



**Universidad**  
Zaragoza

# **TRABAJO FIN DE GRADO**

## **MODELADO BASADO EN AGENTES Y SIMULACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DEL GLIOBLASTOMA: FORMACIÓN DE UNA PSEUDOEMPALIZADA**

---

## **AGENT-BASED MODELLING AND SIMULATION OF GLIOBLASTOMA EVOLUTION: FORMATION OF A PSEUDOPALISADE**

**AUTOR: JONÁS TORRES GONZÁLEZ**

**DIRECTORES: MANUEL DOBLARÉ CASTELLANO Y RAQUEL ARROYO VÁZQUEZ**

**ESCUELA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**SEPTIEMBRE 2021**





## RESUMEN: MODELADO BASADO EN AGENTES Y SIMULACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DEL GLIOBLASTOMA, FORMACIÓN DE UNA PSEUDOEMPALIZADA.

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral más maligno y agresivo que existe, además de ser el más prevalente de este tipo de tumores. De ahí el interés de su estudio, tanto in vivo como in vitro. El presente trabajo fin de grado tiene como objetivo principal analizar el potencial de los modelos de comportamiento celular basados en agentes en la simulación de los procesos celulares que aparecen en modelos in vitro de glioblastoma. Se estudia especialmente la formación de una pseudoempalizada en situaciones con importantes gradientes de oxígeno y zonas hipóxicas.

Este trabajo se aprovecha de los modelos experimentales previamente desarrollados y publicados en el grupo TME LAB, donde se recrean en dispositivos microfluídicos, distintos procesos bien conocidos, que aparecen en distintas fases del desarrollo del glioblastoma. En particular, la formación de pseudoempalizadas. Son estas agrupaciones de células tumorales con alta densidad, que se producen alrededor de vasos sanguíneos, consecuencia de procesos de migración celular desde zonas hipóxicas y subsiguiente alta proliferación, que pueden dar lugar a la oclusión de tal vaso y con ello la aparición de otra zona hipóxica que realimenta y acelera la invasión tumoral.

Aquí pretendemos desarrollar modelos matemáticos capaces de simular estas situaciones con precisión razonable, y a partir de hipótesis biológicas consistentes. Ello permitiría estudiar de una forma rápida y barata, fenómenos altamente complejos, analizar cada uno de los efectos involucrados, tanto en forma individual o combinada, y, finalmente, responder a preguntas de tipo “whatif”, algunas de las cuales pueden ser imposibles de reproducir en un ensayo real.

El trabajo se compone de una pequeña introducción teórica, en la que se realiza una breve introducción sobre la biología del GBM, una leve explicación sobre los distintos tipos de modelos matemáticos utilizados en las investigaciones sobre el GBM y sobre el modelado basado en agentes, que es el que se utiliza en este trabajo.

El segundo apartado está compuesto por las distintas simulaciones que se han realizado. Se explican las características de cada una: número de agentes, condiciones de contorno, etc. Dicha explicación se acompaña con distintas imágenes de cada simulación para mostrar el comportamiento que han tenido las células.

A continuación, en el tercer apartado, se analizan los resultados obtenidos en cada simulación, se explica si son coherentes o no y los motivos que dan lugar los fenómenos observados.

Se realizan distintas simulaciones, estudiando casos aislados de: migración, proliferación y migración y proliferación combinadas para demostrar paso a paso y de forma individualizada los distintos fenómenos que dan lugar a la formación de la pseudoempalizada.

Para terminar con las simulaciones, se analiza la de la formación de una pseudoempalizada. Se discuten las similitudes y discrepancias entre el proceso de formación de la pseudoempalizada simulado y el real. Se discute en general la coherencia de la simulación, el parecido de la pseudoempalizada simulada con modelo basado en agentes y la desarrollada en laboratorio o simulaciones con modelo continuo.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	4
1 – INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO .....	10
1.1 – MARCO BIOLÓGICO .....	10
1.1.1 – INTRODUCCIÓN AL GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM) .....	10
1.1.2 – BIOLOGÍA DE LA INVASIÓN DEL GLIOMA .....	11
1.1.2.1 – TRANSICIÓN Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS MADRE.....	11
1.1.3.2 – MIGRACIÓN, PROLIFERACIÓN Y PROBLEMAS PARA ATACAR AL GBM .....	11
1.1.3 – PSEUDOEMPALIZADA .....	13
1.1.4 – MODELOS IN VITRO DE GENERACIÓN DE PSEUDOEMPALIZADAS .....	15
1.1.5 – MODELOS CONTINUOS PARA LA SIMULACIÓN DEL PROCESO DE GENERACIÓN DE PSEUDOEMPALIZADAS .....	16
1.2 – MODELOS MATEMÁTICOS Y SOFTWARE UTILIZADO .....	18
1.2.1 – TIPOS DE MODELOS.....	18
1.2.2 – MODELADO BASADO EN AGENTES .....	19
1.2.3 – PHYSICELL .....	20
1.2.4 – QT .....	21
1.2.5 – MATLAB .....	22
1.3 – ECUACIONES E HIPÓTESIS CONSIDERADAS .....	23
1.3.1 – ECUACIÓN DE DIFUSIÓN .....	23
1.3.2 – VOLUMEN CELULAR .....	23
1.3.3 – REPRESENTACIÓN GENERAL DEL MODELO DE CICLO CELULAR .....	24
1.3.4 – MIGRACIÓN CELULAR.....	25
1.3.5 – HIPÓTESIS GO-OR-GROW .....	25
2 – EXPLICACIÓN DE LAS SIMULACIONES .....	27
2.1 – SIMULACIONES DE MIGRACIÓN .....	27
2.1.1 – MIGRACIÓN ALEATORIA .....	27
SIMULACIÓN 1.....	27
SIMULACIÓN 2.....	28
2.1.2 – MIGRACIÓN HUYENDO DEL OXÍGENO .....	28
SIMULACIÓN 3.....	28
2.1.3 – MIGRACIÓN SIGUIENDO EL OXÍGENO .....	29
SIMULACIÓN 4.....	29
SIMULACIÓN 5.....	29

SIMULACIÓN 6.....	30
2.2 – SIMULACIONES DE PROLIFERACIÓN.....	30
SIMULACIÓN 7.....	31
SIMULACIÓN 8.....	31
2.3 – SIMULACIONES DE PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN .....	32
2.3.1 – MIGRACIÓN ALEATORIA SIN SEGUIR EL OXÍGENO .....	32
SIMULACIÓN 9.....	32
2.3.2 – MIGRACIÓN DIRIGIDA SIGUIENDO EL OXÍGENO .....	32
SIMULACIÓN 10.....	32
SIMULACIÓN 11.....	33
2.4 – SIMULACIÓN DE FORMACIÓN DE LA PSEUDOEMPALIZADA.....	34
SIMULACIÓN 12.....	34
2.5 – ANÁLISIS PARAMÉTRICO .....	35
2.5.1 – VARIACIÓN DEL OXÍGENO .....	35
20 mmHg O <sub>2</sub> .....	35
38 mmHg O <sub>2</sub> .....	35
50 mmHg O <sub>2</sub> .....	35
2.5.2 – VARIACIÓN DE LA TASA DE CONSUMO .....	35
Tasa de consumo = 2 .....	36
Tasa de consumo = 6.....	36
Tasa de consumo = 12.....	36
2.5.3 – VARIACIÓN SIMULTÁNEA DEL OXÍGENO Y TASA DE CONSUMO.....	36
20 mmHg O <sub>2</sub> y tasa de consumo = 2 .....	36
20 mmHg O <sub>2</sub> y tasa de consumo = 12 .....	37
50 mmHg O <sub>2</sub> y tasa de consumo = 2 .....	37
50 mmHg O <sub>2</sub> y tasa de consumo = 12 .....	37
<b>3 – ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
3.1 – MIGRACIÓN .....	38
3.1.1 – MIGRACIÓN ALEATORIA .....	38
SIMULACIÓN 1.....	38
SIMULACIÓN 2.....	38
3.1.2 – MIGRACIÓN HUYENDO DEL OXÍGENO .....	39
SIMULACIÓN 3.....	39
3.1.3 – MIGRACIÓN SIGUIENDO EL OXÍGENO .....	39
SIMULACIÓN 4.....	39

SIMULACIÓN 5.....	39
SIMULACIÓN 6.....	40
3.2 - PROLIFERACIÓN.....	40
SIMULACIÓN 7.....	40
SIMULACIÓN 8.....	41
3.3 – PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN .....	41
3.3.1 – MIGRACIÓN ALEATORIA Y PROLIFERACIÓN .....	41
SIMULACIÓN 9.....	41
3.3.2 – MIGRACIÓN SIGUIENDO EL OXÍGENO Y PROLIFERACIÓN .....	42
SIMULACIÓN 10.....	42
SIMULACIÓN 11.....	43
3.4 - PSEUDOEMPALIZADA .....	43
SIMULACIÓN 12.....	43
3.5 – ANÁLISIS PARAMÉTRICO .....	48
VARIACIÓN DE OXÍGENO.....	48
VARIACIÓN DE LA TASA DE CONSUMO .....	48
VARIACIÓN SIMULTÁNEA DE OXÍGENO Y DE LA TASA DE CONSUMO .....	49
4 – CONCLUSIONES.....	51
5 – BIBLIOGRAFÍA.....	53
ANEXO I – CÓDIGO DEL ARCHIVO XML DE PHYSICELL.....	55
ANEXO II – CÓDIGO MATLAB.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen del GBM en un paciente. (2).....	10
Figura 2. Imagen del GBM en el cerebro de un paciente. (3) .....	10
Figura 3. Esquematación del proceso de invasión de una célula del glioma al tejido cerebral del huésped. (1).....	11
Figura 4. Resistencia del glioblastoma a la radioterapia. (8) .....	12
Figura 5. Encapsulación y eliminación del tumor por células del sistema inmunitario. (8) .....	13
Figura 6. Pseudoempalizada. (11) .....	14
Figura 7. Proceso de formación de pseudoempalizada. (5).....	14
Figura 8. Vaso sanguíneo colapsado y avance de pseudoempalizada. (5).....	15
Figura 9. Movimiento de las células según cuantos canales abiertos tienen. (14).....	16
Figura 10. Clasificación esquemática de los tipos de modelos de agentes. (8) .....	19
Figura 11. Captura de pantalla de Qt indicando con un rectángulo rojo cual es el archivo a editar. ....	21
Figura 12. Significado de los componentes de la ecuación de difusión. (21) .....	23
Figura 13. Ciclo celular. (24).....	24
Figura 14. Instantáneas extraídas de experimentos in vitro, los números representan el número de veces que se han dividido las respectivas células en 40 horas. (25).....	26
Figura 15. Simulación 1 .....	27
Figura 16. Simulación 2 .....	28
Figura 17. Simulación 3 .....	29
Figura 18. Simulación 4 .....	29
Figura 19. Simulación 5 .....	30
Figura 20. Simulación 6 .....	30
Figura 21. Simulación 7 .....	31
Figura 22. Simulación 8 .....	32
Figura 23. Simulación 9 .....	32
Figura 24. Simulación 10 .....	33
Figura 25. Simulación 11 .....	33
Figura 26. Simulación 12 .....	34
Figura 27. Simulación de pseudoempalizada con menos oxígeno.....	35
Figura 28. Simulación de la pseudoempalizada con oxígeno de más .....	35
Figura 29. Simulación de la pseudoempalizada con menor tasa de consumo .....	36
Figura 30. Simulación de pseudoempalizada con mayor tasa de consumo.....	36
Figura 31. Simulación de la pseudoempalizada con menos oxígeno y menor tasa de consumo	36
Figura 32. Simulación de la pseudoempalizada con menos oxígeno y mayor tasa de consumo	37
Figura 33. Simulación de la pseudoempalizada con más oxígeno y menor tasa de consumo ...	37
Figura 34. Simulación de pseudoempalizada con más oxígeno y mayor tasa de consumo.....	37
Figura 35. Comparación de, con las mismas condiciones iniciales y de contorno, cómo se comportan las células según si se mueven aleatoriamente (izq) o si lo hacen siguiendo el oxígeno (dcha).....	42
Figura 36. Comparación de tamaño del lado del chip con oxígeno. ....	43
Figura 37. Concentración celular al inicio de la simulación de la pseudoempalizada .....	45
Figura 38. Concentración celular a los 6 días de la simulación de la pseudoempalizada .....	45
Figura 39. Concentración celular en el momento final de la simulación de la pseudoempalizada .....	45



Figura 40. Concentración celular al final de la formación de una pseudoempalizada diferenciando células vivas de muertas .....	46
Figura 41. Comparación entre la pseudoempalizada realizada mediante modelo continuo (14) y la realizada con modelo basado en agentes .....	47
Figura 42. Simulaciones de pseudoempalizada con distintos valores de tasa de consumo .....	49
Figura 43. Última imagen de las variaciones simultáneas de O <sub>2</sub> y UR .....	50

## 1 – INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

### 1.1 – MARCO BIOLÓGICO

#### 1.1.1 – INTRODUCCIÓN AL GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM)

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral más maligno y agresivo que existe, además de ser el más prevalente de este tipo de tumores. (1)

Una de sus características es que las células cancerígenas del GBM se entremezclan en el tejido cerebral sano con mucha facilidad, dificultando así su detección temprana puesto que el paciente no muestra ningún síntoma hasta que ya está demasiado extendido. Esta es una de las razones de la pobre esperanza de vida que presentan los pacientes.(1)

Otra característica es su plasticidad fenotípica, es decir, la capacidad de las células tumorales de cambiar de un fenotipo a otro dependiendo de las condiciones microambientales en las que se encuentre. (1)

Como estos tumores se suelen detectar tarde en un estado muy avanzado, es un desafío comprender los motivos biológicos que hay detrás de la expansión del GBM y cuáles son los factores que más afectan e incentivan su desarrollo. (1)

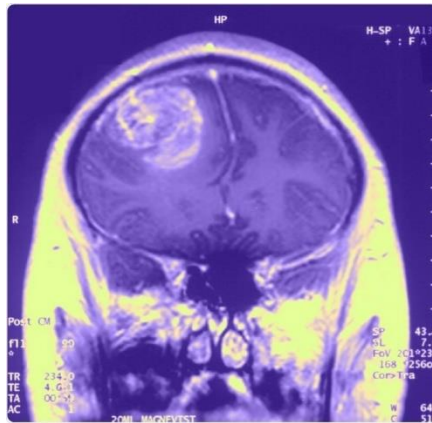


Figura 1. Imagen del GBM en un paciente. (2)

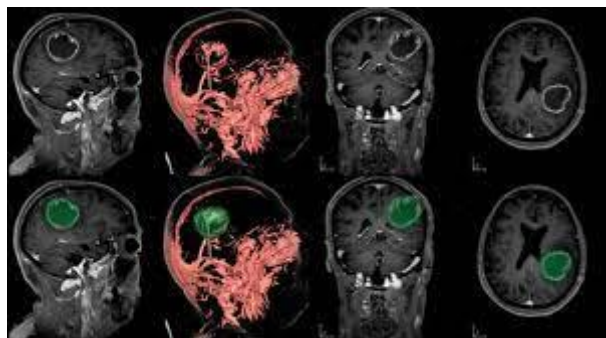


Figura 2. Imagen del GBM en el cerebro de un paciente. (3)

### 1.1.2 – BIOLOGÍA DE LA INVASIÓN DEL GLIOMA

Se ha dicho en el apartado anterior que el GBM se suele detectar demasiado tarde, en un estado muy avanzado, porque las células cancerígenas se infiltran con gran facilidad entre el tejido cerebral sano del paciente. (1)

La infiltración en el parénquima cerebral es una característica importante del GBM ya que hace prácticamente imposible la extracción quirúrgica del tumor. El tumor invade de una manera extensa las células sanas a lo largo del tejido cerebral, con tendencia a infiltrarse en la materia blanca y en la periferia de los vasos sanguíneos. (1)

#### 1.1.2.1 – TRANSICIÓN Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS MADRE

Las células del GBM tienen la habilidad para adquirir el fenotipo de una célula madre y migrar a través de la matriz extracelular (ECM). (1)

La migración es el movimiento de células de un lugar a otro. Normalmente es en respuesta a estímulos externos tales como gradientes químicos o fuerzas mecánicas. (1)

La invasión de células por parte del glioma se compone de 4 pasos:

- **Separación** de células invasoras de la **masa tumoral**
- **Adhesión** a la matriz extracelular
- **Degradación** de la matriz extracelular
- **Migración** de células activas

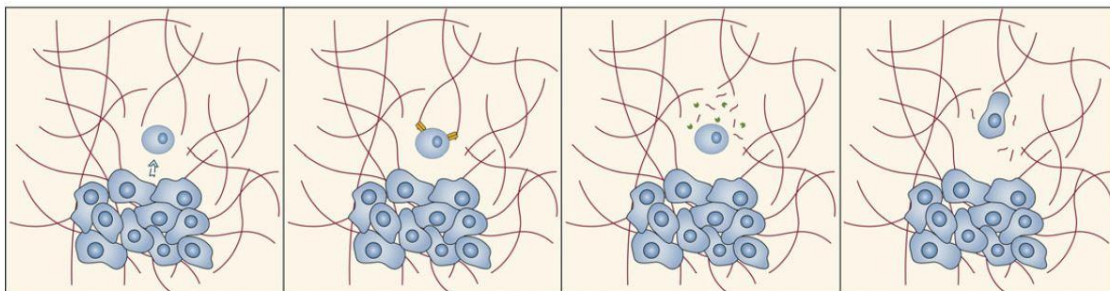


Figura 3. Esquemática del proceso de invasión de una célula del glioma al tejido cerebral del huésped. (1)

Los mecanismos moleculares que ocurren durante la invasión del glioma son complejos y no se sabe con certeza cuáles son los factores que influyen en el desarrollo de la migración ni en qué grado afecta cada factor. (1,4)

#### 1.1.3.2 – MIGRACIÓN, PROLIFERACIÓN Y PROBLEMAS PARA ATACAR AL GBM

Cuando se diagnostica el GBM, suele ser demasiado tarde, las células tumorales ya han migrado y están diseminados por todo el tejido cerebral. (1)

Las células del GBM se comportan según [la hipótesis “go-or-grow”](#). Dicha hipótesis afirma que las células del GBM son capaces de cambiar su fenotipo según las condiciones microambientales en las que se encuentren. (1). Así, por ejemplo, y según esta hipótesis, dependiendo del nivel local de oxígeno, las células dedican su energía metabólica a proliferar (altos niveles de oxígeno) o a migrar (bajos niveles), siendo, por tanto, difícil encontrar células migrando y proliferando simultáneamente.

Cuando las células cancerígenas se encuentran en una región con abundancia de oxígeno, como pueden ser los alrededores de un vaso sanguíneo, comienzan a proliferar. Proliferan hasta que

el número de células es tan alto que se producen problemas de abastecimiento de nutrientes y de oxígeno. (1,5)

El centro de la región tumoral, al tener escasez de oxígeno, es la zona hipóxica. (1,5). Las células en esta zona intentan “escapar” de esta situación, migrando a zonas más ricas en oxígeno, y si ello no es posible (por ejemplo, las células de la zona más interior que se encuentran atrapadas) mueren formando lo que se denomina un núcleo necrótico.

Por el contrario, las células de la periferia de la región tumoral, al no disponer de oxígeno, cambian su fenotipo de proliferación a migración, y migran hacia otro vaso sanguíneo o hacia otra zona del cerebro rica en oxígeno y nutrientes, para intentar sobrevivir y continuar proliferando. (1,5)

Este comportamiento invasivo provoca que las células del GBM estén expandidas por todo el cerebro cuando se consigue diagnosticar el tumor. Dicho fenómeno, denominado como diseminación escondida, es una de las razones más importantes para explicar por qué el GBM es tan maligno y por qué un tratamiento efectivo es muy difícil de conseguir. (1)

Atacar el tumor desde un punto de vista quirúrgico es complicado, ya que el tumor se sitúa en el cerebro y no está concentrado en un único lugar, si no que está diseminado por buena parte del tejido cerebral. (1,6)

Por otro lado, atacar el tumor mediante otras prácticas habituales como pueden ser la quimioterapia o la radioterapia también genera problemas, porque si el tumor está poco extendido, la barrera hematoencefálica del cerebro se encuentra todavía sana y hace de “barrera” o “escudo” contra la quimioterapia, y, sin embargo, cuando la barrera hematoencefálica ya no está en buen estado, es demasiado tarde para que un tratamiento tradicional pueda resultar efectivo. (1,6,7). Así, el tratamiento habitual es una cirugía de resección, tratando de eliminar la mayor parte del tumor, seguida de radioterapia para intentar eliminar el mayor número de células restantes. También se utilizan fármacos antiproliferativos como la temozolomida, que tratan de ralentizar la extensión del tumor. Todo ello, sin embargo, se ha mostrado insuficiente para contrarrestar la alta invasividad y malignidad del GBM, lo que hace que la esperanza de vida de los pacientes diagnosticados, tras la terapia estándar, no supere los 2 años.

