



FACULTAD DE MATEMÁTICA, ASTRONOMÍA,
FÍSICA Y COMPUTACIÓN (FAMAF)

TRABAJO ESPECIAL DE LICENCIATURA EN FÍSICA

Una Terapia de Diferenciación Aplicada a Tumoresferas

Jerónimo Fotinós

Director:
Dr. Carlos A. CONDAT

Representante Académico:
Dr. Lucas BARBERIS



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Interna-](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
[cional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Índice general

1. Introducción	9
1.1. Contextualización	9
1.2. Tumoresferas como modelos biológicos	10
1.3. Importancia de las CMC	11
1.4. Terapia de diferenciación	12
1.5. Modelado de una terapia de diferenciación	13
2. Métodos	15
2.1. Modelo Matemático	15
2.1.1. Hipótesis de modelado	15
2.1.2. Ecuaciones del modelo	18
2.1.3. Adimensionalización	18
2.1.4. Análisis teórico	19
2.1.5. Aplicación a casos experimentales	19
2.2. Limitaciones metodológicas	21
2.3. Recapitulación	22
3. Resultados y Discusión	23
3.1. Análisis teórico: puntos críticos	23
3.2. Análisis teórico: teoremas extendidos	25
3.3. Análisis numérico de casos experimentales	29
3.3.1. Chen	30
3.3.2. Sustrato rígido (<i>Hard</i>), Wang	32
3.3.3. Sustrato blando (<i>Soft</i>), Wang	39
3.3.4. Helmlinger	40
3.3.5. Control, Wang	43
3.4. Recapitulación	45
4. Conclusiones	47

Abstract

Many solid tumors have been found to be driven by chemo- and radiotherapy-resistant cancer stem cells (CSCs). A possible therapeutic avenue in these cases consists of using a differentiating agent (DA) to force the differentiation of the CSCs and then applying conventional therapeutic courses to eliminate the differentiated cancer cells (DCCs). To describe the effects of a DA that reprograms cancer stem cells into DCCs, we adapt a differential equation model developed to investigate tumorspheres, which are assumed to be formed by two jointly evolving cancer cell subpopulations, CSCs and DCCs. We analyze the mathematical properties of the model, finding the equilibrium states and their stability. We also present numerical solutions and phase diagrams to describe the system evolution and the therapy effects, characterizing the DA strength by a parameter a_{dif} . To obtain realistic predictions, we choose the other model parameters to be those determined previously from fits to various experimental datasets ([1-3]).

The data sets reflect the progression of the tumor in different culture conditions. Typically, there is a range of values for a_{dif} such that the tumor final state has a CSC fraction, but a strong enough therapy leads to the suppression of this phenotype. Nonetheless, different external conditions lead to very diverse behaviors. Furthermore, for some environmental conditions, the model predicts a threshold not only in the therapy parameter, but also in its starting time, an early beginning being potentially crucial. In summary, our model shows how the effects of a differentiation therapy depend critically not only on the dosage and timing of the drug application but also on the tumor nature and its environment.

Resumen

El crecimiento de muchos tumores sólidos está promovido por una subpoblación de células madre cancerosas (CMC), particularmente resistentes a la quimio y radioterapia. Un posible tratamiento para estos casos consiste en la utilización de un agente diferenciante (AD) que fuerce a las CMC a perder su carácter de madres, aplicando luego vías terapéuticas convencionales para la eliminación de las células cancerosas diferenciadas (CCD). Para describir los efectos de un AD que provoca la diferenciación de CMC en CCD, se adapta un modelo de ecuaciones diferenciales desarrollado para investigar tumoresferas, que suponemos formadas por dos subpoblaciones de células cancerosas que evolucionan de manera conjunta, CMC y CCD. Se analizan las propiedades matemáticas del modelo, encontrando los equilibrios y su estabilidad. Asimismo, se presentan soluciones numéricas y diagramas de fase para describir la evolución del sistema y los efectos de la terapia, caracterizando la fuerza del AD mediante el parámetro a_{dif} . A fin de obtener predicciones realistas, escogemos los otros parámetros del modelo como aquellos ajustados previamente de distintos conjuntos de datos experimentales ([1-3]).

Estos conjuntos de datos reflejan la progresión del tumor en diferentes condiciones de cultivo. Típicamente, existe un rango de valores para a_{dif} tal que el estado final del tumor contiene CMC; sin embargo, una terapia lo suficientemente fuerte resulta en la desaparición de esta subpoblación. No obstante, diferencias en las condiciones externas provocan comportamientos muy variados. Más aun, para algunas condiciones ambientales, el modelo predice la existencia de valores de umbral, no sólo en el parámetro de terapia, sino también en el momento de inicio de la misma, por lo que el comienzo temprano de esta podría resultar crucial. En síntesis, nuestro modelo muestra cómo el efecto de una terapia de diferenciación depende críticamente, no sólo del dosaje y el momento de administración de la droga, sino también en la naturaleza del tumor y su ambiente.

Capítulo 1

Introducción

Dada la complejidad de los tumores sólidos y del cáncer en general, un enfoque sistémico e interdisciplinario resulta particularmente prometedor a fin de lograr un mayor entendimiento del origen y la progresión de la enfermedad. En particular, el presente trabajo adopta tal enfoque para abordar la descripción de una posible vía terapéutica, la terapia de diferenciación. Se trata de una terapia que toma por objetivo a un tipo particularmente agresivo de células: las células madre cancerosas (CMC). Nuestro objetivo es desarrollar un modelo matemático que permita describir tal terapia aplicada a tumoresferas, modelos de tumor tridimensionales cultivados *in vitro*.

En este capítulo se busca proveer al lector de los conceptos centrales que dan marco al trabajo. A tal fin, comenzamos dando una contextualización general sobre el cáncer y el enfoque adoptado. A continuación, se describen las tumoresferas como modelo biológico, explicitando las razones por las que es importante su estudio y por las que es adecuada la aplicación del modelo al mismo. Luego, se expone el rol central que ocupan las CMC, tanto en la iniciación de los tumores como en la resistencia a terapias. Se introduce la terapia de diferenciación como una posible manera de combatirlos y, finalmente, se explican los motivos por los que se decidió modelarla matemáticamente, junto con las limitaciones que esto conlleva.

1.1. Contextualización

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las que se encuentran células anormales que se multiplican sin control e invaden tejidos cercanos [4]. Muchas de estas, involucran la formación de tumores sólidos o neoplasias, masas anormales de tejido que aparecen debido a dicha multiplicación [5]. El crecimiento de estos tumores depende de las interacciones dinámicas entre las propias células cancerosas, además de las interacciones con el microambiente, que se encuentra en un estado constantemente cambiante [6]. Estas células actúan en conjunto para generar y controlar procesos como la proliferación, muerte y migración. Hay un consenso creciente sobre que estas interacciones no pueden ser explicadas puramente mediante experimentos biológicos, puesto que la complejidad involucrada frecuentemente restringe las escalas espaciales y temporales de observación [7]. En respuesta a esto, se ha comenzado a adoptar el enfoque de la *biología de sistemas*, que utiliza

un abordaje interdisciplinario para proveer un entendimiento sistémico del comienzo y la progresión del cáncer, estudiando cómo las interacciones entre componentes individuales dan origen al comportamiento del cáncer como un todo [7].

Como hemos explicado, la importancia de entender la naturaleza de las interacciones entre las células tumorales difícilmente pueda ser exagerada. No obstante, dada la extraordinaria complejidad del crecimiento *in vivo* de un tumor, un modelo apropiado para dicho crecimiento debe incluir muchos factores que oscurecen la extracción de información. Por esto, la decisión tomada en el presente trabajo es utilizar un modelo continuo de dinámica de poblaciones. Este incluye interacciones entre células mediadas por el ambiente, donde con el espíritu de mantener el modelo lo más simple posible, se incluyen explícitamente sólo células cancerosas madre y diferenciadas. Un modelo de estas características es adecuado para describir el crecimiento de tumoresferas.

1.2. Tumoresferas como modelos biológicos

Las tumoresferas son modelos biológicos *in vitro* tridimensionales, utilizados en investigación como modelos intermedios entre cultivos *in vitro* de líneas celulares y tumores *in vivo*. Más específicamente, las tumoresferas se forman por proliferación clonal a partir de una suspensión unicelular (derivada de líneas celulares permanentes o tejido tumoral), en medios de baja adhesión con distintos factores de crecimiento [8].

Los cultivos de células madre cancerosas (CMC) como esferas libres en suspensión (tumoresferas) fueron primero descritos en tumores cerebrales, pudiéndose generar tumoresferas a partir de una variedad de tumores sólidos (de mama, pulmón, colon, próstata, páncreas y ovarios) en años los siguientes [8]. Los procesos de cultivo de tumoresferas y de otros modelos esféricos de tumores se encuentran descritos en detalle en [8]. No obstante, para el caso de las tumoresferas podría describirse en rasgos generales como sigue. Primero se disocia una muestra tumoral en suspensiones unicelulares (alternativamente puede trabajarse a partir de líneas celulares cancerosas, facilitando este paso). La inhibición de la adhesión resulta en la muerte de las células diferenciadas y no cancerosas vía anoikis, una forma de muerte celular programada que ocurre cuando las células se desprenden de la matriz extra celular. Bajo estas condiciones, las células tumorales no diferenciadas proliferan generando los clústeres en suspensión que llamamos tumoresferas. La suspensión celular debe ser cultivada a baja densidad y en entornos de baja adhesión para evitar la agregación y fusión de los grupos celulares. Esto asegura que estas esferas son clonales, es decir, que cada tumoresfera se ha originado a partir de una única CMC. Además de la densidad celular, parámetros críticos como la composición del medio, el volumen, la superficie de la placa de cultivo y la duración tienen que ser tenidos en cuenta. Respecto a la composición del medio, este cuenta con distintos factores que favorecen la proliferación de las CMC, como pueden ser el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*) o el factor básico de crecimiento de fibroblastos (b-FGF, *basic fibroblast growth factor*). Por último, cabe mencionar que pueden realizarse, luego de la disociación, pasos intermedios que por ejemplo involucran la identificación de marcadores asociados a las CMC.

A pesar de que los distintos modelos tridimensionales tienen rasgos en común, cada

uno exhibe distintas propiedades características, por lo que, para un dado estudio, el modelo esférico debe ser cuidadosamente elegido de manera acorde a los objetivos de la investigación. Contrario al caso del resto de los modelos esféricos, las tumoresferas no buscan imitar el tejido canceroso, sino estudiar las propiedades de las CMC. De hecho, es sabido que las tumoresferas no replican de manera completa la estructura y el ambiente de un tumor *in vivo* [8]. Como nuestro modelo matemático es cero-dimensional, esto es, sólo tiene en cuenta la evolución temporal de los números de células de cada población sin dar cuenta de su distribución espacial, esta diferencia de estructura no se verá reflejada. Sin embargo, el modelo sí reflejará las interacciones entre poblaciones, para lo que las tumoresferas son un buen modelo. En síntesis, las tumoresferas son sistemas biológicos simplificados que permiten el estudio de la evolución del cáncer en ausencia de tejido sano y el complejo sistema de señales que prevalece en el ambiente en el que viven los tumores reales, siendo particularmente adecuadas para poner en evidencia las propiedades de las CMC.

1.3. Importancia de las CMC

Las células madre cancerosas (CMC) son un tipo de células con la capacidad de auto-renovarse que ha sido identificado en la mayor parte de los cánceres líquidos y sólidos, y que contribuyen a la iniciación, expansión, resistencia, recurrencia y metástasis luego de terapia [9]. Si bien inicialmente suelen representar una fracción pequeña de la población celular, esta aumenta a lo largo de la progresión tumoral, incremento que se correlaciona con un aumento en la resistencia a terapias [10]. Usualmente, son definidas por su capacidad para renovar el crecimiento del tumor del cual son originarias y por su capacidad de diferenciarse en distintos tipos de células [11]. Esto implica que la definición de estas células que dan origen a los tumores es funcional, es decir, sólo puede ser verificada experimentalmente. Más aun, de los experimentos de cultivo de tumoresferas se obtienen datos de número y tamaño de estas esferas. Si bien la presencia de CMC puede relevarse mediante la detección de marcadores asociados a las mismas, no se obtiene una evaluación de la cantidad exacta de estas células. Se ha visto, sin embargo, que a través del modelado matemático pueden reconstruirse los números poblacionales de CMC y células cancerosas diferenciadas (CCD). Es el caso del análisis realizado por Barberis et al. [1] para el experimento clásico de Helmlinger [12] donde se obtuvo la fracción de CMC, que no había sido accesible experimentalmente. Si uno quisiera medir esta fracción, sería necesario disociar la tumoresfera y medir las esferas generadas. Sin embargo, este procedimiento también conlleva dificultades, puesto que CMC quiescentes (en un estado adormecido, de no proliferación) podrían no dividirse para formar tumoresferas por falta de algún componente desconocido de activación para las células durmientes, presente en el nicho *in vivo* [8]. La capacidad de entrar reversiblemente en quiescencia de las CMC presenta mayores inconveniencias que ser un impedimento para conocer el número de CMC presentes en la tumoresfera: es uno de los tantos mecanismos que vuelven a las CMC resistentes ante drogas y frente a la radio/quimioterapia estándar. Los objetivos preferenciales de estas terapias son las CCD que no son responsables del crecimiento a largo plazo del tumor [9]. Este proceso de resistencia ha sido abordado previamente en

[13], mediante un modelo espacial que consideraba células en estados de proliferación o quiescencia, mostrando que, aunque el crecimiento del tumor era retrasado al comienzo de cada dosis quimio-terapéutica, la resistencia de las células quiescentes era suficiente para repoblar, ocasionando el fallo de la terapia aun en ausencia de resistencia adquirida.

Adicionalmente a la resistencia a terapias, las CMC son esencialmente responsables de las recaídas (recurrencia tumoral) y la metástasis, que son las principales causas de las bajas tasas de supervivencia en los pacientes afectados [9]. Con esta información, resulta de vital importancia eliminar la población de CMC. Desafortunadamente, esta no puede ser eliminada mediante un procedimiento que se enfoque exclusivamente en ellas, debido a la capacidad de las CCD de des-diferenciarse. La des-diferenciación es un proceso por el cual células cancerosas no-madres, incluso en estados completamente diferenciados, pueden retener su capacidad de tumorigénica [9]. Esta plasticidad fenotípica es regulada por el microambiente y puede complicar seriamente las terapias enfocadas en las CMC, ya que las CMC destruidas pueden ser sustituidas por CCD des-diferenciadas [2]. Por otro lado, se ha reportado que la presencia de células en diferentes estados de diferenciación resulta en resistencia a las drogas debida a la cooperación entre las CMC y las CCD [8]. Esta cooperación interespecífica ha sido evidenciada por diversos trabajos que realizaban un modelado matemático del crecimiento y ajustaban el modelo a datos de distintos experimentos de cultivo de tumoresferas [1-3]. Todo lo anterior nos lleva a concluir que es necesaria la aplicación combinada de agentes con toxicidad selectiva para ambas poblaciones (CMC y CCD). Esta necesidad de eliminar simultáneamente ambas poblaciones, ha sido señalada ya en la literatura [14], en particular en el caso de una terapia de diferenciación como la que describiremos a continuación.

1.4. Terapia de diferenciación

Una posible terapia enfocada hacia las CMC, consiste en la utilización de un agente que las fuerce a diferenciarse, volviéndose CCD. Esto en combinación con una terapia convencional para reducir la masa de CCD, podría resultar una estrategia terapéutica prometedora.

Existen distintos compuestos con esta propiedad, que podríamos llamar “agentes diferenciadores”, de los cuales uno de los más usados es el ATRA (*All-Trans Retinoic Acid*). Este es el metabolito más activo de la vitamina A. Se ha reportado que el ATRA induce la diferenciación de CMC en un amplio espectro de tumores sólidos, volviéndose útil para enfrentarse a estas células tumorigénicas, dando lugar a la presencia de fenotipos más benignos [14]. También ha sido demostrado que el ATRA es capaz de prevenir la metástasis en células de carcinoma de tiroides y de tumores de mama, e inhibir la proliferación e invasión en cánceres de ovarios, hígado y pulmón [14]. Notablemente, el uso del ATRA para inducir la diferenciación, en combinación con otros agentes quimio-terapéuticos, representa el enfoque terapéutico estándar actual, usado para el tratamiento de leucemia promielocítica aguda en adultos y de neuroblastomas en niños [14]. Una gran ventaja del ATRA es su baja toxicidad. Sin embargo, lejos de ser perfecta, los mayores problemas asociados con la utilización de esta droga son el transporte ineficiente hasta las células objetivo y la resistencia generada por las células cancerosas. El primero se debe a la baja

solubilidad acuosa que posee y a su reducida vida media en plasma [14], además de su susceptibilidad a la luz, el calor y los oxidantes [15]. Esto dificulta el mantenimiento de niveles altos y estables de la droga bajo condiciones fisiológicas. El desarrollo de métodos de transporte para la droga es un campo de investigación activo en la actualidad. Respecto al segundo problema, la resistencia (ya sea intrínseca o adquirida) representa un problema particularmente importante en los fenotipos más agresivos, donde diversas “rutas de escape” les confieren resistencia a los ácidos retinoicos [15]. Los problemas mencionados son responsables de que, a pesar de los prometedores resultados de las fases pre-clínicas para el tratamiento de tumores sólidos, las terapias basadas en el uso del ATRA hayan sido ineficaces en las pruebas clínicas [15].

