simulación de protocolos hipotéticos con diferentes cantidades de CDs por dosis. El intervalo de inyección es cada 168 horas durante tres semanas, aplicando 10^3 CDs por dosis (Tabla 6.1, Protocolo 3), se obtuvo un porcentaje de decrecimiento del 19,92%. La población de células tumorales (<i>línea gruesa</i>) y la cantidad de CDs inyectadas (<i>línea punteada</i>) son mostradas	49
6.9. Simulación de protocolos hipotéticos con diferentes cantidades de CDs por dosis. El intervalo de inyección es cada 168 horas durante tres semanas, aplicando 10^8 CDs por dosis (Tabla 6.1, Protocolo 3), se obtuvo un porcentaje de decrecimiento del 88,69%. La población de células tumorales (<i>línea gruesa</i>) y la cantidad de CDs inyectadas (<i>línea punteada</i>) son mostradas	49

6.10. Simulación de la inmunoterapia cambiando el número de inyecciones de CDs. Intervalo de inyección cada 48 horas aplicando 10^6 CDs por dosis durante tres semanas (Table 6.2, Protocol 10) con un 85,97% de decrecimiento obtenido. En la gráfica se muestra la población tumoral (<i>línea gruesa</i>) y cantidad de CDs inyectadas (<i>línea puntada</i>)	51
6.11. Simulación de la inmunoterapia cambiando el número de dosis de CDs suministradas. Intervalo de inyección cada 192 horas aplicando 10^6 CDs por dosis durante tres semanas (Tabla 6.1, Protocolo 15), un 37,12% de decrecimiento fue obtenido. Se muestran la población tumoral (<i>línea gruesa</i>) y la cantidad de CDs inyectadas (<i>línea punteada</i>).	52
6.12. Diagrama de la metodología de prueba de las inmunoterapias hipotéticas.	53
6.13. Porcentaje de CDs inyectadas en la inmunoterapia que influyen en la eficiencia de la inmunoterapia. La <i>línea azul</i> muestra el número de células tumorales obtenidas sin aplicar la inmunoterapia, la <i>línea negra</i> muestra el resultado de aplicar el protocolo 17, <i>línea azul</i> protocolo 18, <i>línea verde</i> protocolo 19, <i>línea magenta</i> protocolo 6, <i>línea morada</i> protocolo 20, <i>línea amarilla</i> protocolo 21	54
6.14. Efecto de la citocina $TGF - \beta$ en la inmunoterapia. Intervalo de inyección cada 168 horas aplicando 10^6 CDs por dosis durante 1000 horas. Se muestra la población de células tumorales (<i>línea verde</i>) considerando considerando la influencia de la citocina $TGF - \beta$ en la simulación del modelo de EDRs y la población de células tumorales (<i>línea roja</i>) sin la influencia de la citocina $TGF - \beta$ en la simulación del modelo	55
6.15. Análisis paramétrico de sensibilidad (LPSA) para el modelo de EDRs aplicando el Protocolo 1 (Table 5.1)	57

INTRODUCCIÓN

La incidencia de cáncer alrededor del mundo ha ido incrementando dramáticamente debido al crecimiento de la población y su envejecimiento. Para el año 2030 se tiene una expectativa de crecimiento de 21.7 millones de nuevos casos de cáncer y 13 millones de muertes por cáncer es por ello que el estudio de su prevención y tratamiento es de importancia mundial para su erradicación [3].

Una de las modalidades de tratamiento que se han estudiado en los últimos años es la basada en el principio de que el sistema inmune de los organismos es capaz de generar una respuesta inmune contra las células tumorales [4], esta terapia también es llamada inmunoterapia [2].

La inmunoterapia que utiliza células dendríticas (CDs) para inducir la respuesta inmune contra diferentes variantes del cáncer es una terapia que ha sido explorada en los últimos años por los médicos, biólogos e inmunólogos con resultados prometedores [5]. Este tipo de terapia induce una respuesta inmune específica, provocando con esto que los pacientes no desarrollen una respuesta adversa al tratamiento [2].

Sin embargo, a pesar de los logros que se han obtenido hasta ahora, no se ha logrado una terapia efectiva contra el cáncer. Por lo que las investigaciones continúan realizándose encaminadas al desarrollo de nuevas inmunoterapias y la optimización de las existentes [6]. En esta dirección la utilización de herramientas desarrolladas en otras áreas de investigación como las ciencias de la computación y las matemáticas han permitido obtener un conocimiento más profundo sobre el desarrollo, crecimiento y expansión del cáncer, al crear modelos matemáticos que simulen el comportamiento de algunas de las complejas interacciones que ocurren en los pacientes con cáncer [7].

En esta investigación se presenta dos modelos matemáticos, los cuales representan una vista simplificada de los mecanismos que ocurren en el sistema inmune de ratones con melanoma y su interacción con la inmunoterapia con CD4s.

El primer modelo es un modelo de cuatro ecuaciones diferenciales ordinarias (EDOs), el cuál simula el crecimiento de células tumorales en un ratón con melanoma al aplicarle diferentes inmunoterapias hipotéticas con CD4s. Para su diseño se considero las interacciones entre las células tumorales, las CD4s aplicadas por la inmunoterapia, los linfocitos T citotóxicos (CTLs) activados y el factor de crecimiento transformante beta ($TGF - \beta$) como inhibidor del sistema inmune. Los resultados muestran los rangos de operación entre los cuales se debería encontrar la cantidad de CD4s inyectadas en los ratones para obtener mejores posibilidades de éxito en una inmunoterapia.

En base a las conclusiones y observaciones obtenidas del modelo de EDOs, se elaboró un segundo modelo matemático de cinco ecuaciones diferenciales con retardo (EDRs) que representa algunas interacciones que ocurren en el sistema inmune de un ratón con melanoma y la inmunoterapia con CD4s; en este modelo se incluyó además el tiempo de retardo que existe entre la infusión de la inmunoterapia y la muerte de las células tumorales.

El modelo es validado comparando los resultados de las simulaciones computacionales con los resultados de las pruebas biológicas de la inmunoterapia con CD4s desarrollada por el Laboratorio de Inmunoterapia Experimental de la Facultad de Medicina en la Universidad Autónoma de México. Los resultados del crecimiento de las células tumorales obtenidos de la simulación del modelo de EDRs, muestran un crecimiento similar a la población de células tumorales obtenidas en los datos biológicos.

Esto nos permitió usar el modelo como una infraestructura para probar diferentes protocolos hipotéticos de tratamiento. Los resultados numéricos de estas simulaciones sugieren que al incrementar una sola dosis de CD4s inyectadas en los ratones el crecimiento de las células tumorales decae de forma más rápida que con la terapia usada actualmente, logrando obtener mayores posibilidades de éxito en la eliminación de las células tumorales.

Finalmente, la modelación y simulación de estos modelos nos permitió describir, cuantificar y predecir el comportamiento de algunos de los mecanismo complejos que ocurren dentro del sistema inmune de los ratones al recibir la inmunoterapia con CD4s. Lo que se traduce en un aumento en el conocimiento sobre esta enfermedad que podría ayudar a disminuir los costos y tiempo de experimentación a los biólogos, médicos y oncólogos.

1.1. Planteamiento del problema

La incidencia de personas que padecen melanoma, ha ido incrementando en los últimos años y aunque existen tratamientos muy exitosos para etapas tempranas, no lo es así para etapas tardías, donde la cirugía, quimioterapia o radioterapia ha demostrado poco éxito. Uno de los estudios más prometedores son las inmunoterapias, las cuales utilizan el propio sistema inmune del organismo para atacar el cáncer tratando de inducir una respuesta inmune utilizando células dendríticas, células citotóxicas o la infusión de citocinas como el caso del $IL - 2$.

Sin embargo, estos estudios son costosos y llevan mucho tiempo de elaboración. Es en este punto donde el uso de otras áreas de conocimiento como las ciencias de la computación y las matemáticas, permite ayudar en la gran tarea de entender y tratar a una enfermedad como es el cáncer.

En este trabajo se plantea el estudio de inmunoterapias en ratones con melanoma a nivel celular. Utilizando un modelo de EDOs y un modelo de EDRs, considerando una aproximación a la dinámica de las células tumorales debido a su interacción con las CDs propias de la inmunoterapia, las células del sistema inmune (células citotóxicas activadas e inactivadas) y la citocina $TGF - \beta$.

1.2. Objetivo

El objetivo general es estudiar la dinámica del crecimiento del melanoma en ratones y la inmunoterapia con CDs. Utilizando la modelación matemática y las simulación computacional para entender los mecanismos que ocurren dentro del sistema inmune del ratón, la infusión de CDs y el crecimiento de células de melanoma hemos tratando de predecir su respuesta a la inmunoterapia con CDs.

1.2.1. Objetivos específicos

- Realizar una representación matemática de las interacciones entre el sistema inmune, las células cancerosas y las CDs propias de la inmunoterapia.
- Localizar los rangos de operación del tiempo de infusión y cantidad de CDs inyectadas entre los cuales se deberán encontrar las inmunoterapia con mayores posibilidades de éxito.
- Proponer un modelo matemático *ad hoc* a la inmunoterapia antitumoral que desarrolla el Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos de la Facultad de Medicina en la UNAM en ratones con melanomas.

- Proponer una nueva terapia de CDs que disminuyan el crecimiento de las células del melanoma y que sea biológicamente posible realizar dentro de los laboratorios de la UNAM.
- Medir la eficacia de estas terapias propuestas, utilizando los datos experimentales arrojados por el modelo.
- Realizar un estudio de sensibilidad a los parámetros utilizados en el modelo.

MARCO TEÓRICO

2.1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad que engloba una gran variedad de padecimientos y comienza cuando las células del organismo empiezan a crecer sin control provocando que exista un desequilibrio entre la replicación y muerte celular [8].

Las células cancerosas tiene la capacidad de formar nuevos tejidos, invadir el tejido que las rodea y diseminarse a otros órganos dentro del cuerpo, impidiendo el correcto funcionamiento de los órganos donde se encuentran [9, 10]. Este proceso es llamado *metástasis* y sucede cuando las células cancerosas entran en el torrente sanguíneo o los vasos linfáticos [11].

Existen diferentes tipos de cáncer con diferentes características entre sí, como la tasa de crecimiento, los órganos que afecta, la forma en que aparece la metástasis o su respuesta a diferentes tratamientos, haciendo muy difícil encontrar tratamientos eficientes. A pesar de que cada día se conoce más sobre la forma de prevenir y tratar el cáncer, cada año aumenta el número de personas que lo padecen y que mueren si no son tratadas adecuadamente [8].

2.2. Melanoma

Una forma muy peligrosa del cáncer de piel es el melanoma, el cuál ha estado incrementando su incidencia en personas que lo padecen alrededor del mundo [12, 13]. En las últimas décadas, ha habido grandes avances en los tratamientos en etapas tempranas con una alta tasa de éxito [2, 14], sin embargo no es así en etapas tardías en las cuales los tratamientos son limitados [15].

El melanoma es un tipo de cáncer que inicia con las células *melanocitas* situadas en la epidermis (capa exterior de la piel, que tiene la función de proteger a las capas inferiores y a los órganos del cuerpo del medio ambiente). Otro nombres con los que se le conoce a este tipo de cáncer son *melanoma maligno* o *melanoma cutáneo*. La mayoría de las células de melanoma producen melanina, por lo que los tumores de melanoma son generalmente color café o negro [12].

El melanoma es 20 veces más común en personas de piel blanca que en personas de piel oscura. Se han encontrado diferentes factores de riesgo que pueden hacer que una persona tenga más probabilidad de desarrollar melanoma, en los que se incluye la exposición a rayos ultravioleta (UV), historial familiar con melanoma, inmunosupresión, edad o género entre otros.

Algunos de los principales tratamientos que se dan a los pacientes con melanoma son [12, 13]:

- Cirugía. Este tratamiento consiste en extirpar el tumor junto con una pequeña cantidad de piel normal no canceroso en los bordes, aplicando anestesia local. Es la opción principal de tratamiento para la mayoría de los melanomas y usualmente tiene éxito en estados tempranos del melanoma.
- Quimioterapia. Utiliza medicamentos que pueden matar a las células cancerosas. Los medicamentos generalmente son inyectados en las venas o administrados por vía oral mediante píldoras. Estas viajan a través del torrente sanguíneo a todas partes del cuerpo. Atacando a las células que se encuentran dividiendo.
- Radioterapia. Utiliza rayos X, los cuales matan a las células cancerosas mediante un haz de luz. La radioterapia se enfoca en la zona donde se encuentra el tumor.
- Inmunoterapia. Utiliza medicamentos que estimulan el sistema inmune del propio paciente para que pueda reconocer y destruir a las células cancerosas. Es utilizado para tratar a pacientes con estados avanzados de melanoma.

2.3. Inmunología

A través de los años se han estudiado las defensas que el cuerpo ejerce contra la presencia de agentes infecciosos o la introducción de sustancias foráneas capaces de causar algún daño o enfermedad al organismo [2].

El sistema encargado de generar estas defensas es el sistema inmune, el cuál está formado por células y moléculas que colectivamente y coordinadas tratan de protegerlo. El sistema inmune es altamente efectivo en detectar y eliminar agentes infecciosos externos, como bacterias, hongos o virus que se encuentran en nuestros tejidos.

Existe un gran número de investigaciones sobre la capacidad del sistema inmune de eliminar tumores. Las dificultades asociadas a este tipo de defensa contra el cáncer son evidentes desde el principio: el sistema inmune está organizado para reconocer y eliminar agentes externos del cuerpo y permitir a los tejidos propios del cuerpo vivir en paz. Sin embargo, las células cancerosas son nativas del cuerpo y son en muchos sentidos, indistinguibles de las células normales del cuerpo.

2.3.1. Respuesta inmune adaptativa

El sistema inmune de los organismos poseen diferentes mecanismos de defensa contra agentes infecciosos. Uno de estos mecanismos es realizado por la *inmunidad innata*. Es la primera línea de defensa contra los agentes infecciosos, está conformada por células y mecanismos de defensa bioquímicos que se encuentran antes de la infección, teniendo como objetivo el de responder rápidamente a los agentes externos. Este tipo de respuesta no distingue bien las diferencias entre los agentes externos [2].

Una reacción más tardía a los agentes externos es llevada a cabo por la *inmunidad adaptativa*, la cual es estimulada por la repetida exposición a los agentes infecciosos, incrementando su respuesta y especificidad.

La respuesta inmune adaptativa comienza cuando el sistema inmune identifica de los agentes infecciosos externos al ser presentados a las células del sistema inmune llamados linfocitos. La presentación se lleva a cabo mediante las células presentadoras de antígeno (CPAs), las cuales son capaces de reconocer e ingerir moléculas específicas del agente infeccioso (*antígenos*). Esta presentación de antígenos ingeridos por las CPAs a los linfocitos T se dan en los nodos linfáticos, para lo cual las CPAs migran siguiendo el consumo de antígeno.

Los linfocitos pueden reconocer y responder a la presencia de antígenos foráneos activándose y mediando una respuesta celular. Existen varios subtipos de linfocitos que pueden reconocer a los antígenos. Entre los que se encuentran los linfocitos T ayudantes y los linfocitos T citotóxicos (CTLs por sus siglas en inglés Cytolytic T Lymphocyte) o células T citotóxicas.

La respuesta inmune celular se monta cuando el sistema inmune desarrolla células citotóxicas capaces de reconocer y directamente atacar otras células que despliegan ciertos antígenos específicos sobre su superficie. En este caso, las células citotóxicas de linaje de los *linfocitos -T* (CTLs) han desarrollado su propia maquinaria de reconocimiento de antígenos en la forma de receptores de *células -T* (TCRs), los cuales usan para identificar a las células que producen ciertos antígenos particulares y ser destruidos por los linfocitos citotóxicos T.

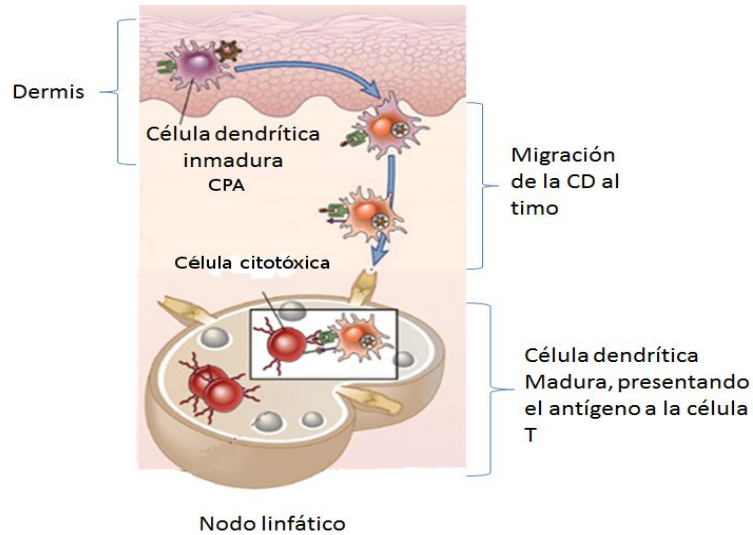


Figura 2.1: Esquema de la respuesta inmune adaptativa [2]

2.4. Inmunoterapia contra el cáncer utilizando células dendríticas

Las células cancerosas promueven el crecimiento de tumores, su movilidad, proliferación, invasión y angiogénesis vía genes inmunosupresores, macrófagos y células dendríticas inmaduras. Además, muchos tumores expresan o inducen citocinas inmunosupresoras como el $TGF - \beta$ y el $IL - 10$. Como resultado, la presentación cruzada de tumor-antígeno por las CDs induce *anergia* o supresión de las células T (no activación) lo que provoca la inactivación de la respuesta antitumoral. En la actualidad existe una terapia prometedora antitumoral que usa infusiones de CDs [5].

Las células dendríticas, juegan un rol muy importante en la iniciación, programación y regulación de la respuesta inmune específica. Su objetivo al utilizarse en la inmunoterapia, es inducir una respuesta específica de las células T hacia la células cancerosas. La primera etapa de esta inmunoterapia consiste en cultivar a las CDs con antígenos específicos tumorales. Lo que permite inducir la respuesta inmune de las células T y activar las CTLs para facilitar la eliminación del tumor. Esto puede ser alcanzado cultivando de forma *in vitro*, las CDs (las cuales previamente fueron obtenidas de los pacientes) con adyuvantes (proteínas que inducen la maduración de las CDs) y los antígenos específicos del tumor [6].

La segunda etapa consiste en inyectar estas células dentro del paciente [6]. Al utilizar CDs activadas permite inducir la respuesta inmune de las células T y activar las CTLs para facilitar la eliminación del tumor.