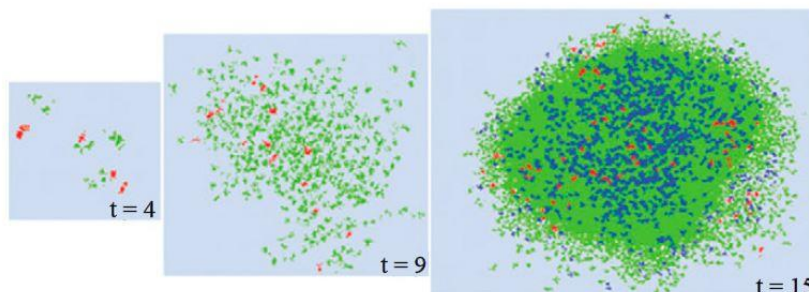


Figura 4. Resistencia del glioblastoma a la radioterapia. (8)

En consecuencia, es necesaria una investigación más profunda para comprender los factores que regulan y dirigen la migración y la proliferación de las células del GBM. (1,6)

Si se consiguieran conocer dichos factores y de qué manera afecta cada factor al desarrollo del GBM, se obtendrían nuevas dianas a los que apuntar en la lucha contra este cáncer. (1,6)

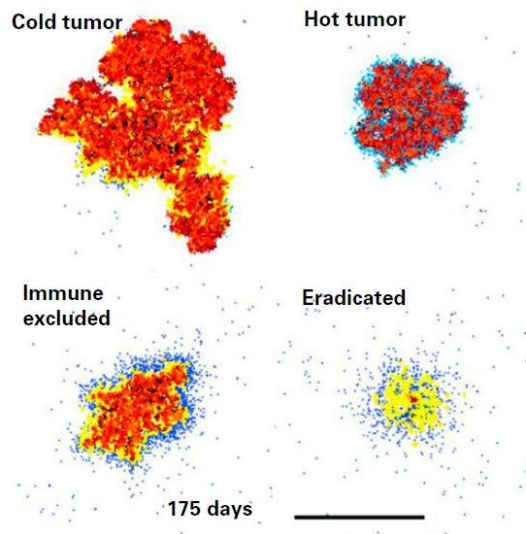


Figura 5. Encapsulación y eliminación del tumor por células del sistema inmunitario. (8)

### 1.1.3 – PSEUDOEMPALIZADA

Las pseudoempalizadas son agrupaciones de células tumorales de alta densidad que rodean la zona necrótica del tumor. Normalmente están ligadas con una hiperplasia microvascular. La hiperplasia microvascular es una exuberante forma de angiogénesis que sale a la luz en respuesta a la secreción de factores químicos proangiogénicos producidos por la pseudoempalizada. (5,9)

El grado de necrosis es inversamente proporcional a la esperanza de vida del paciente. A pesar de que tal necrosis siempre ha sido reconocida como un marcador del comportamiento de los gliomas, no explica por sí solo la rápida expansión de estos. De hecho, la muerte de las células tumorales es la meta de todos los tratamientos contra el cáncer. (5)

En los alrededores del GBM se encuentran cantidades de compuestos químicos en un orden de 200 a 300 veces mayor de lo que sería habitual, estos altos niveles son resultado de factores inducidos por hipoxia. La recepción de estas sustancias químicas conlleva angiogénesis en regiones adyacentes a la pseudoempalizada, de hecho, conduce a una densidad vascular en el glioblastoma que es la más elevada de todos los neoplasmas humanos. (10)

Puesto que la necrosis y la hipoxia están localizadas en el núcleo y cerca del anillo de realce de contraste del GBM, la angiogénesis inducida por hipoxia tiene lugar más lejos del GBM, favoreciendo el crecimiento neoplásico hacia afuera y una rápida extensión del tumor. La naturaleza permisiva de la matriz parenquimal del sistema nervioso central ante la infiltración difusa de células individuales de glioma facilita también este estallido de expansión por la periferia. (5)

Como conclusión, que se den núcleos necróticos en pseudoempalizadas, junto con hiperplasia microvascular son dos de los indicadores más claros de un pronóstico pobre para gliomas, es decir, una corta esperanza de vida para el paciente. La presencia de estas estructuras es un marcador con gran certeza de un tumor grave. (5)

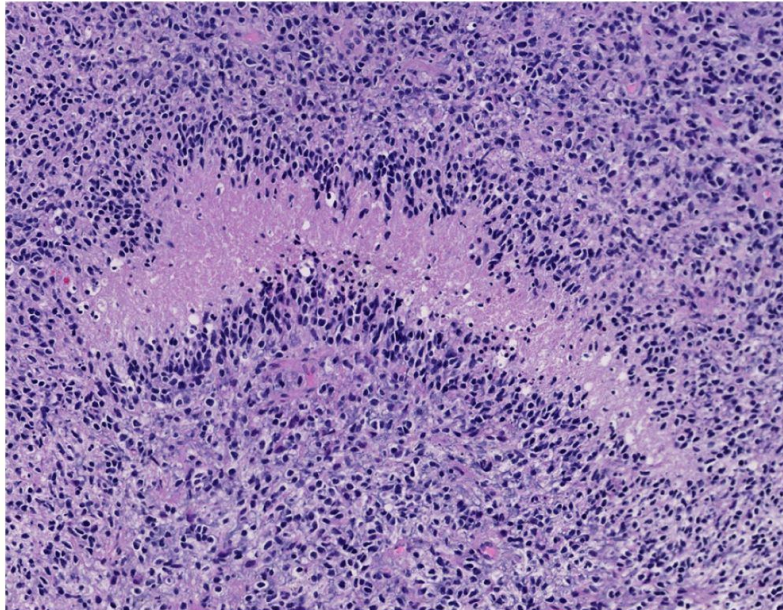


Figura 6. Pseudoempalizada. (11)

La pseudoempalizada, como se ha indicado, está formada por una ola de células tumorales que migran moviéndose desde el área central de hipoxia. Las células que forman la pseudoempalizada son menos proliferativas que las que están en el resto del astrocitoma. (5)

Los mecanismos que se encuentran detrás de esta migración celular inducida por hipoxia no se saben con total certeza, pero una de las hipótesis más respaldadas es que, cuando los vasos sanguíneos dentro del neoplasma se ocluyen o colapsan, resulta en hipoxia tumoral perivascular y comienza la migración. Una evidencia de esto es que las pseudoempalizadas suelen tener una forma alargada, estrecha y serpenteante cuando se ven desde un corte longitudinal. (5,12)

El argumento principal en contra de esta hipótesis es que no siempre se encuentra un vaso sanguíneo en el interior. De todos modos, la identificación de tales estructuras vasculares resulta prácticamente imposible debido a la extensa necrosis cercana a las pseudoempalizadas. Se encuentran vasos sanguíneos colapsados en alrededor del 50% de casos estudiados, y evidencias de trombosis en el 90%. (5,12,13)

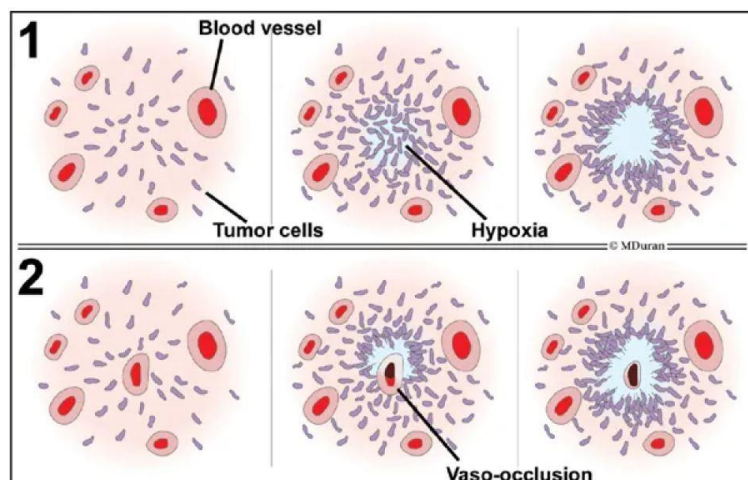
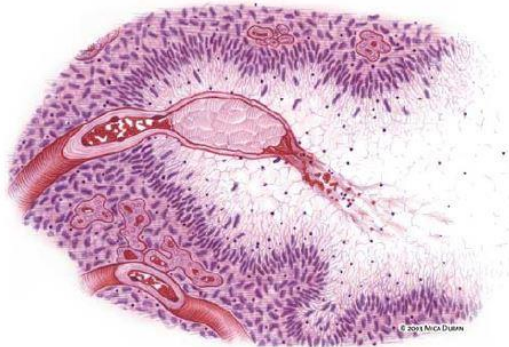


Figura 7. Proceso de formación de pseudoempalizada. (5)

La pseudoempalizada y la hiperplasia microvascular asociada, que están asociados con el crecimiento acelerado de los GBM, sigue esta secuencia hasta su formación:

- 1 – **Oclusión vascular**, normalmente asociada con trombosis intravascular.
- 2 – **Hipoxia** en regiones alrededor de la **patología vascular**.
- 3 – **Migración** de las células del glioma hacia afuera lejos de la hipoxia creando una **ola periférica en movimiento (pseudoempalizada)**.
- 4 – Muerte de las **células que no han migrado**, provocando un **núcleo necrótico** en el centro.
- 5 – **Secreción de factores proangiogénicos** solubles por las células hipóxicas de la pseudoempalizada.
- 6 – Una exuberante **respuesta angiogénica** creando **proliferación** microvascular en regiones periféricas a la hipoxia central.
- 7 – La **expansión de las células tumorales** se enfoca hacia **otra vasculatura** y se **reinicia el ciclo**.



*Figura 8. Vaso sanguíneo colapsado y avance de pseudoempalizada. (5)*

#### 1.1.4 – MODELOS IN VITRO DE GENERACIÓN DE PSEUDOEMPALIZADAS

En las líneas siguientes se esboza de forma breve, los experimentos realizados en el grupo TME Lab para la recreación de pseudoempalizadas. Una explicación más detallada puede encontrarse en distintos artículos del grupo, singularmente en (14).

Para la realización de los experimentos de laboratorio, se cultivaron células de la línea comercial U251 provenientes de glioblastoma en un chip microfluídico de COP (cyclic olefine copolymer), que es impermeable a gases y permite, por tanto, crear condiciones de hipoxia. El chip, fabricado por la empresa BeonChip SL y especialmente diseñado para la creación de gradientes, se denomina BE-Gradient. Consta de una cámara central, de dimensiones 916x2000x250  $\mu\text{m}$ , y dos microcanales laterales. Imitando vasos sanguíneos.

En los microcanales laterales se inyecta PBS oxigenado para asegurar la viabilidad celular, que se refresca cada 24 horas. Para producir el núcleo necrótico, se sembró con una muy alta densidad celular de 40M células/ml, lo que asegura que, los nutrientes, y, sobre todo el oxígeno no sea capaz de alcanzar el centro de la cámara central debido al alto consumo de oxígeno y nutrientes que se daba en las proximidades de los microcanales, provocando así la muerte de las células centrales y generando el núcleo necrótico. Para provocar la formación de la pseudoempalizada, la cámara se sembró con un número diez veces menor de células y se procede a bloquear uno de los canales, manteniendo abierto el restante. Ello da lugar a un

gradiente de oxígeno con una región hipóxica próxima al canal bloqueado y otra bien oxigenada cercana al otro canal, lo que obliga a las células en la zona hipóxica a migrar en la dirección del gradiente de oxígeno, de forma que, una vez alcanzada por las células, y con el diseño del chip que impide que tales células escapen por el canal abierto, hace que estas comiencen a proliferar y sobre todo a aumentar considerablemente la densidad celular en esa zona por la migración y la proliferación. (14) (véase la figura siguiente).

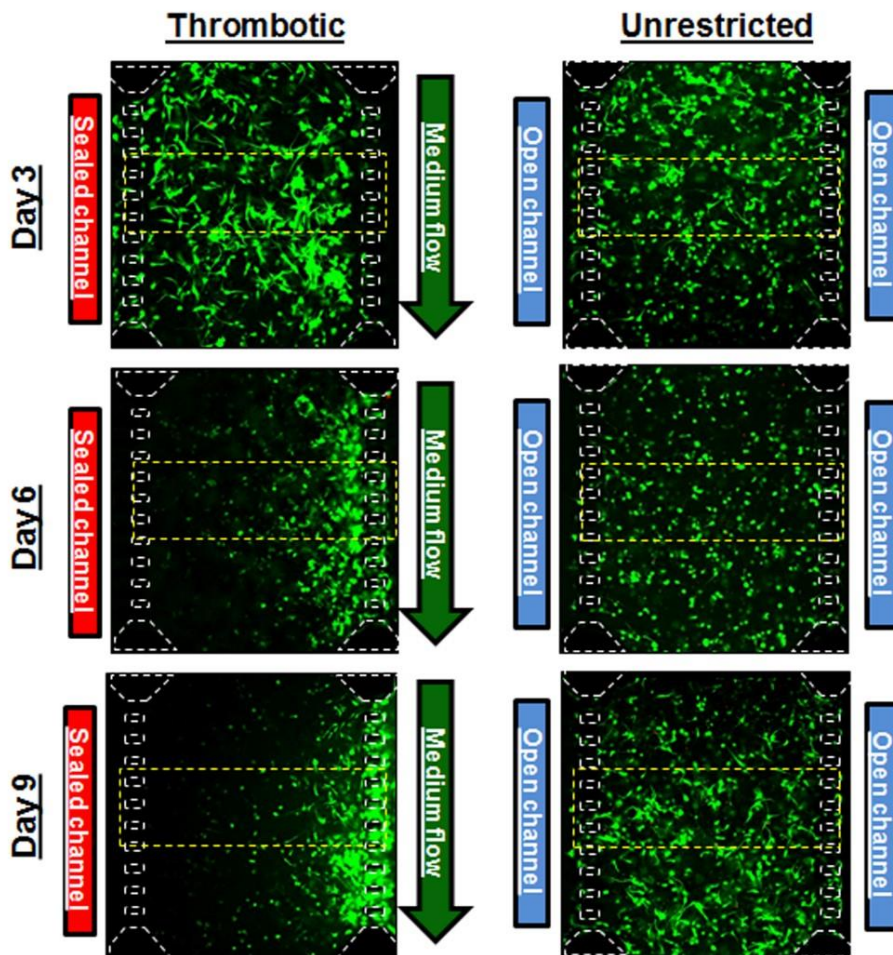


Figura 9. Movimiento de las células según cuantos canales abiertos tienen. (14)

### 1.1.5 – MODELOS CONTINUOS PARA LA SIMULACIÓN DEL PROCESO DE GENERACIÓN DE PSEUDOEMPALIZADAS

La formación de la pseudoempalizada también se ha estudiado en el grupo TME Lab mediante simulaciones utilizando modelos continuos (formulados con ecuaciones diferenciales en derivadas parciales de variables continuas como la concentración de oxígeno o de células).

De hecho, en el estudio con el que se compara este trabajo, se trató el problema como unidimensional, considerando que la variación en las distintas variables a lo largo de la dirección de los canales era despreciable frente a la variación en la dirección del gradiente, al menos en las partes centrales del microchip. En esta simulación, cuyos detalles pueden encontrarse en (14), se consideraron dos tipos celulares (vivas y muertas) que interactúan con el oxígeno, que actúa como agente regulador del proceso. Esto no quiere decir que todas las células proliferen o migren por igual, puesto que estos procesos dependen en las condiciones particulares del entorno que las rodea, pero todas las células responderán del mismo modo cuando se vean sometidas a las mismas condiciones de entorno. El hecho de asumir un solo fenotipo para todas



las células vivas conlleva menos parámetros y una más fácil interpretación de los resultados, con una calibración más fácil y menos incertidumbre. (14)

## 1.2 – MODELOS MATEMÁTICOS Y SOFTWARE UTILIZADO

### 1.2.1 – TIPOS DE MODELOS

Los modelos matemáticos operan a distintas escalas y se basan en datos experimentales existentes. Estos modelos se utilizan para llevar a cabo simulaciones con el fin de sugerir hipótesis nuevas más avanzadas para los estudios experimentales y apuntar a nuevas líneas de investigación que faciliten una mejor comprensión del GBM y aporten un nuevo objetivo al que apuntar y atacar en la lucha contra el cáncer. (14) Uno de los problemas que conciernen a los investigadores es el descubrimiento de bioindicadores para una detección temprana del GBM. (1)

Según el nivel de dificultad y a la cantidad de tiempo que conlleva llevar a cabo experimentos de laboratorio *in vivo/in vitro*, la comunidad científica ha desarrollado una variedad de simulaciones basadas en diferentes modelos matemáticos para analizar potenciales factores que afecten de distintas maneras a la expansión del GBM y en qué grado afecta cada uno de ellos. (1). Existen distintos tipos de modelos matemáticos utilizados en el campo de la investigación en Biología: modelos discretos, continuos, de agentes, etc.

Algunos de los modelos más empleados en el estudio del glioma se centran en estudiar:

- La migración celular invasiva: Se estudia la adhesión entre células y la migración bajo condiciones hipóxicas y normóxicas, además, algunos modelos analizan la migración haptotáctica y quimiotáctica mientras permiten el cálculo de la velocidad del frente invasivo. Se intenta indicar la relación que puede tener la hipoxia con la invasión celular. (1)
- La plasticidad fenotípica: Hasta ahora la mayoría de modelos matemáticos se han centrado en la [hipótesis de plasticidad go-or-grow](#). Es un desafío apuntar a otros tipos de plasticidad fenotípica y analizar implicaciones para la invasión en modelos matemáticos en el futuro. (14)
- La morfología infiltrativa: Está documentado que las características morfológicas están relacionadas con el carácter de invasión y agresividad del glioma. Los modelos matemáticos a menudo utilizan datos de experimentos con esferoides multicelulares. Con modelos matemáticos se ha mostrado por qué pseudoempalizadas alrededor de regiones de cáncer con necrosis y con hipoxia permiten predecir el comportamiento invasivo. (8,14)
- La progresión maligna: Los resultados de estos experimentos indican la importancia del papel del microambiente, por ejemplo, un entorno de hipoxia, cómo afecta a la progresión maligna. Otro ejemplo indica cómo la progresión puede ser resultado solamente del incremento de la ratio de proliferación celular. Hasta ahora, estos modelos no han considerado mutaciones genéticas. (1)

De todos modos, muchos otros aspectos relacionados con la invasión del glioma todavía no han sido descubiertos, por lo que el campo de la investigación sigue siendo muy importante, al igual que en todas las ramas de la oncología, para seguir avanzando en el desarrollo de la medicina personalizada para cada paciente. (1,8)

### 1.2.2 – MODELADO BASADO EN AGENTES

El modelado basado en agentes (MBA) es un marco que estudia cómo la conducta de cada individuo condiciona la evolución de un sistema. Consta de un entorno, unos agentes que habitan el entorno y unas condiciones de comportamiento del agente en relación a otros agentes y a su interacción con el entorno. (15)

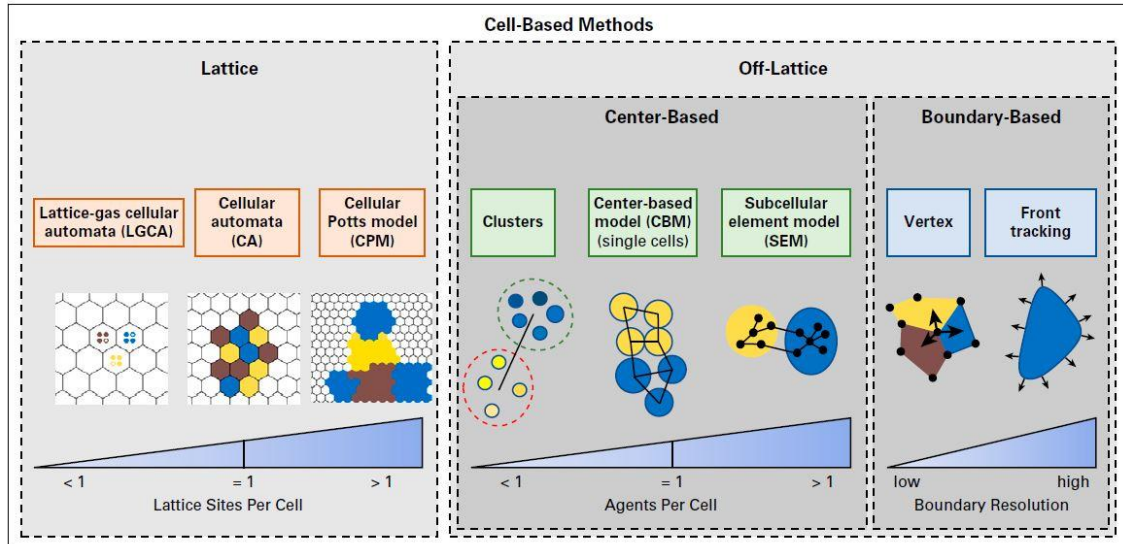


Figura 10. Clasificación esquemática de los tipos de modelos de agentes. (8)

Un agente es la unidad más pequeña, indivisible, del estudio, por ejemplo, si el estudio se hace sobre una población de personas, el agente es una persona; si el estudio se hace sobre un conjunto de células, como este caso, cada célula es un agente.