1.5. Modelado de una terapia de diferenciación

En el contexto de esta problemática, una descripción matemática de la terapia de diferenciación podría aportar piezas clave de información respecto a estrategias de implementación de la misma y de la evolución del sistema, difícilmente obtenibles de otra manera. La utilidad del modelado matemático para guiar la aplicación de otras terapias ha sido enfatizada previamente en la literatura [7, 11]. En el presente trabajo, nos enfocamos en la extensión del modelo desarrollado por Benítez et al. [2] para el caso de una terapia de diferenciación. Este modelo se ha usado exitosamente para describir el crecimiento de tumoresferas [1-3]. Nuestra extensión tratará de anticipar entonces, la aplicación de una terapia de diferenciación a tumoresferas, evaluando aspectos particularmente importantes como el dosaje y el momento de inicio de la terapia.

Este enfoque, aunque valioso, tiene varias limitaciones que serán abordadas oportunamente en el capítulo 2. No obstante, anticipamos aquí brevemente algunas de ellas, a fin de que el lector esté al tanto del alcance del trabajo. En primer lugar, el modelo utilizado es continuo, por lo que no limita los números de individuos a valores discretos. Por otro lado, se trata de un modelo determinista, dejando fuera los efectos de la estocasticidad presente de manera natural en la biología. Además, por la naturaleza de los experimentos, resulta complicado tener abundancia y calidad en los datos. Por esto, en general, los parámetros para un dado experimento se han obtenido de conjuntos de escasos datos, lo que limita la confianza que uno tiene en los mismos. Como se mencionó previamente, el modelo es adecuado para la descripción de tumoresferas, por lo que no sería capaz de dar cuenta de la presencia de tejido sano u otros elementos del ambiente de los tumores que crecen *in vivo*. Asimismo, tampoco se tienen en cuenta explícitamente fenómenos como la senescencia o la des-diferenciación.

La descripción detallada del modelo utilizado, sus implicancias, su utilización con los datos de distintos casos experimentales y sus limitaciones, son explicadas en el capítulo 2. En el capítulo 3 se detallan las propiedades teóricas del modelo, algunos teoremas probados para el mismo y se exponen los resultados de la utilización del modelo en dichos casos experimentales. Finalmente, en el capítulo 4 se resumen y discuten las conclusiones que se deducen de lo expuesto en el capítulo anterior.

Capítulo 2

Métodos

El objetivo del presente trabajo es intentar dilucidar los efectos de una hipotética terapia de diferenciación aplicada a una tumoresfera, modelando el crecimiento de la misma teniendo en cuenta los efectos debidos a la presencia de distintos tipos de células tumorales, a saber, células madre cancerosas (CMC) y células cancerosas diferenciadas (CCD). A tal fin se utiliza un modelo continuo de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas.

Con el propósito de explicar la metodología de trabajo utilizada, en primer lugar se presentarán el modelo matemático y sus hipótesis, luego se expondrá una adimensionalización del mismo, a continuación se detallarán las herramientas utilizadas para el análisis teórico del modelo y la realización de simulaciones numéricas y, por último, se discutirán las limitaciones de la metodología implementada.

2.1. Modelo Matemático

Para modelar el crecimiento de una tumoresfera sometida a una terapia de diferenciación, utilizamos un modelo continuo de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas. El mismo es una extensión del modelo desarrollado previamente por Benítez y colaboradores [2, 3], que trataba el crecimiento en ausencia de terapia. Dichas ecuaciones dan cuenta de la dinámica poblacional de las CMC y de las CCD. El número de individuos de cada población es respectivamente denotado con las variables S y D .

2.1.1. Hipótesis de modelado

En general se podría considerar que la población de células madre se reproduce a una tasa r_S mientras que las células diferenciadas se reproducen con una tasa r_D . Aquí sin embargo, consideraremos una única tasa global r (es decir, tomamos $r_S = r_D = r$). Esta simplificación sigue lo señalado por Benítez et al. en [3]. Allí se argumenta que esta es una descripción más adecuada ya que, en general, en los experimentos de crecimiento de tumoresferas no es posible discriminar entre estas tasas, sino que se extrae de los datos una única tasa global. De este modo, nuestro modelo se adecúa mejor a la descripción de estos experimentos. No obstante, el modelo debería seguir siendo capaz de representar los

datos, aun si esta simplificación no fuera del todo adecuada. Esto es así principalmente por dos razones.

Para la primera, es preciso mencionar por adelantado un aspecto de los resultados: la ubicación de ningún punto crítico del sistema que tenga relevancia biológica (es decir, que se dé para valores positivos de las poblaciones celulares) depende del valor de las tasas de reproducción r_S o r_D . Las tasas de reproducción pueden a lo sumo aparecer junto con el coeficiente de terapia en la forma a_{dif}/r , de modo que este sea adimensional, pero no aparecen de manera independiente. Esto es razonable, ya que dichas tasas caracterizan la escala temporal del sistema. Por esto, uno esperaría que a lo sumo modifiquen la forma de las trayectorias en el espacio de fases, pero no su destino. El hecho de que las posiciones de los equilibrios dependan en general de los coeficientes de interacción (estrategia K) en lugar de depender de las tasas de reproducción (estrategia r), es algo frecuente en dinámica de poblaciones cuando el ambiente no está fraccionado [16].

La segunda razón es que, notando que r_S aparece multiplicada por algún factor correspondiente a las probabilidades de los distintos tipos de reproducción, tenemos que una posible diferencia entre r_S y r_D será absorbida por dichas probabilidades. Así, en el peor de los casos, el modelo seguirá pudiendo dar cuenta del comportamiento del sistema, sólo que atribuyendo la diferencia entre las tasas a una diferencia en las probabilidades.

En lo que respecta a los tipos de reproducción, mientras que una célula diferenciada sólo puede originar otras dos células diferenciadas, la reproducción de una célula madre presenta distintas posibilidades: esta puede autorreplicarse, i.e. producir otras dos células S , con probabilidad p_s ; puede originar dos células D con probabilidad p_d ; por último, puede realizar una reproducción asimétrica, dando una célula D y una S , con probabilidad $p_a = 1 - p_s - p_d$. Esto es ilustrado en la Fig. 2.1.

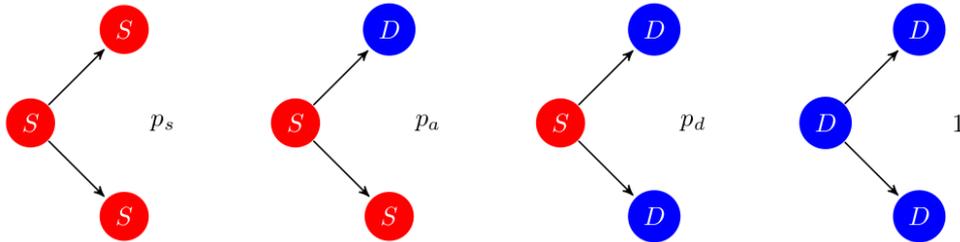


Figura 2.1: *Posibilidades para las reproducciones celulares.* Se muestran las CMC o S en rojo, con los posibles resultados de su reproducción. De izquierda a derecha, una célula S puede generar dos S con probabilidad p_s , una S y una D (o CCD, en azul) con probabilidad p_a o dos D con probabilidad p_d . Por último, las células D sólo pueden autorreplicarse, i.e. originan dos células D con probabilidad 1.

Debido a que el comportamiento de una célula se ve influenciado por la presencia del resto de las células, tanto de su mismo tipo (interacciones intraespecíficas) como de tipos distintos (interacciones interespecíficas), el modelo tiene una estructura base típica de los modelos de poblaciones interactuantes [16]. Estos incorporan la interacción mediante coeficientes α_{ij} que dan cuenta del efecto de la población de tipo j sobre la de tipo i . En la Fig. 2.2 puede observarse un esquema de las interacciones tenidas en cuenta por

el modelo, donde los coeficientes correspondientes han sido ubicados sobre las flechas que representan dichas interacciones. De este modo, las interacciones intraespecíficas son tenidas en cuenta por los coeficientes α_{ij} con $i = j$, mientras que si $i \neq j$, el coeficiente representa una interacción interespecífica.

La presencia de un mayor número de individuos de una dada especie puede inhibir o estimular el crecimiento. Si $\alpha_{ij} > 0$, el efecto de la población j es inhibir el crecimiento de la población i . Esto puede deberse a diversos motivos, como pueden ser la competencia por nutrientes, espacio habitable o recursos en general. Por otro lado, si $\alpha_{ij} < 0$, tenemos que la presencia de la especie j promueve el crecimiento de la especie i . Esto implica que algún tipo de cooperación tiene lugar, ya sea por ejemplo porque una especie asiste a la otra (cooperación interespecífica) o porque la especie presenta depensación (cooperación intraespecífica, [16]).

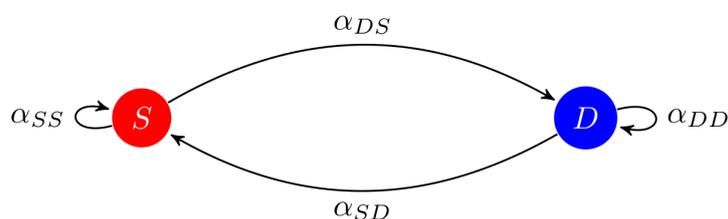


Figura 2.2: *Coefficientes de interacciones poblacionales.* En el esquema se ubica cada coeficiente sobre la flecha de la interacción que representa. Así, por ejemplo, α_{SS} se ubica en la flecha que tiene como origen y destino a las S , ya que da cuenta de la interacción intraespecífica de las mismas, mientras que α_{DS} se ubica en la flecha que tiene por origen a las S y por destino a las D , ya que da cuenta del efecto de la interacción interespecífica sobre las D causado por las S .

En general, uno puede interpretar la inversa del coeficiente de interacción intraespecífica de una dada especie como la capacidad de carga del ambiente para dicha especie. Esto es, el número de individuos de esta especie que el ambiente tiene recursos para sostener. En nuestro modelo, podrá hacerse dicha interpretación en el caso de α_{DD} , pero no necesariamente de α_{SS} . Esto se debe a que, si sólo tenemos células D , estas se reproducirán hasta alcanzar el valor estacionario $1/\alpha_{DD}$ (bajo el supuesto de que $\alpha_{DD} > 0$). En cambio, si comenzamos con una población que contiene únicamente células S , estas pueden generar células D , por lo que en general no se observará $1/\alpha_{SS}$ como valor estacionario de las mismas. El hecho de que los miembros de una especie puedan generar individuos de una especie distinta, es una de las principales diferencias respecto a un modelo estándar para poblaciones interactuantes.

Otra diferencia respecto a un modelo típico para poblaciones interactuantes, que a su vez es la diferencia con el modelo de Benítez y colaboradores, es la incorporación de los términos de terapia. Aquí consideramos el efecto de una terapia de diferenciación. La misma consiste en administrar un agente diferenciante que obliga a las células S a diferenciarse y convertirse en D . La eficiencia de dicha terapia es reflejada por el parámetro α_{dif} , definido como la fracción de células S que se diferencia por unidad de tiempo. De

este modo, la terapia no cambia el número total de células, sólo transfiere células de S a D . Notemos que, por definición, $a_{dif} \geq 0$.

2.1.2. Ecuaciones del modelo

A continuación, se muestran las ecuaciones del modelo, donde el punto indica derivada temporal y $\Pi = p_d/p_s$.

$$\dot{S} = rp_s S(1 - \Pi - \alpha_{SS}S - \alpha_{SD}D) - a_{dif}S \quad (2.1a)$$

$$\dot{D} = [rD + rS(p_a + 2p_d)](1 - \alpha_{DS}S - \alpha_{DD}D) + a_{dif}S \quad (2.1b)$$

En la ecuación (2.1a) para S , el primer término consiste de un factor $rp_s S$ que, multiplicado por $1 - \Pi = (p_s - p_d)/p_s$, puede ser interpretado como la tasa de reproducción efectiva intrínseca de las S . Los dos últimos términos del paréntesis dan cuenta de los efectos de las interacciones poblacionales. La interpretación del primer factor como una reproducción efectiva, se deriva de que, al ser r la tasa de reproducción, rS es la reproducción de toda la población de CMC. Al multiplicar por p_s , uno toma la fracción de estas reproducciones que dan dos CMC, que son las que efectivamente aumentan el número de estas. Como las reproducciones simétricas que dan dos CCD hacen decrecer el número de CMC, en el paréntesis tenemos primero los términos $1 - \Pi$, que representan la diferencia entre las reproducciones que dan dos CMC y las que dan dos CCD. Notemos que las reproducciones asimétricas no modifican el número de células S . El tercer y cuarto término del paréntesis representan las interacciones intraespecífica e interespecífica, respectivamente. Estos pueden pensarse como la fracción ocupada de la capacidad de carga del sistema para la población S , donde la población D consume o aumenta esos recursos dependiendo de si α_{SD} es mayor o menor a cero respectivamente.

Por otro lado, en la ecuación (2.1b) para las D , el corchete representa la reproducción efectiva de estas, donde el primer término corresponde a la contribución de las propias D , mientras que el segundo es la contribución de las S . Las reproducciones de las S que dan dos células D deben razonablemente pesar doble. Al igual que en el caso de las S , este factor multiplica al que da cuenta de las interacciones poblacionales.

Los últimos términos en ambas ecuaciones son los términos de terapia. Estos diferencian una cantidad $a_{dif}S$ de CMC por unidad de tiempo, es decir, las remueven de las S y las agregan como células D . Se puede corroborar sumando ambas ecuaciones que estos términos no modifican el número total de células.

2.1.3. Adimensionalización

Suele ser conveniente utilizar una versión adimensionalizada de las ecuaciones. Esto no sólo facilita la implementación de simulaciones numéricas, sino que también nos permite independizarnos en cierta medida de los valores particulares de los parámetros para un caso dado.

Las ecuaciones adimensionales son

$$\dot{X} = X(P - AX - BY) - M(1 - P)X \quad (2.2a)$$

$$\dot{Y} = (X + Y)(1 - CX - Y) + MX \quad (2.2b)$$

donde,

$$\begin{aligned} X &= \alpha_{DD}(p_a + 2p_d)S & Y &= \alpha_{DD}D & A &= \frac{\alpha_{SS}}{\alpha_{DD}} \frac{p_s}{p_a + 2p_d} & B &= \frac{\alpha_{SD}}{\alpha_{DD}} p_s \\ C &= \frac{\alpha_{DS}}{\alpha_{DD}} \frac{1}{p_a + 2p_d} & P &= p_s - p_d & M &= \frac{a_{dif}}{r(p_a + 2p_d)} & \tau &= rt \end{aligned}$$

El punto ahora indica derivada respecto a τ .

2.1.4. Análisis teórico

Para el análisis del modelo en el caso general, se utilizan principalmente técnicas típicas de sistemas dinámicos como las descritas en [17]. Los puntos críticos, que son los valores estacionarios de las poblaciones, son hallados resolviendo el sistema de ecuaciones que resulta de igualar a cero las derivadas temporales de las poblaciones en las ecuaciones (2.1) o (2.2). En los casos en donde sea posible, se realiza un análisis de la positividad de estos puntos. Es decir, se analizan las condiciones bajo las cuales estos puntos pertenecen al primer cuadrante o a los dos semiejes positivos (del espacio de S y D), situación en la cual decimos que estos puntos son biológicamente razonables.

A su vez la estabilidad de los puntos críticos es analizada por el método de linealización. El mismo consiste en hallar los autovalores de la matriz de linealización de las ecuaciones del sistema alrededor de un punto crítico. La parte real de estos nos indica si, en la dirección del autovector correspondiente, el punto crítico atrae a las condiciones cercanas, en caso de que dicha parte real sea negativa, o las repele, en caso de que sea positiva. Una parte imaginaria no nula en los autovalores nos indica que los puntos están siendo rotados alrededor del punto crítico. Nuevamente se estudia la estabilidad en general en los casos en los que es posible.

Adicionalmente, se extienden los teoremas formulados en [1] para el modelo sin terapia. Las extensiones de los mismos garantizan la positividad del modelo bajo ciertas hipótesis y brindan una aproximación para el valor de umbral en la eficiencia de la terapia tal que hay crecimiento inicial por parte de las CMC. Estos teoremas resultan útiles también en el análisis de casos experimentales particulares.

2.1.5. Aplicación a casos experimentales

A pesar de obtenerse expresiones explícitas tanto para los puntos críticos como para los autovalores, muchas veces su análisis se ve imposibilitado a causa de la complejidad de las expresiones. Afortunadamente, en trabajos previos realizados por Benítez et al. [2, 3] y por Barberis y colaboradores [1], se ajustó el modelo sin terapia a casos experimentales de cultivo de tumoresferas. Las condiciones de cultivo varían en cada caso, lo que permite dilucidar cómo las mismas influyen en la evolución del sistema.

Aquí, el enfoque que se toma es valorar los parámetros de los distintos casos experimentales de manera tal que todo quede en términos de un único parámetro, a saber, a_{dif} . De este modo podemos analizar cómo respondería el sistema ante terapias de diferenciación de distintas intensidades. Esto también nos permite explorar el espacio de parámetros con valores razonables de los mismos y analizar los comportamientos habilitados por el modelo.

Para simular la evolución de las poblaciones para un conjunto especificado de parámetros y condiciones iniciales dadas, se utilizan programas en Fortran 90 que implementan la solución del sistema de ecuaciones por el método de Runge-Kutta de orden 8. Dicho código fue validado mediante la reproducción de curvas conocidas. Para analizar y graficar el comportamiento de los puntos críticos, los autovalores, las trayectorias en el espacio de fases y los diagramas de fases, se utilizan programas en Python. Los mismos incorporan librerías como numpy, scipy, sympy y matplotlib.