2.4. INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER UTILIZANDO CÉLULAS DENDRÍTICAS

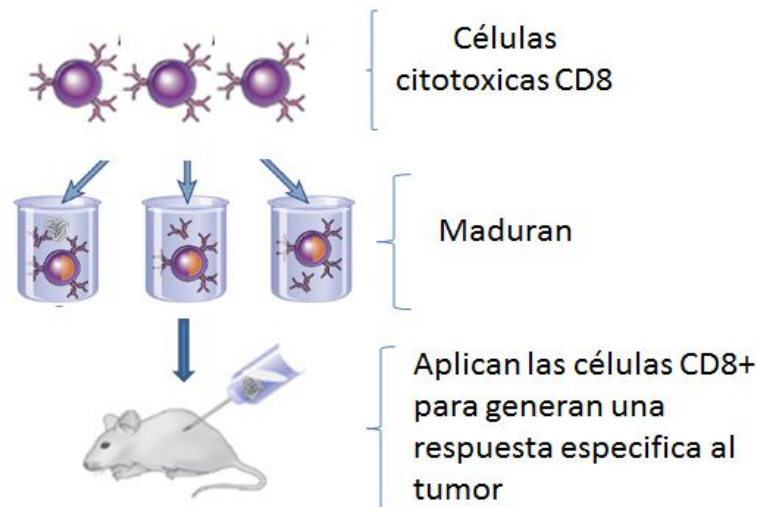


Figura 2.2: Inmunoterapia con CDs [2]

Recientes estudios sugieren que pacientes con altos números de CDs presentes en los tumores sobreviven más que los pacientes con pocas CDs en el tejido con cáncer. Los resultados del estudio realizado por Daud et al., sobre melanoma en estadio III y IV, donde las CDs fueron tratadas con citocinas maduras antes del tratamiento muestran remisión o retraso en su recurrencia (Daud et al.).

El desarrollo de nuevas terapias y la optimización de las terapias existentes, continúa siendo un importante campo muy prometedor para la investigación de las terapias contra el melanoma en los próximos años. La necesidad de diseñar mejores inmunoterapias que aumenten la respuesta inmune es crucial para el futuro de las terapias contra el melanoma, lo cual va unido con el mejor entendimiento de la respuesta inmune y la enfermedad [16].

MODELACIÓN MATEMÁTICA

3.1. Modelación

Los modelos matemáticos tratan de describir partes del mundo real, utilizando conceptos matemáticos como constantes, variables, funciones, ecuaciones, etc [17].

Su objetivo más importante es el de representar de forma fiel el comportamiento de un sistema físico que permita su mejor entendimiento. Los modelos matemáticos permiten explorar las consecuencias de manipular varios de sus parámetros asociados con un escenario particular, utilizando métodos matemáticos y la simulación computacional [18]. El observar los resultados de estas manipulaciones permite el diseño de nuevos escenarios de experimentación que definan mejor la direcciones de las investigaciones [19, 20]. Por ejemplo, los modelos que simulan el crecimiento de cáncer, al manipular sus parámetros permiten probar protocolos de tratamiento antes de que sean puestos en práctica, lo que ayudaría a predecir la eficacia de estos [21–23].

Tiene claramente otras dos ventajas: el bajo coste económico, dado que la experimentación real requiere de mayores recursos económicos y el tiempo de ejecución, sensiblemente inferior en la utilización de simulaciones numéricas de los modelos matemáticos [17].

La elaboración de un modelo matemático lleva tiempo y necesita bases de datos fiables de los experimentos físicos estudiados [17] debe seguir los siguientes puntos en su elaboración [24].

1. Entender el problema biológico (identificar los factores relevantes, la dependencia e independencia de variables).
2. Realizar una representación realista del fenómeno biológico (descripción y abstracción de

las ideas utilizando matemáticas).

3. Encontrar una solución que sea utilizable
4. Los resultados deben tener una interpretación física en términos de predicciones.

Es importante recalcar que un modelo matemático es una descripción del fenómeno estudiado y no una explicación completa de su comportamiento [24]. Su principal uso es el de probar teorías acerca del comportamiento del sistema, dando predicciones sobre su comportamiento y aun cuando sea posible recrear un espacio y tiempo similar al del fenómeno estudiado, se debe hacer la distinción de los resultados que el modelo muestra y que tan cerca de la realidad se encuentra.

Existen varias herramientas que pueden utilizarse para diseñar un modelo; tal como [18]:

- Ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO). Utilizadas para modelar poblaciones que evolucionan en un periodo de tiempo continuo.
- Ecuaciones en derivadas parciales (EDPs). Son usadas para modelar dos o más variables independientes, por ejemplo el tiempo y el espacio o el tiempo y la edad.
- Modelos estocásticos. Son modelos completamente probabilísticos.
- Automatas celulares (AC). Son modelos discretos, donde las variables independientes y dependientes son discretas. Un AC puede ser determinista o estocástico cuando su regla de evolución es estocástica.

La selección de una de estas herramientas para diseñar un modelo depende de las preguntas que se quieran responder, el propósito del modelo, los datos disponibles, etc [18].

3.1.1. Modelos continuos de población

Uno de los problemas más estudiados y que ha tenido éxito desde el punto de vista de la modelación matemática es el crecimiento de las poblaciones, la complejas interacciones entre las diferentes poblaciones y su relación con su medio ambiente. Algunos ejemplos de estos estudios son el crecimiento de una sola especie (crecimiento de conejos), modelos de interacción de dos especies (modelo depredador-presa), sociedades de especies múltiples en ecología (cadenas de alimentación, estructuras de comunidades) e incluso en epidemiología de enfermedades infecciosas [19].

$$\frac{dN}{dt} = \text{nacimientos} - \text{muerte} + \text{migracion} \quad (3.1)$$

La ecuación anterior es un ejemplo de una ecuación de *conservación*, la cuál podría describir la dinámica de la población de una sola especie es decir la tasa de cambio de la población. Donde $N(t)$ es la población de la especie al tiempo t .

3.1.2. Modelos con retardo

Algunos modelos continuos consideran que la interacción entre sus elementos ocurren de forma instantánea o al mismo tiempo, sin embargo en la realidad esto no ocurre en la mayoría de las veces [24]. Una forma de tratar este tipo de interacciones es incluir dentro del modelo, el tiempo de retardo que se da entre las interacciones del fenómeno. En las ecuaciones diferenciales estos retardos se pueden considerar en los modelos de ecuaciones diferenciales con retardo (EDRs) de la forma:

$$\frac{dN(t)}{dt} = f(N(t), N(t-T)) \quad (3.2)$$

donde, $T > 0$ es el retardo y es tratado como otro parámetro dentro del modelo.

3.1.3. Modelación matemática y el cáncer

En cuanto a la enfermedades como el cáncer, la oncología matemática describe los procesos relacionados con esta enfermedad como un conjunto de complejas interacciones, con objetivo de identificar y analizar los procesos biológicos que ocurren en ella para cuantificar y el predecir su comportamiento [1]. Lo que ha ayudado a entender la evolución de esta enfermedad y a probar hipótesis sobre esta.

Uno de los temas claves sobre el cáncer es la predicción del crecimiento de los tumores, el cuál es estudiado con gran interés por los físicos y computólogos debido a la importancia que tiene para su tratamiento [21, 23, 25].

La evaluación de la calidad de estos modelos es compleja debido a que pueden existir diferentes aproximaciones para reproducir un mismo resultado experimental [20]. Chauviere et. al [1] refieren que la elección de un tipo de modelación está determinada por la escala de interés a la que se estudiará el cáncer y el nivel de detalle que se requiere para el problema en particular y que por lo tanto un buen modelo es aquel que ofrece soluciones que pueden ser probadas experimentalmente y que provee conocimientos verdaderos sobre el problema biológico. Mientras que Byrne et. al [20] sostienen que la elección depende de la utilización que se da al modelo y los tipos de datos que están disponibles.

Por otro lado, los modelos basados en ecuaciones pueden describir hasta cierto nivel detalle, el crecimiento del tumor, la evolución de nutrientes, la distribución de las redes vasculares, la

estructura de la matriz extracelular entre otros. Para esto se requiere datos experimentales de varios tipos y la evaluación de varios parámetros (ejemplo, tasas de proliferación, coeficientes de difusión de químicos dentro de los tejidos). Sin embargo, esta adquisición y extracción es una tarea muy difícil, donde es necesario una gran interacción entre modeladores, experimentalistas y clínicos para lograr una mejor modelación.

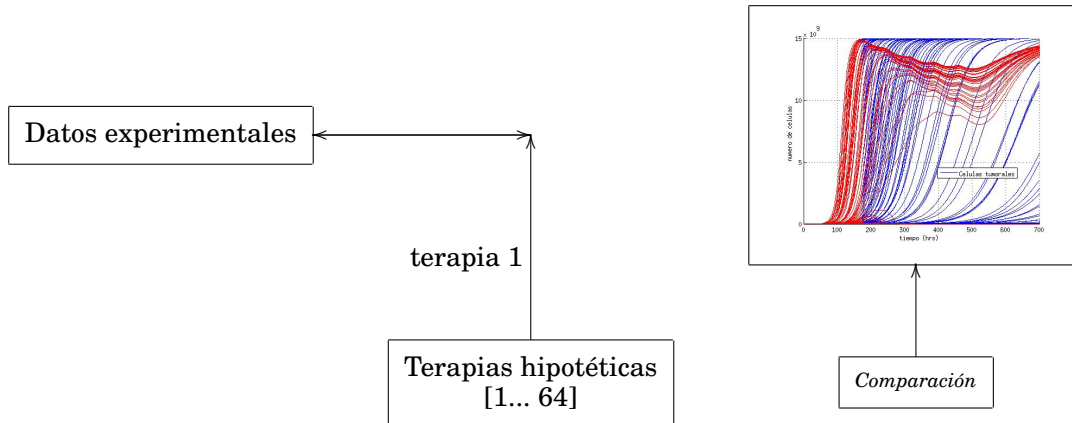


Figura 3.1: Esquema de simulación para las terapias hipotéticas

3.1.4. Inmunoterapia aplicada contra gliomas malignos (GM) y glioblastomas malignos (GBM) (Aproximación a un problema similar)

En el año 2007, Natalie Kronik et al. [21], proponen un modelo matemático de seis ecuaciones diferenciales para la inmunoterapia adaptativa aplicada a gliomas malignos (MG), el cual describe las complejas interacciones de las células tumorales con aCTL y los receptores MHC, mediante las $TGF-\beta$ y las $INF-\gamma$ (Figura 3.2).

Los parámetros del modelo que fueron obtenidos de experimentos biológicos *in vitro* e *in vivo* en humanos. EL modelo completo es usado para recuperar o simular varios escenarios inmunoterapeúticos y está predicción es validada por la comparación con dos conjuntos de resultados empíricos, que son de Burger et al. [26] y Kruse et al. [27] y Kruse and Rubinstain [28]. El estudio se completó con simulaciones que identificaron escalas mejoradas de inmunoterapia e indicaciones cuya intervención podría llevar a la cura.

En la Figura 3.2, se describen las interacciones de las células y los MG. Para una respuesta inmune efectiva los linfocitos T-CD4 deben pasar a través de la barrera BBB (*barra azul*) y unirse a las moléculas MCH-II (*pequeñas lunas amarillas*) en la superficie de las CPA (*figura en forma de cangrejo*) or los astrocitos (*figura en forma de célula estirada*). Esta unión eventualmente activa la transición de los linfocitos CD8 a CTLs (*estrella morada*). La CTL se junta a una molécula MCH-I (*estrella de cuatro puntos*) en la superficie de la célula tumoral destruyendola. La célula tumoral en turno produce altos niveles de $TGF-\beta$ (*bolitas naranjas la parte superior*) reduciendo

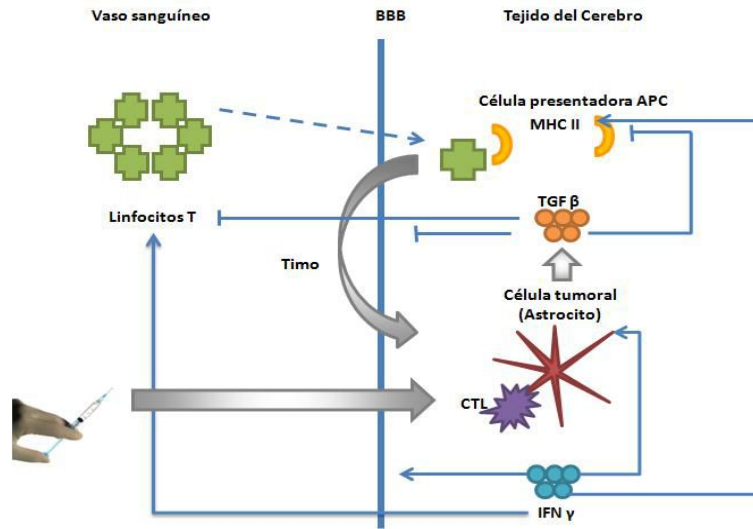


Figura 3.2: Inmunoterapia para gliomas malignos

la permeabilidad de la BBB, la expresión del MHC-II y la actividad de los linfocitos T. El $INF-\gamma$ (bolitas azules la parte inferior) producen CTLs, incrementa la permeabilidad de la BBB, aumenta la activación de los linfocitos T y con ellos la expresión de las moléculas MHC-I y las moléculas MHC-II.

El modelo simula un tumor de grado III sin tratar y un GBM en progreso. Se distingue entre el grado III y el tumor GBM por la tasa máxima de crecimiento $r = 0,00035$ y $r = 0,001$, respectivamente. La figura 3.3, muestra los resultados de la simulación del crecimiento natural de un tumor grado III y GBM.

Los resultados corroboran las estimaciones hechas por Burger et al.[26], en el caso del tumor de grado II requiere aproximadamente de 3 a 5 años para pasar desde el tamaño mínimo del diagnóstico hasta el máximo tamaño para la muerte del paciente. Siguiendo estas estimaciones esto da un crecimiento de 10^{10} a 10^{11} células. Burger et al.[26] reportan que para el GBM el tumor requiere un año para pasar desde el tamaño mínimo del diagnóstico hasta el máximo tamaño para la muerte del paciente.

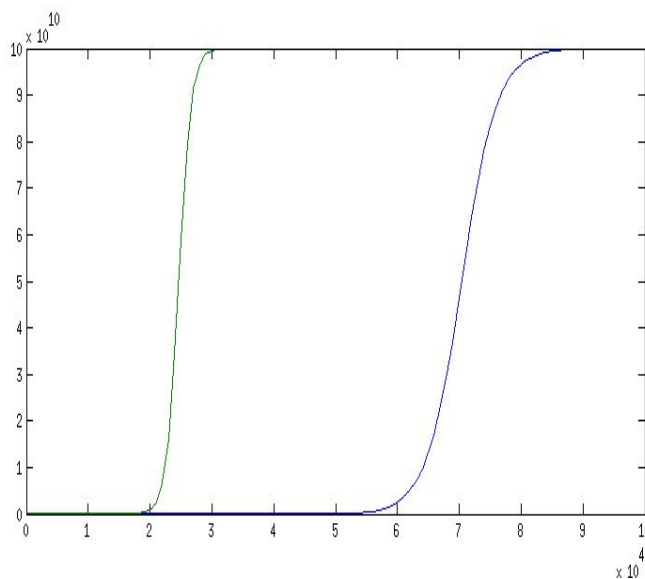


Figura 3.3: Simulación experimental, con los siguientes parámetros $T(0) = 2$, $C(0) = 2$ para grado III $r = 0,00035$ (línea azul) y para grado IV del MG $r = 0,001$ (línea verde)

MODELACIÓN DE LA INMUNOTERAPIA CON CD PARA RATONES CON MELANOMA ASUMIENDO UNA RESPUESTA INMEDIATA

En los últimos años se ha desarrollado varias inmunoterapias contra el melanoma con el objetivo de activar la respuesta inmune y estimular los mecanismos de defensa que el propio organismo tiene hacia el cáncer. En el año 2001, Overwilk et al. [29] plantean protocolos para probar en ratones *in vivo* modelos de inmunoterapia y observar el crecimiento de subcutáneo y pulmonar del melanoma B16. Estos protocolos proponen una forma de implantar las células tumorales en los ratones, sin embargo hasta ahora no existe un protocolo estándar para implementar las infusiones de las inmunoterapias.

Cuadro 4.1: Protocolos de inducción de melanoma en ratones

Protocolo	Tipo	Infusión	Tamaño	Tipo de ratón
Melanoma subcutáneo	B16 melanoma	1×10^5 células/ratón	1cm^3 de 14 a 21 días	C57BL/6
Melanoma múltiple pulmonar (metástasis)	B16 melanoma	2×10^5 células/ratón	50 a 250 nódulos pulmonares de 16 a 18 días	C57BL/6

El uso de CD activadas es parte de las nuevas estrategias terapéuticas para aumentar la respuesta de las CTLs. El objetivo de las vacunas con CD es inducir la respuesta inmune de las células T y activar las CTLs para facilitar la eliminación del tumor.

Los experimentos *in vivo* sin embargo requieren una planificación muy cuidadosa, además de que toman varias horas ininterrumpidas de trabajo para tratar de minimizar el tiempo en que

las células tumorales o las CTLs estén en el hielo [29].

El siguiente estudio, muestra un modelo matemático de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs), el cual simula algunas de las interacciones del sistema inmune en ratones con melanoma y la inmunoterapia que se aplica a estos utilizando células dendríticas. Con el objetivo de determinar los rangos de operación entre los que se podría encontrar una terapia con CDs con mayores posibilidades de éxito, el modelo simula 64 inmunoterapias propuestas aplicadas a diferentes condiciones iniciales.

4.1. Modelo de EDOs

Considerando el trabajo realizado por Kronik et. al [21, 22], Pillis Et. al [23] y los experimentos biológicos reportados por Piñon Et. al [30] se construyó un modelo matemático de 4 ecuaciones diferenciales ordinarias, las cuales representan algunas interacciones del sistema inmune y la inmunoterapia de CD que aplica a los ratones con melanoma.

La ecuación 4.1 describe el crecimiento de las células tumorales utilizando una ecuación logística, considerando que su muerte solo se da por las células CTLs activadas y por la citocina $TGF - \beta$ que actúa como inhibidor del sistema inmune. La ecuación 4.2 describe la infusión de células dendríticas dependiente de la inmunoterapia hipotética que será evaluada. Para este modelo se consideró que las células CTLs son activadas y replicadas en función de las células dendríticas además de que las CTLs inactivadas son constantes (consideradas en las condiciones iniciales) y que solo se activarán cuando haya presencia de células dendríticas, mientras que la muerte de las CLTs se da por muerte natural (ecuación 4.3). Por último, la producción de la citocina $TGF - \beta$ por las células tumorales como inhibidor del sistema inmune está representada por la ecuación 4.4.

Crecimiento de las células tumorales

$$\frac{dT}{dt} = r_T \cdot T \left(1 - \frac{T}{K}\right) - a_T \cdot C_a \left(\frac{T}{T + h_T}\right) \left(a_{T\beta} + \frac{e_{T,\beta}(1 - a_{T,\beta})}{F_\beta + e_{T,\beta}}\right). \quad (4.1)$$

La ecuación 4.1, describe el crecimiento de las células tumorales. El primer término del lado derecho describe el crecimiento como una función logística, donde r_T es la tasa de crecimiento de las células y K es límite de crecimiento de las células tumorales. El segundo término describe su eliminación por las CTLs activadas. El parámetro a_T es la máxima eficiencia que con la que las CTLs matan a las células tumorales por lisis, el término $\frac{T}{T+h_T}$ define la accesibilidad de las células CTLs a las células tumorales utilizando un término de saturación de michaelis-menten con una constante de michaelis-menten h_T . El último término del lado derecho de la ecuación 4.1

representa el efecto que causa $TGF - \beta$, al inhibir la eficiencia de las CTLs. Se considera también una función de saturación inversa, en este caso lo mínimo que puede reducir la eficiencia de las CTLs es el término $a_{T\beta}$.

