



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Modelado de esferoides de cáncer de colon con
modelos basados en agentes

Modeling of colon cancer spheroids with agent based
models

Autor

Paula Orga Nebra

Directores

Raquel B. Arroyo Vázquez

Manuel Doblaré Castellano

ESCUELA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
2023

Modelado de esferoides de cáncer de colon con modelos basados en agentes

RESUMEN

En el ranking de cánceres más frecuentes, el cáncer colorrectal (CCR) aparece ocupando el tercer puesto y suponiendo el 10.7% de los nuevos casos. Es la cuarta causa más común de muerte relacionada con el cáncer en el mundo [1].

Uno de los aspectos más preocupantes de esta enfermedad es su metástasis, la cuál afecta principalmente al hígado y a los pulmones. Para conseguir detectar este cáncer antes de que metastatice, con nuevas técnicas de diagnóstico y obtener nuevos tratamientos, se utilizan diferentes métodos de estudio. Por un lado tenemos los métodos *in vivo*, basados en experimentos con animales y ensayos clínicos. Por otro, tenemos los experimentos *in vitro*, que utilizan diferentes líneas celulares. Por último, tenemos los métodos *in silico*, que hacen uso de herramientas computacionales.

Los métodos *in silico* tienen gran potencial e importancia en el estudio del cáncer. Estos modelos tratan de replicar laboratorios virtuales con condiciones completamente controladas. Además, mediante el uso de estos modelos se pueden comprobar nuevas hipótesis de forma más rápida que mediante métodos *in vitro* o *in vivo* y a un coste mucho menor.

El objetivo de este trabajo fin de grado es simular con modelos basados en agentes un esferoide de cáncer de colon. Para ello, se modelará un esferoide en el que se incluye la proliferación, la muerte celular por necrosis, la mecánica celular y el consumo de sustratos. A continuación, se modificarán los parámetros correspondientes a la proliferación, la mecánica y el consumo celular, realizando un análisis de sensibilidad y estudiando los distintos comportamientos que el esferoide pueda presentar. Por último, se realizará una validación experimental con datos *in vitro* obtenidos en el grupo TMELab.

De este TFG se obtienen conclusiones como que la mecánica celular y el nivel de recursos en el medio tiene un impacto fundamental en el comportamiento del esferoide. Además, la realización de este trabajo me ha permitido ampliar mis conocimientos en el ámbito biológico y aumentar mis habilidades con respecto al análisis y tratamiento de datos.

Índice

1. Introducción y objetivos	1
1.1. Cáncer colorrectal	1
1.2. Modelos <i>in vitro</i>	2
1.2.1. Sistemas de cultivo 2D	2
1.2.2. Sistemas de cultivo 3D	3
1.3. Modelos <i>in silico</i>	3
1.3.1. Modelos basados en agentes	3
1.3.2. PhysiCell	4
1.4. Objetivos y alcance	5
2. Metodología	7
2.1. Ecuaciones de Physicell utilizadas	7
2.1.1. Proliferación	7
2.1.2. Muerte celular: necrosis	8
2.1.3. Mecánica celular	8
2.1.4. Difusión de los sustratos y consumo celular	9
2.2. Modelo e hipótesis	10
2.3. Dominio y características de las simulaciones	12
2.4. Código y herramientas utilizadas	14
3. Resultados	17
3.1. Proliferación	17
3.2. Coeficiente de adhesión celular	18
3.3. Coeficiente de repulsión celular	24
3.4. Distancia relativa máxima de adhesión	25
3.5. Consumo celular	27
4. Validación experimental	31
4.1. Metodología del experimento <i>in vitro</i>	31
4.2. Metodología del modelo computacional	32

4.2.1. Radio celular - PhysiCell	33
4.2.2. Radio experimental	34
4.3. Resultados	35
5. Conclusiones y trabajo futuro	41
5.1. Conclusiones	41
5.2. Trabajo futuro	42
5.3. Valoración personal	43
6. Bibliografía	45
Lista de Figuras	49
Lista de Tablas	51
Anexos	52
A. Códigos de MATLAB para el tratamiento de datos	55
A.1. Cálculo de células muertas	55
A.2. Representación de los perfiles de recursos	57
A.3. Cálculo del área del esferoide	57

Capítulo 1

Introducción y objetivos

1.1. Cáncer colorrectal

El cáncer es una enfermedad que se produce cuando las células del cuerpo humano se dividen y diseminan descontroladamente. En condiciones normales, las células se multiplican con el objetivo de remplazar aquellas que han envejecido o que han sido dañadas y permitir el crecimiento y renovación de tejidos. Sin embargo, las células dañadas se siguen dividiendo cuando no deberían y eso puede dar lugar a la formación de tumores cancerosos [2].

Según la Organización Mundial de la Salud [3], el cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial. En 2020, el número de fallecidos debidos a esta enfermedad ascendió a los 10 millones y se estima que hubo casi 20 millones de nuevos casos [4]. De entre todos los diferentes tipos existentes, el cáncer colorrectal es el tercero más común y la cuarta causa de muerte relacionada con el cáncer [5].

El cáncer colorrectal (CCR) se origina en el colon o el recto aunque debido a numerosas similitudes se agrupan bajo esta denominación. Uno de los aspectos más preocupantes de este tipo de cáncer es su metástasis. La metástasis consiste en la propagación de las células cancerosas de una parte a otra del cuerpo. En el caso de los tumores colorrectales, los principales órganos de implantación de metástasis son el hígado y el pulmón [6]. El 50 % de los pacientes diagnosticados con CCR presentan metástasis hepática en algún momento de su evolución. Asimismo, el 30-40 % de éstas es descubierto en el momento del diagnóstico del tumor primario [7]. No obstante, sólo el 2-4 % de todos los pacientes tienen exclusivamente metástasis pulmonares [6].

La obtención de nuevos tratamientos contra esta enfermedad depende del conocimiento y entendimiento de la metástasis del cáncer colorrectal, al igual que de su comportamiento general.

Es por ello, por lo que se han desarrollado diferentes modelos de estudio (*in vivo*, *in vitro* e *in silico*):

- Los métodos *in vivo* son aquellos que se llevan a cabo dentro de un organismo vivo. Éstos permiten estudiar las condiciones biológicas en las que ocurre el fenómeno y cuáles son sus consecuencias. El estudio se realiza tanto en animales como en humanos (ensayos clínicos).
- Los métodos *in vitro* son realizados en dispositivos de laboratorio utilizando tejidos, células, o moléculas provenientes de organismos vivos.
- Los métodos *in silico* son simulaciones o reproducciones de experimentos *in vivo* o *in vitro*, en los que se emplean modelos matemáticos y herramientas computacionales. Estos permiten conocer las respuestas del sistema en estudio ante modificaciones de las variables que intervienen [8].

A continuación, se tratarán más en profundidad los métodos *in vitro* e *in silico* ya que son los utilizados a lo largo de este trabajo.

1.2. Modelos *in vitro*

El estudio del cáncer de colon *in vitro* se vio impulsado debido al descubrimiento de la línea celular Caco-2, obtenida del adenocarcinoma colorrectal humano. Debido a la gran heterogeneidad morfológica de estas células, la línea celular Caco-2 ha sido clonada y ligeramente modificada para poder obtener otras líneas celulares como pueden ser Caco-2/TC7, Caco-2/AQ o Caco-2/15 [9].

Otra línea celular utilizada es HCT-116. Esta línea se obtiene del colon de un hombre adulto con cáncer de colon. Las células son adherentes con una morfología epitelial [10] y presenta una mutación en el codón 13 del protooncogén RAS [11]. Las mutaciones en esta familia son muy frecuentes, encontrándose entre aproximadamente el 30 % de todos los cánceres humanos [12]. Esta línea celular será la utilizada en los experimentos *in vitro* presentados en el capítulo 4.

1.2.1. Sistemas de cultivo 2D

Un modelo utilizado para el estudio del cáncer colorrectal son los cultivos 2D. Estos consisten en una monocapa plana de células (de cualquiera de las líneas celulares mencionadas anteriormente) sobre una superficie sólida. Estas condiciones permiten un rápido crecimiento y facilitan la manipulación de las células. No obstante, estos modelos presentan una gran limitación como es la distribución de difusión del oxígeno, de los nutrientes y de los metabolitos [9], así como un comportamiento muy diferente de las células en cuanto a proliferación y migración, respecto de la situación tridimensional en el interior de un tejido.

1.2.2. Sistemas de cultivo 3D

Los modelos en 3D se han usado en estudios contra el cáncer como un modelo intermedio entre el cultivo de líneas celulares *in vitro* y tumores *in vivo*. Además, el uso de estos modelos está provocando una disminución en el uso de animales con fines experimentales. Estos modelos 3D se conforman de masas pluricelulares: organoides y esferoides. Los organoides permiten crear un modelo que reproduce la distribución espacial y la funcionalidad de un órgano específico [13]. Por otro lado, los esferoides son un conjunto de células de un solo tipo, con forma quasi-esferoidal [14].

Los esferoides permiten replicar aspectos del comportamiento tumoral y su microambiente y se pueden obtener de varias fuentes de células cancerosas. Cada una de ellas tiene una preparación en el laboratorio diferente, con el fin de obtener una forma esférica lo más perfecta posible. La obtención de esferoides en el laboratorio no es objeto de estudio en este TFG, pero se puede consultar en [14].

1.3. Modelos *in silico*

Existen distintos modelos computacionales utilizados para el estudio del cáncer: modelos continuos, modelos discretos y los modelos híbridos. En este trabajo nos vamos a centrar en los modelos basados en agentes (un tipo de modelo computacional discreto), ya que permiten incorporar fácilmente reglas biológicas (basadas en datos experimentales o hipótesis) y estudiar el esferoide a nivel celular. Los modelos basados en agentes también permiten definir las interacciones mecánicas célula-célula [15].

1.3.1. Modelos basados en agentes

El cáncer se puede entender como un sistema en el que se produce una interacción entre las células cancerosas y el microambiente en el que se encuentran [16]. A lo largo de los años se han ido desarrollando distintos modelos matemáticos con el objetivo de entender lo mejor posible esta interacción. Las simulaciones matemáticas tratan de replicar laboratorios virtuales con condiciones completamente controladas y en las que se pueden comprobar rápidamente nuevas hipótesis sobre el funcionamiento del cáncer.

Los modelos basados en agentes (ABMs por sus siglas en inglés *Agent Based Models*) son modelos discretos que simulan células individuales. En la mayoría de los casos, estos modelos se combinan con modelos continuos usados para la simulación del microambiente tumoral.

Los ABMs se pueden clasificar de diferentes formas. Atendiendo a si se utiliza mallado o no, tendremos los modelos “*lattice-based*” y los “*off-lattice*” [16].

Dependiendo del número de células con respecto a los elementos de la malla podemos diferenciar tres modelos:

- Modelo de autómatas celulares: cada elemento de la malla solo puede contener una célula.
- Modelo “*lattice-gas automata*”: cada elemento de la malla puede contener varias células.
- *Cellular Potts Model*: se emplean varios elementos de la malla para representar una única célula.

Los métodos sin malla se pueden clasificar en distintos tipos:

- Center-Based Models (CBMs). Estos modelos simulan las células enfocándose en el centro y volumen celular.
- Boundary-tracking models. Estos modelos se centran en simular los contornos celulares.

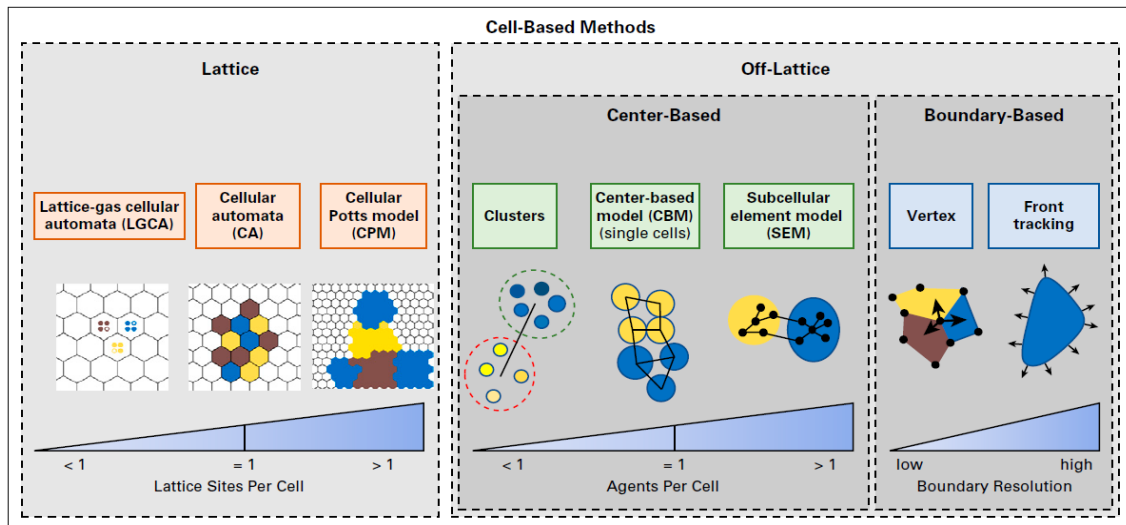


Figura 1.1: Tipos de ABMs [16]

1.3.2. PhysiCell

El *software* a utilizar para realizar las simulaciones en agentes será PhysiCell (versión 1.11.0). Este *software*, de código abierto y gratuito, usa los modelos basados en el centro (CBM de sus siglas en inglés *Center Based Models*) para la simulación celular. PhysiCell (physics-based multicellular simulator) es un simulador pluricelular que se basa en la física que regula el comportamiento celular [17].

Este *software* permite realizar simulaciones de hasta 10^6 células, donde se pueden ir modificando tanto parámetros propios de las células: proliferación, migración, apoptosis, necrosis, etc; como parámetros relativos al microambiente tumoral que afectan al comportamiento de las células cancerosas. Algunos ejemplos de estos parámetros son el oxígeno, la glucosa, los metabolitos, etc.

Physicell modela el comportamiento celular siguiendo un modelo basado en agentes, en el que cada célula corresponde a un agente. Sin embargo, el microambiente tumoral se modela en un dominio continuo. Para ello se utiliza BioFVM, un “biotransport solver” capaz de simular la secreción, difusión, consumo y decaimiento de varias sustancias en microambientes tumorales 3D [18].

1.4. Objetivos y alcance

El objetivo principal de este trabajo fin de grado es simular con modelos basados en agentes un esferoide de cáncer de colon y comparar estos resultados con experimentos *in vitro*. A través de las simulaciones se pretende entender el comportamiento de las células que forman el esferoide al modificar los parámetros que rigen las interacciones entre ellas.

En primer lugar, se modelará un esferoide en el que se incluye la proliferación, la muerte celular por necrosis, la mecánica celular y el consumo de sustratos. Sin embargo, no se incorporará la migración, dado que en los experimentos que se quieren reproducir, las células de colon, al estar suspendidas en el medio, no tienen capacidad de moverse por el entorno.

A continuación, se modificarán los parámetros correspondientes a la proliferación, la mecánica y el consumo celular, realizando un análisis de sensibilidad. Por último, se realizará una validación experimental con datos *in vitro* obtenidos en el grupo TMELab.

Capítulo 2

Metodología

Para obtener un modelo basado en agentes capaz de simular el comportamiento de un esferoide de cáncer de colon, se debe ajustar el código de PhysiCell para poder obtener resultados que se correspondan con el comportamiento observado en las células de cáncer colorrectal.

Durante este capítulo se introducirán las ecuaciones utilizadas de PhysiCell y se describirán las hipótesis y el modelo utilizado. A continuación, se detallarán los valores numéricos comunes a todas las simulaciones que se van a realizar (dominio, condiciones de contorno, etc.) y, posteriormente, se comentarán las herramientas y códigos utilizados para la elaboración de este trabajo fin de grado.

2.1. Ecuaciones de Physicell utilizadas

Como se ha comentado anteriormente en el capítulo 1, PhysiCell es un *software* de código abierto y gratuito programado en C++. En esta sección se van a describir brevemente las ecuaciones de PhysiCell que tienen mayor importancia en este trabajo. Para ampliar el conocimiento y la información acerca de estas ecuaciones, se recomienda consultar el artículo de presentación de PhysiCell [17] y el material suplementario [19].

2.1.1. Proliferación

El ciclo celular es un proceso altamente ordenado que resulta en la duplicación y transmisión de información genética de una generación celular a la siguiente. Está dividido en fases discretas: G1 es el intervalo de tiempo entre mitosis (M) y la síntesis del ADN (S) y G2, es el intervalo de tiempo entre la síntesis y la mitosis [20].

