

Models estocàstics multiescala de la dinàmica de poblacions cel·lulars: mètodes asimptòtics i numèrics

PILAR GUERRERO I TOMÁS ALARCÓN

Resum: En aquest article, presentem una nova metodologia que permet formular i analitzar models estocàstics multiescala de la dinàmica de poblacions cel·lulars. Seguint la idea de models híbrids multiescala existents, creem el nostre model de forma jeràrquica d'acord amb les escales temporals característiques involucrades, on la dinàmica estocàstica de la població està governada per les taxes de naixement i de mortalitat segons el que prescriuen les corresponents vies intracel·lulars (per exemple, el model estocàstic del cicle cel·lular). El mecanisme de retroalimentació es tanca amb l'acoblament entre la dinàmica de la població i la dinàmica intracel·lular a través de la concentració d'oxigen: les cèl·lules consumeixen oxigen, el qual, al seu torn, regula la taxa amb la qual les cèl·lules evolucionen al llarg del seu cicle cel·lular. L'acoblament entre la dinàmica intracel·lular i la poblacional es duu a terme a través d'un mètode innovador, que permet obtenir la taxa de naixement a partir del model estocàstic del cicle cel·lular, basat en un enfocament de temps mitjà de primer pas. Se suposa que la proliferació cel·lular és activada quan una o més de les proteïnes involucrades en la via de regulació del cicle cel·lular arriba a un valor llindar. Aquest punt de vista permet calcular la taxa de divisió com a funció de l'edat de la cèl·lula i l'oxigen extracel·lular en termes del temps corresponent de primer pas. Aleshores, podem procedir a formular la dinàmica estocàstica de les poblacions cel·lulars en termes d'una equació mestra estructurada per l'edat. A més a més, també hem desenvolupat generalitzacions de mètodes asimptòtics del tipus WKB per a l'equació mestra estructurada per l'edat, així com un mètode de salt τ per simular l'evolució de la població estructurada per l'edat. Finalment, il·lustrem aquesta metodologia general amb un exemple d'una població cel·lular, on la progressió en el cicle cel·lular està regulada per la disponibilitat d'oxigen.

Paraules clau: modelització multiescala, modelització estocàstica, càncer, cicle cel·lular.

Classificació MSC2010: 92B05.

1 Introducció

En els darrers anys, la modelització multiescala de sistemes biològics ha esdevingut un camp de recerca molt actiu, i ha fet contribucions significatives en diverses àrees, que van des de la cardiologia [25, 31, 36, 51] fins a la biologia del desenvolupament [26, 40, 49, 50, 62] i el creixement tumoral [2, 11, 14, 15, 27, 33, 34, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 55, 56, 57].

L'interès que mou l'increment d'esforç dedicat al desenvolupament de models i tècniques multiescala està motivat per la constatació que el mètode de la *bala màgica* [54] per al tractament de malalties complexes, i, més precisament, en el cas del càncer, pot ser que no sigui tan efectiu com inicialment s'havia pensat. Pel que fa al tractament del càncer, aquest concepte va ser presentat per Paul Ehrlich [54] i consisteix en una teràpia dirigida que actua específicament en cèl·lules cancerígenes, i que deixa sense danyar les cèl·lules normals. Amb l'arribada de la recerca genòmica, s'esperava que aquest mètode fos impulsat considerablement. De fet, durant més de trenta anys, la recerca en oncologia ha estat dominada per una aproximació genocèntrica, on les teràpies dirigides, és a dir, medicaments desenvolupats amb l'objectiu d'interferir amb productes específics de gens cancerígens, han estat el centre i l'objectiu fonamental de la biologia del càncer [39]. Els avenços en genòmica i altres *òmiques* (proteòmica, epigenòmica, etc.) han promogut encara més aquest enfocament. No obstant això, l'èxit d'aquesta aproximació en termes de desenvolupament de nous medicaments eficients per al càncer s'ha quedat lluny de les expectatives [39].

Hi ha diverses raons per les quals el mètode de la *bala màgica* ha tingut un èxit limitat. El comportament i les característiques globals de les cèl·lules en resposta als estímuls, és a dir, el fenotip, emergeixen a partir d'una complexa xarxa d'interaccions entre els gens i els seus productes, la qual, finalment, acaba regulant l'expressió dels gens (vegeu, per exemple, el treball recent de Lignet *et al.* pel que fa a la xarxa de senyalització VEGF [32]). Aquestes xarxes de regulació dels gens constitueixen una dinàmica no lineal, de dimensió molt gran, l'estructura de les quals ha anat prenent forma per l'evolució deguda a la selecció natural i, per tant, posseeixen propietats com ara robustesa (és a dir, resistència del fenotip en contra d'alteracions genètiques) i canalització (és a dir, l'habilitat dels fenotips d'incrementar la seva robustesa a mesura que el temps avança). Aquestes propietats són explotades pels tumors per tal d'incrementar el seu potencial de proliferació i per resistir a les teràpies [29]. A part de les complexes interaccions no lineals entre cèl·lules, existeixen intrincades interaccions entre diferents components dels sistemes biològics a tots els nivells: des de complexes vies de senyalització i xarxes de regulació gèniques fins a complexos efectes no locals, on les perturbacions a tot el teixit indueixen canvis a nivell dels camins intracel·lulars de les cèl·lules [2, 14, 34, 41, 44, 48]. Aquests i altres factors porten cap a una complicada dinàmica en teixits biològics. En particular, a causa de totes les capes de complexitat que hi intervenen, és molt difícil d'avaluar el principal dogma del mètode de la *bala màgica*, és a dir, saber si un agent terapèutic serà efectiu en contra del tumor i inofensiu per al teixit sa que hi ha al voltant.

Per tal d'abordar i respondre a aquestes qüestions, s'ha intensificat la recerca en el desenvolupament i l'anàlisi de models multiescala. Aquests models són capaços d'incorporar en un sol model diferents submodels corresponents a diversos nivells d'organització biològica (intracel·lular, interacció entre cèl·lules, nivell del teixit complet, etc.), els quals, normalment, estan caracteritzats per diferents escales temporals i de longitud, així com l'acoblament entre aquests submodels, de forma que el comportament global de tot el teixit pot ser analitzat com una propietat emergent dels elements acoblats [11, 14, 33, 41, 47, 56].