Al utilizar el modelado basado en agentes se obtiene información más detallada sobre lo que le ocurre a cada célula que si se utilizara modelado continuo. En este último se trabaja con concentraciones celulares, por lo que el comportamiento es el promediado de una subpoblación de tamaño suficiente dentro de un elemento de volumen representativo, típico de la escala del modelo contemplado. Por el contrario, con los MBA se obtienen resultados sobre lo que le ocurre a cada agente, y se tiene en cuenta leyes de comportamientos individuales, permitiendo un control más fino, y, sobre todo, modelos basados en mecanismos biológicos celulares más precisos. (15)

Cada agente responde de manera individual a las interacciones con el entorno y con el resto de agentes, estableciendo así una secuencia de acciones en el tiempo. Cuando cada agente toma una “decisión”, lleva a cabo una acción y el entorno cambia. Estas modificaciones continuas se van sucediendo hasta que se alcanza un estado de equilibrio en el cual se genera un patrón de comportamiento que ya no varía. Los agentes pueden adaptarse, aprender y cambiar sus acciones con el tiempo. (15)

En modelos continuos ya se han conseguido simulaciones con un alto grado de fidelidad en relación a experimentos realizados *in vivo/in vitro*, por lo que son aptas para complementar a estos ensayos de laboratorio, al ser mucho más rápidas, flexibles y baratas. En este trabajo se intenta lograr el mismo resultado alcanzado ya con modelos continuos, pero utilizando modelado basado en agentes. (11,14,15)

### 1.2.3 – PHYSICELL

Muchos problemas de sistemas multicelulares solo se pueden entender estudiando cómo las células se mueven, crecen, se dividen, interactúan y mueren. Las dinámicas a nivel tisular emergen de sistemas con varias células interactuando, respondiendo y siendo influenciadas por el microambiente en el que están. El laboratorio virtual ideal para tales sistemas multicelulares simula ambos agentes necesarios: el ambiente bioquímico (el escenario) y varias interacciones celulares, interacciones mecánicas y bioquímicas (los jugadores en el escenario). (16)

PhysiCell es una librería para la simulación basada en agentes. Es de código abierto. Proporciona ambos escenario y agentes para estudiar las varias interacciones celulares en el microambiente del tejido dinámico. (16)

PhysiCell incluye submodelos basados en mecanismos biológicos celulares bien conocidos, apoptosis, necrosis, proliferación, migración, diferenciación, cambios de volumen sólido y fluido, mecánicas y movilidad. (16)

Simulaciones del orden de  $10^5$ - $10^6$  células son fácilmente alcanzables con ordenadores de sobremesa de gama media accesibles a nivel usuario. Simulaciones con más componentes son posibles en ordenadores más potentes. (16)

PhysiCell trabaja con distintas escalas de tiempo. Cada vez que transcurre uno de esos tiempos característicos, se recalcula qué les ocurre a las células, que acciones han sufrido, cuáles han sido sus reacciones, cómo está el grupo en conjunto como consecuencia de las reacciones de los individuos, etc. (16)

También es posible incorporar la evolución de biotransporte difusivo, y la mecánica de las células, es decir, sobre el fenotipo de las células.(16)

Como se ha indicado, PhysiCell trabaja con distintas escalas temporales desacopladas (interacción temporal débil).

Ello es debido a que el biotransporte difusivo ocurre a escalas de tiempo relativamente rápidas si se compara con la mecánica de las células y mucho más rápido, si se compara con los procesos celulares, que son quasi-estáticos en relación a dicho transporte. (16)

La configuración de las simulaciones se define en un fichero XML con el siguiente enlace:

**Carpeta en la que se tiene instalado PhysiCell > Carpeta bajo el nombre de PhysiCell > sample\_projects > template > config > PhysiCell\_settings.xml**

En dicho archivo XML se pueden modificar todos los parámetros necesarios para llevar a cabo las distintas simulaciones. Los valores asignados a los tiempos característicos anteriormente comentados se han establecido en PhysiCell basándose en distintas hipótesis y resultados experimentales. Son los valores óptimos para conseguir simulaciones con resultados coherentes y conviene que el usuario no los modifique. Los parámetros que sí se pueden y deben editar son: dominio de la simulación (tamaño del chip), periodo de tiempo real a simular, condiciones iniciales, condiciones de contorno, el consumo de oxígeno por célula y el número de células. Además, puede indicarse si las células tienen libertad para moverse (migrar) o no, también si, en caso de que se puedan mover, deben moverse según el oxígeno o no y, en caso de moverse según el oxígeno, puede asignárseles si deben moverse huyendo del oxígeno o moviéndose hacia él.

Para mayor detalle sobre el código del archivo XML se puede consultar el [anexo I](#).

#### 1.2.4 – QT

QT es una aplicación de desarrollo de software multiplataforma. QT no es un código de programación como tal, es un espacio de trabajo que acepta distintos lenguajes. En este caso se ha trabajado en C++. Se utiliza para compilar el código y ejecutar el programa. (17)

QT es el programa en el que se cambian las condiciones de operación del software, como por ejemplo, cada cuanto debe incrementarse el tiempo, cada cuanto hacer una captura de pantalla de cómo va la simulación, etc. Es donde se debe escribir la ruta a seguir para guardar el resultado de la simulación, etc.

Es el espacio de trabajo que permite trabajar con PhysiCell y poder implementar la tremenda galería de recursos y de datos físicos con los que cuenta.

#### Cómo utilizar Qt para realizar las simulaciones:

Antes de comenzar con la explicación es importante recalcar que, cada vez que se corre el código para realizar una simulación distinta hay que tener cuidado de cambiar el nombre de dónde se van a guardar los resultados, porque si no estarías continuamente sobrescribiendo los resultados.

Para ejecutar el código de PhysiCell desde Qt se detallan a continuación los pasos a seguir:

**Abrir Qt > File > Open Project > Carpeta donde está guardado PhysiCell en el PC del usuario > Carpeta PhysiCell > PhysiCell.pro**

El código está escrito en C++. Al abrir el archivo PhysiCell.pro se abre la pestaña Edit de Qt, ahí a la izquierda de la pantalla aparece una carpeta llamada *PhysiCell*, se despliega y aparece un archivo y 2 carpetas:

- *PhysiCell.pro*

- *Headers*

- *Sources*

Se despliega la carpeta *Sources* y aparecen una carpeta y un archivo llamado **main.cpp**. Dicho archivo es en el que hay que indicar el nombre de la simulación a realizar, si no, se sobrescribirían los datos cada vez que se realizara una simulación distinta. El archivo que hay que editar para realizar distintas simulaciones es el archivo **custom.cpp**.

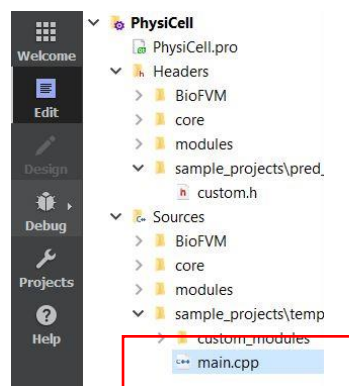


Figura 11. Captura de pantalla de Qt indicando con un rectángulo rojo cual es el archivo a editar.

### 1.2.5 – MATLAB

Matlab es una plataforma de programación y cálculo numérico utilizada por millones de ingenieros y científicos para analizar datos, desarrollar algoritmos y crear modelos. (18)

En este trabajo se ha utilizado Matlab para representar en gráficas la concentración de células frente a la longitud del chip en distintos momentos de la formación de la pseudoempalizada y, también, la concentración celular en la pseudoempalizada una vez acabada la simulación diferenciando entre células vivas y muertas.

Se ha hecho con el fin de comparar los resultados obtenidos de la simulación utilizando modelado basado en agentes con los resultados de otros experimentos realizados con modelos continuos o experimentos in vitro o in vivo en el laboratorio. (14,19,20)

Se puede consultar el código aquí implementado en, el [anexo II](#).

## 1.3 – ECUACIONES E HIPÓTESIS CONSIDERADAS

### 1.3.1 – ECUACIÓN DE DIFUSIÓN

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \mathbf{D} \circ \nabla^2 \rho - \lambda \circ \rho + \sum_i \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i) \left[ V_i \mathbf{S}_i \circ (\rho_i^* - \rho) - V_i \mathbf{U}_i \circ \rho + \mathbf{E}_i \right]$$

Symbol	Meaning	Dimensions
$\rho$	vector of substrate densities (or concentrations)	substance/volume
$\mathbf{D}$	vector of diffusion coefficients	length <sup>2</sup> /time
$\lambda$	vector of decay rates	1/time
$V_i$	volume of cell $i$	volume
$\mathbf{x}_i$	cell $i$ 's position (center)	length
$\mathbf{S}_i$	vector of cell $i$ 's secretion rates	1/time
$\rho_i^*$	vector of cell $i$ 's secretion saturations	substance/volume
$\mathbf{U}_i$	vector of cell $i$ 's uptake rates	1/time
$\mathbf{E}_i$	vector of cell $i$ 's net export rates	substance/time

Figura 12. Significado de los componentes de la ecuación de difusión. (21)

En el código C++ del archivo XML de PhysiCell se puede variar el valor de los distintos parámetros de la ecuación de difusión. A continuación, se va a explicar el significado de algunos de ellos.

-  $\mathbf{D}$ : Coeficiente de difusión.

Técnicamente es la facilidad con la que el soluto se mueve en un disolvente, es decir, es la facilidad con la que el oxígeno se filtra entre los agentes. (21)

-  $\rho$ : Densidad del oxígeno.

-  $\lambda$ : Decay rate: velocidad de decadencia del oxígeno (va disminuyendo la concentración//densidad). (21)

En este trabajo se utiliza un valor de  $\lambda=0$ , porque el oxígeno no se degrada en estos ensayos.

A este parámetro habría que darle un valor distinto de 0 si se estuviera trabajando con una sustancia que se degrada de forma progresiva.

-  $\delta$ : Delta de Kronecker.

Es una función (en realidad una distribución) de dos variables, cuyo resultado puede tomar 2 valores,  $\delta=1$  si sus variables son iguales y  $\delta=0$  si sus variables son distintas. (22)

Consumo celular es la cantidad de oxígeno que consume una célula. (21)

En este trabajo dicho valor no se ha variado para ninguna simulación porque el valor que tiene asignado de manera predeterminada ha sido calculado y escogido por los desarrolladores de PhysiCell basándose en experimentos de laboratorio y datos conocidos de la comunidad científica.

-  $\mathbf{E}_i$ : Vector de exportaciones netas.

### 1.3.2 – VOLUMEN CELULAR

PhysiCell es un modelo basado en la posición celular (center-based model), donde las células se modelan como esferas cuyo volumen varía con el tiempo dependiendo de los estímulos externos. (21)

### 1.3.3 – REPRESENTACIÓN GENERAL DEL MODELO DE CICLO CELULAR

En PhysiCell, el modelo de ciclo celular se representa por un conjunto de fases y ratios de transición entre una fase y otra. Cada modelo de ciclo celular se define mediante un conjunto de instrucciones sobre la división celular. En algunas de estas fases se modifica el volumen celular o parte de él y en otras no. (21)

Cada fase se representa con un color diferente. (23)

La fase inicial se llama primer intervalo y se representa en color azul (G1), esta fase es donde la célula crece y genera los componentes moleculares que necesitará posteriormente. (23)

A continuación, pasa a morada (S). En la fase S la célula sintetiza una copia completa de su ADN en su núcleo y duplica una estructura de organización llamada centrosoma, que ayuda a separar el ADN durante la mitosis. (23)

Seguidamente viene la fase G2, representada en color amarillo mostaza (G2), esta fase se conoce como segundo intervalo y aquí la célula crece más y comienza a reorganizar su contenido en preparación para la mitosis, que empieza cuando G2 acaba. (23)

El conjunto de estas 3 fases se conoce como interfase, es lo que ocurre entre una fase mitótica y la siguiente. (23)

Y, por último, la fase M, que incluye mitosis y citocinesis, representada en verde (M). La célula divide su ADN duplicado y su citoplasma para hacer dos nuevas células. En la mitosis el ADN nuclear de la célula se condensa en cromosomas visibles y se separa. En la citocinesis, el citoplasma de la célula se divide en dos, lo que forma dos nuevas células. La citocinesis comienza en cuanto acaba la mitosis. (23)

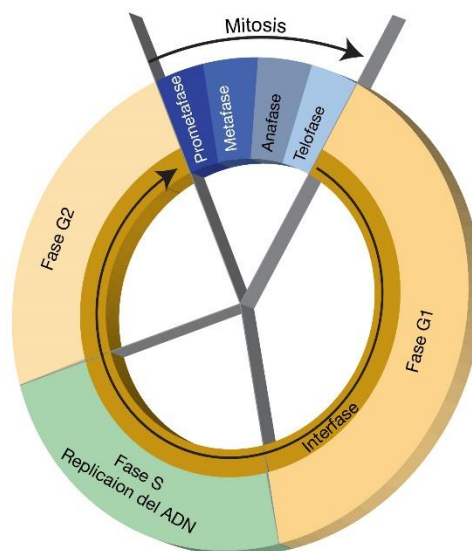


Figura 13. Ciclo celular. (24)

El tiempo que dura cada fase está determinado por los desarrolladores de PhysiCell. Se han ajustado los tiempos que dura cada fase basándose en experimentos de laboratorio y datos científicos (21), para lograr que los tiempos del ciclo celular consigan unos resultados fidedignos y los resultados de la simulación muestren los mismos fenómenos que los experimentos reales



del laboratorio. Estos tiempos se pueden cambiar manualmente en el archivo XML de PhysiCell para configurar la simulación, pero es recomendable no hacerlo.

#### 1.3.4 – MIGRACIÓN CELULAR

Las células se mueven en respuesta a distintos estímulos (químicos, mecánicos, térmicos, eléctricos, etc). Ese movimiento está representado a través de una fuerza  $\mathbf{F}_{loc}$  en la ecuación de equilibrio (21), pero para este trabajo, el estudio de las fuerzas no nos interesa, así que se remarca con un rectángulo en la ecuación cual es la expresión correspondiente a la migración de las células.

$$\mathbf{F}_{loc} = s_{loc} \mathbf{u}_{loc} = s_{loc} \frac{b \mathbf{d}_{bias} + \xi(1-b)}{\|b \mathbf{d}_{bias} + \xi(1-b)\|}$$

Para  $b = 0$  el movimiento es totalmente aleatorio, y para  $b = 1$  totalmente determinista y sesgado (en la dirección que indique  $\mathbf{d}_{bias}$ ). Por otro lado,  $\xi$  es un vector unitario con dirección aleatoria, mientras que el parámetro  $s_{loc}$  identifica la velocidad de migración que puede imponer el usuario, pero no la velocidad celular real si existen otras fuerzas además de  $\mathbf{F}_{loc}$ . (21)

#### 1.3.5 – HIPÓTESIS GO-OR-GROW

La hipótesis “Go-or-grow” defiende que las células solo pueden llevar a cabo una de las dos acciones: migración o proliferación. Es decir, que durante la migración la proliferación es muy baja o inexistente y viceversa. (1)

Cuando la célula está migrando, migra hacia un área con nutrientes y oxígeno, en el caso del GBM normalmente migran hacia los alrededores de un vaso sanguíneo, migra buscando su supervivencia. Y cuando migra no prolifera o lo hace muy poco. (1,5)

En el momento en el que la célula alcanza dicho lugar con oxígeno, para de migrar, ha alcanzado una zona con las condiciones óptimas para comenzar el ciclo celular y no hay ningún motivo para que se siga moviendo. (1)

Su fenotipo cambia de migración a proliferación. La célula se encuentra con las condiciones óptimas para proliferar y una vez comience, no parará de proliferar hasta que ya no se den las condiciones óptimas en dicha localización. (1)

Por ejemplo, hasta que un trombo en el vaso sanguíneo provoque un corte en el suministro de oxígeno, o hasta que el número de células sea demasiado grande y no se puedan satisfacer las necesidades de oxígeno y nutrientes de todas, generándose así una región hipóxica. (5)

En ese momento las células tendrán que irse de ahí para sobrevivir, para evitar entrar en necrosis. Entonces su fenotipo vuelve a cambiar, de proliferación a migración. Y así continuamente. (1)

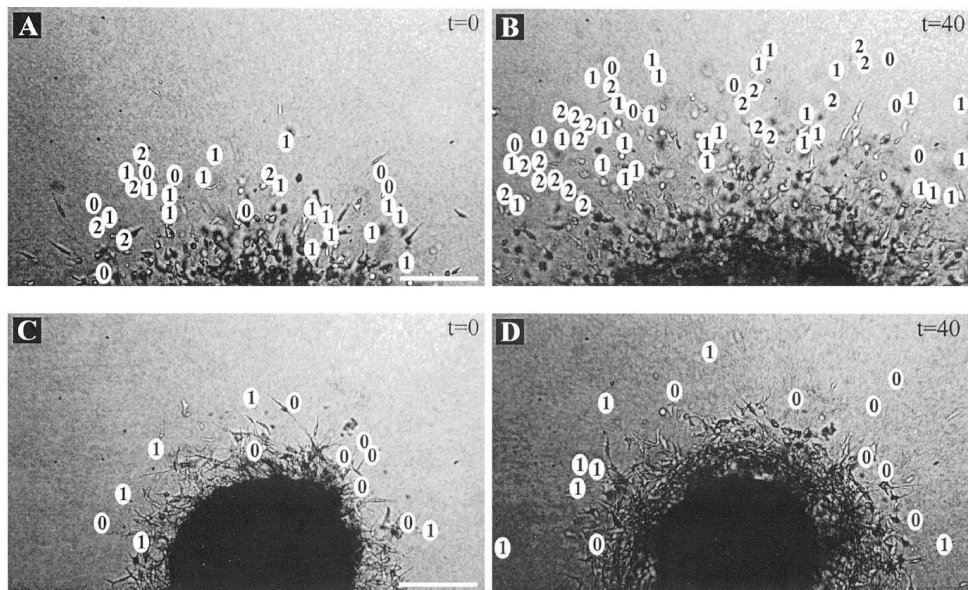


Figura 14. Instantáneas extraídas de experimentos *in vitro*, los números representan el número de veces que se han dividido las respectivas células en 40 horas. (25)

## 2 – EXPLICACIÓN DE LAS SIMULACIONES

Antes de entrar a hablar de los distintos tipos de simulaciones a realizar, se van a comentar unos conceptos generales que es importante dejar claros.

Lo primero que se configura en el programa es el dominio, es decir, las dimensiones que tiene el microchip en el que se realiza el experimento. Se acordó con mi tutora un tamaño de 500x800  $\mu\text{m}$ . Las dimensiones originales de PhysiCell para el chip eran mayores, nosotros optamos por reducirlo para que las células llegaran antes a los bordes del chip, así las simulaciones podían hacerse de menos días y disminuir el tiempo de computación de las simulaciones. Para simular la pseudoempalizada se ha utilizado un microchip de las mismas dimensiones que el experimental, 916x2000  $\mu\text{m}$ , para poder comparar ambos.

Las condiciones iniciales son también modificables. Dichas condiciones iniciales son cual es la densidad de oxígeno en los límites del microchip a la hora de iniciar la simulación.

Además de las condiciones iniciales, también son modificables las condiciones de contorno, en las que se puede establecer un valor fijo o un flujo de oxígeno en cada borde del microchip.

Tras las condiciones iniciales y de contorno se pueden modificar los tipos de célula. Hay una gran variedad registrada en PhysiCell.

### 2.1 – SIMULACIONES DE MIGRACIÓN

Existen distintos tipos de migración: aleatoria, huyendo del oxígeno y siguiendo al oxígeno.

Para llevar a cabo los distintos tipos de migración se modifica el archivo XML de PhysiCell. Este archivo permite modificar aspectos como si las células deben moverse en función del oxígeno o no, moverse a favor o en contra del oxígeno, etc.

Los tipos de migración mencionados se van a explicar con varios ejemplos a continuación.

#### 2.1.1 – MIGRACIÓN ALEATORIA

##### SIMULACIÓN 1

En la **simulación número 1** se han representado 30 células durante 2 días, asignando un **valor fijo de oxígeno de 20 mmHg por todos los lados del chip**. Se ha programado en el archivo XML de PhysiCell que las células se muevan de manera aleatoria, sin reaccionar al oxígeno.

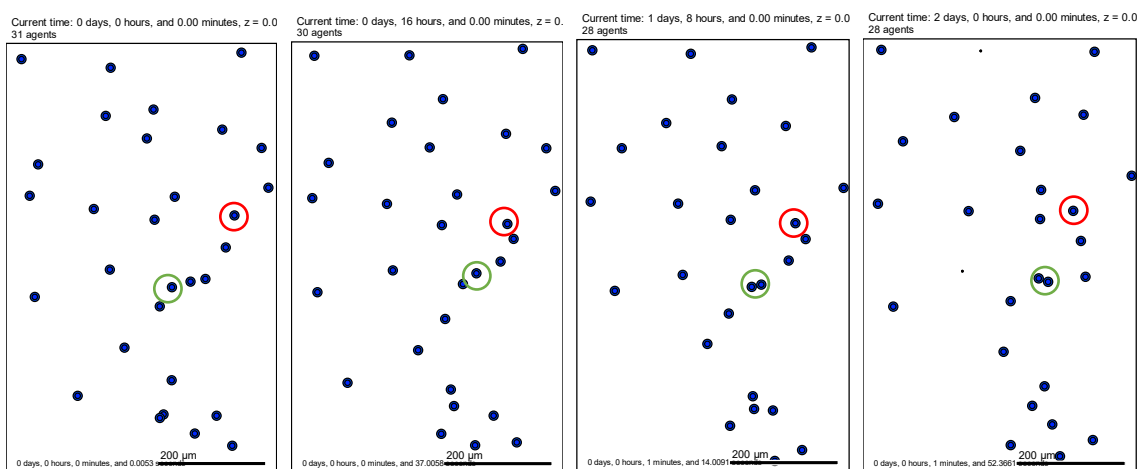


Figura 15. Simulación 1

Se han rodeado con un círculo rojo y otro verde dos células distintas para que sea más fácil seguir su desplazamiento. Cuando se tienen todas las imágenes de la simulación se observa que, cuando el movimiento es aleatorio, las células se mueven en un área reducida, van cambiando de lugar poco a poco.

