

## Predicción de la agresividad del cáncer a partir de la morfología del tejido tumoral: aplicación en el estudio del carcinoma epidermoide de cuello uterino

E. Izquierdo-Kulich, M. Amigó de Quesada<sup>a</sup>, C. M. Pérez Amor<sup>b</sup>, O. Casanella Saint-Blancard<sup>a</sup> y J. M. Nieto-Villar.

Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba. elenaik@fq.uh.cu†,

a) Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, Cuba. mamigo@infomed.sld.cu

b) Facultad de Física, Universidad de la Habana, cp@fq.uh.cu

†autor para la correspondencia

Recibido el #####. Aprobado en versión final el 10/12/2009.

**Sumario.** El diagnóstico del cáncer se realiza esencialmente a partir de la imagen histopatológica del patrón celular, por lo que se han realizado estudios para caracterizar esta morfología a partir de la dimensión fractal y su relación con la prognosis. Los mismos parecen evidenciar que en una misma localización la dimensión fractal de los tejidos neoplásicos es mayor que la de los tejidos sanos. A partir de estos resultados se desarrolló un modelo matemático para predecir la dinámica del cáncer a partir de la dimensión fractal. El modelo propuesto se aplicó para correlacionar la agresividad del carcinoma de cuello uterino con la edad del paciente, encontrándose que la velocidad de propagación de este tipo de tumor disminuye con el envejecimiento, lo que se corresponde con los resultados obtenidos en los estudios clínicos realizados.

**Abstract.** Cancer cells diagnose is essentially made from the histopathological image of the cell pattern and based on this, studies have been made to characterize this morphology using its fractal dimension and its relation with the prognosis. The results show that in a same location the fractal dimension of neoplastic tissues is greater than that of healthy tissues. A mathematical model was developed from these results to predict the cancer's growth using its fractal dimension. The model was used to relate the aggressiveness of cervical cancer with the age of the patients showing that the growth rate decreases with the age, similarly to what was obtained from clinical studies.

**Palabras clave.** Cancer 87.19.xj, morphogenesis 87.17.Pq, Stochastic models in biological physics 87.10.Mn.

### 1 Introducción

En los tejidos biológicos normales tienen lugar un conjunto de procesos bioquímicos complejos que dependen del tipo celular, de la acción de hormonas, factores de crecimiento, el sistema inmune, radicales libres y otros estímulos que, en conjunto, determinan si se induce la división celular (mitosis), la muerte programada o suici-

dio celular (apoptosis) o si las células se encuentran fuera del ciclo celular (sin dividirse ni morir), de tal forma que se mantenga la homeostasis o equilibrio fisiológico. Cuando fallan los mecanismos de control del ciclo celular, de reparación del ADN, el mecanismo apoptótico y el sistema inmune, las mutaciones en el ADN se acumulan y propagan a través de una división celular descontrolada provocando la aparición del cáncer<sup>1,2</sup>.

El diagnóstico de esta enfermedad se basa en la imagen histopatológica del patrón celular en el tejido biológico de una localización determinada y en los síntomas clínicos que presentan los pacientes, entre otros factores<sup>3</sup>. Este patrón presenta una estructura compleja, por lo que se han hecho estudios para su cuantificación a través de la dimensión fractal<sup>4</sup>. Aunque estos estudios aún resultan insuficientes para llegar a conclusiones válidas para todos los tipos de cáncer, los resultados obtenidos hasta el momento parecen evidenciar que la dimensión fractal de los tejidos tumorales es mayor que en los sanos<sup>5,6</sup>.

Este resultado es lógico si se toma en cuenta que un predominio de la mitosis sobre la apoptosis debe manifestarse en un incremento en la densidad de las células<sup>7</sup> y que los tejidos neoplásicos exhiben mayor proliferación celular que los sanos. Por esta razón, resulta interesante explorar la posibilidad de cuantificar la agresividad del cáncer a partir de la morfología del tejido tumoral.