Els models multiescala poden ser formulats de diverses maneres. Una d'aquestes metodologies és l'anomenada *modelització híbrida* [2, 28, 34, 41, 47, 48]. Els models multiescala híbrids estan formats per diferents submodels per a diferents nivells d'organització biològica (processos intracel·lulars, interacció entre cèl·lules, secreció i transport de senyals, etc.), i cada un és modelat en termes de descripcions matemàtiques diferents (equacions diferencials ordinàries, EDO; autòmats cel·lulars; equacions en derivades parcials, EDP; etc.). Els models híbrids estan caracteritzats normalment per l'ús de models basats en els individus per descriure la dinàmica de, com a mínim, un dels compartiments cel·lulars considerats al model [42, 43]. Altres fases (per exemple, poblacions cel·lulars no modelades com a individus i fases fluïdes com la sang o el fluid intersticial) són modelades mitjançant EDP com a fases contínues [28, 34]. Els models basats en els individus són complementats normalment amb models per al comportament de cèl·lules en resposta a senyals com la manca de nutrients o a molècules de senyalització [2]. La concentració de nutrients o de molècules de senyalització és modelada normalment com un camp continu mitjançant EDP del tipus reacció-difusió. Els models híbrids han estat proposats per estudiar diferents aspectes del creixement tumoral, com ara la resposta a la teràpia [2, 48], l'angiogènesi induïda pel tumor [34, 42, 43] i la dinàmica evolutiva del creixement tumoral [47].

Una altra forma possible d'estudiar la modelització multiescala és usant els models de fases múltiples [10, 33, 45, 57]. En aquests models, cada tipus cel·lular és modelat com una fase diferent. Els models de fluids de fases múltiples han estat utilitzats per analitzar aspectes diferents del creixement tumoral, on cada tipus de cèl·lula correspon a un fluid diferent [10, 33, 45]. Els models de camp de fase s'han utilitzat recentment per modelar l'angiogènesi induïda per un tumor [57].

Malgrat el considerable esforç fet en el camp dels models multiescala per al creixement tumoral, hi ha aspectes diversos de la dinàmica dels teixits biològics que, en aquest context de modelització, encara són poc coneguts. Un d'ells és l'efecte del soroll. Els efectes aleatoris han estat inclosos en diversos models multiescala o bé híbrids. Per exemple, els models d'angiogènesi induïda tumoralment de McDougall *et al.* [37, 38, 53], basats en un estudi previ sobre un model híbrid continu-discret d'Anderson i Chaplain [5], o els models multiescala per a l'angiogènesi formulats a [42, 43] tenen un element estocàstic que, en aquest cas, correspon a considerar que la formació de vasos és representada en

termes d'un model esbiaixat de passeig aleatori per al moviment de les cèl·lules endotelials més externes. Malgrat tot, una metodologia general que ens permeti incorporar i analitzar específicament els efectes del soroll a diferents escales encara no existeix. Com a primer pas per omplir aquest forat, proposem en aquest treball una metodologia per formular models estocàstics multiescala de la dinàmica de les poblacions cel·lulars, així com el desenvolupament de mètodes numèrics i asimptòtics per a la seva anàlisi.

En aquest article, ens proposem formular models estocàstics multiescala de la dinàmica de poblacions cel·lulars, els quals tinguin en consideració fluctuacions a dos nivells: tant a nivell de vies de senyalització intracel·lulars, a causa del baix nombre de proteïnes, com a nivell de població cel·lular, com a conseqüència de tenir una població de mida finita. D'ara endavant, ens referirem a aquestes dues fonts de soroll com a *soroll molecular* i *soroll cel·lular*, respectivament. L'objectiu d'aquesta publicació és abordar el problema del soroll en sistemes multiescala d'una forma sistemàtica. Amb aquesta finalitat, creem un context de treball que ens permet formular i analitzar models estocàstics multiescala.

Pel que fa a la creació del nostre model, farem la mateixa suposició bàsica que es va fer a [2], és a dir, dividirem el problema en les tres capes que considerem, que identifiquem amb processos caracteritzats per escales temporals extensament diverses (vegeu la figura 1 per a una representació esquemàtica del nostre model i les escales temporals característiques involucrades). Considerem un model on acoblem la dinàmica de la concentració de nutrient disponible (per exemple, oxigen), determinada per la seva taxa de subministrament i consum per part de les cèl·lules; una capa intracel·lular, on considerem un model que descriu la manera com la concentració d'oxigen regula la taxa de progressió al llarg del cicle cel·lular [1, 7] i, per tant, també la taxa de divisió, i, finalment, una capa cel·lular, on considerem la dinàmica estocàstica de les poblacions de cèl·lules. Les capes intracel·lular i cel·lular estan acoblades mitjançant un model per a la taxa de divisió que depèn de l'oxigen, formulat en termes d'un problema de temps mitjà de primer pas.

L'article està organitzat com s'explica tot seguit. A la secció 2, descrivim la formulació del model. Hi discutim el model estocàstic per a la progressió del cicle cel·lular regulat per l'oxigen, i plantegem la formulació d'un model per a la taxa de divisió que depèn de l'oxigen i l'edat com un problema de temps mitjà de primer pas associat a la dinàmica estocàstica del cicle cel·lular. Després procedim a formular un procés estocàstic de naixement-mort que depèn de l'edat per a la dinàmica de les poblacions cel·lulars. A la secció 3, presentem un mètode asimptòtic WKB (Wentzel-Kramers-Brillouin) per trobar solucions aproximades per a l'equació mestra (EM) corresponent que depèn de l'edat. La secció 4 està dedicada a la formulació d'un mètode de salt τ que depèn de l'edat que ens permet fer simulacions del model estocàstic multiescala. Finalment, a la secció 5, s'hi discuteixen els nostres resultats, les limitacions d'aquest enfocament i les direccions per a una recerca futura.