La mayoría de células van migrando aleatoriamente, a excepción de alguna que otra célula que muere por apoptosis.

### SIMULACIÓN 2

En la **simulación número 2** se han representado 100 células durante 5 días, con unas **condiciones de contorno de 38 mmHg de O<sub>2</sub> por todos los lados del chip**. Se desea observar claramente el movimiento aleatorio de todas las células.

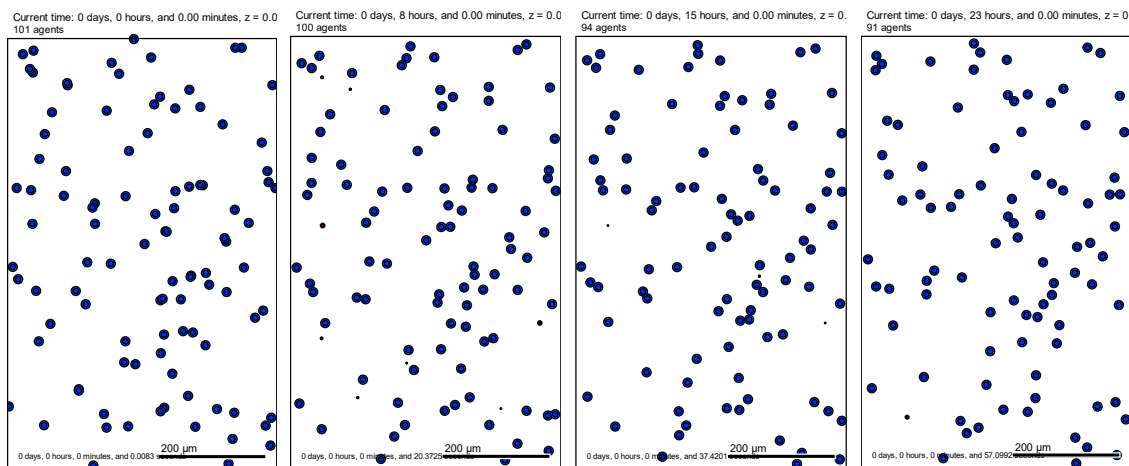


Figura 16. Simulación 2

### 2.1.2 – MIGRACIÓN HUYENDO DEL OXÍGENO

Al ordenarse que las células avancen en dirección contraria al oxígeno, lo lógico es que mueran conforme va avanzando la simulación porque se están alejando de la única fuente que les permitiría respirar.

### SIMULACIÓN 3

En la **simulación número 3** se han programado 10 células durante 2 días. Con **condiciones de contorno de 38 mmHg de O<sub>2</sub> por el lado derecho del chip**. Lo que se desea observar es que las células migren en el sentido contrario al lógico, que sigan el camino que seguirían para aproximarse al oxígeno, poder respirar y sobrevivir, pero que lo hagan en sentido contrario.

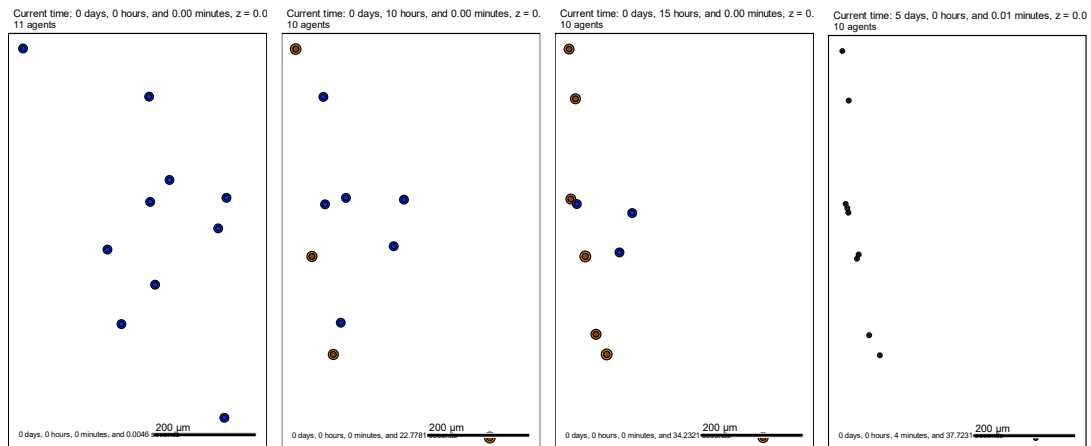


Figura 17. Simulación 3

### 2.1.3 – MIGRACIÓN SIGUIENDO EL OXÍGENO

Las células se mueven hacia el oxígeno son simulaciones más parecidas a lo observado comúnmente en el laboratorio porque las células van hacia donde hay oxígeno porque si no entran en anoxia y se mueren.

#### SIMULACIÓN 4

En la **simulación número 4** se han programado 10 células con **condiciones de contorno de 38 mmHg de O<sub>2</sub> por todos los bordes del chip**. El objetivo es ver cómo cada célula migra hacia el borde del chip más cercano.

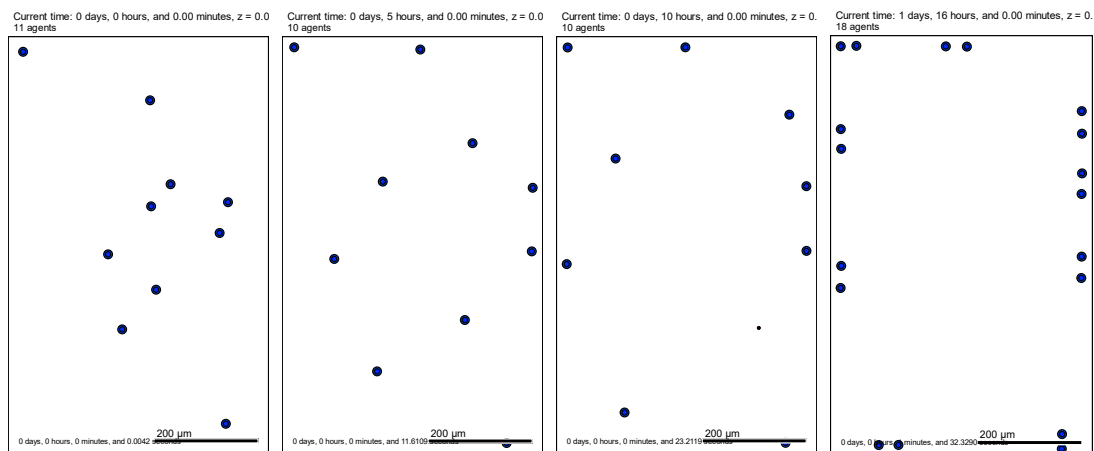


Figura 18. Simulación 4

#### SIMULACIÓN 5

En la **simulación número 5** se han repetido las mismas condiciones de contorno, pero se han simulado 100 células. Así el movimiento queda más claro.

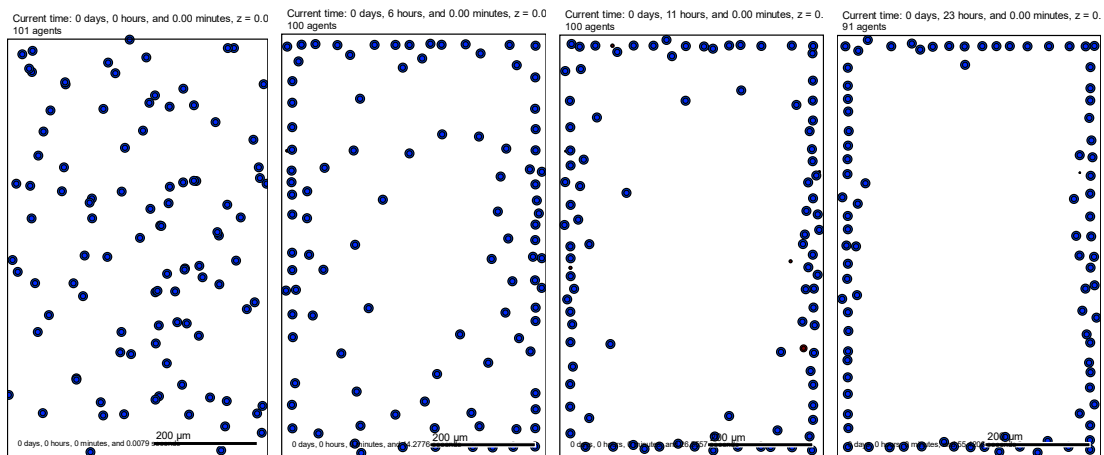


Figura 19. Simulación 5

### SIMULACIÓN 6

En la **simulación número 6** se han programado inicialmente 10 células durante 5 días con unas condiciones de contorno de **38 mmHg de O<sub>2</sub> por el borde derecho del chip**. El objetivo es observar cómo las 10 células migran hacia el borde derecho del chip, buscando el oxígeno.

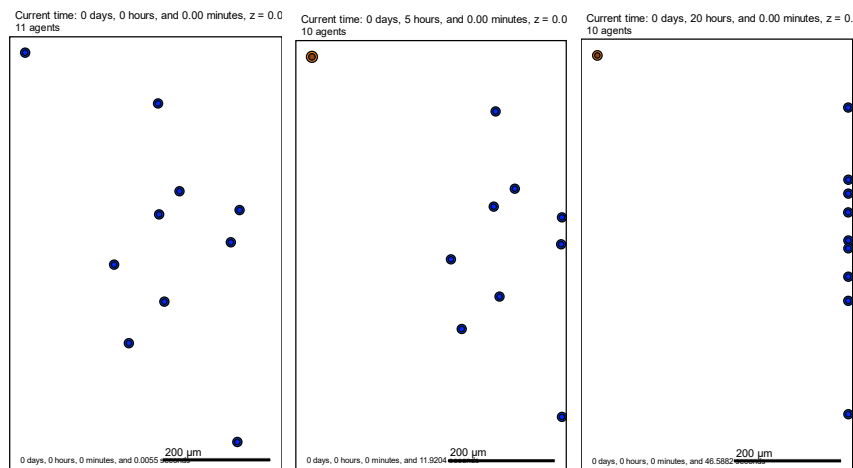


Figura 20. Simulación 6

## 2.2 – SIMULACIONES DE PROLIFERACIÓN

Para las simulaciones de proliferación, se anula en el archivo XML la posibilidad de que las células se muevan ya que nos basamos en la hipótesis go-or-grow, y en estos experimentos nos centramos en el aspecto de proliferación, por lo que no deberían moverse. Las imágenes obtenidas materializan que el programa funciona bien a la hora de simular proliferación celular.

Existen varias opciones para alterar la proliferación de las células modificando el archivo XML, una opción sería variar cuánto oxígeno hay en los bordes del chip porque, a menos oxígeno en los alrededores, menos proliferación, lógicamente. Otra opción sería modificar cuánto oxígeno consumen las células para sobrevivir, la tasa de consumo celular.

Según las estimaciones y experimentos realizados por los desarrolladores de PhysiCell, dichos valores deben tener unos valores de tasa de consumo = 6/min y condiciones de contorno de 38 mmHg para que salgan unos resultados coherentes. Si se disminuyera mucho el nivel de oxígeno en los contornos del chip, también debería disminuirse la tasa de consumo para que los resultados de las simulaciones fueran válidos. (14)

Se va a experimentar ajustando el número de células para que sea posible observar claramente los cambios de fase de las células durante el proceso de proliferación.

### SIMULACIÓN 7

En la **simulación número 7** se han programado 10 células con **condiciones de contorno de abundancia de oxígeno en los bordes, 38 mmHg O<sub>2</sub>**. El resultado esperado es que proliferen hasta que acabe la simulación, que no se forme núcleo necrótico y que no migren.

Se ve claramente el fenómeno de proliferación. Con oxígeno abundante para la supervivencia por todos los bordes del chip, las células comienzan a proliferar y no paran.

La simulación empieza con 10 células y a los 20 días se cuenta con 2542 agentes.

Entre cada foto han pasado 5 días.

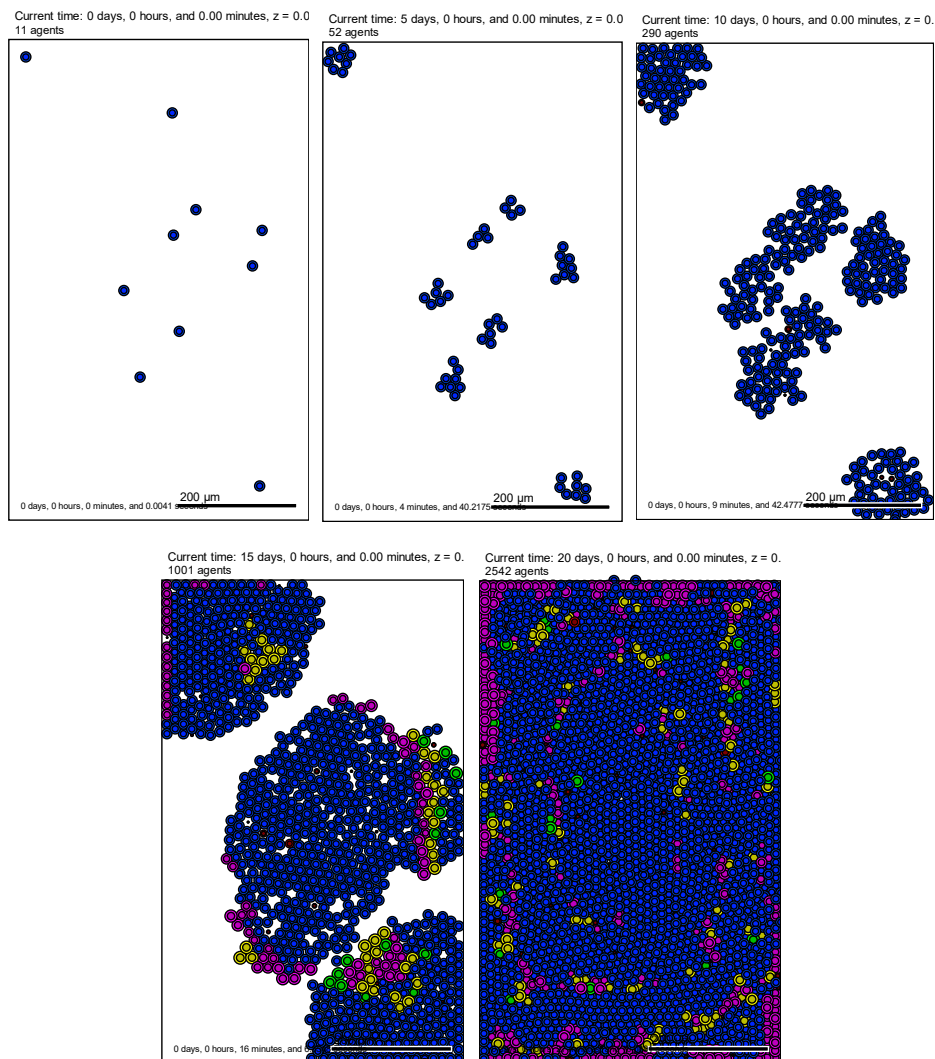


Figura 21. Simulación 7

### SIMULACIÓN 8

En la **simulación número 8** se han programado 500 células con **el nivel original de oxígeno en los bordes, 38 mmHg**. La simulación dura 5 días.

Se comienza la simulación con 501 agentes y transcurridos los 5 días hay 1538 células.

Se ve claramente el cambio de fase de las células durante la proliferación.

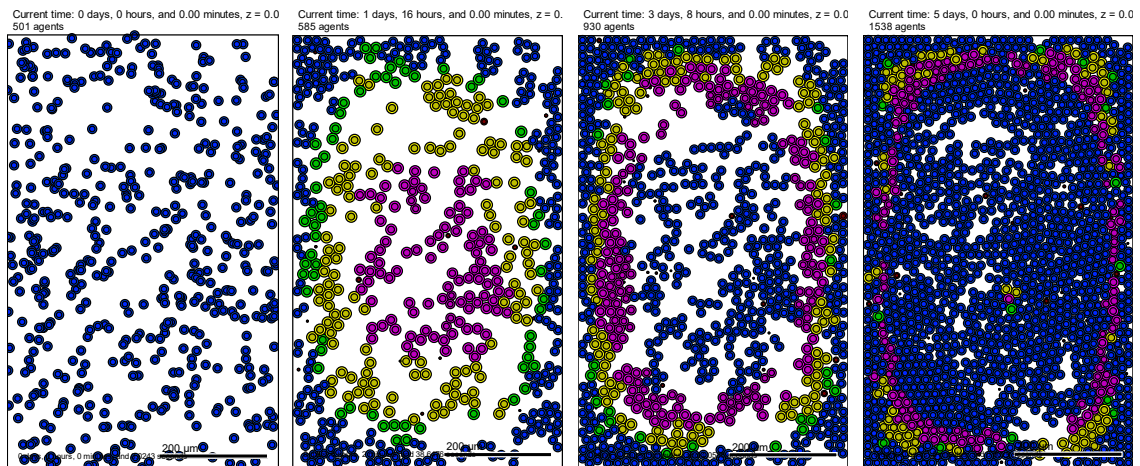


Figura 22. Simulación 8

## 2.3 – SIMULACIONES DE PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN

### 2.3.1 – MIGRACIÓN ALEATORIA SIN SEGUIR EL OXÍGENO

#### SIMULACIÓN 9

En la **simulación número 9** se han representado 500 células durante 2 días, asignando un **valor fijo de oxígeno de 38 mmHg por el lado derecho del chip**. A los agentes se les asignó un patrón de movimiento aleatorio.

Como se produce migración de algunas células, proliferación de otras y algunas células mueren por necrosis al comienzo y por apoptosis durante la simulación, el número de células inicial es distinto del final.

Al principio se contaba con 500 agentes y al final de la simulación con 509, tras perder agentes a mitad simulación, ya que se contaba con 475 células.

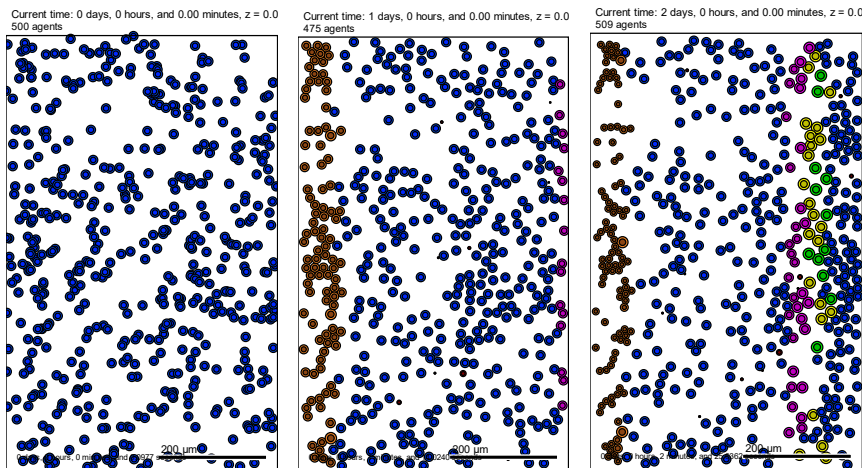


Figura 23. Simulación 9

### 2.3.2 – MIGRACIÓN DIRIGIDA SIGUIENDO EL OXÍGENO

#### SIMULACIÓN 10

En la **simulación número 10** se han programado 1000 células inicialmente y se ha simulado un tiempo equivalente a 5 días. Se ha fijado un **valor de 38 mmHg de O<sub>2</sub> por los bordes izquierdo, inferior y derecho del chip**.



Las células migran hacia el oxígeno y luego proliferan. La simulación comienza con 1000 agentes y termina con más de 2900.

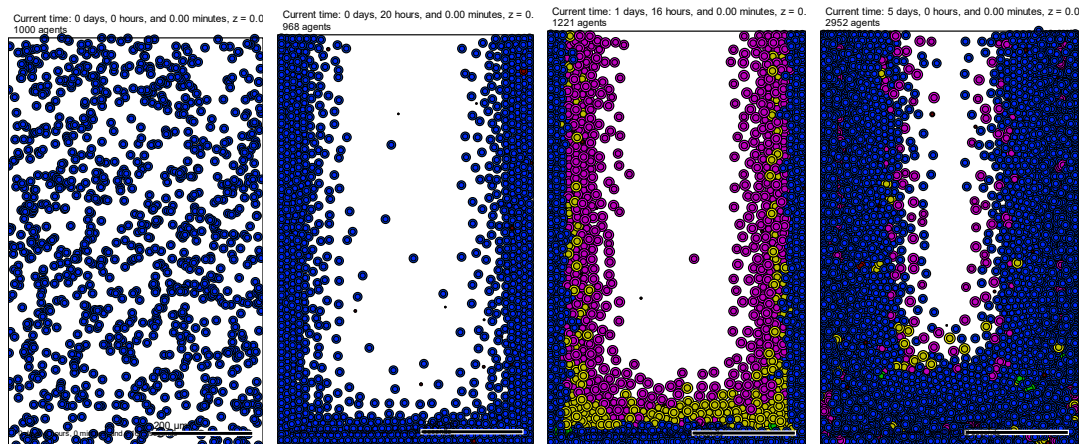


Figura 24. Simulación 10

### SIMULACIÓN 11

En la **simulación número 11** se han programado inicialmente 1000 células durante 5 días, con unas condiciones de contorno de 38 mmHg de  $O_2$  en el lado inferior del chip.