En PhysiCell, el modelo del ciclo celular consiste en una colección de fases $\{X_1, \dots, X_n\}$ y unas ratios de transición de una fase a otra $\{r_{ij}\}_{i,j=1}^n$. Cada agente k tiene un fenotipo específico $S_k(t) \in \{X_i\}_{i=1}^n$ y un parámetro de tiempo t_k que corresponde a la cantidad de tiempo que lleva la célula en su fase actual X_i . En un

intervalo de tiempo $[t, t + \Delta t]$, una célula con $\{S_k(t) = X_i\}$, tiene una probabilidad de abandonar la fase X_i y entrar en la siguiente fase X_j de:

$$\text{Prob}(S_k(t + \Delta t) = X_j \mid S_k(t) = X_i) = 1 - e^{-r_{ij}\Delta t} \approx r_{ij}\Delta t. \quad (2.1)$$

Cuando una célula finaliza el ciclo celular, se duplica y estas dos células nuevas tienen los mismos parámetros y estados asociados que la primera.

2.1.2. Muerte celular: necrosis

Se conocen dos tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis. La necrosis se asocia con una ruptura de la membrana celular, lo que conduce a la degradación nuclear. La apoptosis generalmente incluye la activación de nucleasas específicas y ocurre en una célula con una membrana plasmática intacta [21]. Sin embargo, la caspasa 8 (CASP8), una molécula fundamental que interviene en el proceso de apoptosis, queda inhibida en las células cancerígenas [22]. Esto conlleva que la muerte de las células cancerígenas sea principalmente por necrosis, por lo que es el tipo de muerte celular a estudiar.

La muerte celular se simula de manera análoga a la proliferación comentada en el apartado anterior. Se definen unas fases necróticas (N_i, N_j) y se asocian unas probabilidades al paso de un estado a otro. Si definimos un intervalo de tiempo cualquiera $[t, t + \Delta t]$, una célula puede pasar de una fase N_i a N_j con una ratio r_{ij} y una probabilidad de:

$$\text{Prob}(S(t + \Delta t) = N_i \mid S(t) = N_j) = 1 - e^{-r_{ij}\Delta t} \approx r_{ij}\Delta t. \quad (2.2)$$

2.1.3. Mecánica celular

La mecánica celular en PhysiCell modela la interacción de unas células con otras y de las células con la membrana basal. En este trabajo fin de grado, las fuerzas de interacción entre las células y la membrana basal son inexistentes debido a que no hay membrana basal, por lo que solamente se modelan las interacciones de unas células con otras.

Estas fuerzas entre células pueden ser de repulsión o adhesión. La repulsión es la fuerza que ejerce una célula sobre otra para evitar que ambas se solapen, mientras que la adhesión hace referencia a las fuerzas derivadas de las cadherinas y que unen las células.

Estas fuerzas se modelan con parámetros de adhesión, repulsión y con funciones potenciales. Las fuerzas de adhesión y repulsión de unas células con otras son F_{cca} y F_{ccr} , respectivamente y se definen a continuación:

$$F_{cca}^{ij} = -C_{cca} A_i A_j \nabla \phi_{n_{cca}, R_{i,A} + R_{j,A}}(x_j - x_i), \quad (2.3)$$

$$F_{ccr}^{ij} = -C_{ccr} \nabla \psi_{n_{cca}, R_{i,A} + R_{j,A}}(x_j - x_i), \quad (2.4)$$

donde C_{cca} , A_i , A_j son parámetros de adhesión entre las células, C_{ccr} es el coeficiente de repulsión y, ϕ_{n,R_A} y $\psi_{n,R}$, son las funciones potenciales.

Las funciones potenciales son ϕ_{n,R_A} para modelar la adhesión y $\psi_{n,R}$ para las fuerzas de repulsión. Estos potenciales permiten una transición suave de la fuerza desde un valor nulo o mínimo, hasta su máximo valor. No obstante, para simular las fuerzas en PhysiCell, no se utilizan directamente las funciones potenciales, sino sus gradientes:

$$\nabla \phi_{n,R_A}(\mathbf{r}) = \begin{cases} \frac{\mathbf{r}}{|\mathbf{r}|} \left(1 - \frac{|\mathbf{r}|}{R_A}\right)^{n+1}, & \text{si } |\mathbf{r}| \leq R_A \\ 0, & \text{en cualquier otro caso} \end{cases} \quad (2.5)$$

$$\nabla \psi_{n,R}(\mathbf{r}) = \begin{cases} -\frac{\mathbf{r}}{|\mathbf{r}|} \left(1 - \frac{|\mathbf{r}|}{R}\right)^{n+1}, & \text{si } |\mathbf{r}| \leq R \\ 0, & \text{en cualquier otro caso} \end{cases} \quad (2.6)$$

donde \mathbf{r} es vector de posición radial al centro de la célula, R es la suma de los radios de las células i y j , R_A es la máxima distancia de adhesión y n un entero positivo que regula la “suavidad” del comportamiento de las fuerzas, normalmente $n = 1$.

2.1.4. Difusión de los sustratos y consumo celular

Para poder modelar los sustratos del microambiente tumoral y las interacciones de ellos con las células, PhysiCell integra un *software* llamado BioFVM. Este *software* tiene en cuenta la secreción y consumo celular, al igual que la difusión y el decaimiento de las distintas sustancias a lo largo del tiempo de la simulación. Para profundizar en el funcionamiento y el modelo matemático detrás de BioFVM, puede consultarse el artículo [18].

La ecuación de transporte en PhysiCell que establece cómo varía la concentración de las sustancias, es la siguiente:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \mathbf{D} \circ \nabla^2 \rho - \boldsymbol{\lambda} \circ \rho + \sum_i \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i) \left[V_i \mathbf{S}_i \circ (\rho_i^* - \rho) - V_i \mathbf{U}_i \circ \rho + \mathbf{E}_i \right], \quad (2.7)$$

donde ρ es el vector de densidad o concentración de las sustancias consideradas, \mathbf{D} el vector de los coeficientes de difusión, $\boldsymbol{\lambda}$ es un vector con los ratios de decaimiento de cada sustrato. δ es la delta de Dirac, \mathbf{x} es el vector posición en el que se evalúa la concentración, \mathbf{x}_i es el vector con la posición del centro de la célula i , V_i es el volumen

de la célula i , \mathbf{S}_i es un vector con los ratios de secreción de la célula i , $\boldsymbol{\rho}_i^*$ es un vector con el nivel de saturación de cada sustrato en el medio, \mathbf{U}_i es el vector con los ratios de consumo de cada célula i y \mathbf{E}_i es el vector de ratios de producción de la sustancia neta de cada célula i .

En el caso que nos ocupa, solamente se ha utilizado un sustrato que se ha denominado “recurso” y en el que se considerará el oxígeno o la glucosa. No existe decaimiento de estos recursos ($\boldsymbol{\lambda} = 0$), ni secreción o producción neta por parte de las células ($\mathbf{S}_i = 0$, $\mathbf{E}_i = 0$). Sí que existe consumo celular \mathbf{U}_i .

2.2. Modelo e hipótesis

Partimos de una configuración inicial en la que las células vivas están agrupadas formando un esferoide en 2D de $200 \mu\text{m}$ de radio. Esta es la configuración inicial de las simulaciones que se van a realizar en este TFG para el análisis de sensibilidad. Dependiendo de los parámetros que se modifiquen y los valores que se le asignen, el esferoide se comportará de una manera u otra.

Las hipótesis y condiciones son las siguientes:

- El tiempo de la simulación es de 7200 minutos (5 días). Se ha considerado que este tiempo es suficiente para poder observar la evolución y el comportamiento del esferoide ante distintas situaciones.
- Las células no secretan ningún tipo de sustancia. Para simplificar el problema se va a considerar que de las sustancias que componen el medio en los experimentos *in vitro* (oxígeno y glucosa) sólo una de ellas tiene un efecto relevante. La sustancia de estudio se ha decidido denominar “recurso”. Independientemente de la sustancia que se trate (oxígeno o glucosa), PhysiCell trabaja con la presión parcial de la mezcla, es decir, con unidades de mmHg. Las células vivas consumen el recurso (R) existente en el medio y su consumo depende de los siguientes parámetros:

$$U = \frac{u}{R} H_n = \frac{u}{R} \left(\frac{R}{R + R^M} \right) = \frac{u}{R + R^M}, \quad (2.8)$$

donde u es el coeficiente de consumo, H_n es la función de Hill, R^M es el coeficiente de Michaelis-Menten y R es la concentración del recurso en el medio. La función de Hill regula que el consumo tenga un crecimiento sigmoideal y que a partir de cierto nivel, el consumo celular se estabilice y no aumente.

- En $t = 0$, todas las células iniciales están vivas. Si el recurso (R) en su entorno es suficiente (a partir de un cierto umbral, R^{th}), las células comenzarán a proliferar.

Basándonos en un trabajo previo [23], se utiliza el siguiente ratio de transición entre las fases de proliferación:

$$r_{ij} = \begin{cases} \frac{1}{T} \frac{R}{R^{\text{th}}} & \text{si } 0 \leq R \leq R^{\text{th}} \\ \frac{1}{T} & \text{si } R > R^{\text{th}} \end{cases}, \quad (2.9)$$

donde si el recurso es menor a cierto umbral (R^{th}) la ratio de proliferación va aumentando linealmente (es decir, hay mayor probabilidad de que la célula prolifere, cuanto más recurso tenga disponible). Si no existe recurso, la ratio de proliferación es 0. Y si hay más recurso disponible que el umbral, la ratio de proliferación será máxima (y de valor, la inversa de la duración del ciclo celular). Por simplicidad en el modelo, se considera una única fase de proliferación.

- El volumen celular total es de $2494 \mu\text{m}^3$. Este es el valor de referencia utilizado en PhysiCell por defecto. En el capítulo 4 se ajustará este parámetro al tamaño de las células de colon, pero para ver el comportamiento general del esferoide 2D, no se ha modificado.
- El modelo de muerte celular que se va a utilizar es la necrosis. Esta muerte se produce debido a estímulos externos como pueden ser: estrés químico o mecánico, calor o frío, etc [24]. En nuestro caso, la necrosis es causada por la falta de recurso. Las células van muriendo a medida que éstas consumen el recurso. Dependiendo del nivel de concentración del recurso y el consumo celular (U) de éste, irán muriendo un mayor o menor número de células. Para modelar la necrosis celular, basándonos en un trabajo previo [23], se utiliza la siguiente ratio de transición entre las fases de muerte:

$$r_{ij} = \frac{r^{\text{nec}}}{2} \left[1 - \tanh \left(\frac{R - N^{\text{th}}}{S^{\text{R}}} \right) \right], \quad (2.10)$$

donde r^{nec} es la ratio de necrosis, N^{th} es el umbral de concentración de recurso a partir del cual empiezan a morir células y S^{R} expresa cómo de resistentes y adaptables son las células a los cambios de concentración de recurso. Por simplicidad, de forma análoga a la proliferación, se considera un único ratio de transición.

- Debido a que queremos simular un esferoide suspendido en medio y que experimentalmente no se produce migración celular, ya que las células no tienen dónde anclarse para producir el movimiento, se va a suponer que las células sólo interactúan mecánicamente entre sí y que no existe migración celular de ningún tipo: ni difusiva ni quimiotáctica.

- Ya que se están modelando fenómenos biológicos, que intrínsecamente tienen comportamientos aleatorios, no se ha trabajado con un modelo determinista sino que muchas de las reglas de comportamiento celular incorporan aspectos estocásticos.

2.3. Dominio y características de las simulaciones

El dominio que se ha utilizado para todas las simulaciones es un dominio cuadrado de $600 \mu\text{m}$ de lado. Como se ha comentado anteriormente, el tiempo de simulación es de 7200 minutos, obtenemos una imagen con la configuración del esferoide cada 60 minutos y cada 360 se recoge toda la información en un archivo *.mat* para su posterior análisis.

El estudio del microambiente tumoral no es objeto de estudio en este TFG, no obstante, se deben establecer unas condiciones iniciales y unas condiciones de contorno. En este caso, debido a que tanto la proliferación como la muerte celular dependen de la concentración del recurso, es necesario establecer sus parámetros. Se establece que el coeficiente de difusión del recurso es de $60000 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{min}}$. Estas simulaciones se van a realizar suponiendo que no existe una ratio de decaimiento propio del microambiente tumoral. La concentración del recurso disminuye a lo largo del tiempo debido al coeficiente de consumo celular. Las condiciones de contorno son de tipo Dirichlet en las que se establece que la concentración inicial de este recurso es de 7,00 mmHg.

Durante el análisis de sensibilidad realizado a lo largo del capítulo 3 se establece que el recurso utilizado es el oxígeno. Los valores correspondientes al coeficiente de difusión y su concentración inicial, se han obtenido de un trabajo previo [23] en el que también se usó el *software* PhysiCell para simular el comportamiento de otro tipo de cáncer. Aunque se podría haber ajustado estos parámetros con datos obtenidos de bibliografía, a causa de la falta de tiempo, se decidió priorizar otros aspectos y centrarse en el comportamiento general y cualitativo y no dar tanta importancia a los valores exactos de cada parámetro.

El barrido paramétrico que se va a realizar consiste en ir modificando un parámetro cada vez, dejando el resto fijos con unos valores que se explican a continuación. Los parámetros a modificar son los correspondientes a la duración del ciclo celular (proliferación), el coeficiente de adhesión, el coeficiente de repulsión, la distancia máxima relativa de adhesión y el coeficiente de consumo.

En la tabla 2.1 se muestran los valores de partida de las simulaciones y que se han obtenido de [23].

Parámetros	Símbolo	Valor	Unidades
Coefficiente de difusión del recurso	D_R	60000	$\mu\text{m}^2/\text{min}$
Volumen celular	V_T	2494	μm^3
Duración ciclo celular	T	12000	min
Umbral de bajo nivel del recurso	R^{th}	7	mmHg
Ratio de necrosis	r^{nec}	$3,472 \cdot 10^{-4}$	1/min
Umbral de necrosis	N^{th}	1,6	mmHg
Sensibilidad al recurso	S^R	0,1	mmHg
Coefficiente de consumo	u	60	mmHg/min
Constante de Michaelis-Menten	R^M	2,5	mmHg
Coefficiente de adhesión celular	C_{cca}	0.4	$\mu\text{m}/\text{min}$
Coefficiente de repulsión celular	C_{ccr}	10	$\mu\text{m}/\text{min}$
Distancia máxima relativa de adhesión	R_A	1.25	Adimensional

Tabla 2.1: Principales parámetros utilizados en PhysiCell.

PhysiCell tiene un componente aleatorio debido a que trabaja con probabilidades, por lo que, con el objetivo de obtener un conjunto de datos válidos, para cada experimento se van a realizar un número determinado de réplicas.

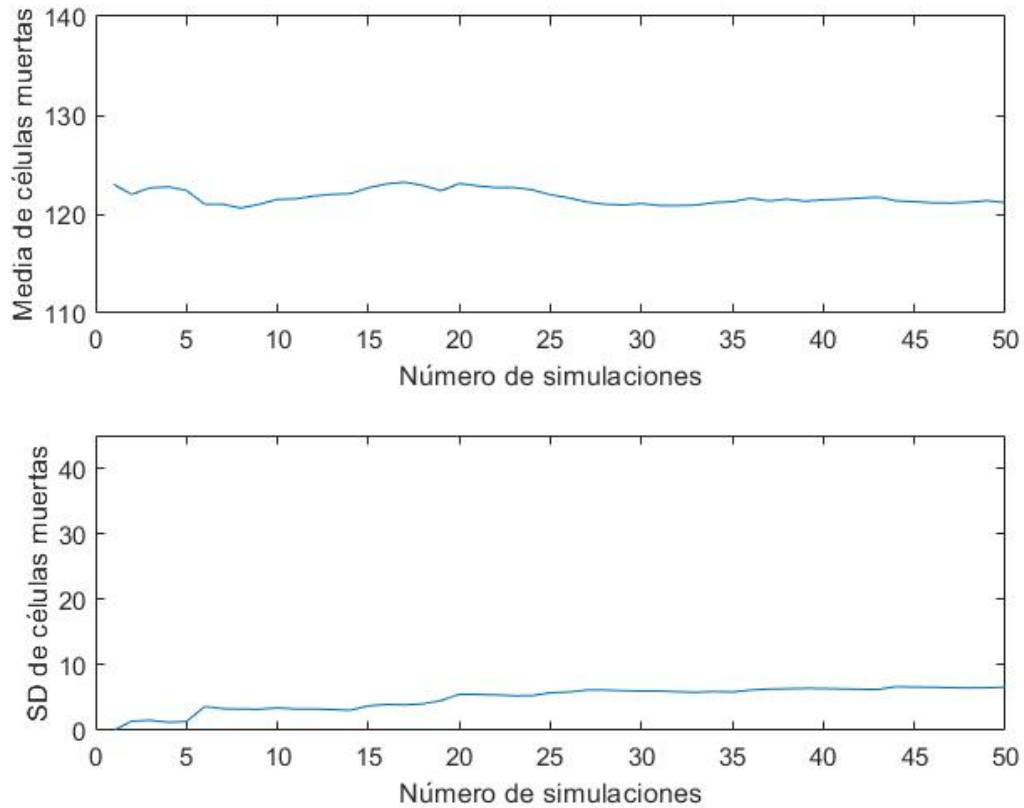


Figura 2.1: Convergencia de la media y la desviación estándar en 50 simulaciones

Consideramos que se alcanza la convergencia cuando tanto la media como la

desviación típica convergen. En términos generales, se ha constatado que para los experimentos realizados, se necesitan entre 30 y 50 réplicas para obtener un comportamiento adecuado. Dado que las simulaciones que se realizan en este TFG son muy variadas, se ha optado por realizar 50 réplicas de todas ellas para asegurar la convergencia en todas las situaciones posibles.

