



Trabajo Fin de Grado

Modelado matemático y ajuste paramétrico de la evolución del Glioblastoma Multiforme (GBM) en esferoides

Mathematical modelling and parameter fitting of the evolution of Glioblastoma Multiforme (GBM) in spheroids

Autora

Esther Vázquez Campillo

Directores

Marina Pérez Aliacar
Jacobo Ayensa Jiménez

Ponente

Manuel Doblaré Castellano

Modelado matemático y ajuste paramétrico de la evolución del Glioblastoma Multiforme (GBM) en esferoides

RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades con más impacto en la sociedad hoy en día y por ello una de las más estudiadas. Teniendo en cuenta que el cáncer en sí mismo abarca muchos tipos, existen varios estudios diseñados para responder a diferentes cuestiones de investigación. Sin embargo, debido al alto coste que supone la realización de experimentos, cada vez es más complicado obtener resultados que ayuden a luchar contra la enfermedad o, al menos, encontrar tratamientos que funcionen y mejorar la tasa de supervivencia.

Los modelos matemáticos y las herramientas de simulación por ordenador (*in silico*) son una alternativa a los experimentos por su capacidad de aislar parámetros y resolver problemas complejos por lo que son de gran ayuda si se trata, como en este caso, de modelos biológicos que, por lo general, presentan un gran número de parámetros correlacionados entre sí.

El objetivo de este trabajo es estudiar la evolución del Glioblastoma Multiforme (GBM), el tumor más letal y a la vez el más común de entre los tumores del sistema nervioso central, mediante la adaptación de dos modelos matemáticos ya existentes, que simulan el comportamiento de las células tumorales en esferoides, un tipo de cultivo celular muy común en experimentación biológica. Se pretende, establecer diferentes modelos y compararlos, ajustar los parámetros de los mismos, y discutir los resultados obtenidos, y con el propósito de ahorrar en costes económicos, tiempo y recursos.

Con este estudio, se pone de manifiesto la gran flexibilidad de los modelos *in silico*, una vez ajustados, para recrear diferentes condiciones experimentales con el enorme ahorro que supone en tiempo, costes económicos y recursos, al margen de ulteriores consideraciones éticas. No obstante se mostrará la sustancial debilidad de esta metodología, que radica en el peligro de la ambigüedad a la hora de definir diferentes modelos, cuando los datos experimentales no son suficientemente ricos.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Motivación	1
1.1.1. Glioblastoma Multiforme	1
1.1.2. El microentorno tumoral	4
1.1.3. Estudios <i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	5
1.1.4. Modelos <i>in silico</i>	8
1.2. Objetivos y alcance	8
1.3. Estructura	9
2. Experimentos y modelos matemáticos	11
2.1. Experimentos	11
2.2. Modelos matemáticos	14
2.2.1. Modelo 1: Células invasivas y proliferativas tratadas conjuntamente	14
2.2.2. Modelo 2: Células invasivas tratadas individualmente.	20
2.3. Comparación entre modelos	24
2.4. Implementación numérica	27
2.4.1. Ecuaciones del modelo en simetría esférica	27
2.4.2. Implementación en Matlab	29
2.4.3. Tratamiento numérico de la Delta de Dirac	29
3. Ajuste paramétrico	33
3.1. Ajuste por mínimos cuadrados	33
3.1.1. Análisis bibliográfico	34
3.1.2. Resultados del ajuste	34
3.2. Contraste estadístico	36
3.3. Discusión del ajuste	37
4. Resultados	41
4.1. Evolución de los perfiles celulares	41
4.2. Influencia del nivel de oxígeno	44

4.3. Recreación <i>in silico</i> del esferoide	45
5. Conclusiones	53
5.1. Principales conclusiones	53
5.2. Líneas futuras de trabajo	54
5.2.1. Mejora de los modelos matemáticos	54
5.2.2. Obtención de nuevos datos experimentales	55
6. Bibliografía	57
Lista de Figuras	63
Lista de Tablas	65

Capítulo 1

Introducción

1.1. Motivación

1.1.1. Glioblastoma Multiforme

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la segunda causa de muerte alrededor del mundo [1]. Por ello desde hace años se han buscado soluciones para la cura de éste, que consiste en un conjunto de enfermedades muy diferentes entre sí. Normalmente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren, y células nuevas las remplazan. Sin embargo, en el cáncer, existe un crecimiento desproporcionado de algunas células del organismo de forma que la capacidad de multiplicarse y diseminarse aumenta de forma descontrolada.

El cáncer es la causa de casi una de cada seis defunciones en el mundo, por esta razón, los distintos tipos de cáncer han sido objeto de estudio [1]. En este trabajo nos centramos en el Glioblastoma Multiforme (GBM), el tumor más agresivo del grupo de tumores denominados gliomas. Un glioma es un tumor que se desarrolla en el cerebro o en la médula espinal a partir de las células gliales (células que desempeñan principalmente la función de soporte del sistema nervioso). Clínicamente, los gliomas se dividen en cuatro grados según su peligrosidad. Desafortunadamente, el Glioblastoma Multiforme (GBM) tiene un grado de agresividad IV; se trata del glioma más agresivo y más común en los humanos [2]. La clasificación de gliomas se realiza a partir del análisis de una muestra de tejido (Figura 1.1).

Los gliomas representan el 75 % de los tumores cerebrales primarios (aquellos que se originan en células del sistema nervioso central) malignos y de ellos, más de la mitad son glioblastomas. En la Figura 1.2 [4] se observa la clasificación de tumores cerebrales tanto malignos como benignos.

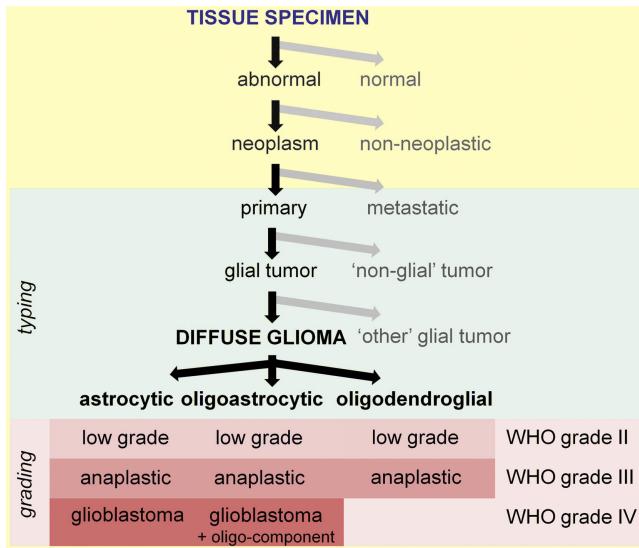


Figura 1.1: Árbol de decisión para la exclusión paso a paso de las opciones de diagnóstico diferencial en el diagnóstico microscópico de gliomas difusos. (Fuente: [3]).

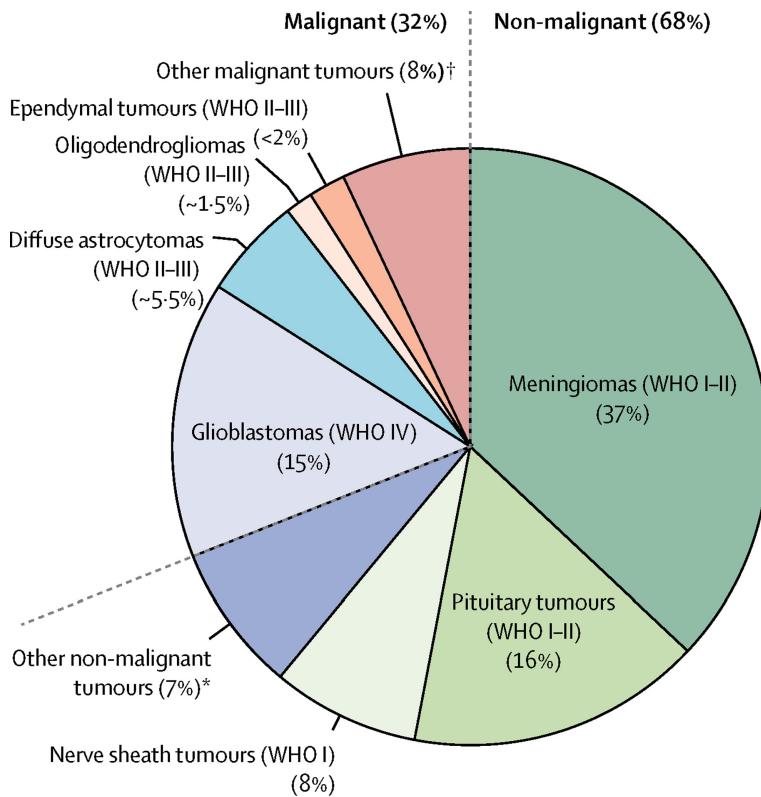


Figura 1.2: Representación de la incidencia de los tumores cerebrales según su tipo (Fuente: [4]) .

Los tumores GBM son heterogéneos, pero se distinguen patológicamente de los gliomas con menor grado de agresividad por la presencia de áreas de hiperplasia microvascular (alta proliferación alrededor de los vasos sanguíneos) bajo niveles moderados de hipoxia (déficit de oxigenación) y necrosis central, generalmente rodeada de regiones hipercelulares conocidas como pseudoempalizadas [5]. Ambas estructuras

están relacionadas con el crecimiento acelerado de estos tumores. De hecho, la presencia de un núcleo necrótico es uno de los marcadores principales para el diagnóstico de GBM.

Estudios sobre el GBM indican que el tiempo medio de supervivencia, una vez que se ha detectado el tumor, incluso en los pacientes que han recibido tratamiento, es de 14 meses [6], y la tasa de supervivencia transcurridos 5 años desde el diagnóstico es inferior al 10 % [7]. Una de las razones de que la supervivencia sea tan baja es que la evolución de este tumor es compleja puesto que la progresión es muy rápida y tiene una alta capacidad de infiltración en tejidos; las últimas hipótesis señalan la oclusión o colapso de un vaso sanguíneo en el interior del tumor como su principal desencadenante [8]. Alrededor de este vaso se genera una zona hipódrica y como consecuencia las células migran hacia otras zonas con mayor concentración de oxígeno y nutrientes, formando las pseudoempalizadas (Figura 1.3).

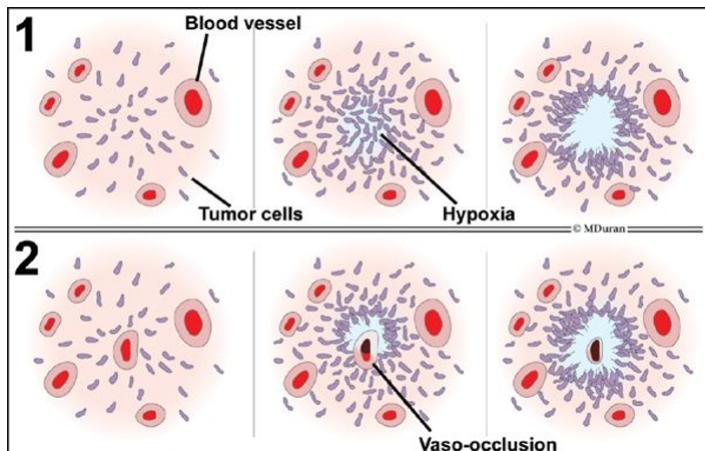


Figura 1.3: Esquema de la evolución del GBM (Fuente:[8]).

Se ha demostrado que las células que forman estas estructuras tienen menor capacidad proliferativa que las células adyacentes, pero más capacidad migratoria [9]. A su vez, las células que no migran mueren formando el núcleo necrótico alrededor del vaso. Finalmente, las células llegan a otros vasos sanguíneos y expresan de nuevo una elevada tasa de proliferación, causando la oclusión de estos y la formación de nuevas pseudoempalizadas [10]. Las células tumorales están así expuestas a ciclos de migración-proliferación según las condiciones del entorno en el que se encuentran (Figura 1.4).

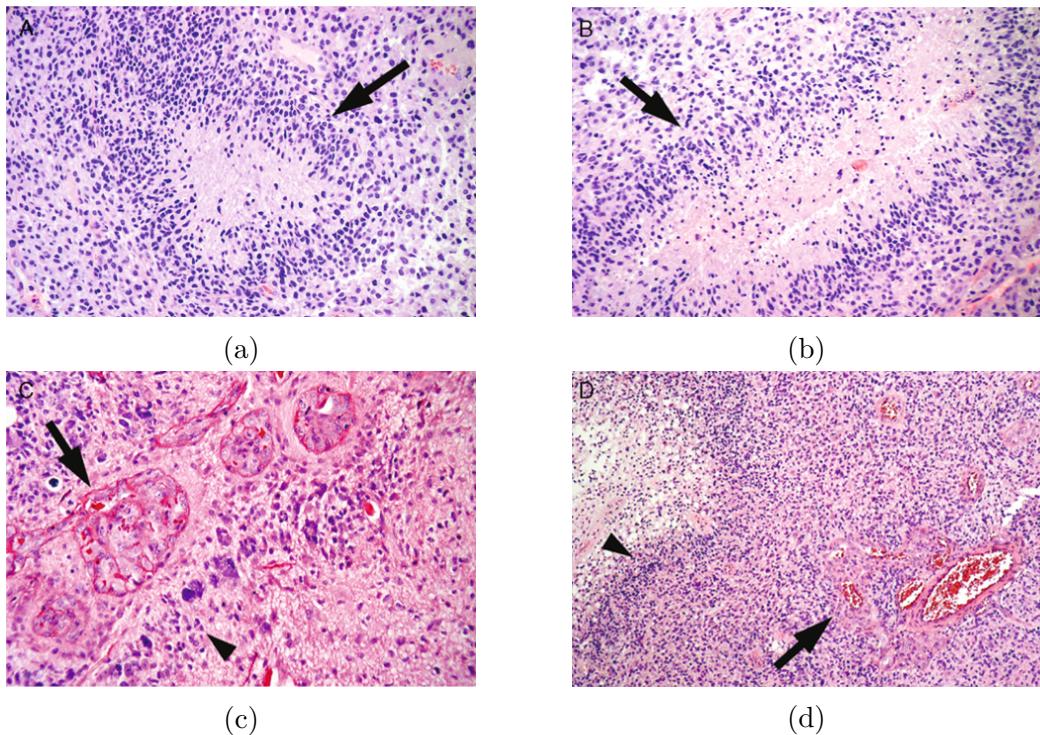


Figura 1.4: Principales características histopatológicas del glioblastoma [9]. Las imágenes (a) y (b) muestran pseudoempalizadas (indicadas por la flecha) caracterizadas por la acumulación de núcleos celulares en torno a una zona central más clara. La imagen (c) muestra la hiperplasia microvascular (indicada por la flecha), provocada por las células migratorias de la pseudoempalizada (indicada por la cabeza de flecha). Por último, en la imagen (d) se observa la dirección de la pseudoempalizada (indicada por la cabeza de flecha) desde la zona de necrosis hasta la vasculatura emergente, donde se observa la hiperplasia (indicada por la flecha).

1.1.2. El microentorno tumoral

El microentorno tumoral o TME, por sus siglas en inglés (*Tumor MicroEnvironement*) [11], está compuesto de células no cancerígenas y biomoléculas en el interior del tumor al igual que la matriz extracelular. Las células no cancerígenas que constituyen el microentorno tumoral incluyen astrocitos normales y reactivos, células madre de GBM, fibroblastos, pericitos vasculares, células inmunes, micrófagos, macrófagos y células endoteliales (Figura 1.5).

Las biomoléculas son producidas por las células no cancerígenas que incluyen citoquinas, quimiocinas, hormonas y óxido nítrico (NO) [12].

El TME regula el GBM y el tejido cerebral adyacente al tumor, por lo que ambos están muy relacionados e interaccionan entre sí constantemente. Las células reciben estímulos físico-químicos de su entorno y reaccionan a ellos, modificando su forma, localización, estructura interna o su expresión genética (epigenética) y por lo tanto modificando su capacidad de proliferar, migrar, diferenciarse o segregar sustancias

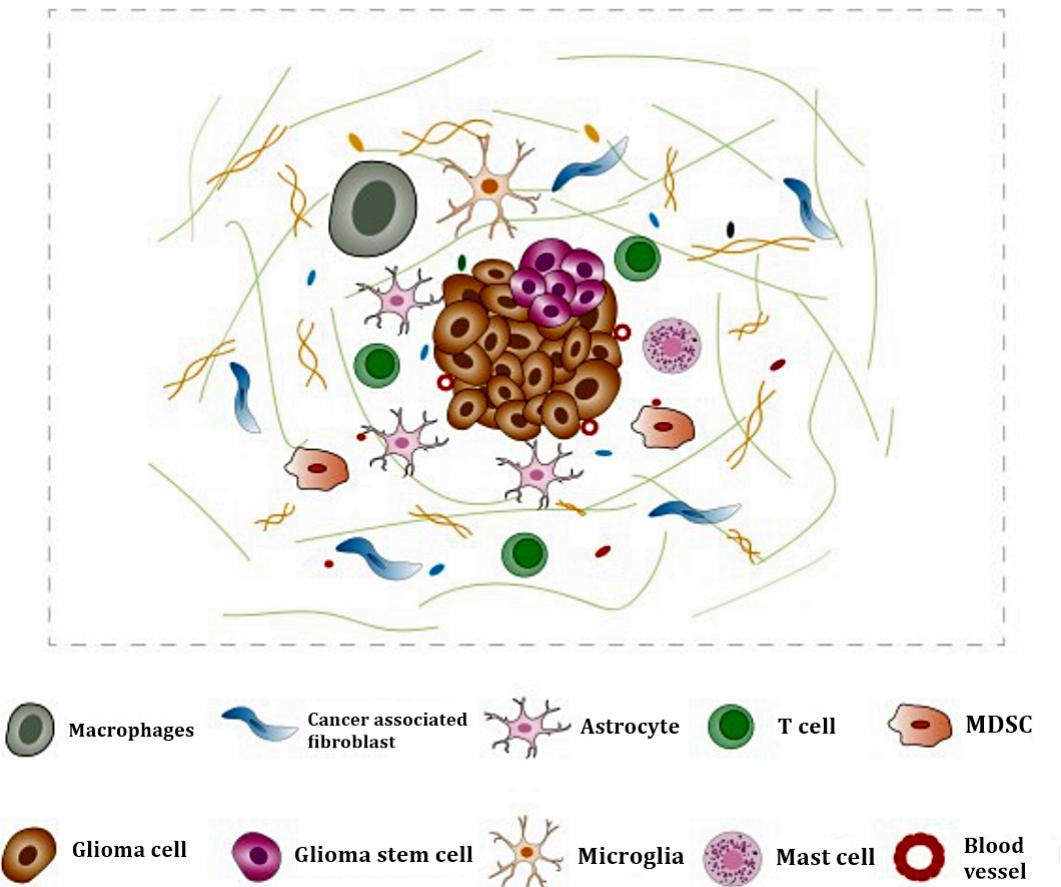


Figura 1.5: Representación del microentorno tumoral (Fuente: [12]).

al medio, influyendo de esta forma en su composición. Esta interacción entre las células tumorales y el TME ha demostrado tener influencia en distintos procesos de la progresión del cáncer o la metástasis [13], lo que hace que su estudio sea de gran importancia.

1.1.3. Estudios *In vitro* e *in vivo*

Aunque hay algunas similitudes entre los estudios *in vitro* e *in vivo*, existen diferencias importantes en cómo estos son realizados, interpretados y aplicados de forma práctica (Figura 1.6). A continuación se explican los dos tipos de estudio haciendo hincapié en las virtudes y defectos de cada uno y las diferencias que presentan entre ellos.

El término *in vitro* se refiere a un estudio médico o experimento que se realiza en un entorno controlado fuera de organismos vivos como un laboratorio. Muchos experimentos de biología celular se llevan a cabo fuera del organismo o las células, sin embargo, estos experimentos no pueden replicar las condiciones celulares precisas del organismo. En respuesta a esta problemática, se han desarrollado técnicas experimentales que buscan reproducir lo más fielmente posible las condiciones del

entorno de las células en el organismo y en particular en nuestro caso, el microentorno tumoral, como un entorno 3D alimentado y oxigenado por vasos sanguíneos en el que se pueden generar regiones de hipoxia localizada. El cultivo tridimensional de células (por ejemplo en esferoides, que detallaremos a continuación) proporciona un escenario en el que, trabajando *in vitro*, se consigue mayor similitud con los casos del tumor *in vivo* [14].

El término *in vivo* se refiere a un test médico, experimento o procedimiento que utiliza todo un organismo vivo, como la experimentación animal o los ensayos clínicos. Las pruebas *in vivo* se emplean más a menudo que las *in vitro* puesto que se consideran más adecuadas para observar los efectos generales de un experimento en un sujeto vivo. Si bien hay muchas razones para creer que los estudios *in vivo* tienen el potencial de ofrecer ideas concluyentes sobre la naturaleza de la medicina y la enfermedad, hay varias maneras en que estas conclusiones pueden ser engañosas [15]. Además, los experimentos *in vivo* presentan conflictos éticos como el sufrimiento del ser vivo y cuentan con un gran gasto económico.