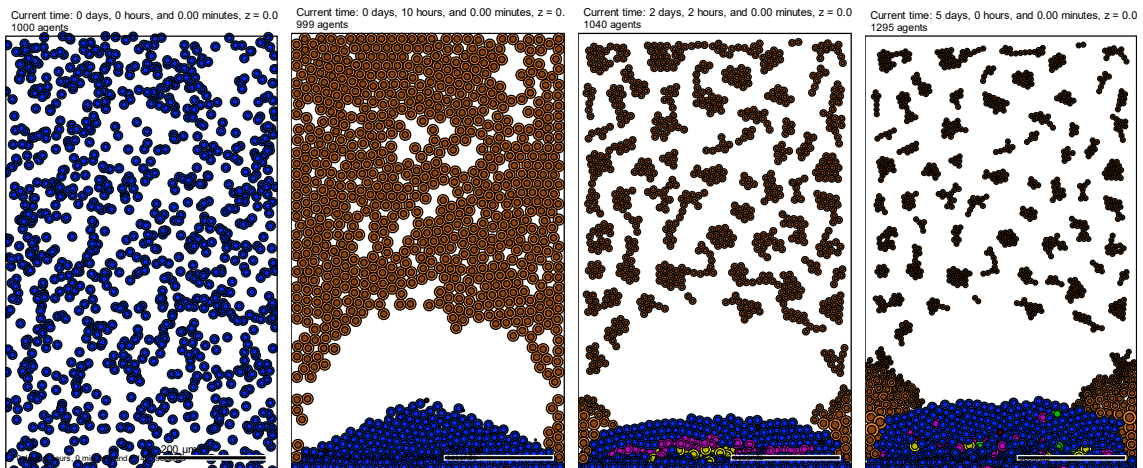


Figura 25. Simulación 11

## 2.4 – SIMULACIÓN DE FORMACIÓN DE LA PSEUDOEMPALIZADA

### SIMULACIÓN 12

En la **simulación número 12** se han programado inicialmente 5000 células durante 5 días con un valor fijo de 70 mmHg de O<sub>2</sub> por el borde derecho del chip.

El objetivo es observar todas las zonas de una pseudoempalizada y su proceso de formación.

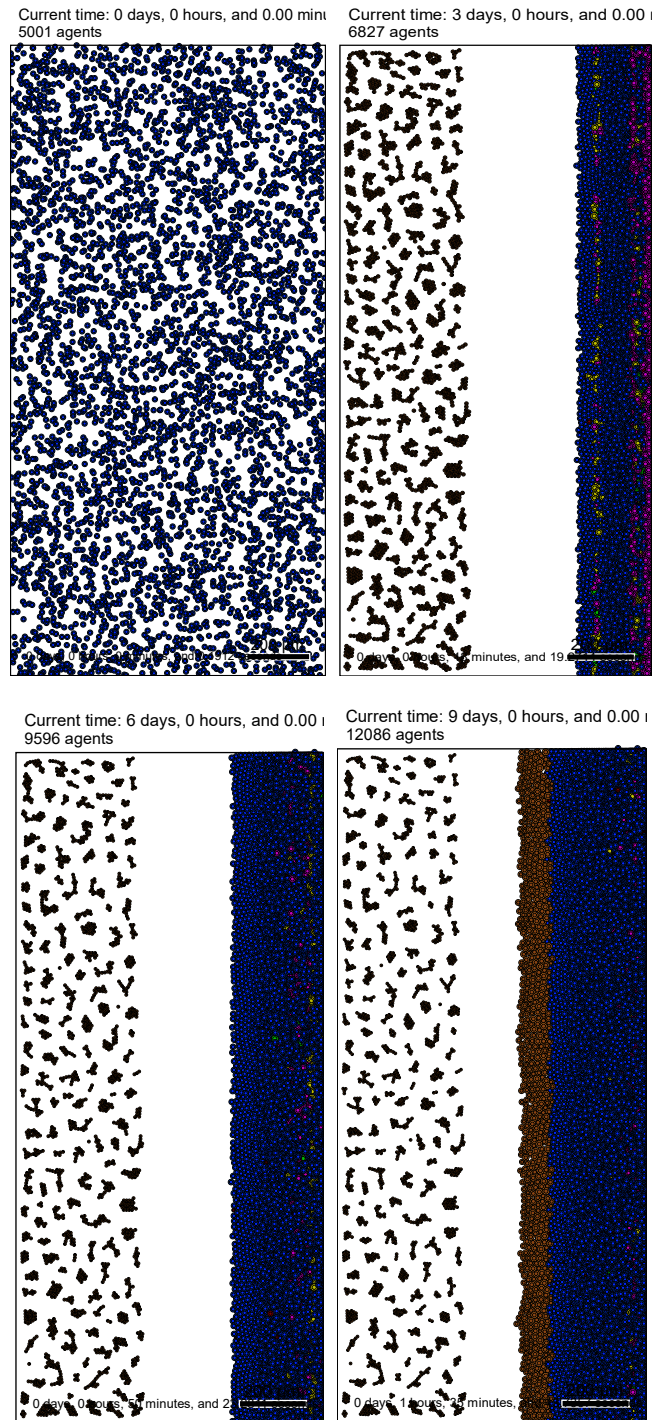


Figura 26. Simulación 12

## 2.5 – ANÁLISIS PARAMÉTRICO

Se procede a realizar un análisis paramétrico sobre la simulación de la pseudoempalizada.

Es decir, se varía el valor de distintos parámetros con los que se logra la simulación exacta de la pseudoempalizada, para ver cómo la variación de estos valores afecta al resultado final de la simulación.

### 2.5.1 – VARIACIÓN DEL OXÍGENO

Las simulaciones de variación de oxígeno se hacen con la tasa de consumo fijada en 6.

#### 20 mmHg O<sub>2</sub>

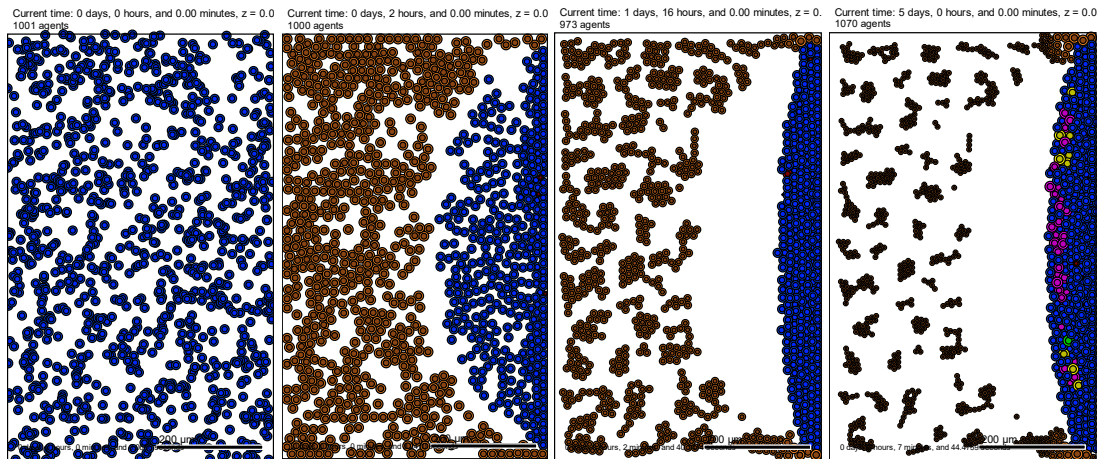


Figura 27. Simulación de pseudoempalizada con menos oxígeno

#### 38 mmHg O<sub>2</sub>

Realizar esta simulación sería llevar a cabo otra vez la [simulación 12](#).

#### 50 mmHg O<sub>2</sub>

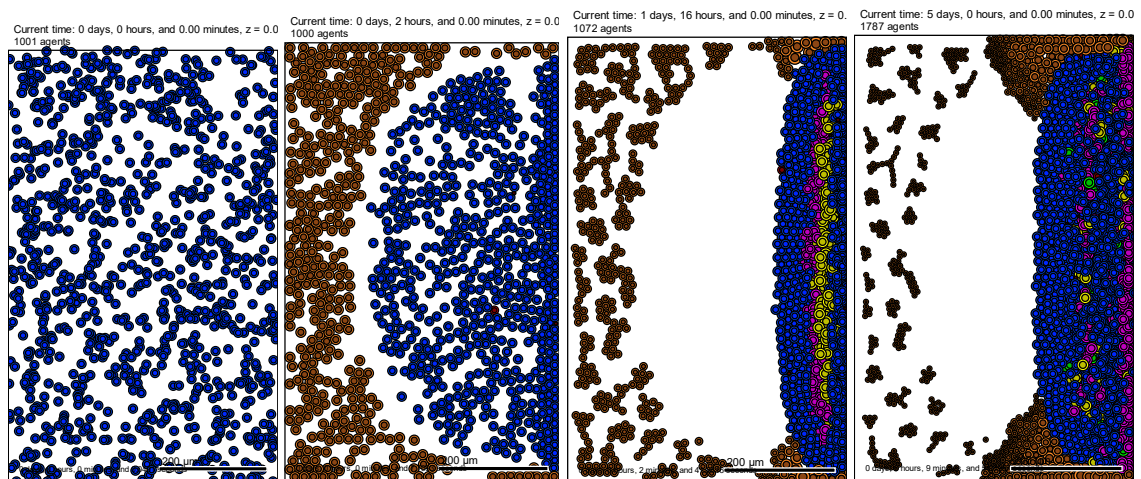


Figura 28. Simulación de la pseudoempalizada con oxígeno de más

### 2.5.2 – VARIACIÓN DE LA TASA DE CONSUMO

Las simulaciones de variación de la tasa de consumo se hacen con el oxígeno fijado en 38 mmHg O<sub>2</sub>

*Tasa de consumo = 2*

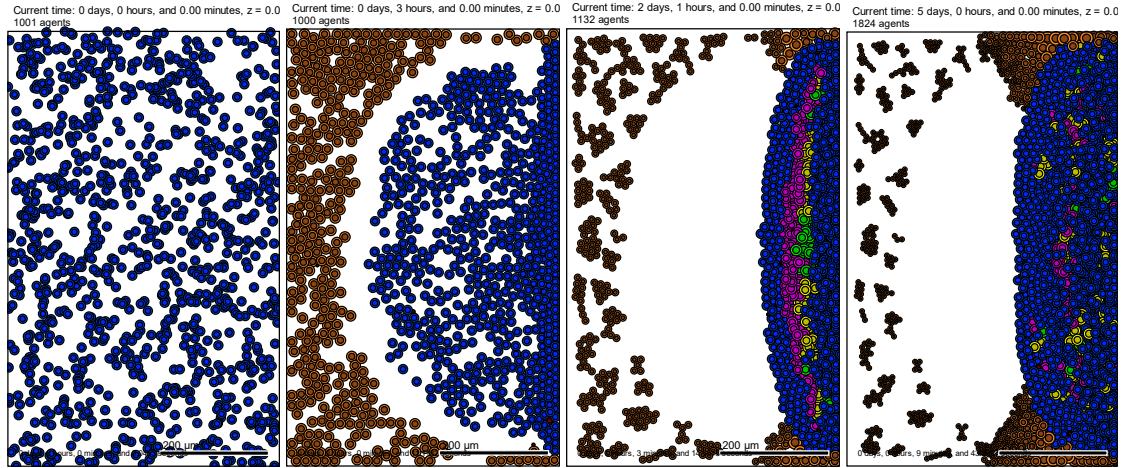


Figura 29. Simulación de la pseudoempalazada con menor tasa de consumo

*Tasa de consumo = 6*

Realizar esta simulación sería llevar a cabo otra vez la [simulación 12](#).

*Tasa de consumo = 12*

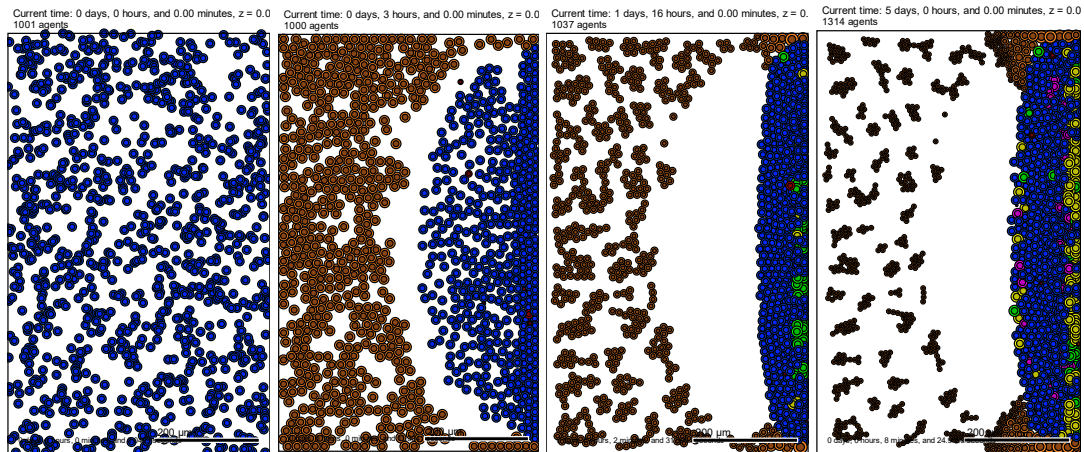


Figura 30. Simulación de pseudoempalazada con mayor tasa de consumo

2.5.3 – VARIACIÓN SIMULTÁNEA DEL OXÍGENO Y TASA DE CONSUMO

*20 mmHg O<sub>2</sub> y tasa de consumo = 2*

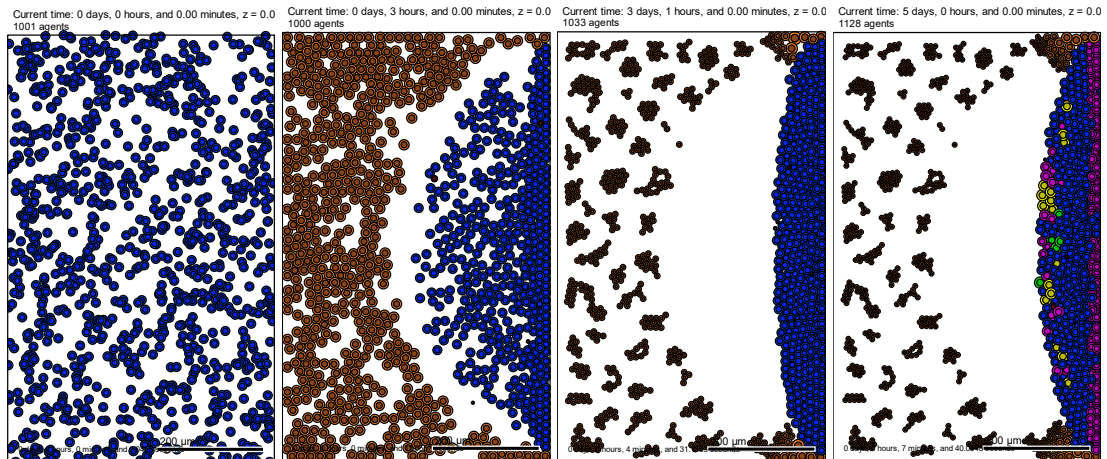


Figura 31. Simulación de la pseudoempalazada con menos oxígeno y menor tasa de consumo

20 mmHg O<sub>2</sub> y tasa de consumo = 12

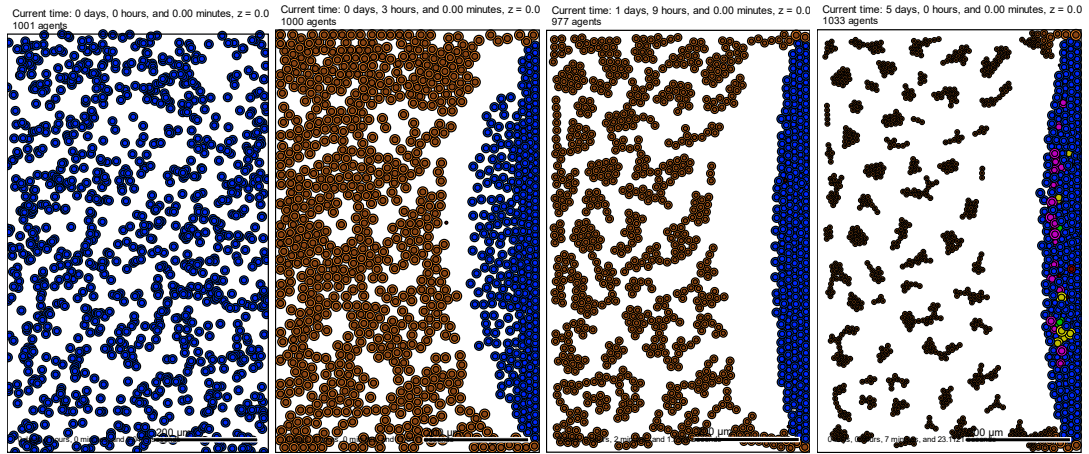


Figura 32. Simulación de la pseudoempalizada con menos oxígeno y mayor tasa de consumo

50 mmHg O<sub>2</sub> y tasa de consumo = 2

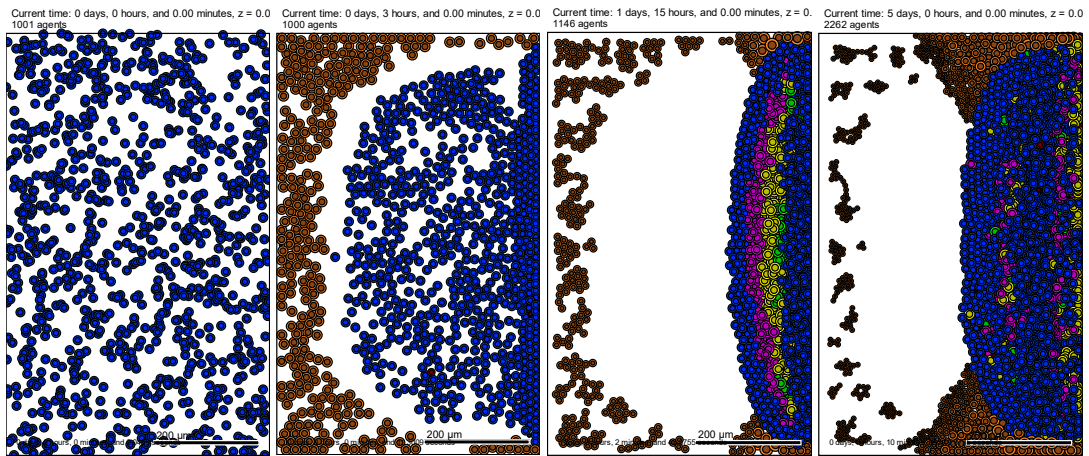


Figura 33. Simulación de la pseudoempalizada con más oxígeno y menor tasa de consumo

50 mmHg O<sub>2</sub> y tasa de consumo = 12

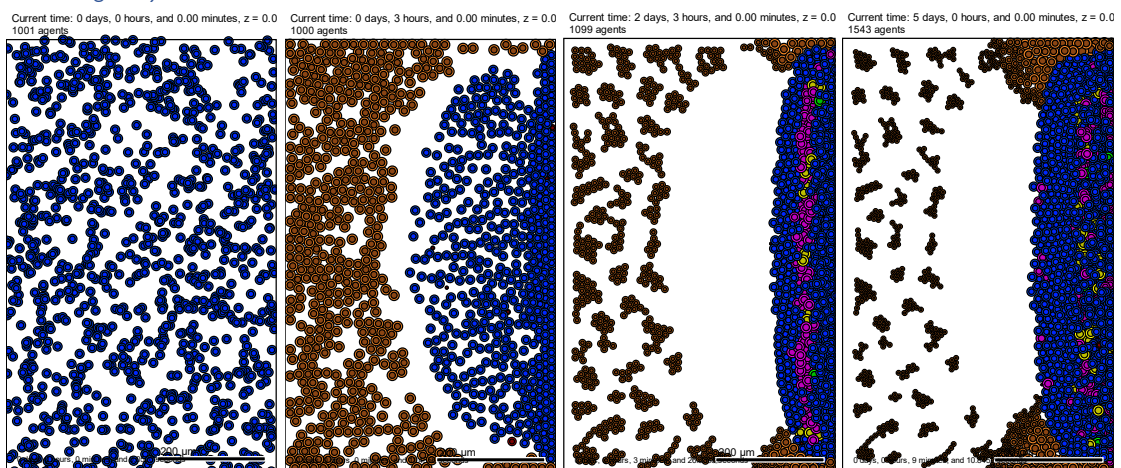


Figura 34. Simulación de pseudoempalizada con más oxígeno y mayor tasa de consumo

## 3 – ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 3.1 – MIGRACIÓN

#### 3.1.1 – MIGRACIÓN ALEATORIA

##### *SIMULACIÓN 1*

En la [figura 15](#), las células se mueven aleatoriamente, entonces, si alguna decidiera moverse hacia un borde en el que no hubiera oxígeno, moriría por necrosis.

Si, por el contrario, se estableciera en todos los bordes un valor de 38 mmHg de O<sub>2</sub> las células tendrían demasiado oxígeno fueran donde fueran, y en cuanto alcanzaran una posición con oxígeno suficiente para sobrevivir dejarían de migrar y comenzarían a proliferar al encontrarse en abundancia de oxígeno. Entonces se mezclarían varios fenómenos, el de migración y el de proliferación.