2.4. Código y herramientas utilizadas

Las herramientas utilizadas para la realización del trabajo han sido computacionales. Para las primeras pruebas se utilizó un ordenador personal, pero para las simulaciones finales se trabajó con el cluster de supercomputación HERMES del instituto de investigación I3A. Se ha usado PhysiCell para el modelado en agentes, MATLAB para el procesamiento y el análisis de los datos y FURY para la visualización 3D de los esferoides.

Gran parte del trabajo realizado en este TFG ha sido el análisis y tratamiento de los datos obtenidos en las simulaciones. En el anexo A pueden consultarse los códigos de MATLAB utilizados, desarrollados por la estudiante.

Cada 360 minutos se guardan dos archivos *.mat*. En el primero aparece toda la información sobre el microambiente tumoral (concentración del recurso en este caso) y otro donde aparece toda la información sobre cada una de las células.

En este último, los datos están ordenados en forma de matriz donde cada una de las filas corresponde a una variable medida por PhysiCell y cada columna corresponde a una célula. El número de variables obtenidas de PhysiCell es de 88, en consecuencia, en cada intervalo de tiempo la matriz tiene unas dimensiones de $88 \times n^o$ de agentes que existen en ese instante. A medida que pasa el tiempo de simulación, las filas permanecen constantes debido a que PhysiCell recoge los mismos datos, sin embargo, el número de agentes varía y por tanto, las columnas de esta matriz varían. Por consiguiente, la matriz que se obtiene en cada intervalo de tiempo de cada simulación tiene unas dimensiones distintas.

De las 88 filas de información que nos proporciona este *software*, en este trabajo estamos interesados principalmente en las filas 2, 3, 4 y 7,

En las filas 2, 3 y 4 viene indicada la posición X , Y y Z , respectivamente, de la célula en ese instante. Estos datos se utilizarán para obtener información sobre el tamaño final del esferoide y su evolución a lo largo del tiempo. Esto se realizará en el cálculo del área del esferoide para la validación experimental en el capítulo 4.

La fila 7 es donde viene indicado el estado de la célula. Esta es la variable a estudiar a lo largo del capítulo 3, puesto que dependiendo del número que se muestre, indicará

si la célula está viva o muerta (está viva si el valor es inferior a 100 y muerta si es 100 o mayor).

El archivo *.mat* que contiene información acerca del microambiente tumoral, se utilizará con el fin de analizar los perfiles de concentración de los recursos en aquellas simulaciones en las que sea especialmente relevante. Debido a que tanto la proliferación como la necrosis celular depende de la concentración del recurso, el estudio de estos perfiles puede ser determinante a la hora de entender y analizar los distintos comportamientos del esferoide.

Capítulo 3

Resultados

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos a partir de la realización del barrido de parámetros comentado en el capítulo 2. Se han estudiado cinco parámetros: duración del ciclo celular, coeficiente de adhesión, coeficiente de repulsión, la máxima distancia relativa sobre la que la fuerza de adhesión actúa y el coeficiente de consumo. Para cada parámetro se detallará el intervalo de valores que se simulan, se mostrarán los resultados obtenidos más significativos y se analizarán los datos obtenidos.

Para decidir el intervalo que se va a analizar, se han realizado simulaciones dando a los parámetros un valor 0 o un valor mínimo, hasta un valor donde los resultados muestran situaciones irreales: las células se salen del dominio cuadrado establecido o el conjunto de células deja de formar un esferoide.

Se han utilizado diversas técnicas de análisis de datos tales como la visualización gráfica de los resultados, el análisis estadístico y la identificación de patrones y tendencias.

3.1. Proliferación

Como se ha comentado en el capítulo 2, PhysiCell modela la proliferación como una probabilidad de transición entre fases. Por simplicidad, se va a utilizar un modelo de ciclo celular con una única fase. La célula se encuentra en esta fase cuando está proliferando y en cuanto sale de ella, la célula se divide. El tiempo de duración del ciclo (T) es el indicado en la tabla 2.1.

Se han realizado simulaciones en las que T , se encuentra en el intervalo $[4500, 48000]$ minutos. Se ha considerado que con estos valores se puede realizar un estudio del comportamiento del esferoide. Se comenzó simulando con $T = 1500$, sin embargo, la proliferación era tan rápida que un tiempo de 2 días, ya había células que se salían del dominio cuadrado establecido. El mínimo valor para el que las células no se salen del dominio es 4500 minutos, por lo que este es el primer valor de simulación.

T [min]	Media agentes	Media muertas	Media vivas
4500	956.98	190.90	766.08
5000	909.34	179.20	730.14
6000	853.68	163.94	689.74
12000	697.80	121.16	576.64
24000	631.48	105.32	526.16
48000	599.22	98.72	500.48

Tabla 3.1: Datos obtenidos al modificar T

Análisis de datos

Al aumentar el tiempo de duración del ciclo celular, la proliferación disminuye. Esto no solo afecta al número de células finales, sino también al área del esferoide final. Tal y como se puede observar en la figura 3.1a, con una duración del ciclo celular de 5000 minutos, existen células (sobre todo en la parte inferior del esferoide), que están prácticamente al borde del dominio. Por otro lado, el esferoide la figura 3.1b, presenta un menor área total y menor área de núcleo necrótico.

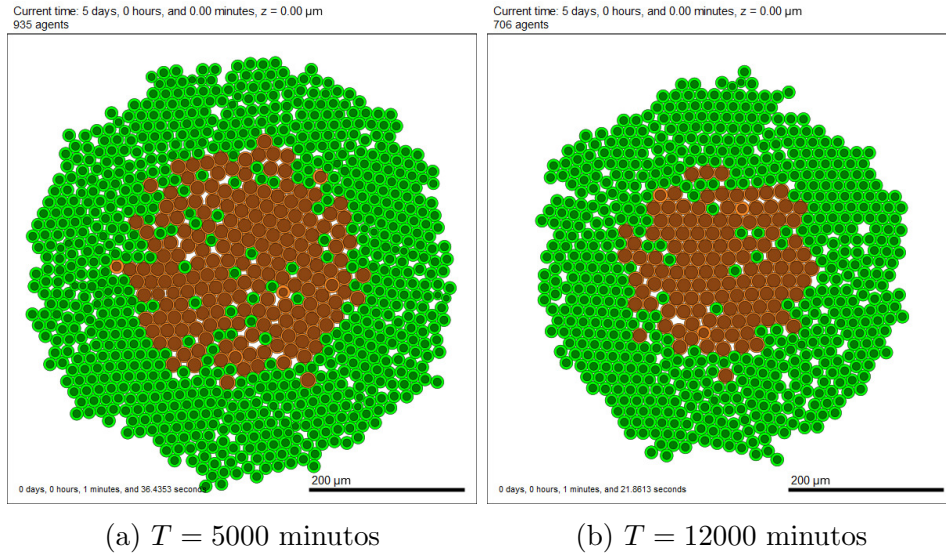
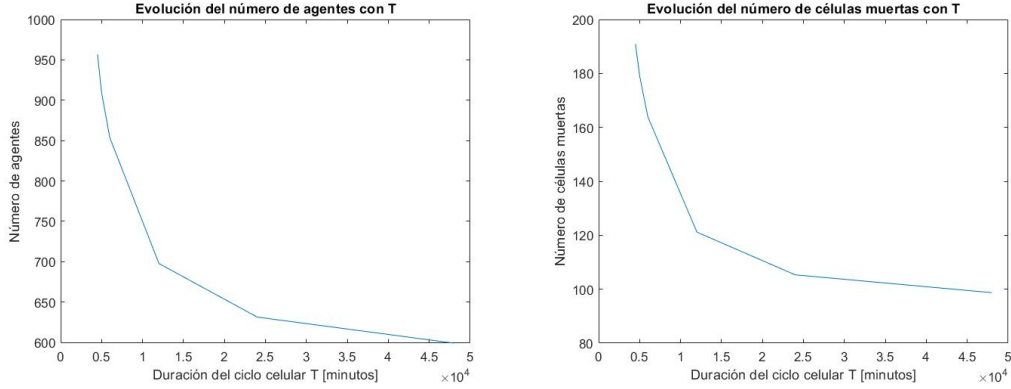


Figura 3.1: Configuración final del esferoide con $T = 5000$ y $T = 12000$ minutos

El comportamiento general de estos esferoides con respecto a modificaciones en el parámetro de la proliferación se puede observar en las gráficas de la figura 3.2

3.2. Coeficiente de adhesión celular

La adhesión celular es la unión entre una célula y un sustrato, una matriz extracelular u otra célula distinta. La fuerza de adhesión hace referencia a la fuerza de esta unión. No obstante, a día de hoy, los métodos para obtener una medida real



(a) Evolución del n^o de agentes

(b) Evolución del n^o de células muertas

Figura 3.2: Respuesta del esferoide a variaciones en la duración del ciclo celular.

cuantitativa de esta fuerza, siguen siendo inciertos o poco fiables. Esto es principalmente debido a que no se ha llegado a establecer un método o un experimento óptimo que determine el valor de esta fuerza a nivel celular o molecular [25].

Durante este trabajo fin de grado, cuando se nombra la fuerza de adhesión, se hace referencia a la fuerza de adhesión entre células. El parámetro que se modifica es C_{cca} , el coeficiente de adhesión celular en la ecuación 2.3. Los otros dos parámetros : A_i y A_j , son iguales a 1.

Inicialmente, se realizaron simulaciones en el intervalo $[0, 10] \frac{\mu m}{min}$, con el fin de obtener una idea general del comportamiento del esferoide.

Con un valor de C_{cca} superior a $5 \frac{\mu m}{min}$, la forma del esferoide se pierde por completo, por lo que podemos acotar superiormente el intervalo de valores posibles que puede tomar el coeficiente de adhesión. Con un valor de $C_{cca} = 0 \frac{\mu m}{min}$, el conjunto de células mantiene la distribución de un esferoide, por lo que se analizan los resultados más representativos e importantes dentro del intervalo $[0, 5]$.

$C_{cca} [\mu m/min]$	Media agentes	Media muertas	Media vivas
0	702.40	105.30	597.10
1	684.42	145.70	538.72
2	671.94	185.54	486.40
3	661.16	227.12	434.04
4	655.70	260.56	395.14
5	649.14	279.32	369.82

Tabla 3.2: Datos obtenidos al modificar C_{cca}

Análisis de datos

Con una fuerza de adhesión nula, se puede observar en la simulación que a medida que el núcleo necrótico crece, éste va empujando hacia el exterior a las células vivas

obteniendo un esferoide final con un radio mayor al de cualquier otra situación. Al ser inexistente la fuerza de adhesión, las células vivas deben desplazarse para dejar hueco al núcleo necrótico. Además, se forman dentro del esferoide espacios no solo entre las células vivas, sino también en el interior del núcleo necrótico.

A medida que la fuerza de adhesión entre las células va aumentando, el radio del esferoide final decrece y la cantidad de espacios libre entre las células también, tal y como se puede apreciar en la figura 3.3.

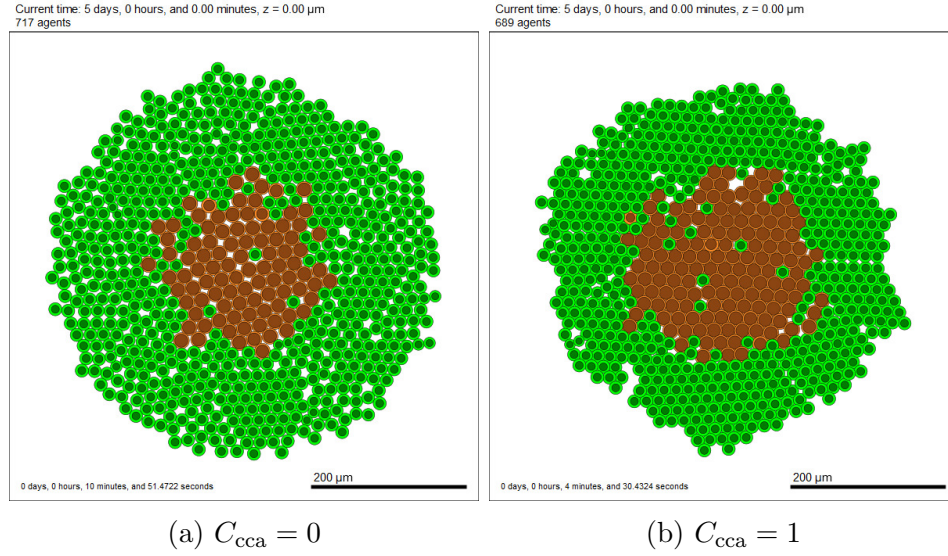


Figura 3.3: Configuración final del esferoide con $C_{cca} = 0$ y $C_{cca} = 1 \frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$

En el momento en el que C_{cca} supera el valor de $1 \frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$, las células se superponen cada vez más, hasta alcanzar una configuración en la que el esferoide no presenta ningún espacio entre sus células. Esto ocurre para un valor de C_{cca} igual a $3 \frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$, (figura 3.4a).

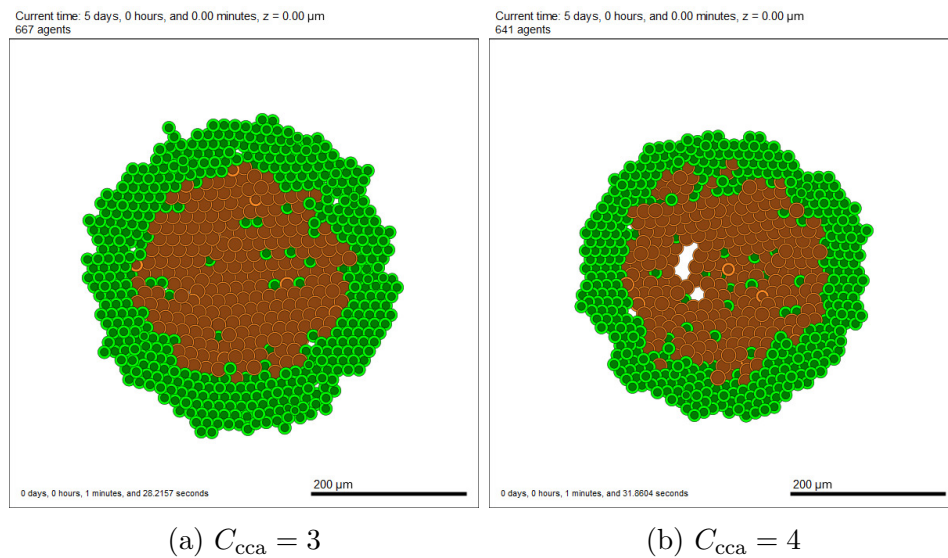


Figura 3.4: Configuración final del esferoide con $C_{cca} = 3$ y $C_{cca} = 4 \frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$

Con un valor de $4 \frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$, se forma un hueco en el interior del esferoide, un espacio sin ocupar (figura 3.4b). Este hueco puede aparecer en el interior del núcleo necrótico, o en su frontera con las células vivas. Si se continua incrementando el valor del parámetro, se observa como este espacio va aumentando de tamaño (figura 3.5a), hasta que se forma una clara separación entre el núcleo necrótico y las células vivas. Esta separación ocurre con un valor de $5 \frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$ (figura 3.5b).