Pasamos a detallar los casos experimentales analizados. El primero corresponde a uno de los cultivos realizados por Chen y colaboradores [18]. En dicho trabajo se realizó un estudio experimental de crecimiento de tumoresferas, utilizando tres líneas celulares de las cuales aquí nos concentraremos en sólo una, la T47D que corresponde a una línea de cáncer de mama. Puede encontrarse un análisis del resto de las líneas (para el caso sin terapia) en [2]. Los cultivos eran iniciados con una única CMC y se medía el tamaño promedio de la tumoresfera cada dos días durante un total de diez días. Encontraron que, bajo las condiciones adecuadas, la proporción final de CMC era significativa. Para analizar este caso tomamos los parámetros del modelo como los ajustados por Barberis et al. en [1].

El segundo y el tercer caso tratan los experimentos de Wang et al. [19], en los cuales se realizó el cultivo de tumoresferas sobre sustratos de distinta rigidez. Aquí trataremos los casos Control y de sustrato rígido, ya que en cuanto a lo que a la terapia respecta el caso de sustrato suave es cualitativamente similar al de sustrato rígido. En estos experimentos se aplicaban factores que estimulaban el crecimiento (Factor de Crecimiento Epidérmico - EGF) e inhibían hasta cierto punto la diferenciación (Factor Básico de Crecimiento de Fibroblastos - bFGF). De este modo lograban obtener cultivos ricos en CMC en estados de quiescencia o proliferación. El análisis de estos experimentos y su ajuste con el modelo sin terapia fue realizado en [3], de donde tomamos los parámetros para el análisis de estos casos.

El cuarto caso está dedicado al experimento de Helmlinger [12]. En este se preparaban medios de cultivo que sometían a los esferoides a distintas presiones, mostrando que el estrés es un factor que inhibe el crecimiento de los tumores. Un análisis detallado de este caso puede encontrarse en [1], de donde tomamos los valores de los parámetros.

2.2. Limitaciones metodológicas

Si bien el abordaje de utilizar un sistema continuo de ecuaciones diferenciales es ampliamente utilizado en modelado [16] y ha ajustado correctamente los datos de diversas condiciones experimentales [1-3], los modelos de campo medio como el aquí utilizado tienen limitaciones que es conveniente tener en mente.

Para empezar, los valores que experimentalmente pueden asumir S y D son siempre discretos. Por esto, los valores reales que puedan asumir en el modelo deben siempre interpretarse como un promedio de numerosas mediciones de sistemas creciendo bajo condiciones idénticas. Por otro lado, el modelo supone que toda célula siente la presencia de un ambiente análogo, cuya naturaleza depende de la densidad de células que la rodean, que suponemos uniforme. Si uno quisiera describir las heterogeneidades en los entornos de distintas células, sería necesaria una descripción espacial. Sin embargo, un modelo espacial posee una complejidad que quizás oscurezca los procesos o imposibilite la extracción de información. Por esto, es conveniente en primera instancia trabajar con un modelo simple como el presentado en este trabajo, que tiene la virtud de lograr representar el comportamiento del sistema a la vez que permite extraer información para caracterizar al mismo. En futuros trabajos se podría implementar un modelo espacial basado en lo construido aquí.

Otra limitación tiene que ver con el hecho de que frecuentemente uno puede variar los parámetros de un ajuste dentro de cierto rango y aun así representar adecuadamente los datos. Esto compromete seriamente las capacidades predictivas de los modelos deterministas, ya que pequeñas diferencias entre dos curvas de ajuste a un tiempo dado pueden evolucionar en diferencias significativas a tiempos futuros. Sin embargo, como ha sido explicado por Sibona y colaboradores [20] en el contexto de los modelos epidemiológicos, a pesar de que no sean tan buenos para realizar predicciones, estos modelos (de campo medio) son útiles para explicar comportamientos a posteriori. Esto último justifica la elección realizada, ya que lo que pretendemos es entender cómo la naturaleza de las interacciones entre las poblaciones celulares y la terapia afectan a la dinámica resultante. No pretendemos predecir el crecimiento de un caso particular a partir de un conjunto de datos, sino caracterizar el efecto de la terapia teniendo en cuenta el rol de cada una de las partes del sistema. Es por esto que se ha decidido adoptar este enfoque a pesar de sus limitaciones. En caso de querer usar el modelo para realizar predicciones, Castro et al. [21] señalan que se deben asignar incertidumbres a los parámetros y propagarlas junto con las de los datos a fin de realizar predicciones probabilísticas a tiempos cortos. Estas predicciones serán confiables en la medida en la que las condiciones del medio se mantengan inalteradas.

Ante esto, uno quizás pensaría que un modelo realista incorporaría más parámetros para dar cuenta de los posibles cambios en el medio o en el comportamiento de las poblaciones. Esto podría llevarse a cabo aumentando el número de parámetros o, por ejemplo, considerando que parámetros como los coeficientes de interacción puedan ser funciones de otros parámetros en lugar de mantenerse constantes. Aunque esto pueda resultar útil, aumentar la complejidad del modelo conlleva numerosas desventajas. Además de dificultar la extracción de información, parafraseando lo dicho en [21], los modelos multiparamétricos son propensos al sobreajuste a medida que se aumenta el número de parámetros, lo cual a su vez provoca la pérdida del poder explicativo del modelo. Esto último es algo que queremos evitar a toda costa, por lo que trataremos de mantener el modelo tan simple como sea posible, dando cuenta de los aspectos esenciales del fenómeno. Por esta razón, fenómenos como la desdiferenciación de CCD en CMC que podrían complicar terapias que hacen foco en las células madre, quedan reflejados en los coeficientes de interacción (ver

[2]), dejando fuera por ejemplo la posibilidad de que el efecto de la desdiferenciación se intensifique cuando la fracción de CMC se vuelve muy pequeña. Una manera de modelar esto, es introducir una transferencia de células D a S cuando la proporción de células S cae por debajo de cierto umbral. Uno podría, por ejemplo, incorporar un término que sea proporcional a una sigmoide valuada en la fracción que representan las CMC del total, es decir

$$\Lambda(\sigma) = a \frac{1 + e^{-\sigma_0/\lambda}}{1 + e^{(\sigma-\sigma_0)/\lambda}}$$

donde $\sigma = S/(S + D)$ es la fracción de CMC, σ_0 el valor de “umbral”, λ caracteriza la pendiente de la sigmoide y la normalización es tal que la desdiferenciación máxima está dada por a . Alternativamente, puede utilizarse una modificación que incorpore explícitamente la presencia de los micro-ARN que controlan la desdiferenciación, respondiendo a la falta de CMC en el entorno, como la descrita en [11].

Por último, una limitación a destacar deviene del hecho de que los parámetros usados para analizar casos experimentales fueron obtenidos de ajustes con pocos datos, generalmente de poblaciones totales sin indicar la composición. Esto genera una falta de confianza en las descripciones cuantitativas de dichos casos. Sin embargo, en dichos trabajos [1-3] se tuvo el cuidado de que la incertidumbre en los parámetros no provocara cambios en la interpretación cualitativa. Por esto, aun si el análisis cuantitativo no resulta del todo confiable, las conclusiones cualitativas sí deberían serlo. Una manera de superar este obstáculo sería disponer de un mayor número de datos que a su vez sean más detallados y abarquen un período de tiempo más prolongado. Estudios experimentales futuros podrían contribuir a este aspecto.

2.3. Recapitulación

Se utiliza un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias para caracterizar el efecto de una terapia de diferenciación aplicada a una tumoresfera, donde se toman en consideración dos poblaciones de células tumorales, células madre cancerosas (CMC) y células cancerosas diferenciadas (CCD). Las propiedades del modelo son analizadas mediante técnicas típicas de los sistemas dinámicos, hallándose sus equilibrios y estabilidad. Se da también una adimensionalización del modelo.

Se han revisado las limitaciones de este enfoque y las razones por las cuales, a pesar de las mismas, se ha decidido proceder con este.

Capítulo 3

Resultados y Discusión

A fin de dilucidar los efectos de una terapia de diferenciación aplicada a una tumoresfera, en este capítulo se reportan los resultados y hallazgos de los análisis teóricos y numéricos mencionados en el capítulo anterior. Comenzamos con el reporte de los puntos críticos, dando condiciones para su positividad y estabilidad cuando sea posible. Luego, procedemos a enunciar y demostrar algunos teoremas para el modelo. Finalmente, nos dedicamos al análisis de los casos experimentales. Comenzamos por el caso de Chen, continuamos por los casos de sustrato rígido de Wang y el caso de Helmlinger, y finalizamos con el caso Control de Wang.

3.1. Análisis teórico: puntos críticos

Aquí, el i -ésimo punto crítico se denotará como un punto en el espacio de fases $T_i = (S_i, D_i)$. Como se mencionó oportunamente en la sección correspondiente del capítulo de Métodos, estos pares de valores anulan las derivadas temporales de ambas poblaciones simultáneamente. Otra convención de notación que tomaremos es denotar al j -ésimo autovalor del i -ésimo punto crítico como $\lambda_j^{(i)}$ y por $\nu_j^{(i)}$ a su correspondiente autovector (en general, tanto las multiplicidades geométricas como aritméticas de todos los autovalores calculados son iguales a uno). Procedemos a detallar cada uno de los puntos críticos.

Solución Trivial T_0

Este punto crítico corresponde al origen del espacio de fases, es decir, sus coordenadas son $T_0 = (0, 0)$. Este punto representa la extinción de ambas poblaciones. Los autovalores de la matriz de linealización centrada en este punto y sus correspondientes autovectores son

$$\lambda_1^{(0)} = r$$

$$\nu_1^{(0)} = (0, 1)$$

$$\lambda_2^{(0)} = r(p_S - p_D) - a_{dif}$$

$$\nu_2^{(0)} = \left(\frac{p_d - a_{dif}/r}{(p_a + 2p_d) + a_{dif}/r}, 1 \right)$$

Como puede observarse, este punto es siempre inestable, ya que repele en la dirección correspondiente al eje D , pues suponemos que $r > 0$ con lo que $\lambda_1^{(0)} > 0$. Para el segundo autovalor, tendremos repulsión en una dirección que tiene que ver con S si la tasa de reproducción efectiva de las CMC, tenida en cuenta por el término $r(p_s - p_d)$, es mayor a la de diferenciación producida por la terapia. Si $p_d > p_s$, las S decrecen naturalmente en esta dirección, con lo que este autovalor siempre es negativo (independientemente de a_{dif}). Si $p_d < p_s$, la reproducción efectiva es positiva y podemos tener dos situaciones. La primera, en la cual la terapia es lo suficientemente fuerte como para superar la tasa de reproducción efectiva, con lo que el segundo autovalor se volvería negativo. Tendríamos atracción en la dirección correspondiente, resultando T_0 en un punto silla. La segunda situación corresponde a una terapia que no supera la tasa de reproducción efectiva, por lo cual T_0 resulta un repulsor (atractor negativo).

Equilibrio Diferenciado T_1

Este punto se ubica en $T_1 = (0, 1/\alpha_{DD})$, es decir, corresponde a una población exclusivamente compuesta por células D . Los autovalores de este punto y sus correspondientes autovectores son

$$\lambda_1^{(1)} = -r \qquad \nu_1^{(1)} = (0, 1)$$

$$\lambda_2^{(1)} = rp_s \left(1 - \Pi - \frac{\alpha_{SD}}{\alpha_{DD}} \right) - a_{dif} \qquad \nu_2^{(1)} = \left(\frac{1 + p_s \left(1 - \Pi - \frac{\alpha_{SD}}{\alpha_{DD}} \right) - \frac{a_{dif}}{r}}{\frac{a_{dif}}{r} - \frac{\alpha_{DS}}{\alpha_{DD}}}, 1 \right)$$

Razonablemente el equilibrio diferenciado es estable sobre su propio eje. Esto puede verse en el hecho de que en la dirección del eje D tenemos $\lambda_1^{(1)} < 0$. De aquí que este equilibrio sea el máximo número permitido por la competición intraespecífica de las D , es decir, que corresponda a la capacidad de carga del sistema para las D como hemos mencionado previamente.

Para que el equilibrio diferenciado sea estable, necesitaremos que el segundo autovalor sea también negativo. En ausencia de terapia, esto significaba que la presencia de las D fuera más inhibitoria sobre las S que sobre las propias D . Esto puede verse igualando a_{dif} a cero en la expresión para el autovalor, o alternativamente, consultando la referencia [2]. En el caso con terapia, la situación es bastante similar, sólo que la incorporación de a_{dif} contribuye a la estabilidad a medida que este coeficiente aumenta. Esto nos indica algo que resulta de gran utilidad y que se verá en el análisis de casos experimentales: el hecho de que en casos en los que T_1 sea un punto silla, uno puede convertirlo en un atractor mediante el uso de la terapia o su intensificación. La ventaja de tal maniobra sería obtener una tumoresfera sin CMC cuyo número se mantiene estable en $1/\alpha_{DD}$ (suponiendo $\alpha_{DD} > 0$).

Este equilibrio será biológicamente razonable si $\alpha_{DD} > 0$. En los casos en los que $\alpha_{DD} < 0$, T_1 será no biológico (se ubicará en el semieje negativo D), las D cooperarán entre sí y esperaríamos que esta población crezca sin cota en el tiempo. Esto podría ser impedido por las S ; sin embargo, consideramos que en general estas tienen un efecto promotor sobre las D .

Coexistencias $T_{2,3}$

Este par de equilibrios corresponde a valores no nulos de ambas poblaciones. Sus expresiones explícitas son complicadas y en general su posición depende de a_{dif}/r (la eficiencia de la terapia por el tiempo característico del sistema). Por esto no podemos decir a priori si dichos equilibrios son biológicamente razonables. Si bien también se extrajeron expresiones explícitas para los autovalores, su complejidad no permite un análisis general, por lo que sólo encontrarán su utilidad al momento de analizar casos experimentales específicos.

3.2. Análisis teórico: teoremas extendidos

Aquí enunciamos y demostramos las extensiones para el modelo con terapia de los teoremas probados en [1] para el régimen sin terapia. Estos nos dicen cómo cambian las condiciones para la positividad y el crecimiento inicial al incorporar la terapia.

Teorema 3.1 Sean $S(t)$ y $D(t)$ soluciones del sistema (2.1) para las condiciones iniciales $S(0) = S_0 > 0$ y $D(0) = D_0 = 0$, tenemos que $S(t)$ mantiene la positividad $\forall t > 0$. Si además suponemos que $p_s < 1 \vee a_{dif} \neq 0$, entonces $\alpha_{DS} < \xi(S_{MAX})$ es condición suficiente para asegurar la positividad de $D(t)$, donde S_{MAX} es el máximo valor alcanzado por $S(t)$ y

$$\xi(S) = \frac{1}{S} \left[1 + \frac{a_{dif}}{r(p_a + 2p_d)} \right]$$

Demostración: Comencemos con la positividad de S . Supongamos que $S(t)$ se vuelve no positiva por primera vez en $t_1 > 0$. Tenemos entonces que $S(t_1) = 0 \wedge \dot{S}(t_1) < 0$, pero por (2.1a) tenemos que $S(t_1) = 0 \implies \dot{S}(t_1) = 0$, lo cual es un absurdo que proviene de suponer que $\exists t_1$ con las propiedades prescriptas. Notemos que este argumento vale independientemente del valor de D .

Para la positividad las D , notemos que pedir $(p_s \neq 1 \vee a_{dif} \neq 0) \wedge \alpha_{DS} < \xi(S_{MAX})$ es suficiente para asegurar crecimiento inicial. A tiempos cortos podemos despreciar los términos que involucran un factor D en la ecuación (2.1b), con lo que tenemos

$$\dot{D} \approx rS(p_a + 2p_d)(1 - \alpha_{DS}S) + a_{dif}S$$

podemos acotar inferiormente esta derivada reemplazando α_{DS} por $\xi(S_{MAX})$ (ya que probamos que $S > 0$ y que por hipótesis $\alpha_{DS} < \xi(S_{MAX})$), obteniendo

$$\dot{D} > S[r(p_a + 2p_d) + a_{dif}] \left(1 - \frac{S}{S_{MAX}} \right)$$

y esto último es siempre mayor a cero, con lo que tenemos crecimiento inicial en las D . Dado esto, $\exists t_2 > 0$ tal que $t \in (0, t_2) \implies D(t) > 0$. Supongamos además que t_2 es el menor tiempo positivo tal que $D = 0$ y que la no negatividad se perdería luego, es decir, $\dot{D}(t_2) < 0$, entonces usando (2.1b)

$$\begin{aligned} \dot{D}(t_2) &= [rD(t_2) + rS(p_a + 2p_d)](1 - \alpha_{DS}S - \alpha_{DD}D(t_2)) + a_{dif}S \\ &= [r(p_a + 2p_d)(1 - \alpha_{DS}S) + a_{dif}]S < 0 \end{aligned}$$

como $S > 0$ tenemos que esto implica que

$$r(p_a + 2p_d)(1 - \alpha_{DS}S) < -a_{dif} \implies \alpha_{DS} > \xi(S) > \xi(S_{MAX})$$

lo cual es un absurdo (que provino de suponer que $\exists t_2$ tal que D pierde su no-negatividad), por lo que $D(t) \geq 0, \forall t > 0$. ■

OBSERVACIONES:

1. Independientemente del valor de S_{MAX} , la positividad de D quedará asegurada si $\alpha_{DS} < 0$ ya que $\xi(S_{MAX}) > 0, \forall S_{MAX} > 0$. Uno esperaría que en general esta condición se cumpla pues esperamos que las CMC tengan un efecto promotor sobre las CCD. Esta condición es suficiente pero no necesaria, a menos que la población de CMC pueda crecer sin cota. En ese caso $\xi(S_{MAX}) \rightarrow 0$ y recuperamos la condición $\alpha_{DS} < 0$. Este comportamiento límite es razonable puesto que nos dice que, si la población S es siempre pequeña, podemos permitir cierta competición sobre las D . En contraste, si la población de S no está acotada, para tener positividad en las D necesitamos que no se ejerza competición sobre estas. Esto podría ser una inconveniencia del modelo, ya que al no contar con efectos espaciales, todas las células S pueden influenciar a todas las D . De todos modos, esto en principio no sería grave, ya que significa ignorar la aparición de clústeres de D en un mar de S .
2. a_{dif} contribuye a la positividad de $D(t)$. Esto se desprende del hecho de que $\xi(S)$ crece con a_{dif} , por lo que la cota $\alpha_{DS} < \xi(S_{MAX})$ es más fácil de cumplir a medida que aumentamos a_{dif} . La interpretación de esto es directa: como la positividad que está en juego es la de las D mientras que la de las S está asegurada, transferir células de S a D contribuye a la positividad general.