Algunas células en la [figura 15](#), han muerto por apoptosis, este fenómeno no depende de las condiciones en las que se encuentre la célula si no que es un evento basado en la probabilidad. Las células que mueren por apoptosis son una cantidad prácticamente insignificante.

Cuando las células mueren por apoptosis pasan del color azul al rojo y sufren una reducción de volumen hasta desaparecer.

En los siguientes experimentos se clarificará que son mucho más importantes las células que mueren por necrosis, ya que indican la existencia de una zona hipóxica.

Cuando las células mueren por necrosis pasan del color azul al marrón y también sufren una reducción gradual de su volumen, aunque no tan rápida como las células que mueren por apoptosis.

Las células que mueren por apoptosis mueren por probabilidad, es decir, hay una expresión que rige la probabilidad de que cualquier célula entre en apoptosis. (21) Sin embargo, para que una célula muera por necrosis, debe estar en una zona con hipoxia, es decir, con falta de oxígeno.

En las [simulaciones de migración y proliferación](#) se encuentran ejemplos muy ilustrativos de células muertas por necrosis.

Como en esta simulación se cuenta con 30 células y el movimiento es aleatorio, es difícil apreciarlo a simple vista. Por eso se han rodeado, [en la figura 15](#), dos células con un círculo rojo y otro verde, para que resulte más sencillo ver su movimiento.

##### *SIMULACIÓN 2*

En la **simulación 2**, con 100 células, se han establecido las mismas condiciones de contorno en todos los bordes del chip, **38 mmHg de O<sub>2</sub>**, para evitar la formación de ningún núcleo necrótico y para contrastar que, como se ha dicho en la simulación 1, si el nivel de oxígeno fuera superior, llegaría un momento de la simulación en que las células dejarían de migrar y comenzarían a proliferar.

El aumento de oxígeno ha provocado que las últimas imágenes de la [figura 16](#) en las que se ve migración sean a las 23 horas de comenzar la simulación. Pasadas esas 23 horas las células dejan de migrar y comienzan a proliferar, pues tienen oxígeno suficiente para hacerlo en cualquier parte del chip.

Hasta esas 23 horas el número de agentes ha disminuido ligeramente porque algunas células han muerto por apoptosis.

En las imágenes de esta simulación se ve con mayor claridad cómo las células se mueven aleatoriamente. No se dan grandes desplazamientos, pero se ve que no están en la misma posición en ningún momento.

Al disponer de oxígeno suficiente por todos los lados del chip, no se produce ningún núcleo necrótico.

### 3.1.2 – MIGRACIÓN HUYENDO DEL OXÍGENO

#### *SIMULACIÓN 3*

En la **simulación 3** se han programado 10 células durante 2 días. Con **condiciones de contorno de 38 mmHg de O<sub>2</sub> por el lado derecho del chip.**

Se ha programado el archivo XML de PhysiCell de tal manera que lo que se desea observar es que las células migren en el sentido contrario al lógico, que recorran el camino que seguirían para aproximarse al oxígeno, respirar y sobrevivir, pero en sentido contrario, es decir, que huyan del oxígeno. En la [figura 17](#) se ve que el resultado es el esperado.

Estas simulaciones sirven para demostrar que el programa también se puede utilizar para estudiar comportamientos de las células ante sustancias que serían dañinos para ellas y que huirían de él.

En esta simulación las células migran en dirección contraria al oxígeno, por lo que llegan a un punto en el que ya no tienen oxígeno y no pueden seguir migrando porque entran en necrosis al encontrarse en un área hipóxica, es decir, en ausencia de oxígeno.

En la tercera imagen de la [figura 17](#) se ve como se han movido hacia la izquierda alejándose del oxígeno y están ya casi todas las células en necrosis. En la última imagen ya se ven todas las células en necrosis con su correspondiente reducción de volumen una vez agrupadas las células más cercanas.

### 3.1.3 – MIGRACIÓN SIGUIENDO EL OXÍGENO

#### *SIMULACIÓN 4*

En la **simulación número 4** se han programado 10 células con **condiciones de contorno de 38 mmHg de O<sub>2</sub> por todos los bordes del chip.** El objetivo es ver cómo cada célula migra hacia el borde del chip más cercano.

En las imágenes de la [figura 18](#) se observa como cada célula se ha movido hacia su borde más cercano, buscando el oxígeno.

Ninguna célula muere por necrosis porque hay abundancia de oxígeno en todos los bordes, sin embargo, una célula muere por apoptosis. En la última imagen se tienen 9 agentes en vez de 10.

#### *SIMULACIÓN 5*

En la **simulación número 5 se han repetido las mismas condiciones de contorno que en la simulación 4,** pero se han simulado 100 células. Así el movimiento queda más claro.

En la [figura 19](#), las células están rodeadas de oxígeno por todos los bordes del chip, entonces, cada célula migra hacia su borde más próximo y no se forma ningún núcleo necrótico porque se cuenta con oxígeno en todo el dominio del chip.

Nuevamente una pequeña cantidad de células mueren por apoptosis.

La migración de todas las células es posible gracias a la abundancia de oxígeno en todos los bordes. Las células que más cerca se encuentran del borde en el instante inicial son las que primero tienen acceso al oxígeno.

La cantidad de oxígeno presente es mayor que la cantidad de oxígeno que necesita la célula para sobrevivir y migrar, entonces el oxígeno sobrante sigue avanzando hacia el centro del chip y les llega a las células más céntricas. El oxígeno que les llega es también suficiente como para sobrevivir y conseguir migrar hacia un lugar en el que cuenten con más oxígeno.

Las células se mueven buscando las condiciones más favorables para asentarse, es decir, buscando el oxígeno, por eso se han movido todas hacia los bordes.

#### *SIMULACIÓN 6*

En la **simulación número 6** se han programado inicialmente 10 células durante 5 días con unas condiciones de contorno **de 38 mmHg de O<sub>2</sub> por el borde derecho del chip.**

En la [figura 20](#), la mayoría de células han migrado hacia el oxígeno, solo la de la esquina superior izquierda no ha sido capaz, al encontrarse en una zona demasiado alejada del oxígeno y ha muerto por necrosis. Las células que han conseguido migrar hasta el lado con oxígeno ya no pueden moverse más allá, y como gozan de oxígeno abundante, cambiarían su fenotipo de migración a proliferación y empezarían a reproducirse.

Esta simulación establece las bases de la simulación de la pseudoempalizada al suministrar oxígeno solo por un borde del chip.

### **3.2 - PROLIFERACIÓN**

#### *SIMULACIÓN 7*

En la **simulación número 7** se han programado 10 células con **condiciones de contorno de 38 mmHg O<sub>2</sub> en todos los bordes.**

En esta simulación, al impedirse el movimiento de las células modificando el archivo XML de PhysiCell, se ve claramente el fenómeno de la proliferación.

Como se cuenta con oxígeno abundante por todos los bordes del chip no se forman núcleos necróticos y, al tener impedida la migración y no poder acercarse a los bordes del chip para estar más cerca del oxígeno, las células comienzan a proliferar en su lugar original y no paran.

La simulación empieza con 10 células y a los 20 días se cuenta con 2542 agentes. Entre cada foto han pasado 5 días.

En las imágenes de la [figura 21](#) se observa cómo han ido proliferando, y no las células que más cerca estaban del oxígeno por estar en el borde son las que más se han reproducido.

Esto se debe a que las células más cercanas a los bordes han consumido menos oxígeno del disponible para sobrevivir y proliferar. Esto permite que el oxígeno avance hacia el centro del chip y las células de la zona céntrica también gocen de oxígeno suficiente para sobrevivir y proliferar. Así, se ha podido observar una proliferación a la par de las células centrales y de las de los bordes.

Si no hubiera sido así y el oxígeno en los bordes hubiera sido más escaso, a las células centrales no les habría llegado el oxígeno suficiente para proliferar y, si no les hubiera llegado siquiera oxígeno suficiente para sobrevivir, se habría formado un núcleo necrótico y las células centrales habrían muerto.



### *SIMULACIÓN 8*

En la **simulación número 8** se han programado 500 células con **el nivel original de oxígeno en los bordes, 38 mmHg**. La simulación dura 5 días.

Inicialmente había 500 células en la [figura 22](#).

No se produce ningún núcleo necrótico porque, al igual que en la simulación anterior, hay abundancia de oxígeno por todo el chip. Esto quiere decir que el oxígeno se infiltra bien entre los agentes y no queda ningún punto del dominio al que no llegue el oxígeno.

Esto se debe a que las células que se encuentran en el contorno exterior, las que están más cerca del borde del chip y por lo tanto del oxígeno, consumen menos oxígeno del disponible y les es suficiente para sobrevivir y proliferar. Esto permite que el oxígeno sobrante pase a las células que están situadas en el centro del chip. El oxígeno que les llega a las células del interior es, también, el suficiente como para sobrevivir y proliferar.

Tardan 1 día en comenzar a proliferar, pero desde que empieza el proceso ya no paran hasta que se dejen de dar las condiciones idóneas para proliferación, es decir, hasta que se corte el suministro de oxígeno.

Que las células muestren un cambio de color, que no aparezcan de color azul, quiere decir que está teniendo lugar un cambio de fase. Si está sucediendo un cambio de fase es porque las células no están migrando, si no que están proliferando, que era el objetivo de esta simulación, que no migraran las células y que proliferaran.

El color de la célula representa la fase en la que se encuentra. Qué color está asociado a cada fase se ha explicado previamente en el [apartado 1.3.3](#).

La proliferación que se ve en este ejemplo es menos espectacular que la de la simulación 7, pero se observa de una manera muy clara el cambio de fase de las células en las imágenes 2 y 3 de la [figura 22](#).

## **3.3 – PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN**

### **3.3.1 – MIGRACIÓN ALEATORIA Y PROLIFERACIÓN**

#### *SIMULACIÓN 9*

En la **simulación número 9** se han representado 500 células durante 2 días, asignando un **valor fijo de oxígeno de 38 mmHg por el lado derecho del chip**.

Las células que originalmente están a la izquierda del chip, en la [figura 23](#), mueren por necrosis, dado que se encuentran en la zona más alejada del oxígeno. La necrosis se produce, entre otras razones, por la falta de oxígeno en una región hipóxica.

Si a las células se les hubiese indicado moverse en la dirección del oxígeno, que es lo lógico, dado que en la realidad las células se desplazan hacia donde tienen oxígeno para poder vivir, la mayoría de las células se habrían desplazado hacia la derecha. Las que hubieran aparecido a la izquierda desde el principio, al encontrarse demasiado lejos del oxígeno, habrían entrado en necrosis y habrían muerto igual.

Las células que se encontraban cerca del borde derecho y las que, aleatoriamente, han migrado hasta él, cuentan con abundancia de oxígeno, por lo que su fenotipo cambia de migración a proliferación. Estas células dejan de moverse y comienzan a proliferar. Se observa como en la

foto final de la [figura 23](#) hay más aglomeración de células en el borde derecho respecto a la imagen inicial.

Las células que se ven con colores distintos al azul (sin contar el marrón, que indica necrosis) están, como se ha comentado con anterioridad, cambiando de fase porque están en el proceso de proliferación. Está teniendo lugar el ciclo celular. La explicación del significado de cada color se ha llevado a cabo en el [apartado 1.3.3](#).

Más adelante en la memoria se ha analizado la simulación de la [pseudoempalizada](#). Se puede hacer una comparación de las imágenes y se ve como en esa simulación los agentes se mueven hacia el oxígeno y se ve de forma muy clara como en cuanto empieza la simulación, todas las células que pueden, es decir, las que no están demasiado alejadas del oxígeno, no están en necrosis y por lo tanto pueden migrar, se desplazan rápidamente hacia el borde del chip con oxígeno.

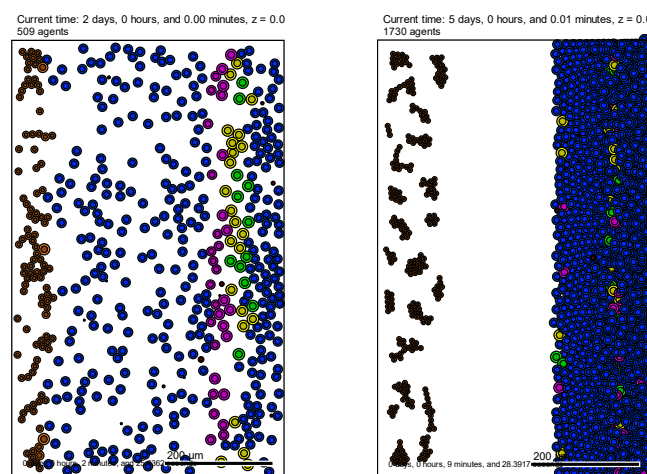


Figura 35. Comparación de, con las mismas condiciones iniciales y de contorno, cómo se comportan las células según si se mueven aleatoriamente (izq) o si lo hacen siguiendo el oxígeno (dcha)

### 3.3.2 – MIGRACIÓN SIGUIENDO EL OXÍGENO Y PROLIFERACIÓN

#### SIMULACIÓN 10

En la **simulación número 10** se han programado 1000 células inicialmente y se ha simulado un tiempo equivalente a 5 días. Se ha fijado un **valor de 38 mmHg de O<sub>2</sub> por los bordes izquierdo, inferior y derecho del chip**.

En la secuencia de imágenes de la [figura 24](#) se ve la rapidez con la que las células migran hacia las zonas con oxígeno y como, una vez ahí, cambia su fenotipo de migración a proliferación y, el número de agentes, incrementa.

En la imagen 3 de la [figura 24](#) se observa cómo las células están pasando por un cambio de fase, lo que quiere decir que están proliferado, están pasando por la fase S y la fase G2 mayoritariamente. El significado de cada fase y su color asociado están explicados en el [apartado 1.3.3](#).

En la última imagen de la [figura 24](#) se ve como el número final de agentes, agrupados sobre los bordes con oxígeno del chip, es claramente superior al que se tenía en el momento de la segunda imagen.

Pese a tener un número de agentes tan elevado, el oxígeno es tan abundante que es suficiente para que sobrevivan y proliferen todas las células y no llega a formarse ningún núcleo necrótico.

### SIMULACIÓN 11

En la **simulación número 11** se han programado inicialmente 1000 células durante 5 días, con unas **condiciones de contorno de 38 mmHg de O<sub>2</sub> en el lado inferior del chip**.

En la [figura 25](#), todas las células intentan ir hacia el lado con oxígeno, pero, al ser el lado en el que hay oxígeno, más pequeño que en el resto de simulaciones, menos células van a ser capaces de llegar al oxígeno en los instantes iniciales de la simulación.

El borde con oxígeno en esta ocasión es menor que en las simulaciones anteriores, por lo que resulta más lejano para un mayor número de células. Esto conlleva que la región hipóxica sea mayor y que se vean más células en necrosis.

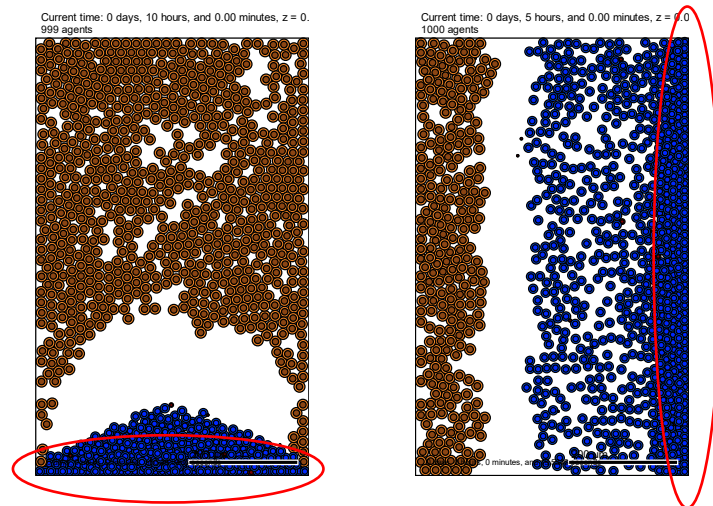


Figura 36. Comparación de tamaño del lado del chip con oxígeno.

En el chip de la izquierda, el lado con oxígeno es el inferior, rodeado con una elipse roja, y en el chip de la derecha el lado con oxígeno es el derecho, rodeado con otra elipse roja.

Como consecuencia de que esta vez las células hayan tenido que migrar hacia uno de los lados más pequeños del chip, hay menos oxígeno para la misma cantidad de células, por lo que morirán más y quedan menos células para proliferar, aunque las células que consiguen llegar al borde con oxígeno proliferan igual que en el resto de casos.

Así se ve en la última imagen, que se encuentran células muertas por necrosis por todo el chip y en un lugar en el cual hasta ahora no se habían observado, en las esquinas al lado de células que han migrado hasta el borde y están proliferando. Además, el número final de agentes es el menor de todas las simulaciones hechas hasta el momento, 1295 agentes.

Las células que se encuentran en núcleos necróticos se ven cada vez más pequeñas. Esto es porque, en la realidad, las células que se encuentran en necrosis van reduciendo progresivamente su volumen y está reflejado en PhysiCell.

En la tercera imagen se ve como las células que están en el borde con oxígeno están proliferando, están cambiando de fase y por tanto de color, están llevando a cabo su ciclo.

### 3.4 - PSEUDOEMPALIZADA

#### SIMULACIÓN 12

En la **simulación número 12** se han programado inicialmente 5000 células durante 5 días con un **valor fijo de 70 mmHg de O<sub>2</sub> por el borde derecho del chip**.

Como ya se ha mencionado anteriormente en el [apartado 1.2.3](#), Physicell cuenta con un archivo XML modificable donde se configura cómo va a ser la simulación. En dicho archivo se modifican las condiciones iniciales y de contorno para simular la pseudoempalizada.

Las condiciones que se imponen para la simulación son:

- El movimiento de las células es dirigido, deben moverse hacia el oxígeno.
- Hay oxígeno solo en un lado del chip, para que las células migren hacia ahí.
- La cantidad de oxígeno en el borde debe ser la adecuada. Si hubiera mucho oxígeno, proliferarían demasiadas células y no se formaría el núcleo necrótico. Por otro lado, si hubiera demasiado poco oxígeno, muy pocas células serían capaces de migrar y proliferar, por lo que tampoco se generaría esa agrupación tan característica de células en el borde de la pseudoempalizada.
- La tasa de consumo, cantidad de oxígeno que consumen las células, debe ser la adecuada. Si es un valor muy bajo, las células consumirán menos oxígeno para sobrevivir y entonces proliferarán mucho más. Sin embargo, si la tasa de consumo es demasiado alta, consumirán mucho oxígeno y proliferarán menos de lo que lo harían en la realidad.

En la [figura 26](#) se ve cómo se habilita oxígeno por solo uno de los bordes, haciendo la función de un vaso sanguíneo sano. Se observa como las células a las que les llega oxígeno migran rápidamente hacia el vaso sanguíneo sano.

Las células que migran hacia el vaso sanguíneo alcanzan una zona rica en oxígeno y nutrientes, por lo que cambian su fenotipo de migración a proliferación y comienzan sus ciclos celulares. Comienzan a dividirse.

Todas estas células proliferantes en la zona rica en oxígeno, forman una zona de gran densidad celular, una barrera, forman la pseudoempalizada.

Tras esta barrera de células agrupadas en torno al “vaso sanguíneo” se encuentra la zona hipóxica del GBM, la zona sin oxígeno.

Las células que no han sido capaces de migrar hacia el oxígeno y se encuentran en la zona hipóxica, mueren por necrosis, se crea un núcleo necrótico.

Las células que están en la zona rica en oxígeno continuarían proliferando hasta que las necesidades metabólicas (cantidad de oxígeno requerida para que todas las células de la pseudoempalizada sigan proliferando) fueran inasumibles y entonces, volvería a comenzar el ciclo de migración hacia un vaso sanguíneo sano tras colapsar y provocar trombosis en el vaso actual.

A continuación, se ha representado la concentración celular en el eje Y frente a la longitud del chip en el eje X utilizando Matlab. Los gráficos obtenidos de la simulación de la pseudoempalizada se van a comparar a los resultados obtenidos con simulaciones basadas en modelos continuos. (14,19,20)

Para reforzar así la eficacia, veracidad y fiabilidad de la simulación basada en agentes.

En primer lugar, se ha representado la concentración celular frente a la longitud del chip durante distintos momentos de la simulación: en el momento inicial, en su punto intermedio y en el final.