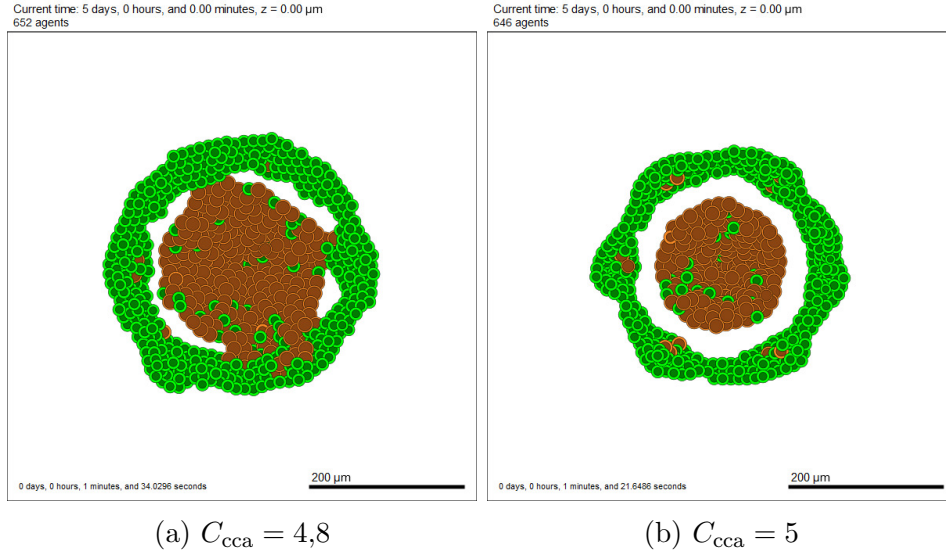


Figura 3.5: Configuración final del esferoide con $C_{cca} = 4,8$ y $C_{cca} = 5 \frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$

Por otra parte, tras analizar los vídeos de las simulaciones con valores de $C_{cca} = 3$, se observó cómo durante las primeras horas, aparecen unos huecos en el esferoide, que posteriormente desaparecen (figura 3.6). La formación de estos huecos se asemejan a la formación de grietas. La causas de esta aparición podría ser el hecho de que el esferoide no se encuentra en equilibrio. Existen zonas del esferoide donde una fuerza es mayor que otra (tira más) y esto provoca que el esferoide se abra ligeramente, dando lugar a estas grietas.

También cabe destacar la formación de patrones geométricos temporales en aquellas simulaciones con valores del parámetro de adhesión superiores a 3. Esto se puede observar en la figura 3.7, donde se muestra la configuración del esferoide al cabo de 1 hora (figura 3.7a) y al cabo de 2 horas (figura 3.7b). Estas imágenes muestran la simulación con un valor de C_{cca} igual a 4.

Estos patrones geométricos podrían deberse al hecho de que el esferoide inicial no es una esfera perfecta y no se encuentra en equilibrio. En la figura 3.8, pueden observarse 6 zonas en las que las células del contorno del esferoide están formando una recta, no una circunferencia.

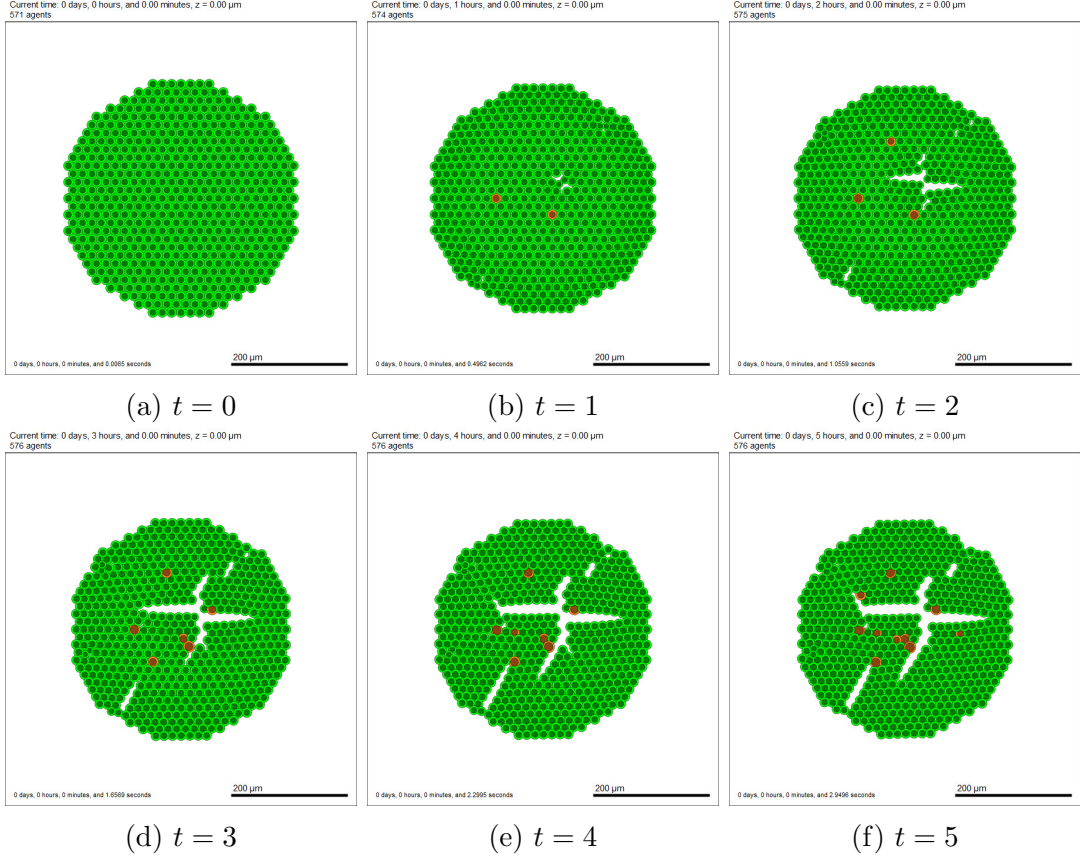


Figura 3.6: Formación de espacios en el interior del esferoide durante las primeras horas de la simulación con $C_{cca} = 3$

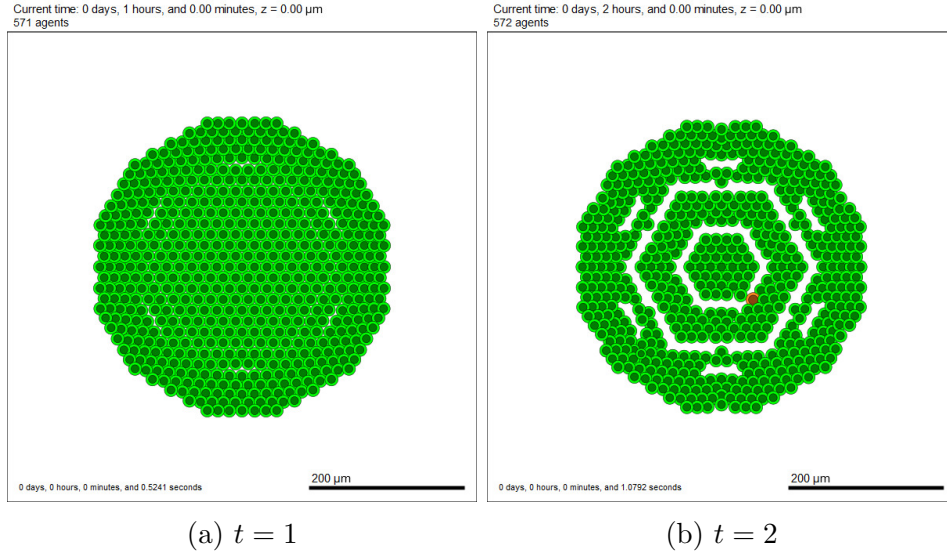


Figura 3.7: Formación de patrones geométricos durante las primeras horas de la simulación con $C_{cca} = 4$

Tras analizar los datos obtenidos de las simulaciones comentadas anteriormente, la respuesta del esferoide a variaciones en el coeficiente de adhesión celular se puede encontrar en la figura 3.9.

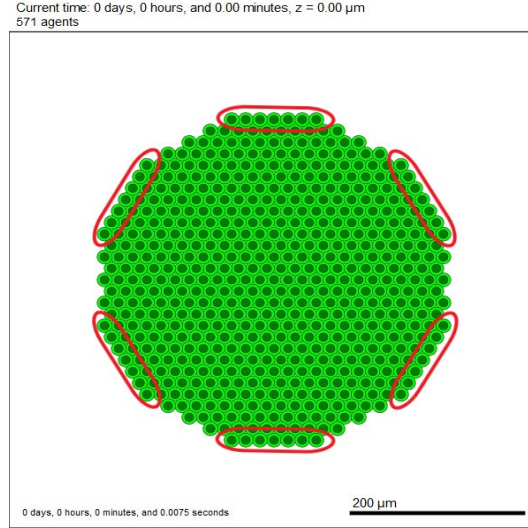


Figura 3.8: Contorno recto en la configuración inicial

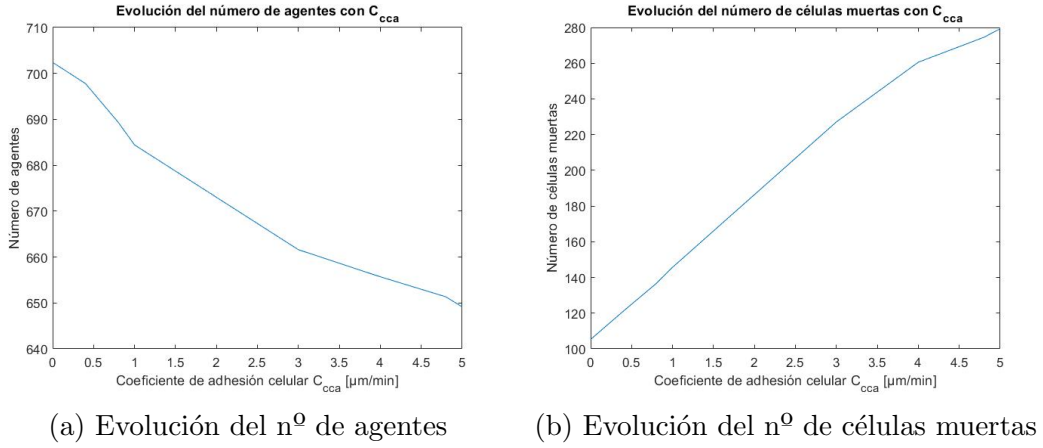
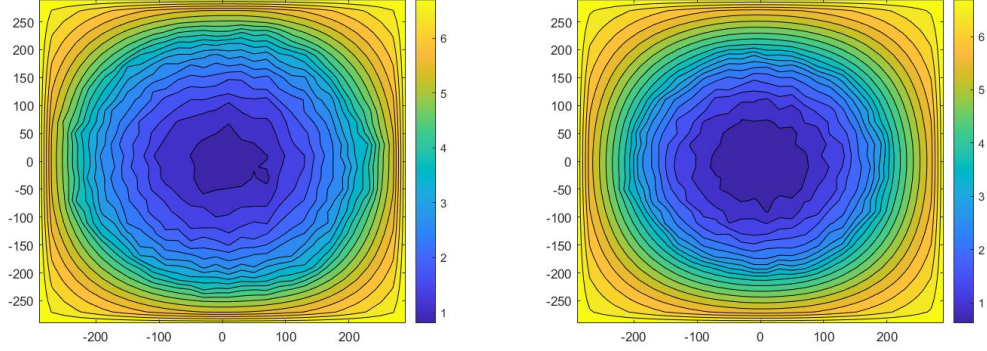


Figura 3.9: Respuesta del esferoide a variaciones en el coeficiente de adhesión celular

El número total de agentes al finalizar la simulación disminuye con el aumento del parámetro C_{cca} , tal y como se observa en la figura 3.9a. Asimismo, este aumento de C_{cca} , provoca un aumento de las células muertas (figura 3.9b). Este comportamiento es prácticamente lineal.

Una hipótesis de este comportamiento es que al aumentar la fuerza de adhesión entre las células, el esferoide se comprime y las células se concentran en el centro. Debido a este aumento de concentración celular y al consumo celular, el recurso disponible disminuye, lo que provoca la muerte por necrosis. De la misma manera, la disminución de la concentración del recurso causa una disminución en la proliferación celular. En la figura 3.10, podemos ver los perfiles de concentración del recurso en dos situaciones: con un valor de C_{cca} igual a 0,4 (figura 3.10a) y con un valor de C_{cca} igual a 3 (figura 3.10b).

Se puede observar que el área con menor concentración de recurso, es mayor en la figura 3.10b. Por lo que es coherente que exista un mayor número de muertes y una menor proliferación.



(a) Perfil de recursos con $C_{cca} = 0,4$

(b) Perfil de recursos con $C_{cca} = 3$

Figura 3.10: Comparación de la concentración de recursos

Para valores superiores a $5 \frac{\mu m}{min}$, la forma del esferoide se pierde y las simulaciones no corresponden a circunstancias reales.

3.3. Coeficiente de repulsión celular

La fuerza de repulsión modela la resistencia elástica a la deformación y el parámetro que se va a modificar es el coeficiente de repulsión celular, C_{ccr} , de la ecuación 2.4. La fuerza de repulsión solo actúa cuando la distancia entre las células es 0.

Continuando con la metodología empleada para la obtención del intervalo del coeficiente de adhesión, se realizaron simulaciones comenzando con un coeficiente de repulsión de 0. No obstante, con este parámetro, la configuración y el comportamiento obtenido no es el propio de un esferoide, por lo que se continua aumentando el parámetro hasta obtener la formación de uno. Esto ocurre para un valor de C_{ccr} igual a $0,8 \frac{\mu m}{min}$.

$C_{ccr} [\mu m/min]$	Media agentes	Media muertas	Media vivas
0.8	663.38	227.06	436.32
1.0	667.10	222.16	444.94
2.5	677.78	185.20	492.58
5.0	688.18	147.76	540.42
15.0	697.70	110.92	586.78
25.0	701.2	100.46	600.76
50.0	705.88	89.22	616.66

Tabla 3.3: Datos obtenidos al modificar C_{ccr}

Análisis de datos

El comportamiento del esferoide a la modificación del parámetro C_{ccr} , es el inverso al de la modificación del parámetros C_{cca} , analizado en el apartado anterior. Con un coeficiente de repulsión muy bajo ($C_{\text{ccr}} = 0,8$), la configuración final del esferoide es similar a la de una adhesión alta ($C_{\text{cca}} = 5$) y viceversa.

Durante el intervalo de $[0,8,1]$, aparecen comportamientos ya analizados: para un valor de 0,8, durante las primeras horas también se forma un patrón geométrico, que posteriormente, desaparece y para un valor de 1, aparecen grietas. No todas estas grietas se cierran completamente al finalizar la simulación y por tanto, quedan huecos en el interior del esferoide, tanto en el núcleo necrótico, como en la frontera de separación entre las células vivas y las muertas.

En el momento en que el valor de $C_{\text{ccr}} = 1,5$, la configuración final del esferoide se asemeja a aquella que se obtenía con un valor de $C_{\text{cca}} = 3$, un esferoide con células superpuestas en las que no existe prácticamente ningún hueco. A partir de $C_{\text{ccr}} = 2,5$, el comportamiento del esferoide se estabiliza: las células están cada vez más alejadas unas de otras, provocando un esferoide lleno de huecos y de un radio mayor.

El máximo valor que se ha llegado a simular es $C_{\text{ccr}} = 250$, en el que se comprobaba que las células se salían del dominio establecido y se perdía la forma del esferoide, asemejándose a una distribución de células al azar.

Tras analizar los datos obtenidos de las simulaciones comentadas anteriormente, se establece que la respuesta del esferoide a variaciones en el coeficiente de repulsión es el siguiente:

El número total de agentes al finalizar la simulación aumenta con el aumento del parámetro C_{ccr} , tal y como se observa en la figura 3.12a. A partir de un valor de $C_{\text{ccr}} = 20$, el comportamiento comienza a ser más lineal. Asimismo, el aumento de C_{ccr} , provoca además una disminución de las células muertas (figura 3.12b). Este comportamiento es el inverso al producido por el coeficiente de adhesión, por lo que se puede establecer una relación entre ambos.