Para analizar esta hipótesis se propone un formalismo matemático que se fundamenta en dos aspectos esenciales:

1) el desarrollo de un modelo mesoscópico a partir del cual se propone una relación teórica entre la dimensión fractal y los parámetros que determinan la dinámica del sistema y

2) un modelo macroscópico que describe el comportamiento del tamaño del tumor con respecto al tiempo y la influencia de los factores de crecimiento y el sistema inmune sobre la dinámica del metabolismo celular.

## 2 Modelo utilizado

Para obtener el modelo el tumor se visualiza en 2D y en dos escalas de observación diferentes (ver Figura 1), una escala mesoscópica de tamaño  $\Omega$  [ $L^2$ ], donde el número  $n$  de células promedio se encuentra en estado estacionario, y una escala macroscópica de tamaño  $\Psi$  [ $L^2$ ] que representa al tumor en su totalidad. En la escala mesoscópica se toma en cuenta que  $\Omega$  es de un orden equivalente al tamaño  $\alpha$  [ $L^2$ ] de las células, por lo que la influencia de las fluctuaciones internas producto del carácter aleatorio de los procesos de mitosis y apoptosis no se debe despreciar<sup>8,9,10</sup>. Suponiendo *a priori* que la probabilidad de transición por unidad de tiempo  $W_{n+1/n}$  [ $t^{-1}$ ] de que  $n$  se incremente en 1 debido a la mitosis es proporcional  $n$ :

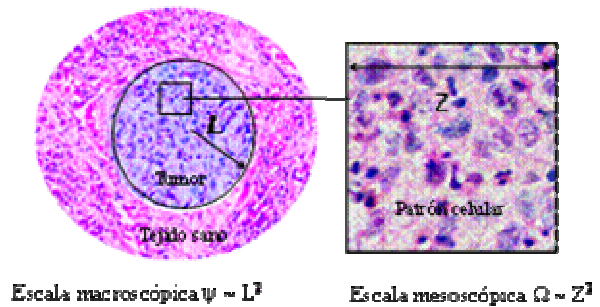
$$W_{n+1/n} = un \quad (1)$$

y que la probabilidad de transición por unidad de tiempo  $W_{n-1/n}$  [ $t^{-1}$ ] de que  $n$  disminuya en 1 debido a la apoptosis depende de  $n$  y de la competencia por el espacio:

$$W_{n-1/n} = b \left( 1 + \frac{n\alpha}{\Omega} \right) n, \quad (2)$$

se obtiene la ecuación maestra<sup>9,10</sup> que describe el comportamiento de la probabilidad  $P(n;t)$  de tener  $n$  células al tiempo  $t$ :

$$\frac{\partial P(n;t)}{\partial t} = (E^{-1} - 1)unP(n;t) + (E^{+1} - 1)b \left( 1 + \frac{n\alpha}{\Omega} \right) nP(n;t)P(n_0;0) = 1 \quad (3)$$



**Figura 1.** Escalas de observación del tumor que son consideradas para la descripción de su comportamiento

En la ecuación maestra (3)  $u$  es la constante de velocidad de mitosis [ $t^{-1}$ ],  $b$  es la constante de velocidad de apoptosis [ $t^{-1}$ ] y  $E^j$  representa el operador de ascenso-descenso que actúa sobre funciones de variables discretas. Debido a que las probabilidades de transición por unidad de tiempo son funciones no lineales de  $n$ , para la solución de la ecuación (3) se aplica el método de desarrollo en  $\Omega$  de van Kampen<sup>9</sup>. Definiendo como variable intensiva la fracción  $\Phi$  del área  $\Omega$  ocupada por las células:

$$\Phi = \frac{n\alpha}{\Omega} \quad (4)$$

y, considerando que la probabilidad  $\Pi(\Phi)$  asociada a  $\Phi$  [-] se encuentra en estado estacionario, se obtiene una función gaussiana<sup>8,9</sup> con valor esperado:

$$\langle \Phi \rangle = (k-1) \quad (5)$$

y varianza  $\sigma$ :

$$\sigma_{\Phi} = \varepsilon \frac{((k+1)\langle \Phi \rangle + \langle \Phi \rangle^2)}{2(1-k+2\langle \Phi \rangle)}, \quad (6)$$

donde  $k = u.b^{-1}$  representa el cociente dinámico o índice de proliferación del tumor y  $\varepsilon = \alpha.\Omega^{-1}$  el factor de escalado mesoscópico que determina la importancia de la magnitud de las fluctuaciones internas. Como a escala mesoscópica estas son significativas, el valor de  $\Phi$  no es el mismo en todos los sitios del sistema, de tal manera que la morfología observada del patrón celular presenta una estructura compleja que se caracteriza a través de la dimensión fractal  $f$ .