Teorema 3.2 *Supongamos que la evolución de un sistema está descrita por las ecuaciones (2.2), con las condiciones iniciales $X(\tau = 0) = X_0$ e $Y(\tau = 0) = Y_0$. Tenemos entonces que*

- a) *Si las condiciones iniciales (semilla) son tales que $|AX_0|, |CX_0|, |BY_0|, |Y_0| \ll 1 \wedge P \neq 1$, entonces inicialmente (a tiempos cortos)*

$$M < \frac{P}{1-P} \implies \frac{\partial|X|}{\partial\tau} > 0, \quad \frac{\partial|Y|}{\partial\tau} > 0$$

$$M > \frac{P}{1-P} \implies \frac{\partial|X|}{\partial\tau} < 0, \quad \frac{\partial|Y|}{\partial\tau} > 0$$

b) $X_0 = 0 \implies X(\tau) = 0, \forall \tau > 0$

c) $X_0 = 0, Y_0 > 0 \implies \lim_{\tau \rightarrow \infty} Y(\tau) = 1$

d) $X_0 = 0, Y_0 < 0 \implies \lim_{\tau \rightarrow T^-} Y(\tau) = -\infty$ con $T = -\ln\left(\frac{-Y_0}{1-Y_0}\right)$

e) $Y_0 < 0, C > 0$ (o equivalentemente $\alpha_{DS} < 0$) $\implies Y(\tau)$ decrece sin cota.

Demostración:

a) Bajo estas hipótesis, puede usarse una linealización del sistema de ecuaciones. La ecuación resultante para X es exactamente soluble, obteniéndose de la misma que

$$X(\tau) = X_0 \exp\{[P - M(1 - P)]\tau\}$$

Notando que por definición $P \in [-1, 1]$ y que por hipótesis $P \neq 1$ (o equivalentemente $p_s < 1$), tenemos que el argumento de la exponencial es positivo si $M < P/(1 - P)$. Como $\text{sgn}(X(\tau)) = \text{sgn}(X_0)$, tenemos que si el argumento de la exponencial es positivo $\partial_\tau |X| > 0$.

Resolviendo la ecuación linealizada para Y , obtenemos que

$$Y(\tau) = e^\tau \left[Y_0 + \frac{X_0}{1 - P} \left(1 - e^{(M+1)(1-P)\tau} \right) \right]$$

Sustituyendo para obtener $Y(X)$ y luego derivando respecto a X , obtenemos una ecuación para la trayectoria en el plano (X, Y) :

$$\frac{\partial Y}{\partial X} = \frac{1}{1 - (M + 1)(1 - P)} \left[\frac{X(\tau)}{X_0} \right]^{\frac{M+1}{1-P-M}} \left(\frac{Y_0}{X_0} + \frac{1}{1 - P} \right) - \frac{1}{1 - P}$$

Definiendo

$$\beta = \left[\frac{X(\tau)}{X_0} \right]^{\frac{M+1}{1-P-M}} \quad \text{y} \quad \gamma = 1 - (M + 1)(1 - P)$$

tenemos que, por definición, $\gamma < 1$. Si, además

$$\gamma > 0 \implies M < \frac{P}{1 - P} \implies \frac{X(\tau)}{X_0} > 1 \implies \beta > 1 \implies \frac{\beta}{\gamma} > 1$$

Como, además, $\text{sgn}(Y_0) = \text{sgn}(X_0)$ y tenemos que

$$\frac{\partial Y}{\partial X} = \frac{\beta}{\gamma} \frac{Y_0}{X_0} + \frac{1}{1 - P} \left(\frac{\beta}{\gamma} - 1 \right)$$

podemos finalmente afirmar que

$$M < \frac{P}{1 - P} \implies \frac{\partial Y}{\partial X} > 0$$

Por otro lado, si

$$M > \frac{P}{1 - P} \implies \gamma < 0 \implies \frac{\partial Y}{\partial X} < 0$$

Usando la regla de la cadena tenemos que

$$\frac{\partial Y}{\partial \tau} = \frac{\partial Y}{\partial X} \frac{\partial X}{\partial \tau}$$

Esta relación junto a lo anterior nos permite saber el signo de la derivada temporal de Y si sabemos el de la de X . De esto y de lo dicho al comienzo sobre que $M < P/(1 - P) \implies \partial_\tau |X| > 0$ se sigue este inciso del teorema.

- b) Se sigue de notar que el origen es un equilibrio del sistema.
- c) Si $X_0 = 0$, usando el inciso anterior tenemos que la ecuación para Y queda $\dot{Y} = Y(1 - Y)$, que para valores positivos de Y tiene un único equilibrio estable en $Y = 1$.
- d) Si $X_0 = 0 \implies X(\tau) = 0, \forall \tau > 0$, con lo que la ecuación para Y queda $\dot{Y} = Y(1 - Y)$, i. e. una parábola con raíces $Y_1 = 0$ e $Y_2 = 1$. De este modo partiendo de $Y_0 < 0$ evolucionamos hacia valores más negativos, cada vez más rápido pues $|\dot{Y}|$ aumenta a medida que Y decrece, con lo que la solución decrece sin cota. Sin embargo, la solución diverge a tiempo finito, más específicamente a

$$T = -\ln\left(\frac{-Y_0}{1 - Y_0}\right)$$

Esto puede verificarse mediante la solución exacta de la ecuación para Y . Notando que se trata de una ecuación diferencial ordinaria de Bernoulli, la solución exacta es la curva logística de capacidad de carga unidad

$$Y(\tau) = \frac{1}{1 + \frac{1 - Y_0}{Y_0} e^{-\tau}} \xrightarrow{\tau \rightarrow T^-} -\infty$$

- e) En este caso la ecuación (2.2b) queda

$$\begin{aligned} \dot{Y} &= (X + Y)(1 - CX - Y) + MX \\ &= -Y^2 + (1 - CX - X)Y + X(1 - XC + M) =: -Y^2 + \hat{b}Y + \hat{c} \end{aligned}$$

donde $\hat{c} < 0$ debido a que por definición $M > 0$, por hipótesis $C > 0$ e $Y_0 < 0 \implies X_0 < 0 \implies X(\tau) < 0 \forall \tau > 0$, puesto que asegurada la positividad de las S por el teorema 3.1. Si bien aquí $D_0 \neq 0$, como se señaló en la demostración, la positividad de S vale independientemente del valor de D . Por definición, tenemos que $\text{sgn}(X) = \text{sgn}(\alpha_{DD})$ (independiente de τ). Con esto, $CX < 0 \implies (1 - XC) > 0 \implies X(1 - XC) = \hat{c} < 0$. Utilizando las propiedades del producto y la suma de las raíces de una parábola, tenemos que

$$\begin{aligned} Y_1 Y_2 &= \frac{\hat{c}}{-1} \quad \text{y como } \hat{c} < 0 \\ &\implies \text{sgn}(Y_1) = \text{sgn}(Y_2) \end{aligned}$$

Además

$$Y_1 + Y_2 = \frac{-\hat{b}}{-1} = \hat{b} > 0 \implies Y_1, Y_2 > 0$$

Por lo que para $Y < 0$ tenemos que $\dot{Y} < 0$ y $|\dot{Y}|$ aumenta a medida que Y decrece, repitiendo el comportamiento cualitativo del inciso anterior.

■

OBSERVACIONES:

1. Este teorema está formulado de manera tal que sea también aplicable a casos donde $\alpha_{DD} < 0$, para los que el crecimiento en el plano de fases del sistema adimensional se da en el tercer cuadrante en lugar de en el primero.
2. Dimensionalmente, el valor de quiebre para el crecimiento inicial está dado por $a_{dif} = r(p_s - p_d)$. En ausencia de tratamiento, basta que $p_s < p_d$ para que las CMC no prosperen (condición que es independiente de r). Al aplicar el tratamiento, hará falta $p_s > p_d + a_{dif}/r$ para que haya crecimiento de la fracción de S . Es decir, las células madre necesitan un mayor p_s para crecer. Algo notable, es que la condición depende ahora de r , siendo mayor el efecto supresor de a_{dif} cuando r es pequeño. Esto es esperable, ya que r define la escala temporal del crecimiento, con lo cual comparamos para decir que una tasa dada es grande o pequeña. Más aun, si $a_{dif}/r > 1$, no hay crecimiento de células madre para ningún p_s . Este valor será adecuado para tiempos cortos cuando las interacciones sean realmente despreciables o para semillas pequeñas. Si bien estas situaciones pueden parecer poco interesantes, debido a que uno espera que la terapia comience un tiempo más tarde que el crecimiento, hay al menos dos casos donde resultan relevantes. El primero de ellos, es que la terapia podría estar aplicándose durante la generación de un tumor secundario (metástasis), cuyo disparador posiblemente sea una CMC depositada sobre tejido sano. En este caso, el crecimiento podría ser fácilmente contenido si $a_{dif} > r$. El segundo caso se da cuando, luego de una terapia convencional, sobrevive sólo un pequeño número de CMC. En esta situación, la terapia podría frustrar el recrecimiento del cáncer.
3. La formulación de este teorema en términos del sistema adimensional no es accidental. Una semilla $(S_0, D_0) = (1, 0)$ no es necesariamente pequeña, ya que por la adimensionalización del sistema la comparación se hace con la capacidad de carga del sistema para las CCD. Si dicha capacidad de carga $K_D = 1/\alpha_{DD}$ es grande comparada a la población inicial, la semilla será pequeña, pero si α_{DD} es grande probablemente no se pueda iniciar con una semilla suficientemente pequeña en ningún caso.
4. En el inciso d del Teorema 3.2, la solución pierde la continuidad en T , logrando converger a la capacidad de carga desde $+\infty$. Por supuesto, esto carece de sentido físico. En un experimento real, una vez que se alcance una población de gran tamaño probablemente los efectos de la competencia se vean intensificados, cambiando el valor de α_{DD} . En particular, este podría dejar de ser negativo, lo que implica que Y también perdería su negatividad. Lo que debería interpretarse de este inciso, es que bajo las suposiciones realizadas el sistema incrementa su tamaño de manera descontrolada.

3.3. Análisis numérico de casos experimentales

En esta sección, utilizamos los valores de los parámetros ajustados en [1, 3] para distintos experimentos con tumoresferas (transcriptos en la Tabla 3.1) y analizamos la

dinámica en función de a_{dif} . Se reporta sólo la dinámica biológicamente relevante. Comenzamos analizando el comportamiento que resulta de utilizar los parámetros para el experimento de Chen [18], continuamos por los casos de sustrato rígido de Wang [19] y el caso de Helmlinger [12], y finalizamos con el caso Control de Wang [19].

Constante	Chen	Hard (Wang)	Soft (Wang)	Control (Wang)	Helmlinger
r [1/días]	1,32	0,1335	0,0685	0,0240	0,89
p_s	0,36	0,7124	0,9701	0,1646	0,24
p_d	0,160	0,0000	0,0019	0,3911	0,22
α_{SS}	0,0519	-0,0456	0,0873	0,0028	0,0202
α_{SD}	-0,032816	-0,5280	-0,4185	0,0266	0,000060
α_{DS}	-0,0175	-0,1376	-0,2061	-1,0683	0,4007
α_{DD}	0,020616	1,8329	0,3668	-0,3087	0,000066

Tabla 3.1: Valores de ajuste de los parámetros para distintos casos experimentales.

Para los distintos casos hay valores particulares de la eficiencia de la terapia que separan comportamientos cualitativamente distintos (por ejemplo, algún equilibrio pasa de un cuadrante a otro o cambia su estabilidad). Estos se muestran en la Tabla 3.2 y algunos serán referidos durante el análisis de los casos. Más allá de los valores particulares, es suficiente con percatarse de que la notación indica el caso como subíndice, mientras que el supraíndice los numera en orden (de menor a mayor). Los valores reportados son aproximados, pero han sido calculados con mayor precisión.

Chen	Hard (Wang)	Soft (Wang)	Control (Wang)	Helmlinger
$a_{Ch}^{(1)} = 0,2640$	$a_H^{(0)} = 0,0349$	$a_S^{(1)} = 0,0663$	$a_C^{(1)} = 0,0026$	$a_{He}^{(1)} = 0,006946$
$a_{Ch}^{(2)} = 0,5392$	$a_H^{(1)} = 0,0951$	$a_S^{(2)} = 0,0768$	-	$a_{He}^{(2)} = 0,007011$
$a_{Ch}^{(3)} = 0,9081$	$a_H^{(2)} = 0,1032$	$a_S^{(3)} = 0,1048$	-	$a_{He}^{(3)} = 0,007031$
$a_{Ch}^{(4)} = 0,9834$	$a_H^{(3)} = 0,1089$	$a_S^{(4)} = 0,1321$	-	$a_{He}^{(4)} = 0,007056$
$a_{Ch}^{(5)} = 1,0204$	$a_H^{(4)} = 0,1145$	$a_S^{(5)} = 0,1421$	-	$a_{He}^{(5)} = 0,007062$
$a_{Ch}^{(6)} = 1,0206$	$a_H^{(5)} = 0,1225$	-	-	$a_{He}^{(6)} = 0,007140$
$a_{Ch}^{(7)} = 1,0324$	-	-	-	$a_{He}^{(7)} = 0,007592$
$a_{Ch}^{(8)} = 2,5804$	-	-	-	$a_{He}^{(8)} = 0,017800$
$a_{Ch}^{(9)} = 4,8729$	-	-	-	-
$a_{Ch}^{(10)} = 6,1003$	-	-	-	-

Tabla 3.2: Valores particulares de la eficiencia donde se dan cambios de comportamiento.

3.3.1. Chen

Para este caso, T_0 puede ser un repulsor o una silla dependiendo de si el valor de a_{dif} es menor o mayor que $a_{Ch}^{(1)}$. Recordemos que los valores de los puntos especiales $a_{Ch}^{(i)}$

están ordenados, es decir que $i < j \implies a_{Ch}^{(i)} < a_{Ch}^{(j)}$. Tenemos que $T_1 \approx (0; 48,5)$ será una silla si $a_{dif} < a_{Ch}^{(5)}$, de lo contrario será un atractor. T_2 es un atractor en el primer cuadrante en el rango en el que existe (para $a_{dif} > a_{Ch}^{(6)}$ los equilibrios $T_{2,3}$ se vuelven complejos conjugados). T_3 parte en el cuarto cuadrante para $a_{dif} = 0$, luego para $a_{Ch}^{(1)}$ entra al segundo cuadrante por el origen (donde ocurre una bifurcación transcítica con su correspondiente intercambio de estabilidad). En $a_{Ch}^{(5)}$, T_3 entra al primer cuadrante por T_1 , donde nuevamente tiene lugar una bifurcación transcítica. El comportamiento biológicamente relevante puede resumirse en dos regímenes con dos subregímenes cada uno, como se especifica en la Tabla 3.3.

Régimen	Rango	T_0	T_1	T_2	T_3
1-A	$[0, a_{Ch}^{(1)})$	Repulsor	Silla	Atractor	No biológico
1-B	$(a_{Ch}^{(1)}, a_{Ch}^{(5)})$	Silla	Silla	Atractor	No biológico
2-A	$(a_{Ch}^{(5)}, a_{Ch}^{(6)})$	Silla	Atractor	Atractor	silla
2-B	$(a_{Ch}^{(6)}, \infty)$	Silla	Atractor	No biológico	No biológico

Tabla 3.3: Resumen del comportamiento cualitativo del sistema según el valor de a_{dif} bajo los parámetros de Chen.

En el régimen 1 cualquier condición inicial tiende a una coexistencia que achica su tamaño a medida que uno aumenta a_{dif} , comenzando en $T_2(a_{dif} = 0) \approx (89,3; 124,3)$, hasta $T_2(a_{dif} = a_{Ch}^{(5)}) \approx (1,12; 50,28)$. Esto puede observarse en la Fig. 3.1(a). La única diferencia entre los subregímenes A y B del régimen 1, es el cambio de estabilidad del origen debido a una bifurcación transcítica que tiene lugar cuando T_3 pasa por T_0 para $a_{dif} = a_{Ch}^{(1)}$. Esto no produce cambios significativos en la dinámica.

Grosso modo, uno podría decir que en el segundo régimen a_{dif} ha aumentado de modo que la población estable esté compuesta por CCD. Esto no es enteramente así, ya que en el subrégimen 2-A tanto T_2 como T_1 son atractores y es la variedad estable de T_3 la que marca la división entre sus cuencas de atracción. A pesar de esto, la simplificación es razonable dada la proximidad de T_2 a T_1 en este subrégimen (aquí el número de CMC en T_2 es menor a 1,12, ver Fig. 3.1(b)). En el subrégimen 2-B ambas coexistencias desaparecen y todas las condiciones iniciales del primer cuadrante son atraídas hacia T_1 .