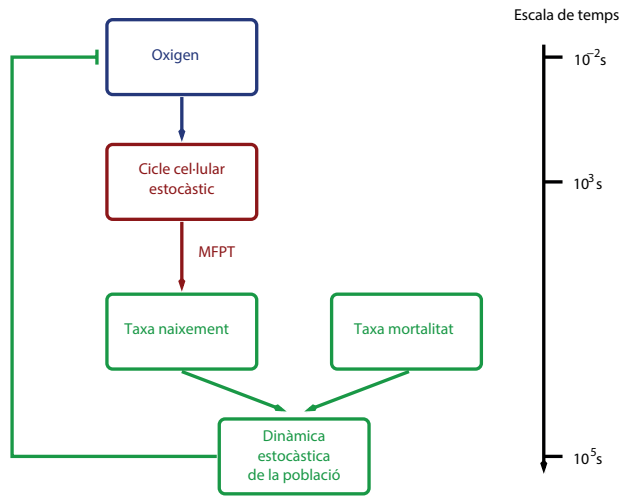


FIGURA 1: Representació esquemàtica del model multiescala: l'oxigen modula la progressió de les cèl·lules al llarg del cicle cel·lular o, equivalentment, la seva taxa de divisió. La taxa de divisió que depèn de l'oxigen és modelada en termes d'un problema de temps mitjà de primer pas i, després, és usada a l'equació mestra que determina la dinàmica estocàstica de la població cel·lular. Les cèl·lules consumeixen oxigen i, en conseqüència, la seva dinàmica regula la concentració d'oxigen, de manera que tanca el mecanisme de retroalimentació. També mostrem les escales temporals característiques corresponents: desenes de mil·lisegons per a l'oxigen, minuts o hores per als processos intracel·lulars i dies per a les cèl·lules.

2 Formulació del model

2.1 Estructura general del model estocàstic multiescala

Abans de passar a fer una discussió detallada dels diferents elements involucrats en la formulació del model estocàstic multiescala, procedim a una descripció detallada de l'estructura general del model, la qual està altament relacionada amb la del model proposat a [2].

El model que presentem en aquest article integra fenòmens caracteritzats per escales temporals diferents, com es pot veure esquemàticament a la figura 1, on s'inclouen el lliurament de l'oxigen a la població cel·lular i el consum d'aquest per part de les cèl·lules, la dinàmica de la població cel·lular sota la restricció d'un subministrament d'oxigen a una taxa finita i la proliferació i l'apoptosi de la divisió cel·lular. La seva estructura és, per tant, força complexa i, per aquesta raó, abans de presentar els submodels involucrats en la descripció de cada un d'aquests processos, explicarem l'estructura global del context de la modelització.

El punt de vista que nosaltres utilitzem és una generalització natural del procés de Markov estàndard de naixement-mort a temps continu i la seva descripció via una equació mestra [17]. Com veurem, el caràcter multiescala del sistema, és a dir, la inclusió de l'estructura fisiològica associada a les variables del cicle cel·lular, introdueix una estructura d'edat a la població: la taxa de divisió depèn de l'edat de la cèl·lula (*i. e.*, el temps que ha transcorregut des de l'última divisió), que determina, a través del model de cicle cel·lular corresponent, l'estatus dins del cicle cel·lular de les cèl·lules respectives.

Pel que fa a les particularitats de cada submodel involucrat, el model per al lliurament d'oxigen és una equació diferencial estocàstica, on l'oxigen és proporcionat a una taxa constant F i consumit per part de les cèl·lules (vegeu la figura 1). El caràcter estocàstic de l'equació que governa l'evolució de la concentració d'oxigen sorgeix del fet que el nombre de cèl·lules a un temps determinat és una variable estocàstica.

El segon submodel (és a dir, el model intracel·lular) considerat en el nostre context multiescala és un model estocàstic per a la progressió a través del cicle cel·lular regulada per l'oxigen (vegeu la figura 1). Aquest submodel és formulat usant les tècniques estàndard de modelització de cinètica química [20], de forma que el límit de camp mitjà del model estocàstic correspon al model determinista per al cicle cel·lular formulat a [1]. Aquest model proporciona l'estatus del cicle cel·lular, és a dir, el nombre de molècules de cada proteïna involucrades en el model, d'on nosaltres podem deduir si la transició G_1/S ha tingut lloc per a una cèl·lula d'una determinada edat a . L'estatus del cicle cel·lular d'una cèl·lula d'edat a està determinat en termes de si l'abundància de certes proteïnes que activen el cicle cel·lular (ciclins) ha arribat a un cert valor llindar. En el nostre cas concret, si a una edat a els nivells de ciclins estan per sota del valor llindar corresponent, la cèl·lula encara està a G_1 . Si, en canvi, el valor llindar ja s'ha assolit, aleshores la cèl·lula ha passat a S i, per tant, està preparada per dividir-se. Això implica que la probabilitat que una cèl·lula hagi creuat el nivell llindar de ciclins a una edat a pot ser formulada en termes d'un problema de temps mitjà de primer pas (MFTP), en el qual hom analitza la probabilitat d'un procés Markov d'arribar a una certa frontera [17]. La taxa a la qual el nostre model per al cicle cel·lular arriba al valor llindar d'activació de la ciclina, dit d'una altra forma, la taxa a la qual les cèl·lules passen a través del punt de restricció del cicle cel·lular, es pren de forma que sigui proporcional a la taxa de divisió. La taxa de divisió és funció de l'edat de la cèl·lula, així com de la concentració d'oxigen, ja que l'abundància d'oxigen regula la taxa de progressió al llarg del cicle cel·lular.

El tercer i últim submodel (és a dir, el model cel·lular) correspon a la dinàmica de les poblacions cel·lulars i està governat per l'equació mestra per a la funció de densitat de probabilitat del nombre de cèl·lules [17]. El procés estocàstic que descriu la dinàmica de les poblacions cel·lulars és un procés naixement-mort que depèn de l'edat, on la taxa de naixement depèn de l'edat i és determinada pel model intracel·lular. La taxa de mort és, per simplicitat, considerada constant. Com a conseqüència del fet que la taxa de naixement depengui de l'edat,

la nostra equació mestra multiescala no té la forma estàndard per a poblacions no estructurades. És, en canvi, una equació mestra que depèn de l'edat.

La descripció detallada dels processos involucrats en cada un dels submodels que han estat resumits en les línies anteriors és l'objecte d'estudi de la part restant de la secció 2.