Para estimar  $f$  se selecciona  $\Omega$  de tal forma que  $\Phi_{n \rightarrow 1} \sim \varepsilon$  y la varianza  $\sigma_{\Phi \rightarrow \varepsilon}$  se expresa como una función de potencias de  $\varepsilon$ . Si la probabilidad se visualiza desde el punto de vista del conjunto, entonces el valor esperado de  $\Pi(\Phi)_{\Phi \rightarrow \varepsilon}$  constituye una medida de la densidad  $\rho$  de las células en una región de longitud característica  $Z$ , por lo que  $\rho(Z).Z^2 \sim Z^f$ . Tomando en cuenta estos aspectos y sustituyendo apropiadamente se obtiene entonces<sup>8</sup>:

$$f = \frac{1}{2} \frac{k(5-2k)+13}{(k+2)(3-k)}. \quad (7)$$

Para describir la dinámica de crecimiento del tumor en la escala macroscópica se establecen las siguientes suposiciones i) el incremento del área  $\Psi$  depende principalmente de la proliferación de las células que se encuentran en la interfase entre el tejido tumoral y el sano; ii) las fluctuaciones internas son despreciables y iii) la morfología del tumor es aproximadamente circular. Si  $N$  es el número total de células entonces:

$$\Psi = N\alpha = \pi.L^2 \quad (8)$$

y como el número de células  $m$  cuya proliferación determina el incremento de  $\Psi$  depende de la longitud del perímetro, la relación entre  $m$  y  $N$  está dada por:

$$m = 2\sqrt{\pi}\sqrt{N}. \quad (9)$$

A partir de estas consideraciones y las ecuaciones (8) y (9) se obtiene que el tamaño del tumor, caracterizado a través de la longitud  $L$ , evoluciona temporalmente de acuerdo a:

$$\frac{dL}{dt} = \alpha^{0.5}(u-b), \quad (10)$$

$$L(0) = L_0$$

donde  $\alpha^{0.5}(u-b)$  [ $L.t^{-1}$ ] representa la velocidad de crecimiento. Las constantes  $u$  y  $b$  expresan la dinámica global de los procesos metabólicos que ocurren a nivel de las células, por lo que dependen de la producción de factores de crecimiento y la acción del sistema inmune<sup>11</sup>, los que disminuyen significativamente con la edad<sup>2,7,12</sup>.

Debido a que hasta el momento solo existe un conocimiento parcial sobre como la dinámica de los procesos metabólicos en las células se manifiesta en la morfología y en la dinámica del tejido tumoral, los comportamientos de  $u$  y  $b$  con respecto a la edad  $x$  se describen en el contexto de este trabajo a través de ecuaciones que se establecen *a priori* a partir de las siguientes consideraciones matemáticas basadas en evidencias empíricas: 1)  $u(x)$  y  $b(x)$  son funciones que toman siempre valores positivos; 2) se supone que  $u(x)$  y  $b(x)$  disminuyen con  $x$ , por lo que las derivadas  $\partial_x u$  y  $\partial_x b$  tienen ambas signo negativo y 3) debido a que todos los sistemas biológicos tienen un tiempo de vida limitado, cuando  $x$  tiende a infinito la función  $k(x) = u(x)/b(x)$  tiende a cero.