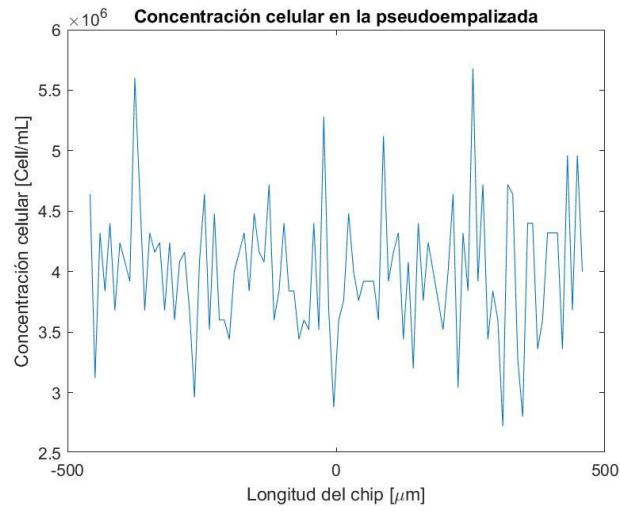


Figura 37. Concentración celular al inicio de la simulación de la pseudoempalizada

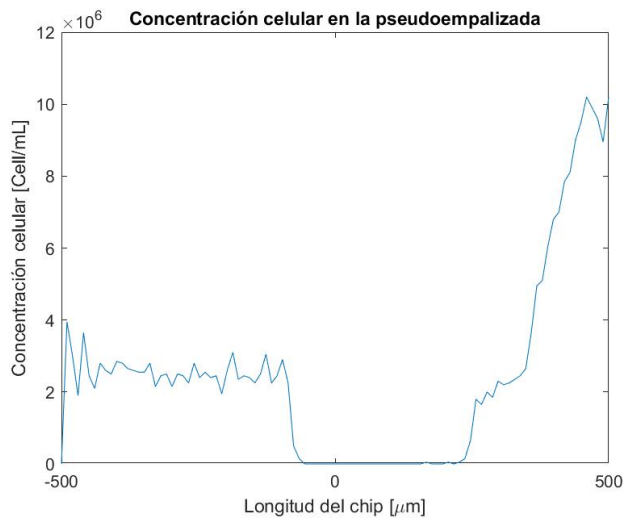


Figura 38. Concentración celular a los 6 días de la simulación de la pseudoempalizada

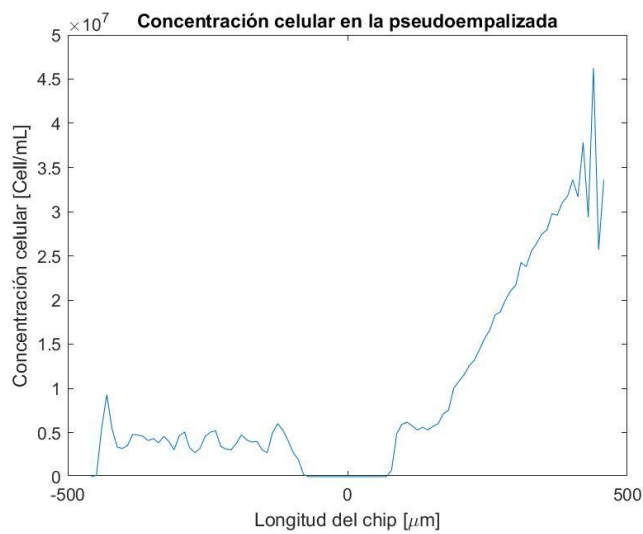


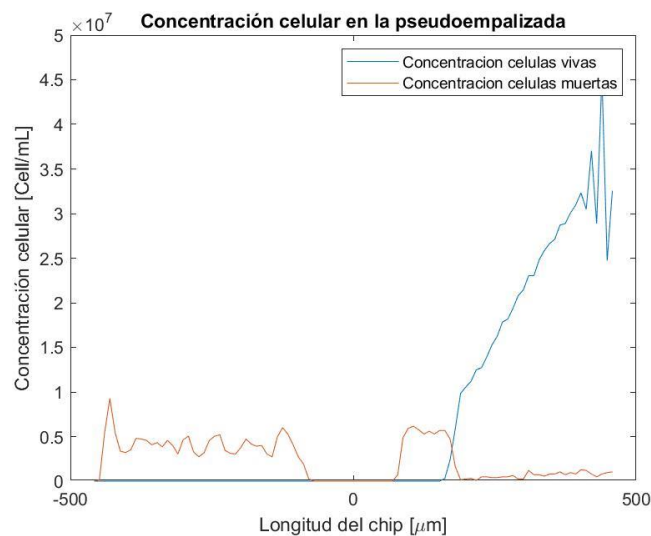
Figura 39. Concentración celular en el momento final de la simulación de la pseudoempalizada

En la [figura 37](#) se ve como las células están distribuidas de manera aleatoria inicialmente.

A continuación, en la [figura 38](#), se observa cómo las células a las que les llegó el oxígeno migraron hacia la derecha del chip y las que no fueron capaces, entraron en necrosis en la izquierda del chip.

Por último, en la [figura 39](#), se observa como han aumentado los valores del eje Y respecto a las dos figuras anteriores. Esto se debe a que las células que consiguieron migrar y llegar hasta el borde del chip, una vez ya asentadas en un espacio con oxígeno abundante cambiaron su fenotipo de migración a proliferación y comenzó a aumentar el número de células y, en consecuencia, la concentración celular.

También se ha hecho una gráfica en la que se diferencia qué células están vivas y cuales están muertas.



*Figura 40. Concentración celular al final de la formación de una pseudoempalizada diferenciando células vivas de muertas*

En la [figura 40](#) queda más clara la diferenciación entre el núcleo necrótico, compuesto por células muertas, que queda a la izquierda de la gráfica, y la pseudoempalizada, zona de mayor densidad celular formada por células vivas, a la derecha de la gráfica.

La figura 41 es útil para comparar la simulación llevada a cabo en este estudio con la simulación llevada a cabo en el artículo (14), en el que la simulación es llevada a cabo utilizando un modelo continuo.

En la página siguiente, en la [figura 41](#), se representan ambas gráficas una al lado de otra. A la izquierda, la gráfica del artículo (14), y a la derecha, la gráfica de la simulación con modelado basado en agentes.

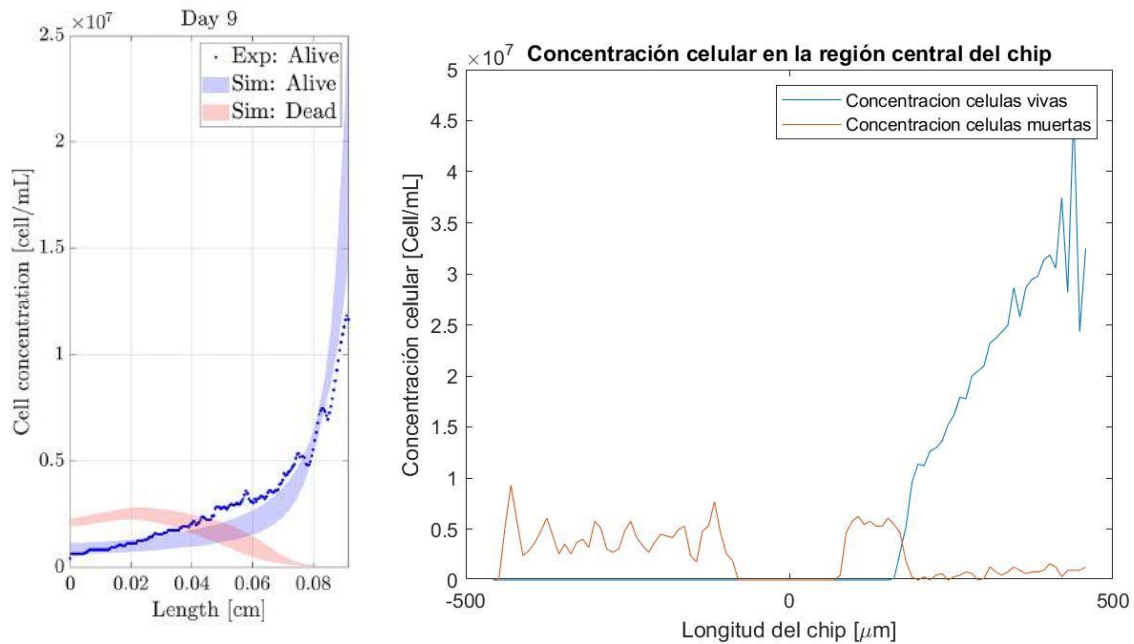


Figura 41. Comparación entre la pseudoempalazada realizada mediante modelo continuo (14) y la realizada con modelo basado en agentes

En la simulación con modelo continuo, se encuentran células vivas desde el comienzo del chip hasta el extremo en el que se encuentra el oxígeno. En la gráfica de la derecha no es así.

Esto se debe a que el modelo continuo utiliza variables continuas y derivables, por lo que los resultados son más suaves que en el modelo de agentes de la derecha. Para conseguir estos resultados más suaves en el modelo discreto se necesitaría un número de agentes (células) muy superior y con ello una capacidad computacional mucho más potente que la disponible.

El tiempo de simulación utilizando agentes para 1000 células es de alrededor de 10 minutos, para una simulación con 5000 células está entre 30 y 40 minutos, y si la simulación ya escala a 10000 células, el ordenador tarda más de 1 hora en completarla.

Debido a que el número de células en la simulación con modelado continuo es superior, para que sea posible y lógica la comparación entre ambas simulaciones, debe aplicarse un factor de conversión a los datos de la simulación con agentes. Dicho factor de conversión es simplemente un cambio de unidades. En ese cambio de unidades hay que tener en cuenta el espesor real del chip, ya que en la simulación con agentes se trabaja en 2D. También hay que tener en cuenta la conversión de micrómetros cúbicos a centímetros cúbicos.

Comparando la gráfica del modelo continuo y la del modelo basado en agentes, se observa que se ha alcanzado el mismo orden de magnitud. Aunque el resultado no es exactamente el mismo, esto se debe a multitud de factores que eran distintos durante las simulaciones, desde la velocidad a la que migran las células, al coeficiente de difusión, etc. En el modelo continuo se trabaja con concentraciones celulares, y en el modelo basado en agentes, con células.

El objetivo a remarcar es que se ha alcanzado el mismo orden de magnitud con ambas simulaciones.

### 3.5 – ANÁLISIS PARAMÉTRICO

#### VARIACIÓN DE OXÍGENO

En las [figuras 27 y 28](#) se observa como la variación de oxígeno afecta a cuantas células son capaces de migrar hasta la zona rica en oxígeno y cuantas de estas son capaces de proliferar.

Cuanto más oxígeno hay en el borde del chip, más penetra el oxígeno en el chip y más células son capaces de migrar. Por eso en la segunda imagen de la [figura 27](#) hay menos movimiento de células que en la correspondiente imagen de la [figura 28](#).

Como se acaba de decir. Cuanto más oxígeno haya, más células llegarán al borde del chip y por lo tanto más células proliferarán.

En la última imagen de la [figura 27](#) se muestra como se acaba la simulación con 1070 células y en la [figura 28](#) se acaba con casi 1800.

Como se ha aumentado la cantidad de oxígeno disponible, los resultados de la simulación son los esperados, a más oxígeno mayor supervivencia de células y mayor proliferación.

Si además del oxígeno se hubiera modificado cuánto oxígeno consume cada célula, es decir, la tasa de consumo, los resultados habrían variado.

Si se aumenta la cantidad de oxígeno disponible, pero se aumenta proporcionalmente cuanto oxígeno consume cada célula, los resultados no deberían variar.

Por otra parte, si solo se modificara la tasa de consumo y el nivel de oxígeno se dejara constante, cuanto mayor fuera la tasa de consumo, menos células sobrevivirían porque cada célula necesitaría más oxígeno.

#### VARIACIÓN DE LA TASA DE CONSUMO

Al variar la tasa de consumo, lo que se está variando es la cantidad de oxígeno que consume cada célula.

Cuanto mayor sea la tasa de consumo, más oxígeno necesitará cada célula para sobrevivir. Por lo que, si el nivel de oxígeno se mantiene constante y la tasa de consumo aumenta, sobrevivirán menos células, porque cada célula necesitará más oxígeno.

Si la tasa de consumo disminuye y el oxígeno se mantiene constante, sobrevivirán y proliferarán más porque cada célula necesita menos oxígeno.

De hecho, con la tasa de consumo = 2 se consiguen 1824 células al final de la simulación. Con tasa de consumo = 6 se consiguen 1730 y con tasa de consumo = 12 se obtienen 1314 células.

En la [figura 42](#) se observan, de izquierda a derecha, la fotografía final de cada simulación, en la que se anota en la esquina superior izquierda el número de células de cada una.



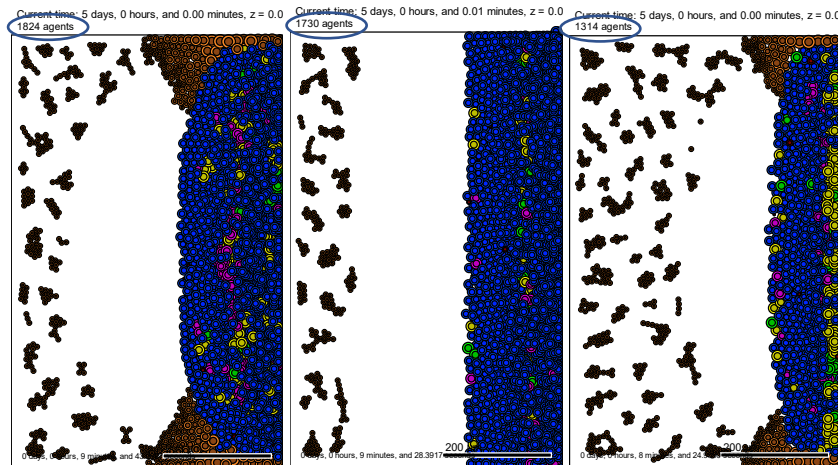


Figura 42. Simulaciones de pseudoempalizada con distintos valores de tasa de consumo

Los resultados del análisis de sensibilidad de la tasa de consumo corroboran el buen funcionamiento de la simulación porque los resultados obtenidos arrojan la misma información que si se hubieran hecho los experimentos en laboratorio.

#### VARIACIÓN SIMULTÁNEA DE OXÍGENO Y DE LA TASA DE CONSUMO

Las variaciones de oxígeno y de la tasa de consumo pueden contrarrestarse o potenciarse mutuamente los efectos.

Por ejemplo, si se aumenta la cantidad de oxígeno, deberían sobrevivir y proliferar más células, pero si se incrementa a su vez la tasa de consumo, el efecto del aumento de oxígeno no es tan considerable, porque, aunque haya más oxígeno, cada célula necesita más oxígeno para sobrevivir.

Por el contrario, si se aumenta el oxígeno y se disminuye la tasa de consumo, las células van a sobrevivir y proliferar todavía más porque disponen de más oxígeno y, además, cada célula necesita menos oxígeno para sobrevivir.

Ocurre lo contrario si se baja el nivel de oxígeno.

Si se disminuyen la cantidad de oxígeno y la tasa de consumo, aunque las células tengan menos oxígeno, cada célula necesita menos para sobrevivir, entonces las cifras de proliferación no se ven tan alteradas como si se modificara solo el oxígeno.

Si se disminuye el nivel de oxígeno y se aumenta la tasa de consumo, además de contar con menos cantidad de oxígeno, cada célula necesita más oxígeno para sobrevivir. Esto conlleva que menos células sean capaces de sobrevivir y proliferar.

El número final de células en cada caso ha sido:

- Incremento de oxígeno y de tasa de consumo: 1543
- Incremento de oxígeno y disminución de tasa de consumo: 2282
- Disminución de oxígeno y de tasa de consumo: 1128
- Disminución de oxígeno y aumento de tasa de consumo: 1033

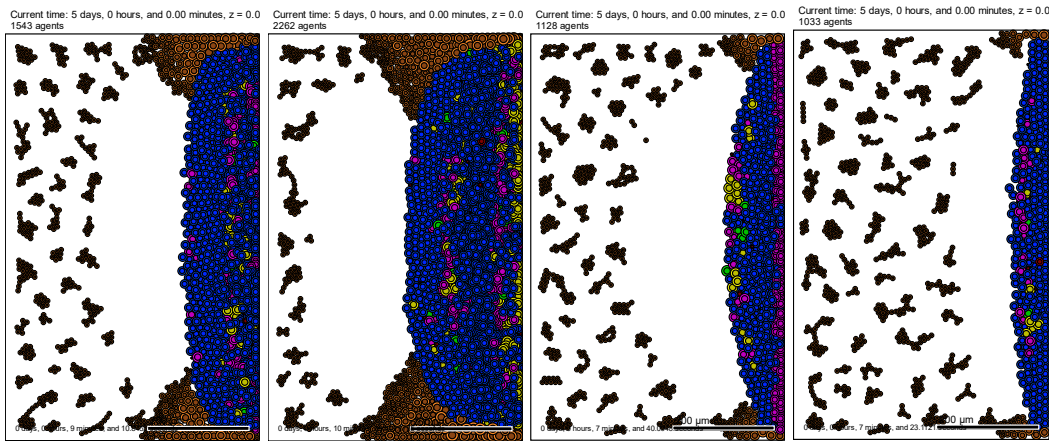


Figura 43. Última imagen de las variaciones simultáneas de  $O_2$  y  $UR$

En la [figura 43](#) se ven los resultados finales de cada simulación.

En las simulaciones en las que se han aumentado o disminuido ambos parámetros, el oxígeno y la tasa de consumo, los resultados finales de número de células son más similares que los resultados cuando se aumenta un parámetro y se disminuye el otro.

Esto corrobora la explicación al principio de este apartado.

## 4 – CONCLUSIONES

Los resultados de la simulación tienen las suficientes similitudes con los resultados de los modelos continuos utilizados en otros estudios de simulación de formación de pseudoempalizada (14) como para afirmar que la simulación utilizando modelado basado en agentes es suficientemente válida.

Una de las fortalezas del modelado basado en agentes es que se puede profundizar más sobre el comportamiento de cada agente, se puede obtener más información que con un modelo continuo. Se puede saber, por ejemplo, el estado de cada célula en cada momento. Puede saberse de forma visual, ya que cada fase del ciclo celular tiene un color asociado.

Sin embargo, uno de los puntos débiles del modelado basado en agentes es que no se pueden llevar a cabo simulaciones con el mismo número de células que con un modelo continuo, ya que la potencia computacional requerida para eso es de difícil acceso. En una simulación con modelado continuo se pueden utilizar fácilmente 4 millones de células, pero con el modelado basado en agentes, simulaciones del orden de 10000 células ya consumen bastante tiempo y se necesita un ordenador personal de gama alta para ejecutarse.

En las simulaciones iniciales se han llevado a cabo los diferentes fenómenos que se ven en la formación de la pseudoempalizada, pero por separado.

En dichas simulaciones se ha utilizado una población de 1000 células y unas dimensiones del chip menores que el de la simulación de la pseudoempalizada, por reducir el tiempo computacional. Las simulaciones que se han llevado a cabo son de migración, limitando el valor de oxígeno para evitar que se produjera proliferación, de proliferación, limitando la movilidad de las células para que no migraran, y de migración y proliferación conjuntamente.

En la simulación de la formación de la pseudoempalizada se han utilizado inicialmente 5000 células distribuidas de forma aleatoria por el chip, este chip ya tiene las mismas dimensiones que el chip real utilizado en laboratorio y en las simulaciones con modelo continuo con las que se ha comparado (14).

Para la simulación solo se habilita el paso del oxígeno en un borde del chip y se observa como las células a las que les llega el oxígeno migran inmediatamente hacia él. Mientras que a las que no les llega el oxígeno se asfixian y entran en necrosis, quedándose así en el margen izquierdo del chip y reduciendo su volumen progresivamente con el paso del tiempo. Esta zona de células muertas es el núcleo necrótico.

Las células que consiguen migrar hasta el oxígeno, una vez han llegado a él, cambian su fenotipo de migración a proliferación. Comienzan a proliferar y no se detendrían hasta que se cortara el suministro de oxígeno y nutrientes a la zona en la que se encuentran. Esta proliferación da lugar a una zona de mayor densidad celular, creando una “barrera” de células. Dicha barrera celular es la pseudoempalizada.

Se ve así una diferenciación bien clara de la zona del núcleo necrótico y la pseudoempalizada.

En la zona que queda vacía entre el núcleo necrótico y la pseudoempalizada debería haber células vivas, como se ve en las gráficas de la simulación con modelado continuo (14) pero debido a que el número de células utilizando modelado basado en agentes es mucho menor al utilizado en el modelo continuo, ahí se produce un hueco sin células.

El resultado de este trabajo es alentador. Ha reforzado la eficacia y veracidad del modelado basado en agentes en las simulaciones con células.

Supone un aliciente para continuar esta línea de investigación porque la simulación basada en agentes ofrece un mayor grado de información sobre el problema que el modelado continuo y es mucho más rápida y económica que la experimentación en laboratorio. Las simulaciones han durado alrededor de 8 minutos cada una, y el tiempo de simulación eran 5 días.

Las simulaciones con modelos basados en agentes pueden ser una herramienta muy útil en los próximos años en la lucha contra el cáncer y en su investigación.