Los estudios *in vivo* presentan una gran dificultad en el caso del Glioblastoma Multiforme. Esto es debido a la complejidad del proceso y del tumor en sí mismo.

En la Tabla 1.1 se destacan las diferencias entre ambas técnicas.

	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Definición	Técnica para realizar un determinado experimento, generalmente, en un ambiente controlado fuera del organismo vivo.	Técnica para realizar un determinado experimento dentro o en el tejido vivo de un organismo vivo.
Plataforma	Experimentos en laboratorio.	Pruebas con animales y ensayos clínicos.
Alcance	Tiende a enfocarse en órganos, tejidos, células, componentes celulares, proteínas y/o biomoléculas.	Trabaja con el organismo completo.
Ventajas	Es más apropiada para deducir un mecanismo de acción, con menos variables y reacciones amplificadas.	Es más apropiada para dar más información sobre lo que sucede.
Desventajas	No se consideran muchas variables puesto que no se reproduce exactamente la fisiología real.	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Presenta muchos fenómenos acoplados que resultan prácticamente imposibles de desacoplar. ▷ Consideraciones éticas. ▷ Alto coste de los experimentos.

Tabla 1.1: Diferencias entre *in vitro* e *in vivo*

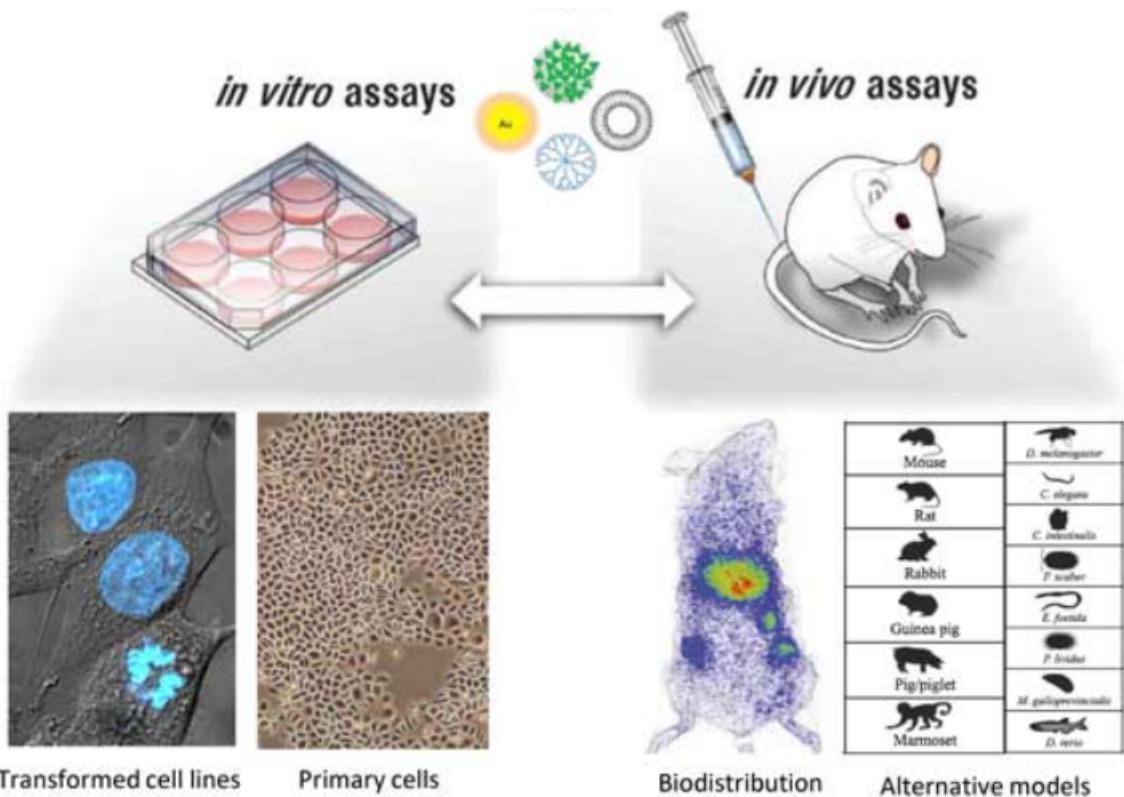


Figura 1.6: *In vitro* vs *in vivo* (Fuente: [16]).

Este trabajo se centra en un tipo del cultivo celular *in vitro*, llamado esferoide.

Esferoides Se denomina esferoide a un agregado tridimensional multicelular *in vitro* que proporciona un microentorno similar al del tejido normal *in vivo* [17]. Actualmente son numerosas las áreas científicas en las que se están utilizando los esferoides como modelos de cultivo 3D para el desarrollo de investigaciones biomédicas, hasta tal punto que podemos afirmar que nos movemos desde los cultivos 2D hacia una nueva era de los estudios *in vitro*, la era de los cultivos en 3D. La diferencia fundamental entre ambos tipos de cultivo es que en los cultivos 2D las células crecen en monocapa, adheridas a un sustrato plano o en suspensión, mientras que en los modelos de cultivos 3D las células se localizan sobre andamiajes sólidos (naturales o artificiales), o formando grupos celulares generalmente de forma esférica (esferoides) o en pequeñas formaciones a modo de cápsulas esféricas (esferas líquidas). En ellos, las interacciones que se establecen son del tipo célula-célula o célula-medio, de modo semejante a como acontece *in vivo* [18]. Crear esferoides con células tumorales es crítico para la obtención de posibles tratamientos contra el cáncer puesto que puede ser un mejor modelo de células tumorales que los cultivos de células 2D [19]. A nivel estructural se pueden distinguir tres capas de poblaciones celulares en los esferoides de células tumorales o MTS, por sus siglas

en inglés (*Multicellular Tumor Spheroids*): un centro apoptótico/necrótico, una capa intermedia de células quiescentes con tendencia a diferenciarse y una capa externa de células en proliferación (Figura 1.7)[20].

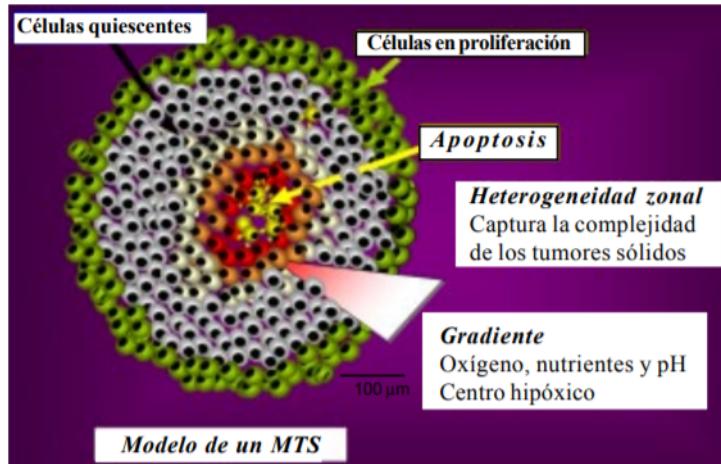


Figura 1.7: Estructura de un MTS clonogénico de al menos 0.5 mm de diámetro que representa sus tres principales capas: células proliferativas, quiescentes y necróticas (Fuente: [20]).

Los esferoides permiten comparar el comportamiento de diferentes líneas celulares y diferentes condiciones.

1.1.4. Modelos *in silico*

Como solución complementaria a las limitaciones que presentan los estudios realizados tanto *in vitro* como en *in vivo*, los modelos matemáticos y las herramientas de simulación por ordenador son una alternativa a los experimentos por su capacidad de aislar parámetros y resolver problemas complejos.

El desarrollo de estos modelos se ve facilitado por el rápido avance de herramientas experimentales y analíticas que generan datos biológicos de gran valor informativo y de alto rendimiento [21]. Aunque los estudios *in silico* representan una vía de investigación relativamente nueva, ha comenzado a usarse ampliamente en estudios que predicen cómo determinados fármacos interactúan con el cuerpo y con los patógenos.

Sin embargo, para que estos modelos sean una herramienta de auténtico valor se deben combinar los resultados obtenidos en las simulaciones con el conocimiento adquirido de manera experimental.

1.2. Objetivos y alcance

El objetivo de este proyecto es la descripción y comparación de dos modelos matemáticos de la evolución del Glioblastoma Multiforme en esferoides con el fin de

comprender y ajustar dichos modelos, y aportar algunos resultados que nos acerquen más al conocimiento de este tumor y cómo poder combatirlo. Gracias a la combinación de los datos experimentales que se obtienen en la bibliografía y los resultados de las simulaciones de la evolución de dichas células tumorales, se realiza un estudio en profundidad de los parámetros que intervienen aprovechando la facilidad que aportan los modelos *in silico* de aislar los parámetros y entender mejor cómo afectan a la evolución del GBM. Los dos modelos matemáticos son adaptaciones de modelos existentes ([22], [23]) que se implementan y se ajustan a unos datos experimentales ([23]). Este proyecto pretende mostrar el conocimiento adquirido sobre los diferentes fenómenos celulares y el modelado matemático. Además de describir las debilidades y fortalezas que se observan de cada modelo mostrando, a partir de este análisis, qué tipo de modelado matemático refleja mejor lo que sucede en los cultivos de esferoides. De esta manera, se ayuda a optimizar el tiempo y los recursos en la parte experimental, aspectos que son claves para la investigación.

1.3. Estructura

El documento se ha estructurado en base a 5 capítulos cuyo contenido se detalla a continuación:

- **Capítulo 1: Introducción.** En este primer capítulo se describen conceptos que nos acercan a entender en qué consiste el estudio y por qué se ha decidido que es importante realizar estudios sobre el Glioblastoma Multiforme, así como la forma de estudiarlo: modelos matemáticos sobre la evolución del GBM en esferoides. Se expondrán también los objetivos y la estructura del mismo. De esta forma se pone en contexto el trabajo de fin de grado y la importancia de éste.
- **Capítulo 2: Modelos matemáticos.** En el capítulo 2 se explica el experimento con esferoides que se pretende reproducir *in silico*. Posteriormente, se introducen dos modelos matemáticos diferentes, se explica individualmente cada modelo y se comparan. Se explica así mismo la implementación numérica de dichos modelos.
- **Capítulo 3: Ajuste paramétrico.** En el capítulo 3 se realiza el ajuste paramétrico de ambos modelos en base a trabajos similares existentes en la bibliografía. De esta manera se busca la confluencia entre los resultados obtenidos mediante las simulaciones y los experimentales para un conjunto de parámetros biológicos determinado.
- **Capítulo 4: Resultados.** En este capítulo se muestran los resultados obtenidos en las simulaciones de ambos modelos y se realiza una discusión sobre ellos.

- **Capítulo 5: Conclusiones.** Finalmente, en el capítulo 5, se expresan las conclusiones que pueden extraerse a partir de los resultados mostrados en el anterior capítulo y se establecen posibles líneas futuras de trabajo.

Capítulo 2

Experimentos y modelos matemáticos

2.1. Experimentos

Los modelos matemáticos que se discuten en este proyecto pretenden representar los experimentos explicados a continuación y con más precisión en un artículo publicado [23]. El artículo de donde se extraen los datos experimentales tiene como fin, entre otros objetivos, estudiar y diferenciar el comportamiento de dos líneas celulares: U87WT y U87 Δ EGFR. La línea celular U87WT contiene un receptor endógeno (tipo salvaje) y la línea U87DEGFR contiene una mutación en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que se asocia con un aumento de la malignidad. En la Figura 2.1 se muestran los resultados experimentales del artículo, resaltando con círculos negros el radio del núcleo del esferoide y el radio invasivo, que marca el alcance de la migración celular hacia fuera del esferoide. Estos experimentos diferencian el comportamiento de las dos líneas celulares, y a partir de las conclusiones del artículo, en este trabajo se ha elegido trabajar con la línea U87WT puesto que se concluye que esta línea es la que muestra más capacidad invasiva y de migración (en la Figura 2.1 se puede observar la diferencia en la migración entre las dos líneas celulares). Ambas líneas celulares se cultivaron en las condiciones detalladas en [23] durante siete días. Para hallar el radio invasivo se toman fotomicrografías del plano medio de los esferoides (Figura 2.1).

El perfil de células obtenido el tercer día de cultivo y el radio invasivo que se muestran en el propio artículo, se utilizan como referencia para la evaluación de los modelos en este TFG (Figura 2.2).

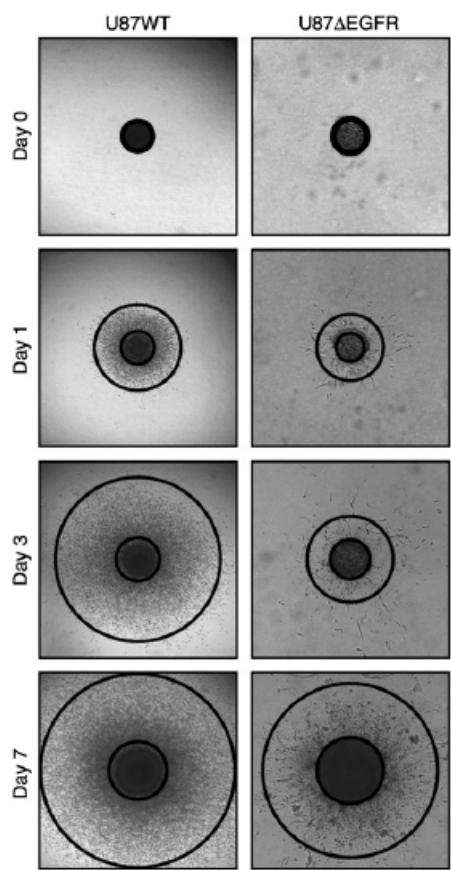


Figura 2.1: Diferencia en la invasión entre U87WT y U87DEGFR. Las fotomicrografías de esferoides tumorales (3 mm x 3 mm) fueron tomadas en experimentos. Los círculos internos y externos indican el límite central y el borde invasivo, respectivamente (Fuente: [23]).

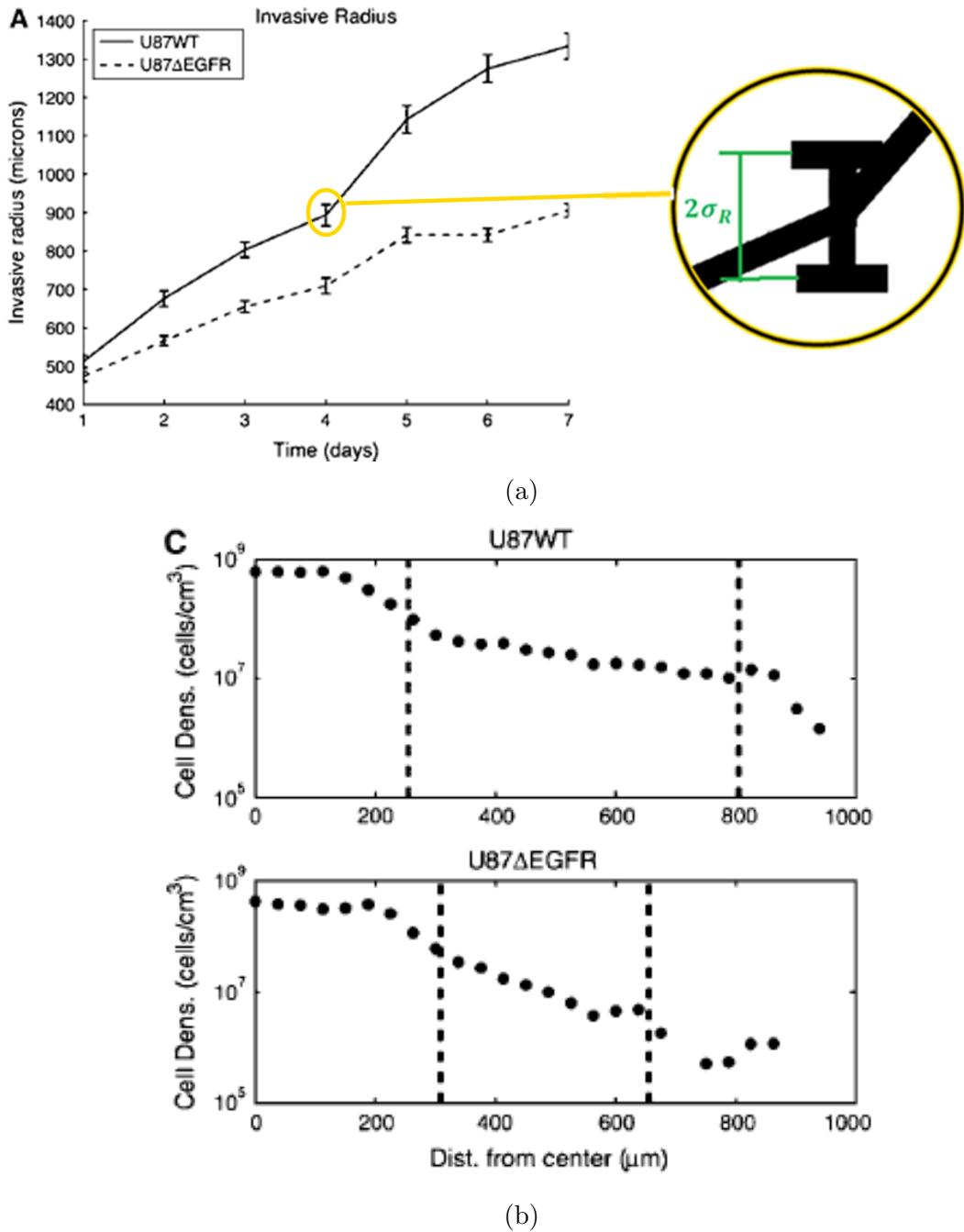


Figura 2.2: Resultados experimentales. (a) Evolución temporal del radio invasivo. *Invasive radius* denota el borde exterior de la región invasiva (radio invasivo). Los esferoides U87WT son más invasivos que los esferoides U87 Δ EGFR. (b) Registro de la densidad celular en el día 3 en función de la distancia al centro del esferoide. La línea punteada a la izquierda de cada gráfico denota el límite de la zona del *core* y la línea punteada a la derecha denota el límite de la zona de invasión. (Fuente: [23]).

Los datos obtenidos en estos experimentos son los necesarios para realizar el ajuste paramétrico de ambos modelos y calcular el error de los mismos. Aunque la mayoría de los datos se obtienen de las figuras del artículo [23], la desviación estándar de

la medida de densidad celular (σ_u) no aparecía en el artículo. Por ello, se tomó la decisión de contactar con los autores del artículo, y éstos generosamente, enviaron todo lo necesario para continuar con el ajuste paramétrico de este estudio (en concreto $\sigma_u = 4,539 \times 10^6$ células/mL). Cuando se pretenda realizar un ajuste, se usarán los datos de la Figura 2.2a para medir el radio invasivo y los de la Figura 2.2b para medir el perfil de células en el día 3, concretamente, la representación de la línea celular U87WT.

2.2. Modelos matemáticos

Los modelos matemáticos representan mediante ecuaciones la relación entre distintas variables, parámetros y restricciones para ser utilizados como una herramienta para la investigación. Este trabajo pretende optimizar y comparar dos modelos matemáticos para predecir la evolución del Glioblastoma Multiforme en esferoides. Se consideran dos modelos tridimensionales con simetría esférica, debido a las simetrías que presentan los esferoides y los experimentos realizados. Ambos modelos consideran fenotipos celulares y especies químicas que interactúan en el TME, tal y como se explica en la sección de cada modelo.

2.2.1. Modelo 1: Células invasivas y proliferativas tratadas conjuntamente

El primer modelo se basa en un artículo científico [22] que describe el comportamiento de este mismo tumor pero en dispositivos microfluídicos. El modelo del estudio, que estaba pensado para geometrías unidimensionales, aquí se ha adaptado a simetría esférica. En este primer modelo se consideran 2 fenotipos celulares: fenotipo normoxíco, formado por las células vivas, y fenotipo necrótico, formado por las células muertas, interactuando con una única especie química, el oxígeno, que actúa como regulador. Tal y como se explica en el capítulo de introducción, las células tumorales modifican su capacidad proliferativa o migratoria según el entorno en el que se encuentren, es por ello que este modelo está diseñado considerando la facultad de la célula de adaptarse a su entorno. Al tratarse de un modelo poblacional, donde no se modela el comportamiento de las células a nivel individual sino a nivel de población, se considera la concentración celular y de las especies bioquímicas como campos continuos. Además, se supone que la matriz extracelular dentro del esferoide en el que se realizan los experimentos es homogénea y su estructura no varía con el tiempo, de modo que sus propiedades mecánicas y su temperatura son constantes y no afectan a los parámetros del modelo [7]. A diferencia de como se hace en otros trabajos [24], se utiliza solo un

fenotipo de células vivas para reducir el número de parámetros implicados y por tanto, facilitar la optimización del modelo.