El comportamiento mencionado es esperable, ya que el sistema presenta competición intraespecífica y cooperación interespecífica, por lo que esperamos que tienda a la coexistencia. Al aumentar la terapia, disminuimos el número de CMC con lo que la asistencia sobre las CCD cae, provocando una disminución en el tamaño total de la tumoresfera. Cuando a_{dif} supera el umbral $a_{Ch}^{(6)}$ la diferenciación es demasiado fuerte como para que la coexistencia se sostenga, por lo que el único equilibrio estable pasa a ser T_1 . Es interesante notar que el número de CCD en T_1 es menor que en T_2 para cualquier $a_{dif} < a_{Ch}^{(6)}$. La cooperación de las CMC les permite a las CCD alcanzar una población mayor a la capacidad de carga. De este modo, el efecto de la terapia es reducir el tamaño de la tumoresfera, eliminando la población de CMC si la eficiencia de la terapia es lo suficientemente grande. El momento de inicio de la terapia no tiene un rol particularmente relevante aquí, la importancia parece residir en la eficiencia de la terapia.

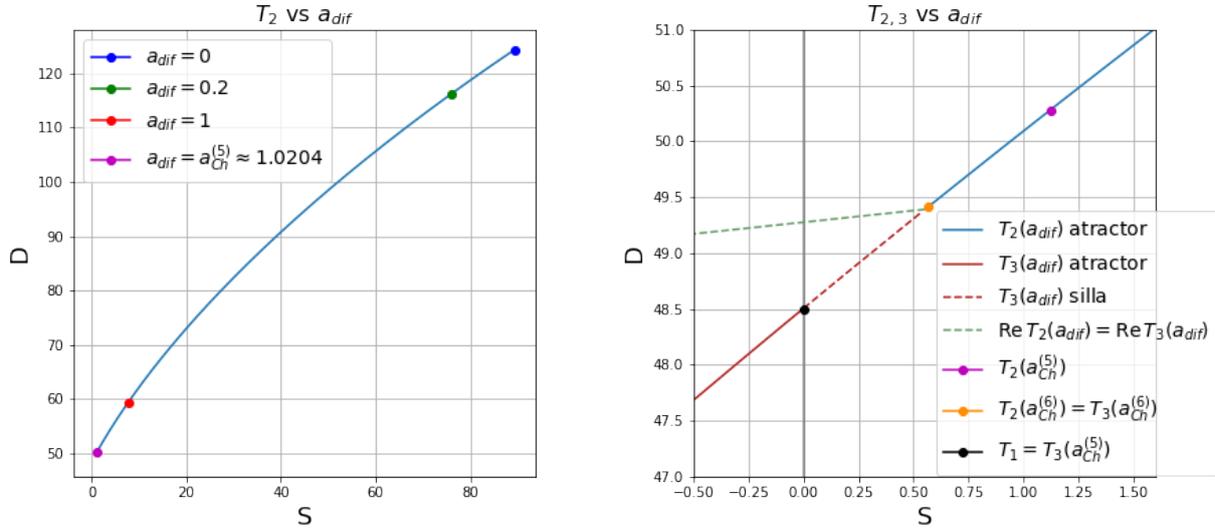
(a) Coexistencia $T_2(a_{dif})$ en el régimen 1.(b) Coexistencias $T_{2,3}(a_{dif})$ en régimen 2.

Figura 3.1: Posición de los equilibrios en función de a_{dif} . En la subfigura 3.1(a) puede verse la curva $T_2(a_{dif})$ en el régimen 1 en el que toda condición inicial tiende a este equilibrio, que reduce su tamaño a medida que a_{dif} aumenta. En la subfigura 3.1(b), pueden verse las coexistencias $T_{2,3}$ en: el final del régimen 1-B, donde T_2 y T_3 son atractores en el primer y segundo cuadrante respectivamente; el régimen 2-A, donde T_3 pasa a ser una silla en el primer cuadrante; la primera parte del régimen 2-B, que comienza cuando T_2 y T_3 se igualan para $a_{Ch}^{(6)}$, eficiencia a partir de la cual ambas coexistencias se vuelven complejas conjugadas (cuya parte real se muestra como línea de trazos verde).

Este caso se toma como referencia del comportamiento esperado, principalmente por tres razones:

1. Se cultiva en suspensión libre, por lo cual el sistema crece en ausencia de tensiones externas.
2. El cultivo no tiene agregados (como podrían ser los factores de crecimiento en Wang).
3. Como se explica en [18], el arreglo experimental usado son chips de cultivo que permiten evitar falencias típicas del cultivo de tumoresferas, en particular proveen una aislación robusta de una única célula.

La comparación de este con otros casos nos permitirá establecer relaciones entre cambios en las condiciones de cultivo y cambios en la dinámica resultante.

3.3.2. Sustrato rígido (*Hard*), Wang

En este caso nuevamente T_0 puede ser un repulsor o un punto silla si a_{dif} es menor o mayor que $a_H^{(1)}$ respectivamente (bifurcación transcítica con T_3). El equilibrio diferenciado

ahora consta de menos de una CCD, $T_1 \approx (0; 0,5)$, por lo que las CCD no pueden sobrevivir sin la asistencia de las CMC. Este será un punto silla si $a_{dif} < a_H^{(5)}$ y un atractor si $a_{dif} > a_H^{(5)}$. El cambio de estabilidad se debe al intercambio de estabilidades con T_3 cuando este entra al primer cuadrante por T_1 (bifurcación transcítica). T_2 no tiene relevancia biológica para ningún valor de a_{dif} . Las posiciones de T_2 y T_3 en función de a_{dif} pueden verse en la Fig. 3.2. Resumimos el comportamiento biológicamente relevante en la Tabla 3.4.

Régimen	Rango	T_0	T_1	T_2	T_3
1-A	$[0, a_H^{(1)})$	Repulsor	Silla	No biológico	No biológico
1-B	$(a_H^{(1)}, a_H^{(5)})$	Silla	Silla	No biológico	No biológico
2	$(a_H^{(5)}, \infty)$	Silla	Atractor	No biológico	Silla

Tabla 3.4: Resumen del comportamiento cualitativo del sistema según el valor de a_{dif} bajo los parámetros para sustrato rígido de Wang.

En el régimen 1, tenemos que todas las condiciones del primer cuadrante divergen. En el régimen 2, el primer cuadrante queda dividido por la variedad estable de T_3 en la cuenca de atracción de T_1 y la región fuera de esta donde las condiciones divergen. Ambos comportamientos son ejemplificados en la Fig. 3.3.

El efecto de aumentar a_{dif} es el de alejar a T_3 del origen. Al alejarse T_3 , también su variedad estable se mueve hacia valores mayores de S , aumentando la cuenca de atracción de T_1 . De este modo, a_{dif} controla qué condiciones terminan en T_1 y qué condiciones están destinadas a divergir. Más específicamente, podríamos decir que, dada una condición inicial, existe un valor de umbral a_{dif}^{min} tal que, a partir de este valor, dicha condición inicial converge a T_1 . Si por el contrario la eficiencia es menor a este valor, la solución diverge. Este valor de umbral a_{dif}^{min} corresponde a la eficiencia para la cual la condición inicial pertenece a la variedad estable de T_3 . Una manera de obtener este valor es graficar las poblaciones finales a tiempos grandes en función de a_{dif} para cierta condición inicial. Esto puede verse para $(S_0, D_0) = (1, 0)$ en la Fig. 3.4, donde se muestra cómo el umbral se va definiendo a medida que aumentamos el tiempo final t_f .

Para mayor claridad, mostramos en el espacio de fases los primeros 23 días de evolución para la condición inicial $(S_0, D_0) = (1, 0)$, para distintos valores de a_{dif} . Esto puede verse en la Fig. 3.5. Para esta condición inicial, a_{dif}^{min} es apenas menor a 0,15 como se mostró en la Fig 3.4. Por esto, la curva naranja correspondiente a 0,15 logra converger a T_1 , pero es una buena referencia de la división. Las curvas con un a_{dif} mayor evolucionan hacia T_1 , mientras que las de un a_{dif} menor divergen.

Si uno hubiese intentado utilizar el Teorema 3.2 para calcular una aproximación del umbral, se habría encontrado con que esta no es muy buena. Para este caso $r(p_s - p_d) = 0,095$, mientras que, como podemos observar en la Fig. 3.5, el valor de umbral se encuentra entre 0,10 y 0,15. El problema con intentar usar el teorema aquí es el que habíamos anticipado en una de las observaciones posteriores al teorema. Como α_{DD} es grande, una única CMC no representa una semilla pequeña. Para este caso, $S_0 = 1 \implies X_0 \approx 0,527$ que es comparable a 1 (la capacidad de carga es $K_D \approx 0,55$).

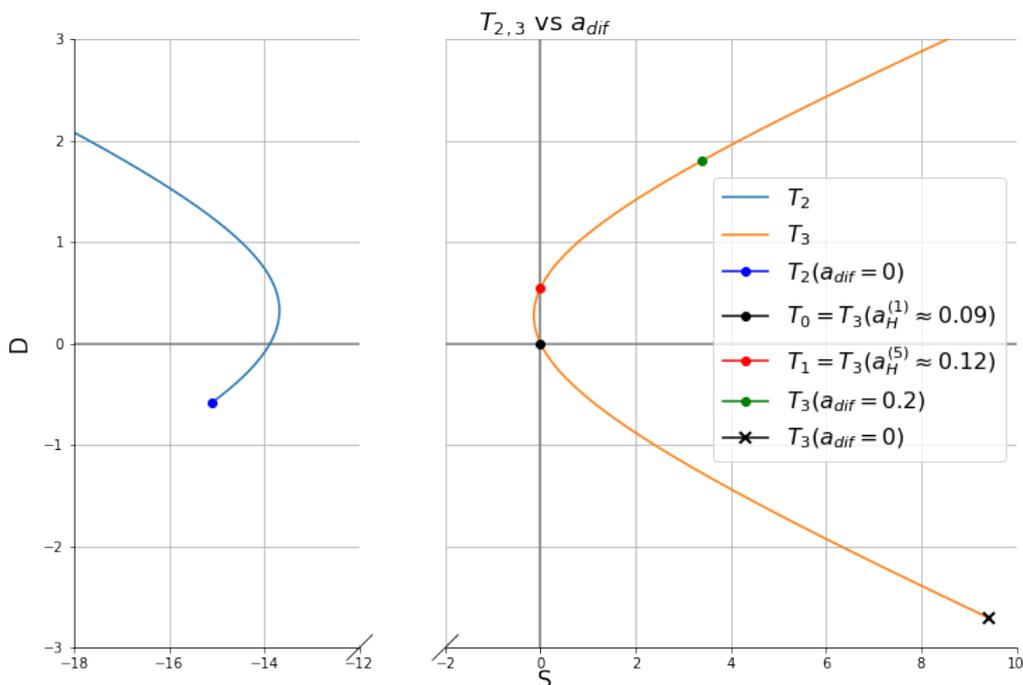


Figura 3.2: Posiciones de las coexistencias en función de a_{dif} . Se muestran el espacio de fases, el origen en negro, T_1 en rojo, y las curvas azul y naranja como las posiciones de T_2 y T_3 en función de a_{dif} , respectivamente. T_2 es siempre no biológico y T_3 se vuelve biológico para eficiencias mayores a $a_H^{(5)}$. Se muestra en verde la posición de T_3 para $a_{dif} = 0,2$ usado a modo de ejemplo posteriormente.

Algo que vale la pena notar, es que, aun en los casos que divergen, la terapia logra retardar la evolución. Esto es así porque a medida que a_{dif} disminuye, las poblaciones a un mismo tiempo aumentan. Para nuestro ejemplo esto puede verse en la miniatura de la Fig. 3.5. Hay que recordar que todas las curvas corresponden a un tiempo total de evolución de 23 días. Esto es razonable considerando que las CCD compiten fuertemente entre sí (α_{DD} es positivo y grande, dando una capacidad de carga menor a una célula), mientras que las CMC cooperan entre sí y asisten a las CCD en mayor medida de lo que son asistidas por estas.

Una posible preocupación respecto a lo anterior podría ser el hecho de que comenzar la terapia a la vez que comienza la evolución es una suposición bastante artificial. En general uno pensaría que la evolución se da desde $t_0 = 0$ en ausencia de terapia y que la terapia comienza, digamos, en un tiempo $t_T > 0$. Si consideramos que $a_{dif}(t) = \theta(t - t_T)\tilde{a}$ donde $\theta(t)$ es la función escalón de Heaviside, tenemos dos grandes posibilidades. La primera es que, si $\tilde{a} < a_H^{(5)}$, toda la evolución tanto en ausencia de terapia como una vez comenzada la misma se da en el régimen 1, por lo que el sistema diverge. La segunda posibilidad es que $\tilde{a} > a_H^{(5)}$, caso en el que al comenzar la terapia cambiamos del régimen 1 al régimen 2.

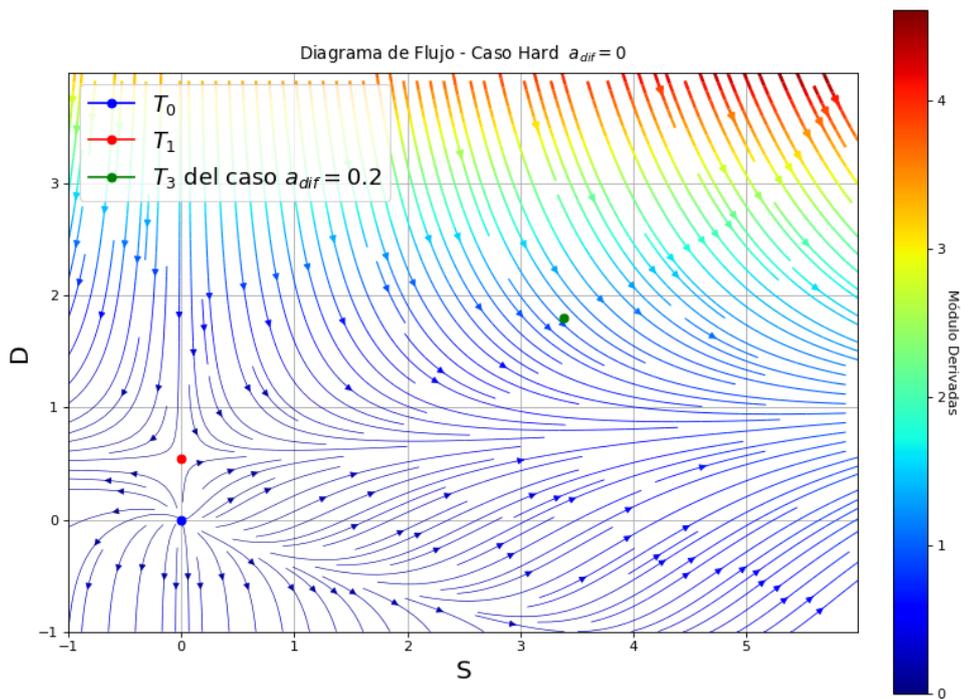
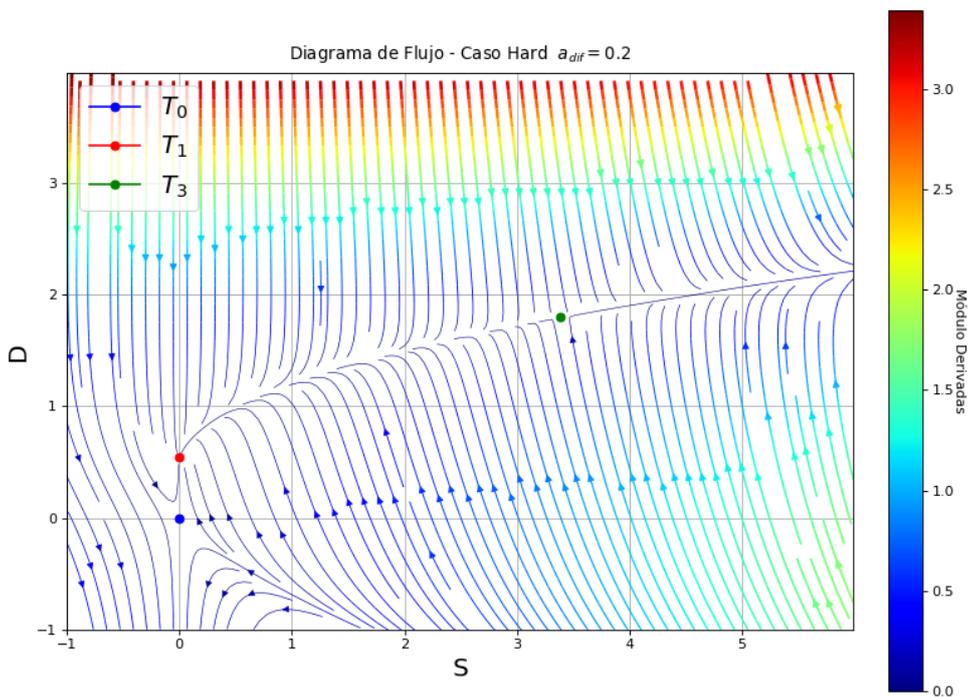
(a) Diagrama de fases para $a_{dif} = 0$ (régimen 1-A).(b) Diagrama de fases para $a_{dif} = 0,2$ (régimen 2).

Figura 3.3: *Diagramas de Fase, Sustrato Rígido (Wang)*. Se muestra un ejemplo del diagrama de fases de cada régimen. Pueden verse las líneas de flujo bajo una escala de colores que indica la velocidad del flujo en esa región (dada por el módulo de la derivada en unidades de 1/día). Se indican también el origen T_0 y el equilibrio diferenciado T_1 . En ambas imágenes se ha graficado T_3 para el caso del panel 3.3(b) a fines comparativos.