Crecimiento de las células dendríticas

La ecuación 4.2, describe la inmunoterapia aplicada utilizando células dendríticas. Se considera que el número de CDs, d_0 decae a una tasa constante μ_D , entonces, para $t < 168$ se considera que el número de CDs está dado por

$$D(t) = d_0 e^{-\mu_D t}, \quad \text{Si } t < 168$$

con $t_n = n \cdot 168$ para $n = 1 \dots 3$, son introducidas en el ratón por la inmunoterapia 10^6 CDs. Por lo tanto, el número de CDs esta dado por

$$D(t) = \sum_{n=0}^3 d_n(t) e^{-\mu_D(t-168n)}, \quad \text{Si } t > 0$$

donde $d_n(t) = 10^6 \chi_{168n}(t)$ para $\chi_{168n}(t) = 0$ Si $t < 168n$ y $\chi_{168n}(t) = 1$ en otro caso.

Notar que la evolución de las CDs dentro de los intervalos $(168(n-1), 168n)$ para $n = 1 \dots 6$ esta dado por

$$\frac{dD}{dt} = -\mu_D D, \quad t \in (168(n-1), 168n) \text{ para } n = 1 \dots 3 \quad (4.2)$$

Crecimiento de las células CTLs activadas

En ecuación 4.3, se describe la dinámica de las CTLs activadas, el primer término del lado derecho de la ecuación, se refiere a la replicación o expansión de las células activadas por las células dendríticas cuando estas llegan a los nodos linfáticos, el siguiente término es la activación de las células CTLs naive o endógenas del organismo, esto solo lo va a realizar cuando las células dendríticas sean inyectadas (no se permite nuevas CTLs en ausencia de DCs). Por último se introduce un término de muerte de las células CTLs.

$$\frac{dC_a}{dt} = r_e \cdot C_a \cdot \left(\frac{D}{D + \theta_D} \right) + r_a \cdot C_i \cdot D_{on} - \mu_{C_a} \cdot C_a. \quad (4.3)$$

donde,

$$D_{on} = \begin{cases} 0, & \text{si } D(t) = 0 \\ 1, & \text{si } D(t) > 0 \end{cases}$$

Dinámica del $TGF - \beta$ por las células tumorales

El primer término de la ecuación 4.4, representa la producción del $TGF - \beta$ por las células tumorales. Para este modelo solo consideramos que las células tumorales producen el $TGF - \beta$ a una tasa $r_{T\beta}$ y que esta se va degradando naturalmente dentro del ratón a una tasa constante μ_β

$$\frac{dF_\beta}{dt} = r_{T\beta} \cdot T - \mu_\beta \cdot F_\beta. \quad (4.4)$$

4.2. Simulación y pruebas

Para la simulación de las condiciones iniciales del tumor se tomaron en cuenta dos parámetros, la tasa de crecimiento “ r ” y población inicial de células tumorales “ t_0 ”. Se consideraron 100 valores posibles en un rango entre 0,001 y 0,1 para el parámetro r y otros 100 valores posibles para el parámetro t_0 en un rango entre 5×10^4 y 2×10^5 (Ver esquema de trabajo en la Figura: 4.1).

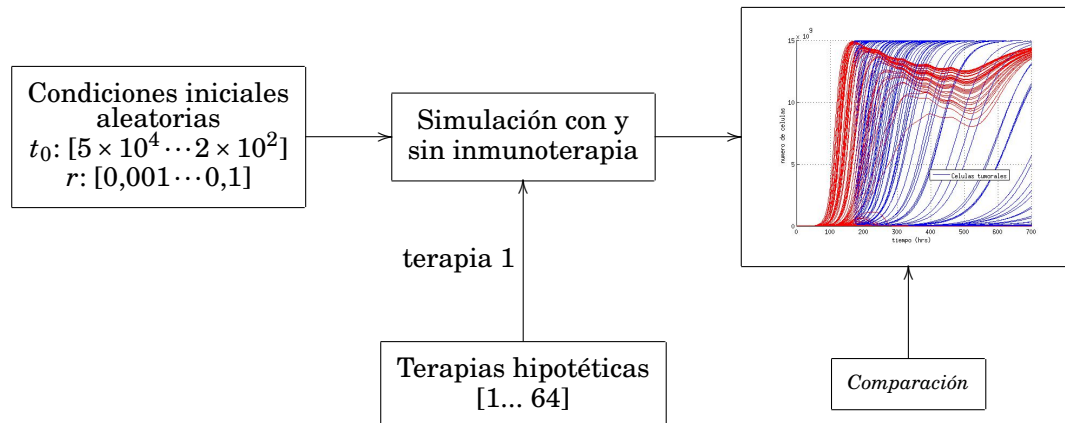


Figura 4.1: Esquema de simulación para las terapias hipotéticas

De la combinación de estos parámetros se escogieron de forma aleatoria 100 condiciones iniciales por cada terapia que se planteó para probarla. Las terapias propuestas son una combinación del número de células dendríticas inyectadas al ratón y el tiempo de aplicación de estas células dendríticas. Las células dendríticas que se utilizan para las terapias propuestas son del orden de $1 \times 10^2, 1 \times 10^3, 1 \times 10^4, 1 \times 10^5, 1 \times 10^6, 1 \times 10^7, 1 \times 10^8$ y 1×10^9 células dendríticas inyectadas. Mientras que el tiempo de infusión considerado fue de 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 horas (ver Figura 4.2). Las infusiones son después de las 168 horas de iniciada la simulación siguiendo los protocolos descritos por Overwijk Et. al [29].

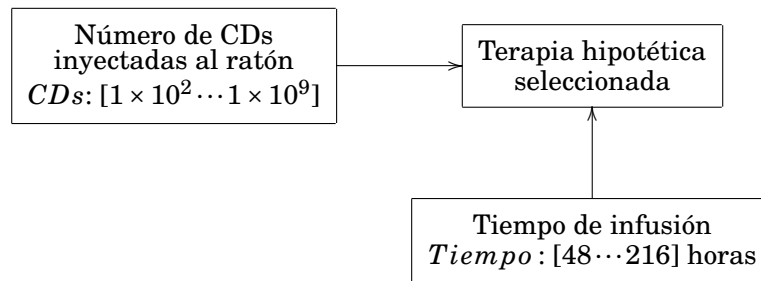


Figura 4.2: Esquema de selección de la terapia hipotética a probar

Por último, para la determinación del éxito o no de una terapia se consideró el promedio de crecimiento de la población de células tumorales, simulando el crecimiento de las células tumorales sin inmunoterapia y con inmunoterapia. Si el promedio de crecimiento de la población es mayor a 70% se considera que la inmunoterapia no tuvo éxito pues no existe una respuesta y las células tumorales siguen creciendo. Si el promedio se encuentra entre el 30% y el 70% se considera que el crecimiento es estable y si el crecimiento de la población es menor al 30% en comparación con la población de células tumorales que no reciben inmunoterapia se considera que la terapia es exitosa. El valor de las constantes del modelo se muestran con mayor detalle en el Anexo.

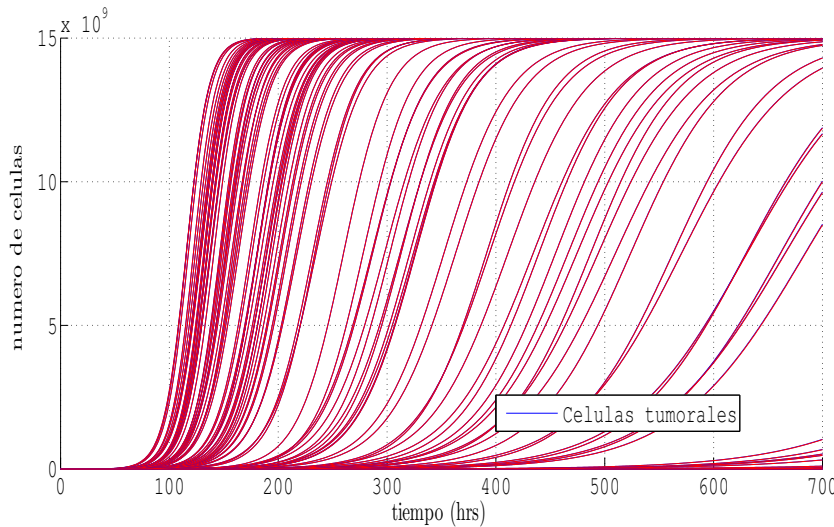


Figura 4.3: Terapia 1×10^3 CDs cada 120 horas, aplicada a 100 condiciones iniciales diferentes. Se observa en *color rojo*, la células tumorales que recibieron inmunoterapia y en *color azul* el crecimiento de las células tumorales sin inmunoterapia

La Tabla 4.2 muestra 8 de los 64 tratamientos hipotéticos propuestos, los cuales consisten en inyectar 1×10^3 CDs al ratón a diferentes tiempos bajo 100 distintas condiciones iniciales. Como se puede observar en la Tabla 4.2, las inmunoterapias aplicadas no generan ninguna respuesta en el crecimiento de las células tumorales. La Figura 4.3, muestra 100 de las 800 pruebas realizadas para esta terapia.

Al probar terapias con 1×10^7 CDs inyectadas en la inmunoterapia no importando el tiempo de infusión y bajo 100 condiciones iniciales diferentes, los resultados muestran que alrededor del 50% de la terapias tiene éxito (ver Tabla 4.3). En la figura 4.4, se puede observar los resultados de aplicar la terapia con 1×10^7 CDs cada 72 horas bajo 100 condiciones iniciales diferentes.

CAPÍTULO 4. MODELACIÓN DE LA INMUNOTERAPIA CON CD PARA RATONES CON MELANOMA ASUMIENDO UNA RESPUESTA INMEDIATA

Cuadro 4.2: Tratamientos hipotéticos 1 para el modelo de EDOs

Tratamiento	Número de CD inyectadas	Período de infusión	% de crecimiento	No hay resp.	Estable	Éxito
1	1×10^3	48	0,99	100	0	0
2	1×10^3	72	0,99	100	0	0
3	1×10^3	96	0,99	100	0	0
4	1×10^3	120	0,99	100	0	0
5	1×10^3	144	0,99	100	0	0
6	1×10^3	168	0,99	100	0	0
7	1×10^3	192	0,99	100	0	0
8	1×10^3	216	0,99	100	0	0

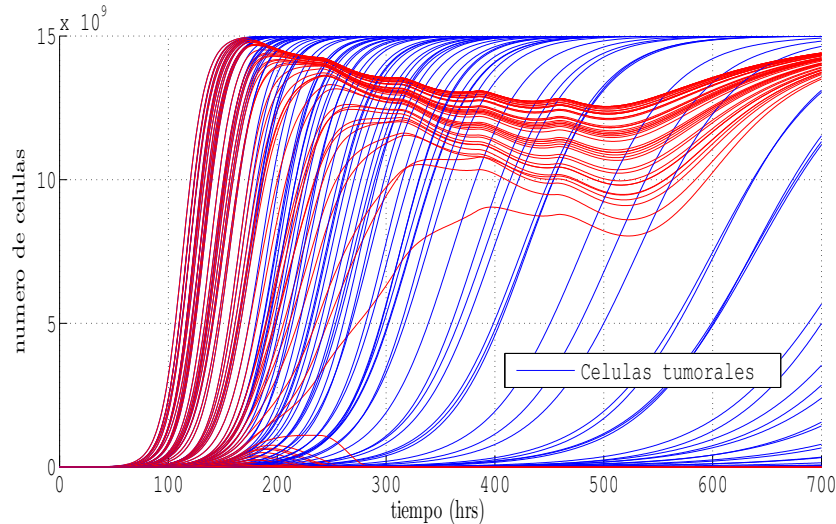


Figura 4.4: Terapia 1×10^7 CDs cada 72 horas, aplicada a 100 condiciones iniciales diferentes. Se observa en *color rojo*, la células tumorales que recibieron inmunoterapia y en *color azul* el crecimiento de las células tumorales sin inmunoterapia

Los resultados de los tratamientos hipotéticos donde se utilizan infusiones mayores a 1×10^8 CDs a diferentes tiempos de infusión, muestran que todas estas terapias tienen éxito, es decir los porcentajes de crecimiento de las células tumorales son menores al 30% como se observa en la Tabla 4.4. En la figura 4.5, se observa a las células tumorales decaer rápidamente al ser inyectadas las células dendríticas.

Cuadro 4.3: Tratamientos hipotéticos 1 para el modelo de EDOs

Tratamiento	Número de CD inyectadas	Período de infusión	% de crecimiento	No hay resp.	Estable	Éxito
1	1×10^7	48	0,33	30	16	54
2	1×10^7	72	0,37	40	3	57
3	1×10^7	96	0,46	20	2	48
4	1×10^7	120	0,45	48	0	52
5	1×10^7	144	0,42	45	0	55
6	1×10^7	168	0,40	41	1	58
7	1×10^7	192	0,53	55	1	44
8	1×10^7	216	0,54	57	0	43

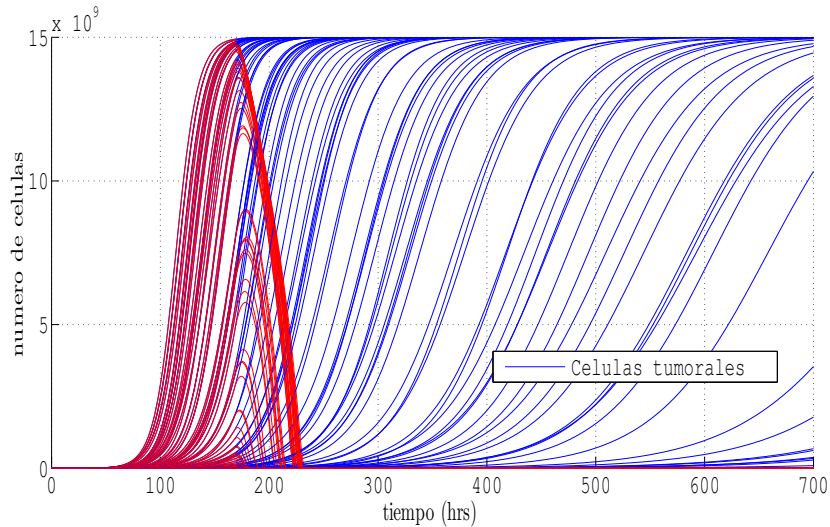


Figura 4.5: Terapia 1×10^8 CDs cada 144 horas, aplicada a 100 condiciones iniciales diferentes. Se observa en *color rojo*, la células tumorales que recibieron inmunoterapia y en *color azul* el crecimiento de las células tumorales sin inmunoterapia

Cuadro 4.4: Tratamientos hipotéticos 1 para el modelo de EDOs

Tratamiento	Número de CD inyectadas	Período de infusión	% de crecimiento	No hay resp.	Estable	Éxito
1	1×10^7	48	0,027	0	0	100
2	1×10^7	72	0,027	0	0	100
3	1×10^7	96	0,028	0	0	100
4	1×10^7	120	0,029	0	0	100
5	1×10^7	144	0,029	0	0	100
6	1×10^7	168	0,029	0	0	100
7	1×10^7	192	0,030	0	0	100
8	1×10^7	216	0,030	0	0	100

MODELACIÓN DE LA INMUNOTERAPIA CON CDs EN RATONES CON MELANOMA

5.1. Experimentación biológica

El grupo de investigación de la UNAM, utilizó 10 ratones de tipo *C57BL/6* [31] de entre 6 y 8 meses de edad para realizar los experimento biológicos. Estos ratones fueron mantenidos dentro del departamento de Biología Celular y Tisular de la UNAM durante toda la experimentación [30].

La inmunoterapia diseñada por los investigadores de la UNAM utiliza CDs tomadas de la médula ósea de ratones tipo *C57BL/6*, las cuales son incubadas de forma *in vitro* con la proteína MG-CSF [32] para diferenciar a las CDs y con el antígeno MAGE-AX [33] para estimular la inmuno respuesta.

Por otro lado, la formación de melanomas fue inducido utilizando 6×10^4 células cancerosas de la línea *B16/F10* [34], las cuales fueron inoculadas subcutáneamente en los 10 ratones de la línea *C57BL/6*. La terapia con CDMOs (Células Dendríticas derivadas de la Médula Ósea) da inicio después de una semana de la inducción del tumor; por cada ratón les es inoculado de forma subcutánea 1×10^6 CDs, una vez a la semana durante 3 semanas. De la misma manera se utilizaron otros 10 ratones de la línea *C57BL/6* a los cuales les fue inducido la formación de melanomas 6×10^4 células de la línea *B16/F10*, sin embargo no recibieron tratamiento con CDs, permitiendo así obtener datos del crecimiento de los tumores sin inmunoterapia (grupo de control). La eficiencia del tratamiento biológico fue medida comparando los diámetros de los tumores, midiendo expresión de las moléculas MHC, la modulación de las citocinas *IL - 2* y *IL - 10*, los niveles de *CD8 T* linfocitos además de medir la tasa de sobrevivencia que presentan

los ratones.

Cuadro 5.1: Protocolo de la inmunoterapia con células dendríticas (CDs)

Protocol	Tiempo de infusión				
	Semana 1 (0 h)	Semana 2 (168 h)	Semana 3 (336 h)	Semana 4 (504 h)	Semana 5 (672 h)
Control de la inmunoterapia	Infusión de 6×10^4 B16/F10 células				Sacrificio de los ratones
Protocol 1 (Tratamiento con CDs)	Infusión de 6×10^4 B16/F10 células	Infusión de 10^6 CDs	Infusión de 10^6 CDs	Infusión de 10^6 CDs	Sacrificio de los ratones

La medición del crecimiento de los tumores con y sin tratamiento de inmunoterapia se llevó a cabo utilizando un *calibrador vernier* y da inicio al séptimo día una vez que las células tumorales fueron inyectadas para después medirse cada dos días a partir del décimo día hasta que los ratones mueran o a la 5ta semana cuando son sacrificados.

Los resultados muestran que al utilizar MAGE-AX como antígeno del tumor, induce una respuesta específica contra el melanoma, incrementa la sobrevivencia del ratón, y presenta una tasa de crecimiento menor a la del grupos de control. Los ratones sin inmunoterapia viven por 28 días, teniendo un diámetro promedio de $4,3cm$ el día 28 mientras que recibiendo la inmunoterapia con CDs viven hasta 40 días con un diámetro promedio de $1,5cm$ el día 40.

Tomando en cuenta la observación de los investigadores de la UNAM de que no todas las CDs llegan a los nodos linfáticos para activar a las células citotóxicas, se consideró entonces que solo el 50% del total de las CDs inyectadas por dosis activan la respuesta inmune.