2.2 Escala intracel·lular: model estocàstic per a la progressió del cicle cel·lular que depèn de l'oxigen

2.2.1 Informació prèvia sobre la modelització del cicle cel·lular. El cicle cel·lular és la seqüència d'esdeveniments mitjançant els quals una cèl·lula que està creixent duplica tots els seus components i es divideix en dues cèl·lules filles, cada una de les quals, al seu torn, té la maquinària i la informació suficients per poder repetir el procés [4]. El cicle cel·lular està dividit, normalment, en quatre fases: G_1 , S , G_2 i la mitosi M . Durant la fase G_1 (G = fase buida), la cèl·lula no es divideix i els cromosomes no es repliquen. La replicació de l'ADN nuclear ocorre durant la fase S , mentre que la mitosi es completa al final de la fase M . L'interval entre la replicació de l'ADN i la divisió s'anomena *fase* G_2 . Les fases buides G_1 i G_2 donen a la cèl·lula temps addicional per créixer. La cèl·lula també passa per dues transicions irreversibles. La primera d'aquestes transicions ocorre al final de G_1 i s'anomena *Inici*. Durant la fase G_1 , la cèl·lula controla el seu entorn i la seva mida. Quan les condicions externes i la mida de la cèl·lula són les adients, la cèl·lula es dedica a sintetitzar ADN i a la seva divisió. Aquesta transició és irreversible: un cop la cèl·lula entra a la fase S i la replicació de l'ADN comença, la divisió s'ha d'acabar. La segona transició, *Acabament*, ocorre quan la replicació de l'ADN ja s'ha completat. Un cop la cèl·lula ha comprovat que l'alineació de l'ADN i les cromàtides ha ocorregut, la transició *Acabament* és activada i la cèl·lula, finalment, es divideix en dues cèl·lules filles. Un cinquè estat, l'anomenat *estat* G_0 , és definit per referir-se a les cèl·lules que han abandonat la progressió normal del cicle cel·lular i han esdevingut quiescents. En aquest estat, la majoria (tot i que no totes) de les funcions cel·lulars estan suspeses, d'entre les quals la més notable és la proliferació.

Els esdeveniments del cicle cel·lular són controlats per una xarxa de senyals moleculars que tenen per components centrals les proteïnes-cinases que depenen de ciclines (CDK). A l'estat G_1 , l'activitat de les CDK és baixa, ja que les seves parelles obligades, les ciclines, no hi són. Això es deu al fet que la síntesi per part de l'ARNm de les ciclines és inhibida i la proteïna ciclina es degrada ràpidament. A l'*Inici*, s'indueix la síntesi de ciclines i s'inhibeix la degradació de ciclines, la qual cosa causa un increment increïble en l'activitat de les CDK, que es manté durant S , G_2 i M . L'activitat alta de les CDK és necessària per a la replicació de l'ADN, la condensació dels cromosomes i la formació del fus. A l'*Acabament*, un grup de proteïnes que formaran el complex promotor de l'anafase (APC) és activat [63]. L'APC enganxa una «etiqueta de construcció» a unes proteïnes diana específiques, que a continuació són degradades per la maquinària de proteòlisi de la cèl·lula. L'APC està format per un nucli complex

constituït per una dotzena de polipèptids aproximadament i dues proteïnes auxiliars, Cdc20 i Cdh1, que sembla que tenen el paper (quan estan actives) de reconèixer unes proteïnes diana específiques i presentar-les al complex del nucli perquè les etiquetin [61, 63]. L'activació de la Cdc20 a l'*Acabament* és necessària per a la degradació de cohesines a l'anafase i per a l'activació de la Cdh1. De forma conjunta, Cdc20 i Cdh1 etiqueten ciclines per degradar a la telofase, la qual cosa permet al sistema de control retornar a G_1 . Cal que distingim aquestes dues proteïnes auxiliars, ja que la Cdc20 i la Cdh1 són controlades de forma diferent per la ciclina-CDK, la qual activa la Cdc20 i inhibeix la Cdh1.

A [58], Tyson i Novak descriuen un model per a les transicions irreversibles *Inici* i *Acabament*, les quals regulen la progressió del cycle cel·lular. El model que presentem suposa que aquestes transicions ocorren per mitjà de bifurcacions del sistema regulador, la qual cosa porta a la creació i destrucció d'estats estacionaris estables del sistema regulador molecular del procés de divisió cel·lular.

La dinàmica del cycle cel·lular pot estar afectada per condicions ambientals, en particular, pel nivell d'oxigen extracel·lular: és ben sabut que concentracions d'oxigen baixes (hipòxia) alteren la progressió del cycle de divisió cel·lular [18] i de la transició G_1/S , en particular. A la referència [1], se suposava que la resposta d'aquesta transició a la hipòxia era mediada per la proteïna p27, un element de la xarxa CDK, la producció de la qual augmenta sota condicions d'hipòxia [16, 18], encara que estudis recents posen alguns dubtes sobre el rol de la p27 com a mediadora dels efectes d'hipòxia en la progressió del cycle cel·lular [9, 23]. En el nostre model, suposem que la p27 intervé en l'aturada de la transició G_1/S induïda per la hipòxia, de manera que inhibeix la formació del complex ciclina-CDK i, per tant, inhibeix la síntesi de l'ADN.

A [1] es proposa una modificació del model de Tyson i Novak [58], en la qual es consideren els efectes de la hipòxia en el cycle cel·lular a través dels nivells de la proteïna p27. La p27 inhibeix la formació del complex ciclina-CDK. A més, els nivells de p27 s'incrementen en presència d'hipòxia. Així, el conjunt d'equacions diferencials ordinàries (EDO) introduït a [1] per modelar l'efecte de la hipòxia a la fase de transició *Inici* és el següent:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{(1 + b_3 u)(1 - x)}{J_3 + 1 - x} - \frac{b_4 m x y}{J_4 + x},$$

$$\frac{dy}{dt} = a_4 - (a_1 + a_2 x + a_3 z) y,$$

$$\frac{dm}{dt} = \eta m \left(1 - \frac{m}{m_*}\right),$$

$$\frac{dz}{dt} = c_{z_1} \left(1 - \frac{m}{m_*}\right) - c_{z_2} \frac{O_2}{B + O_2} z,$$