De acuerdo a la suposición 2) se escriben las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$\frac{du}{dx} = -k_1 u^\nu \quad (11)$$

$$u(x_0) = u_0$$

$$\frac{db}{dx} = -k_2 b^p, \quad (12)$$

$$b(x_0) = b_0$$

donde  $\nu$  y  $p$  son números enteros positivos. De la solución analítica de las ecuaciones diferenciales (11) y (12), considerando que  $\nu > 1$  y  $p > 1$  se infiere:

$$u \sim x^{-\frac{1}{\nu-1}} \quad (13)$$

$$b \sim x^{-\frac{1}{p-1}},$$

de tal forma que la condición 3) se escribe:

$$\lim_{x \rightarrow \infty} \frac{x^{-\frac{1}{\nu-1}}}{x^{-\frac{1}{p-1}}} = \lim_{x \rightarrow \infty} \left[ x^{\frac{\nu-p}{(\nu-1)(p-1)}} \right] = 0, \quad (14)$$

por lo que esta condición se cumple cuando  $\nu < p$ .

Teóricamente existen muchas funciones que satisfacen estas condiciones y es imposible desde el punto de vista práctico considerarlas a todas, por lo que se va a suponer que  $p = \nu + 1$ , y que el valor de  $\nu$  se encuentra en el intervalo [0,3], donde la selección del modelo más apropiado para un tipo de cáncer específico dependerá de los resultados experimentales observados.

### 3 Estudio cuantitativo de la agresividad del carcinoma epidermoide de cuello de útero a partir del modelo propuesto

En esta sección se describe como el modelo propuesto se aplicó en el estudio del comportamiento del carcinoma de cuello de útero con respecto a la edad para analizar si sus predicciones se corresponden con los resultados de los estudios clínicos realizados.

Se seleccionaron 35 casos de pacientes diagnosticadas con carcinoma de cuello de útero con grado de malignidad II y en etapa clínica III. Los tejidos biológicos fueron tratados por el procedimiento químico de rutina para diagnóstico utilizando hematoxilina y eosina. Para obtener las imágenes se utilizó con un microscopio Olympus CX21FS con aumento  $\times 40$  y una cámara digital Cannon de 8 Mpíxeles de resolución. Para cada campo se tomaron 3 fotos y para cada caso se analizaron 3 campos. La dimensión fractal de cada imagen se determinó con el programa ImageJ 1.40g Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. El máximo error asociado a un mismo campo es de  $\pm 0,003$ , y el asociado a diferentes campos de un mismo caso  $\pm 0,05$ . Se tomaron también imágenes de tejido normal, por lo que en total fueron procesadas 342 imágenes. En todos los casos la dimensión fractal del tejido tumoral ( $f$ : [1.45,1.75]) fue superior al sano ( $f = 1,21 \pm 0,05$ ), lo que se corresponde con los resultados encontrados en otros tipos de tumor<sup>7</sup>. Una vez calculado el promedio de  $f$  para cada caso se determinó el cociente de proliferación correspondiente a partir de la ecuación (7), lo que permitió obtener la curva experimental del comportamiento de  $k$  con respecto a la edad  $x$ .

**Resultados experimentales y discusión.** Los resultados experimentales del comportamiento del índice de proliferación  $k$  con respecto a la edad  $x$  del paciente en el momento del diagnóstico fueron procesados mediante el programa estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1. La relación estadística entre  $k$  y  $x$  se determinó mediante regresión polinomial, obteniéndose un valor de  $p$  en la Tabla ANOVA inferior a 0.05 y una correlación igual a 0,5642 lo que indica que existe correlación estadística significativa entre  $x$  y  $k$  con un nivel de confian-

za de 95%. Los modelos propuestos *a priori* se ajustaron mediante regresión no lineal por el método de estimación Marquardt. La selección del modelo más apropiado se basó en criterios estadísticos, siendo en este caso el correspondiente a  $\nu = 0$ :

$$k = \frac{u_0 - xk_1}{b_0 \exp(-xk_2)}$$

donde los resultados del ajuste son:  $u_0/b_0 = 1,37465 \pm 0,07034$ ,  $k_1/b_0 = 0,01149 \pm 0,00054$ ,  $k_2 = 0,01551 \pm 0,00214$ ,  $\text{Corr.} = 0,4250$ ,  $R^2 = 27,99\%$ ,  $R^2_{(g.l.)} = 23,49\%$ , Coeficiente Durbin-Watson = 1,77

En la Figura 2 se muestran los valores de  $k$  con respecto a  $x$  para todos los casos analizados, los promedios dentro de grupos de edades y el modelo ajustado mediante métodos estadísticos.