5.2. Modelo matemático de EDRs

5.2.1. Células tumorales, “T”

Para estudiar el crecimiento de la población de células tumorales, “T” se consideró un crecimiento tipo Gompertz [35], el cual puede observarse en primer término del lado derecho de la ecuación 5.1 donde el parámetro “r” representa la tasa máxima de crecimiento del ratón y el parámetro “K” es la capacidad de acarreamiento (límite máximo del tamaño de la población de

células tumorales que el medio puede sostener). Cabe hacer notar que el número de células en un ratón es significativamente menor que el valor de “ K ” obtenido a partir de los datos experimentales (ver Anexo 1), por lo que para la simulación computacional del crecimiento tumoral se consideró un crecimiento tipo Gompertz para $T < 1,6 \times 10^{10}$ y si $T \geq 1,6 \times 10^{10}$ el raton muere, como muestran los resultados experimentales.

Para la eliminación de las células tumorales por las CTLs “ C_a ”, (segundo término del lado derecho de la ecuación 5.1), suponemos que tanto “ T ” como “ C_a ” son proporcionales. El parámetro “ a_T ” denota la tasa máxima de la eficiencia de las CTLs para eliminar a las células tumorales.

La influencia de la citocina $TGF-\beta$, “ F_β ” también es considerada. Esta produce una reducción en la eficiencia de la inmunoterapia y se supone que es un factor inmunosupresor de la actividad de las CTLs [36]. La forma de inhibición Michaelis-Menten [37], representada por el factor $a_{T,\beta} + \frac{e_{T,\beta}(1-a_{T,\beta})}{e_{T,\beta}+F_\beta}$ es usada para este proposito, donde, el parámetro “ $e_{T,\beta}$ ” es la constante de Michaelis-Menten y el parámetro “ $a_{T,\beta}$ ” es tasa máxima de reducción que produce el $TGF-\beta$ en la eficiencia de las CTLs. Este término es similar al usado por Kronik et al. [21] en su modelo de EDO el cuál describe la interacción del sistema inmune y el crecimiento de Gliomas.

$$\frac{dT}{dt} = rT \ln\left(\frac{K}{T}\right) - a_T \cdot C_a \cdot T \cdot \left(a_{T,B} + \frac{e_{T,B}(1-a_{T,B})}{e_{T,B}+F_\beta}\right). \quad (5.1)$$

5.2.2. Células dendríticas, “ D ”

La ecuación 5.2, describe la dinámica de la población de células dendríticas, “ D ”. El número inicial de células dendríticas, d_0 es considerado que decae a una tasa constante μ_D , entonces para $n < 168$ el número de células dendríticas esta dado por

$$D(t) := 0 \quad \text{Si } t < 168$$

en $t_n = n \cdot 168$ para $n = 1 \dots 3$, 10^6 las células dendríticas son inyectadas dentro del ratón, entonces, el número de células dendríticas de la inmunoterapia está dado por

$$D(t) := \begin{cases} 0, & \text{Si } t < 168 \\ 10^6 e^{-\mu_D(t-168)} \cdot ef, & \text{Si } 168 \leq t < 168 \cdot 2 \\ 10^6 (e^{-\mu_D(t-168)} + e^{-\mu_D(t-168 \cdot 2)}) \cdot ef, & \text{Si } 168 \cdot 2 \leq t < 168 \cdot 3 \\ 10^6 (e^{-\mu_D(t-168)} + e^{-\mu_D(t-168 \cdot 2)} + e^{-\mu_D(t-168 \cdot 3)}) \cdot ef, & \text{Si } t \geq 168 \cdot 3. \end{cases}$$

Donde “ ef ”, representa el porcentaje total de las CDs que inicial la inmuno respuesta. Notar que la evolución de las células dendríticas dentro del intervalo $(168(n-1), 168n)$ para $n = 1 \dots 3$ esta dado por

$$\frac{dD}{dt} = -\mu_D D, \quad t \in (168(n-1), 168n) \text{ para } n = 1 \dots 3 \quad (5.2)$$

5.2.3. Linfocitos T Citotóxicos activados, “ C_a ”

La dinámica de las CTLs activadas, “ C_a ”, es descrita en la ecuación 5.3, donde se considera la activación de las $CD8^+$ naive, la expansión de las CTLs activadas y la muerte natural de las mismas.

El primer término del lado derecho de la ecuación 5.3, representa la activación de las CTLs o células citotóxicas inactivadas. Se considera que el contacto entre las CDs y las CTLs inactivadas producen la activación de estas. Además, se propone que la activación es llevada a cabo antes de la muerte de las células tumorales por el contacto de las CTLs activadas y que se da una tasa de activación “ r_a ”. El encuentro entre las CTLs inactivadas con las CDs ocurre al tiempo $t - \tau$. Por otro lado, la probabilidad de sobrevivencia de las CTLs inactivadas durante el retardo de tiempo se considera que está dado por el término $e^{-\mu_{C_i}\tau}$ en la ecuación 5.3.

El segundo término del lado derecho de la ecuación representa la expansión de las CTLs activadas. El parámetro “ r_e ” representa la tasa de expansión de las CTLs activadas, que se da por el contacto entre las CDs, la cual es descrita como una función de saturación tipo Michaelis-Menten [37]. De la misma forma, como se lleva a cabo la activación de las CTLs, la expansión se da antes de la muerte de las células tumorales por el contacto de las CTLs y se asume que se da al tiempo $t - \tau$. La probabilidad de que las CTLs activadas sobrevivan durante el tiempo del retardo está considerada en el término $e^{-\mu_{C_a}\tau}$ de la ecuación 5.3.

La muerte natural de las CTLs activadas se incluye en el último término de la ecuación 5.3, con una constante de muerte “ μ_{C_a} ”.

$$\begin{aligned} \frac{dC_a}{dt} = & r_a \cdot e^{(-\mu_{C_i}\tau)} \cdot C_i(t-\tau) \cdot \left(\frac{D(t-\tau)}{D(t-\tau)+\theta_D} \right) + \\ & r_e \cdot e^{(-\mu_{C_a}\tau)} \cdot D(t-\tau) \cdot \left(\frac{C_a(t-\tau)}{C_a(t-\tau)+\theta_a} \right) - \mu_{C_a} C_a. \end{aligned} \quad (5.3)$$

5.2.4. Linfocitos T citotóxicos inactivados, “ C_i ”

La ecuación 5.4, expresa la dinámica de la población de las CTLs inactivadas, “ C_i ”. El primer término del lado derecho de la ecuación es igual al primer término de la ecuación 5.3 con un signo negativo y representa el decrecimiento de la población de las CTLs inactivadas al ser activadas. El contacto entre estas poblaciones ocurre en el tiempo $t - \tau$.

Dado que el sistema inmune no presenta una respuesta significativa al ser inducidas las células tumorales, se considera que la respuesta de activación del sistema inmune se da después de ser inyectada la inmunoterapia, por esta razón no se toma en cuenta un término que producirá nuevas células CTLs inactivadas. En las simulaciones computacionales, se considera una cantidad basal de CTLs inactivadas que se introducen en el modelo como una condición inicial (ver Anexo).

El efecto de las células dendríticas en la activación de las CTLs, está representado en la ecuación 5.4 como una función tipo Michaelis-Menten y la dependencia de la eficiencia de las “ C_i ” al ser activadas por la población de las “ D ” es representada por el parámetro “ θ_D ” que es la constante de Michaelis. Se asume tasa constante de muerte “ μ_{C_i} ” para las CTLs inactivadas.

$$\frac{dC_i}{dt} = -r_a \cdot e^{(-\mu_{C_i}\tau)} \cdot C_i(t-\tau) \cdot \left(\frac{D(t-\tau)}{D(t-\tau) + \theta_D} \right) - \mu_{C_i} C_i. \quad (5.4)$$

5.2.5. Factor de crecimiento transformante beta, “ F_β ”

Uno de los mecanismos de defensa de las células tumorales al sistema inmune es la secreción de la citocina TGF- β , la cuál puede entre otras cosas inhibir la actividad de las CTLs [38]. La dinámica que sigue la citocina TGF- β , está representada por la ecuación 5.5, donde el parámetro “ $a_{T,\beta}$ ”, representa la tasa de producción por célula tumoral de la citocina TGF- β ; la cual es proporcional al número de células tumorales, “ T ” y el último término de la ecuación representa la tasa de degradación natural con coeficiente “ μ_β ” de la citocina TGF- β .

$$\frac{dF_\beta}{dt} = a_{T,\beta} T - \mu_\beta F_\beta. \quad (5.5)$$

5.3. Simulación computacional

El modelo es implementó utilizando el método de Runge Kutta de cuarto orden para ecuaciones diferenciales con retardos (EDRs) con un paso de integración de 1 hora [39, 40]. Algunos parámetros han sido obtenidos de la literatura y otros fueron calculados usando el modelo de EDRs propuesto junto con los resultados de los experimentos *in vivo* de la inmunoterapia desarrollada por los investigadores de la UNAM. En el Anexo se presentan las referencias utilizadas para obtener los parámetros del modelo (ver Anexo).

Los datos experimentales fueron utilizados para calcular el valor de la tasa máxima de crecimiento del tumor “ r ” y la población máxima que el medio ambiente puede sostener “ K ”, usando el método de ajuste de mínimos cuadrados a la función de crecimiento Gompertz [35], con población inicial de células tumorales igual a $6 * 10^4$ de acuerdo al protocolo de inmunoterapia aplicado por los investigadores de la UNAM (Tabla 5.1).

La eficiencia máxima de las CTLs para eliminar a las células tumorales, “ a_T ”, la tasa de activación de las CTLs inactivadas “ r_a ”, la tasa de expansión o replicación de las CTLs activadas y el retardo en el tiempo “ τ ”, fueron calculadas utilizando una búsqueda exhaustiva utilizando el modelo de EDRs para minimizar la diferencia entre los resultados numéricos y los datos experimentales, en el Anexo se dan mas detalles de este procedimiento (ver Anexo).

5.4. Ajuste por mínimos cuadrados

El modelo matemático presentado se enfoca en uno de los experimentos biológicos realizados por Gabriela et. al [30]. El cual realiza un pretratamiento a las CDs con el antígeno MAGE-AX antes de ser inyectado dentro del ratón. La tasa máxima de crecimiento “ r ” y la capacidad máxima de acarreamiento “ K ” fueron calculadas usando un ajuste de mínimos cuadrados a la función de crecimiento Gompertz, con el objetivo de determinar el comportamiento del crecimiento del melanoma dentro de los ratones siguiendo las condiciones propias del experimento biológico sin inmunoterapia 5.1.

En la Figura 6.13, se muestra los resultados del ajuste por mínimos cuadrados. El objetivo fue aproximar los datos biológicos (número de células tumorales resultantes del crecimiento del melanoma sin inmunoterapia, medidas por los investigadores de la UNAM) a una curva que los represente adecuadamente y proporcione predicciones lo más fiable posible. En esta investigación se realizaron pruebas con las ecuaciones de crecimiento tipo Logística y de Gompertz [41, 42].

$$x(t) = \frac{KAe^{rt}}{1 + Ae^{rt}} \quad (5.6)$$

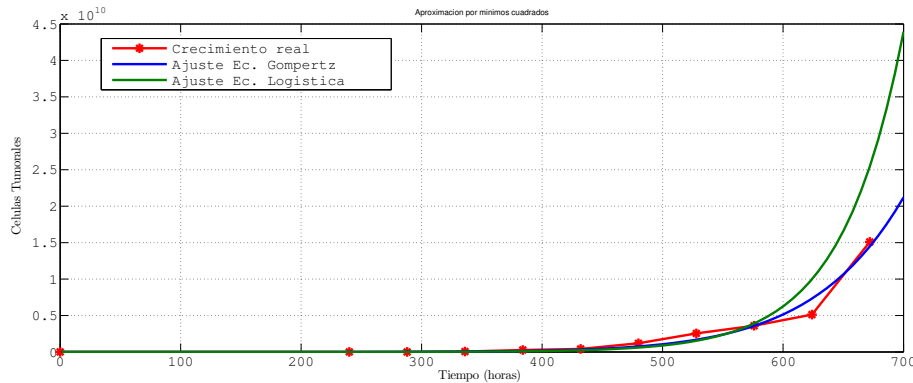


Figura 5.1: Ajuste por mínimos cuadrados a los datos reales (*línea roja*) utilizando la ecuación logística (*línea verde*) y a la ecuación de Gompertz (*línea roja*).

donde A es la población inicial, r es la tasa de crecimiento y K capacidad de acarreamiento.

Para realizar el ajuste se transformó la curva logística (Ecuación 6.1) y la curva de Gompertz (Ecuación 5.7) en una recta mediante un cambio de variables adecuado, y entonces el problema se reduce a un ajuste de tipo lineal. El ajuste utilizando una ecuación logística muestra un error normalizado cuadrático medio (NRMSE por sus siglas en inglés) del 22,95 % mientras que para la ecuación de Gompertz se obtuvo un NRMSE del 4,95 % (ver Figura 6.13).

$$x(t) = Ke^{-Ae^{-rt}} \quad (5.7)$$

donde A es la población inicial, r es la tasa de crecimiento y K capacidad de acarreamiento.

5.5. Parámetros del modelo

Tasa máxima de crecimiento del tumor; "r". Para esta estimación se tomó en cuenta el promedio de diámetros de los tumores, medidos por los investigadores de la UNAM. Las mediciones se realizaron, el séptimo día después de la inducción de las células tumorales y repetidas cada dos días después del décimo día por un período de 700 horas en los ratones de control para la inmunoterapia. Se asumió una forma esférica para calcular el número de células en los tumores obteniéndose finalmente el promedio de células tumorales medidas. Se consideró que el tamaño de una célula tumoral es aproximadamente de $17,4 \pm 0,21 \mu\text{m}$ [43]).

Usando el método de mínimos cuadrados para ajustar los datos biológicos a la una curva de crecimiento de tipo Gompertz se calculó la tasa de crecimiento. Los resultados muestran un

valor para el parámetro “ r ” igual a 0,0010602 con un NRMSE 4,95% (ver Figura 6.13), línea azul).

Capacidad de acarreamiento del Tumor, “ K ”. Representa el tamaño máximo de población de células que el medio ambiente puede sostente y fue calculado usando el mismo ajuste de mínimos cuadrados a la función de Gompertz para calcularlo realizado anteriormente. La búsqueda del valor para el parámetro “ K ” se realizó en un rango entre 10^{15} y 10^{20} , determinando un valor para el parámetro “ K ” igual a $6,75 * 10^{15}$ células tumorales.

Por otro lado, observando los resultados biológicos, demuestran que los ratones mueren cuando el tumor alcanza un diámetro de 4,3 cm (aproximadamente $1,6 * 10^{10}$ células tumorales). Por esta razón se consideró a esta cantidad de células tumorales como un límite de la población de las células tumorales. En las simulaciones computacionales cuando se alcanza esta cantidad de células tumorales se toma como constante a partir de ese momento.

Tasa natural de muerte de las CDs, “ μ_D ”. De Pillis et al. [23] usa los estudios realizados por Ludewig et al. [44] para determinar el valor “ μ_D ” en $0,009625h^{-1}$.

Tasa de muerte para la células CTLs activadas en el sitio del tumor, “ μ_{C_a} ”. El valor de parámetro “ μ_{C_a} ” fué calculado por De Pillis et al. en $0,01925h^{-1}$.

Límite de la densidad de CDs por la tasa máxima de proliferación de las CTLs “ θ_D ”. Fue puesta en en 212 células dendríticas y determinadas por De Pillis et al. [23].

Límite de la densidad de “ C_a ” por la tasa máxima de proliferación de las CTLs, “ θ_A ”. Se encontró en un intervalo de búsqueda entre [1, 300] células logrando el mejor ajuste en 10.

El modelo propuesto y los datos experimentales de la inmunoterapia en ratones con melanoma fueron utilizados para encontrar los valores de los parámetros “ a_T ”, “ τ ”, “ r_E ” y “ r_A ”, realizándose una búsqueda exhaustiva y utilizando el error mínimo cuadrático medio para determinar el valor óptimo de estos parámetros. El error mínimo cuadrático medio es el resultado de comparar la población de células tumorales de los experimentos biológicos y la población de células tumorales generadas por el modelo. El valor de los parámetros determinados fueron:

Máxima eficiencia de las células citotóxicas, “ a_T ”. Representa la eficiencia a la cual las células citotóxicas pueden eliminar a las células tumorales. Esta estimación es llevada a cabo utilizando una búsqueda exhaustiva en un intervalo de búsqueda entre 10^{-13} y 10^3 , el valor obtenido fue de $6 * 10^{-11}h^{-1}$.

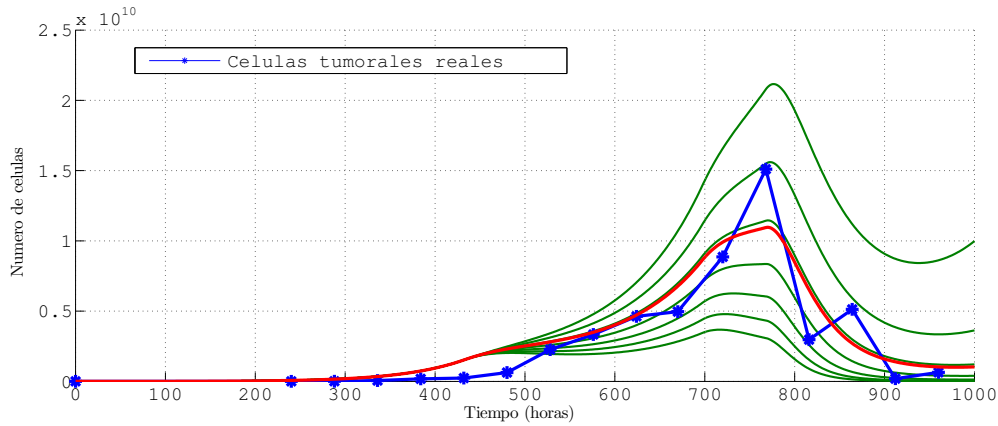


Figura 5.2: Búsqueda exhaustiva del parámetro a_T . Se muestran los datos reales de las células tumorales (línea azul), células tumorales a las que se les aplicó la inmunoterapia utilizando diferentes valores de a_T (líneas verdes), resultado de la mejor aproximación a los datos reales (línea roja).

Tasa de activación de las CTLs, " r_a ". Se utilizó un intervalo de búsqueda entre 0,00001 y 100 para encontrar su valor, obteniéndose un valor igual a $61h^{-1}$. Los datos usados en el modelo propuesto por Ludewig et al. [44] y Handel et al. [45] fueron considerados para determinar los intervalos de búsqueda. En la figura 5.3 se observan algunas de las iteraciones que se realizaron para obtener el valor el parámetro " r_a " utilizando el modelo de EDRs.