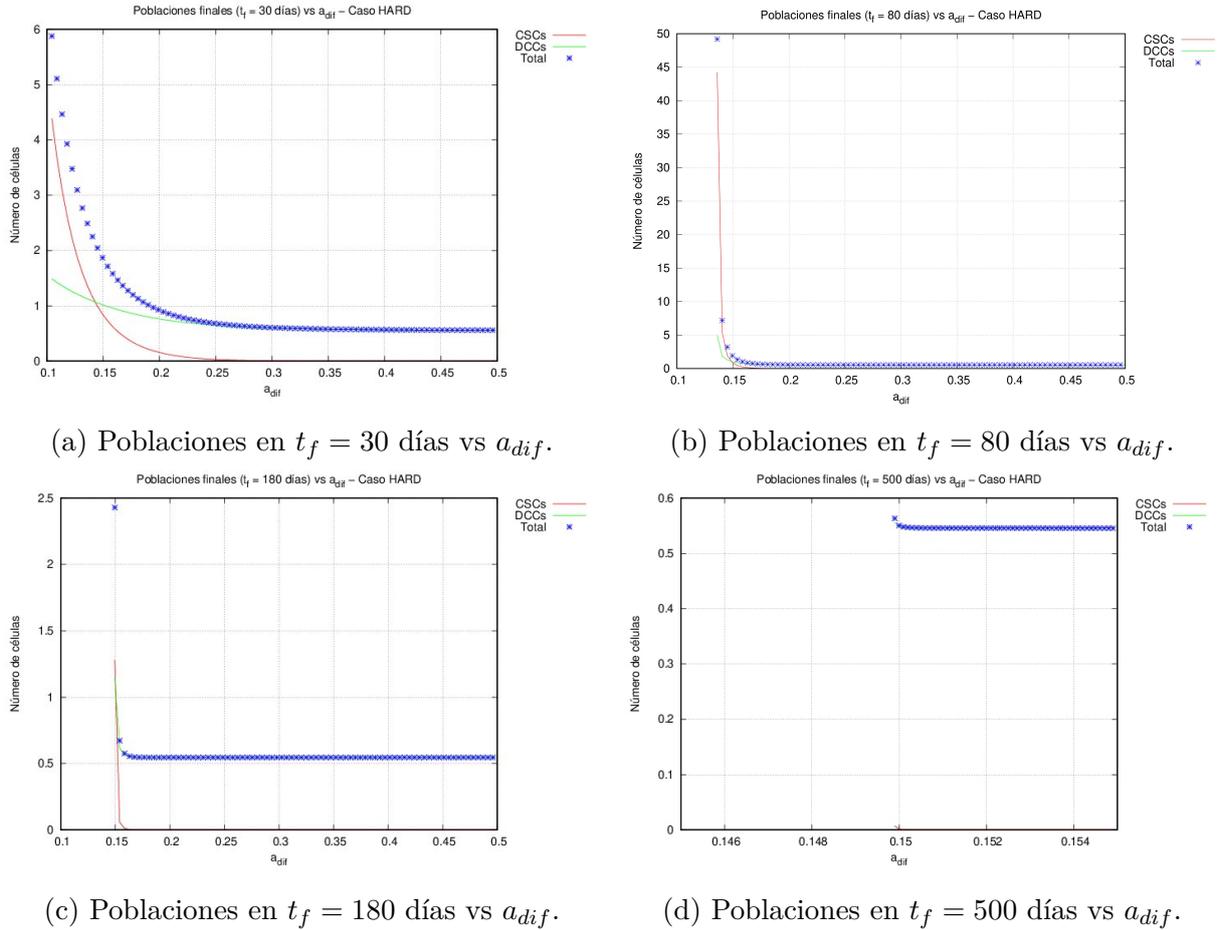


Figura 3.4: *Formación del escalón para la obtención del umbral a_{dif}^{min} .* Se muestran las poblaciones en t_f en función de a_{dif} para la condición inicial $(S_0, D_0) = (1, 0)$. A medida que t_f aumenta, las poblaciones están más evolucionadas y se define mejor el escalón que nos da el umbral a_{dif}^{min} . En la subimagen 3.4(d) puede verse que a_{dif}^{min} es apenas menor a 0,15, los valores de las poblaciones para eficiencias menores no llegan a verse por ser muchos órdenes de magnitud mayores.

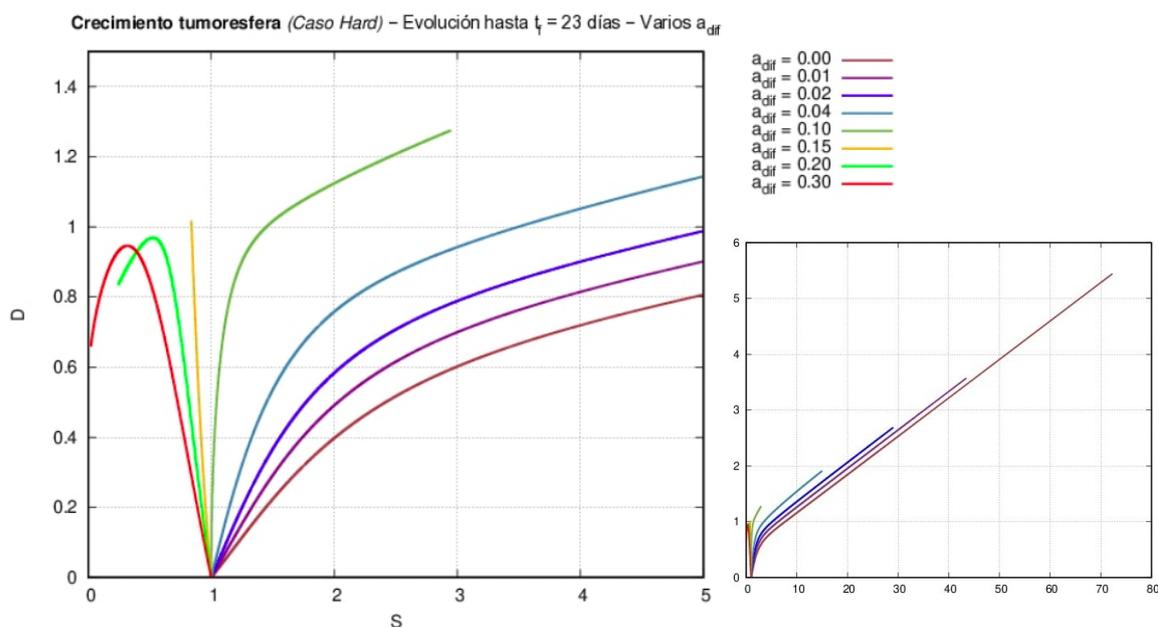


Figura 3.5: Ejemplificación del umbral a_{dif}^{min} para una condición inicial dada. Trayectorias en el espacio de fases de los primeros 23 días de evolución a partir de una única CMC para distintas eficiencias de la terapia. Para eficiencias mayores a $a_{dif}^{min} \approx 0,15$ se converge a T_1 , mientras que para eficiencias menores que este valor las curvas divergen con un crecimiento más rápido mientras menor es a_{dif} .

En este caso el sistema crecerá sin cota si en el tiempo t_T logró escapar de la que será la cuenca de atracción de T_1 para \tilde{a} . Si en el tiempo que evoluciona sin terapia (régimen 1) su crecimiento no fue suficiente para estar a la derecha de la variedad estable de $T_3(\tilde{a})$, al comenzar la terapia el sistema se encontrará en la cuenca de T_1 y evolucionará hacia este.

Nuevamente, dada una condición inicial y un \tilde{a} suficientemente grande, existirá un valor de umbral t_T^{Max} tal que si $t_T > t_T^{Max}$ el tamaño del sistema diverge, mientras que si $t_T < t_T^{Max}$ converge a T_1 . Este valor está dado por el tiempo en el que el sistema alcanza la variedad estable de $T_3(\tilde{a})$ evolucionando sin terapia desde la condición inicial. Notemos que si \tilde{a} no es lo suficientemente grande como para que la condición inicial se encuentre a la izquierda de la variedad estable de $T_3(\tilde{a})$, el sistema crece sin cota sin importar t_T (y por lo tanto no se puede hablar de ningún umbral).

A modo de ejemplo, analizamos el caso $(S_0, D_0) = (1, 0)$ con $\tilde{a} = 0,2$. Para hallar el umbral graficamos las poblaciones en un tiempo t_f en función de t_T . Esto puede verse en la Fig. 3.6. Para tiempos largos este gráfico converge al escalón con el quiebre en t_T^{Max} ; antes del quiebre las poblaciones convergen a T_1 y luego del quiebre divergen.

Para mayor claridad, simulamos la evolución del sistema para $t_T = 5$ días $< t_T^{Max} \approx 10$ días, que representa un inicio temprano de la terapia, y para $t_T = 12$ días $> t_T^{Max} \approx 10$ días, que representa un inicio tardío de la terapia. Las poblaciones en función del tiempo pueden verse en la Fig. 3.7.

De lo anterior, uno nota rápidamente que, dada una condición inicial, existe una curva

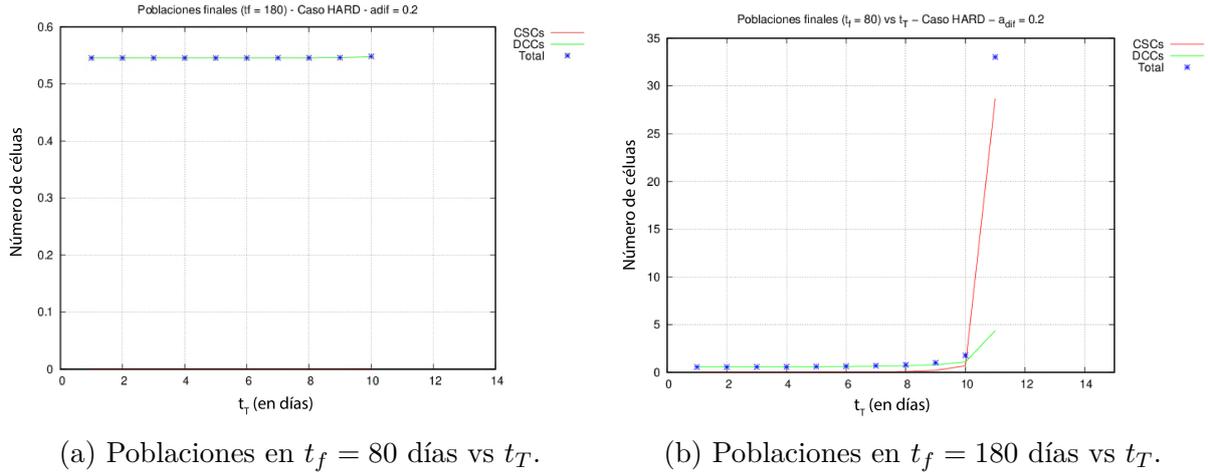


Figura 3.6: *Formación del escalón para la obtención del umbral a_{dif}^{min} .* Se muestran las poblaciones en t_f en función de a_{dif} para la condición inicial $(S_0, D_0) = (1, 0)$. A medida que t_f aumenta, las poblaciones están más evolucionadas y se define mejor el escalón que nos da el umbral t_T^{Max} . En la subimagen 3.6(b) puede verse que $t_T^{Max} \approx 10$ días, los valores de las poblaciones para t_T mayores no llegan a verse por ser mucho más grandes. Los valores para t_T menores convergen a $T_1 \approx (0; 0,5)$.

$t_T^{Max}(a_{dif})$ que separa los valores de eficiencia de la terapia y su tiempo de inicio que hacen que la solución diverja, de los que hacen que converja a T_1 . Esta curva puede obtenerse encontrando los valores de t_T^{Max} , como se ha indicado previamente, para distintos valores de la eficiencia. Para este caso y utilizando una única CMC como condición inicial, la curva es la expuesta en la Fig. 3.8(a), donde el espacio de los parámetros queda dividido por esta entre los que dan lugar a soluciones divergentes y los que dan lugar a soluciones que convergen a T_1 . Razonablemente, al aumentar la eficiencia de la terapia, uno puede demorar su comienzo. Por otro lado, el corte de la curva con el eje horizontal corresponde al valor a_{dif}^{min} discutido previamente y refleja el hecho de que existe una eficiencia mínima absoluta necesaria para la terapia, dada una condición inicial. Vale la pena recordar que, para toda condición inicial, este valor será mayor que el valor necesario para entrar en el régimen 2, a saber $a_H^{(5)}$.

Cuando comparamos con Chen, parece ser que el efecto de los agentes agregados EFG y b-FGF es el de remover T_2 del primer cuadrante, es decir que rompen el equilibrio de coexistencia. La coexistencia T_3 tiene un comportamiento cualitativamente similar en Chen y en *Hard*, sólo que en *Hard* no desaparece del primer cuadrante porque no puede encontrarse con T_2 .

Uno podría pensar que esta diferencia se debe a la rigidez del sustrato, pero el comportamiento cualitativo para los parámetros del sustrato blando (*Soft*) es exactamente el mismo que para *Hard*, a excepción de la ubicación de T_2 que no tiene relevancia biológica alguna. Sería interesante realizar experimentos en los que se agreguen estos agentes junto a algún agente diferenciante como el ATRA, con el fin de ver si los primeros refuerzan la competencia de las CCD a la vez que el agente diferenciante limita el número de CMC. Otra posibilidad es que los efectos sencillamente se cancelen, pero más información es

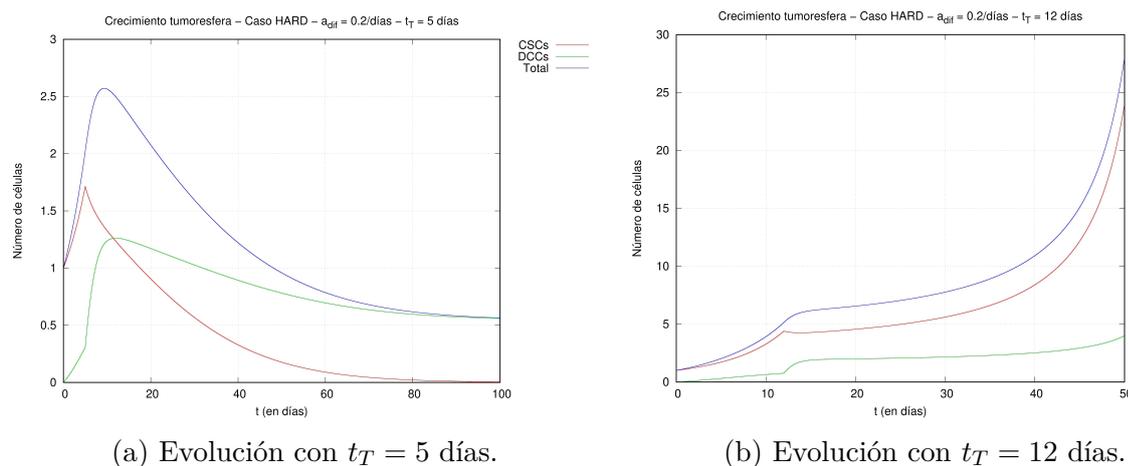


Figura 3.7: *Evolución con inicio de terapia temprano vs inicio tardío*. Se muestran las poblaciones en función del tiempo para la condición inicial $(S_0, D_0) = (1, 0)$. La terapia aplicada tiene una intensidad $\tilde{a} = 0,2$ y comienza en $t_T = 5$ días para la subfigura 3.7(a) y en $t_T = 12$ días para la subfigura 3.7(b). La primera comienza antes del umbral, por lo que el sistema converge al equilibrio diferenciado, mientras que en el caso de la segunda la terapia comienza luego del umbral, por lo que la terapia sólo retrasa el crecimiento, pero no logra acotarlo. Para las curvas de las poblaciones puede verse un quiebre en el momento de inicio de la terapia. Sin embargo, este quiebre no se ve para el total, ya que la terapia sólo transfiere células de una subespecie a la otra sin alterar la suma.

necesaria para discernir entre estas dos posibilidades.

En cualquier caso, una lectura posible es que, en el caso de Chen, donde las tumoresferas crecen en suspensión y sin factores agregados, el crecimiento alcanza un valor estacionario aun en ausencia de terapia, a diferencia de Wang, donde uno puede tener soluciones que divergen. Esto nos indicaría que la influencia del medio es vital para explicar el crecimiento descontrolado (es decir, la existencia de soluciones no acotadas).

3.3.3. Sustrato blando (*Soft*), Wang

Este caso guarda una altísima similitud con el anterior. Cualitativamente el comportamiento biológicamente relevante es el mismo. Cuantitativamente, los mismos cambios de comportamiento que había en *Hard* para $a_H^{(i)}$ ahora se dan en $a_S^{(i)}$, con la única excepción del cambio de cuadrante de T_2 en *Hard* (en $a_H^{(0)}$) que no tiene lugar en *Soft*. Aquí, T_2 se mantiene en el tercer cuadrante para todo valor de la eficiencia, alejándose del origen a medida que a_{dif} crece. De todos modos, esta diferencia no tiene relevancia biológica. Es por esto que para este caso se omite el análisis detallado que se ha expuesto en la sección anterior. Resulta, sin embargo, interesante reportar el resultado final de la curva

$t_T^{Max}(a_{dif})$, ya que esta provee un buen resumen de la dinámica y nos permite comparar con el caso *Hard*. Esta puede verse en la Fig. 3.8(b). Aquí se evidencia que el crecimiento en el caso del sustrato blando es más lento, lo que provoca que, a una misma eficiencia, el comienzo de la terapia pueda retrasarse mucho más. Nuevamente la pendiente de la curva se reduce a medida que nos movemos a valores mayores de la eficiencia de la terapia. Esto básicamente nos dice que, para poder demorarnos un poco más en comenzar la terapia, hay que aumentar la eficiencia en cantidades cada vez mayores.