3.4. Distancia relativa máxima de adhesión

La distancia máxima relativa de adhesión hace referencia al radio de influencia de la fuerza de adhesión de unas células sobre otras. El parámetro que se va a modificar es R_A , que se encuentra en el gradiente de la función potencial ϕ (ecuación 2.5). Este parámetro, $\nabla\phi$, se encuentra en la ecuación 2.3, por lo que al modificarlo se está modificando también la fuerza de adhesión.

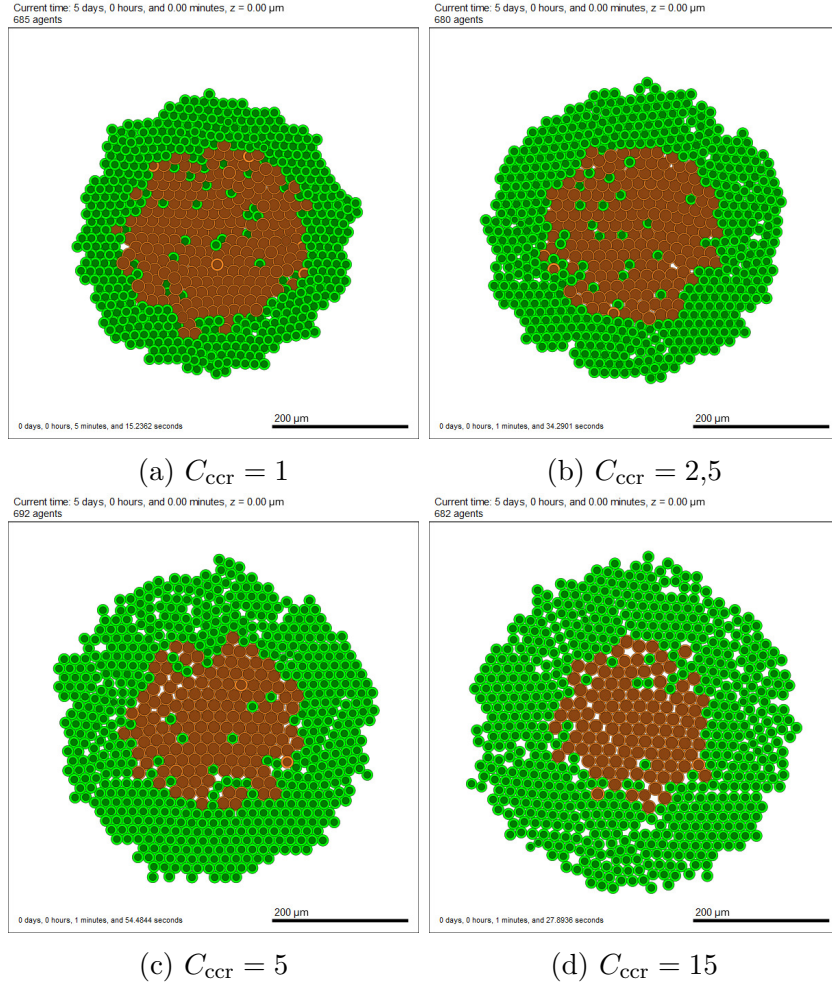


Figura 3.11: Evolución de la configuración final del esferoide con un coeficiente de repulsión de 1,5 a 15 $\frac{\mu m}{min}$

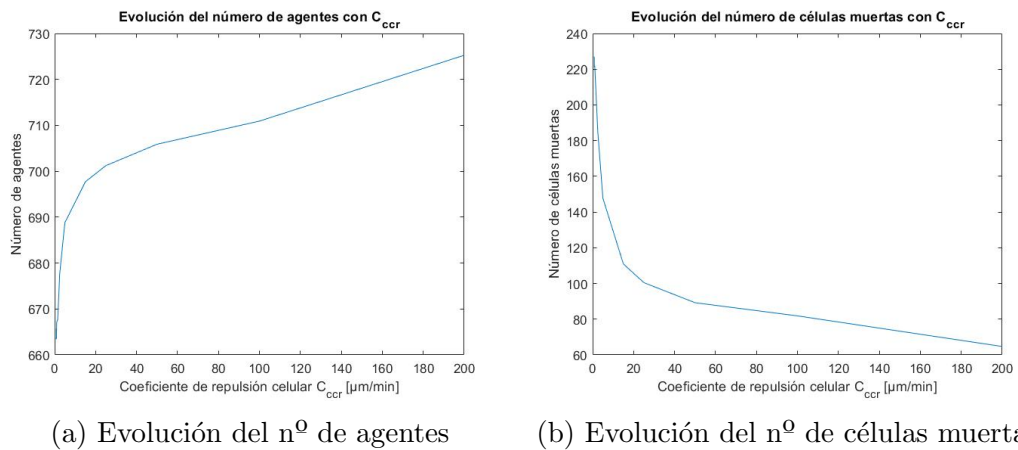


Figura 3.12: Respuesta del esferoide a variaciones en el coeficiente de repulsión

R_A toma valores comprendidos entre $[1, 2]$, por consiguiente, se han obtenido datos para los valores: 1, 1,25, 1,5, 1,75 y 2. . Un R_A igual a 1, implica que la fuerza de adhesión que ejerce la célula 1 sobre la célula 2 solo actúa cuando la célula 2 se encuentra a una

distancia igual a la suma de los radios de la célula 1 y la célula 2. Al igual que ocurre con la fuerza de repulsión. Por el contrario, un R_A igual a 2, significa que la fuerza de adhesión actúa hasta una distancia máxima de $2r$, siendo r , el radio de la célula.

R_A	Media agentes	Media muertas	Media vivas
1	706.28	108.10	598.16
1.25	697.80	121.16	576.64
1.5	688.58	143.12	545.46
1.75	682.94	162.90	520.04
2	674.38	193.44	480.94

Tabla 3.4: Datos obtenidos al modificar R_A

Análisis de datos

Con una máxima distancia relativa de 1, las células están más dispersas y se forman los huecos en el interior del esferoide. La cantidad de huecos disminuye al aumentar la distancia relativa, hasta obtener con R_A igual a 1,75, un esferoide prácticamente compacto y sin apenas huecos. Por otra parte, al incrementar este parámetro, las células se superponen y el radio del esferoide final disminuye. Esta evolución se muestra en la figura 3.13

El comportamiento es similar al barrido de parámetros del coeficiente de adhesión. La evolución del número de agentes y células muertas se pueden observar en la figura 3.14.

3.5. Consumo celular

La modificación del consumo celular se realiza directamente mediante la variación del coeficiente de consumo, u , idéntico a todas las células. Este parámetro se encuentra en la ecuación 2.8.

Hasta ahora las simulaciones se han realizado con un $u = 60$ mmHg/min, tal y como se indicó en el capítulo 2. El intervalo de variación de este parámetro es de $[30, 120]$. Estos valores permitirán comprender el comportamiento del esferoide en función del nivel de recurso disponible en el dominio. Un mayor coeficiente de consumo celular supone un menor nivel de recursos del que disponen las células. Esto afectará tanto a la proliferación como a la muerte por necrosis.

En este caso se han realizado 30 réplicas de cada simulación en lugar de 50, debido al coste computacional y la falta de tiempo.

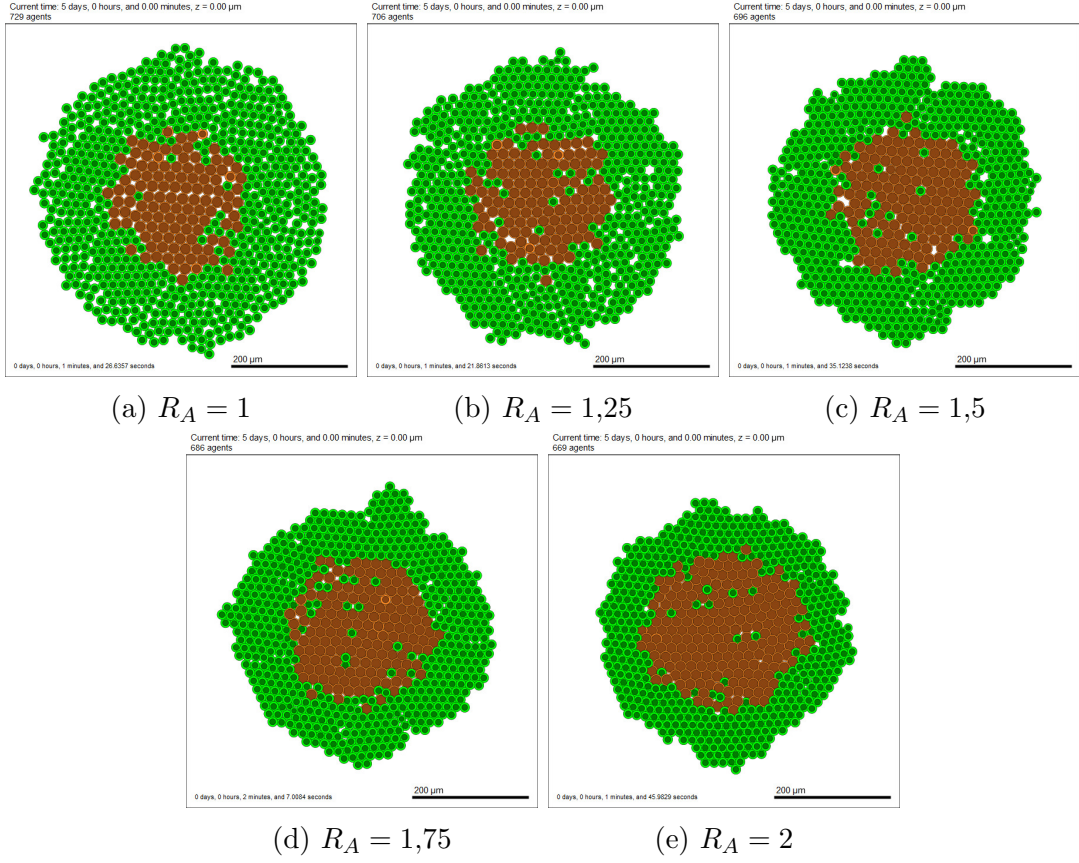


Figura 3.13: Evolución de la configuración final del esferoide con R_A

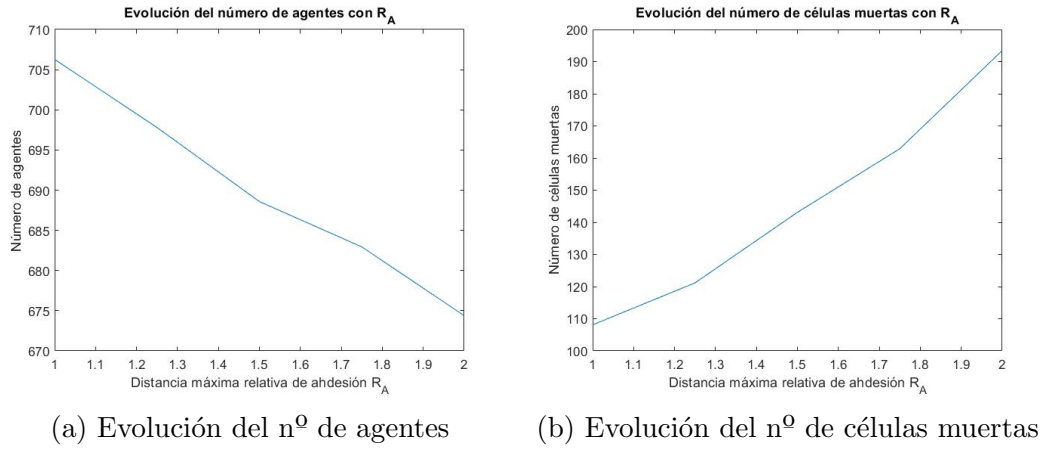


Figura 3.14: Respuesta del esferoide a variaciones de R_A

u [mmHg/min]	Media agentes	Media muertas	Media vivas
30	808.13	0	808.13
60	699.70	121.06	578.63
120	617.33	388.47	228.87
180	593.37	482.57	110.80

Tabla 3.5: Datos obtenidos al modificar u

Análisis de datos

Como era de esperar, en la simulación con el coeficiente de consumo celular menor, $u = 30$ mmHg/min, las células tienen una proliferación mayor. El nivel de recurso en el dominio es tan elevado, que no se llega a formar núcleo necrótico. No obstante, a medida que este coeficiente aumenta, el nivel de recurso disminuye, lo que provoca una disminución del número de agentes finales y la formación de un núcleo necrótico cada vez mayor. Cabe destacar que para un consumo celular de $u = 120$ mmHg/min, el número de células muertas es más del doble del número de agentes final.

En la figura 3.15 se muestran las configuraciones finales del esferoide para $u = 30$ mmHg/min (figura 3.15a) y $u = 120$ mmHg/min (figura 3.15b). Se ha optado por mostrar estos valores ya que la simulación con $u = 60$ mmHg/min equivale a la realizada con $C_{cca} = 0,4$, que ha sido estudiada con anterioridad en el apartado correspondiente al coeficiente de adhesión celular. Por otro lado, un coeficiente de consumo $u = 180$ mmHg/min, resulta excesivo debido a que el núcleo necrótico está formado por más del 80 % de las células del esferoide.

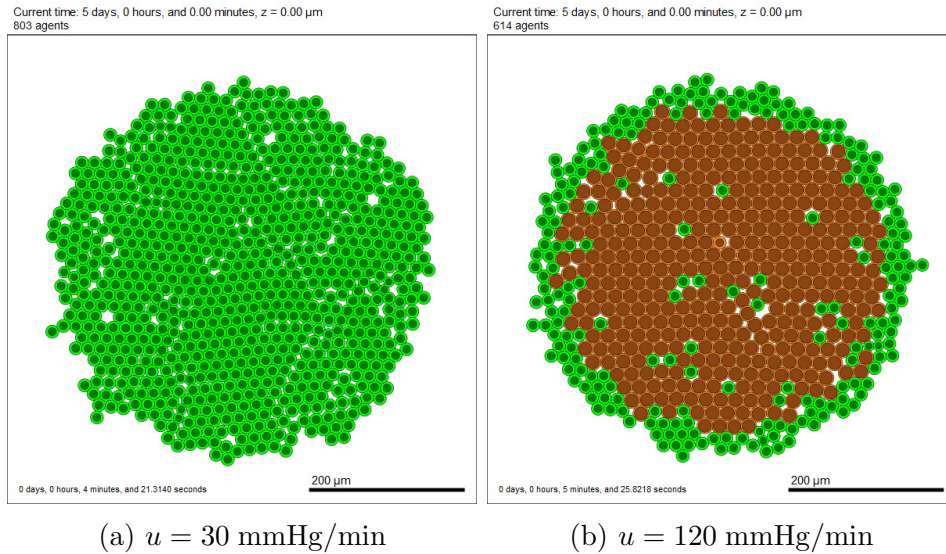
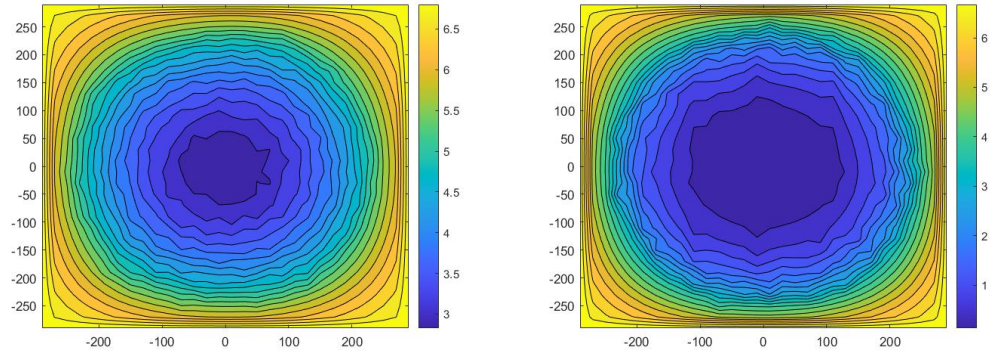


Figura 3.15: Configuración final del esferoide con $u = 30$ mmHg/min y $u = 120$ mmHg/min

Asimismo, y con el fin de visualizar el nivel de recurso, se ha representado el perfil de recurso final, en $t = 5$ días, de las simulaciones con $u = 30$ mmHg/min y $u = 120$ mmHg/min (figura 3.16).

En ambas figuras, el menor nivel de recurso se encuentra en el centro del esferoide, como era de esperar. No obstante, estos niveles son distintos para los distintos valores del coeficiente de consumo celular.