Ecuaciones principales

Las ecuaciones que, de forma general, identifican este modelo son:

Poblaciones celulares. Las dos ecuaciones principales que gobiernan la evolución de las poblaciones celulares (C_n y C_d) son las siguientes:

$$\frac{\partial C_n}{\partial t} = K_n \nabla^2 C_n - \nabla \cdot (K_{ch} \Pi_{ch} C_n \nabla O_2) + \frac{1}{\tau_n} \Pi_{gr} C_n - \frac{1}{\tau_{nd}} \Pi_d C_n \quad (2.1)$$

$$\frac{\partial C_d}{\partial t} = \frac{1}{\tau_{nd}} \Pi_d C_n \quad (2.2)$$

donde C_n y C_d representan la concentración de células vivas y muertas respectivamente.

Especies químicas. Como ya se ha comentado, se considera únicamente la concentración de oxígeno, cuya evolución se modela utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial O_2}{\partial t} = K_{O_2} \nabla^2 O_2 - \alpha_n \Pi_n C_n \quad (2.3)$$

donde O_2 representa la concentración de oxígeno.

Las funciones Π_{ch} , Π_{gr} , Π_d y Π_n son funciones de corrección adimensionales que, en su forma más simple, valen 1, pero que para el caso que nos ocupa se detallan posteriormente.

Tanto las ecuaciones (2.1) y (2.2) como la ecuación (2.3) se completan con condiciones de contorno y condiciones iniciales.

Las condiciones de contorno pueden ser básicamente de tres tipos:

- Condiciones de tipo **Dirichlet**, con las que se fija el valor de las variables dependientes en el contorno.
- Condiciones de tipo **Neumann**, con las que se fija el valor de las derivadas de las variables dependientes en el contorno.
- Condiciones de tipo **mixto**, o de **Robin**, que son combinación lineal de las anteriores.

En este modelo se utilizan condiciones de contorno tipo Dirichlet para el oxígeno y las células. Esto se debe a la presunción de que la concentración de oxígeno, suficientemente lejos del centro del esferoide, permanece constante a lo largo de la duración del experimento y que suficientemente lejos del esferoide, la concentración de células es nula.

Coeficientes y funciones de corrección

La regulación de la concentración intracelular de sustratos es esencial para el mantenimiento de un entorno celular estable. Los procesos de difusión y producción, suministran y consumen sustratos dentro de las células y determinan sus concentraciones [25].

Difusión. En el proceso de difusión, una sustancia tiende a moverse de una zona de alta concentración a un área de baja concentración hasta que ésta sea igual a lo largo de un espacio sin costo energético adicional (transporte pasivo). Si todos los demás factores son iguales, un gradiente de concentración más fuerte (mayor diferencia de concentración entre las regiones) se traduce en una difusión más rápida (Figura 2.3). En nuestro caso, K_{O_2} es el coeficiente de difusión del oxígeno y mediante K_n se modela el movimiento aleatorio (pedesis) de las células vivas, que responde matemáticamente también a un proceso difusivo. Como es lógico, el coeficiente de difusión de las células necróticas es cero.

Quimiotaxis. La quimiotaxis es el movimiento celular de reacción de las células ante la concentración de determinados agentes químicos en el medio ambiente, en este caso, el oxígeno. Este fenómeno permite que las células se dirijan hacia la zona donde existe una mayor cantidad de oxígeno o nutrientes y se alejen del lugar en el cual hay elementos tóxicos moviéndose en la dirección del gradiente de una determinada especie, en nuestro caso el oxígeno. Las células muertas no se ven afectadas por la quimiotaxis, sin embargo, para las células vivas, K_{ch} es un parámetro del modelo y además se debe tener en cuenta que la mortalidad de los pacientes con tumores sólidos se debe principalmente a metástasis, que depende de la invasión de las células tumorales de los vasos sanguíneos, a su vez resultado de la interacción entre la migración y la proliferación. La hipótesis de *go or grow* postula que la migración y la proliferación se excluyen en el ámbito espacio-temporal [27]. En este modelo se sigue esta hipótesis, por lo tanto, las células solo se mueven por quimiotaxis cuando el nivel de oxígeno está por debajo de un determinado umbral, puesto que por encima de este umbral las

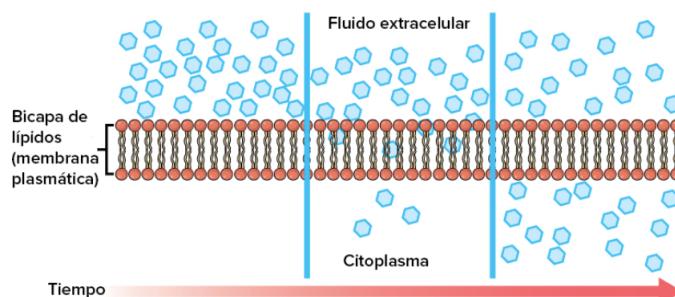


Figura 2.3: Movimiento por difusión (Fuente: [26]).

células ya tienen oxígeno suficiente para vivir. Además, en este modelo se incluye la hipótesis que defiende la migración de células únicamente por debajo del umbral de saturación, puesto que por encima de dicha concentración, no hay espacio disponible para que migren las células.

Teniendo en cuenta esto, la función de corrección que afecta al término de quimiotaxis se define de la siguiente manera:

$$\Pi_{\text{ch}} = \chi_n(O_2)\gamma_n(C_n) \quad (2.4)$$

donde χ_n y γ_n son correcciones no lineales que modelamos como una función de activación en forma de ReLU (*Rectified Linear Unit*) (Figura 2.4a). La función χ_n se define como:

$$\chi_n(O_2) = \begin{cases} 1 & \text{si } O_2 \leq 0 \\ 1 - \frac{O_2}{O_2^H} & \text{si } 0 \leq O_2 \leq O_2^H \\ 0 & \text{si } O_2 > O_2^H \end{cases} \quad (2.5)$$

donde O_2^H es el umbral de hipoxia, por debajo del cual las células comienzan a migrar. Por otra parte, la función γ_n , (Figura 2.4c) tiene en cuenta la disponibilidad de espacio al que migrar:

$$\gamma_n(C_n) = \begin{cases} 1 & \text{si } C_n \leq 0 \\ 1 - \frac{C_n}{C^M} & \text{si } 0 \leq C_n \leq C^M \\ 0 & \text{si } C_n > C^M \end{cases} \quad (2.6)$$

donde C^M es la capacidad de saturación del esferoide, por encima de la cual las células no migran.

Proliferación. El término de proliferación viene caracterizado por un tiempo característico τ_n . Este parámetro cuantifica el tiempo característico de proliferación de las células normóxicas. Además, para este fenómeno hay que tener presente de nuevo la hipótesis de *go or grow*, que marca la dependencia de este fenómeno con el oxígeno (las células solo proliferan por encima de un determinado umbral de oxígeno). Por otro lado, los modelos logísticos son muy usados para modelar crecimiento de poblaciones, puesto que tienen en cuenta un crecimiento exponencial en las primeras fases de vida de la población (cuando aún hay pocos individuos), pero luego este crecimiento se estanca, debido a la escasez de algún recurso crítico que genera competencia entre los individuos. Finalmente, en la etapa de madurez de la población (en nuestro caso, al alcanzar la capacidad de saturación del esferoide C^M), el crecimiento se detiene ya que se están utilizando todos los recursos disponibles y no hay espacio para más individuos. Al igual que la quimiotaxis, la proliferación solo se define en el caso de las células vivas. Con todo esto, se propone un modelo logístico para modelar la dependencia con la

concentración y una corrección en forma de ReLU para modelar la dependencia con el oxígeno:

$$\Pi_{\text{gr}} = \beta_n(O_2)Q_n(C_n, C_d) \quad (2.7)$$

Aquí, Q_n es el factor de corrección logístico, que tiene en cuenta que las células proliferan menos cuando el número total de células se aproxima a la concentración de saturación C^M (Ver Figura 2.5). La expresión de Q_n es:

$$Q_n(C_n, C_d) = \left(1 - \frac{C_n + C_d}{C^M}\right) \quad (2.8)$$

Por otro lado, la función de activación β_n define que las células alcanzan el nivel máximo de proliferación por encima del umbral de hipoxia O_2^H y por el contrario, que la proliferación queda inactivada en ausencia de oxígeno (Ver Figura 2.4a). β_n viene dada por:

$$\beta_n(O_2) = \begin{cases} 0 & \text{si } O_2 \leq 0 \\ \frac{O_2}{O_2^H} & \text{si } 0 \leq O_2 \leq O_2^H \\ 1 & \text{si } O_2 > O_2^H \end{cases} \quad (2.9)$$

Diferenciación. En este modelo solo se considera un cambio de fenotipo: el paso de células vivas a muertas. Existen dos modos de muerte celular [28]. Por un lado, la necrosis es el resultado del daño celular masivo, que puede estar generado por falta de nutrientes, agentes físicos (calor, frío, radiación...), agentes químicos (tóxicos) o agentes biológicos. Es un proceso que ocurre de manera aguda, como por ejemplo en el centro de un tejido infartado. En el problema que nos ocupa, la principal causa de necrosis es la falta de oxígeno, conocida como anoxia. Por otro lado, la apoptosis, o muerte celular programada, es un tipo de muerte celular en la que una serie de procesos moleculares en la célula conducen a su muerte. Este es un método que el cuerpo utiliza para deshacerse de células innecesarias o anormales y sustituirlas por células nuevas. A diferencia de la necrosis, no está ligado a la falta de energía, sino que es necesaria para que se produzca. Desde el punto de vista poblacional, este fenómeno que tiene una naturaleza estocástica, viene caracterizado por un tiempo característico τ_{nd} , y sirve para mantener el equilibrio de los tejidos asegurando así la salud del organismo.

Debido a la naturaleza de la muerte celular, se utiliza como función de corrección una tangente hiperbólica, capaz de reproducir tanto el proceso de apoptosis como el de necrosis, ya que esta función se utiliza cuando se presentan variaciones más suaves, por ser menos abrupta que una ReLU, puesto que, aún cuando el nivel de oxígeno es muy alto, mueren algunas células debido a la apoptosis.

La función de activación correspondiente a la diferenciación queda pues así:

$$\Pi_d = S_{nd}(O_2) \quad (2.10)$$

S_{nd} es la función de corrección (Figura 2.4b), que regula la dependencia con el nivel de oxígeno y depende a su vez de 2 parámetros: el umbral de anoxia O_2^D y un parámetro de sensibilidad ΔO_2^D , que tiene en cuenta la naturaleza estocástica del fenómeno:

$$S_{nd}(O_2) = \frac{1}{2} \left(1 + \tanh \left(\frac{O_2 - O_2^D}{\Delta O_2^D} \right) \right) \quad (2.11)$$

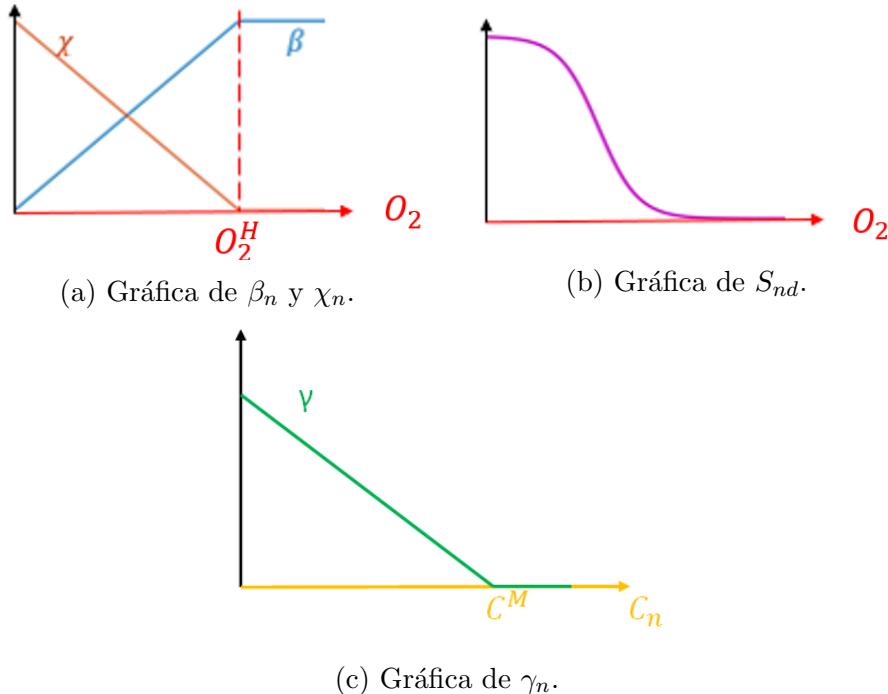


Figura 2.4: Diferentes funciones de activación utilizadas.

Consumo de oxígeno. El consumo de oxígeno por parte de las células es un fenómeno complejo relacionado con la fosforilación oxidativa que tiene lugar en las mitocondrias. α_n es el parámetro que representa el consumo de oxígeno de las células normóxicas por unidad de tiempo (las células muertas no consumen oxígeno) y H_n es la función de corrección.

$$\Pi_n = H_n(O_2) \quad (2.12)$$

Para modelarlo, se utiliza una función de corrección basada en el modelo cinético de Michaelis-Menten [29], que describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas (Figura 2.6):

$$H_n(O_2) = \frac{O_2}{O_2^M + O_2} \quad (2.13)$$

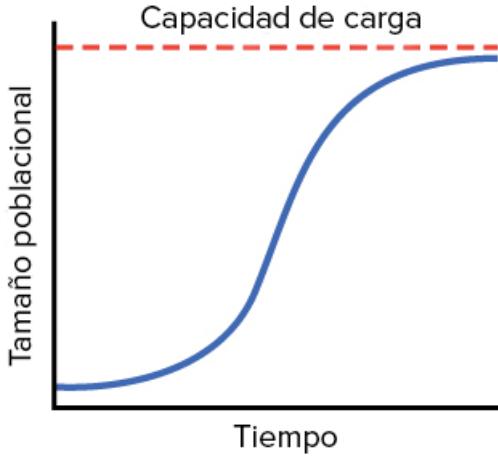


Figura 2.5: Evolución de la población considerando el modelo de crecimiento logístico.

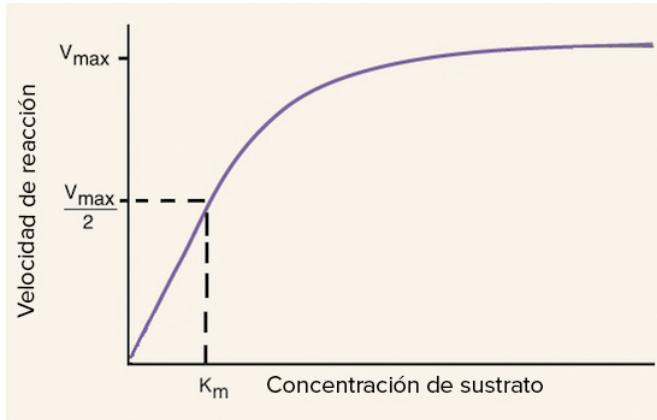


Figura 2.6: Diagrama del modelo cinético de Michaelis-Menten, donde $K_m = O_2^M$ es la constante de Michaelis-Menten.

En la Ecuación (2.13) se muestra la función de corrección H_n , que depende de la constante de Michaelis-Menten O_2^M , que indica la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima de reacción.

2.2.2. Modelo 2: Células invasivas tratadas individualmente.

El segundo modelo se basa en un estudio del comportamiento de esferoides tumorales y el radio invasivo, modelando la diferencia en el comportamiento del núcleo y las células invasivas [23]. Para completar este modelo y que sea comparable al primero se añade el oxígeno como especie química. Así, este modelo consta de un solo fenotipo celular (células invasivas) y una especie química (oxígeno). Al pretender hallar los diferentes comportamientos del esferoide tumoral y las células invasivas, se modela el núcleo del tumor (donde se encuentran las células proliferativas) como una esfera que aumenta su radio a una velocidad constante, y se desprenden de células invasivas a un determinado ritmo constante. Teniendo en cuenta que los esferoides

tumorales multicelulares, cuando crecen en agar blando o metilcelulosa, primero crecen exponencialmente, luego linealmente, y finalmente dejan de crecer por completo [30] y que el crecimiento lineal normalmente ocurre en esferoides con un radio de entre 0.1 mm y 0.5 mm, como es el caso del experimento que se va a reproducir (véase la Figura 2.7), se supone un crecimiento lineal, $R(t) = R_0 + v_ct$.

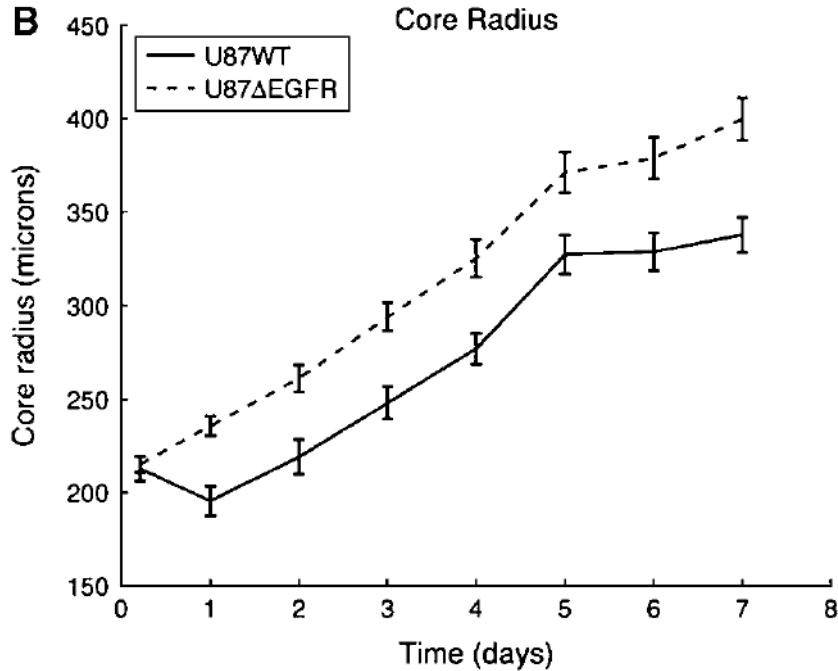


Figura 2.7: Radio del núcleo del esferoide con respecto al tiempo (Fuente: [23]).

Además, en este modelo, al añadir la dependencia del oxígeno, la migración de las células invasivas se produce en la dirección del gradiente de oxígeno (quimiotaxis).

Ecuaciones principales

Las ecuaciones que identifican este modelado son las siguientes:

Poblaciones celulares. La ecuación principal que gobierna la evolución de las poblaciones celulares invasivas (C_n) es la siguiente:

$$\frac{\partial C_n}{\partial t} = K_n \nabla^2 C_n - \nabla(K_{ch} \Pi_{ch} C_n \nabla O_2) + s_{inv} \delta(r - R(t)) + \frac{1}{\tau_n} \Pi_{gr} C_n \quad (2.14)$$

Especies químicas. La ecuación que se muestra a continuación, como ya se ha comentado, no está en el estudio en el que se basa el modelo 2. Se trata de una adaptación del modelo en el que se añade la dependencia de oxígeno de la velocidad de migración y, por tanto, se requiere la siguiente ecuación que describe la evolución del

oxígeno:

$$\frac{\partial O_2}{\partial t} = K_{O_2} \nabla^2 O_2 - \alpha_n \Pi_n C_n \quad (2.15)$$

donde se aprecia que la concentración de oxígeno se ve modificada por la difusión y del consumo celular.

Coeficientes y funciones de corrección

Al margen de los fenómenos comunes con el modelo anterior, este modelo introduce algunas variaciones tanto en el valor de los parámetros como en las funciones de corrección que se detallan a continuación.

Desprendimiento. En este modelo se tiene en cuenta el desprendimiento de la superficie del núcleo mediante el parámetro s_{inv} . Se sabe que la matriz de colágeno tiene el potencial de mejorar el desprendimiento [23], proporcionando a las células un sustrato en el que moverse, pero también puede inhibir el desprendimiento si las células tienen dificultades para moverse a través de la malla de colágeno. En cuanto a la función δ , representa la Delta de Dirac. Se trata de una función generalizada o distribución que constituye una aproximación muy útil para funciones apuntadas y constituye el mismo tipo de abstracción matemática que una carga o masa puntual [31]. Intuitivamente se puede imaginar la función $\delta(x)$ como una función que tiene un valor infinito en $x = 0$, y tiene un valor nulo en cualquier otro punto, de tal manera que su integral es uno (ver Figura 2.8).

$$\begin{cases} \delta(x - a) = 0 & \forall x \neq a \\ \int_{-\infty}^{+\infty} \delta(x - a) \cdot dx = 1 \end{cases} \quad (2.16)$$

La distribución $\delta(x)$ tiende a infinito cuando $x = a$, en donde a puede ser igual a cero (situando el “pico” en el centro del sistema de coordenadas) y, para cualquier otro valor de x , es igual a 0. En particular, en nuestro modelo $a = R(t)$, y de esta manera se representa que únicamente se desprenden células en la frontera del *core* del esferoide.