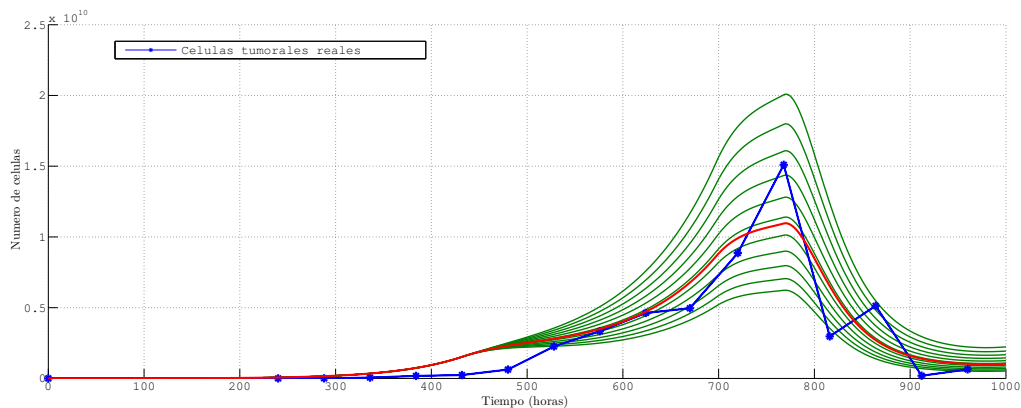


Figura 5.3: Búsqueda exhaustiva del parámetro " r_a ". Se muestran los datos reales de las células tumorales (línea azul), células tumorales a las que se les aplicó la inmunoterapia utilizando diferentes valores de " r_a " (líneas verdes) y el resultado de la mejor aproximación a los datos reales (línea roja).

Tasa de expansión de las CTLs activadas, “ r_e ”. El valor de parámetro “ r_e ” fue calculado en $6500h^{-1}$ que es el resultado de la estimación usando una búsqueda exhaustiva en un intervalo de búsqueda entre $10h^{-1}$ y $7000h^{-1}$. Se observa en la figura 5.4, los resultados de algunas de las búsquedas realizadas para encontrar el valor del parámetro “ r_e ”.

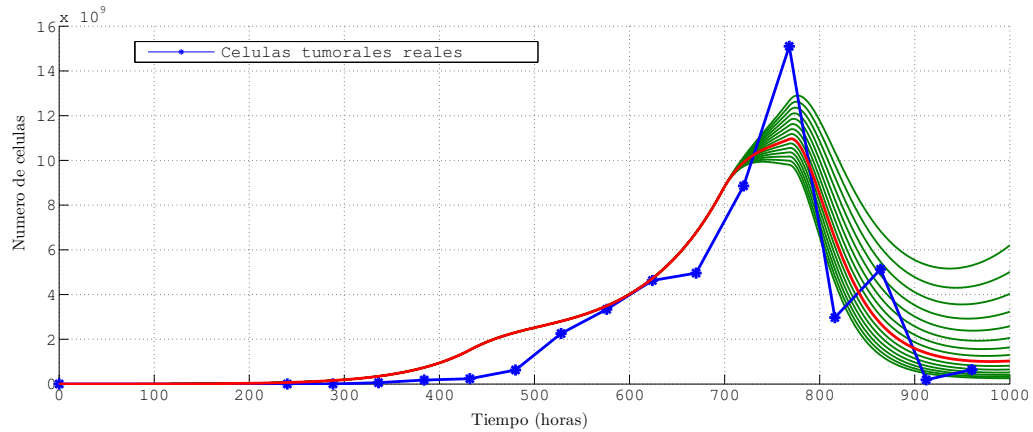


Figura 5.4: Búsqueda exhaustiva del parámetro “ r_e ”. Se muestran los datos reales de las células tumorales (línea azul), células tumorales a las que se les aplicó la inmunoterapia utilizando diferentes valores de “ r_e ” (líneas verdes) y el resultado de la mejor aproximación a los datos reales (línea roja).

Retardo en el tiempo, “ τ ”. Indica el tiempo cuando la terapia tiene el mayor efecto en el crecimiento de las células tumorales. Considerando las observaciones de los investigadores de la UNAM que el tiempo de este efecto se da entre 100 y las 300 horas después de haber inyectado la primera infusión de CDS, el valor de “ τ ” fue determinado en 265 hours utilizando una búsqueda exhaustiva. En la figura 5.5, se muestran algunas simulaciones que se realizaron para obtener el valor de τ con error de aproximación mínimo.

Los parámetros listados a continuación fueron tomados de los estudios realizados por Kronik et al. [21, 22]

Máximo efecto de reducción de la citocina “ $TGF - \beta$ ” en la eficiencia de las CTLs, “ $a_{T,\beta}$ ”. Usando los reportes acerca de la eficiencia de las CTLs el valor determinado por Kronik et al. es de $0,69h^{-1}$.

Dependencia de las CTLs en la eficiencia de la citocina $TGF - \beta$, “ $e_{T,\beta}$ ”. Estimado en $10^4 pg$ por Kronik et al. [21] y los datos de Peterson et al.[46].

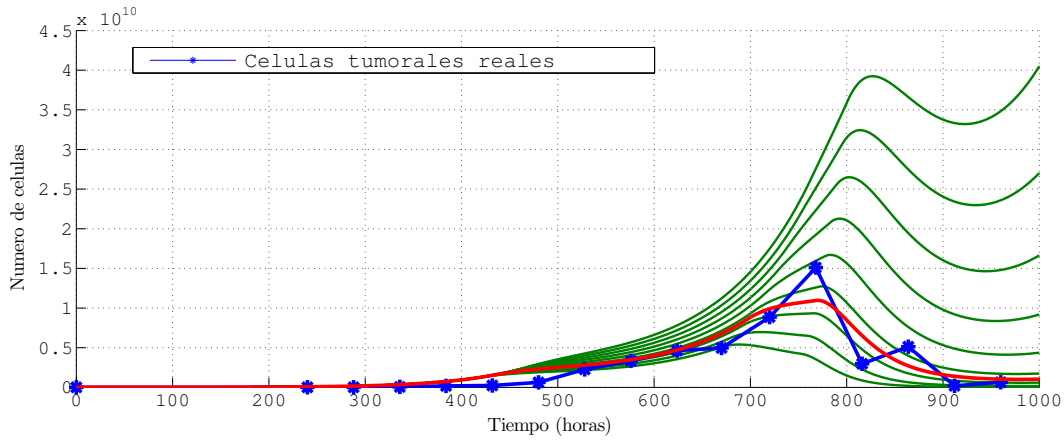


Figura 5.5: Búsqueda exhaustiva del parámetro “ τ ”. Se muestran los datos reales de las células tumorales (línea azul), células tumorales a las que se les aplicó la inmunoterapia utilizando diferentes retardos de tiempo (líneas verdes), resultado de la mejor aproximación a los datos reales (línea roja).

Tasa de muerte de las CTLs inactivadas, “ μ_{C_i} ”. El modelo usa la vida media de las CTLs estimada por Kronik et al.[21] en $0,007h^{-1}$.

Tasa de producción de la citocina $TGF-\beta$ por una célula tumoral, “ $r_{T,\beta}$ ”. Calculada en $5,75 * 10^{-6} pg(cell * h)^{-1}$ Kronik et al.[21] y basada los datos de Peterson et al. [46].

Tasa de degradación de la citocina $TGF-\beta$, “ $\mu_{F\beta}$ ”. Fue encontrada en un intervalo de búsqueda entre $1h^{-1}$ y $10h^{-1}$, calculada en $2,7h^{-1}$.

RESULTADOS

6.1. Simulación y validación del crecimiento de las células tumorales

Utilizando los protocolos de control y de infusión de las CDs para la inmunoterapia contra el melanoma en ratones (ver Tabla 5.1) y el modelo de EDRs, se procedió a su simulación. La validación del modelo se llevó a cabo comparando los resultados biológicos con los resultados de las simulaciones.

6.1.1. Simulación del protocolo de control para la inmunoterapia con CDs

La simulación del crecimiento de las células tumorales sin inmunoterapia con el modelo de EDRs, se llevó a cabo utilizando una población inicial de $6 * 10^4$ células tumorales (cantidad de células tumorales usada en las pruebas biológicas para inducir melanoma en los ratones (Tabla 5.1) y los parámetros mostrados en el Anexo, con el parámetro de máxima eficiencia de las CTLs puesto en 0 (Ejemplo “ $a_T = 0$ ”).

Para observar la diferencia entre el crecimiento real de los tumores y el simulado por el modelo de EDRs, se calculó la raíz normalizada del error cuadrático medio (NRSME por sus siglas en inglés) entre los resultados de simulaciones computacionales y los datos reales obtenidos de los experimentos biológicos. Se tomaron en cuenta solo los datos obtenidos en los tiempos de medición realizados por los investigadores de la UNAM, iniciados al séptimo día después de que fueran inducidas las células de melanoma en los ratones y continuados a partir del décimo día con intervalos de dos días durante 5 semanas.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS

La población de células tumorales reales en el tumor fue calculada tomando el promedio de los diámetros medidos por los investigadores de la UNAM en los ratones asumiendo una forma esferica (tamaño del tumor igual a $17,4 \pm 0,21\mu$ [43]).

En la figura 1, se muestra los datos reales del crecimiento de las células tumorales y los datos obtenidos del modelo matemático utilizando el protocolo de control. Se puede observar que el crecimiento del tumor es interrumpido pues no existe influencia de las CTLs que disminuya su crecimiento. En la hora 672, la simulación es parada porque en los experimentos biológicos es cuando los ratones son sacrificados .

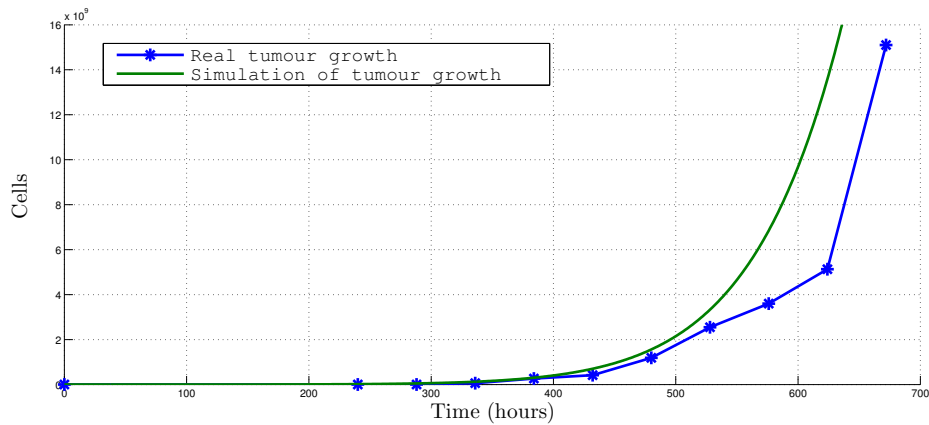


Figura 6.1: Simulación del crecimiento de las células tumorales (control de la inmunoterapia). Duración de la simulación 700 h, $T(0) = 6 \times 10^4$, $r = 0,00106h^{-1}$ y $K = 6,754^{15} cells$ (Table 5.1)

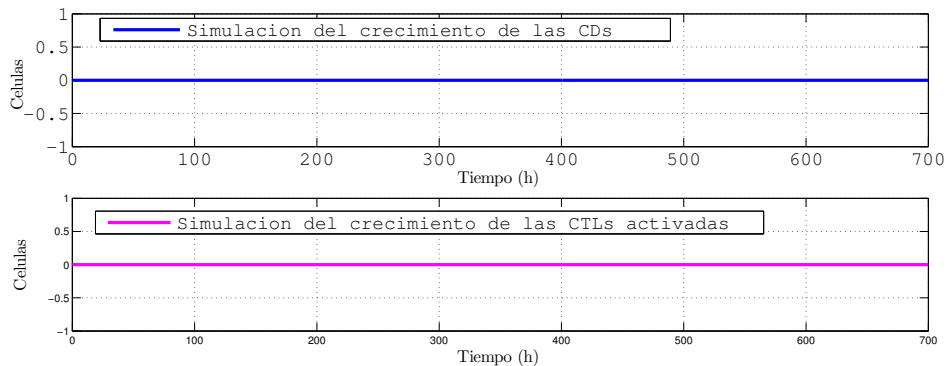


Figura 6.2: Simulación del crecimiento de las CDs y las CTLs activadas (control de la inmunoterapia). Duración de la simulación 700 h, $T(0) = 6 \times 10^4$, $r = 0,00106h^{-1}$ y $K = 6,754^{15} cells$ (Table 5.1)

6.1. SIMULACIÓN Y VALIDACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS TUMORALES

En la terapia de control no hay infusión de CDs en el ratón, al realizar la simulación numérica, los resultados muestran que no hay presencia de esta población de células (Figura 6.2, *línea azul*). El crecimiento y replicación de la población de CTLs (Figura 6.2, *línea rosa*) se asumió que se da por el contacto con las CDs, dando como resultado que la ausencia de CDs, produce que las CTLs inactivadas no se activen y por lo tanto no exista población de CTLs que puede influir en el crecimiento de las células tumorales.

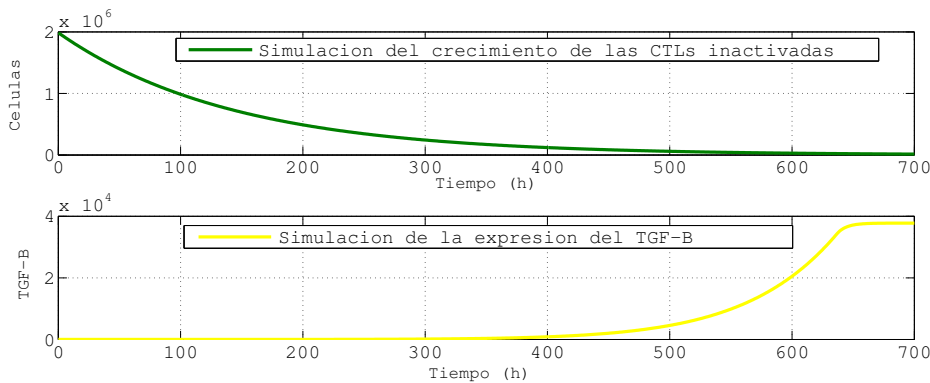


Figura 6.3: Simulación del crecimiento de las CTLs inactivadas y la expresión del $TGF - \beta$ (control de la inmunoterapia). Duración de la simulación 700 h, $T(0) = 6 \times 10^4$, $r = 0,00106h^{-1}$ y $K = 6,754^{15} cells$ (Table 5.1)

Dentro de las condiciones iniciales del modelo, se consideró que existe un población inicial de CTLs propias del ratón que no son activadas pues es necesario el contacto con las CDs. Suponemos que estas células van muriendo a una tasa constante (ver Sección Parámetros), como puede ser observado en la Figura 6.3, *línea verde*. También se puede observar en la figura, la expresión de la citocina $TGF - \beta$ por las células tumorales, como no existe una disminución en la población de células tumorales, la expresión tampoco va disminuyendo.

6.1.2. Simulación del protocolo de la inmunoterapia con CDs

Utilizando el protocolo de inmunoterapia con CDs que los investigadores de la UNAM aplican, el cual administra tres dosis de 10^6 CDs activadas con MAGE-AX, inyectadas cada 168 horas durante tres semanas (ver Tabla 5.1, Protocol 1) y con los parámetros mostrados en el Anexo (ver Anexo), la simulación de la inmunoterapia fue realizada. De igual forma, el NRSME fue calculado para medir la diferencia entre la población de células tumorales reales obtenidas de los experimentos biológicos y la población de células tumorales obtenida de las simulaciones computacionales aplicando el protocolo 1, los resultados muestran un NRMSE del 10,5% (ver Figura 6.4).

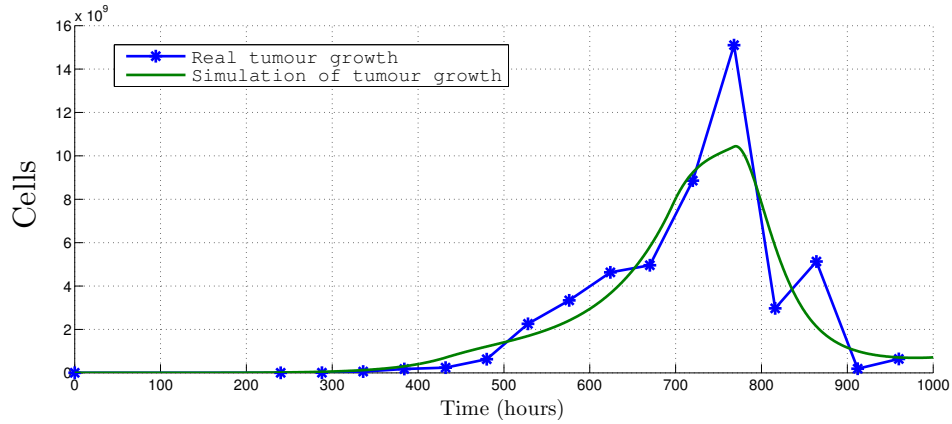


Figura 6.4: Simulation de la inmunoterapia (Protocolo 1). Duración de la simulación 1000 h con $T(0) = 6 \times 10^4$, $r = 0,00106h^{-1}$ y $K = 6,754^{15} cells$ (Tabla 5.1)

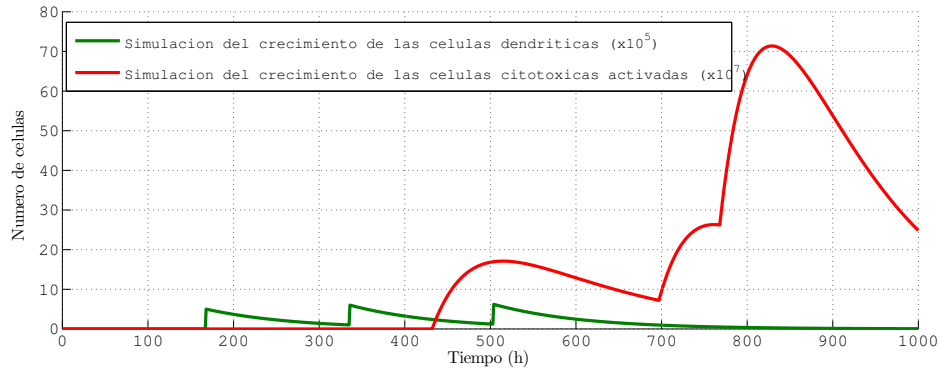


Figura 6.5: Simulation de la inmunoterapia (Protocolo 1), crecimiento las CTLs activadas y la infusión de las CDs. Duración de la simulación 1000 h con $T(0) = 6 \times 10^4$, $r = 0,00106h^{-1}$ y $K = 6,754^{15} cells$ (Tabla 5.1)

La figura 6.5, muestra la infusión de las células dendríticas *línea verde*, se puede observar como existen tres picos en las horas 168, 336 y 504 que es cuando se simula la infusión de las CDs en el modelo. Se observa también la dinámica de las células citotóxicas activadas *línea roja*, la activación de estas células da como resultado la muerte de las células tumorales, la cuál se consideró que no es de forma inmediata por lo que la terapia para ser efectiva tiene un tiempo de retardo de 256 horas, en la gráfica este retardo se observa al verse elevada la cantidad de CTLs en tiempo igual a 424 horas.