3.3.4. Helmlinger

En este caso la totalidad de las interacciones son competitivas. La capacidad de carga para las células D es de aproximadamente $K_D \approx 15150$ y el correspondiente equilibrio T_1 es siempre un atractor. El origen, por otra parte, cambia de repulsor a silla mediante una bifurcación transcítica que tiene lugar cuando es atravesado por T_3 para $a_{He}^{(8)}$. Tanto las trayectorias de las coexistencias como su estabilidad son complicadas. Por un tema de escalas, los recorridos de las coexistencias no pueden ser eficazmente comunicados en un único gráfico. Para dar una idea del comportamiento, realizamos un esquema que puede verse en la Fig. 3.9. En este puede apreciarse que T_3 parte del primer cuadrante, volviéndose complejo cuando se encuentra con T_2 . Las coexistencias son complejos conjugados de $a_{He}^{(2)}$ a $a_{He}^{(4)}$. Luego se separan y T_3 pasa del cuarto al segundo cuadrante por el origen, mientras que T_2 se mantiene en el cuarto cuadrante, alejándose del origen. En cuanto a la estabilidad, T_3 es una silla siempre que se encuentre en valores positivos de S (o equivalentemente para eficiencias menores a $a_{He}^{(8)}$). Al cruzar el origen, intercambia estabildades con T_0 volviéndose un repulsor (bifurcación transcítica). T_2 es un atractor para eficiencias menores a $a_{He}^{(6)}$ y un repulsor para mayores (exceptuando las eficiencias para las cuales es complejo, donde es una silla).

El comportamiento biológicamente relevante puede resumirse en los siguientes regímenes:

- **Régimen 1:** $a_{dif} \in [(0, a_{He}^{(2)}) \cup (a_{He}^{(4)}, a_{He}^{(6)})]$. En este régimen tenemos dos atractores, T_1 y T_2 , cuyas cuencas de atracción quedan divididas por la variedad estable de T_3 (que es una silla). El destino del sistema depende de la condición inicial. T_2 representa una suerte de “equilibrio de las CMC” mientras que como hemos dicho previamente, T_1 es el equilibrio diferenciado. Este esquema característico de la competición de especies es justificado por el hecho de que $\alpha_{ij} > 0, \forall i, j$. Notemos además que la cuenca de T_2 es grande, más de 2.5 células S prácticamente me aseguran estar en la cuenca de T_2 . Esto se debe a que la inhibición de las S sobre las D es mucho más grande que la recíproca: $\alpha_{DS} = 0,4007 \gg \alpha_{SD} = 0,00006$. En este régimen se agrupan dos subregímenes distintos, bajo el criterio de que en ambos T_2 representa una suerte de remisión de las D .

Subrégimen A: $a_{dif} \in [(0, a_{He}^{(1)}) \cup (a_{He}^{(4)}, a_{He}^{(6)})]$. En este subrégimen T_2 es no biológico (real en el cuarto cuadrante), pero arrastra condiciones del primer cuadrante al cuarto. Restringiendo la dinámica al primer cuadrante, se llega a una tumoresfera compuesta únicamente por un número fijo de células S .

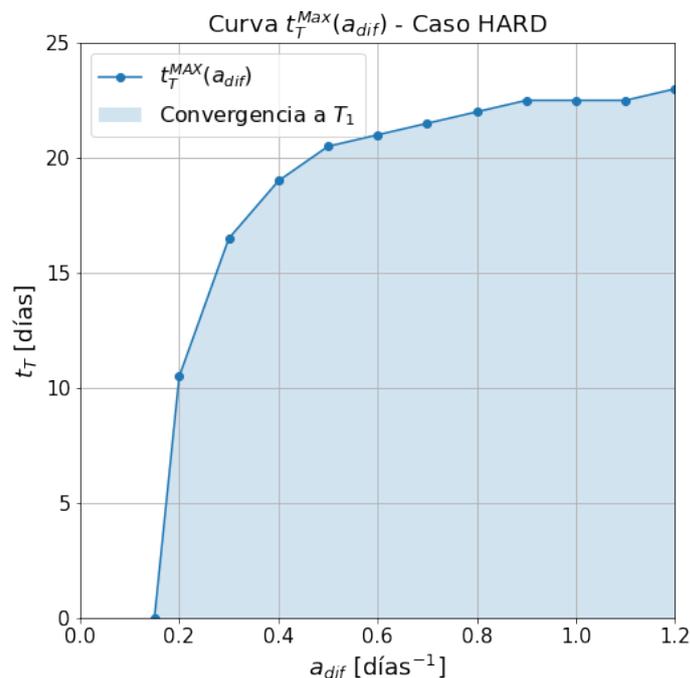
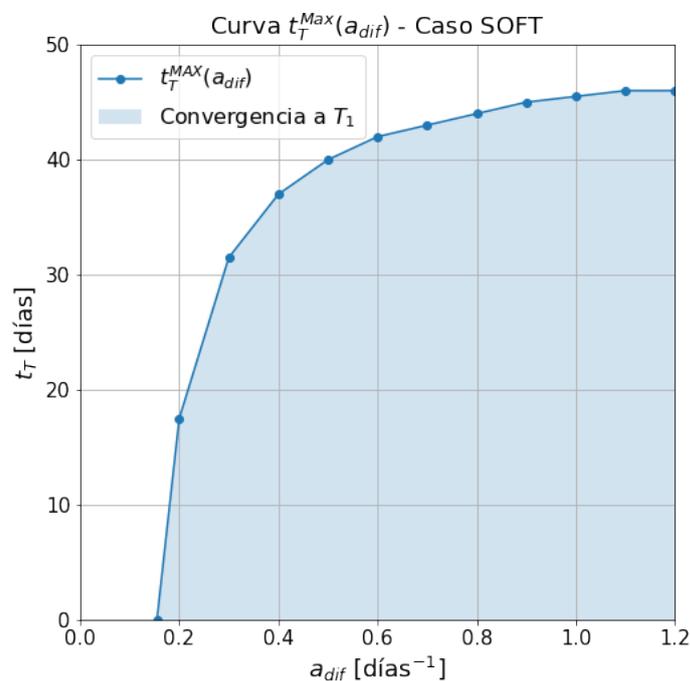
(a) Sustrato Rígido (*Hard*).(b) Sustrato Blando (*Soft*).

Figura 3.8: Curva de tiempo máximo de inicio de terapia en función de la eficiencia de la misma (experimentos de Wang). Se exponen las curvas $t_T^{Max}(a_{dif})$ para el caso *hard* en 3.8(a) y para el caso *soft* en 3.8(b). Los pares (a_{dif}, t_T) por debajo de esta curva dan soluciones que convergen a T_1 mientras que pares por encima de esta curva dan soluciones que divergen. Si bien la curva parece tener quiebres, esto probablemente se deba a que la resolución en t_T es de medio día para un dado valor de la eficiencia. Aumentando esta resolución, uno esperaría ver una curva suave.

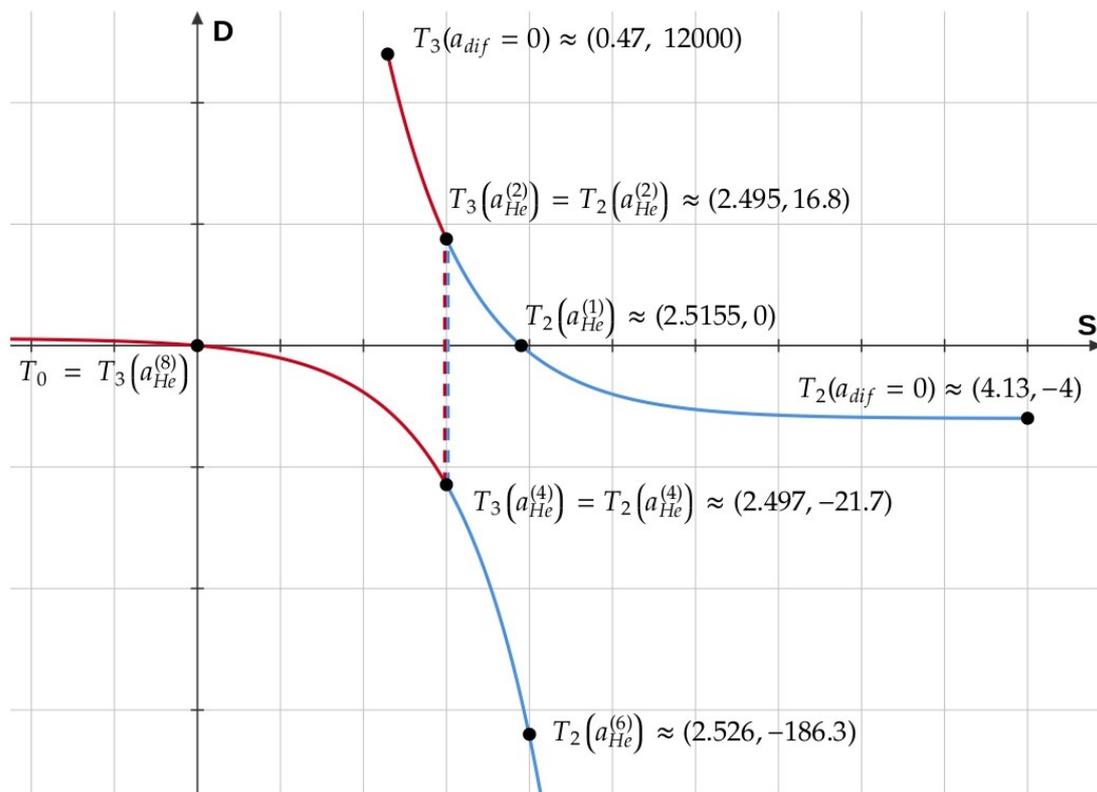


Figura 3.9: Esquema de las coexistencias en el espacio de fases. La curva roja muestra la trayectoria de T_3 , mientras que la azul corresponde a la de T_2 . Para $a_{dif} = 0$, T_2 parte del cuarto cuadrante mientras que T_3 parte de valores elevados de D en el primer cuadrante. Para $a_{dif} = a_{He}^{(2)}$ ambas coexistencias se encuentran, volviéndose complejas hasta $a_{He}^{(4)}$. Las líneas segmentadas representan la parte real de los equilibrios complejos en este rango de eficiencias.

Subrégimen B: $a_{dif} \in (a_{He}^{(1)}, a_{He}^{(2)})$. Es similar al anterior, sólo que ahora no hay que restringir la dinámica al primer cuadrante dado que T_2 pertenece al mismo. Estrictamente hablando T_2 es una coexistencia, pero consta de un número relativamente pequeño de CCD (comparando con la capacidad de carga para las mismas).

- **Régimen 2:** $a_{dif} \in [(a_{He}^{(2)}, a_{He}^{(4)}) \cup (a_{He}^{(6)}, \infty)]$. Todas las condiciones iniciales convergen al equilibrio diferenciado T_1 . Los equilibrios T_2 y T_3 son no biológicos e inestables (sillas o repulsores, complejos o reales fuera del primer cuadrante).

En principio este comportamiento nos sugiere que, si estamos dispuestos a renunciar a eliminar a las S , para un conjunto de condiciones iniciales existe un valor óptimo para la eficiencia de la terapia. Esto es así puesto que si bien uno puede lograr llegar a T_1 aumentando lo suficiente la eficiencia de la terapia como nos lo hemos propuesto en los casos anteriores, en este caso ese equilibrio de células diferenciadas es muy grande en comparación a los valores de las dos poblaciones. No siempre tendremos elección, hay condiciones iniciales como la que hemos usado previamente de $(S_0, D_0) = (1, 0)$ que están en la cuenca de atracción de T_1 , $\forall a_{dif} > 0$. Sin embargo, de no estar en la cuenca de T_1 ,

convendría estar en el régimen 1-A donde uno tiene que la tumoresfera tenderá a contener entre dos y cuatro CMC aproximadamente. El valor óptimo para la eficiencia de la terapia sería $a_{He}^{(4)}$, ya que allí se tiene el mínimo número total de células (debido a que la dinámica real ocurre siempre en el primer cuadrante).

No obstante, el comportamiento predicho no es del todo confiable. Esto tiene que ver con lo mencionado en la sección de limitaciones metodológicas, respecto a que en este modelo una única CMC es capaz de inhibir a todas las CCD a la vez. Por ejemplo, según el modelo tener cinco CMC es suficiente para reducir a cero una población de miles de CCD si se está en ausencia de terapia. Es posible que, de incorporarse efectos espaciales, veríamos que esta inhibición no es tan fuerte como aquí aparenta ser.

El hecho de que todos los coeficientes de interacción sean positivos encuentra su explicación en las condiciones de cultivo. La tumoresfera crece en un gel de 0,3% de agar, teniendo que desplazar al mismo con su crecimiento y sufriendo así presiones crecientes. Probablemente esto fuerce a las células a tener que competir por recursos como nutrientes o espacio.

Esto no se observa en los casos del experimento de Wang, pues allí las tumoresferas se colocaban sobre el sustrato con agar luego de haber sido cultivadas en suspensión. Esto las libra de los efectos inhibitorios de la presión observados por Helmlinger para tumoresferas que crecen dentro del medio con agar. No obstante, el sustrato continúa influenciando la evolución del tumor. Distinta rigidez de sustrato genera distintas respuestas por parte de las células, quizás por lo conjeturado en [3] respecto a que estas perciben un ambiente tensionado que podría deberse a tejido dañado. Sin embargo, se han observado diferencias muy marcadas aun en casos donde la rigidez del sustrato no varía, como sucede en *Hard* y *Control*. Como veremos a continuación, *Control* presenta una característica distintiva: la cooperación intraespecífica por parte de las CCD. Esto lo diferencia fuertemente de *Hard* y una posible explicación para este comportamiento ha sido propuesta en [3]. Allí, atribuyen esto a la migración: la posibilidad de que, una vez que el esferoide alcanza cierto tamaño, las células comienzan a migrar por lo que el número de células con las que interacciona cada una deja de aumentar.

Por último, no podemos dejar de mencionar el hecho de que en el régimen 1-A tuvimos que restringir la dinámica al primer cuadrante. Esto se debe a la pérdida de la positividad de las soluciones. Dicha pérdida de positividad puede explicarse mediante el Teorema 3.1, con el que podemos estimar por ejemplo que para $a_{dif} = 0$, si la población máxima de CMC supera un valor de aproximadamente 2,5 células, habrá problemas de positividad. Esto es coherente con lo que se observa en el diagrama de fases de este caso, que puede verse en la figura Fig. 3.10. En un caso como este, el sistema biológico evolucionará variando el número de CMC, manteniendo una cantidad nula de CCD.

3.3.5. Control, Wang

Aquí el origen es siempre un punto silla. Como hemos anticipado, este caso presenta la peculiaridad de que $\alpha_{DD} < 0$, por lo que T_1 se ubica en el semieje negativo de las D y resulta no biológico. Se tratará de una silla si $a_{dif} < a_C^{(1)}$, de lo contrario será un atractor. Además, ambas coexistencias resultan no biológicas, ubicándose en el cuarto cuadrante

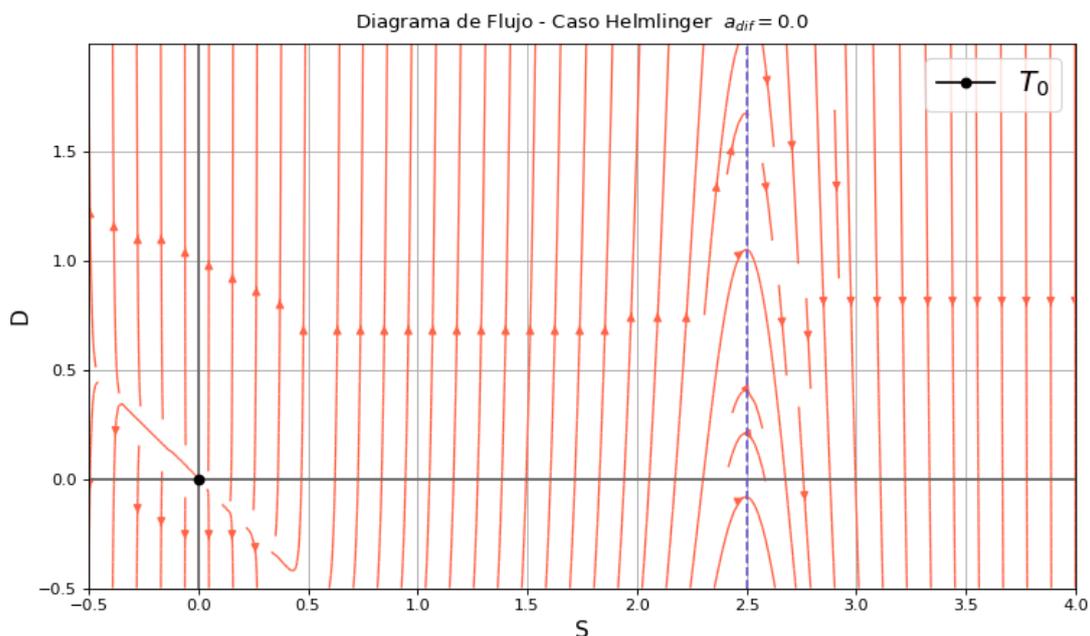


Figura 3.10: *Pérdida de positividad del caso de Helmlinger.* En el diagrama de fases se han graficado la solución trivial en negro y una línea segmentada en el valor $S = 2,5$ a partir del cual el modelo deja de tener asegurada la positividad según el teorema. Puede verse que, a partir de este valor, las trayectorias en el espacio de fase cruzan del primer cuadrante al cuarto, perdiéndose efectivamente la positividad de las soluciones.