on x i y són les concentracions de Cdh1/APC actives i la concentració dels complexos ciclina-CDK, respectivament; z és la concentració de p27; O_2 , la concentració d'oxigen; u , un activador genèric; η , la taxa de creixement de la cèl·lula; m , la massa de la cèl·lula, i m_* és la massa d'una cèl·lula adulta. Els a_i ($i = 1, 2, 3, 4$), c_{z_i} ($i = 1, 2$), b_i ($i = 3, 4$) són taxes constants, i J_3 i J_4 són les constants de Michaelis-Menten. Tyson i Novak [58] trien una escala per a les seves equacions tal que la concentració total de Cdh1 (activa i inactiva) està normalitzada a 1 i les constants de Michaelis-Menten, J_3 i J_4 , són tals que $J_3 \ll 1$ i $J_4 \ll 1$. Tot i que en el model proposat a [1] es considera que la ciclina involucrada en la transició G_1/S és CycB i se suposa que el seu inhibidor és APC/Cdh1, estudis recents suggereixen que, en canvi, una representació més acurada de la situació portaria a considerar CycE i el seu inhibidor SCF [59]. De fet, en els mamífers, la ciclina D està involucrada en la regulació de la dinàmica lenta de la fase G_1 (inhibida per p27), mentre que la ciclina E regula la dinàmica ràpida (vegeu la referència [52] per a una descripció detallada). Una descripció molt acurada de la regulació de la transició G_1/S en cèl·lules de mamífers hauria de tenir en compte la presència d'aquestes dues ciclines, en lloc de considerar els seus efectes *grosso modo* en un sol compost.

2.2.2 Formulació estocàstica. Ara procedim a formular un model estocàstic per a la progressió del cycle cel·lular regulada per l'oxigen com un procés de Markov en termes d'una equació mestra. El model resultant serà analitzat utilitzant el mètode asimptòtic WKB per a sistemes de mida gran [3, 30, 35]. Aquest (sub)model expressa la taxa de proliferació de les cèl·lules com a funció de l'oxigen extracel·lular. Aquesta informació serà usada després a l'escala cel·lular del model poblacional com a paràmetre, és a dir, utilitzarem la taxa de divisió que depèn de l'oxigen i de l'edat dins de l'equació mestra que descriu la dinàmica de la fase cel·lular.

El model que nosaltres proposem aquí està basat en els mateixos principis bàsics [58] que el que es va formular a [1]. Tyson i Novak [58] van proposar un model per a la transició G_1/S , en el qual l'element central del model és la inhibició mútua entre la forma activa de Cdh1/APC, un inhibidor de la progressió del cycle cel·lular, i CycB-CDK, l'activitat del qual és necessària per tal que el cycle cel·lular pugui sotmetre's a la transició abans mencionada. Aquesta inhibició mútua dona lloc a un sistema biestable amb dos estats estacionaris estables: el punt fix anomenat G_1 , on l'activitat de Cdh1 és propera al seu màxim i l'activitat de CycB és virtualment inexistent, i el punt fix $S-G_2-M$, on passa el contrari. A més a més, Tyson i Novak [58] suposen que la inhibició de Cdh1 per part de CycB està modulada per la mida cel·lular: la inhibició és inicialment pobra, quan les cèl·lules s'han acabat de dividir i encara no han arribat a la mida crítica necessària per a entrar a la fase S , però augmenta a mesura que les cèl·lules creixen i s'apropen a la mida crítica. Matemàticament, aquestes regulacions segons la mida cel·lular indueixen una bifurcació sella-node, on el punt fix G_1 es destrueix quan la mida cel·lular (massa) arriba a un

valor crític, la qual cosa força el sistema a incrementar l'activitat de CycB i a entrar a la fase *S*. A [1] es va proposar una modificació d'aquest model simple, segon la qual un inhibidor addicional de l'activitat de les ciclines, p27, va ser introduït. Se sap que l'activitat de p27 augmenta quan falta oxigen (hipòxia), la qual cosa retarda l'inici de la transició G_1/S . Aquest model ens permet acoblar la taxa de progressió del cycle celular amb l'abundància d'oxigen i, per tant, analitzar els efectes de les fluctuacions en l'aportació d'oxigen en el creixement tumoral [2].

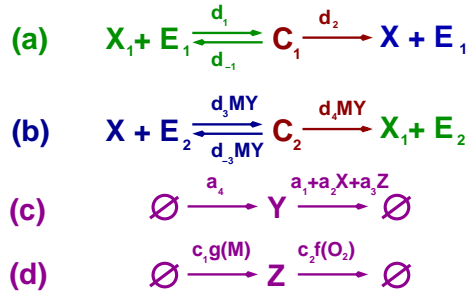


FIGURA 2: Representació esquemàtica de les reaccions involucrades en el model estocàstic de la progressió del cycle celular regulada per l'oxigen. M és la massa de la cèl·lula, X (X_1) és el nombre de molècules Cdh1 actives (inactives), E_1 (E_2) és el nombre d'enzims activadors de Cdh1 (inactivadors), C_1 (C_2) és el nombre de complexos X_1E_1 (XE_2), Y és el nombre de complexos ciclina-CDK i Z és el nombre de molècules p27. Les reaccions (a) i (b) corresponen a l'activació i inactivació catalitzada per enzims de Cdh1, respectivament. Es fa notar que la reacció d'inactivació és incentivada per CycB (Y) i modulada per la mida cel·lular (M). Les reaccions (c) i (d) determinen la dinàmica del nombre de molècules actives CycB i p27. CycB és sintetitzada a una taxa constant i degradada a una taxa que depèn de la Cdh1 activa, així com de la p27. p27 és sintetitzada a una taxa que depèn de la mida i degradada a una taxa que depèn de l'oxigen. D'acord amb [1], $g(M) = 1 - M/m_*$ i $f(O_2) = O_2/(B + O_2)$. Les taxes constants es poden veure a la taula 2.

Les reaccions involucrades en el nostre model estocàstic de la progressió del cycle celular regulada per l'oxigen es poden veure esquemàticament a la figura 2: M denota la massa de la cèl·lula; X (X_1) és el nombre de molècules Cdh1 actives (inactives); E_1 (E_2), el nombre d'enzims activadors (inactivadors) de Cdh1, i C_1 (C_2), el nombre de complexos X_1E_1 (XE_2). A més, Y i Z es refereixen al nombre de complexos ciclina-CDK i al nombre de molècules p27, respectivament.