En la gráfica 6.6, se observa la dinámica de las CTLs inactivadas, como puede observarse las CTLs decaen, pues la ecuación representa como estas CTLs se van activando por lo que su población va disminuyendo. Cabe hacer notar que durante la modelación de la inmunoterapia con CDs, se consideró que las CDs propias del ratón no juegan un rol importante dentro en el sistema

6.2. PROTOCOLOS DE INMUNOTERAPIA PROPUESTOS

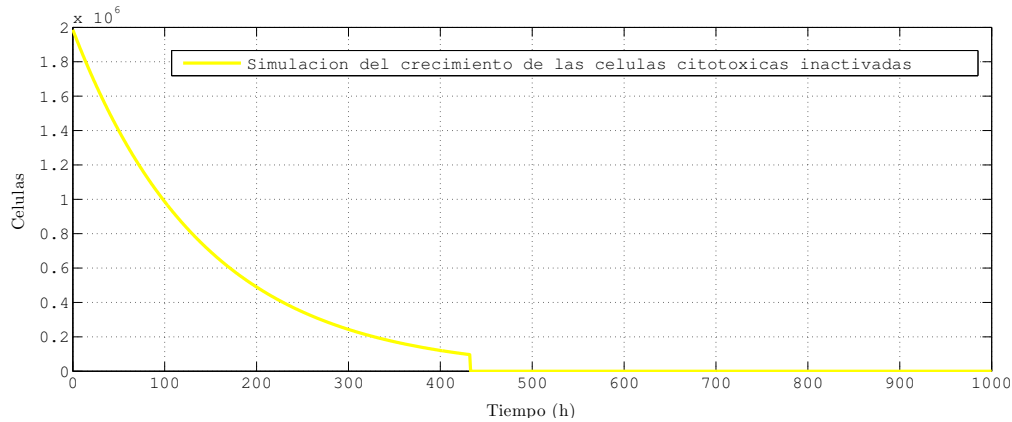


Figura 6.6: Simulación de la inmunoterapia (Protocolo 1), dinámica de las CTLs inactivadas. Duración de la simulación 1000 h con $T(0) = 6 \times 10^4$, $r = 0,00106h^{-1}$ y $K = 6,754^{15} cells$ (Tabla 5.1)

inmune de los ratones ya que estas células no son capaces de inducir una respuesta inmune pues su población es pequeña o se encuentra inmunosuprimida.

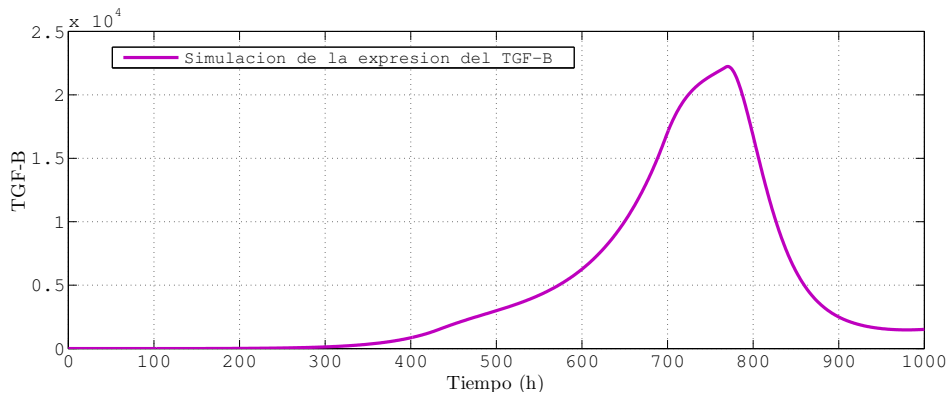


Figura 6.7: Simulación de la inmunoterapia (Protocolo 1), dinámica de la citocina $TGF-\beta$. Duración de la simulación 1000 h con $T(0) = 6 \times 10^4$, $r = 0,00106h^{-1}$ y $K = 6,754^{15} cells$ (Tabla 5.1)

La dinámica de la citocina $TGF-\beta$, se encuentra unida a la cantidad de células tumorales que hay durante la simulación como puede observarse en la gráfica 6.7, la expresión de esta citocina reduce la eficiencia de la inmunoterapia y se consideró que su expresión está dada por las células tumorales.

6.2. Protocolos de inmunoterapia propuestos

Considerando que el protocolo usado por los investigadores de la UNAM puede ser mejorado, se sugieren diferentes protocolos de inmunoterapia para erradicar el tumor y extender la vida de

los ratones, los cuales fueron probados utilizando el modelo de EDRs.

6.2.1. Modificación de la cantidad de CDs inyectadas

Para probar diferentes cantidades de CDs inyectadas, se usó el mismo protocolo de inyección de CDs que en los experimentos biológicos (tres dosis cada 168 horas y 1000 horas), pero se cambió la cantidad de CDs inyectadas por dosis. Los resultados de la simulación son mostrados en la Tabla 6.1.

La eficiencia de los protocolos hipotéticos propuestos se obtuvo, calculando el promedio de reducción de las células tumorales (en términos de porcentaje) comparando la población de células tumorales simuladas sin recibir ningún tratamiento y la población de células tumorales obtenidas al recibir el tratamiento hipotético utilizando el modelo EDRs. Los datos utilizados para la comparación fueron tomados a las 168 horas después de iniciada la simulación y continuando a partir 240 horas con intervalos de 48 horas durante 1000 horas (siguiendo el mismo patrón de medición utilizado por los investigadores de la UNAM). Las Figuras 6.8 and 6.9, muestran algunos resultados de las simulaciones utilizando los protocolos hipotéticos propuestos, donde la cantidad de CDs inyectadas fue cambiada.

Cuadro 6.1: Protocolos hipotéticos para la inmunoterapia con CDs

Protocolo	Dosis de CDs	Intervalo de Inyec. (horas)	Número de dosis	% CDs	% de Decre.	Erad.
2	10^2	168	3	50	12,61	<i>no</i>
3	10^3	168	3	50	19,92	<i>no</i>
4	10^4	168	3	50	20,79	<i>no</i>
5	10^5	168	3	50	20,95	<i>no</i>
6	10^6	168	3	50	68,65	<i>no</i>
7	10^7	168	3	50	88,69	<i>si</i>
8	10^8	168	3	50	91,68	<i>si</i>
9	10^9	168	3	50	91,68	<i>si</i>

Intervalo de Inyec. Intervalo de inyección, *Erad* Erradicación, *% de CDs* Porcentaje de CDs que arriban a los nodos linfáticos y que inician la inmuno respuesta.

La Figura 6.8, muestra el resultado de inyectar $1 * 10^3$ CDs cada 7 días durante 3 semanas (línea punteada), se puede observar que el crecimiento del tumor no sufre ningún cambio y continúa creciendo, demostrando que esta cantidad es insuficiente para eliminar o detener el crecimiento del tumor (línea gruesa) en la simulación.

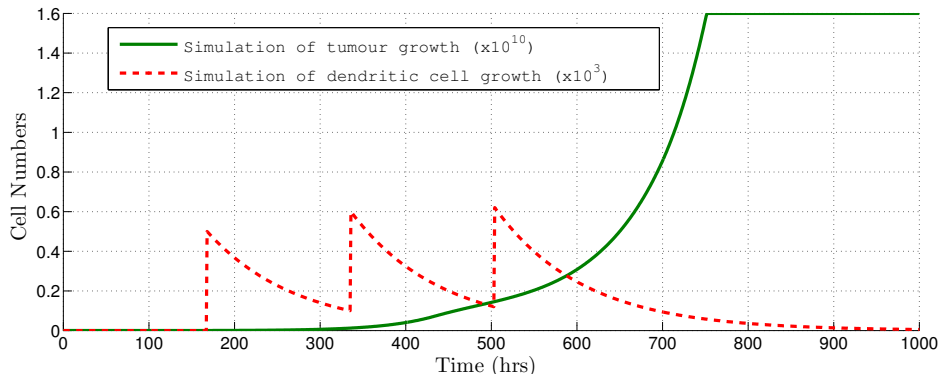


Figura 6.8: Simulación de protocolos hipotéticos con diferentes cantidades de CDs por dosis. El intervalo de inyección es cada 168 horas durante tres semanas, aplicando 10^3 CDs por dosis (Tabla 6.1, Protocolo 3), se obtuvo un porcentaje de decrecimiento del 19,92%. La población de células tumorales (*línea gruesa*) y la cantidad de CDs inyectadas (*línea punteada*) son mostradas

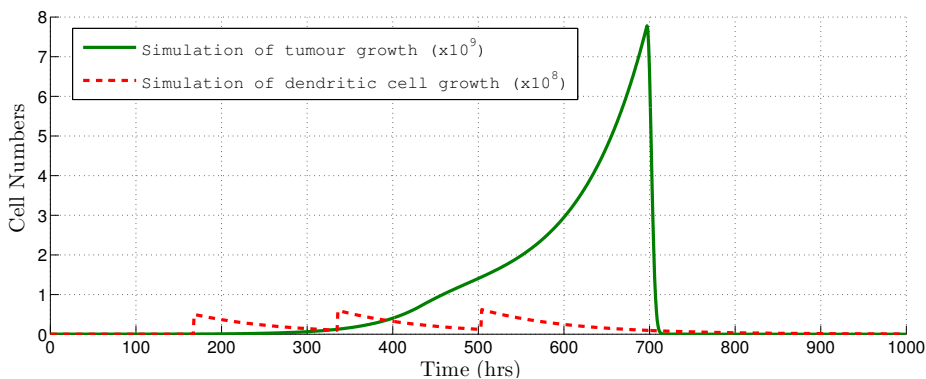


Figura 6.9: Simulación de protocolos hipotéticos con diferentes cantidades de CDs por dosis. El intervalo de inyección es cada 168 horas durante tres semanas, aplicando 10^8 CDs por dosis (Tabla 6.1, Protocolo 3), se obtuvo un porcentaje de decrecimiento del 88,69%. La población de células tumorales (*línea gruesa*) y la cantidad de CDs inyectadas (*línea punteada*) son mostradas

Por otro lado, la Figura 6.9 muestra los resultados de inyectar $1 * 10^8$ CDs cada 7 días durante 3 semanas; la simulación muestra como la población de células tumorales decae dramáticamente después de transcurrir 700 horas. Por lo que puede decirse que esta terapia podría tener mejores resultados que la terapia actual.

6.2.2. Modificación de intervalo de inmunoterapia

Se propuso modificar el intervalo de inyección de las CDs, conservando el mismo número de CDs usadas en la experimentos biológicos de la inmunoterapia (10^6 CDs por dosis, Tabla 6.1 Protocolo 1), con el objetivo de observar la influencia del número de infusiones en el tratamiento. Como en los anteriores protocolos hipotéticos, la eficiencia de los tratamientos propuestos fue medida usando el promedio de reducción de las células tumorales. Los resultados se muestran en la Tabla 6.2.

Cuadro 6.2: Protocolos hipotéticos modificando el intervalo de inyección de las CDs

Protocolo	Dosis de CDs	Intervalo de Inyec. (horas)	Número de dosis	% CDs	% de Decre.	Erad.
10	10^6	48	8	50	85,97	<i>yes</i>
11	10^6	72	5	50	83,70	<i>yes</i>
12	10^6	96	4	50	81,40	<i>yes</i>
13	10^6	120	3	50	76,05	<i>no</i>
14	10^6	144	3	50	76,72	<i>no</i>
15	10^6	192	2	50	37,12	<i>no</i>
16	10^6	216	2	50	33,11	<i>no</i>

Intervalo de Inyec. Intervalo de inyección, *Erad* Erradicación, *% de CDs* Porcentaje de CDs que arriban a los nodos linfáticos y que inician la inmuno respuesta.

De los resultados en la Tabla 6.2, se puede observar que el tumor es erradicado en las simulaciones para los intervalos de inyección menores a 120 horas en un rango de simulación de 1000 horas. Mientras que para los intervalos mayores e iguales a 120 hora, el resultado de las simulaciones muestran que células tumorales siguen creciendo y que por lo tanto no es erradicado el tumor.

En la Figura 6.10, se observan los resultados de la simulación aplicando el protocolo hipotético 10 de la Tabla 6.2. Este protocolo aplica 8 inyecciones de 10^6 CDs, los resultados muestran que las células tumorales son eliminadas en su totalidad a las 300 horas después de haber ocurrido la última infusión de CDs.

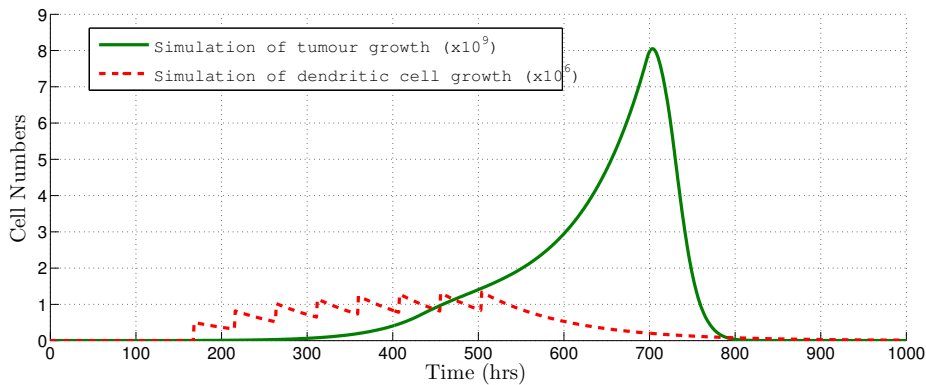


Figura 6.10: Simulación de la inmunoterapia cambiando el número de inyecciones de CDs. Intervalo de inyección cada 48 horas aplicando 10^6 CDs por dosis durante tres semanas (Table 6.2, Protocol 10) con un 85,97% de decrecimiento obtenido. En la gráfica se muestra la población tumoral (*línea gruesa*) y cantidad de CDs inyectadas (*línea puntada*)

La figura 6.11, muestra los resultados de aplicar solo dos dosis de 10^6 CDs cada 192 horas (Tabla 6.2, Protocol 15). Los resultados muestran que estas dos dosis no son suficientes para permitir que el crecimiento de células tumorales se detengan y se elimine el tumor canceroso.

6.2.3. Modificación de las dosis de CDs y el intervalo de aplicación de la inmunoterapia

Con el objetivo de encontrar un protocolo de inmunoterapia más eficiente que el utilizado actualmente por los investigadores de la UNAM, fueron probadas dosis de $10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8$ y 10^9 CDs con intervalos de inyección de 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 horas. Siguiendo la metodología de prueba mostrada en la Figura 6.12.

Los resultados muestran (ver Anexo) que usando dosis iguales o mayores a 10^6 CDs con intervalos menores que 120 horas en un tiempo de simulación de 1000 horas, las células tumorales

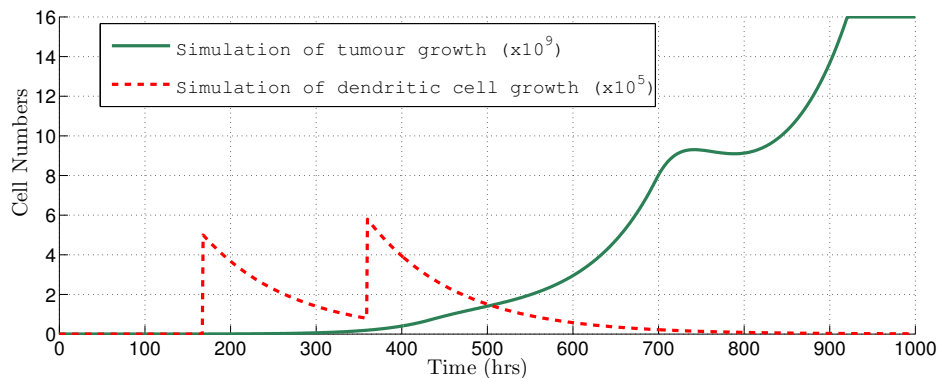


Figura 6.11: Simulación de la inmunoterapia cambiando el número de dosis de CDs suministradas. Intervalo de inyección cada 192 horas aplicando 10^6 CDs por dosis durante tres semanas (Tabla 6.1, Protocolo 15), un 37,12% de decrecimiento fue obtenido. Se muestran la población tumoral (*línea gruesa*) y la cantidad de CDs inyectadas (*línea punteada*).

son eliminadas, lo que indica que todas estas terapias hipotéticas son exitosas. Por el contrario, si los intervalos de inyección son mayores a 120 horas con 10^6 CDs por dosis, las células tumorales continúan creciendo después de las 1000 horas. Los resultados también muestran que para cualquier dosis menor a 10^6 CDs no importando el intervalo de infusión, ninguna terapia resulta exitosa, pues la población de células tumorales continúa creciendo.

6.2.4. Porcentaje de CDs que inducen la respuesta inmune

Las observaciones de los experimentos biológicos realizados por investigadores de la UNAM, concluyen que no todas las CDs inyectadas llegan a los nodos linfáticos del ratón para inducir la respuesta inmune. Tomando en consideración esta observación, se propuso realizar protocolos de inmunoterapia hipotéticos con el objetivo de observar cómo influye el porcentaje de CDs inyectadas en la inmunoterapia utilizando el modelo de EDRs. Se utiliza el Protocolo 1 (ver Tabla 5.1) para la infusión de las CDs.

6.2. PROTOCOLOS DE INMUNOTERAPIA PROPUESTOS

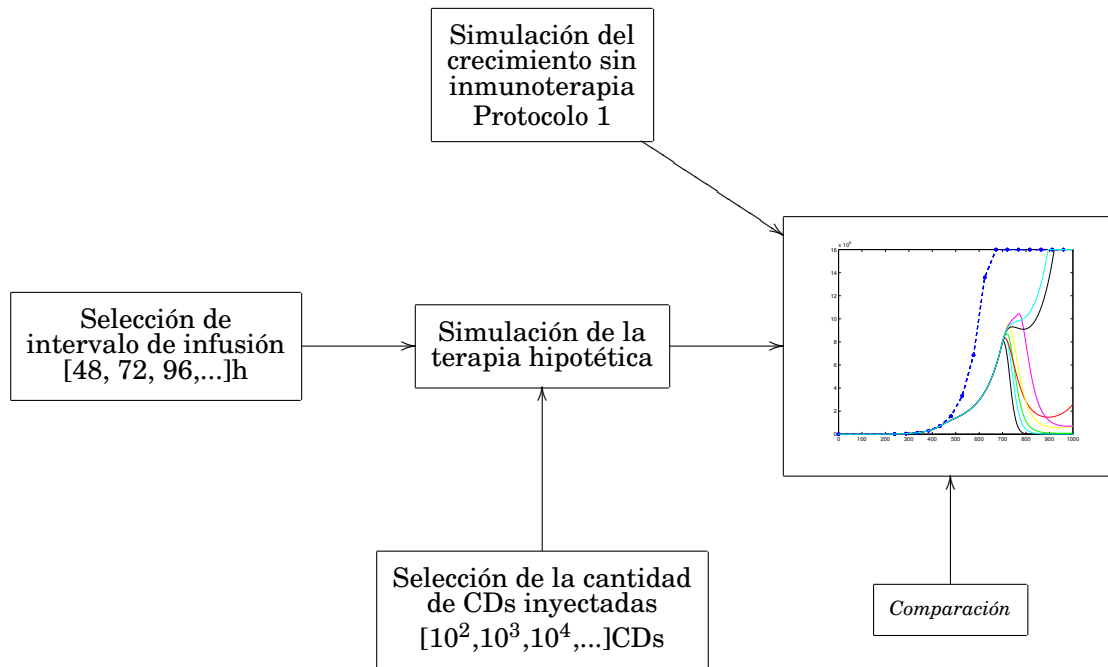


Figura 6.12: Diagrama de la metodología de prueba de las inmunoterapias hipotéticas.