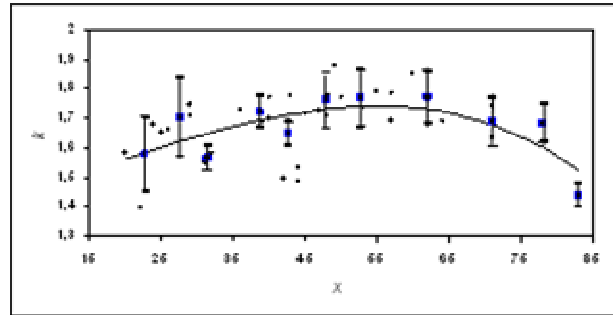
De los resultados estadísticos se obtienen 3 ecuaciones que se relacionan con 4 de los 5 parámetros que se involucran en las ecuaciones (10), (11) y (12), por lo que es necesario escribir estas ecuaciones de tal manera que involucren solamente los parámetros que se pueden determinar experimentalmente. Para esto, se definen las variables adimensionales  $\tau = t.u_0$  y  $\beta = L.\alpha^{-0,5}$  y, combinando la ecuación (10) expresada en función de  $\tau$  y  $\beta$  con las soluciones de las ecuaciones diferenciales (11) y (12) para  $\nu = 0$ ,  $p = 1$ , se obtiene:

$$\begin{aligned} \beta &= V.\tau + \beta_0 \\ V &= 1 - 0,0083.x \\ &\quad - 0,7274.\exp(-0,0155.x) \end{aligned} \quad (15)$$

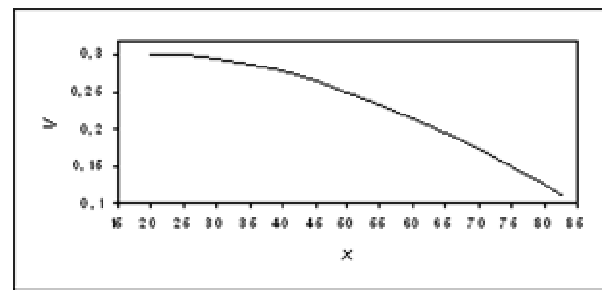
donde  $V$  es un parámetro adimensional proporcional a la velocidad de crecimiento, que en el contexto de este trabajo se identifica con la agresividad. En la Figura 3 se muestra el comportamiento de  $V$  con respecto a  $x$ , donde se predice cuantitativamente que la agresividad de este tipo de tumor disminuye con la edad, lo cual se corresponde con los resultados de los estudios clínicos<sup>11,12</sup>, ya que se ha encontrado que este tipo de tumor es más agresivo cuando se desarrolla en las mujeres más jóvenes, las que además presentan una peor prognosis.

A pesar de que, para este tipo de tumor, los resultados predichos por el modelo se corresponden con los resultados obtenidos en los estudios clínicos realizados, es necesario señalar que el modelo presenta las siguientes limitaciones: 1) se considera que el único factor que influye sobre la agresividad es la edad del paciente, por lo que para obtener un modelo que permita particularizar mejor el diagnóstico hay que tomar en cuenta además otros factores clínicos; 2) las funciones que se establecen para describir el comportamiento de las constantes de velocidad de mitosis y apoptosis se establecen *a priori*, donde el modelo más apropiado se selecciona a partir de criterios estadísticos, por lo que no es posible explicar desde el punto de vista fenomenológico la estructura matemática de las ecuaciones obtenidas y 3) es necesario aplicar el formalismo propuesto a otros tipos de cáncer y en otras localizaciones para poder generalizar si la hipótesis establecida es correcta. En este sentido, es impor-

tante señalar que la cuantificación *in vivo* de la agresividad del cáncer no es prácticamente posible, ya que una vez que se realiza el diagnóstico el paciente es sometido a una terapia de tratamiento, que no se toma en cuenta en el modelo, y que obviamente influye sobre la agresividad y la dinámica de crecimiento del tumor.