Les reaccions de la figura 2 (a) i (b) corresponen a les reaccions catalitzades per enzims d'activació i inactivació de Cdh1, respectivament. Fem notar que, com a [58], la inactivació de Cdh1 és incentivada per CycB activa (Y) i està

modulada pel creixement cel·lular (M). La reacció de la figura 2 (c) explica la dinàmica del nombre de molècules actives CycB, Y : CycB és sintetitzada a una taxa constant i és degradada a una taxa que depèn tant de l'activa Cdh1 (X) (la qual cosa tanca, per tant, el mecanisme de retroalimentació negatiu d'inhibició mútua entre Cdh1 i CycB) com del nombre de molècules p27 (Z), la qual cosa implementa en el model el rol de p27 com a inhibidor de l'activitat de les ciclines. Finalment, la reacció de la figura 2 (d) determina la dinàmica del nombre de molècules p27, Z : p27 és sintetitzada a una taxa que depèn de la mida cel·lular i degradada a una taxa que depèn de l'oxigen, de forma que, quan l'oxigen és escàs, la degradació de p27 es redueix. Aquest efecte porta a una acumulació de p27 que retarda la progressió del cicle cel·lular, la qual cosa incrementa la inhibició de l'activitat de les ciclines. El lector pot consultar a [1] tots els detalls sobre el raonament biològic d'aquest model.

El model estocàstic s'especifica, per tant, en termes del vector d'estat, $\vec{X}(a)$:

$$\vec{X}(a) = (M(a), Z(a), X_1(a), E_1(a), C_1(a), X(a), E_2(a), C_2(a), Y(a)),$$

on a representa l'edat, que es pren com el temps que ha passat des de la darrera divisió cel·lular. La dinàmica del model es descriu mitjançant la densitat de probabilitat que el sistema estigui a l'estat \vec{X} a l'edat a , $\Psi(\vec{X}, a)$, la dinàmica de la qual està determinada per l'equació mestra (EM):

$$\frac{\partial \Psi(\vec{X}, a)}{\partial a} = \sum_i (W_i(\vec{X} - r_i, a) \Psi(\vec{X} - r_i, a) - W_i(\vec{X}, a) \Psi(\vec{X}, a)), \quad (2.1)$$

on $W_i(\vec{X}, a)$ són les taxes de transició corresponents a cada una de les reaccions elementals involucrades en el model mostrades a la figura 2, i r_i és un vector que té per entrades l'increment en el nombre de molècules de cada espècie molecular quan la reacció i ocorre, és a dir,

$$P(\vec{X}(a + \Delta a) = x(a) + r_i \mid x(a)) = W_i(\vec{X}, a) \Delta a.$$

Les taxes de transició corresponents a les reaccions enzimàtiques de la figura 2 es poden veure a la taula 1. Per modelar la cinètica de les reaccions químiques de la figura 2, hem utilitzat la llei d'acció de la massa (LMA) [20], incloses les reaccions enzimàtiques, tal com s'indica a la figura 2 (a) i (b). Hem triat la cinètica LMA per modelar aquestes reaccions en lloc d'utilitzar la cinètica Michaelis-Menten per raons tècniques, que estan relacionades amb l'anàlisi asimptòtica de l'equació (2.1) que fem a la secció següent: el mètode asimptòtic WKB demana que les taxes de transició W_i satisfacin certes lleis d'escalament (vegeu l'equació (2.3) més endavant). Aquesta relació d'escalament no se satisfà amb les taxes Michaelis-Menten, i hem, per tant, de recórrer a la cinètica LMA. No obstant això, aquest fet també implica que cal anar amb molta cautela quan es parametrítzi el model, ja

que els valors dels paràmetres donats a [58], on es va utilitzar la cinètica Michaelis-Menten per a modelar l'activació i inactivació de Cdh1 catalitzada per enzims, no són directament aplicables al nostre model. A l'apèndix A, tractem aquest problema i trobem la relació entre els paràmetres usats a [58] i els nostres.

Probabilitat de la reacció p.u.t.	\vec{r}_i
$W_1 = \frac{\eta}{m_*\Omega} \frac{M(M-1)}{2}$	$(-1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0)$
$W_2 = \eta M$	$(1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0)$
$W_3 = c_{z_1}\Omega$	$(0, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0)$
$W_4 = c_{z_1} \frac{M}{m_*} + c_{z_2} \frac{O_2}{B+O_2} Z$	$(0, -1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0)$
$W_5 = \frac{d_1}{\Omega} X_1 E_1$	$(0, 0, -1, -1, 1, 0, 0, 0, 0)$
$W_6 = d_{-1} C_1$	$(0, 0, 1, 1, -1, 0, 0, 0, 0)$
$W_7 = \frac{d_4}{\Omega^2} Y M C_2$	$(0, 0, 1, 0, 0, 0, 1, -1, 0)$
$W_8 = d_2 C_1$	$(0, 0, 0, 1, -1, 1, 0, 0, 0)$
$W_9 = \frac{d_3}{\Omega^3} X Y M E_2$	$(0, 0, 0, 0, 0, -1, -1, 1, 0)$
$W_{10} = \frac{d_{-3}}{\Omega^2} Y M C_2$	$(0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, -1, 0)$
$W_{11} = a_4 \Omega$	$(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1)$
$W_{12} = \left(a_1 + \frac{a_2}{\Omega} X + \frac{a_3}{\Omega} Z\right) Y$	$(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, -1)$

TAULA 1: Probabilitat de la reacció per unitat de temps, $\bar{W}_i \equiv W(\vec{X}, \vec{r}_i, a)$, amb $\vec{r}_i = (r_{im}, r_{iz}, r_{ix_1}, r_{ie_1}, r_{ic_1}, r_{ix}, r_{ie_2}, r_{ic_2}, r_{iy})$, $i = 1, \dots, 12$.

2.2.3 Anàlisi del model: aproximació WKB. La metodologia que usem per analitzar el nostre model està basada en l'aproximació WKB i va ser proposada per primera vegada per Kubo *et al.* [30], els quals proven que, sota la hipòtesi adequada d'escalament, la solució que depèn del temps de l'EM, equació (2.1), pot ser aproximada per una funció del mateix tipus que la de la solució a l'equilibri, és a dir, l'exponencial d'una funció homogènia de \vec{X} , que anomenarem S ,

$$\Psi(\vec{X}, a) = C \exp(-S(\vec{X}, a)) = C \exp(-\Omega s(\vec{x}, a)), \quad (2.2)$$

on Ω és alguna mesura de la mida del sistema i $\vec{x} = \vec{X}/\Omega$; vegeu [6]. També mostren que les taxes de transició $W(\vec{X}, r, a)$ han de ser funcions homogènies de \vec{X} per tal d'obtenir una solució de l'EM del tipus de l'equació (2.2),

$$W_i(\vec{X}, a) = \Omega w_i(\vec{x}, a), \quad \vec{x} = \frac{\vec{X}}{\Omega}. \quad (2.3)$$

En conseqüència, la probabilitat que passi una determinada reacció en un interval de temps infinitesimal és proporcional a la mida del sistema, Ω , i

està determinada només per l'estat del sistema, representat pel conjunt de les variables intensives \vec{x} . La definició

$$\psi(\vec{x}, a) = \Omega \Psi(\vec{X}, a),$$

juntament amb l'equació (2.3), ens permet escriure l'EM (2.1) en la forma WKB:

$$\frac{1}{\Omega} \frac{\partial \psi(\vec{x}, a)}{\partial a} = \sum_i (e^{-((r_i/\Omega) \cdot (\partial/\partial x))} - 1) w_i(\vec{x}, a) \psi(\vec{x}, a),$$

on hem usat que $e^{-r \cdot (\partial/\partial x)}$ és el generador de les translacions en l'espai d'estats del sistema.