Proliferación. Al igual que en el modelo 1 se considera la proliferación como un coeficiente determinante para evaluar la invasión de los esferoides tumorales. En este caso también se propone un modelo logístico para modelar la dependencia con la concentración celular.

$$\Pi_{\text{gr}} = Q_n(C_n)C_n \quad (2.17)$$

Aquí Q_n es el factor de corrección logístico, que tiene en cuenta que las células proliferan menos cuando el número total de células se aproxima a la concentración máxima C^M

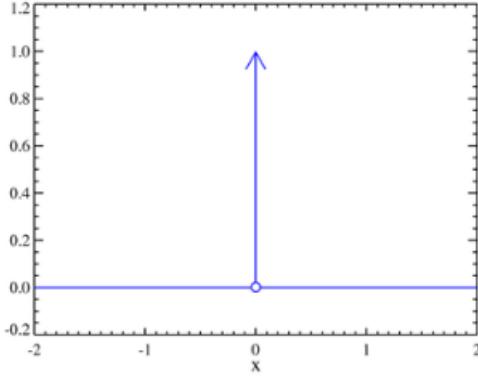


Figura 2.8: Diagrama esquemático de la función delta de Dirac (Fuente: [31]).

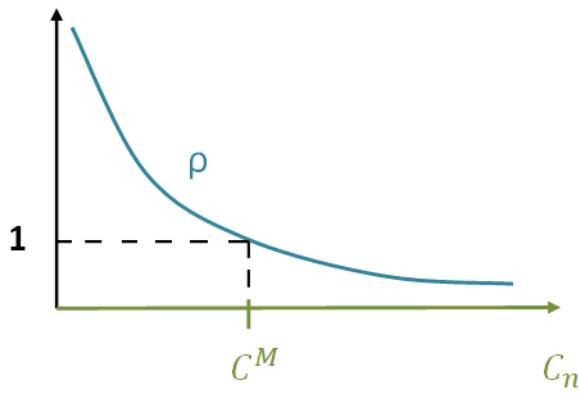


Figura 2.9: Gráfica de la función $\rho(r, C_n)$.

(Figura 2.5).

$$Q_n(C_n) = \left(1 - \frac{C_n}{C^M}\right) \quad (2.18)$$

Aunque se podría introducir una corrección al crecimiento como la dada por la función β_n (Ecuación (2.9)), como aquí se está teniendo únicamente en cuenta en fenotipo invasivo se supone que en dicha población la concentración de oxígeno no afecta a la velocidad de migración.

Quimiotaxis. De forma análoga a como se ha razonado para el crecimiento, como solo se considera el fenotipo invasivo se asume que la función de corrección es $\Pi_{ch} = 1$ lo que hace que solo haya un parámetro (K_{ch}) relacionado con la velocidad de migración.

Consumo de oxígeno. Para el consumo de oxígeno se utiliza la misma función de corrección que en el modelo 1 basada en el modelo cinético Michaelis-Menten junto con otra función para tener en cuenta el consumo de las células proliferativas en el núcleo del esferoide.

$$\Pi_n = \rho(r, C_n) H_n(O_2) \quad (2.19)$$

$H_n(O_2)$ es la función de corrección del modelo cinético de Michaelis-Menten (Ecuación

(2.13)) y $\rho(r, C_n)$ viene dada por:

$$\rho(r, C_n) = \begin{cases} \frac{C^M}{C_n} & \text{si } r \leq R(t) \\ 1 & \text{si } r > R(t) \end{cases} \quad (2.20)$$

C^M es la concentración celular máxima, $R(t)$ es el radio del *core* (núcleo) en un tiempo t .

La función ρ da cuenta del hecho de que dentro del *core* del esferoide se produce un consumo constante y uniforme (suponiendo que las células están en saturación), puesto que no se simulan las células proliferativas pero consumen oxígeno. Fuera del mismo esta corrección no tiene efecto (Ver Figura 2.9).

2.3. Comparación entre modelos

Los modelos de este trabajo, aunque tengan como objetivo el estudio de la evolución del Glioblastoma Multiforme en esferoides y se hayan adaptado de sus modelos base respectivos para ser comparables, presentan diferencias entre sí.

En primer lugar, el planteamiento de ambos modelos es diferente puesto que en el primer modelo se pretende modelar las principales estructuras migratorias del GBM en un esferoide contando con dos fenotipos celulares (normóxico y necrótico) y, el segundo modelo estudia el comportamiento del núcleo y las células invasivas del GBM de forma independiente, también en un esferoide, contando con un solo fenotipo celular (células invasivas). Esto provoca que algunos de los aspectos que definen los modelos sean distintos. Algunas de estas diferencias aparecen en el término fuente, y son las siguientes:

- **Diferenciación.** Al contar solo con un fenotipo, el modelo 2 no considera ningún cambio de fenotipo, por lo tanto este término solo aparece en el modelo 1.
- **Desprendimiento.** El modelo 1, al tratar conjuntamente el fenotipo del *core* y el fenotipo invasivo, no considera el desprendimiento de la superficie del núcleo, mientras que el modelo 2 sí lo hace (mediante el término $s_{inv}\delta(r - R(t))$) puesto que las células invasivas tienen que surgir de algún sitio.

Sin embargo, ambos modelos tienen en común los siguientes términos (aunque con matrices que se detallarán):

- **Difusión.** La difusión es importante en ambos modelos, siendo la velocidad de difusión de las células K_n en los dos.

- **Quimiotaxis.** Aunque la quimiotaxis se encuentra presente en los dos modelos, se ha de tener en cuenta que el segundo modelo solo considera el fenotipo invasivo y por tanto la función de corrección Π_{ch} , en el caso del modelo 2, se asume igual a 1, mientras que las funciones de corrección χ_n y γ_n , para el primer modelo, tienen que tener en cuenta lo que se conoce como *go or grow*.
- **Proliferación.** Al igual que en el caso de la quimiotaxis, el modelo 2 presenta una forma más simple puesto que cuenta con un único fenotipo celular mientras que en el modelo 1 se consideran dos fenotipos celulares. Además, se tiene que tener en cuenta el paradigma *go or grow*, cosa que se hace mediante la función de corrección β_n .
- **Consumo de oxígeno.** Aunque ambos modelos presentan una función de corrección basada en el modelo cinético Michaelis-Menten (H_n), el modelo 2 presenta una segunda función de corrección ρ . Esta función proporciona información más concreta sobre cómo afecta la concentración de células al consumo de oxígeno al segundo modelo en función de en qué zona se localizan las células.

En resumen, el modelo 1, gracias a las ReLus χ_n y β_n (Ecuaciones (2.5) y (2.9)), puede distinguir entre células proliferativas e invasivas desde una perspectiva poblacional, mientras que el modelo 2 solo se centra en el comportamiento invasivo. Al tener en cuenta más posibles comportamientos celulares el modelo 1 aporta más información sobre el cultivo global de células. Sin embargo, el modelo 2, presenta un análisis más específico de la evolución del núcleo del esferoide y de la progresión de las células invasivas y permite diferenciar ambos tipos de células en el esferoide.

En la Tabla 2.1 se resumen las diferencias principales entre los dos modelos.

	MODELO 1	MODELO 2
Fenotipos celulares	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Células muertas ▷ Células normóxicas (invasivas + proliferativas) 	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Células invasivas
Fenómenos celulares	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Difusión ▷ Quimiotaxis ▷ Proliferación ▷ Diferenciación (muerte celular) 	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Difusión ▷ Quimiotaxis ▷ Proliferación ▷ Desprendimiento
Fenómenos especies	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Consumo de oxígeno ▷ Difusión 	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Consumo de oxígeno ▷ Difusión
Parámetros comunes	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Coeficiente de difusión de las células normóxicas, K_n. ▷ Coeficiente de quimiotaxis de las células normóxicas, K_{ch}. ▷ Tiempo característico de proliferación, τ_n. ▷ Capacidad de saturación, C^M. ▷ Coeficiente de difusión del oxígeno, K_{O_2}. ▷ Coeficiente de consumo de oxígeno, α_n. ▷ Constante de Michaelis-Menten, O_2^M. 	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Coeficiente de difusión de las células invasivas, K_n. ▷ Coeficiente de quimiotaxis de las células invasivas, K_{ch}. ▷ Tiempo característico de proliferación, τ_n. ▷ Capacidad de saturación, C^M. ▷ Coeficiente de difusión del oxígeno, K_{O_2}. ▷ Coeficiente de consumo de oxígeno, α_n. ▷ Constante de Michaelis-Menten, O_2^M.
Parámetros propios	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Umbral de hipoxia, O_2^H. ▷ Tiempo característico de muerte, τ_{nd}. ▷ Umbral de anoxia, O_2^D. ▷ Parámetro de sensibilidad de anoxia, ΔO_2^D. 	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Radio del tumor inicial, R_0. ▷ Coeficiente de velocidad del incremento del radio del <i>core</i>, v_c. ▷ Desprendimiento de la superficie del <i>core</i>, s_{inv}.
<i>Go or grow</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Funciones de corrección χ_n y β_n. 	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Fenotipos invasivo y no invasivo tratados separadamente.

Tabla 2.1: Resumen modelo 1 vs. modelo 2.

2.4. Implementación numérica

2.4.1. Ecuaciones del modelo en simetría esférica

Los dos modelos explicados anteriormente, se implementaron en Matlab. Sin embargo, puesto que ambos presentan simetría esférica, es necesario particularizar las ecuaciones de cada uno de estos. Suponiendo simetría esférica, los operadores diferenciales involucrados quedan:

- Gradiente:

$$\nabla f = \frac{\partial f}{\partial r} \mathbf{u}_r \quad (2.21)$$

- Divergencia:

$$\nabla \cdot \mathbf{F} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} (r^2 F_r) \quad (2.22)$$

- Laplaciano:

$$\nabla^2 f = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial f}{\partial r} \right) \quad (2.23)$$

Aplicando las expresiones anteriores de los operadores diferenciales en simetría esférica, el modelo 1 particularizado para el problema a estudiar se define mediante las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \frac{\partial C_n}{\partial t} &= K_n \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C_n}{\partial r} \right) - K_{ch} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \chi_n(O_2) \gamma_n(C_n) C_n \left(\frac{\partial O_2}{\partial r} \right) \right) \\ &\quad + \frac{1}{\tau_n} \beta_n(O_2) G_n(C_n, C_d) C_n - \frac{1}{\tau_{nd}} S_{nd}(O_2) C_n \end{aligned} \quad (2.24)$$

$$\frac{\partial C_d}{\partial t} = \frac{1}{\tau_{nd}} S_{nd}(O_2) C_n \quad (2.25)$$

$$\frac{\partial O_2}{\partial t} = K_{O_2} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial O_2}{\partial r} \right) - \alpha_n H_n(O_2) C_n \quad (2.26)$$

En cuanto al modelo 2, las ecuaciones quedan:

$$\begin{aligned} \frac{\partial C_n}{\partial t} &= K_n \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C_n}{\partial r} \right) - K_{ch} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 C_n \frac{\partial O_2}{\partial r} \right) + s_{inv} \delta(r - R(t)) + \frac{1}{\tau_n} Q_n(C_n) C_n \\ &\quad \end{aligned} \quad (2.27)$$

$$\frac{\partial O_2}{\partial t} = K_{O_2} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial O_2}{\partial r} \right) - \alpha_n \rho(r, C_n) H_n(O_2) C_n \quad (2.28)$$

Las ecuaciones de los modelos matemáticos se completan con condiciones de contorno y condiciones iniciales. Aunque los dos modelos presentan las mismas

condiciones de contorno, las condiciones iniciales difieren. Se suponen las siguientes condiciones de contorno para el oxígeno:

$$O_2(r \rightarrow \infty, t) = O_2^{\text{ext}} \quad (2.29)$$

donde O_2^{ext} es un valor de concentración de oxígeno conocido. La condición de contorno para las células se expresa como:

$$C_n(r \rightarrow \infty, t) = 0 \quad (2.30)$$

$$C_d(r \rightarrow \infty, t) = 0 \quad (2.31)$$

donde C_n representa las células vivas (modelo 1) o invasivas (modelo 2) y C_d las células muertas. Esta condición de contorno supone que no existen nunca células suficientemente lejos del esferoide.

Se ha de tener en cuenta que por razones de implementación se simula desde $r = 0$ cm a $r = 1$ cm, que se considera como el infinito por estar suficientemente alejado de la zona donde va a haber células. La simetría esférica condiciona el modelo de manera que las condiciones de contorno para $r = 0$ son las siguientes:

$$\frac{\partial O_2}{\partial r}(r = 0, t) = 0 \quad (2.32)$$

$$\frac{\partial C_n}{\partial r}(r = 0, t) = 0 \quad (2.33)$$

$$\frac{\partial C_d}{\partial r}(r = 0, t) = 0 \quad (2.34)$$

Como condiciones iniciales, se supone que la concentración de células y la concentración de oxígeno son conocidas en el tiempo inicial. Teniendo en cuenta que las condiciones iniciales son diferentes entre los modelos, las del modelo 1 son las siguientes:

$$C_n(r, t = 0) = C_n^0(r) \quad (2.35)$$

$$C_d(r, t = 0) = 0 \quad (2.36)$$

$$O_2(r, t = 0) = O_2^{\text{ext}} \quad (2.37)$$

donde $C_n^0(r)$ es conocida y vale:

$$C_n^0 = \begin{cases} 2,1 \times 10^8 \text{ células/cm}^3 & \text{si } r < R_0 \\ 0 & \text{si } r \geq R_0 \end{cases} \quad (2.38)$$

mientras que las del modelo 2 son:

$$C_n(r, t = 0) = 0 \quad (2.39)$$

$$O_2(r, t = 0) = O_2^{\text{ext}} \quad (2.40)$$

puesto que, en el instante inicial, todas las células se encuentran en el núcleo del esferoide y por tanto no hay células invasivas. En ambos casos el nivel de oxígeno inicial es O_2^{ext} y es conocido e igual a 7 mmHg.

2.4.2. Implementación en Matlab

La plataforma Matlab está diseñada para resolver problemas científicos y de ingeniería. El lenguaje de Matlab, basado en matrices, es una forma muy natural para expresar las matemáticas computacionales. Las gráficas integradas facilitan la visualización de los datos y la obtención de información a partir de ellos. Por todo ello, este TFG se realiza mediante este sistema numérico computacional.

Para resolver los problemas de cada modelo se utiliza un *solver* llamado `pdepe`. El *solver* `pdepe`, resuelve sistemas parabólicos y elípticos de ecuaciones diferenciales parciales (PDE) con una única variable espacial r y el tiempo t , y se ejecuta mediante la siguiente llamada:

```
sol = pdepe(m,pdefun,icfun,bcfun,rmesh,tspan)
```

donde m es un valor escalar que representa la simetría del problema, en este caso, $m = 2$ (simetría esférica). Cuando $m > 0$, como sucede con la simetría esférica ($m = 2$), el *solver* `pdepe` impone automáticamente las condiciones de contorno asociadas con la simetría. `pdefun` son las ecuaciones a resolver, `icfun` representan los valores iniciales (condiciones iniciales) y `bctfun` son las condiciones de contorno. Los detalles sobre el método numérico de aproximación se detallan en el Anexo ??.

2.4.3. Tratamiento numérico de la Delta de Dirac

Como en la ecuación del modelo se utiliza la Delta de Dirac, que es una idealización teórica, es necesario realizar una aproximación en la implementación en Matlab de manera que, para este proyecto, la delta de Dirac se aproxima mediante una función δ_ε , que depende de un parámetro ε de forma que $\delta = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \delta_\varepsilon$. En este trabajo, se ha escogido como función de aproximación la densidad de probabilidad de la función normal de media 0 y desviación típica ε :

$$\delta_\varepsilon(x) = \frac{1}{\varepsilon\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-0)^2}{2\varepsilon^2}} \quad (2.41)$$

Para que la delta de Dirac se modele de la forma adecuada se busca que ε tienda a cero (Figura 2.10). Así, se soluciona la ecuación sustituyendo δ por δ_ε :

$$\delta(r - R(t)) \rightarrow \delta_\varepsilon(r - R(t)) \quad (2.42)$$

siendo δ_ε la δ aproximada. En este caso, la δ_ε sigue una distribución normal y por lo tanto, la implementación en Matlab se realiza mediante la función `normpdf`.

Teniendo en cuenta que la ε debe tener el valor más cercano a cero posible, se realiza un estudio de convergencia para comprobar cuál es la más adecuada. Este estudio se basa en la puesta en marcha de la simulación para varios valores de ε buscando el valor a partir del cual los resultados obtenidos no varían al seguir disminuyendo ε .

Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 2.11. En la Figura 2.11a se observa como, mediante distintas iteraciones, se logra una buena aproximación de la solución a partir de $\varepsilon = 1 \times 10^{-3}$ cm, donde el valor es lo suficientemente pequeño como para que la variación de ε no influya en la simulación. En la Figura 2.11b se puede ver la variación de la solución para diferentes valores del tamaño de la malla Δr y de ε . Se representa la variación relativa de la solución para distintos tamaños de malla y distintos valores de ε . Dicha variación (E) se calcula de la siguiente manera:

$$E = \sqrt{E_u^2 + E_v^2} \quad (2.43)$$

$$E_u = \frac{\int_0^R (C_{n_{i+1}} - C_{n_i})^2 dr}{\int_0^R C_{n_i}^2 dr} \quad (2.44)$$

$$E_v = \frac{\int_0^R (O_{2_{i+1}} - O_{2_i})^2 dr}{\int_0^R O_{2_i}^2 dr} \quad (2.45)$$

donde C_{n_i} y O_{2_i} representan la concentración de células y la concentración de oxígeno correspondientes a la iteración con el valor i-ésimo de ε , respectivamente y $R = 1$ cm.

Las conclusiones que se extraen son las siguientes:

- A partir de cierto valor de ε (alrededor de $\varepsilon = 1 \times 10^{-3}$ cm), la variación en la solución (en norma L_2) es muy pequeña, luego la función δ se considera bien aproximada (Figura 2.11a).
- Para valores de ε menores a la malla usada para simular, Δr , marcada en trazo discontinuo vertical, afinar en el valor de ε no tiene impacto en la simulación, puesto que la simulación no es capaz de detectar la escala de variación de la delta aproximada (Figura 2.11b).

Por tanto, las simulaciones se realizan con un valor de $\varepsilon = 1 \times 10^{-3}$ cm y una malla de $\Delta r = 5 \times 10^{-4}$ cm.

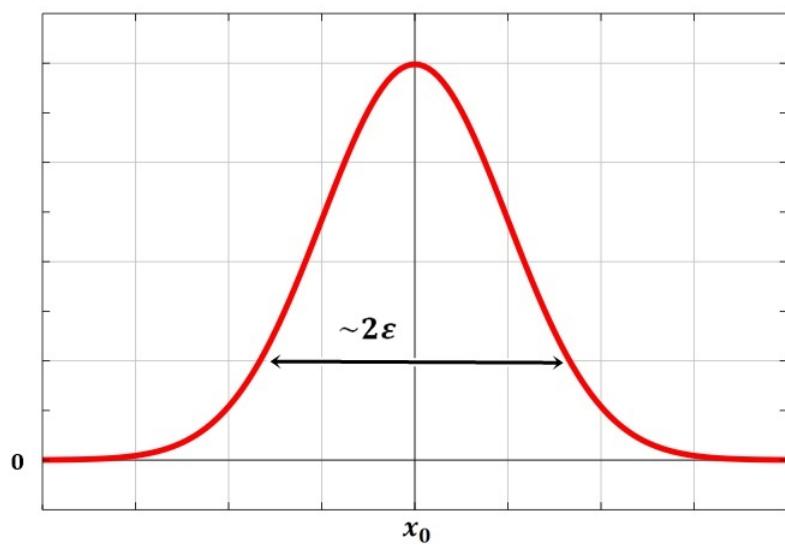
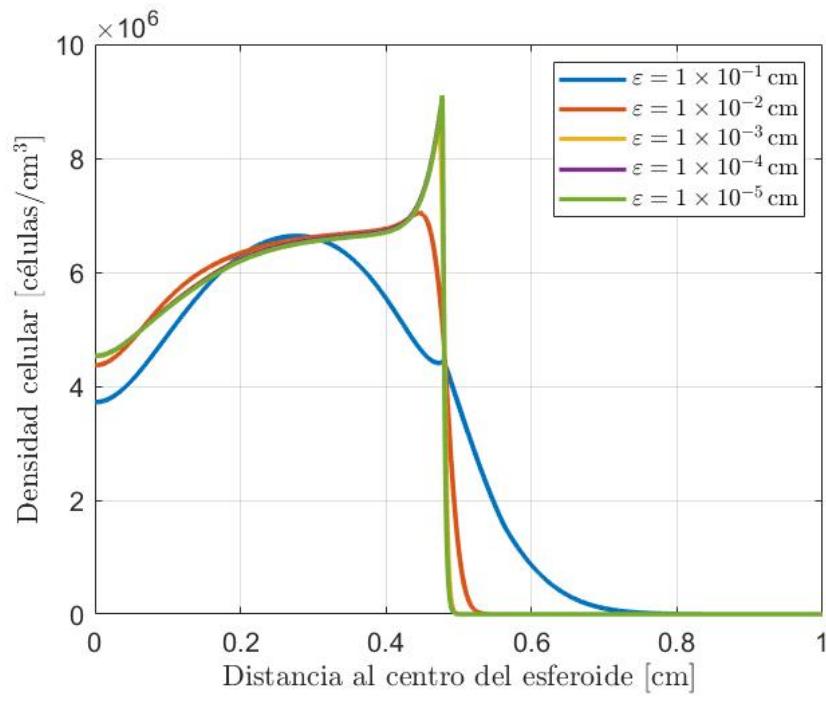
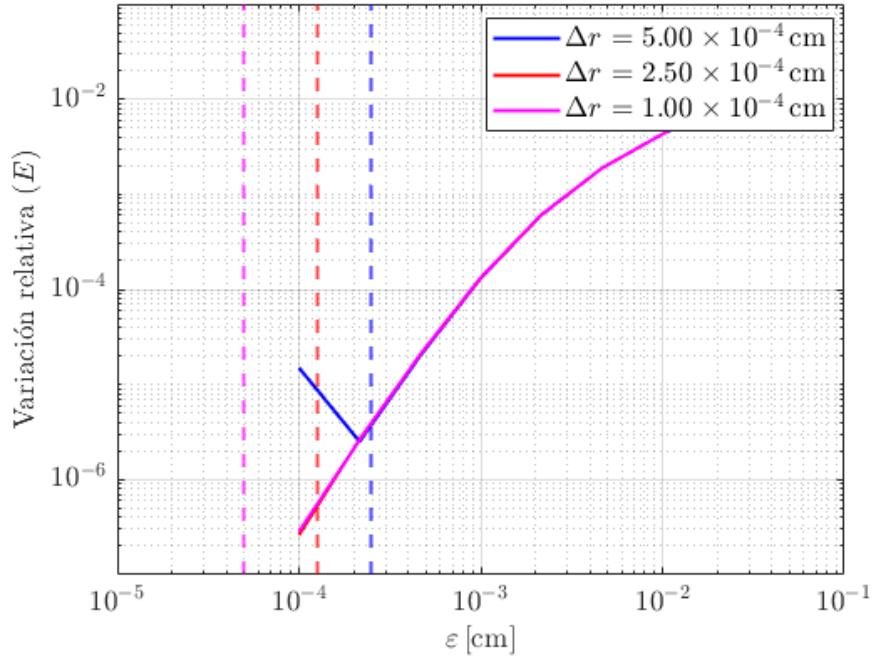


Figura 2.10: Representación de ϵ en una distribución normal.