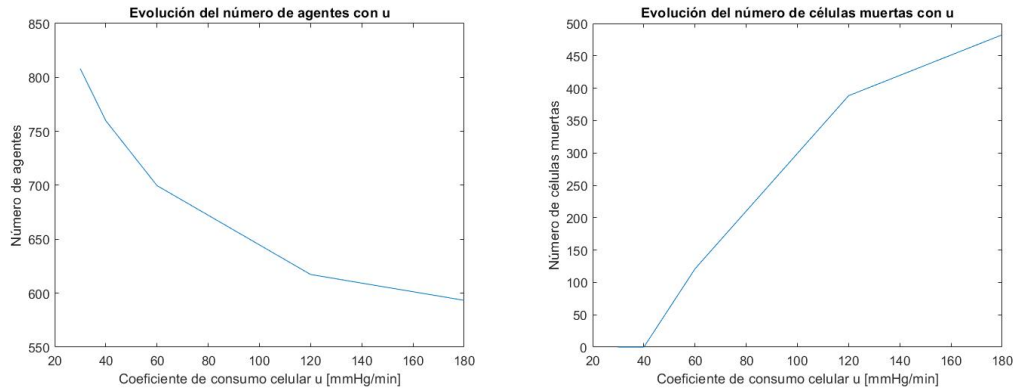
(a) Perfil de recursos con $u = 30$ mmHg/min (b) Perfil de recursos con $u = 120$ mmHg/min

Figura 3.16: Configuración final del esferoide con $u = 30$ mmHg/min y $u = 120$ mmHg/min

En la figura 3.16a, el menor nivel de recurso es 3, que corresponde con el área coloreada de un azul más oscuro en el centro del esferoide. Sin embargo, en la figura 3.16b, no solo el área coloreada de azul oscuro es mucho mayor, sino que su nivel es 1.

Con un coeficiente de consumo celular $u = 120$ mmHg/min, existe un mayor área con un nivel de recurso mínimo.

Se establece que la respuesta del esferoide a variaciones en el coeficiente de consumo celular, es la siguiente:



(a) Evolución del n° de agentes (b) Evolución del n° de células muertas

Figura 3.17: Respuesta del esferoide a variaciones de u mmHg/min

Capítulo 4

Validación experimental

En este capítulo se realizará una validación experimental del modelo obtenido con PhysiCell. Los datos experimentales con los que se va a realizar esta validación han sido obtenidos en el grupo TMELab.

Para la realización de este experimento *in vitro*, se formaron los esferoides con células de la línea de colon HCT-116. El experimento dura 13 días (312 horas) y se midió el área de cada uno de ellos cada 24 horas.

El objetivo de este capítulo es obtener un conjunto de parámetros que consigan replicar la tendencia de crecimiento de los esferoides observada en los datos experimentales.

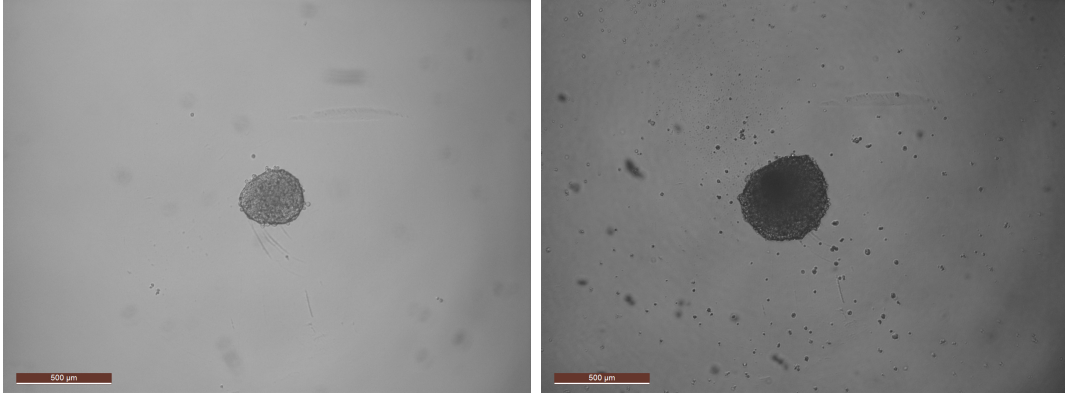
4.1. Metodología del experimento *in vitro*

La línea celular que se ha utilizado es la HCT-116 y los esferoides se obtuvieron con la técnica de *liquid overlay* (LOT de sus siglas en ingles *Liquid Overlay Technique*). Esta técnica se basa en utilizar una superficie no adhesiva que evita la adhesión celular. Las células comienzan a adherirse entre sí, formando agregados y finalmente esferoides [26].

Se sembraron 1000 células iniciales en placas de 96 pocillos tratadas con solución antiadherente. En cada pocillo empleado se pusieron 1000 células. Las placas se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 rpm y posteriormente se llevaron a un incubador (37°C y 5 % CO_2). Los cultivos se dejaron 48 horas para asegurar que los esferoides se formaran correctamente. Se obtuvieron 15 esferoides.

El medio utilizado es bajo en glucosa (1 g/L) y no tiene suero fetal bovino (concentración de 0 % v/v). El experimento se realizó durante 312 horas, recogiendo datos sobre el área del esferoide cada 24 horas. Durante estas 312 horas no se comprobó si se llega a formar núcleo necrótico y se estima, que en caso de su formación, sería uno muy pequeño.

En la Figura 4.1, se pueden observar las imágenes inicial y final de uno de los esferoides formados.



(a) Esferoide inicial en $t = 0$

(b) Esferoide final en $t = 312$ horas

Figura 4.1: Imágenes del esferoide inicial y final

En la figura 4.2 se puede representa la evolución del área de los 15 esferoides en 312 horas. En color gris se han representado los 15 experimentos y en color negro, con una línea de mayor grosor, la media. Es esta tendencia media la que se va a intentar replicar.

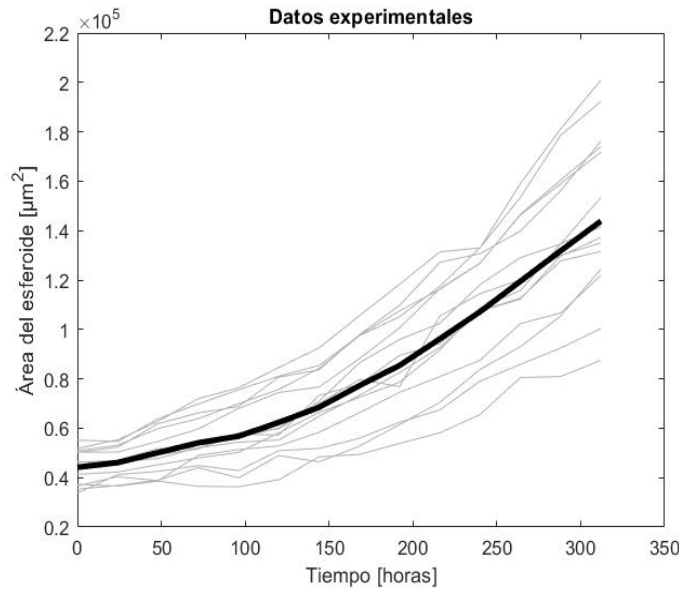


Figura 4.2: Resultados obtenidos del experimento *in vitro*

4.2. Metodología del modelo computacional

Para poder replicar el comportamiento de los esferoides, es necesario realizar algunas modificaciones al código de PhysiCell utilizado hasta ahora. El medio en el que se han

realizado los experimentos *in vitro*, es bajo en glucosa, sin suero fetal bovino y con oxígeno en abundancia. En consecuencia, el recurso utilizado a lo largo de este capítulo no es el oxígeno sino la glucosa.

Debido a que no se registraron datos reales acerca de la glucosa, se han mantenido algunos de los parámetros utilizados previamente. No obstante, se prevé a futuro repetir esta validación experimental con los datos reales de la glucosa utilizada.

Lo primero que se debe hacer es asegurar que las condiciones iniciales de las simulaciones corresponden con las del experimento *in vitro*. Dado que la variable de control del experimento es el área del esferoide, se debe ajustar el radio celular para que el área inicial del esferoide en PhysiCell equivalga al área media de los esferoides en los experimentos.

Para ello, en primer lugar se va a realizar un ajuste del radio celular en PhysiCell haciendo un barrido paramétrico. Y en segundo lugar, se obtendrá el radio celular medio a partir de imágenes de cultivo de células HCT-116 en reposo (ver figura 4.3) para contrastar que el valor de ambos radios coinciden.

En caso de que no coincidieran, eso significaría que las interacciones mecánicas iniciales no son las mismas y nos permitiría ajustar los parámetros mecánicos y la concentración celular inicial del esferoide.

4.2.1. Radio celular - PhysiCell

El radio celular en PhysiCell se ha obtenido buscando que el área inicial de la simulación coincida lo máximo posible con el área inicial del experimento *in vitro*.

Dado que sabemos que el número de células iniciales es 1000 y el área media del esferoide en ese instante tiene un valor de $4.418 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$, se puede estimar el radio celular.

Una vez fijado este valor, se modifica el radio del esferoide hasta obtener un área inicial lo más similar posible a los datos del experimento *in vitro*.

El hecho de modificar el radio celular, implica también la modificación de otros parámetros como el volumen celular total, el área superficial de las células, el radio del núcleo celular, etc.

Tras realizar varias pruebas se ha obtenido que los valores que más fielmente replican el área inicial del experimento *in vitro* son los siguientes:

La media de las áreas iniciales de los 15 esferoides es de $4.418 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$ y con los valores de la tabla 4.1, el valor obtenido es de $4.447 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$. El error obtenido en esta aproximación es del 0.645 %. Esto se ha calculado con la siguiente fórmula:

Parámetro	Valor	Unidades
Radio celular	11.20	μm
Radio del núcleo	6.72	μm
Superficie celular	1576.32	μm^2
Volumen celular	5884.94	μm^3
Volumen del núcleo	1274.20	μm^3

Tabla 4.1: Geometría de las células

$$\text{Error} = \frac{\text{Valor aproximado} - \text{Valor real}}{\text{Valor real}} \cdot 100 \quad (4.1)$$

4.2.2. Radio experimental

De los experimentos *in vitro* también se obtuvieron imágenes de las células en reposo antes de formar el esferoide (ver figura 4.3a).

Mediante funciones de tratamiento de imagen en MATLAB, se obtuvo el radio celular medio ($r = 5,48 \mu\text{m}$). En la figura 4.3b se puede ver un recorte aumentado de la otra imagen, con la detección de círculos utilizada en MATLAB para estimar el radio celular.

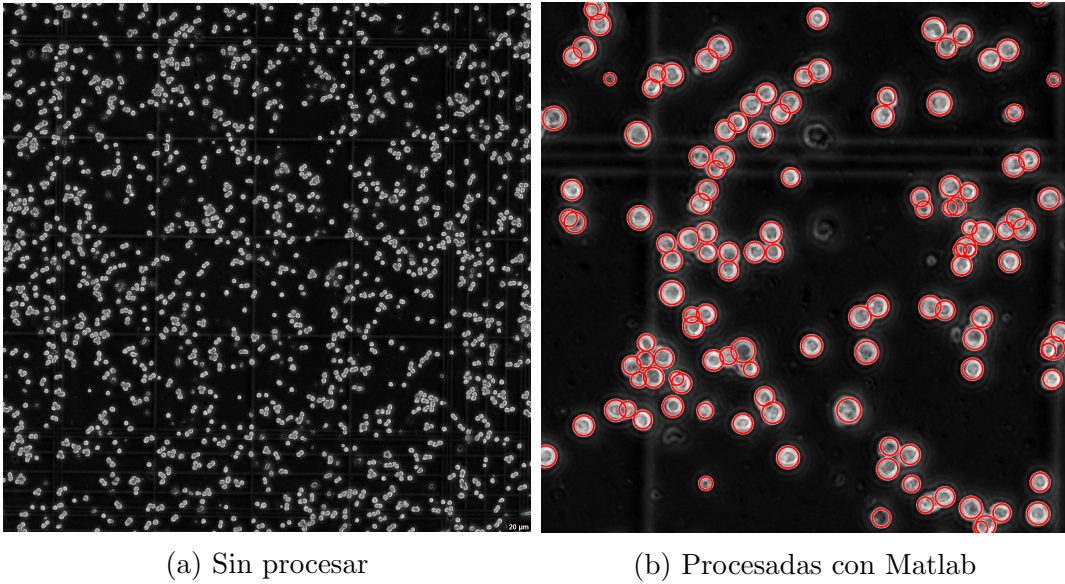


Figura 4.3: Imágenes de células de cáncer de colon HCT-116

El valor obtenido experimentalmente ($r = 5,48 \mu\text{m}$) y el obtenido a través de PhysiCell ($r = 11,2 \mu\text{m}$) son muy diferentes. Se ha decidido utilizar el obtenido en PhysiCell para ajustar los experimentos, pero se prevé a futuro analizar la gran diferencia de tamaños y entender el porqué de esa discrepancia.

4.3. Resultados

Con el objetivo de intentar replicar la tendencia del crecimiento del esferoide en el experimento *in vitro*, los parámetros que se van a variar son tres: la proliferación, la fuerza de adhesión y el consumo. El resto de parámetros permanecen constantes y son los comentados en el capítulo 2.

Se ha decidido modificar esos 3 parámetros ya que son los que, como se vio en el capítulo anterior, generan efectos independientes entre sí. Mientras que el resto de parámetros, o establecen características propias de las células o del medio, o los parámetros tienen una dependencia de comportamiento entre sí (como se vio en el caso de la repulsión, la adhesión y la distancia de adhesión).

El primer parámetro que se ajusta es el correspondiente a la proliferación. El procedimiento es el siguiente: se cambia el valor del parámetro, se realiza la simulación, se obtiene el valor del área cada 24 horas y se representan en la misma gráfica que los datos experimentales. Esta representación visual permite observar la tendencia del crecimiento del esferoide simulado y tomar la decisión de aumentar o disminuir los parámetros.

Tras la realización de varias simulaciones modificando únicamente la proliferación, se obtuvo la figura 4.4 con un valor de la duración del ciclo celular de 5000 minutos.

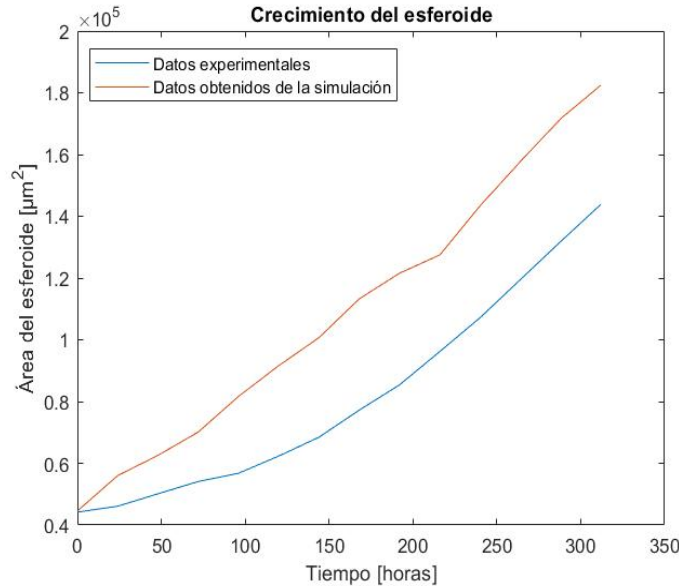


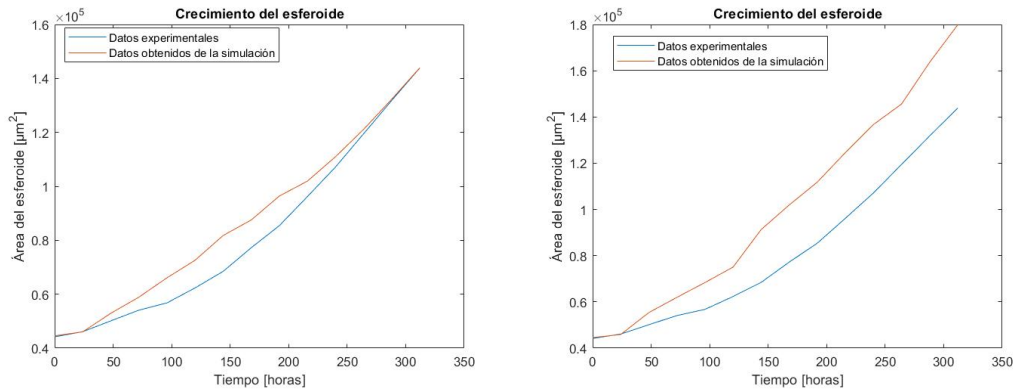
Figura 4.4: Crecimiento del esferoide con $T = 5000$ minutos

Debido a la similitud entre la pendiente de ambas curvas, se procede a dejar fijo el valor correspondiente a la proliferación en 5000 minutos y mediante el ajuste del coeficiente de adhesión celular, se continúa replicando los datos experimentales de forma más exacta.