$\forall a_{dif} \geq 0$. T_2 es siempre un repulsor y T_3 es siempre una silla.

Todo esto implica que, en lo concerniente a la dinámica del primer cuadrante, T_0 es inestable y el resto de los equilibrios son no biológicos. Por esto, todas las condiciones iniciales del primer cuadrante dan lugar a soluciones que divergen, sin importar la eficiencia de la terapia. Notemos que esto es una consecuencia del inciso “e” del Teorema 3.2. Este es uno de esos casos que observamos a continuación del teorema, en el que la dinámica ocurre en el tercer cuadrante del espacio de fases adimensional en lugar del primero.

Uno podría, sin embargo, preguntarse qué sucede si uno aplica la terapia de todos modos. En principio la terapia podría retardar el crecimiento, aunque no logre controlarlo, de manera similar al caso *Hard*. Por otro lado, puesto que las CCD cooperan entre sí, aumentar su número podría acelerar el crecimiento, caso en el cual la terapia estaría contraindicada.

A fin de dilucidar entre estas posibilidades, se resuelven las ecuaciones para la condición inicial de la tumoresfera $(S_0, D_0) = (1, 0)$ para distintos valores de la eficiencia y se compara la evolución en los primeros 23 días. Lo que se encuentra es que, si bien a tiempos cortos el total de células es menor para una terapia más débil, rápidamente esta situación se invierte, acelerándose el crecimiento. Los casos con una terapia más fuerte ven retrasada su evolución, dando un número total de células menor a un mismo tiempo. Cabe aclarar que no habrá en este caso un valor de umbral para la eficiencia; el caso límite para eficiencias altas está dado por la evolución de una población compuesta

exclusivamente por CCD, que sigue creciendo de manera no acotada. Es de esperarse que, para eficiencias suficientemente altas, la evolución se dé sobre el eje D debido a la naturaleza discreta de las poblaciones. Este retraso del crecimiento ante un aumento en la terapia puede explicarse notando que, a pesar de que las CCD cooperan entre sí, esta cooperación no es tan fuerte como la asistencia que reciben por parte de las CMC: $\alpha_{DD} = -0,3087 > \alpha_{DS} = -1,0683$. Quizás un buen criterio para establecer una contraindicación de la terapia sea cuando $\alpha_{DD} < \alpha_{DS}$. No obstante, tal caso resultaría extremadamente raro, puesto que en general esperaríamos que las interacciones intraespecíficas sean o se vuelvan competitivas transcurrido un tiempo suficiente. El hecho de que la competición intraespecífica no se aprecie aquí puede deberse a que el experimento es de corta duración o a que la tumoresfera falla en mantener la forma esférica a tiempos tardíos. Esto último puede implicar que la aplicación del modelo no sea del todo adecuada. La posibilidad de migración para este caso, mencionada previamente, explicaría que las CCD no se vean forzadas a competir entre sí, habilitando a α_{DD} a volverse negativo.

3.4. Recapitulación

En este capítulo hemos presentado los resultados del análisis del modelo. Se estudió tanto la posición como la estabilidad de los puntos críticos. Se probaron también teoremas respecto a la positividad y al crecimiento de las soluciones, que posteriormente fueron utilizados para explicar aspectos del comportamiento de distintos casos experimentales.

El comportamiento típico esperado es representado por el experimento de Chen. Allí el sistema tiende a una coexistencia que achica su tamaño a medida que se refuerza la terapia, eventualmente desembocando en el equilibrio diferenciado. Para los casos de sustrato rígido y blando de Wang, la terapia retrasa el crecimiento y puede evitar que el tamaño del sistema diverja, confinándolo en la cuenca de atracción del equilibrio diferenciado. Para lograr esto, tanto la eficiencia de la terapia como el momento de su comienzo ocupan un rol central, presentando valores de umbral cuya relación se ha explicitado en el espacio de los parámetros de terapia (a_{dif}, t_T) . Dichos umbrales fueron calculados para algunos casos particulares, indicando el procedimiento para un caso genérico. Se ha mostrado, además, que el espacio de parámetros de la terapia queda dividido en dos partes, una con las combinaciones que nos llevan al equilibrio diferenciado y otra con las que dan soluciones que divergen. Típicamente, esperaríamos que la terapia retrase el crecimiento cuando $\alpha_{DD} > \alpha_{DS}$.

En el caso de Helmlinger, tenemos que aumentando la terapia lo suficiente todas las condiciones tienden al equilibrio diferenciado. Para eficiencias menores, parece haber un valor óptimo de la terapia, sin embargo, esta conclusión del modelo podría no ser del todo confiable. El caso Control de Wang resulta un caso patológico por la cooperación de las CCD, algo que podría ser explicado por la migración de células fuera del esferoide original. Aun así, el efecto de la terapia en este caso es ralentizar levemente el crecimiento, por lo que no estaría contraindicada. Genéricamente, uno esperaría que la terapia esté contraindicada cuando $\alpha_{DD} < \alpha_{DS}$. En todos los casos se discutió además la relación entre las condiciones de cultivo y la dinámica resultante.

Capítulo 4

Conclusiones

Este capítulo concluye el trabajo, resumiendo los resultados principales y analizando sus consecuencias. Finalmente, se proponen algunas oportunidades para futuros trabajos.

En primer lugar, se generalizó el modelo de Benítez y colaboradores para incluir el caso de una terapia de diferenciación aplicada a tumoresferas. Estudiamos las propiedades del modelo generalizado, incluyendo los equilibrios del sistema, así como algunos teoremas respecto a la positividad de las soluciones, las condiciones para el crecimiento temprano de una semilla y propiedades de las soluciones en distintos casos particulares.

Utilizamos el modelo para hacer predicciones sobre la aplicación de la terapia a distintos casos experimentales, cuyo crecimiento había sido modelado previamente. En primer lugar, para el caso del experimento de Chen [18], donde las esferas crecen en una microcámara, se encontró que, para eficiencias bajas de la terapia, la tumoresfera tiende a estar compuesta de una mezcla de ambas poblaciones, mientras que para eficiencias suficientemente altas la fracción de CMC desaparece, componiéndose el tumor únicamente de CCD. En este caso de crecimiento en suspensión libre, el momento de inicio de la terapia no es relevante, sino que la importancia parece residir exclusivamente en su intensidad (dosaje). No obstante, cabe destacar que para estas condiciones de cultivo el crecimiento del tumor está controlado aun en la ausencia de terapia. El rol de esta es reducir el tamaño del tumor final.

En el caso de los experimentos de Wang [19], en los que se cultivaron tumoresferas sobre sustratos de distinta rigidez, tanto para sustrato rígido (*Hard*) como blando (*Soft*), se encontró que existe una eficiencia mínima para la terapia (para cualquier condición inicial) si uno espera poder limitar el crecimiento. En principio, este crecimiento es no acotado, debido a la fuerte cooperación interespecífica presentada. Esta eficiencia mínima está dada por los valores de bifurcación $a_H^{(5)}$ y $a_S^{(5)}$, respectivamente. Además, dada una condición inicial, se expuso que el espacio de parámetros de la terapia (dado por la eficiencia y el tiempo de inicio de la misma) queda dividido en condiciones que controlan el crecimiento, eliminando la fracción de CMCs, y condiciones para las cuales el sistema crece sin cota. Adicionalmente a haber hallado suficientes puntos de la curva que divide ambos tipos de parámetros como para tener una visualización clara, se ha detallado el procedimiento a seguir para obtener puntos adicionales de la misma. Esto permite encontrar el tiempo máximo de inicio de la terapia dada una eficiencia para la misma, o equivalentemente, la

eficiencia mínima dado el momento de inicio. Razonablemente, mientras uno más demora en iniciarla, más potente debe ser la terapia.

En base a esto, una recomendación que uno podría hacer para el caso general es que una terapia como esta debería comenzar tan rápido como sea posible, ya que el modelo muestra la existencia de un umbral en el tiempo de inicio para una región realista del espacio de parámetros.

En el caso Control de Wang, se ve que la cooperación intraespecífica de las CCD (posiblemente debida a la migración) da lugar a soluciones no acotadas, sin importar la eficiencia o el momento de inicio de la terapia. Lo único que esta puede hacer, es retrasar el crecimiento. Esta demora es mayor a medida que se aumenta la eficiencia. En casos como este, que presenten cooperación entre las CCD, la terapia podría estar contraindicada. Un posible criterio práctico sería aplicar la terapia en los casos en los que $\alpha_{DS} < \alpha_{DD}$, es decir, en los casos en los que la ayuda de las CMC hacia las CCD sea mayor que la ayuda que se brindan las CCD entre sí (o la competencia que ejerzan).

Por último, el caso de Helmlinger permitió estudiar un experimento donde las tumoresferas crecían dentro de un medio agaroso, sufriendo presiones que aumentaban durante su crecimiento. Esto probablemente sea la causa de que la totalidad de interacciones sean competitivas, por lo que efectivamente mientras la eficiencia de la terapia no fuera demasiado alta, el espacio de fases quedaba dividido en condiciones iniciales que tendían al equilibrio diferenciado, de puras CCD, y condiciones iniciales que tendían a un equilibrio formado únicamente por CMC. Para este último, había que restringir la dinámica a valores positivos de la población, ya que como fue posible predecir mediante uno de los teoremas probados y verificar mediante resoluciones numéricas, las soluciones eventualmente pierden la positividad cuando se encuentran fuera de la cuenca de atracción del equilibrio diferenciado. En este caso se observó nuevamente que, si la eficiencia de la terapia se incrementaba lo suficiente, se obtenía un régimen en el que el equilibrio diferenciado era el atractor de todas las condiciones iniciales en el primer cuadrante del espacio de fases. Sin embargo, se argumentó que, a fin de obtener un número total de células pequeño, quizás podría haber una eficiencia óptima para la terapia. En cualquier caso, el modelo indica que el efecto inhibitorio de la presión descrito por Helmlinger genera que las tumoresferas no puedan estar compuestas de un gran número de CMC para ningún régimen.

El contraste entre los distintos casos presentados, nos indica que el crecimiento descontrolado se debe, al menos en parte, al medio en el que crece el tumor. El modelo muestra entonces, cómo el resultado de la terapia depende no sólo del dosaje y del momento de aplicación, sino también, críticamente, del ambiente en el que crece el tumor.

Sería interesante continuar el análisis con mayor información proveniente de distintos ensayos experimentales, tanto en condiciones de cultivo diversas, como de mayor duración en el tiempo y con un mayor número y precisión en las mediciones. En este aspecto, es prometedora la colaboración emprendida por nuestro grupo con el laboratorio del Dr. Luciano Vellón del IBYME – CONICET. Por otro lado, nuestro modelo está siendo extendido para incluir los efectos del tejido sano, en una formulación cero-dimensional análoga a la utilizada en el presente trabajo. Si bien no se dispone de datos todavía para ajustar dicho modelo, resulta una vía a explorar en trabajos futuros. Otro aspecto sobre el cual

se podrían realizar mayores estudios es analizar la aplicación de protocolos más realistas para la terapia, como podría ser el de terapia periódica para los casos de sustrato rígido y blando de Wang. Si bien en el presente trabajo se prefirió analizar el mayor espectro posible de condiciones de cultivo, resultaría interesante relevar los detalles de cómo el período y la intensidad de la terapia determinan el destino del sistema. Por último, otra mejora posible es la incorporación de estocasticidad en el modelo. Quizás, una manera de hacerlo podría ser utilizando una ecuación maestra (típicamente utilizada para procesos de nacimiento y muerte) cuya aproximación determinista sea el presente modelo.

En síntesis, se ha presentado en este capítulo un breve resumen de los resultados del trabajo, relacionando las condiciones de cultivo a las respuestas frente a la terapia, explorando la importancia de distintos aspectos de la misma. Se destacó la potencial importancia del momento de inicio de la terapia, así como el rol central que ocupa el ambiente en el que crece el tumor. Finalmente, se discutieron posibles caminos a seguir en futuros estudios.

Bibliografía

- [1] Lucas Barberis, Lucia Benítez y Carlos A Condat. “Elucidating the role played by cancer stem cells in cancer growth”. En: *Mmsb* 1.1 (2021), págs. 48-54. URL: <https://sitios.vtte.utem.cl/revistammsb/wp-content/uploads/sites/27/2021/08/revista-MMSB-vol1-n1-2021-Barberis-Ben%C3%ADtez-Condat.pdf>.
- [2] L. Benítez, L. Barberis y C. A. Condat. “Modeling tumorspheres reveals cancer stem cell niche building and plasticity”. En: *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* 533 (2019), pág. 121906. ISSN: 03784371. DOI: [10.1016/j.physa.2019.121906](https://doi.org/10.1016/j.physa.2019.121906). URL: <https://doi.org/10.1016/j.physa.2019.121906>.
- [3] Lucía Benítez y col. “Understanding the influence of substrate when growing tumorspheres”. En: *BMC Cancer* 21.1 (2021), págs. 1-11. ISSN: 14712407. DOI: [10.1186/s12885-021-07918-1](https://doi.org/10.1186/s12885-021-07918-1).
- [4] NIH. *Definición de cáncer - Diccionario de cáncer del NCI - NCI*. URL: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/cancer> (visitado 01-07-2022).
- [5] NIH. *Definición de tumor - Diccionario de cáncer del NCI - NCI*. URL: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/tumor> (visitado 01-07-2022).
- [6] Mina J. Bissell y Derek Radisky. “Putting tumours in context”. En: *Nat Rev Cancer* 1.1 (2001), págs. 46-54. DOI: [10.1038/35094059](https://doi.org/10.1038/35094059).
- [7] Thomas S. Deisboeck y Georgios S. Stamatakos. “Multiscale cancer modeling”. En: *Multiscale Cancer Modeling* (2010). DOI: [10.1201/b10407](https://doi.org/10.1201/b10407).
- [8] Louis Bastien Weiswald, Dominique Bellet y Virginie Dangles-Marie. “Spherical cancer models in tumor biology”. En: *Neoplasia (United States)* 17.1 (2015), págs. 1-15. ISSN: 14765586. DOI: [10.1016/j.neo.2014.12.004](https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004>.
- [9] Masoud Najafi, Bagher Farhood y Keywan Mortezaee. “Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy”. En: *Journal of Cellular Physiology* 234.6 (2019), págs. 8381-8395. ISSN: 10974652. DOI: [10.1002/jcp.27740](https://doi.org/10.1002/jcp.27740).
- [10] Masoud Najafi, Keywan Mortezaee y J. Majidpoor. “Cancer stem cell (CSC) resistance drivers”. En: *Life Sciences* 234.August (2019). ISSN: 18790631. DOI: [10.1016/j.lfs.2019.116781](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116781).

- [11] Caterina A. M. La Porta y Stefano Zapperi. *The physics of cancer*. Cambridge University Press, 2017. ISBN: 9781316271759. DOI: <https://doi.org/10.1017/9781316271759>.
- [12] Gabriel Helmlinger y col. “Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids”. En: *Nature Biotechnology* 15.8 (1997), págs. 778-783. ISSN: 15461696. DOI: [10.1038/nbt0897-778](https://doi.org/10.1038/nbt0897-778).
- [13] S. A. Menchón y C. A. Condat. “Quiescent cells: A natural way to resist chemotherapy”. En: *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* 390.20 (2011), págs. 3354-3361. ISSN: 03784371. DOI: [10.1016/j.physa.2011.05.009](https://doi.org/10.1016/j.physa.2011.05.009). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physa.2011.05.009>.
- [14] Maria Valeria Giuli y col. “Current trends in ATRA delivery for cancer therapy”. En: *Pharmaceutics* 12.8 (2020), págs. 1-33. ISSN: 19994923. DOI: [10.3390/pharmaceutics12080707](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080707).
- [15] Lara Costantini y col. “Retinoic acids in the treatment of most lethal solid cancers”. En: *Journal of Clinical Medicine* 9.2 (2020). ISSN: 20770383. DOI: [10.3390/jcm9020360](https://doi.org/10.3390/jcm9020360).
- [16] Nicholas Ferris Britton. *Essential mathematical biology*. Springer London, 2003. ISBN: 978-1-85233-536-6. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4471-0049-2>.
- [17] Ferdinand Verhulst. *Nonlinear differential equations and dynamical systems*. Springer Berlin, Heidelberg, 1996. ISBN: 978-3-540-60934-6. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-61453-8>.
- [18] Yu Chih Chen y col. “High-throughput single-cell derived sphere formation for cancer stem-like cell identification and analysis”. En: *Scientific Reports* 6.August 2015 (2016), págs. 1-12. ISSN: 20452322. DOI: [10.1038/srep27301](https://doi.org/10.1038/srep27301). URL: <http://dx.doi.org/10.1038/srep27301>.
- [19] Jing Wang y col. “A novel method to limit breast cancer stem cells in states of quiescence, proliferation or differentiation: Use of gel stress in combination with stem cell growth factors”. En: *Oncology Letters* 12.2 (2016), págs. 1355-1360. ISSN: 17921082. DOI: [10.3892/ol.2016.4757](https://doi.org/10.3892/ol.2016.4757).
- [20] Gustavo Sibona y col. “Dinámica epidémica del COVID19 con un sistema de agentes difusivos”. En: *105° RAFA, División de Mecánica Estadística, Física no Lineal y Sistemas Complejos*. 2020.
- [21] Mario Castro y col. “The turning point and end of an expanding epidemic cannot be precisely forecast”. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117.42 (2020), págs. 26190-26196. ISSN: 10916490. DOI: [10.1073/pnas.2007868117](https://doi.org/10.1073/pnas.2007868117).