(a) Representación de resultados de la simulación en función del valor de ε .



(b) Representación de la variación de la solución para diferentes valores de Δr y de ε .

Figura 2.11: Estudio de la convergencia de la solución en función del valor de ε .

Capítulo 3

Ajuste paramétrico

3.1. Ajuste por mínimos cuadrados

Una vez programados los modelos se procede a la fase de ajuste. Esta fase tiene por finalidad el ajuste de las salidas de cada modelo con las observadas en el sistema real [32]. El ajuste se realiza por el método de mínimos cuadrados, que proporciona una forma de encontrar la mejor estimación, suponiendo que los errores sean aleatorios e imparciales. Se trata de un procedimiento de análisis numérico en el que, un conjunto de datos, se ajusta para determinar la aproximación a los datos reales, en este caso, los datos experimentales del artículo [23]. La función a minimizar es

$$\chi_{\text{red}}^2 = \frac{1}{N - n - 1} \left[\sum_t \left(\frac{R_i(t) - \widetilde{R}_i(t)}{\sigma_{R_i}(t)} \right)^2 + \sum_r \left(\frac{u_i(r, t_3) - \widetilde{u}_i(r, t_3)}{\sigma_u} \right)^2 \right] \quad (3.1)$$

donde N es el número de datos experimentales y n es el número de parámetros a ajustar. $R_i(t)$ y $u_i(r, t_3)$ son los datos experimentales del radio invasivo y la densidad de células en el tercer día, respectivamente. Las variables $\widetilde{R}_i(t)$ y $\widetilde{u}_i(r, t_3)$ representan los datos generados por los modelos y por lo tanto dependen del valor de los parámetros. Por último, los parámetros $\sigma_{R_i}(t)$ y σ_u representan la desviación estándar de la medida del radio invasivo y la densidad de células en el día 3, respectivamente en cada punto medido. El radio invasivo se define como el radio del esferoide para el que se tiene una concentración celular de 1×10^7 células/mL. Como se puede observar, para el cálculo de χ_{red}^2 se utiliza el instante t_3 , que representa el tercer día de cultivo celular, para la densidad celular. Esto se debe a que en el artículo [23] se utilizan los datos experimentales de ese día.

Esta función se minimiza con un método de programación secuencial cuadrática (SQP) usando la función de optimización `fmincon` de MatLab. La realización del ajuste comienza con una revisión de la bibliografía, de esta forma se determinan los rangos de variabilidad de cada parámetro y se clasifican entre parámetros fijos y los parámetros

del ajuste (justificados en la Sección 3.1.1).

3.1.1. Análisis bibliográfico

En este apartado, se buscan artículos en los que se trate el tema a desarrollar en este trabajo. El análisis bibliográfico se realiza principalmente a partir de los artículos [22] y [23] (artículos en los que se basa este proyecto). A partir del estudio de los artículos se decide qué parámetros se consideran lo suficientemente conocidos como para considerarse fijos y cuáles, por lo contrario, se considera que deben ajustarse para cada modelo.

A continuación se realiza una breve explicación de por qué los parámetros que aparecen en la Tabla 3.1 se puede suponer que son fijos.

Tanto en el caso de la capacidad de saturación (C^M) como en el del radio del tumor inicial (R_0) y del coeficiente de velocidad del incremento del radio del *core* (v_c) se trata de parámetros muy dependientes de las condiciones experimentales y son considerados, o bien parámetros fijos por las personas que realizan el experimento (C^M), o se dan como datos en el mismo (R_0 y v_c) [23]. Puesto que no hay evidencia de existencia de células muertas se decide no considerarlas, y por lo tanto, el tiempo característico de muerte (τ_{nd}) se supone infinito. También se consideran parámetros fijos: el coeficiente de difusión del oxígeno (K_{O_2}), la constante de Michaelis-Menten (O_2^M), los umbrales de hipoxia (O_2^H) y anoxia (O_2^D) y el parámetro de sensibilidad de anoxia (ΔO_2^D). Las razones por las que estos parámetros se consideran fijos es que, además de ser muy conocidos en bibliografía [22], presentan un gran significado metabólico.

Se considera que los parámetros: K_n , K_{ch} , τ_n , α_n y s_{inv} , son ajustables. Esto se debe entre otras razones a que, tal y como se puede ver en las Tablas 3.2 y 3.3, su rango de variabilidad es demasiado amplio como para considerarse parámetros conocidos.

3.1.2. Resultados del ajuste

A partir de este ajuste se pretende obtener en ambos modelos una $\chi^2_{red} < 1$, puesto que ese error refleja que los datos de las simulaciones, en promedio, no se alejan de los datos reales (experimentales) más que una desviación estándar.

En el primer modelo se escogen los siguientes parámetros para optimizar el primer modelo: K_n , K_{ch} , τ_n , α_n .

En este caso $\chi^2_{red} = \chi^2_{red}(K_n, K_{ch}, \tau_n, \alpha_n)$, siendo por tanto, $n = 4$.

Parámetro	Valor	Unidades	Fuente
Capacidad de saturación, C^M	$4,2 \times 10^8$	células/cm ³	[23]
Coeficiente de difusión del oxígeno, K_{O_2}	1×10^{-5}	cm ² /s	[22]
Constante de Michaelis-Menten, O_2^M	2,5	mmHg	[22]
Umbral de hipoxia, O_2^H	7	mmHg	[22]
Tiempo característico de muerte, τ_{nd}	∞	s	-
Umbral de anoxia, O_2^D	1,6	mmHg	[22]
Parámetro de sensibilidad de anoxia, ΔO_2^D	0,1	mmHg	[22]
Radio del tumor inicial, R_0	250	μm	[23]
Coeficiente de velocidad del incremento del radio del core, v_c	$3,13 \times 10^{-8}$	cm/s	[23]

Tabla 3.1: Valores de los parámetros utilizados en los modelos.

Parámetro	Variabilidad	Valor óptimo	Unidades	Fuente
K_n	$6,6 \times 10^{-12} - 5 \times 10^{-5}$	$1,45 \times 10^{-9}$	cm ² /s	[22]
K_{ch}	$2 \times 10^{-10} - 7,5 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-9}$	cm ² /(mmHg · s)	[22]
τ_n	$5,76 \times 10^4 - 7,2 \times 10^6$	$8,64 \times 10^4$	s	[22]
α_n	$2,5 \times 10^{-9} - 7,5 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-9}$	mmHg · cm ³ /(células · s)	[22]

Tabla 3.2: Rango de variabilidad de los parámetros en bibliografía y resultado de ajuste (modelo 1).

Con los valores de los parámetros mostrados en la Tabla 3.2 se obtiene un valor de $\chi^2_{\text{red}} = 0,9408$.

En el segundo modelo se ajustan los siguientes parámetros: $K_n, K_{ch}, s_{\text{inv}}, \frac{1}{\tau_n}, \alpha_n$.

En este caso $\chi^2_{\text{red}} = \chi^2_{\text{red}}(K_n, K_{ch}, s_{\text{inv}}, \frac{1}{\tau_n}, \alpha_n)$, siendo $n = 5$.

Parámetro	Variabilidad	Valor óptimo	Unidades	Fuente
K_n	$6,6 \times 10^{-12} - 5 \times 10^{-5}$	$1,45 \times 10^{-9}$	cm ² /s	[22]
v	$0 - 1,16 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^{-9}$	cm/s	[23]
s_{inv}	$1,16 \times 10^{-1} - 1,16 \times 10^2$	14,5	células/(cm ² · s)	[23]
$1/\tau_n$	$0 - 3,47 \times 10^{-6}$	$4,63 \times 10^{-6}$	1/s	[23]
α_n	$2,5 \times 10^{-9} - 7,5 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-9}$	mmHg · cm ³ /(células · s)	[22]

Tabla 3.3: Rango de variabilidad de los parámetros en bibliografía y resultado de ajuste (modelo 2).

Con los valores de los parámetros mostrados en la Tabla 3.3 se obtiene un valor de $\chi^2_{\text{red}} = 0,9930$.

3.2. Contraste estadístico

El objetivo del contraste estadístico por hipótesis consiste en, a partir de los datos de una muestra, decidir si se acepta o se rechaza una hipótesis H_0 . La hipótesis que se supone cierta de partida, se llama hipótesis nula (H_0) y la hipótesis que reemplazará a la hipótesis nula en caso de que ésta sea rechazada, se llama hipótesis alternativa (H_1). En el caso del contraste de los dos modelos de este trabajo, la hipótesis nula H_0 sostiene que los datos de las simulaciones describen de manera apropiada los datos experimentales. Para que la hipótesis nula sea aceptada y por lo tanto, no haya evidencia suficiente para rechazar los modelos, se debe cumplir que

$$\chi_{\text{red}}^2 < \chi_{\nu,\alpha}^2 / \nu \quad (3.2)$$

donde χ_{red}^2 es la función utilizada en el ajuste paramétrico (Ecuación (3.1)) y $\chi_{\nu,\alpha}^2$ es la distribución de χ^2 teórica para un nivel de significación α . ν son los grados de libertad. En este caso, $\nu = 18$ para el modelo 1 y $\nu = 17$ para el modelo 2 y se toma $\alpha = 0,05$. La función con la que se implementa en Matlab $\chi_{\nu,\alpha}^2$ es `chi2inv`.

De los resultados que arroja el contraste de hipótesis, se desprende que en ninguno de los dos modelos podemos rechazar la hipótesis nula, (que los datos experimentales puedan ser explicados por los modelos propuestos), es decir, que exigiendo un 95 % de confianza, no hay evidencia para rechazar los modelos propuestos.

El contraste estadístico nos permite alcanzar cierto grado de confianza en la toma de decisiones, al menos desde el punto de vista estadístico, independientemente del tamaño de la muestra y del número de parámetros del modelo, pero con una cierta confianza (en nuestro caso 95 %). Este resultado puede refrendarse con el p-valor, que es la probabilidad de, suponiendo cierta la hipótesis nula, los datos obtenidos con el modelo sean tanto o más extremos que los medidos. Siendo por tanto p_{val} , la probabilidad de que el valor de $\chi^2 = \nu \chi_{\text{red}}^2$ medido sea menor o igual que χ_{ν}^2 y en Matlab se halla mediante la función `chi2cdf`.

En la Tabla 3.4 se presentan los resultados del contraste estadístico para ambos modelos y se observa como no hay evidencia para rechazar H_0 (como puede confirmarse

	MODELO 1	MODELO 2
χ_{red}^2	0.9408	0.9930
$\chi_{\nu,\alpha}^2$	28.557	27.2646
$\chi_{\nu,\alpha}^2 / \nu$	1.5865	1.6038
p_{val}	0.5368	0.5440
Conclusión	No hay evidencia para rechazar H_0	No hay evidencia para rechazar H_0

Tabla 3.4: Valores del contraste estadístico por hipótesis.

puesto que el p-valor es mayor que 0.05 en los dos casos).

3.3. Discusión del ajuste

Se puede concluir que, los dos modelos ajustados son válidos y, además, dichos ajustes tienen significado estadístico puesto que en ninguno de los dos se halla evidencia suficiente como para rechazar la hipótesis nula.

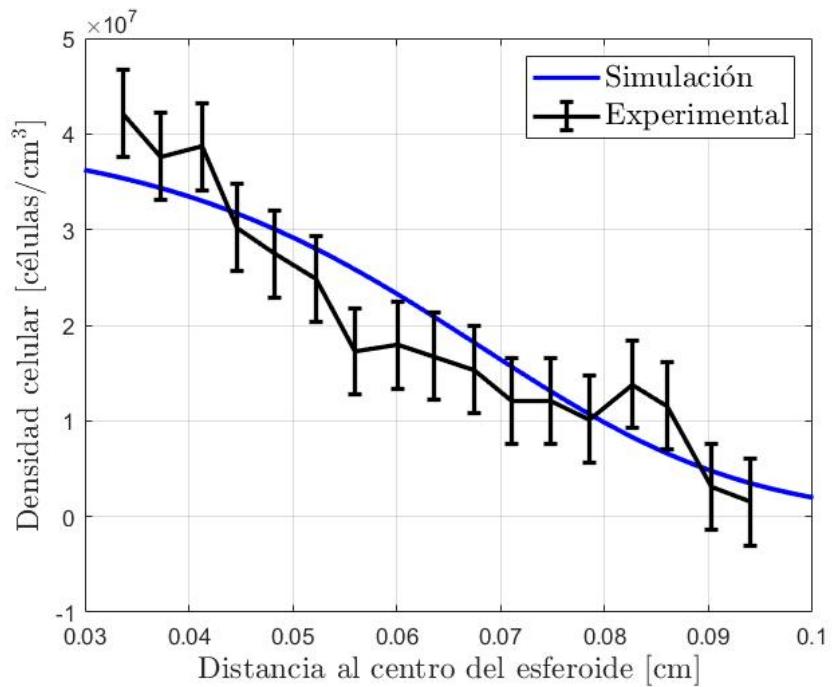
Teniendo en cuenta que el ajuste paramétrico da buenos resultados en ambos casos, a continuación se representan las estimaciones que realizan las simulaciones de los modelos y los datos experimentales comprobando así cuál de los dos modelos representa con más precisión la realidad. Se ha de tener en cuenta que los datos experimentales no consideran el oxígeno, mientras que las simulaciones sí lo hacen.

Tal y como se puede observar en las Figuras 3.3b y 3.3a, las simulaciones apenas muestran diferencias entre sí y es necesario apoyarse en los datos obtenidos del ajuste de ambos modelos para saber cuál es el modelo que se asemeja en mayor medida a la realidad, se puede observar como el modelo 1 muestra una evolución más exacta tanto de la densidad celular como del radio invasivo (presenta un valor de χ^2_{red} ligeramente menor), sin embargo, el modelo 2 tiene una mayor evidencia estadística (p-valor más grande). Es importante recordar que puesto que solo se tienen datos experimentales del tercer día de cultivo celular, la Figura 3.3a, representa la densidad celular de ese día en concreto. En cualquier caso, al haber muy pocas diferencias en el valor mínimo de χ^2_{red} para los dos modelos, es muy difícil decantarse por uno u otro con los experimentos disponibles.

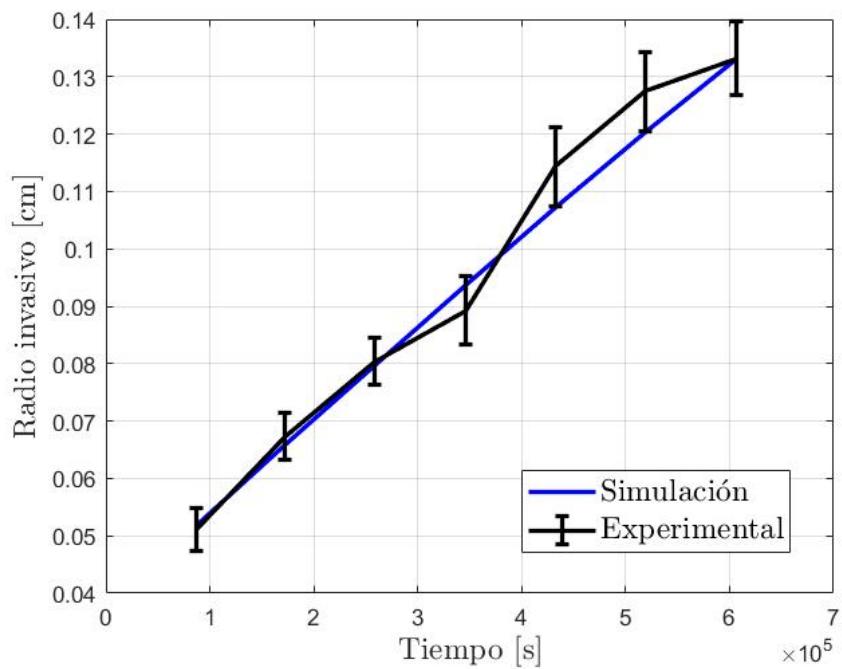
En la Tabla 3.5 se representan los valores de los parámetros ajustados comparables entre sí. De esta tabla se puede concluir que aunque los valores óptimos de cada modelo son distintos escasamente se alejan un orden de magnitud, siendo los valores de τ_n los que más difieren. Además, se ha de señalar que en ningún caso estos se alejan de los rangos biológicos (valores determinados por los artículos de la bibliografía [22] y [23]). Por lo tanto, la similitud entre los valores óptimos de ambos modelos es otra prueba más del éxito del ajuste en los dos modelos.

Parámetro	Valor Modelo 1	Valor Modelo 2	Unidades
K_n	$1,45 \times 10^{-9}$	$4,63 \times 10^{-9}$	cm^2/s
K_{ch}	$4,1 \times 10^{-9}$	$2,4 \times 10^{-9}$	cm^2/s
τ_n	$8,64 \times 10^4$	$2,15 \times 10^5$	s
α_n	$1,1 \times 10^{-9}$	3×10^{-9}	$\text{mmHg} \cdot \text{cm}^3/(\text{células} \cdot \text{s})$

Tabla 3.5: Diferencia en los valores de los parámetros comparables de los ajustes.

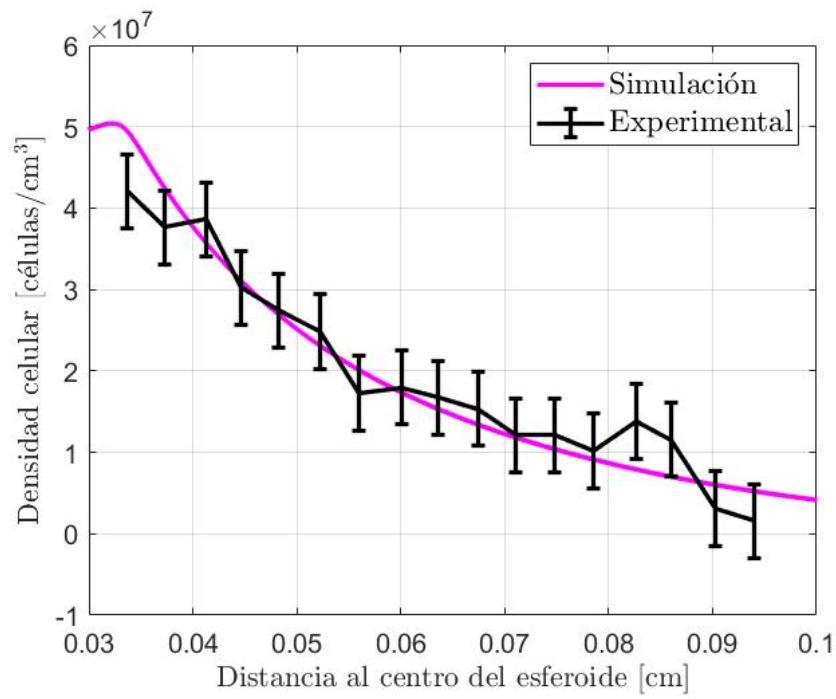


(a) Perfil de células.