En la simulación de la figura 4.4, el coeficiente de adhesión celular es de $0,4 \mu\text{m}/\text{min}$. Dado que el área de los esferoides simulados es mayor que la de los datos *in vitro*, es necesario disminuirla. En el capítulo 3, se determina que al incrementar el valor de C_{cca} , el número de agentes disminuye y por tanto el área del esferoide también. Se realizan pruebas con $C_{cca} = 1,3$, manteniendo el valor de proliferación establecido.

Se realiza la simulación y se obtiene el resultado que aparece en la figura 4.5a. En ella, se observa como el comienzo y final de las curvas coinciden, sin embargo, la tendencia de la simulación es más lineal y no termina de replicar la curva de los datos *in vitro*.

Por ese motivo, se procede a realizar la modificación del consumo celular. Se realiza la misma simulación cambiando el valor de u de $60 \text{ mmHg}/\text{min}$ (figura 4.5a) a $40 \text{ mmHg}/\text{min}$ (figura 4.5b).



(a) Crecimiento del esferoide con $u = 60 \text{ [mmHg/min]}$ y $C_{cca} = 1,3$ (b) Crecimiento del esferoide con $u = 40 \text{ [mmHg/min]}$ y $C_{cca} = 1,3$

Figura 4.5: Crecimiento del esferoide en función de u con $T = 5000$ minutos y $C_{cca} = 1,3$

La gráfica representada en la figura 4.5b, replica mejor la curvatura de la gráfica correspondiente a los datos *in vitro*. Es por ello, que a partir de ahora el valor del coeficiente de consumo permanecerá constante e igual a 40.

Finalmente, se debe de reajustar el coeficiente de adhesión celular para conseguir un ajuste óptimo. Un valor de $C_{cca} = 1,3$ no es suficiente para desplazar la gráfica correspondiente a las simulaciones. En consecuencia, se ha aumentado este coeficiente hasta un valor $C_{cca} = 2$

El ajuste final se muestra en la figura 4.6 y los parámetros definitivos en la tabla 4.2.

En la figura 4.7, se muestran las configuraciones inicial y final del esferoide con los parámetros ajustados. No se ha mostrado la configuración del esferoide en el instante $t=0$ debido a que no es una distribución realista. En $t=0$, no ha habido tiempo a que las células se distribuyan de acuerdo a la mecánica implementada. Esto ocurre en el

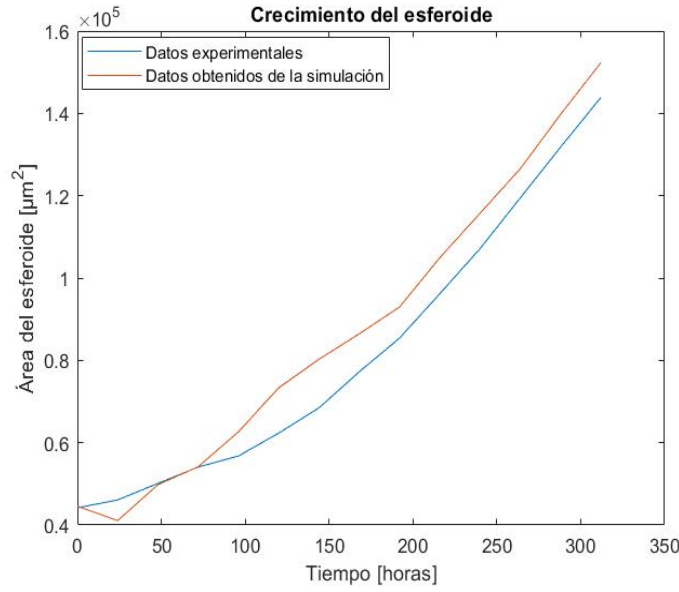


Figura 4.6: Replica de los datos *in vitro*

Parámetros	Símbolo	Valor	Unidades
Coefficiente de difusión de recursos	D_R	60000	$\mu\text{m}^2/\text{min}$
Volumen celular	V_T	5884.94	μm^3
Duración ciclo celular	T	5000	min
Umbral de bajo nivel de recursos	R^{th}	7	mmHg
Ratio de necrosis	r^{nec}	$3,472 \cdot 10^{-4}$	1/min
Umbral de necrosis	N^{th}	1,6	mmHg
Sensibilidad a los recursos	S^R	0,1	mmHg
Coefficiente de consumo	u	40	mmHg/min
Constante de Michaelis-Menten	R^M	2,5	mmHg
Fuerza de adhesión	C_{cca}	2.0	$\mu\text{m}/\text{min}$
Fuerza de repulsión	C_{ccr}	10	$\mu\text{m}/\text{min}$
Distancia máxima relativa de adhesión	R_A	1.25	Adimensional

Tabla 4.2: Valores de los parámetros utilizados en la validación experimental.

siguiente instante de tiempo, en el que el esferoide comienza a comportarse de acuerdo a los parámetros implementados.

Tras una hora, se muestra la configuración del esferoide en el plano $z = 0$ en la figura 4.7a. Las células ya se han distribuido de una forma realista y ha comenzado la proliferación y con ello, el crecimiento del esferoide. La figura 4.8a muestra la misma configuración en 3D. La figura 4.7b es la configuración al finalizar la simulación.

Comparando estas dos imágenes con las de la figura 4.1, e independientemente de que las escalas no sean las mismas, encontramos varias similitudes. En primer lugar cabe destacar, que tanto en el experimento *in vitro*, como en las simulaciones, la forma del esferoide no se pierde en ningún momento. En la figura 4.1 se observan células sueltas

que aparentemente se han separado del esferoide. Esto no ocurre en la simulación, ya que todas las células están formando el esferoide (ver figuras 4.7b, 4.8b).

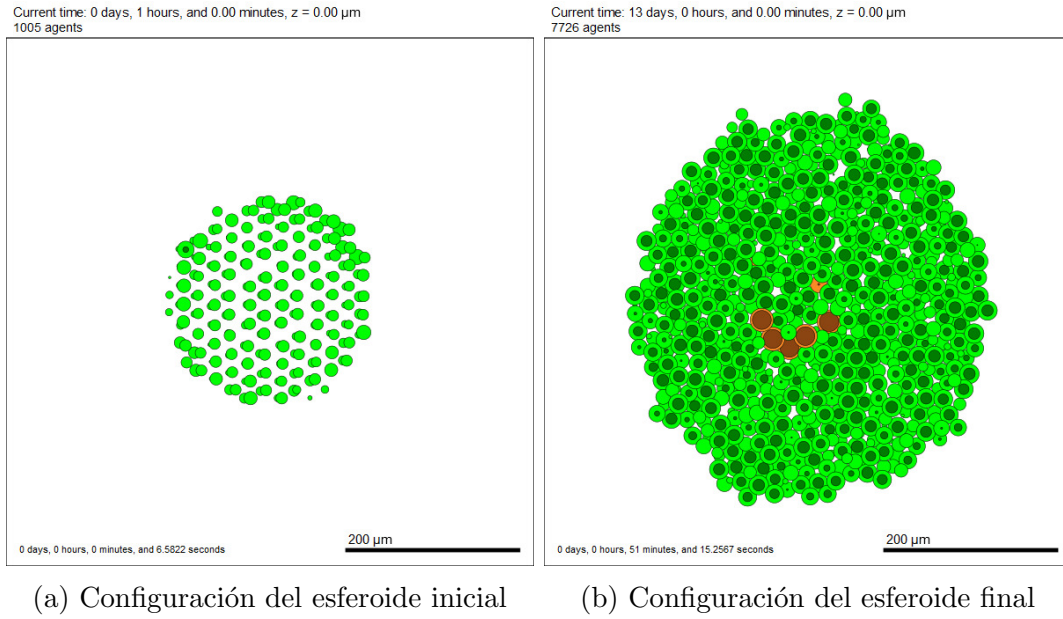


Figura 4.7: Configuraciones inicial y final del esferoide para el plano $z = 0$

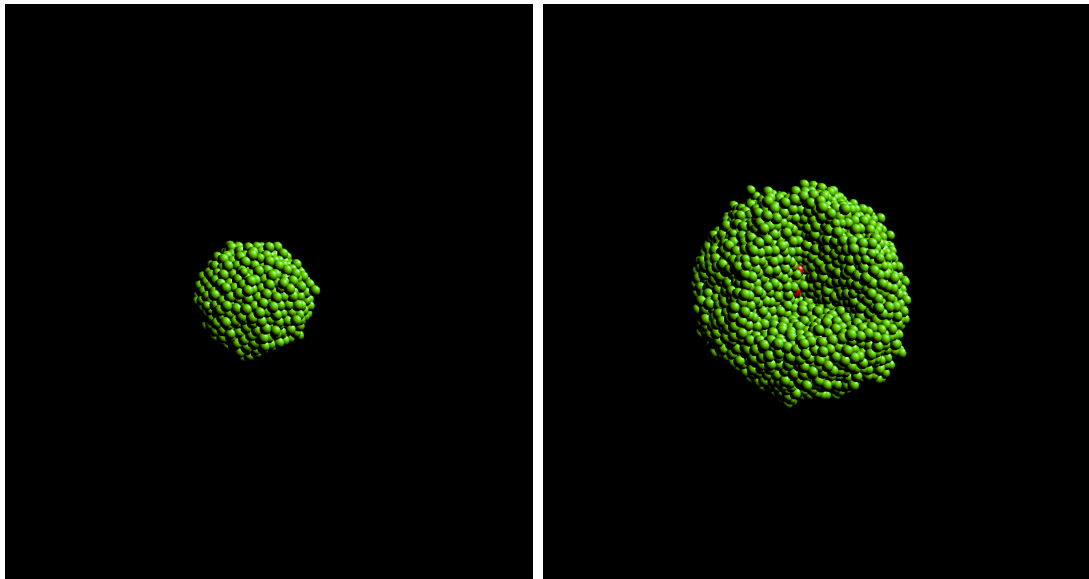
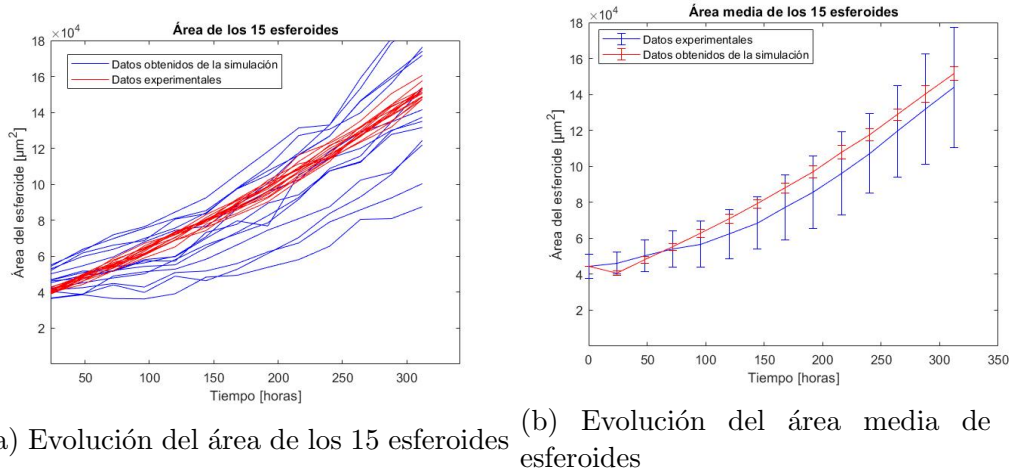


Figura 4.8: Configuraciones 3D inicial y final del esferoide ajustado

Con el objetivo de obtener una visualización más real y representativa, se muestran en la figura 4.8, la configuración del esferoide en 3D, en los mismos instantes de tiempo que los de la figura 4.7. Debido a que en estas 312 horas de simulación existen células que han muerto, se ha incorporado un corte al esferoide final. Tal y como ocurre con el experimento *in vitro*, el núcleo necrótico es muy pequeño en comparación con las

dimensiones del esferoide. El esferoide final está compuesto de 7726 células, de las cuales solo 26 de ellas presentan necrosis.

Una vez hemos obtenido los valores de los parámetros que replican la tendencia observada en el experimento *in vitro*, se realizan 15 réplicas de la misma simulación para asegurar que la tendencia mostrada anteriormente es cierta. Se ha optado por realizar 15 replicas debido a que se tienen datos *in vitro* de 15 esferoides.



(a) Evolución del área de los 15 esferoides (b) Evolución del área media de los esferoides

Figura 4.9: Crecimiento de 15 esferoides

A lo largo de este capítulo 4, se ha intentado replicar el comportamiento medio de los datos *in vitro*, y el resultado aparece en la figura 4.9. La variabilidad de los datos obtenidos *in vitro* es mucho mayor de aquella obtenida mediante simulaciones, tal como se observa en la figura 4.9a, debido a que las condiciones en el modelo *in silico* están mucho más controladas (y poseen menos aleatoriedad) que las condiciones de los experimentos *in vitro*.

Como se puede observar la curva obtenida de las simulaciones está comprendida entre los valores máximos y mínimos de las barras de error del experimento realizado por el grupo TMELab, habiendo conseguido replicar el comportamiento del esferoide.

Capítulo 5

Conclusiones y trabajo futuro

5.1. Conclusiones

El cáncer afecta a una gran parte de la población mundial y es una de las enfermedades más investigadas. Debido a la gran complejidad de esta enfermedad y el gran número de factores que influyen en su desarrollo, es de vital importancia que la investigación tenga suficientes recursos y medios para continuar a lo largo de los años.

En concreto, este trabajo fin de grado se ha centrado en el estudio de un tipo de cáncer: el cáncer colorrectal. Existen distintos métodos de estudio, como pueden ser los métodos *in vivo* en animales o ensayos clínicos, los métodos *in vitro* en un laboratorio y finalmente, aquellos en los que se ha centrado este TFG, los métodos computacionales o *in silico*.

Para este trabajo fin de grado se ha utilizado el *software* PhysiCell, con el que se ha modelado un esferoide de cáncer de colon, usando modelos basados en agentes. Se han modificado cinco parámetros correspondientes a la proliferación, a la mecánica celular y al consumo, con el objetivo de comprender el comportamiento celular de los esferoides. También se ha realizado un ajuste del código para ser capaces de replicar datos obtenidos de un experimento *in vitro* de esferoides de cáncer de colon.

Las principales conclusiones que se extraen de este trabajo son:

- A partir del análisis de sensibilidad realizado en el modelo, se han observado dependencias entre los 3 parámetros mecánicos. Esto ha permitido utilizar sólo uno de ellos para ajustar el esferoide de colon y reducir los parámetros relevantes del modelo.
- Se ha visto que la mecánica tiene un impacto fundamental en el comportamiento del esferoide, modificando cómo de proliferativo es, cuántas células mueren y la configuración que toman las células entre sí.
- El hecho de no partir de una geometría perfecta (un esferoide perfectamente

esférico), provoca unas situaciones en la configuración del esferoide: grietas, patrones geométricos, que no son reales y que se deben saber distinguir de los posibles fenómenos biológicos que puedan ocurrir.

- El nivel de recursos es de vital importancia para el comportamiento del esferoide, al igual que el consumo celular. Esto se puede observar a lo largo del análisis de los resultados y, especialmente, en la sección donde se ha modificado el consumo y en el procedimiento seguido durante la validación experimental.

5.2. Trabajo futuro

Este trabajo fin de grado es el punto de partida de desarrollo de un modelo de esferoide de colon, que se engloba en un proyecto más amplio (CHK-20210004) denominado DIAMOOC, en el que colaboran el grupo TMELab, la empresa BEONCHIP, la universidad NanJing Tech y una empresa China. El objetivo de este proyecto a largo plazo es la generación de un organoide que permita evaluar fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer colorrectal y que incluya aspectos tan importantes como la red vascular y la actividad del sistema inmune.