Per continuar, considerem la funció característica de $\psi(\vec{x}, a)$,

$$Q(u, a) = \int_{-\infty}^{\infty} \psi(\vec{x}, a) e^{iu \cdot \vec{x}} d\vec{x}, \quad (2.4)$$

i la seva funció generatriu de cumulants associada, $q(u, a) \equiv \log(Q(u, a))$ [3, 30]. Els cumulants $q_n(a)$ de $\psi(\vec{x}, a)$ poden ser obtinguts a partir del desenvolupament:

$$q(u, a) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{i^n}{n!} u^n \cdot q_n(a),$$

on u^n representa el producte n -àdic definit per $(u^n)_{j_1, j_2, \dots, j_n} \equiv \prod_{i=1}^n u_{j_i}$ i el punt volat denota la contracció total sobre tots els índexs n . Es pot veure a [3] que de l'equació (2.4) es dedueix:

$$\frac{1}{\Omega} \frac{\partial Q(u, t)}{\partial t} = \frac{1}{(2\pi)^d} \sum_i (e^{-iu \cdot y_i} - 1) \int_{-\infty}^{\infty} w_i(v, a) Q(u - v, t) dv, \quad (2.5)$$

on $w_i(v, a)$ és la transformada de Fourier de $w_i(\vec{x}, a)$ i d és el nombre d'espècies químiques en el nostre model de cicle cel·lular. Kubo *et al.* a [30] mostren que l'equació (2.5) és el punt d'inici per a un desenvolupament asimptòtic del tipus WKB, on s'obté una jerarquia tancada d'equacions diferencials ordinàries per als cumulants $(q_n(a))$ del procés.

Kubo *et al.* [30] proven que, per a n arbitrària, els cumulants de la distribució de probabilitat (*e. g.*, $(q_1)_i = \langle x_i \rangle$; $(q_2)_{ij} = \langle x_i x_j \rangle - \langle x_i \rangle \langle x_j \rangle \dots$) satisfan la relació d'escalament següent: $q_n(a) = \epsilon^{n-1} q_{n1}(a) + \epsilon^n q_{n2}(a) + O(\epsilon^{n+1})$, on $\epsilon = \Omega^{-1}$. Aquest escalament, al seu torn, dona lloc a un desenvolupament asimptòtic consistent que porta a un sistema d'equacions diferencials ordinàries per als cumulants $q_n(a)$ en termes de tots els cumulants d'ordre inferior, $q_1(a), \dots, q_{n-1}(a)$.

L'escalament mencionat per als cumulants d'ordre n implica que es pot obtenir una aproximació gaussiana del procés tal que $X(t) = \Omega \mathcal{N}(q_{11}, \Omega^{-1/2} q_{21})$, on $q_{11}(a)$ és l'aproximació d'ordre més baix per al primer cumulant (és a dir, el primer moment, q_1), que satisfà les equacions de camp mitjà [3, 30]:

$$\dot{q}_{11} = \sum_i r_i w_i(q_{11}(a), a), \quad (2.6)$$

i $q_{21}(a)$ és l'aproximació d'ordre més baix per al segon cumulants (és a dir, la matriu de covariància, $q_2(a)$), els components del qual satisfan el conjunt d'EDO:

$$\dot{Q}_{ij}(a) = \sum_k \left(Q_{ik} \frac{\partial c_j(q_{11}, a)}{\partial q_{11k}} + \frac{\partial c_i(q_{11}, a)}{\partial q_{11k}} Q_{kj} \right) + \sum_r r_i r_j w(q_{11}, r, a), \quad (2.7)$$

on $Q_{ij} \equiv (q_{21})_{ij}$. Per a més detalls sobre el mètode WKB, inclosa l'obtenció detallada de l'equació (2.6), vegeu [3, 30].

Usem les equacions (2.6) i (2.7) per formular els sistemes d'EDO per a les contribucions d'ordre dominant per al primer i el segon cumulants (*i. e.*, el primer i el segon moment, respectivament). Substituint els valors corresponents de $w(\vec{x}, r, a)$ i r de la taula 1 a l'equació (2.6), on $q_{11} = \langle \vec{x} \rangle = \bar{x}$ és el vector mitjana, obtenim l'equació següent per a cada element del vector mitjana, on, fent un abús de notació, posem $\bar{x}_i = x_i$:

$$\begin{aligned} \frac{dm}{da} &= \eta m \left(1 - \frac{m}{m_*} \right), \\ \frac{dz}{da} &= c_{z_1} \left(1 - \frac{m}{m_*} \right) - c_{z_2} \frac{O_2}{B + O_2} z, \\ \frac{dx_1}{da} &= -d_1 x_1 e_1 + d_{-1} c_1 + d_4 y m c_2, \\ \frac{de_1}{da} &= -d_1 x_1 e_1 + (d_{-1} + d_2) c_1, \\ \frac{dc_1}{da} &= d_1 x_1 e_1 - (d_{-1} + d_2) c_1, \\ \frac{dx}{da} &= -d_3 x y m e_2 + d_{-3} y m c_2 + d_2 c_1, \\ \frac{de_2}{da} &= -d_3 x y m e_2 + (d_{-3} + d_4) y m c_2, \\ \frac{dc_2}{da} &= d_3 x y m e_2 - (d_{-3} + d_4) y m c_2, \\ \frac{dy}{da} &= a_4 - (a_1 + a_2 x + a_3 z) y. \end{aligned} \quad (2.8)$$

De manera similar, utilitzant l'equació (2.7), obtenim el conjunt d'EDO corresponent, el qual, acoblat amb les equacions (2.8), ens permet obtenir les entrades de la matriu de covariància, $\sigma(a) = (Q_{ij}(a))$.