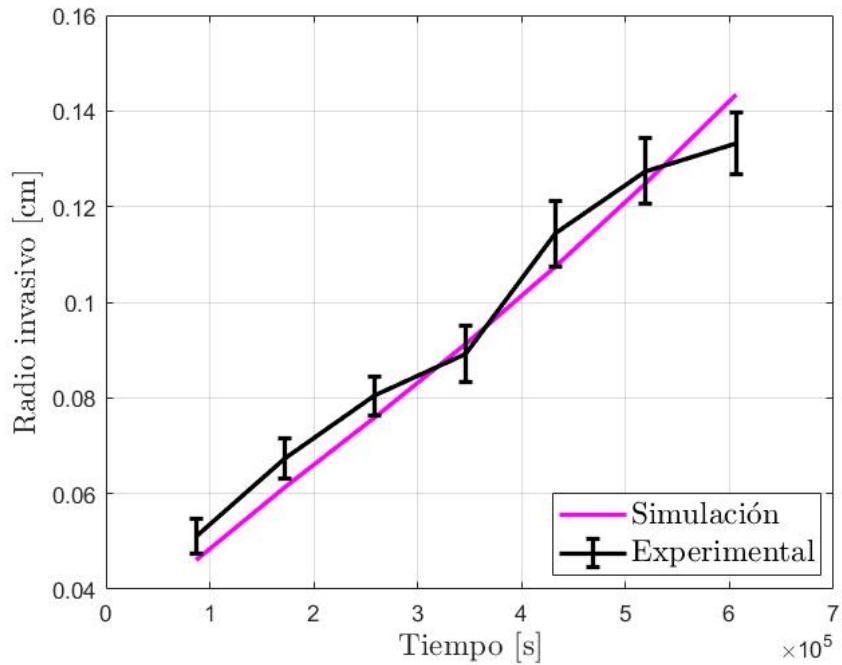


(b) Radio invasivo.

Figura 3.1: Comparación entre la simulación del modelo 1 (con una malla de 5×10^{-4} cm) y los datos experimentales.

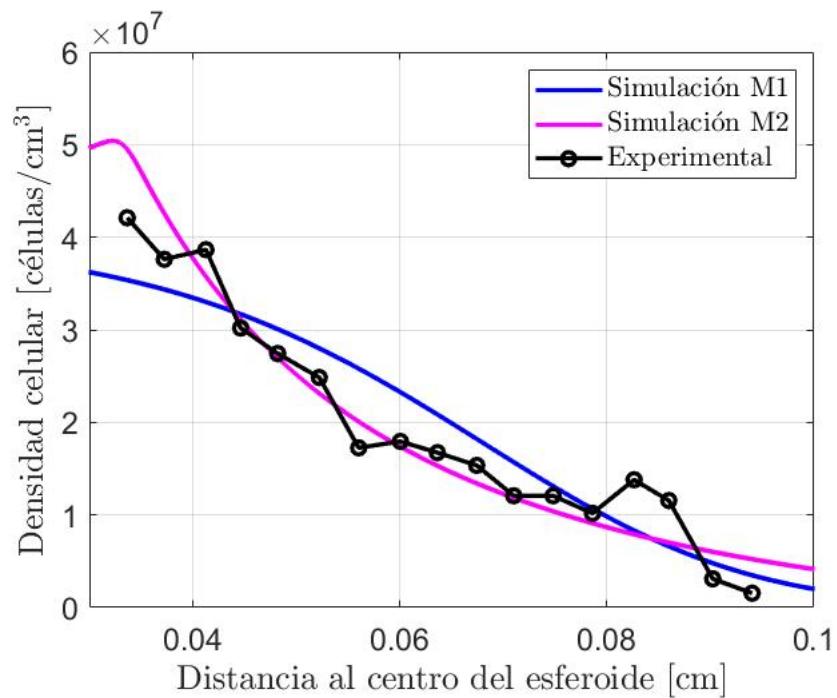


(a) Perfil de células.

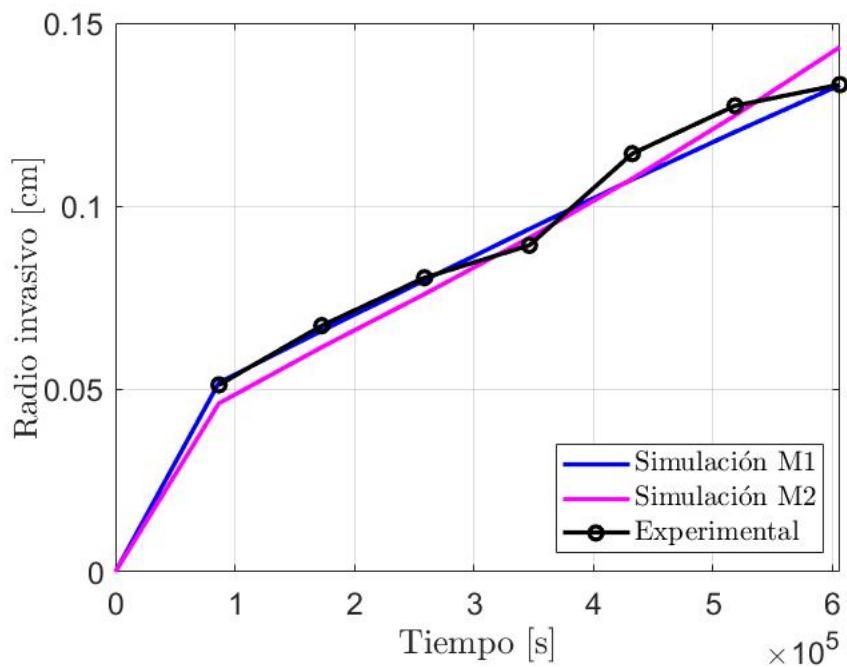


(b) Radio invasivo.

Figura 3.2: Comparación entre la simulación del modelo 2 (con una malla de 5×10^{-4} cm) y los datos experimentales.



(a) Perfil de células.



(b) Radio invasivo.

Figura 3.3: Comparación entre la simulación de los dos modelos y los datos experimentales.

Capítulo 4

Resultados

En lo que sigue se usarán los dos modelos propuestos para recrear *in silico* diferentes experimentos. Los valores de los parámetros que se han escogido para las simulaciones vienen indicados en la Tabla 4.1.

Parámetros	MODELO 1	MODELO 2	Unidades
K_n	$1,45 \times 10^{-9}$	$4,63 \times 10^{-9}$	cm^2/s
K_{ch}	$4,1 \times 10^{-9}$	$2,4 \times 10^{-9}$	cm^2/s
τ_n	$8,64 \times 10^4$	$2,15 \times 10^5$	s
C^M	$4,2 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	células/ cm^3
K_{O_2}	1×10^{-5}	1×10^{-5}	cm^2/s
α_n	$1,1 \times 10^{-9}$	3×10^{-9}	$\text{mmHg} \cdot \text{cm}^3/(\text{células} \cdot \text{s})$
O_2^M	2,5	2,5	mmHg
O_2^H	7	-	mmHg
O_2^D	1,6	-	mmHg
ΔO_2^D	0,1	-	mmHg
R_0	-	250	μm
τ_{nd}	∞	-	s
v_c	-	$3,13 \times 10^{-8}$	cm/s
s_{inv}	-	14,5	células/ $(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$

Tabla 4.1: Parámetros utilizados en los modelos.

4.1. Evolución de los perfiles celulares

Tras presentar los modelos y el ajuste paramétrico de cada uno, se procede al análisis de los resultados. En estos resultados se puede observar la evolución del perfil de células a lo largo del radio del esferoide y cómo el radio invasivo aumenta a lo largo del radio linealmente de forma aproximada.

Aunque el ajuste de los dos modelos sea adecuado, los valores de los parámetros ajustados que representan lo mismo (como la difusión), difieren entre sí (ver Tabla 3.5).

El efecto de la diferencia en los valores de estos parámetros puede observarse en las gráficas de este capítulo donde se ve la disimilitud entre modelos.

Aunque no se tengan datos experimentales del resto de días de cultivo celular, en la Figura 4.1, se representa la evolución celular de la simulación de los dos modelos en 3 días distintos (días 0, 3 y 7). De esta manera se puede observar como las células que en el caso del modelo 1 tenían una concentración de células inicial de $2,1 \times 10^8$ células/cm³ van disminuyendo su concentración a lo largo del experimento mientras que la concentración de células del modelo 2 comienzan en cero y va aumentando a lo largo del experimento. Las diferencias que observamos en el día 7 nos informan sobre cómo se podría discriminar experimentalmente entre ambos modelos: midiendo el perfil de células ese día.

Debido a que en el modelo 2 aparecen constantemente células nuevas en la frontera del *core* del esferoide por el fenómeno de desprendimiento, se pueden ver unas densidades celulares tan elevadas en el centro del esferoide. Mientras que en el caso del modelo 1, la densidad celular únicamente aumenta debido a la proliferación.

Como se puede observar, ambos modelos proporcionan resultados muy similares cerca de la zona de desprendimiento y, sin embargo, en la zona central del esferoide difieren mucho entre sí: una de las diferencias más importantes entre los modelos radica en cómo se trata a las células que están dentro del *core* del esferoide.

Puesto que en este trabajo las adaptaciones de los modelos tienen como nueva variable el oxígeno, se considera interesante mostrar la evolución de la concentración del oxígeno a lo largo del radio del esferoide. Dado que no hay datos experimentales que muestren cómo evoluciona el perfil de oxígeno, se decide comparar el comportamiento de ambos modelos mediante la representación de su evolución simulada (Figura 4.2). Para poder tener una imagen más completa de su evolución, la figura representa 3 días (como en el caso de la densidad celular). En la Figura 4.2, se puede observar como la concentración de oxígeno es uniforme a lo largo del radio en el instante inicial pero va disminuyendo a lo largo del experimento debido al consumo de oxígeno de las células en el centro del esferoide. En este caso, a pesar de que hay diferencias entre los dos modelos, no son tan significativas.

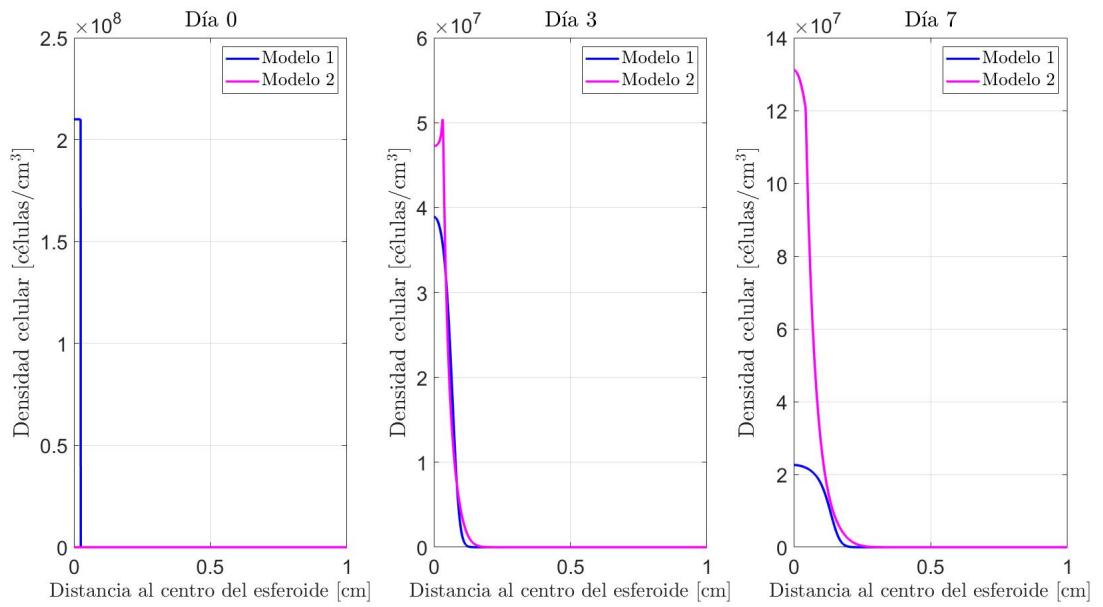


Figura 4.1: Comparativa de la densidad de células entre los dos modelos en los días 0, 3 y 7.

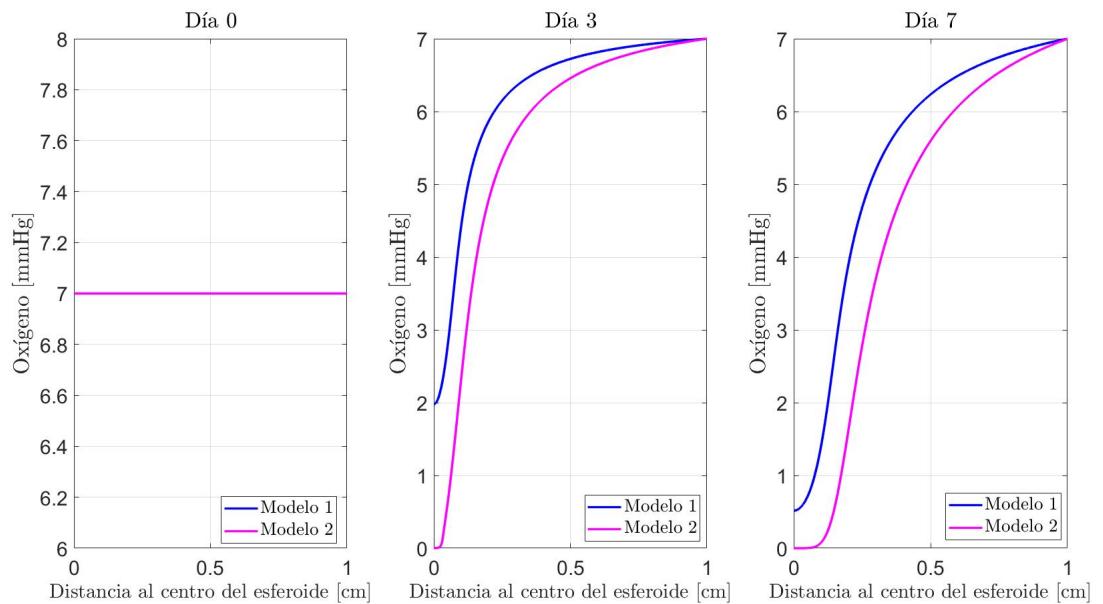


Figura 4.2: Comparativa de la concentración de oxígeno entre los dos modelos en los días 0, 3 y 7.

4.2. Influencia del nivel de oxígeno

Las Figuras 4.3, 4.4 y 4.5 muestran cómo influye el nivel de oxígeno inicial en el comportamiento de las células. En la Figura 4.3 se representan simulaciones del comportamiento de la concentración de oxígeno cambiando la condición inicial. Puesto que la condición inicial de los modelos es una concentración de oxígeno igual a 7 mmHg, se elige representar la comparación de la evolución del oxígeno a lo largo del radio para diferentes concentraciones de oxígeno iniciales: 7 mmHg, 15 mmHg y 0 mmHg. De esta manera se puede observar como, aunque las representaciones de las simulaciones de ambos modelos sean prácticamente iguales entre sí, la curva que representa el instante final del oxígeno de 7 mmHg del modelo 1 tiene un valor de oxígeno levemente superior en el centro del esferoide mientras que en el caso del modelo 2 el centro del esferoide no presenta oxígeno. Además, la curva de oxígeno de 15 mmHg presenta mayor pendiente en el modelo 1 que en el modelo 2 en el instante final por lo que se considera que el modelo 1 conserva mayores niveles de oxígeno a lo largo del radio del esferoide. Esta conclusión está relacionada con el hecho de que en el modelo 2 hay más células y por tanto, es coherente que consuman más oxígeno y los niveles de oxígeno en este modelo sean inferiores. La medición de los niveles de oxígeno cerca del centro del esferoide permitiría también seleccionar entre los dos modelos el más adecuado, como ya se ha apuntado..

Las Figuras 4.4 y 4.5 representan cómo repercute el cambio de la condición inicial referente al oxígeno en el comportamiento de las células. En la Figura 4.4a y la Figura 4.5a se pretende mostrar la evolución celular a lo largo del radio mostrando cada instante del experimento (en días) para cada caso de concentración oxígeno inicial, destacando los días 0, 3 y 7 que son los más utilizados en este trabajo. En la Figura 4.4b y la Figura 4.5b se presenta la comparación de los 3 casos mostrando el instante inicial y final de cada uno. En la Figura 4.4, que representa las simulaciones del modelo 1, se puede observar como las células del caso de concentración de oxígeno inicial igual a 0 mmHg apenas migran (no pueden migrar por quimiotaxis puesto que no hay gradiente de oxígeno, y únicamente se mueven por difusión) y por tanto la densidad celular decrece más bruscamente al aumentar r , mientras que en los otros dos casos se ve como buscan oxígeno lejos del centro del esferoide y por tanto tienen mayor capacidad para sobrevivir. Debido a que en el modelo 2 no hay muerte, lo único que ocurre es que las células no migran por quimiotaxis, por lo que, aunque no haya oxígeno, no desaparecen células. Así mismo, como la concentración de células inicial en el modelo 2 es cero, las simulaciones del perfil de células a lo largo del experimento son completamente diferentes aumentando la densidad celular con el tiempo. Además, la densidad celular

en el centro del esferoide (donde se encuentra el mayor número de células) en el caso del modelo 2 es casi un orden de magnitud menor que en el modelo 1.

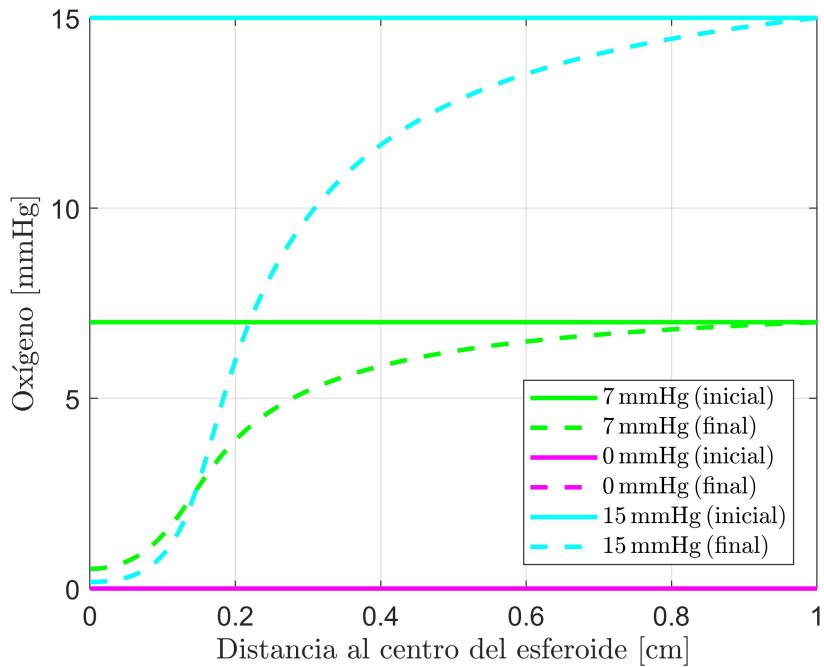
A la vista de los resultados, se puede ver cómo también se podría seleccionar entre los dos modelos viendo cómo evoluciona el esferoide para diferentes niveles de oxigenación: si variaciones del nivel de oxígeno inducen diferencias muy significativas, el modelo 1 sería más adecuado, mientras que el modelo 2 sería más adecuado en caso contrario.

4.3. Recreación *in silico* del esferoide

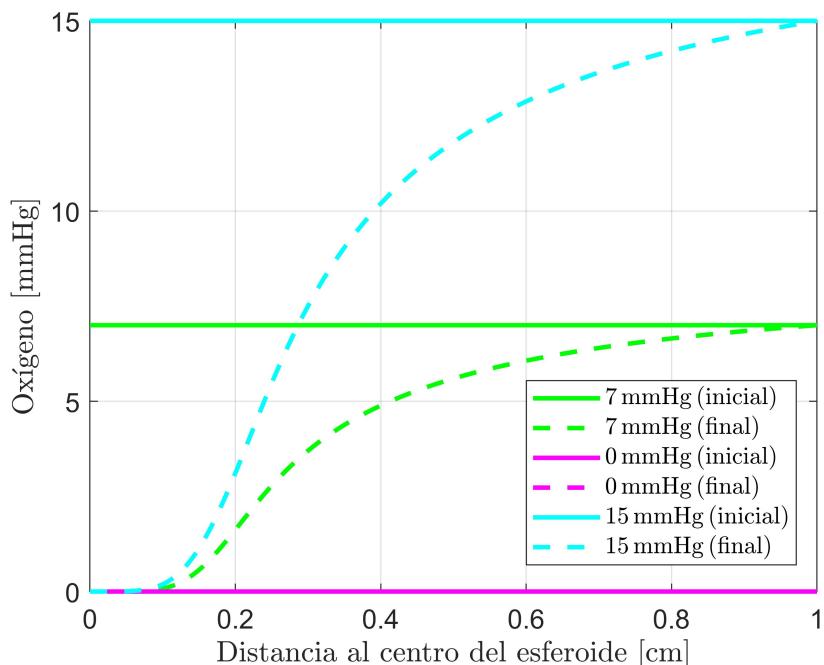
Por último, se decide realizar una representación del esferoide en 2D de manera que se pueda observar de una forma más visual la evolución de este, mostrando, en ambos casos, los días 0, 3 y 7 de la simulación. Aunque no deja de ser un análisis cualitativo, las imágenes experimentales del esferoide parecen más similares a las simulaciones obtenidas con el Modelo 2.