Cuadro 6.3: Protocolos hipotéticos el % de CDs inician la respuesta inmune

Protocolo	Dosis de CDs	Intervalo de Inyec. (horas)	Número de dosis	% CDs	% de Decre.	Erad.
17	10 ⁶	168	3	100	80	yes
18	10 ⁶	168	3	80	77,58	yes
19	10 ⁶	168	3	60	73,05	yes
20	10 ⁶	168	3	40	60,33	no
21	10 ⁶	168	3	20	22,16	no

Intervalo de Inyec. Intervalo de inyección, *Erad* Erradicación, *% de CDs* Porcentaje de CDs que llegan a los nodos linfáticos y que inician la inmunorespuesta.

Los resultados de las simulaciones muestran, que si el porcentaje de CDs que llegan a los nodos linfáticos es igual o mayor al 80 %, las células tumorales son erradicadas (ver Figura 6.13), por lo que sería factible buscar una terapia que incrementará el número de CDs que llegan a los nodos linfáticos.

La Figura 6.13, muestra los resultados de las simulaciones aplicando los protocolos hipotéticos de la Tabla 6.3, se puede observar que la *línea magenta*, representa los resultados de la terapia actual utilizada por los investigadores de la UNAM (protocolo 6) y que si este porcentaje se

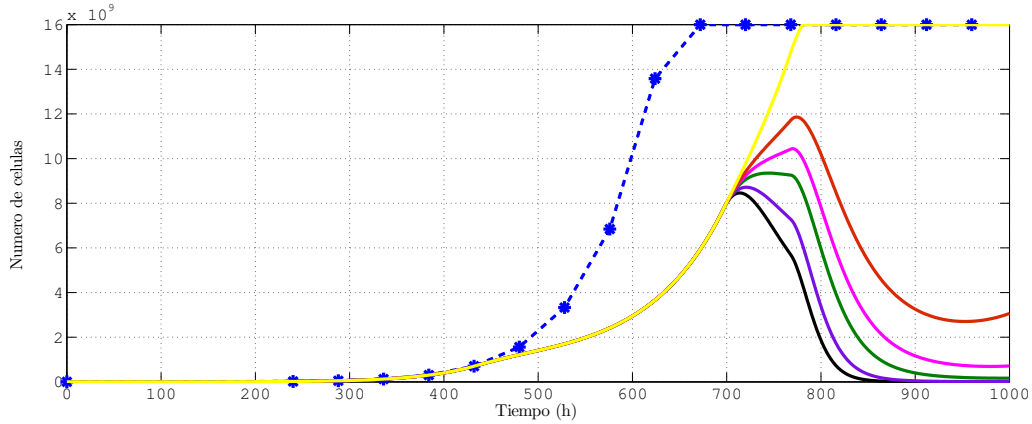


Figura 6.13: Porcentaje de CDs inyectadas en la inmunoterapia que influyen en la eficiencia de la inmunoterapia. La *línea azul* muestra el número de células tumorales obtenidas sin aplicar la inmunoterapia, la *línea negra* muestra el resultado de aplicar el protocolo 17, *línea azul* protocolo 18, *línea verde* protocolo 19, *línea magenta* protocolo 6, *línea morada* protocolo 20, *línea amarilla* protocolo 21

aumentado en un 20%, la inmunoterapia podría eliminar a las células tumorales (protocolo 19).

6.2.5. Importancia de la citocina $TGF - \beta$

La influencia de la citocina $TGF - \beta$ en la inmunoterapia fue observada utilizando el modelo de EDRs al eliminar la tasa de producción de la citocina $TGF - \beta$ por las células tumorales en la ecuación 5.5 (Ejemplo " $r_{T,\beta} = 0$ ").

Los resultados de la simulación muestra que el efecto del $TGF - \beta$ en la inmunoterapia disminuye la población de las células tumorales en un 77,68% mientras que bajo la influencia de la citocina $TGF - \beta$ la población disminuye solo un 68,65%. Lo que sugiere que podría buscarse una terapia alternativa donde se utilicen inhibidores de la citocina $TGF - \beta$, los cuales permitirían mejorar la eficiencia de la inmunoterapia, eliminando más las células tumorales que la terapia actual (Figura 6.14).

6.2.6. Análisis de sensibilidad de los parámetros

El análisis de sensibilidad de los parámetros fue realizado para conocer el impacto que produce cada uno de los parámetros utilizados en los resultados de la simulación del modelo [25]. En la literatura se encuentran varias formas de realizar este análisis [47–49], para el modelo de EDRs se utilizó un análisis de sensibilidad local paramétrico (por sus siglas en inglés LPSA). El

6.2. PROTOCOLOS DE INMUNOTERAPIA PROPUESTOS

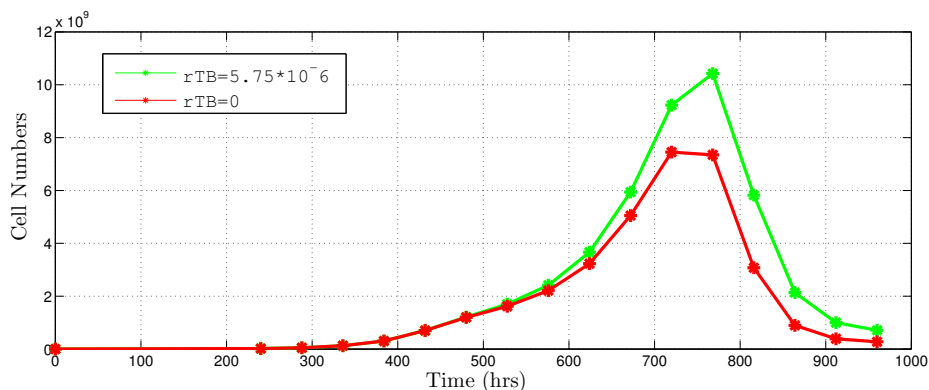


Figura 6.14: Efecto de la citocina $TGF - \beta$ en la inmunoterapia. Intervalo de inyección cada 168 horas aplicando 10^6 CDs por dosis durante 1000 horas. Se muestra la población de células tumorales (*línea verde*) considerando considerando la influencia de la citocina $TGF - \beta$ en la simulación del modelo de EDRs y la población de células tumorales (*línea roja*) sin la influencia de la citocina $TGF - \beta$ en la simulación del modelo

coeficiente de sensibilidad es definido como [50]:

$$S_{\theta}^M = \frac{\delta M(y) / M(y)}{\delta \theta / \theta} \quad (6.1)$$

donde θ representa el parámetro que es variado y $M(y)$ es la característica de la respuesta del sistema a la salida y . δM es el cambio en M debido al cambio $\delta \theta$ en θ .

La sensibilidad de cada uno de los parámetros del modelo de EDRs fue calculada comparando la diferencia entre el número de células tumorales obtenidas después de cambiar en $\pm 1\%$ el valor de referencia del parámetro (sin modificar los demás parámetros) contra la cantidad de células tumorales obtenidas sin modificar ningún parámetro, aplicando en ambas simulación el Protocolo 1 (ver Tabla 5.1) con 1000 horas de simulación.

Cuadro 6.4: Análisis de sensibilidad local paramétrico

Parámetro	Población obtenida	% de cambio	Población obtenida	% de cambio
	decre. -1%	decre. -1%	incre. +1%	incre. +1%
K	$7,06 \times 10^8$	0,97	$7,2 \times 10^8$	-1,01
r	$6,04 \times 10^8$	15,29	$8,35 \times 10^8$	-17,02
τ	$3,90 \times 10^8$	45,33	$1,26 \times 10^9$	-76,64
a_T	$7,84 \times 10^8$	-9,96	$6,49 \times 10^8$	9,05
r_a	$7,29 \times 10^8$	-2,18	$6,98 \times 10^8$	2,13
r_e	$7,67 \times 10^8$	-7,61	$6,63 \times 10^8$	7,07
ef	$7,67 \times 10^8$	-7,61	$6,63 \times 10^8$	7,07
$\mu_{F,\beta}$	$7,18 \times 10^8$	-0,68	$7,08 \times 10^8$	0,67
$t(0)$	$7,09 \times 10^8$	0,64	$7,18 \times 10^8$	-0,64
μ_{C_a}	$4,46 \times 10^8$	37,53	$1,11 \times 10^9$	-56,05
$a_{T,\beta}$	$7,34 \times 10^8$	-2,99	$6,93 \times 10^8$	2,85
$e_{T,\beta}$	$7,18 \times 10^8$	-0,68	$7,08 \times 10^8$	0,66
μ_D	$6,58 \times 10^8$	7,79	$7,72 \times 10^8$	-8,29
θ_D	$7,13 \times 10^8$	0,00	$7,13 \times 10^8$	0,00
θ_a	$7,13 \times 10^8$	0,00	$7,13 \times 10^8$	0,00
$r_{T,\beta}$	$7,08 \times 10^8$	0,70	$7,18 \times 10^8$	-0,70
μ_{C_i}	$6,58 \times 10^8$	7,78	$7,71 \times 10^8$	-8,12

Población final de células tumorales $7,13 * 10^8$ con un tiempo de simulación de 1000 horas. *Población obtenida decre.* -1%. Población obtenida decrecimiento del valor del parámetro en un -1%. *% de cambio decre.* -1%. Porcentaje de cambio obtenido al decrementar el valor de referencia del parámetro. *Población obtenida incre.* +1%. Población obtenida incrementando el valor del parámetro en un +1%. *% de cambio incre.* +1%. Porcentaje de cambio obtenido al incrementar el valor de referencia del parámetro en un +1%.

La Figura 6.15, muestra una gráfica con algunos de los resultados obtenidos del análisis de sensibilidad. Se puede observar que el parámetro “ τ ” es el que presenta un porcentaje mayor de sensibilidad al comparar la cantidad de células tumorales obtenidas al final de la simulación (intervalo de cambio entre -76,64% y 45,33%), seguido de la tasa de crecimiento del tumor “ r ” y el parámetro de máxima eficiencia de la células citotóxicas “ a_T ”. Los resultados numéricos se muestran en la Tabla 6.4.

6.3. Análisis de resultados

El modelo matemático de cinco EDRs presentado, es capaz de simular el crecimiento de células tumorales con un NRMSE 10%, entre los datos reales de las pruebas biológicas de la inmunoterapia con CDs, la cual fue desarrollada por los investigadores de la UNAM y los resultados de las simulaciones del modelo propuesto. A pesar de que sólo se toman en cuenta las interacciones de las células tumorales, las células dendríticas, las CTLs activadas/inactivadas y la citocina $TGF - \beta$ se puede considerar que la aproximación es favorable.

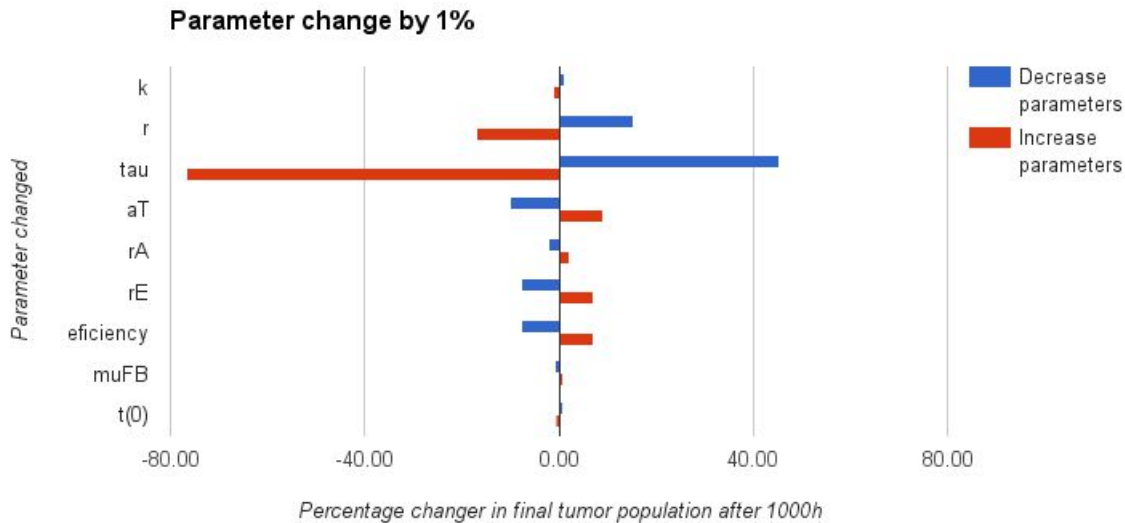


Figura 6.15: Análisis paramétrico de sensibilidad (LPSA) para el modelo de EDRs aplicando el Protocolo 1 (Table 5.1)

La validación del modelo permite probar diferentes protocolos hipotéticos de la inmunoterapia con el objetivo de encontrar un protocolo de inyección de CDs más eficiente que el actual. Se propuso como cambiar el número de infusiones y variar la cantidad de CDs inyectadas.

Observando los resultados de estas pruebas, se puede decir que si se utilizan 4 dosis de 10^6 CDs inyectadas cada 96 horas durante tres semanas (ver Protocolo 12, Tabla 6.1), el crecimiento de las células tumorales es menor que el obtenido con el protocolo de inmunoterapia usado actualmente (ver Protocolo 1, Tabla 5.1) por los investigadores de la UNAM. Este resultado muestra que el incrementar solo una infusión más en la inmunoterapia actual, los ratones podrían vivir más e incluso el tumor podría ser erradicado, cabe mencionar que este protocolo hipotético es viable biológicamente y experimentalmente.

Se encontró además que inyectado cantidades mayores o iguales a 10^7 CDs por dosis no importando el período de infusión de las CDs, el tumor es erradicado. Sin embargo, para obtener esta cantidad de CDs de forma *in vitro* por ahora no es posible para los investigadores de la UNAM debido a las limitaciones del laboratorio de experimentación (ver Anexo).

También se observa que al utilizar cantidades menores o iguales a 10^5 CDs por dosis no importando el período de infusión de las CDs, las células tumorales siguen creciendo. Por lo que estas terapias no son eficientes y por lo tanto no se considerarán para mejorar la inmunoterapia (ver Anexo).

En el caso de variar el porcentaje de CDs que llega a los nodos linfáticos para inducir la inmuno respuesta, el objetivo era observar si el número de CDs inyectadas afectan la eficiencia de la inmunoterapia. Realizando este experimento, se encontró que si más del 80% de las CDs llega a los nodos linfáticos, el tumor es erradicado. Lo que sugiere que la inmunoterapia actual podría ser mejorada, encontrando una forma donde más CDs lleguen a los nodos linfáticos y así mayor número de CTLs puedan ser activadas y replicadas provocando así que el tumor pueda ser erradicado con mayores posibilidades.

Actualmente, se han incluido la inhibición de la citocina $TGF - \beta$ en algunas inmunoterapias con CDs o con CTLs [51] para mejorar la respuesta inmune de los ratones hacia las células tumorales; por esta razón se simula un tratamiento hipotético utilizando el modelo de EDRs en el cuál el efecto de la citocina es eliminado, para observar si la influencia de esta citocina es relevante en la inmunoterapia usada por los investigadores de la UNAM. Los resultados muestran que la citocina tiene una gran relevancia en la efectividad de la inmunoterapia. Por lo que una combinación entre la infusión de CDs e inhibidores de la actividad de la citocina $TGF - \beta$ puede dar mejores resultados que la terapia actual.

Realizando el análisis de sensibilidad de los parámetros del modelo de EDRs, se observó que el parámetro " τ ", es el parámetro más sensible dentro del modelo y esto se debe a que cuando se diseñó el modelo de EDRs se consideró que la activación y proliferación de las CTLs se da antes de que las CTLs eliminen a células tumorales, es decir la respuesta a la inmunoterapia sufre un retardo en el tiempo. Lo cual es observado en los resultados de los experimentos biológicos [30] donde la respuesta principal de la inmunoterapia se da al día 30 después de ser inyectadas las CDs dentro del ratón y no de forma inmediata cuando son inyectadas.

La tasa de crecimiento del tumor " r ", es otro de los parámetros al que es más sensible el modelo de EDRs, el cual está directamente relacionado con el tipo de cáncer que se está simulando (en este caso es cáncer de piel).

Por otro lado " a_T ", es otro parámetro al que es sensible el modelo, el cual representa la capacidad que tienen las células CTLs de eliminar a las células tumorales y que por lo tanto genera una influencia grande en la respuesta del modelo. Uno parámetro al que también el modelo se muestra más sensible es a la eficiencia de la inmunoterapia, la cual está relacionada con el número de CDs que llegan a los nodos linfáticos para activar y reproducir a las CTLs. Esta eficiencia está asociada con los tratamientos que las CDs reciben antes de ser inyectadas dentro de los ratones y que por ahora no son considerados en el modelo.

CONCLUSIONES

El uso de la modelación matemática y la simulación computacional a través del desarrollo de dos modelos matemáticos durante esta tesis nos permitió estudiar la dinámica del crecimiento de las células cancerosas en ratones con melanoma y su interacción con algunas de las células del sistema inmune. Se ha alcanzado con ello nuestro objetivo principal presentado en esta tesis los resultados de la simulación de estos dos modelos, los cuales nos ayudan a estudiar la respuesta del crecimiento de células tumorales en ratones al aplicarles una terapia con CDs.

Los dos modelos matemáticos desarrollados durante esta tesis representan de manera simple los mecanismos que ocurren dentro del sistema inmune, las células de melanoma y su respuesta a la inmunoterapia con CDs, suponiendo que su respuesta es inmediata.

El primer modelo es un modelo de 4 EDOs, el cual nos permitió probar diferentes inmunoterapias hipotéticas, con el objetivo de encontrar un rango de operación donde estas inmunoterapias puedan tener mayor posibilidades éxito. Los resultados muestran que las células tumorales tienen un porcentaje de crecimiento entre el 30% y el 70%, cuando reciben entre 10^6 y 10^7 CDs inyectadas para cualquier tiempo de infusión.

El segundo modelo matemático propuesto está basado en la inmunoterapia antitumoral que fue desarrollada por los investigadores de la UNAM. Los resultados obtenidos de los experimentos biológicos muestran que la respuesta a la inmunoterapia con CDs no actúa de forma inmediata, razón por la cual se propone un modelo de 5 EDRs, el cuál representa también de forma simple algunos de los mecanismos que ocurren entre el sistema inmune y la inmunoterapia con CDs contra el melanoma en ratones. En este modelo se considera que el tiempo de respuesta a la

inmunoterapia.