**Figura 2.** Comportamiento del índice de proliferación con respecto a la edad. Todos los casos analizados (●), promedio en grupos de edades (■) y modelo estadístico ajustado (—).



**Figura 3.** Predicción de la agresividad o velocidad de crecimiento adimensional del carcinoma de cuello de útero con respecto a la edad.

## Conclusiones

A partir de visualizar la dinámica del comportamiento de las células tumorales en dos escalas de observación diferentes, fue obtenido un modelo que permite describir la dinámica de crecimiento del cáncer a partir de la dimensión fractal de la imagen histopatológica del tejido tumoral. Considerando que las constantes de velocidad asociadas a los procesos de mitosis y apoptosis dependen de factores de crecimiento y de la acción del sistema inmune, se proponen *a priori* ecuaciones para describir el comportamiento de estas constantes de velocidad con respecto a la edad del paciente, donde la selección del modelo apropiado para un tipo histológico de cáncer en una localización dada se realiza mediante criterios estadísticos a partir de los resultados experimentales relacionados con el comportamiento del índice de proliferación del tumor con respecto a la edad. El formalismo matemático fue aplicado para analizar cuantitativamente la agresividad del carcinoma epidermoide de cuello de útero

con respecto a la edad, obteniéndose que las predicciones cuantitativas se corresponden con los resultados observados en los estudios clínicos realizados.

## Referencias

1. R.S. Cotran, V. Kumar, T. Collins, "Patología Estructural y Funcional". Sexta edición. McGraw-Hill España,; (1999)
2. S.A. Frank, "Dynamics of Cancer", Ed. H. Allen Orr; Princenton, Series in evolutionary biology; USA; (2007)
3. Robbins and Cotran Eds, "Pathologic basis of disease". Elsevier (2005)
4. G. Landini, "Complexity in Tumour Growth Patterns", Fractals in Biology and Medicine vol.II, Birkhauser Verlag, Basel, (1998)
5. E. Sabo, A. Boltenko, Y. Sova, A. Stein, S. Kleinhaus, M. B. Resnick, "Microscopic Analysis and Significance of Vascular Architectural Complexity in Renal Cell Carcinoma", Clinical Cancer Research; 7, 533-537, (2001)
6. R. Sedivy, Ch. Windischberger, K. Svozil, E. Moser, G. Breitenecker., "Fractal Analysis: An Objective Method for Identifying Atypical Nuclei in Dysplastic Lesions of the Cervix Uteri"; Gynecologic Oncology, 75, 78-83, (1999)
7. L. Norton, "Conceptual and Practical Implications of Breast Tissue Geometry: Toward a More Effective, Less Toxic Therapy", Oncologist, 10, 370-381, (2005)
8. E. Izquierdo-Kulich., M. Amigó de Quesada, C.M. Pérez-Amor, M. Lopes-Teixeira, J. M. Nieto-Villar, "The dynamics of tumor growth and cells pattern", Mathematical Biosciences and Engineering, 6, 3, 547-559, (2009)
9. N.G. van Kampen, "Stochastic processes in physics and chemistry", N.H Publications, (1992)
10. C. W .Gardiner, "Handbook of stochastic methods", Springer-Verlag, (2004)
11. R. W. Tsang, A. W. Fyles, Y. Li, M. M. Rajaraman, W. Chapman, M. Pintilie, C. S. Wong, "Tumor proliferation and apoptosis in human uterine cervix carcinoma I: correlations between tumor proliferation and apoptosis", Radiother Oncol 50: 85-92 (1999)
12. T. Prempre, V. Patanaphan, W. Sewchand, R. M. Scott, "The Influence of Patients' Age and Tumor Grade on the Prognosis of Carcinoma of the Cervix", Cancer, 51, 1, 764-177, (1983).