Las Figuras 4.6, 4.7 y 4.8 muestran la evolución del esferoide en el caso de la simulación del modelo 1, la simulación del modelo 2 y las fotomicrografías tomadas de forma experimental, respectivamente. Para el análisis de estas figuras se ha de tener en cuenta que los círculos negros marcan los radios del *core* (círculos interiores) y radios invasivos (círculos exteriores).

Aunque en las figuras se puede distinguir como el modelo 1 estima mejor el radio invasivo y el modelo 2 estima mejor el perfil de células, es difícil la elección entre ambos modelos. Esto es debido a que ambos logran reproducir la realidad lo suficientemente bien y es preciso realizar más experimentos para encontrar suficientes diferencias de cara a elegir entre los modelos. Algunas posibilidades para conseguir discriminar entre ellos podrían ser medir el perfil de células y el radio invasivo en más días o medir la concentración de oxígeno.

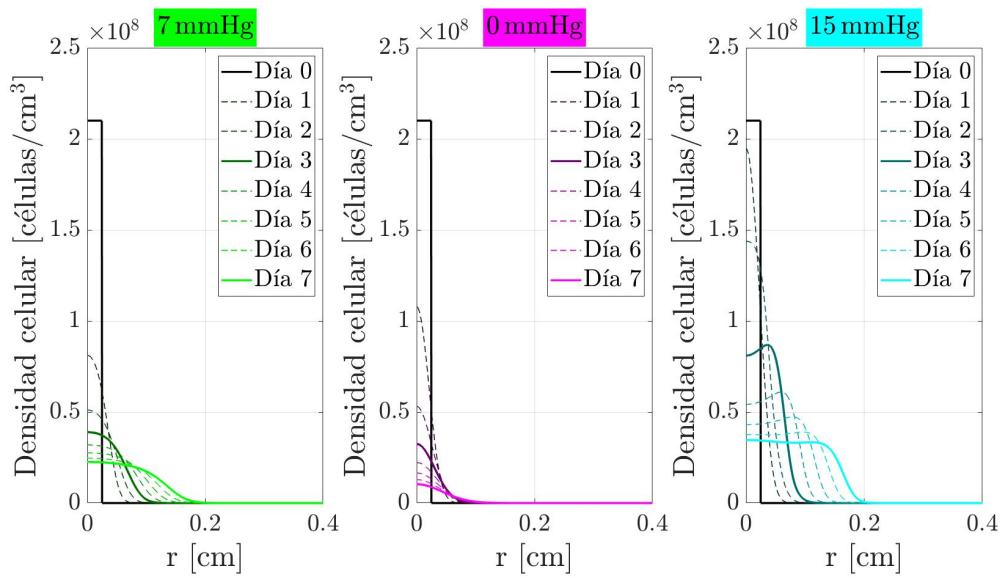


(a) Modelo 1.

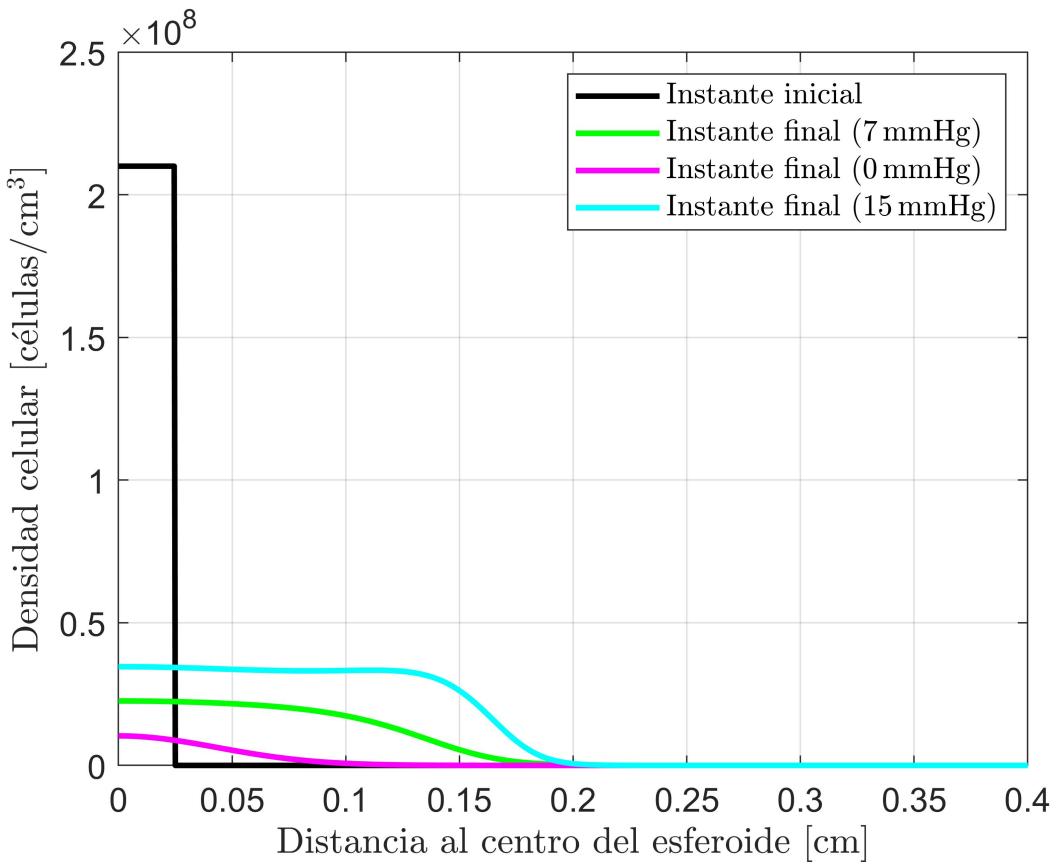


(b) Modelo 2.

Figura 4.3: Perfil inicial y final del oxígeno cambiando la condición inicial del oxígeno.

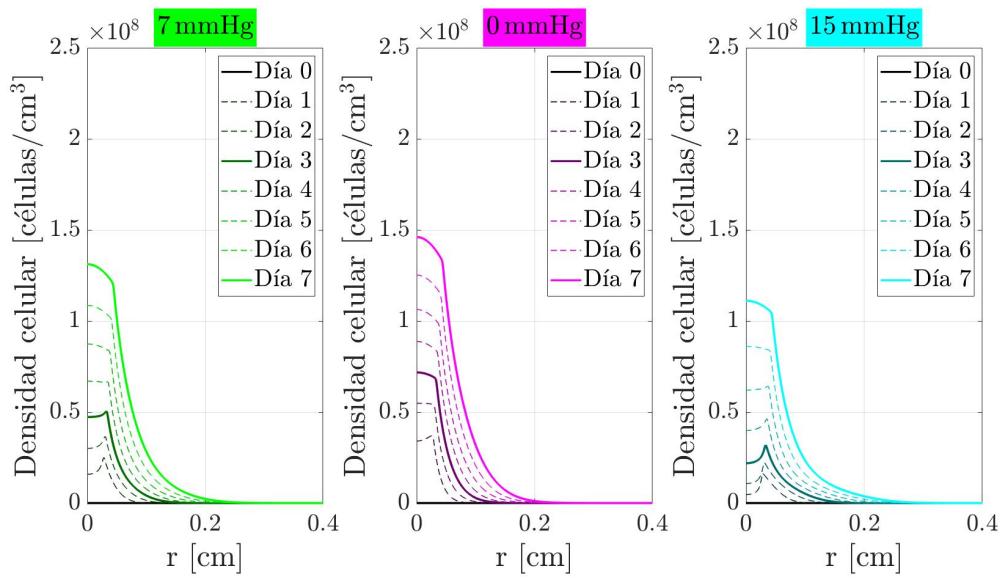


(a) Evolución de la densidad celular a lo largo del experimento para los 3 casos

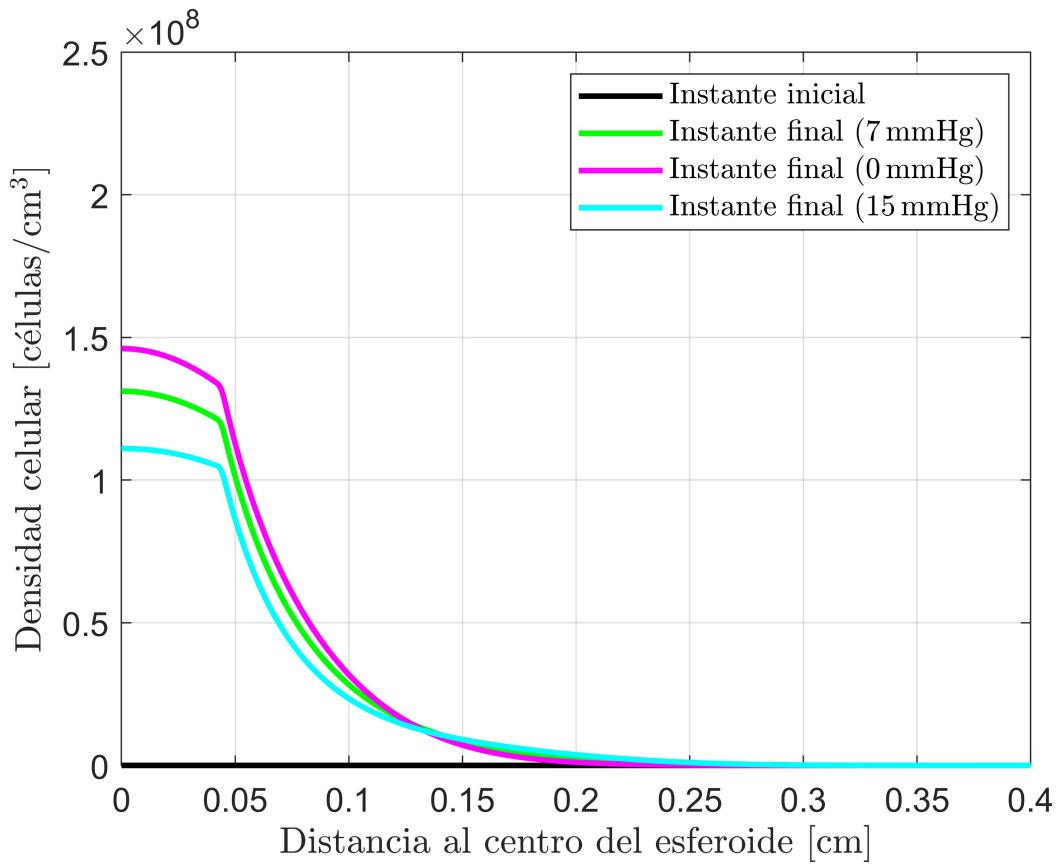


(b) Instante inicial y final para los 3 casos.

Figura 4.4: Modelo 1. Comparación de la densidad celular para los casos de concentración de oxígeno de 7 mmHg, 15 mmHg y 0 mmHg.



(a) Evolución de la densidad celular a lo largo del experimento para los 3 casos.



(b) Instante inicial y final para los 3 casos.

Figura 4.5: Modelo 2. Comparación de la densidad celular para los casos de concentración de oxígeno de 7 mmHg, 15 mmHg y 0 mmHg.

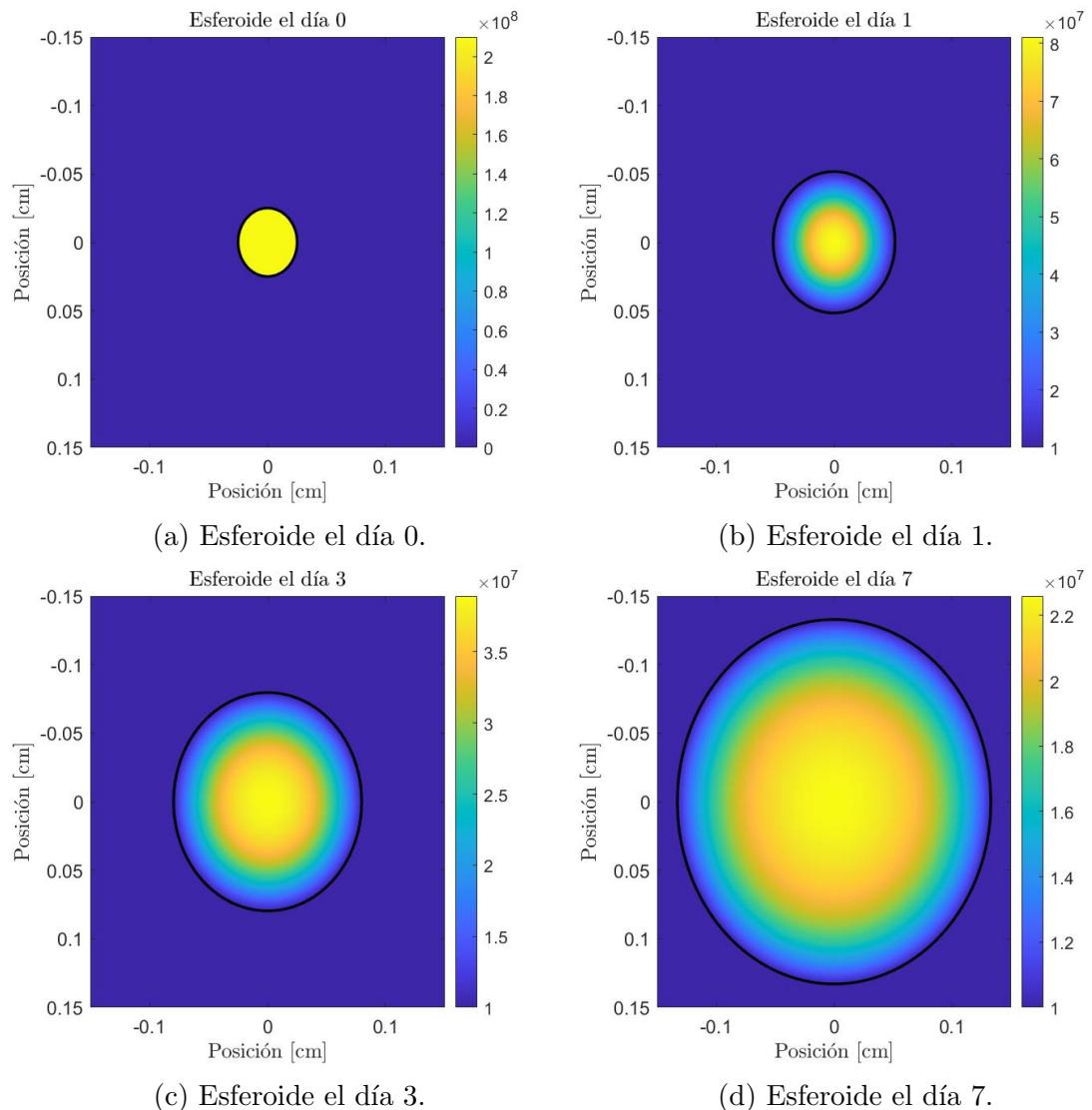


Figura 4.6: Simulación de la evolución del esferoide en el modelo 1.

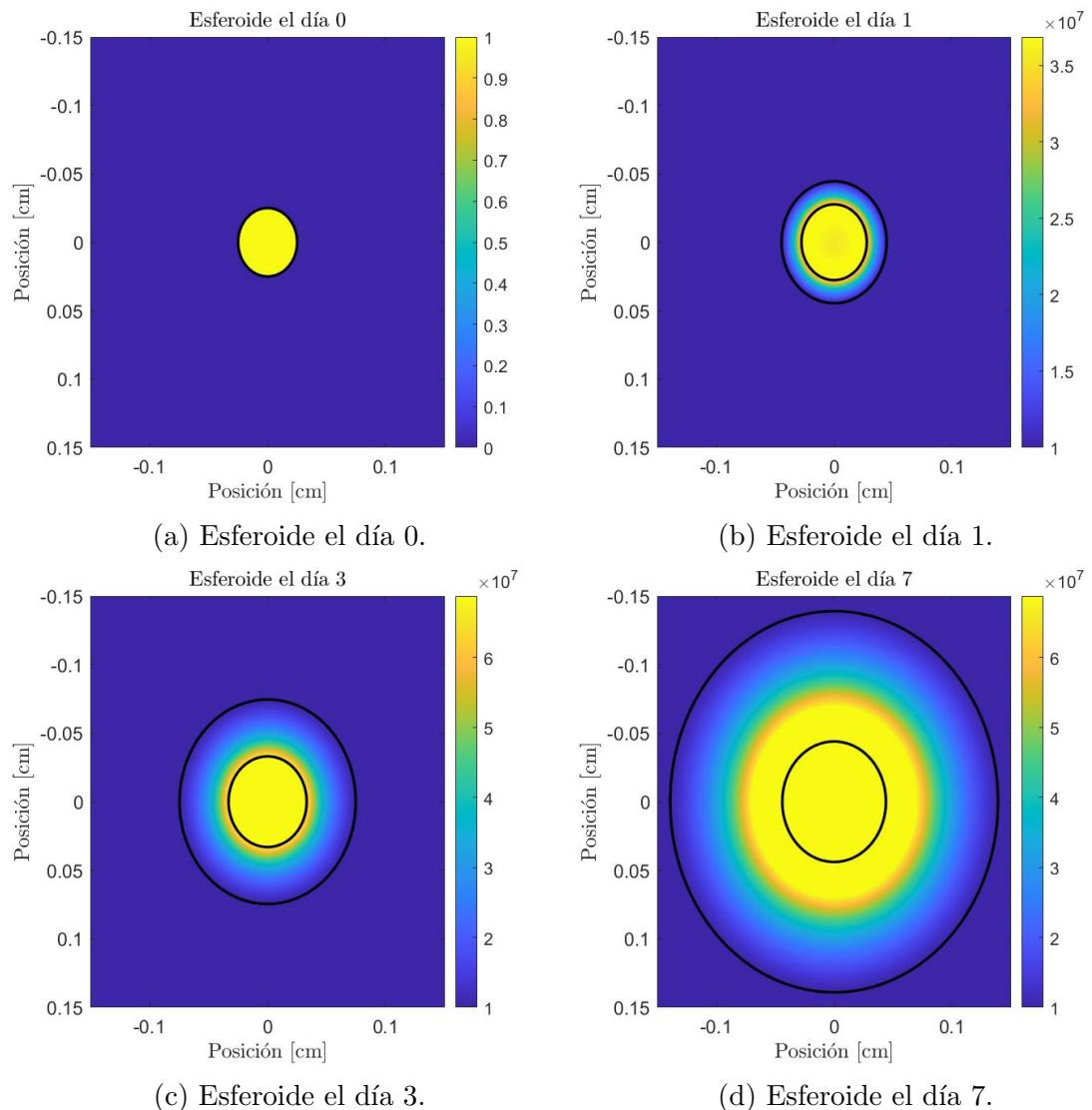
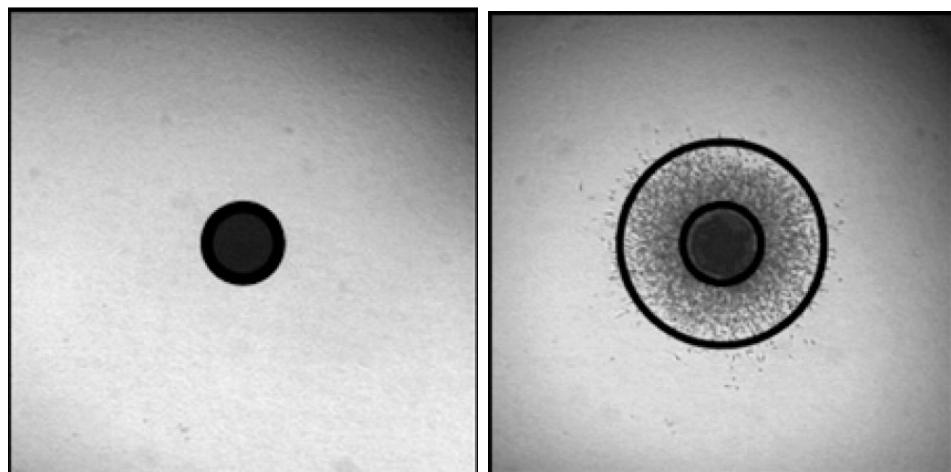
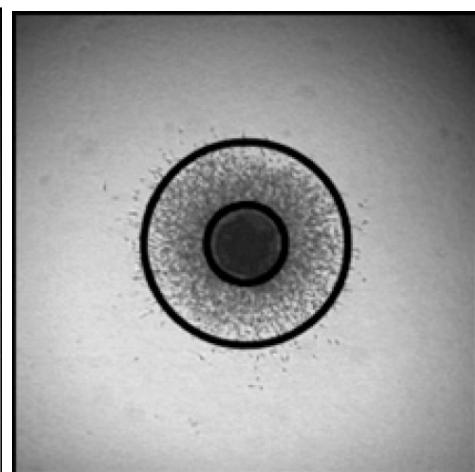


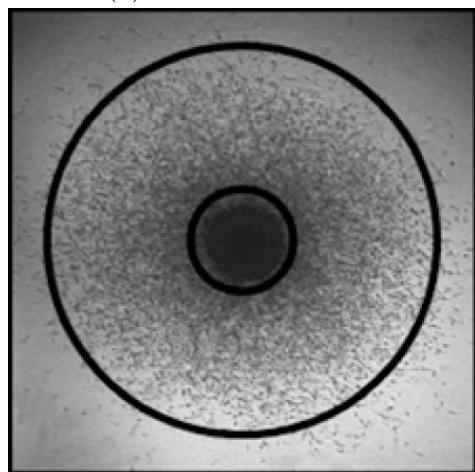
Figura 4.7: Simulación de la evolución del esferoide en el modelo 2.