El modelo de EDRs toma en cuenta cinco interacciones entre las células del sistema inmune, las células tumorales y una citocina. La validación del modelo se realizó al obtener el NRMS entre los datos obtenidos de la simulación computacional y los datos biológicos. Con base a los resultados obtenidos de las validaciones realizadas, se considera que el modelo reproduce de forma adecuada el comportamiento observado en los experimentos biológicos.

Esta validación da la posibilidad de probar diferentes protocolos hipotéticos al utilizar una infraestructura de trabajo con el modelo, los resultados muestran que la inmunoterapia usada en los experimentos biológicos puede ser mejorada manipulando el número de CDs inyectadas, cambiando el intervalo de inyección, eliminando el efecto de la citocina $TGF - \beta$ o incrementando el porcentaje de las CDs que llegan a los nodos linfáticos. Es importante mencionar que si es aumentada en una sola dosis de CDs los resultados obtenidos con la actual inmunoterapia mejorarían dando la posibilidad de que los ratones sobrevivieran más tiempo.

Por otra parte, el modelo es usado para analizar las consecuencias de manipular sus parámetros. Se encontró que el retardo en el tiempo " τ ", la tasa máxima de crecimiento del tumor " r " y la máxima eficiencia de citotoxicidad de las CTLs juegan un rol significativo en la sensibilidad del modelo. Estos parámetros nos dan otras pistas de cómo la inmunoterapia podría incrementar su eficiencia para así detener el crecimiento de las células tumorales o eliminarlas.

El modelo matemático puede ser usado como una guía para mejorar la inmunoterapia y así minimizar costos en tiempo y dinero al probar nuevos protocolos. Lo que eventualmente ayudaría a los investigadores de la UNAM a tener mayores posibilidades de éxito al probar un nuevo protocolo.

Finalmente, creemos que el desarrollo de este tipo de modelos pueden ayudar en la comprensión de esta enfermedad y que ayudará en la búsqueda de soluciones para combatirla.

7.1. Trabajo futuro

1. Durante la fase de prueba se observó que el modelo de EDRs puede ser mejorado incrementando el número de parámetros claves entre los cuales se puede encontrar:
 - Incorporar las células ayudantes T linfocitos o $CD4+$ y las células B , las cuales están relacionadas con la producción de anticuerpos capaces de reconocer el antígeno del melanoma.

- El modelo de EDRs solo considera una citocina la cual tiene la función de inhibir al sistema inmune, sin embargo existen también citocinas que son liberadas por los linfocitos T, los cuales ayudan a contrarrestar esta inhibición, promoviendo la activación o replicación de las células T y células B, como es el caso de la citocina *IL - 2*
 - La expresión del complejo de mayor histocompatibilidad (MHC) clase I y II en la superficie de las CDs, el cual da inicio a la respuesta inmune y es utilizado por los investigadores de la UNAM como un indicador de que la respuesta inmune ha sido exitosa, esta expresión puede ser incorporadas al modelo utilizando expresiones de michaelis-menten en la ecuación 5.3. 5.1
2. Incorporar al modelo términos que representen la terapia que reciben las CDs para ser maduras y activadas con el antígeno específico del melanoma. Este modelo deberá considerar las pruebas biológicas que fueron realizadas por los investigadores de la UNAM. Donde se realizaron 4 terapias diferentes más la terapia de control.
 3. Realizar un análisis de estabilidad lineal para buscar bifurcaciones, puntos en los cuales la terapia puede cambiar su comportamiento dependiendo de los parámetros que se analicen.

Cuadro 8.1: Condiciones iniciales del modelo

Variable del modelo	Valor	Intervalo en el tiempo	Referencia
$T(t)$	6×10^4	$[-\tau, 0]$	Gabriela et. al. [30]
$D(t)$	0	$[-\tau, 0]$	
$C_a(t)$	0	$[-\tau, 0]$	
$C_i(t)$	2×10^6	$[-\tau, 0]$	Duriacil et. al [52]
F_β	0	$[-\tau, 0]$	

Cuadro 8.2: Parámetros utilizados en el modelo EDOs

Parametro	Nombre	Valor	Observaciones
r_T	Tasa máxima de crecimiento del tumor**	$0,001h^{-1}$	Basado en el estudio de Kronik et al. [22] swanson/zvia
K	Capacidad de acarreamiento del tumor**	$10^{11} cell$	Basado en el estudio de Arciero et al. [53] y Kronik et al.[22]
a_T	Máxima eficiencia de las células citotóxicos	$0,12 h^{-1}$	[53] y [22]
h_T	Eficiencia de saturacion de las CTLs para un tamaño grande de tumor	$5 \times 10^8 cell$	[27] y [22]
$\alpha_{T\beta}$	Máximo efecto de la reducción de la citocina $TGF - \beta$ en la eficiencia de las CTLs	0,69 none	Basada en los estudios de Massague [36] y Kronik [21]
$e_{T\beta}$	Dependencia de la eficiencia de las CTLs en la eficiencia del $TGF - \beta$	$10^4 pg$	Basada en los datos de Peterson [46] y Kronik [21]
r_e	Tasa de expansión de las CTLs por las CD	$3,5416h^{-1}$	Ludewig et al.[44]
θ_D	Limite de la densidad de las CD por la tasa máxima de proliferación de las CTLs	$212cells$	Ludewig et al. [44]
r_a	Tasa de activación de las CTLs por las CD	$0,00004(cell * h)^{-1}$	Ludewig et al. [44]
μ_{C_a}	Tasa de muerte de las CLTs activadas en el sitio del tumor	$0,01925h^{-1}$	Basada en los datos de Pillis et al.[23]
$r_{T\beta}$	Tasa de producción de $TGF - \beta$ por una sola célula tumoral	$5,57 \times 10^{-6} pg(cell \times h)^{-1}$	Basada en el estudio de Kronik et al. [21]
μ_β	Tasa de degradación del $TGF - \beta$	$7h^{-1}$	[21]
C_i	Celulas CTLs inactivadas endogenas	$370cells$	[23] (dato <i>ah doc</i>)
μ_D	Tasa de muerte de las células D	$0,009625h^{-1}$	dato <i>ah doc</i> basado en los datos de Ludewig et al. [44]

Cuadro 8.3: Parámetros utilizados en el modelo EDRs

Parámetro	Descripción	Valor estimado	Referencia
r	Tasa máxima de crecimiento del tumor	$0,001060289 h^{-1}$	Ajustada a una función de Gompertz.
K	Capacidad de acarreo del tumor	$6,75 \times 10^{15} \text{ cells}$	Ajustada a una función de Gompertz.
a_T	Máxima eficiencia de las células citotóxicas	$6 \times 10^{-11} h^{-1}$	Estimada usando una búsqueda exhaustiva
$a_{T,\beta}$	Máximo efecto de la reducción de la citocina $TGF-\beta$ en la eficiencia de las CTLs	$0,69 \text{ none}$	Basada en los datos de Kronik [21] y Thomas [36]
$e_{T,\beta}$	Dependencia de las CTLs en la eficiencia de la citocina $TGF-\beta$	$10^4 pg$	Basada en los datos de Peterson [46] y Kronik [21]
μ_D	Tasa natural de muerte de las CDs	$0,009625 X h^{-1}$	Ludewig [44] y De Pillis [23]
r_a	Tasa de activación de las CTLs por las DCs	$61 h^{-1}$	Estimada usando una búsqueda exhaustiva
θ_D	Límite de la densidad de las CDs por la tasa máxima de proliferación de las CTLs	212 cells	Basada en Ludewig [44]
r_e	Tasa de expansión de las CTLs activadas	$6500 h^{-1}$	Estimada usando una búsqueda exhaustiva
μ_{C_a}	Tasa de muerte por las células CTLs activadas en el sitio del tumor	$0,01925 h^{-1}$	De Pillis [23]
θ_A	Límite de la densidad de las C_a por la tasa máxima de proliferación de las CTLs	10 cells	valor <i>Ad hoc</i> ajustado
μ_{C_i}	Tasa de muerte de las CTLs inactivadas	$0,007 h^{-1}$	Valor <i>Ad hoc</i> basado en Kronik [21]
$r_{T,\beta}$	Tasa de producción de la citocina $TGF-\beta$ por una sola la célula tumoral	$5,75 * 10^{-6} pg(\text{cell} * h)^{-1}$	Basada en los datos de Peterson et al. [46] y Kronik et al.[21]
μ_β	Tasa de degradación de la citocina $TGF-\beta$	$2,7 h^{-1}$	Valor ajustado, utilizando los datos de Coffey [54] y Kronik [21]
τ	Retardo en el tiempo	$265 h$	Estimada usando una búsqueda exhaustiva

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Arnaud H Chauviere, Haralampos Hatzikirou, John S Lowengrub, Hermann B Frieboes, Alastair M Thompson, and Vittorio Cristini. Mathematical oncology: how are the mathematical and physical sciences contributing to the war on breast cancer? *Current breast cancer reports*, 2(3):121–129, 2010.
- [2] Abul K. Abbas, Andrew H. H. Lichtman, and Shiv Pillai. *Cellular and Molecular Immunology*. 2011.
- [3] American Cancer Society. *Global Cancer Facts & Figures*. Atlanta: American Cancer Society, 2015.
- [4] Christina J Kim, Sophie Dessureault, Dimitry Gabrilovich, Douglas S Reintgen, and Craig L Slingluff. Immunotherapy for melanoma. *Cancer Control*, 9(1):22–30, 2002.
- [5] Cornelis J.M. Melief. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity Review*, (29):372–383, 2008.
- [6] Karolina Palucka and Jacques Banchereau. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*, 12(4):265–277, 2012.
- [7] Zvia Agur and Stanimir Vuk-Pavlović. Mathematical modeling in immunotherapy of cancer: personalizing clinical trials. *Molecular Therapy*, 20(1):1, 2012.
- [8] National cancer institute. <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>. Acceso: 2015-05-11.
- [9] Lauren Pecorino. *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*. Oxford university press, 2012.
- [10] Raymond W Ruddon. *Cancer biology*. Oxford University Press, 2007.
- [11] Douglas Hanahan and Robert A Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57–70, 2000.
- [12] Skin cancer foundation. <http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma>. Acceso: 2015-05-11.

- [13] American cancer society. <http://www.cancer.org/cancer/skincancer-melanoma/detailedguide/melanoma-skin-cancer-key-statistics>. Acceso: 2015-05-11.
- [14] Jochen Utilkal, Jürgen C. Becker, and Selma Urguel. Diagnostic and prognosis biomarkers in melanoma: Current stage of play. In Michael J. Murphy, editor, *Diagnostic and Prognostic Biomarkers and Therapeutic Targets in Melanoma*, pages 9–18. Human Press Springer, 2012.
- [15] Michael Dougan and Glenn Dranoff Rong-Fu Wang. Immune therapy for cancer. In Rong-Fun Wang, editor, *Innate Immune Regulation and Cancer Immunotherapy*, pages 391–414. Springer Science and Bussines Media.
- [16] Doru T. Alexandrescu, Thomas E. Ichim, Neil H. Riordan, and Francesco M. Marincola. Immunotherapy for melanoma: Current status and perpectives. *J Immunother*, 33(6):570–590, 2010.
- [17] J. Meyer Walter. *Concepts of mathematical modeling*. Dover Publications, 1984. ISBN: 0-07-041747-4.
- [18] Gerda De Vries, Thomas Hillen, Mark Lewis, Johannes Müller, and Birgitt Schönfish. *A course in mathematical biology: quantitative modeling with mathematical and computational methods*, volume 12. Siam, 2006.
- [19] Dominik Wodarz. *Killer Cell Dynamics, Mathematical and Computational Approaches to Immunology*, volume 32. Springer, 2007.
- [20] Helen M Byrne. Dissecting cancer through mathematics: from the cell to the animal model. *Nature Reviews Cancer*, 10(3):221–230, 2010.
- [21] Natalie Kronik, Yuri Kogan, Vladimir Vainstein, and Zvia Agur. Improving alloreactive ctl immunotherapy for malignant gliomas using a simulation model of their interactive dynamics. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 57(3):425–439, 2008.
- [22] Natalie Kronik, Yuri Kogan, Paul G Schlegel, and Matthias Wöfl. Improving t-cell immunotherapy for melanoma through a mathematically motivated strategy: efficacy in numbers? *Journal of Immunotherapy*, 35(2):116–124, 2012.
- [23] Lisette DePillis, Angela Gallegos, and Ami Radunskaya. A model of dendritic cell therapy for melanoma. *Frontiers in oncology*, 3:1–13, 2013.
- [24] James Dickson Murray. *Mathematical Biology; I. An Introduction*, volume 17. Springer New York, USA, third edition, 2002.

-
- [25] Lisette G de Pillis, Ami E Radunskaya, and Charles L Wiseman. A validated mathematical model of cell-mediated immune response to tumor growth. *Cancer research*, 65(17):7950–7958, 2005.
- [26] Peter C Burger, F Stephen Vogel, Sylvan B Green, and Thomas A Strike. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer*, 56(5):1106–1111, 1985.
- [27] Carol A Kruse, Linda Cepeda, Betty Owens, Stephen D Johnson, John Stears, and Kevin O Lillehei. Treatment of recurrent glioma with intracavitary alloreactive cytotoxic t lymphocytes and interleukin-2. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 45(2):77–87, 1997.
- [28] Carol A Kruse and David Rubinstein. Cytotoxic t-lymphocytes reactive to patient major histocompatibility complex proteins for therapy of brain tumors. In *Brain Tumor Immunotherapy*, pages 149–170. Springer, 2001.
- [29] Willem W. Overwijk and Nicholas P. Restifo. B16 as a mouse model for human melanoma. *Current Protocols in Immunology*, 39:1–33, May 2001.
- [30] Gabriela Piñon-Zárate, Miguel Ángel Herrera-Enríquez, Beatriz Hernández-Téllez, Katia Jarquín-Yáñez, and Andrés Eliú Castell-Rodríguez. Gk-1 improves the immune response induced by bone marrow dendritic cells loaded with mage-ax in mice with melanoma. *Journal of Immunology Research*, 2014:1–12, 2014.
- [31] Mekada Kazuyuki, Abe Kuniya, Murakami Ayumi, Nakamura Satoe, and Nakata Hatsumi. Genetic differences among c57bl/6 substrains. *Experimental Animals*, 58(2):141–149, 2009.
- [32] Prasanta K Ghosh, Devesh Bhardwaj, and Rucha Karnik. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: The protein and its current & emerging applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 6(4):435–448, 2007.
- [33] Meixiang Sang, Lifang Wang, Chunyan Ding, Xinliang Zhou, Bin Wang, Ling Wang, Yishui Lian, and Baoen Shan. Melanoma-associated antigen genes – an update. *Cancer letters*, 302:85–90, 2011.
- [34] Meenhard Herlyn and Mizuho Fukunaga-Kalabis. What is a good model for melanoma? *Journal of Investigative Dermatology*, 130:911–912, 2010.
- [35] A Tsoularis and J Wallace. Analysis of logistic growth models. *Mathematical biosciences*, 179(1):21–55, 2002.
- [36] Dori A Thomas and Joan Massagué. Tgf- β directly targets cytotoxic t cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer cell*, 8(5):369–380, 2005.

- [37] Herbert M Sauro. *Enzyme kinetics for systems biology*. Ambrosius Publishing, 2011.
- [38] Niki M Moutsopoulos, Jie Wen, and Sharon M Wahl. Tgf- β and tumors an ill-fated alliance. *Current opinion in immunology*, 20(2):234–240, 2008.
- [39] Christopher AH Paul and Christopher TH Baker. *Explicit Runge-Kutta methods for the numerical solution of singular delay differential equations*. University of Manchester, Department of Mathematics, 1992.
- [40] Alfredo Bellen and Marino Zennaro. *Numerical methods for delay differential equations*. Oxford university press, 2013.
- [41] RD Berger. Comparison of the gompertz and logistic equations to describe plant disease progress. *Phytopathology*, 71(7):716–719, 1981.
- [42] Chemoth.com. Mathematical models for cancer growth, 2015.
- [43] Ochalek Tomasz, J. Nordt Frank, and Tulberg Kjell. Correlation between cell deformability and metastatic potential in b16-f1 melanoma cell variants. *Cancer Research*, 48:5124–5128, 1988.
- [44] Burkhard Ludewig, Philippe Krebs, Tobias Junt, Helen Metters, Neville J Ford, Roy M Anderson, and Gennady Bocharov. Determining control parameters for dendritic cell-cytotoxic t lymphocyte interaction. *European journal of immunology*, 34(9):2407–2418, 2004.
- [45] Andreas Handel and Rustom Antia. A simple mathematical model helps to explain the immunodominance of cd8 t cells in influenza a virus infections. *Journal of virology*, 82(16):7768–7772, 2008.
- [46] Phillip K Peterson, Chun C Chao, Shuxian Hu, Kim Thielen, and Edward G Shaskan. Glioblastoma, transforming growth factor- β , and candida meningitis: A potential link. *The American journal of medicine*, 92(3):262–264, 1992.
- [47] DM Hamby. A review of techniques for parameter sensitivity analysis of environmental models. *Environmental monitoring and assessment*, 32(2):135–154, 1994.
- [48] Christian A Tiemann, Joep Vanlier, Maaike H Oosterveer, Albert K Groen, PA Hilbers, and NA van Riel. Parameter trajectory analysis to identify treatment effects of pharmacological interventions. *PLoS Comput Biol*, 9(8):e1003166, 2013.
- [49] Jungyill Choi, Judson W Harvey, and Martha H Conklin. Use of multi-parameter sensitivity analysis to determine relative importance of factors influencing natural attenuation of mining contaminants. *US Geological Survey Water-Resources Investigations Program, Report*, 1999.

- [50] Riel van and AW Natal. Dynamic modelling and analysis of biochemical networks: mechanism-based models and model-based experiments. *Briefings in bioinformatics*, 7(4):364–374, 2006.
- [51] Erin C Connolly, Julia Freimuth, and Rosemary J Akhurst. Complexities of $\text{tgf-}\beta$ targeted cancer therapy. *International journal of biological sciences*, 8(7):964, 2012.
- [52] David M Duriancik and Kathleen A Hoag. The identification and enumeration of dendritic cell populations from individual mouse spleen and peyer’s patches using flow cytometric analysis. *Cytometry Part A*, 75(11):951–959, 2009.
- [53] JC Arciero, TL Jackson, and DE Kirschner. A mathematical model of tumor-immune evasion and sirna treatment. *Discrete and Continuous Dynamical Systems Series B*, 4(1):39–58, 2004.
- [54] RJ Coffey Jr, LJ Kost, RM Lyons, HL Moses, and NF LaRusso. Hepatic processing of transforming growth factor beta in the rat. uptake, metabolism, and biliary excretion. *Journal of Clinical Investigation*, 80(3):750, 1987.