## 5 – BIBLIOGRAFÍA

1. Alfonso JCL, Talkenberger K, Seifert M, Klink B, Hawkins-Daarud A, Swanson KR, et al. The biology and mathematical modelling of glioma invasion: A review. Vol. 14, *Journal of the Royal Society Interface*. Royal Society Publishing; 2017.
2. News medical live science. Cual es el GBM. [https://www.news-medical.net/health/What-is-Glioblastoma-Multiforme-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/What-is-Glioblastoma-Multiforme-(Spanish).aspx). 2021. p. 1–1.
3. Unidad de neurología RGS. Día mundial contra el cáncer: GBM . <https://neurorgs.net/actualidad/blog/dia-mundial-cancer-glioblastoma-multiforme/>.
4. Arroyo R. TFG\_Raquel Arroyo.
5. Brat DJ, van Meir EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. Vol. 84, *Laboratory Investigation*. 2004. p. 397–405.
6. Zanders ED, Svensson F, Bailey DS. Therapy for glioblastoma: is it working? Vol. 24, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2019. p. 1193–201.
7. Belykh E, Shaffer K v., Lin C, Byvaltsev VA, Preul MC, Chen L. Blood-Brain Barrier, Blood-Brain Tumor Barrier, and Fluorescence-Guided Neurosurgical Oncology: Delivering Optical Labels to Brain Tumors. Vol. 10, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
8. Metzcar J, Wang Y, Heiland R, Macklin P. A Review of Cell-Based Computational Modeling in Cancer Biology. 2019; Available from: <http://tigacenter.bioquant.uni-heidelberg.de/episim.html>
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell*. 2011. p. 646–74.
10. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Vol. 131, *Acta Neuropathologica*. Springer Verlag; 2016. p. 803–20.
11. Caiazzo A, Ramis-Conde I. Multiscale modelling of palisade formation in glioblastoma multiforme. *Journal of Theoretical Biology*. 2015 Oct 21;383:145–56.
12. Ayuso JM, Monge R, Martínez-González A, Virumbrales-Muñoz M, Llamazares GA, Berganzo J, et al. Glioblastoma on a microfluidic chip: Generating pseudopalisades and enhancing aggressiveness through blood vessel obstruction events. *Neuro-Oncology*. 2017 Apr 1;19(4):503–13.
13. Desai K, Hubben A, Ahluwalia M. The Role of Checkpoint Inhibitors in Glioblastoma. Vol. 14, *Targeted Oncology*. Springer-Verlag France; 2019. p. 375–94.
14. Ayensa-Jiménez J, Pérez-Aliacar M, Randelovic T, Oliván S, Fernández L, Sanz-Herrera JA, et al. Mathematical formulation and parametric analysis of in vitro cell models in microfluidic devices: application to different stages of glioblastoma evolution. *Scientific Reports*. 2020 Dec 1;10(1).

15. Instituto de ecología UNAM, Laboratorio nacional de ciencias de sostenibilidad. Modelación basada en agentes. [http://lancis.ecologia.unam.mx/iai/modelacion\\_agentes](http://lancis.ecologia.unam.mx/iai/modelacion_agentes). 2021. p. 1–1.
16. Ghaffarizadeh A, Heiland R, Friedman SH, Mumenthaler SM, Macklin P. PhysiCell: An open source physics-based cell simulator for 3-D multicellular systems. *PLoS Computational Biology*. 2018 Feb 1;14(2).
17. The QT company. QT [Internet]. QT product definition. 2021 [cited 2021 Aug 4]. p. 1–1. Available from: <https://www.qt.io/product>
18. The MathWorks Inc. Matlab. <https://es.mathworks.com/products/matlab.html>. 2021. p. 1–1.
19. Doblaré M. In vitro modeling and in vivo/in silico simulation of glioblastoma growth. A patient-oriented framework to test new therapies non-invasively. 2021.
20. Doblaré M. In vitro characterization and in vitro/in vivo simulation of the effect of hypoxia and drug dosage in glioblastoma growth. 2021.
21. Project P, Macklin P. PhysiCell User Guide (Version 1.7.1).
22. Netinbag. Delta de Kronecker. <https://www.netinbag.com/es/science/what-is-the-kronecker-delta.html>. 2021. p. 1–1.
23. Khan Academy. Ciclo celular. <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/cell-cycle/a/cell-cycle-phases>. 2021. p. 1–1.
24. National human genome research institute. Ciclo Celular. 2021. p. 1–1.
25. Corcoran A, del Maestro RF, Berger MS, Canoll PD, Bruce JN. Testing the “Go or Grow” hypothesis in human medulloblastoma cell lines in two and three dimension. *Neurosurgery*. 2003 Jul 1;53(1):174–85.

## ANEXO I – CÓDIGO DEL ARCHIVO XML DE PHYSICELL

```

74 -
75 - <PhysiCell_settings version="devel-version">
76 -   <domain>
77 -     <x_min>-250</x_min>
78 -     <x_max>250</x_max>
79 -     <y_min>-400</y_min>
80 -     <y_max>400</y_max>
81 -     <z_min>-10</z_min>
82 -     <z_max>10</z_max>
83 -     <dx>20</dx>
84 -     <dy>20</dy>
85 -     <dz>20</dz>
86 -     <use_2D>true</use_2D>
87 -   </domain>
88 -
89 -   <overall>
90 -     <max_time units="min">7200</max_time> <!-- 5 days * 24 h *
91 -       60 min -->
92 -     <time_units>min</time_units>
93 -     <space_units>micron</space_units>
94 -     <dt_diffusion units="min">0.01</dt_diffusion>
95 -     <dt_mechanics units="min">0.1</dt_mechanics>
96 -     <dt_phenotype units="min">6</dt_phenotype>
97 -   </overall>
98 -
99 -   <parallel>
100 -     <omp_num_threads>6</omp_num_threads>
101 -   </parallel>
102 -
103 -   <save>
104 -     <folder>output</folder> <!-- use . for root -->
105 -
106 -     <full_data>
107 -       <interval units="min">360</interval>
108 -       <enable>true</enable>
109 -     </full_data>
110 -
111 -     <SVG>
112 -       <interval units="min">60</interval>
113 -       <enable>true</enable>
114 -     </SVG>
115 -
116 -     <legacy_data>
117 -       <enable>false</enable>
118 -     </legacy_data>
119 -   </save>
120 -
121 -   <options>
122 -     <legacy_random_points_on_sphere_in_divide>false</legacy_random_
.....points_on_sphere_in_divide>
123 -   <virtual_wall_at_domain_edge>true</virtual_wall_at_domain_edge>
124 - </options>
125 -
126 - <microenvironment_setup>
127 -   <variable name="oxygen" units="dimensionless" ID="0">
128 -     <physical_parameter_set>

```

```

129 - <diffusion_coefficient
.....units="micron^2/min">100000.0</diffusion_coefficient>
130 - <decay_rate units="1/min">0.0</decay_rate>
131 - </physical_parameter_set>
132 - <initial_condition units="mmHg">38.0</initial_condition>
133 -
134 - <Dirichlet_boundary_condition units="mmHg"
.....enabled="true">38.0</Dirichlet_boundary_condition>
135 - <!-- use this block to set Dirichlet boundary conditions on
_____individual boundaries -->
136 -
137 -         <Dirichlet_options>
138 - <boundary_value ID="xmin" enabled="true">38.0</boundary_value>
139 - <boundary_value ID="xmax" enabled="true">38.0</boundary_value>
140 - <boundary_value ID="ymin" enabled="true">38.0</boundary_value>
141 - <boundary_value ID="ymax" enabled="true">38.0</boundary_value>
142 - <boundary_value ID="zmin" enabled="false">0</boundary_value>
143 - <boundary_value ID="zmax" enabled="false">0</boundary_value>
144 -         </Dirichlet_options>
145 -
146 -         </variable>
147 -
148 -         <options>
149 -             <calculate_gradients>true</calculate_gradients>
150 -
151 - <track_internalized_substrates_in_each_agent>true</track_internalized_
substrates_in_each_agent>
152 -         <!-- not yet supported -->
153 -         <initial_condition type="matlab" enabled="false">
154 -             <filename>./config/initial.mat</filename>
155 -         </initial_condition>
156 -         <!-- not yet supported -->
157 -         <dirichlet_nodes type="matlab" enabled="false">
158 -             <filename>./config/dirichlet.mat</filename>
159 -         </dirichlet_nodes>
160 -         </options>
161 - </microenvironment_setup>
162 - <cell_definitions>
163 -     <cell_definition name="default" ID="0">
164 -         <phenotype>
165 - <cycle code="6" name="Flow cytometry model (separated)">
166 -         <!-- phases are: G0/G1 , S, G2, M -->
167 -
168 - <!-- using higher than normal significant digits to match
_____divisions in default code
169 - use phase_transition_rates OR phase_durations -->
170 -
171 - <!-- <phase_transition_rates units="1/min"> -->
172 - <!-- <rate start_index="0" end_index="1"
_____fixed_duration="false">0.00334672</rate> -->
173 - <!-- <rate start_index="1" end_index="2"
_____fixed_duration="true">0.00208333</rate> -->
174 - <!-- <rate start_index="2" end_index="3"
_____fixed_duration="true">0.00416667</rate> -->
175 - <!-- <rate start_index="3" end_index="0"
_____fixed_duration="true">0.0166667</rate> -->
176 -         <!-- </phase_transition_rates> -->
177 -
178 -

```



```

179 - <!-- use phase_transition_rates OR phase_durations -->
180 -         <phase_durations units="min">
181 - <duration index="0" fixed_duration="true">300.0</duration>
182 - <duration index="1" fixed_duration="true">480</duration>
183 - <duration index="2" fixed_duration="true">240</duration>
184 - <duration index="3" fixed_duration="true">60</duration>
185 -         </phase_durations>
186 -     </cycle>
187 -
188 -
195 -
196 -         <death>
197 - <model code="100" name="apoptosis">
198 - <death_rate units="1/min">5.31667e-05</death_rate>
199 - <!-- use phase_transition_rates OR phase_durations -->
200 - <!--
201 -
205 - <phase_durations units="min">
206 - <duration index="0" fixed_duration="true">516</duration>
207 -         </phase_durations>
208 -     <parameters>
209 - <unlysed_fluid_change_rate
        units="1/min">0.05</unlysed_fluid_change_rate>
210 - <lysed_fluid_change_rate
        units="1/min">0</lysed_fluid_change_rate>
211 - <cytoplasmic_biomass_change_rate units="1/min">1.66667e-
        02</cytoplasmic_biomass_change_rate>
212 - <nuclear_biomass_change_rate units="1/min">5.83333e-
        03</nuclear_biomass_change_rate>
213 - <calcification_rate units="1/min">0</calcification_rate>
214 - <relative_rupture_volume
        units="dimensionless">2.0</relative_rupture_volume>
215 -     </parameters>
216 - </model>
217 -
218 -         <model code="101" name="Necrosis">
219 - <death_rate units="1/min">0.0</death_rate>
220 - <!-- use phase_transition_rates OR phase_durations -->
221 - <!-- necrosis uses phase_duration[0] = 0 so that it always
        immediately
222 - tries to transition and instead checks volume against the
        rupture
223 -         volume -->
224 -
225 - <!-- <phase_transition_rates units="1/min">
226 - <rate start_index="0" end_index="1"
        fixed_duration="false">9e9</rate>
227 - <rate start_index="1" end_index="2"
        fixed_duration="true">1.15741e-5</rate>
228 - </phase_transition_rates> -->
229 -
230 - <phase_durations units="min">
231 - <duration index="0" fixed_duration="false">200</duration>
232 - <duration index="1" fixed_duration="true">86400</duration>
233 - </phase_durations>
234 -
235 - <parameters>
236 - <unlysed_fluid_change_rate
        units="1/min">0.05</unlysed_fluid_change_rate>
237 - <lysed_fluid_change_rate
        units="1/min">0</lysed_fluid_change_rate>

```

```

238 - <cytoplasmic_biomass_change_rate units="1/min">1.66667e-
_____02</cytoplasmic_biomass_change_rate>
239 - <nuclear_biomass_change_rate units="1/min">5.83333e-
_____03</nuclear_biomass_change_rate>
240 - <calcification_rate units="1/min">0</calcification_rate>
241 - <relative_rupture_volume
_____units="dimensionless">2.0</relative_rupture_volume>
242 - </parameters>
243 - </model>
244 - </death>
245 -
246 - <volume>
247 - <total units="micron^3">2494</total>
248 - <fluid_fraction units="dimensionless">0.75</fluid_fraction>
249 - <nuclear units="micron^3">540</nuclear>
250 -
251 - <fluid_change_rate units="1/min">0.05</fluid_change_rate>
252 - <cytoplasmic_biomass_change_rate
_____units="1/min">0.0045</cytoplasmic_biomass_change_rate>
253 - <nuclear_biomass_change_rate
_____units="1/min">0.0055</nuclear_biomass_change_rate>
254 -
255 - <calcified_fraction units="dimensionless">0</calcified_fraction>
256 - <calcification_rate units="1/min">0</calcification_rate>
257 -
258 - <relative_rupture_volume
_____units="dimensionless">2.0</relative_rupture_volume>
259 - </volume>
260 -
261 - <mechanics>
262 - <cell_cell_adhesion_strength
_____units="micron/min">0.4</cell_cell_adhesion_strength>
263 - <cell_cell_repulsion_strength
_____units="micron/min">10.0</cell_cell_repulsion_strength>
264 - <relative_maximum_adhesion_distance
_____units="dimensionless">1.25</relative_maximum_adhesion_distance>
265 -
266 - <options>
267 - <set_relative_equilibrium_distance enabled="false"
_____units="dimensionless">0.5</set_relative_equilibrium_distance>
268 - <set_absolute_equilibrium_distance enabled="false"
_____units="micron">15.12</set_absolute_equilibrium_distance>
269 - </options>
270 - </mechanics>
271 -
272 - <motility>
273 - <speed units="micron/min">0.5</speed>
274 - <persistence_time units="min">1</persistence_time>
275 - <migration_bias units="dimensionless">0.5</migration_bias>
276 -
277 - <options>
278 - <enabled>true</enabled>
279 - <use_2D>true</use_2D>
280 - <chemotaxis>
281 - <enabled>true</enabled>
282 - <substrate>oxygen</substrate>
283 - <direction>1</direction>
284 - </chemotaxis>
285 - </options>
286 - </motility>
287 -

```

```

288 -         <secretion>
289 -             <substrate name="oxygen">
290 - <secretion_rate units="1/min">0</secretion_rate>
291 - <secretion_target units="substrate density">1</secretion_target>
292 - <uptake_rate units="1/min">6.0</uptake_rate>
293 - <net_export_rate units="total substrate/min">0</net_export_rate>
294 -             </substrate>
295 -         </secretion>
296 -
297 -         <molecular />
298 -     </phenotype>
299 -     <custom_data>
300 -         <sample units="dimensionless">1.0</sample>
301 -     </custom_data>
302 - </cell_definition>
303 - </cell_definitions>
304 -
305 - <initial_conditions>
306 -     <cell_positions type="csv" enabled="false">
307 -         <folder>./config</folder>
308 -         <filename>cells.csv</filename>
309 -     </cell_positions>
310 - </initial_conditions>
311 -
312 - <user_parameters>
313 - <random_seed type="int" units="dimensionless">0</random_seed>
314 -     <!-- example parameters from the template -->
315 -
316 - <div_initialization type="divider" description="---
      Initialization settings---"/>
317 - <!-- tissue setup -->
318 - <!-- <tumor_radius type="double"
      units="micron">200</tumor_radius> -->
319 - <number_of_cells type="int" units="none" description="initial
      number of cells (for each cell type)">5000</number_of_cells>
320 - </user_parameters>
321 -
322 - </PhysiCell_settings>

```

## ANEXO II – CÓDIGO MATLAB

```

1 - % Graficar la concentracion celular de la simulacion
2 - % Se establece el tamaño del chip, la posición de las células y en
.....cuantos
3 - % tramos se divide la longitud del chip.
4 -
5 - %Se establecen los valores iniciales de las variables
6 -
7 - n = 101; %puntos en los que se divide el chip
8 -
9 - %Establecemos las dimensiones del chip
10 - Lx = 916;
11 - Ly = 2000;
12 -
13 - %Se divide el chip en tramos iguales
14 - x = linspace(-Lx/2, Lx/2, n) %Los puntos que marcan el inicio y
_____
el final de cada tramo
15 - deltaX = Lx/(n-1);
16 -
17 - %Se cargan los datos de PhysiCell
18 - load('output00000036_cells_physicell');
19 - pos_cel = cells(2,:); %Posición en x de cada célula
20 - pos_cel_y = cells(3,:); %Posición en y de cada célula
21 - salud = cells(7,:); %Estado celular. Si el valor es menor de 100
_____
es que las
22 - células están vivas. Si es =100 o superior están muertas, en
_____
apoptosis,
23 - %lisis, etc
24 -
25 - m = length(cells) %Se introduce en una variable el numero de
_____
células que hay para que luego el contador
26 - %recorra todas las células
27 -
28 - CC = zeros(1,n-1); %Se pone a cero el contador de concentracion
_____
celular sin distinguir entre vivas o muertas
29 - CCV = zeros(1,n-1); %Se pone a cero el contador de concentracion
_____
células vivas
30 - CCM = zeros(1,n-1); %Se pone a cero el contador de concentracion
_____
células muertas
31 - CCVy = zeros(1,n-1); %Se pone a cero el contador de células vivas
_____
en la región central de Ly
32 - CCMy = zeros(1,n-1); %Se pone a cero el contador de células
_____
muertas en la región central de Ly
33 - for tramo=1:(n-1)
34 -     for i=1:m
35 -         if ((x(tramo) < pos_cel(i)) && (x(tramo+1) > pos_cel(i)) )
36 -             CC(tramo) = CC(tramo) + (1/(deltaX*Ly));
37 -         end;
38 -     end;
39 - end;
40 -
41 -
42 - %Se calcula la concenctración celular para todos los tramos
_____
diferenciando
43 - %entre celulas vivas o muertas
44 - for tramo=1:(n-1)
45 -     for i=1:m
46 -         if ( (x(tramo) < pos_cel(i)) && (x(tramo+1) > pos_cel(i))
_____
&& (salud(i) < 100) )
47 -             CCV(tramo) = CCV(tramo) + (1/(deltaX*Ly));

```

```

48 -         elseif ( (x(tramo) == pos_cel(i)) || (x(tramo+1) ==
_____ pos_cel(i)) && (salud(i) < 100) )
49 -             CCV(tramo) = CCV(tramo) + (0.5/(deltaX*Ly));
50 -         elseif ( (x(tramo) < pos_cel(i)) && (x(tramo+1) >
_____ pos_cel(i)) && (salud(i) >= 100) )
51 -             CCM(tramo) = CCM(tramo) + (1/(deltaX*Ly));
52 -         elseif ( (x(tramo) == pos_cel(i)) || (x(tramo+1) ==
_____ pos_cel(i)) && (salud(i) >= 100) )
53 -             CCM(tramo) = CCM(tramo) + (0.5/(deltaX*Ly));
54 -         end;
55 -     end;
56 - end;
57 -
58 - %Se calcula la concentración celular para todos los tramos
_____ seleccionando
59 - %solo las células pertenecientes al territorio central del chip
_____ para evitar
60 - %el efecto de los bordes
61 -
62 - for tramo=1:(n-1)
63 -     for i=1:m
64 -         if ( (x(tramo) < pos_cel(i)) && (x(tramo+1) > pos_cel(i))
_____ && (salud(i) < 100) && (pos_cel_y(i) <= (Ly/4)) &&
_____ (pos_cel_y(i) >= (-Ly/4)) )
65 -             CCVy(tramo) = CCVy(tramo) + (1/(deltaX*Ly));
66 -         elseif ( (x(tramo) == pos_cel(i)) || (x(tramo+1) ==
_____ pos_cel(i)) && (salud(i) < 100) && (pos_cel_y(i) <=
_____ (Ly/4)) && (pos_cel_y(i) >= (-Ly/4)) )
67 -             CCVy(tramo) = CCVy(tramo) + (0.5/(deltaX*Ly));
68 -         elseif ( (x(tramo) < pos_cel(i)) && (x(tramo+1) >
_____ pos_cel(i)) && (salud(i) >= 100) && (pos_cel_y(i) <=
_____ (Ly/4)) && (pos_cel_y(i) >= (-Ly/4)) )
69 -             CCMY(tramo) = CCMY(tramo) + (1/(deltaX*Ly));
70 -         elseif ( (x(tramo) == pos_cel(i)) || (x(tramo+1) ==
_____ pos_cel(i)) && (salud(i) >= 100) && (pos_cel_y(i) <=
_____ (Ly/4)) && (pos_cel_y(i) >= (-Ly/4)) )
71 -             CCMY(tramo) = CCMY(tramo) + (0.5/(deltaX*Ly));
72 -         end;
73 -     end;
74 - end;
75 -
76 - %Se aplica el factor de conversión
77 - CCM = (10^12*CCM)/(250*2.72926);
78 - CCV = (10^12*CCV)/(250*2.72926);
79 - CC = (10^12*CC)/(250*2.72926);
80 - CCVy = (10^12*CCVy)/(250*2.72926);
81 - CCMY = (10^12*CCMY)/(250*2.72926);
82 -
83 - %Se genera un vector que divida la longitud del chip en tramos
_____ iguales para
84 - %representarlo en la gráfica
85 - ejeX = linspace(-Lx/2,Lx/2,n-1);
86 -
87 - %Se grafican las concentraciones celulares frente a la longitud
_____ del chip
88 - figure(1)
89 - plot(ejeX,CCV,ejeX,CCM)
90 - title('Concentración celular en la pseudoempalizada');
91 - xlabel('Longitud del chip [\mum]');
92 - ylabel('Concentración celular [Cell/mL]');

```

```
93 - legend('Concentración celular vivas', 'Concentración celular  
muertas')  
94 - figure(2)  
95 - plot(ejeX, CC)  
96 - title('Concentración celular en la pseudoempalizada');  
97 - xlabel('Longitud del chip [\mum]');  
98 - ylabel('Concentración celular [Cell/mL]');  
99 - figure(3)  
100 - plot(ejeX, CCVy, ejeX, CCMY)  
101 - title('Concentración celular en la región central del chip');  
102 - xlabel('Longitud del chip [\mum]');  
103 - ylabel('Concentración celular [Cell/mL]');  
104 - legend('Concentración celular vivas', 'Concentración celular  
muertas')
```