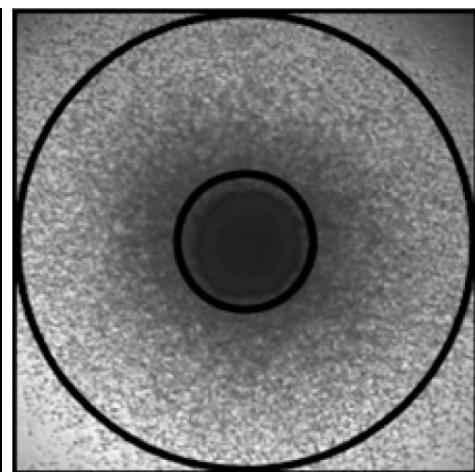
(a) Esferoide el día 0.



(b) Esferoide el día 1.



(c) Esferoide el día 3.



(d) Esferoide el día 7.

Figura 4.8: Fotomicrografías del esferoide (Fuente: [23])

Capítulo 5

Conclusiones

5.1. Principales conclusiones

A lo largo de este trabajo se ha hecho un estudio exhaustivo del tumor a estudiar, el Glioblastoma Multiforme. De esta manera se consigue conocer qué fenómenos, de los muchos que influyen en este tipo de tumor, es interesante incluir como variables en su estudio y cuál es el mejor enfoque. Por esta razón, cada experimento y cada modelo matemático tiene en cuenta los parámetros que considera relevantes para su estudio en particular.

Los modelos matemáticos adaptados en este TFG, forman parte de una misma línea de investigación que se enfoca en estudiar la evolución de las células tumorales en esferoides. Sin embargo, aunque ambos modelos consideren relevantes fenómenos como la difusión o la quimiotaxis, hay diferencias entre ellos. Parte de este trabajo consiste en encontrar los puntos fuertes y débiles de cada modelo y lo que les hace diferentes entre sí, como por ejemplo, la consideración de dos fenotipos celulares en el primer modelo, frente a un único fenotipo celular en el segundo o la consideración del desprendimiento de células invasivas de la superficie del *core* en el caso del segundo modelo.

Ambos modelos se han ajustado para unos datos experimentales siguiendo, en general, la pauta siguiente: los parámetros con claro significado metabólico y/o con poca variabilidad en la literatura se han considerado conocidos, ajustando mediante una optimización por mínimos cuadrados los parámetros restantes. Mediante este ajuste se consigue que la simulación de ambos modelos difiera solo ligeramente de los datos experimentales, haciendo que las simulaciones estén cerca de reproducir la realidad. El resultado es satisfactorio para los dos modelos, arrojando un valor $\chi^2_{\text{red}} < 1$ y no pudiendo descartarse la hipótesis nula (los datos corresponden a los modelos propuestos) en ninguno de los casos. Además, el valor de los parámetros biológicos obtenidos es razonable y se encuentra dentro de los rangos observados en la literatura.

Posteriormente se han realizado diferentes experimentos *in silico* para evaluar el

funcionamiento numérico de ambos modelos. Estas simulaciones, además de darnos información a propósito de importantes rasgos característicos de cada uno de ellos (algunos similares, como la evolución del perfil del oxígeno, otros diferentes, como la evolución del perfil de células), nos permiten por inspección determinar experimentos que serían útiles para descartar uno de los dos modelos. Esto resulta fundamental en la investigación biológica basada en modelos matemáticos, puesto que si no se corre el riesgo de no poder generalizar los resultados a otras circunstancias o configuraciones experimentales.

Se puede decir que este trabajo cumple con los objetivos al presentar, mediante la información aportada y las mejoras en los modelos matemáticos, otro enfoque en el estudio de esta enfermedad y aportar nuevos resultados que nos acerquen a la comprensión del GBM de cara a avanzar en tratamientos exitosos.

En definitiva, este trabajo es valioso puesto que los modelos presentados demuestran ser una herramienta de gran utilidad para la investigación experimental siempre que se analicen los resultados con la perspectiva y el espíritu crítico necesarios.

5.2. Líneas futuras de trabajo

Dado que los resultados de este trabajo son coherentes y pueden prestar ayuda en el diseño de futuros experimentos, se asume que este trabajo ha cumplido con los objetivos propuestos al principio, sin embargo, existen muchas maneras de ampliarlo. A continuación se plantean posibles líneas futuras de trabajo.

5.2.1. Mejora de los modelos matemáticos

Se podrían incluir como propuestas las siguientes:

- Una manera de reforzar los modelos podría ser introduciendo el efecto de sustancias como el FBS (suero fetal bovino) que pueden estimular la migración de las células, o añadiendo otras variables externas como puede ser la temperatura, la rigidez del sustrato, etc.
- El modelo 2 podría enriquecerse añadiendo funciones de corrección (ReLU). De esta manera parámetros como la quimiotaxis o la proliferación dependerán en mayor medida del oxígeno. En cualquier caso, se debe tener en cuenta que añadir parámetros a los modelos tiene que ir siempre de la mano de un mayor número de resultados experimentales.
- Se puede realizar el modelo en 3D sin utilizar simetría esférica, lo que proporciona

una aproximación más realista al problema puesto que en las condiciones de laboratorio esta simetría no se cumple siempre estrictamente.

5.2.2. Obtención de nuevos datos experimentales

Teniendo en cuenta que cuantos más datos se consigan acerca del comportamiento de las células cancerígenas, mejores serán los ajustes y, las simulaciones de los modelos se aproximarán más a la realidad. En consecuencia, se considera interesante la inversión en nuevos proyectos de investigación experimental, tanto *in vitro* como *in vivo*, que reporten nuevos accesos a la resolución de esta enfermedad. En este trabajo, además, utilizando la experimentación *in silico* se han especificado algunas pautas que podrían guiar a futuros trabajos experimentales.

Capítulo 6

Bibliografía

- [1] OMS. Cáncer. *Organización Mundial de la Salud*, 2018.
- [2] Eric C Holland. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12):6242–6244, 2000.
- [3] Pieter Wesseling, Johan M Kros, and Judith WM Jeuken. The pathological diagnosis of diffuse gliomas: towards a smart synthesis of microscopic and molecular information in a multidisciplinary context. *Diagnostic Histopathology*, 17(11):486–494, 2011.
- [4] Sarah Lapointe, Arie Perry, and Nicholas A Butowski. Primary brain tumours in adults. *The Lancet*, 2018.
- [5] Alicia Martínez-González, Gabriel F Calvo, Luis A Pérez Romasanta, and Víctor M Pérez-García. Hypoxic cell waves around necrotic cores in glioblastoma: a biomathematical model and its therapeutic implications. *Bulletin of mathematical biology*, 74(12):2875–2896, 2012.
- [6] Takahiro Oike, Yoshiyuki Suzuki, Ken-ichi Sugawara, Katsuyuki Shirai, Shin-ei Noda, Tomoaki Tamaki, Masaya Nagaishi, Hideaki Yokoo, Yoichi Nakazato, and Takashi Nakano. Radiotherapy plus concomitant adjuvant temozolomide for glioblastoma: Japanese mono-institutional results. *PloS one*, 8(11):e78943, 2013.
- [7] Marina Pérez Aliacar. Estudio paramétrico de la simulación del proceso de glioblastoma multiforme en dispositivos microfluídicos. 2019.
- [8] Daniel J Brat and Erwin G Van Meir. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Laboratory investigation*, 84(4):397, 2004.

- [9] Yuan Rong, Donald L Durden, Erwin G Van Meir, and Daniel J Brat. ‘pseudopalisading’ necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 65(6):529–539, 2006.
- [10] Daniel J Brat, Amilcar A Castellano-Sanchez, Stephen B Hunter, Marcia Pecot, Cynthia Cohen, Elizabeth H Hammond, Sarojini N Devi, Balveen Kaur, and Erwin G Van Meir. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer research*, 64(3):920–927, 2004.
- [11] Frances R Balkwill, Melania Capasso, and Thorsten Hagemann. The tumor microenvironment at a glance, 2012.
- [12] Hao Zhang, Yulai Zhou, Biqi Cui, Zhixiong Liu, and Hong Shen. Novel insights into astrocyte-mediated signaling of proliferation, invasion and tumor immune microenvironment in glioblastoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 126:110086, 2020.
- [13] Daniela F Quail and Johanna A Joyce. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*, 19(11):1423, 2013.
- [14] A Kolchinsky and IB Roninson. Drug resistance conferred by mdr1 expression in spheroids formed by glioblastoma cell lines. *Anticancer research*, 17(5A):3321–3327, 1997.
- [15] Rigalli A, Fina BL, Lombarte M. Investigación de un fenómeno natural: ¿estudios in vivo, in vitro o in silico? *Actual. Osteol*, 9(3):239–240, 2013.
- [16] Diana Boraschi and Paola Italiani. Model validity in nanoimmunosafety: advantages and disadvantages of in vivo vs in vitro models, and human vs animal models. *Current Bionanotechnology*, 2(2):71–76, 2016.
- [17] Ruei-Zeng Lin, Li-Fang Chou, Chi-Chen Michael Chien, and Hwan-You Chang. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of e-cadherin and β 1-integrin. *Cell and tissue research*, 324(3):411–422, 2006.
- [18] José Meseguer, Esteban Abad, M^a Ángeles, Victoriano Francisco Mulero Méndez, Alberto Cuesta Peñafiel, and M^a Sepulcre Cortés. Esferoides y esferas líquidas. cultivos celulares en 3d para mimetizar el ambiente de las células en el organismo. *Eubacteria, nº34*, 2015, 2015.

- [19] Linfen Yu, Michael CW Chen, and Karen C Cheung. Droplet-based microfluidic system for multicellular tumor spheroid formation and anticancer drug testing. *Lab on a Chip*, 10(18):2424–2432, 2010.
- [20] Juan Carlos Gallardo Pérez, Magali Espinosa Castilla, Jorge Meléndez Zajgla, and Vilma Maldonado Lagunas. Esferoides tumorales multicelulares en la evaluación de estrategias terapéuticas anticancerosas. *Revista de Educación Bioquímica*, 25(4):101–107, 2006.
- [21] Lucas B Edelman, James A Eddy, and Nathan D Price. In silico models of cancer. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2(4):438–459, 2010.
- [22] Jacobo Ayensa-Jiménez, Marina Pérez-Aliacar, Teodora Randelovic, Sara Oliván, Luis Fernández, José A. Sanz-Herrera, Ignacio Ochoa, Mohamed H. Doweidar, and Manuel Doblare. Mathematical formulation and parametric analysis of in vitro cell models in microfluidic devices. application to different stages of glioblastoma evolution. Unpublished Results.
- [23] Andrew M Stein, Tim Demuth, David Mobley, Michael Berens, and Leonard M Sander. A mathematical model of glioblastoma tumor spheroid invasion in a three-dimensional in vitro experiment. *Biophysical journal*, 92(1):356–365, 2007.
- [24] Alicia Martínez-González, Mario Durán-Prado, Gabriel F Calvo, Francisco J Alcaín, Luis A Pérez-Romasanta, and Víctor M Pérez-García. Combined therapies of antithrombotics and antioxidants delay in silico brain tumour progression. *Mathematical medicine and biology: a journal of the IMA*, 32(3):239–262, 2015.
- [25] Peter P Thumfort, David B Layzell, and Craig A Atkins. A simplified approach for modeling diffusion into cells. *Journal of Theoretical Biology*, 204(1):47–65, 2000.
- [26] Wikipedia. Difusión (física) — wikipedia, la enciclopedia libre, 2020. [Internet; descargado 8-junio-2020].
- [27] Tamás Garay, Éva Juhász, Eszter Molnár, Maria Eisenbauer, András Czirók, Barbara Dekan, Viktória László, Mir Alireza Hoda, Balázs Döme, József Tímár, et al. Cell migration or cytokinesis and proliferation?—revisiting the “go or grow” hypothesis in cancer cells in vitro. *Experimental cell research*, 319(20):3094–3103, 2013.
- [28] Guido Majno and Isabelle Joris. Apoptosis, oncosis, and necrosis. an overview of cell death. *The American journal of pathology*, 146(1):3, 1995.

- [29] Pei-Sung Tang. On the rate of oxygen consumption by tissues and lower organisms as a function of oxygen tension. *The Quarterly Review of Biology*, 8(3):260–274, 1933.
- [30] M Marušić, Ž Bajzer, JP Freyer, and Stanimir Vuk-Pavlović. Analysis of growth of multicellular tumour spheroids by mathematical models. *Cell proliferation*, 27(2):73–94, 1994.
- [31] G. B. Arfken and H. J. Weber. Mathematical methods for physicists (5ta. ed.). *Academic Press*, 2000.
- [32] Rafael Lahoz-Beltrá. *Bioinformática: Simulación, vida artificial e inteligencia artificial*. Ediciones Díaz de Santos, 2010.
- [33] Senada Koljenović, Tom C Bakker Schut, Johan M Kros, Herbert J van den Berge, Gerwin J Puppels, et al. Discriminating vital tumor from necrotic tissue in human glioblastoma tissue samples by raman spectroscopy. *Laboratory Investigation*, 82(10):1265–1277, 2002.
- [34] Nelson Romero Suárez. La revolución en la toma de decisiones estadísticas: el p-valor. *Telos*, 14(3):439–446, 2012.
- [35] Christina H Wang, Jason K Rockhill, Maciej Mrugala, Danielle L Peacock, Albert Lai, Katy Jusenius, Joanna M Wardlaw, Timothy Cloughesy, Alexander M Spence, Russ Rockne, et al. Prognostic significance of growth kinetics in newly diagnosed glioblastomas revealed by combining serial imaging with a novel biomathematical model. *Cancer research*, 69(23):9133–9140, 2009.
- [36] Philip Gerlee and Alexander RA Anderson. An evolutionary hybrid cellular automaton model of solid tumour growth. *Journal of theoretical biology*, 246(4):583–603, 2007.
- [37] Abramo Agosti, Clara Cattaneo, Chiara Giverso, Davide Ambrosi, and Pasquale Ciarletta. A computational framework for the personalized clinical treatment of glioblastoma multiforme. *ZAMM-Journal of Applied Mathematics and Mechanics/Zeitschrift für Angewandte Mathematik und Mechanik*, 98(12):2307–2327, 2018.
- [38] Elaine L Bearer, John S Lowengrub, Hermann B Frieboes, Yao-Li Chuang, Fang Jin, Steven M Wise, Mauro Ferrari, David B Agus, and Vittorio Cristini. Multiparameter computational modeling of tumor invasion. *Cancer research*, 69(10):4493–4501, 2009.

- [39] Roseanne M Ford and Douglas A Lauffenburger. Analysis of chemotactic bacterial distributions in population migration assays using a mathematical model applicable to steep or shallow attractant gradients. *Bulletin of mathematical biology*, 53(5):721–749, 1991.
- [40] Corinne E Griguer, Claudia R Oliva, Eric Gobin, Pascale Marcorelles, Dale J Benos, Jack R Lancaster Jr, and G Yancey Gillespie. Cd133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *PloS one*, 3(11):e3655, 2008.
- [41] Robert D Skeel and Martin Berzins. A method for the spatial discretization of parabolic equations in one space variable. *SIAM journal on scientific and statistical computing*, 11(1):1–32, 1990.
- [42] Lawrence F Shampine, Mark W Reichelt, and Jacek A Kierzenka. Solving index-1 daes in matlab and simulink. *SIAM review*, 41(3):538–552, 1999.

Listas de Figuras

1.1.	Árbol de decisión para la exclusión paso a paso de las opciones de diagnóstico diferencial en el diagnóstico microscópico de gliomas difusos. (Fuente: [3])	2
1.2.	Representación de la incidencia de los tumores cerebrales según su tipo (Fuente: [4])	2
1.3.	Esquema de la evolución del GBM (Fuente:[8]).	3
1.4.	Principales características histopatológicas del glioblastoma [9]. Las imágenes (a) y (b) muestran pseudoempalizadas (indicadas por la flecha) caracterizadas por la acumulación de núcleos celulares en torno a una zona central más clara. La imagen (c) muestra la hiperplasia microvascular (indicada por la flecha), provocada por las células migratorias de la pseudoempalizada (indicada por la cabeza de flecha). Por último, en la imagen (d) se observa la dirección de la pseudoempalizada (indicada por la cabeza de flecha) desde la zona de necrosis hasta la vasculatura emergente, donde se observa la hiperplasia (indicada por la flecha).	4
1.5.	Representación del microentorno tumoral (Fuente: [12]).	5
1.6.	<i>In vitro</i> vs <i>in vivo</i> (Fuente: [16]).	7
1.7.	Estructura de un MTS clonogénico de al menos 0.5 mm de diámetro que representa sus tres principales capas: células proliferativas, quiescentes y necróticas (Fuente: [20]).	8
2.1.	Diferencia en la invasión entre U87WT y U87DEGFR. Las fotomicrografías de esferoides tumorales (3 mm x 3 mm) fueron tomadas en experimentos. Los círculos internos y externos indican el límite central y el borde invasivo, respectivamente (Fuente: [23]).	12

2.2.	Resultados experimentales. (a) Evolución temporal del radio invasivo. <i>Invasive radius</i> denota el borde exterior de la región invasiva (radio invasivo). Los esferoides U87WT son más invasivos que los esferoides U87 Δ EGFR. (b) Registro de la densidad celular en el día 3 en función de la distancia al centro del esferoide. La línea punteada a la izquierda de cada gráfico denota el límite de la zona del <i>core</i> y la línea punteada a la derecha denota el límite de la zona de invasión. (Fuente: [23]).	13
2.3.	Movimiento por difusión (Fuente: [26]).	16
2.4.	Diferentes funciones de activación utilizadas.	19
2.5.	Evolución de la población considerando el modelo de crecimiento logístico.	20
2.6.	Diagrama del modelo cinético de Michaelis-Menten, donde $K_m = O_2^M$ es la constante de Michaelis-Menten.	20
2.7.	Radio del núcleo del esferoide con respecto al tiempo (Fuente: [23]). . . .	21
2.8.	Diagrama esquemático de la función delta de Dirac (Fuente: [31]).	23
2.9.	Gráfica de la función $\rho(r, C_n)$	23
2.10.	Representación de ε en una distribución normal.	31
2.11.	Estudio de la convergencia de la solución en función del valor de ε	32
3.1.	Comparación entre la simulación del modelo 1 (con una malla de 5×10^{-4} cm) y los datos experimentales.	38
3.2.	Comparación entre la simulación del modelo 2 (con una malla de 5×10^{-4} cm) y los datos experimentales.	39
3.3.	Comparación entre la simulación de los dos modelos y los datos experimentales.	40
4.1.	Comparativa de la densidad de células entre los dos modelos en los días 0, 3 y 7.	43
4.2.	Comparativa de la concentración de oxígeno entre los dos modelos en los días 0, 3 y 7.	43
4.3.	Perfil inicial y final del oxígeno cambiando la condición inicial del oxígeno.	46
4.4.	Modelo 1. Comparación de la densidad celular para los casos de concentración de oxígeno de 7 mmHg, 15 mmHg y 0 mmHg.	47
4.5.	Modelo 2. Comparación de la densidad celular para los casos de concentración de oxígeno de 7 mmHg, 15 mmHg y 0 mmHg.	48
4.6.	Simulación de la evolución del esferoide en el modelo 1.	49
4.7.	Simulación de la evolución del esferoide en el modelo 2.	50
4.8.	Fotomicrografías del esferoide (Fuente: [23])	51

Lista de Tablas

1.1. Diferencias entre <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	6
2.1. Resumen modelo 1 vs. modelo 2.	26
3.1. Valores de los parámetros utilizados en los modelos.	35
3.2. Rango de variabilidad de los parámetros en bibliografía y resultado de ajuste (modelo 1).	35
3.3. Rango de variabilidad de los parámetros en bibliografía y resultado de ajuste (modelo 2).	35
3.4. Valores del contraste estadístico por hipótesis.	36
3.5. Diferencia en los valores de los parámetros comparables de los ajustes. .	37
4.1. Parámetros utilizados en los modelos.	41