Tras la realización de este TFG se abren líneas de futuro encaminadas a continuar con el trabajo aquí realizado y profundizar en el estudio y aplicación de los modelos basados en agentes para el estudio de esferoides. De este modo, algunas de las siguientes líneas de trabajo a seguir a partir de este TFG pueden ser:

- La realización de un análisis de sensibilidad más amplio, estudiando por ejemplo el ratio de necrosis y todos los parámetros correspondientes a los sustratos y al microambiente tumoral.
- Incorporar nuevas condiciones al modelo, como por ejemplo la migración, la apoptosis o la secreción celular.
- Añadir más complejidad al modelo, incorporando simultáneamente el oxígeno, la glucosa y el suero fetal bovino y estudiando el impacto que tiene cada uno de ellos en el comportamiento del esferoide.
- Realizar simulaciones estudiando la formación del esferoide a partir de células sueltas, observando el comportamiento mecánico entre células.
- De la misma manera que se ha realizado una validación experimental con datos *in vitro*, se debería replicar otros experimentos *in vitro* que se hayan llevado a cabo con esferoides de cáncer de colon. Por ejemplo, reproducir el efecto de la

blebistatina (un inhibidor de la miosina y de las interacciones mecánicas celulares) en el crecimiento del esferoide.

5.3. Valoración personal

La realización de este TFG me ha permitido adquirir conocimientos que serán de vital importancia en mi futuro profesional y académico. He necesitado realizar varias búsquedas bibliográficas acerca del cáncer colorrectal y de los modelos basados en agentes, lo que me ha proporcionado conocimientos y herramientas para encontrar y filtrar artículos de carácter científico.

He podido trabajar con un *software* actualmente utilizado en el ámbito de la investigación como es PhysiCell. Asimismo, debido al amplio trabajo de tratamiento y análisis de datos realizado a lo largo de este TFG, me ha permitido aumentar mis conocimientos de programación en MATLAB. Dado que los datos tratados son de ámbito biológico, también he tenido la oportunidad de adquirir conceptos nuevos acerca del comportamiento celular.

Además, este trabajo se ha redactado en su totalidad utilizando el sistema de composición de textos LaTeX. El hecho de aprender a utilizar esta herramienta me permite usarla en futuros proyectos académicos.

En conjunto, considero que la realización de este trabajo fin de grado ha ampliado mis conocimientos y me ha permitido conocer de primera mano cómo funciona el mundo de la investigación.

Capítulo 6

Bibliografía

- [1] World Cancer Research Fund International. Worldwide cancer data. <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/>. (Accessed on June 2023).
- [2] National Cancer Institute. What is cancer? <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. (Accessed on March 2023).
- [3] Organización Mundial de la Salud. Cáncer: Datos y cifras. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. (Accessed on March 2023).
- [4] International Agency for Research on Cancer. The global cancer observatory. <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>. (Accessed on March 2023).
- [5] Inés Mármol, Cristina Sánchez de Diego, Alberto Pradilla Dieste, Elena Cerrada, and María Rodríguez Yoldi. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1):197, January 2017.
- [6] Instituto Quirúrgico Lacy. Síntomas del cáncer de colon por metástasis en otros órganos. <https://www.iqlacy.com/que-operamos/cancer-de-colon/sintomas-del-cancer-de-colon-por-metastasis-en-otros-organos/#>. (Accessed on April 2023).
- [7] Joan Figueras. Metástasis hepáticas masivas de cáncer colorrectal. *Cirugía Española*, 77(6):313–314, June 2005.
- [8] Alfredo Rigalli Brenda Lorena Fina, Mercedes Lombarte. Investigación de un fenómeno natural: ¿estudios in vivo, in vitro o in silico? *Actualizaciones en Osteología*, 9(3):283–288, 2013.

- [9] Joana F. S. Pereira, Nikhil T. Awatade, Cláudia A. Loureiro, Paulo Matos, Margarida D. Amaral, and Peter Jordan. The third dimension: new developments in cell culture models for colorectal research. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(21):3971–3989, May 2016.
- [10] Imanis Life Sciences. Hct116 (colorectal carcinoma). <https://imanislife.com/collections/cell-lines/hct116-cells/>. (Accessed on May 2023).
- [11] American Type Culture Collection (ATCC). Information about the line cell: Hct 116. <https://www.atcc.org/products/ccl-247>. (Accessed on May 2023).
- [12] Universidad de Salamanca. Elaboración de guiones para el estudio interactivo de la relación estructura-función de proteínas. <http://proteinasestructurafuncion.usal.es/moleculas/Ras/index.html>. (Accessed on May 2023).
- [13] Antonio Barbáchano, Asunción Fernández-Barral, Pilar Bustamante-Madrid, Isabel Prieto, Nuria Rodríguez-Salas, María Jesús Larriba, and Alberto Muñoz. Organoids and colorectal cancer. *Cancers*, 13(11):2657, May 2021.
- [14] Louis-Bastien Weiswald, Dominique Bellet, and Virginie Dangles-Marie. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*, 17(1):1–15, January 2015.
- [15] Zhihui Wang and Thomas S. Deisboeck. Computational modeling of brain tumors: discrete, continuum or hybrid? *Scientific Modeling and Simulation SMNS*, 15(1-3), 2008.
- [16] John Metzcar, Yafei Wang, Randy Heiland, and Paul Macklin. A review of cell-based computational modeling in cancer biology. *JCO Clinical Cancer Informatics*, December 2019.
- [17] Ahmadreza Ghaffarizadeh, Randy Heiland, Samuel H. Friedman, Shannon M. Mumenthaler, and Paul Macklin. PhysiCell: An open source physics-based cell simulator for 3-d multicellular systems. *PLOS Computational Biology*, 14(2):e1005991, February 2018.
- [18] Ahmadreza Ghaffarizadeh, Samuel H. Friedman, and Paul Macklin. BioFVM: an efficient, parallelized diffusive transport solver for 3-d biological simulations. *Bioinformatics*, 32(8):1256–1258, December 2015.

- [19] Ahmadreza Ghaffarizadeh, Randy Heiland, Samuel H. Friedman, Shannon M. Mumenthaler, and Paul Macklin. Supplementary Materials for: PhysiCell: An open source physics-based cell simulator for 3-d multicellular systems. *PLOS Computational Biology*, 14(2):e1005991, February 2018.
- [20] E.D. Israels and L.G. Israels. The cell cycle. *The Oncologist*, 5(6):510–513, December 2000.
- [21] C. E. Chwieralski, T. Welte, and F. Bühling. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis*, 11(2):143–149, February 2006.
- [22] Yu-Qiang Yu, Reyes Gamez-Belmonte, Jay V. Patankar, Eva Liebing, and Christoph Becker. The role of programmed necrosis in colorectal cancer. *Cancers*, 14(17):4295, September 2022.
- [23] Raquel Beatriz Arroyo Vázquez. Modelos basados en agentes para simular la evolución del glioblastoma en un modelo in vitro. Trabajo fin de máster, Universidad de Zaragoza, 2022.
- [24] Ma. Luisa Escobar, Olga M. Echeverría, and Gerardo H. Vázquez-Nin. Necrosis as programmed cell death. In *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis*. InTech, December 2015.
- [25] Sungmin Park, Jonghun Kim, and Sang-Hee Yoon. A review on quantitative measurement of cell adhesion strength. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(5):4256–4273, May 2016.
- [26] Wolfgang Metzger, Daniela Sossong, Annick Bächle, Norbert Pütz, Gunther Wennemuth, Tim Pohlemann, and Martin Oberringer. The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. *Cytotherapy*, 13(8):1000–1012, September 2011.
- [27] Popi Syntichaki and Nektarios Tavernarakis. Death by necrosis. *EMBO reports*, 3(7):604–609, July 2002.

Lista de Figuras

1.1. Tipos de ABMs [16]	4
2.1. Convergencia de la media y la desviación estándar en 50 simulaciones .	13
3.1. Configuración final del esferoide con $T = 5000$ y $T = 12000$ minutos . .	18
3.2. Respuesta del esferoide a variaciones en la duración del ciclo celular. . .	19
3.3. Configuración final del esferoide con $C_{cca} = 0$ y $C_{cca} = 1 \frac{\mu m}{min}$	20
3.4. Configuración final del esferoide con $C_{cca} = 3$ y $C_{cca} = 4 \frac{\mu m}{min}$	20
3.5. Configuración final del esferoide con $C_{cca} = 4,8$ y $C_{cca} = 5 \frac{\mu m}{min}$	21
3.6. Formación de espacios en el interior del esferoide durante las primeras horas de la simulación con $C_{cca} = 3$	22
3.7. Formación de patrones geométricos durante las primeras horas de la simulación con $C_{cca} = 4$	22
3.8. Contorno recto en la configuración inicial	23
3.9. Respuesta del esferoide a variaciones en el coeficiente de adhesión celular	23
3.10. Comparación de la concentración de recursos	24
3.11. Evolución de la configuración final del esferoide con un coeficiente de repulsión de 1,5 a $15 \frac{\mu m}{min}$	26
3.12. Respuesta del esferoide a variaciones en el coeficiente de repulsión . . .	26
3.13. Evolución de la configuración final del esferoide con R_A	28
3.14. Respuesta del esferoide a variaciones de R_A	28
3.15. Configuración final del esferoide con $u = 30$ mmHg/min y $u = 120$ mmHg/min	29
3.16. Configuración final del esferoide con $u = 30$ mmHg/min y $u = 120$ mmHg/min	30
3.17. Respuesta del esferoide a variaciones de u mmHg/min	30
4.1. Imágenes del esferoide inicial y final	32
4.2. Resultados obtenidos del experimento <i>in vitro</i>	32
4.3. Imágenes de células de cáncer de colon HCT-116	34

4.4.	Crecimiento del esferoide con $T = 5000$ minutos	35
4.5.	Crecimiento del esferoide en función de u con $T = 5000$ minutos y $C_{cca} = 1,3$	36
4.6.	Replica de los datos <i>in vitro</i>	37
4.7.	Configuraciones inicial y final del esferoide para el plano $z = 0$	38
4.8.	Configuraciones 3D inicial y final del esferoide ajustado	38
4.9.	Crecimiento de 15 esferoides	39

Lista de Tablas

2.1. Principales parámetros utilizados en PhysiCell.	13
3.1. Datos obtenidos al modificar T	18
3.2. Datos obtenidos al modificar C_{cca}	19
3.3. Datos obtenidos al modificar C_{ccr}	24
3.4. Datos obtenidos al modificar R_A	27
3.5. Datos obtenidos al modificar u	28
4.1. Geometría de las células	34
4.2. Valores de los parámetros utilizados en la validación experimental. . . .	37

Anexos

Anexos A

Códigos de MATLAB para el tratamiento de datos

En este anexo se explican y adjuntan los códigos de MATLAB más relevantes utilizados para el análisis y tratamiento de datos a lo largo de este TFG.

A.1. Cálculo de células muertas

A continuación, se muestra el código principal con el que se ha ido obteniendo los valores de: número de agentes, número de células muertas, número de células vivas. Lo primero que se realiza es la inicialización de variables.

```
nsimulaciones = 50;
muertas = zeros(1, nsimulaciones);
agentes = zeros(1, nsimulaciones);
```

PhysiCell guarda todos los resultados en la carpeta **output**. Este bucle localiza la carpeta donde esta guardada la simulación a analizar y se guarda los datos en un *struct*. Las dimensiones de este *struct* es de 21x50, donde las filas es cada instante de tiempo y las columnas en número de simulaciones.

La simulación dura 7200 minutos y se obtienen datos cada 360, incluyendo el instante inicial. Por tanto PhysiCell guarda datos 21 veces en cada simulación.

```
for j = 1:nsimulaciones
    for i = 1:numfiles+1
        filename = sprintf('\\Users\\Usuario\\OneDrive\\Escritorio\\TFG\\CambioSemilla\\2DSAdhesion0.4-\\2DSAdhesion0.4-%d\\output\\output000000%02d_cells.mat', j, i-1);

        datos{i,j} = load(filename);
    end
end
```

Una vez guardados los datos, debemos de calcular el número de células muertas en cada una de las replicas, es decir, en cada una de las columnas.

```

for j = 1:nsimulaciones
    numagentes= size(datos{21,j}.cells,2);

    for a = 1:numagentes
        if datos{numfiles+1,j}.cells(7,a) ~= 5
            muertas(j) = muertas(j) + 1;
        end
    end
    agentes(j) = numagentes;
end

```

```

vivas = agentes - muertas;
porcentajemuerte = (muertas./agentes)*100;

```

Posteriormente, se calcula la media y la desviación estándar de tanto el número de agentes como de células muertas al finalizar la simulación.

```

mediaagentes = mean(agentes);
mediavivas = mean(vivas);
mediamuertas = mean(muertas);

```

```

stdmuertas = std(muertas);
stdvivas = std(vivas);

```

Para comprobar el número de replicas de cada simulación que se debían realizar para tratar con datos representativos. Se calcula la media y la desviación típica del número de células muertas y posteriormente se representa. Para una correcta visualización de ambas gráficas, se optó obtenerlas en la misma ventana para que ambas formaran parte de la misma imagen.

```

for e = 1:nsimulaciones
    media(e)= mean (muertas(1:e));
end

for e = 1:nsimulaciones
    devest(e)= std (muertas(1:e));
end

tiledlayout(2,1)
nexttile
plot(1:nsimulaciones,media)
xlabel ('N de simulaciones ')
ylim([110 140])
ylabel ('Media de celulas muertas ')

nexttile
plot(1:nsimulaciones,devest)
xlabel ('N de simulaciones ')

```

```
ylim([0 45])
ylabel('SD de celulas muertas')
```

A.2. Representación de los perfiles de recursos

El código utilizado para la obtención de los perfiles de recursos es el siguiente:

```
datos = load('C:\Users\Usuario\OneDrive\Escritorio\TFG\
CambioSemilla\2DSAdhesion0.4-\2DSAdhesion0.4 1\output\
output00000020_microenvironment0.mat');

x=-290:20:290;
y=-290:20:290;
A = zeros(30, 30);

k = 1;
for j = -290:20:290
    for i = -290:20:290
        X = (i + 290) / 20 + 1;
        Y = (j + 290) / 20 + 1;
        A(X, Y) = datos.multiscale_microenvironment(5, k);
        k = k + 1;
    end
end

contourf(x,y,A,20)
colorbar
axis([-290 290 -290 290]);
```

A.3. Cálculo del área del esferoide

Para el apartado de validación experimental fue necesario el cálculo del área del esferoide. Esto es un cálculo aproximado que se basa en obtener la máxima y la mínima distancia, en los tres ejes, de las células al centro del esferoide y hacer la media de los seis valores. Se utiliza es valor como radio final del esferoide y se calcula el área.

Este código que se presenta a continuación, lee los datos *in vitro* de un documento Excel y los representa junto con su media. Posteriormente, calcula el área del esferoide de la simulación y la representa junto a la media de los datos experimentales.

```
dataH = readmatrix("datos_matriz.xlsx");

for k=1:14
    Areamedia15 (k)= mean(dataH(:,k));
```

```

end

ejex = [0 24 48 72 96 120 144 168 192 216 240 264 288 312];

grayColor = [.7 .7 .7];

figure(1)
for d=1:14
    plot(ejex,dataH(d,:), 'Color', grayColor)
    hold on
end

plot(ejex,Areamedia15, 'k', 'LineWidth', 3)
xlabel ('Tiempo [horas] ');
ylabel ('Area del esferoide ');
title ('Datos experimentales ')

for i=1:14
    filename = sprintf('\\Users\\Usuario\\OneDrive\\Escritorio\\TFG\\ValExpe\\3Dprueba1\\output\\output000000%02d_cells.mat', i-1);
    datos(i)= load(filename);
end

for j=1:14
    ax(j) = max(datos(j).cells(2,:));
    bx(j) = min(datos(j).cells(2,:));
    cx(j) = abs(bx(j));

    ay(j) = max(datos(j).cells(3,:));
    by(j) = min(datos(j).cells(3,:));
    cy(j) = abs(by(j));

    az(j) = max(datos(j).cells(4,:));
    bz(j) = min(datos(j).cells(4,:));
    cz(j) = abs(bz(j));

end

posicion = [ax;cx;ay;cy;az;cz];
maxposicion = mean(posicion);

radiofinal = maxposicion;
area=(radiofinal).^2*pi;

figure(2)

```

```
plot(ejex ,Areamedial5 ,ejex , area );  
legend ('Datos experimentales ','Datos obtenidos de la simulacion ');  
xlabel ('Tiempo [horas] ');  
ylabel ('Area del esferoide ');  
title ('Crecimiento del esferoide ')
```