La figura 3 mostra la comparació entre la solució numèrica de l'equació (2.8) i la simulació directa del sistema estocàstic usant l'algorisme de Gillespie [20].

Paràmetre	Valor	Font
a_1	0.04	Tyson i Novak (2001) [58]
a_2	1	Tyson i Novak (2001) [58]
a_3	0.25	Alarcón <i>et al.</i> (2004) [1]
a_4	0.04	Tyson i Novak (2001) [58]
b_3	10	Tyson i Novak (2001) [58]
b_4	35	Tyson i Novak (2001) [58]
η	0.01	Tyson i Novak (2001) [58]
m_*	10	Tyson i Novak (2001) [58]
J_3, J_4	0.04	Tyson i Novak (2001) [58]
u	1	Tyson i Novak (2001) [58]
c_{z_1}	0.1	Alarcón <i>et al.</i> (2004) [1]
c_{z_2}	0.01	Alarcón <i>et al.</i> (2004) [1]
B	0.01	Alarcón <i>et al.</i> (2004) [1]
d_1	$(0.1 + d_2)/(J_3 s_0)$	
d_3	$(0.01 + d_4)/(J_4 s_0)$	
ν	10^{-4}	
k	0.067	
κ	$1.57 \cdot 10^{-4}$	

TAULA 2: Valors dels paràmetres.

Finalment, aplicant els resultats previs relacionats amb el mètode asimptòtic WKB a l'EM, obtenim una aproximació gaussiana a la solució de l'equació (2.1):

$$\Psi(\vec{X}, a) = \left(\frac{\Omega}{2\pi}\right)^{d/2} \frac{1}{|\sigma(a)|^{1/2}} e^{-\frac{\Omega}{2}(\vec{X}(a) - \bar{X}(a))^t \sigma(a)^{-1} (\vec{X}(a) - \bar{X}(a))}, \quad (2.9)$$

on d és el nombre d'espècies químiques en el nostre model de cicle cel·lular; $|\cdot|$ denota el determinant; $()^{-1}$, la inversa; $\bar{X}(a)$ és q_{11} , i $\sigma(a)$ és la matriu de covariància (simètrica), amb Q_{ij} les seves components.

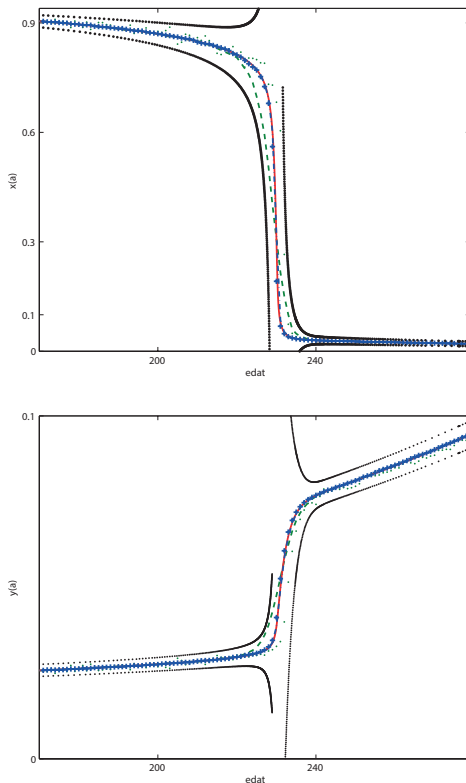


FIGURA 3: Comparació de les trajectòries de $x(a)$ i $y(a)$ obtingudes a partir de l'equació (2.8) (línies vermelles) i les obtingudes amb diferents simulacions de Gillespie. Aquestes simulacions, per a $\Omega = 10^5$, es representen en verd (100 realitzacions, línia de guions, i una sola realització, línia de punts); per a $\Omega = 10^7$, es representen en blau (100 realitzacions, línia de punts i guions, i una realització, línia de senyals). Finalment, les línies de punts negres més exteriors representen l'error ($\pm\sigma(a)$) que dona l'equació (2.7). S'ha pres $O_2 = 1.0$ i la condició inicial $\vec{x} = (5, 1.4, 0.01, 0.01, 0, 0.99, 0.01, 0, 0.01)$.

2.3 Modelització de la taxa de divisió que depèn de l'edat

L'activació de diverses vies de regulació, en particular, el cicle cel·lular, depèn de si un cert component del sistema de regulació arriba a un valor crític d'activació. En el cas del nostre sistema estocàstic per a la progressió en el cicle cel·lular, les cèl·lules passen per la transició G_1/S quan el nivell d'activitat de CycB arriba a un valor llindar. Suposem que, després que la cèl·lula passi aquesta transició, completa el cicle cel·lular i, finalment, es divideix després que un temps mitjà τ_p hagi transcorregut. Per tant, ateses certes condicions externes (en el nostre

cas, aquestes condicions estan determinades per la concentració d'oxigen), la probabilitat d'una cèl·lula de dividir-se després d'una certa edat és igual a la probabilitat que la corresponent proteïna hagi arribat al seu valor crític. Això pot ser formulat en termes d'un problema de temps de primer pas (vegeu [46]), la solució del qual dóna aquesta probabilitat de forma precisa i la seva derivada respecte a l'edat ens dóna la taxa de divisió a edat a . Un cop hem obtingut la taxa de divisió corresponent seguint aquesta metodologia, podem utilitzar-la per parametritzar una equació mestra per a l'evolució estocàstica de la població cel·lular.

Per calcular la taxa de divisió (és a dir, la probabilitat de divisió per cèl·lula i per unitat de temps) en termes d'un problema de temps de primer pas, considerem que la transició G_1/S ocorre quan l'activació de la ciclina arriba al valor llindar i , per tant, podem definir la taxa de divisió com una funció del temps, és a dir, $b(a) = \partial_a(1 - G(a)) = - \int_R \partial_a \Psi(\vec{X}(a)) d\vec{X}$, amb $R = \{y < k, (m, z, x_1, e_1, c_1, x, e_2, c_2) \in \mathbb{R}^{d-1}\}$, on $1 - G(a)$ és la probabilitat que la ciclina-CDK estigui per sobre del seu valor llindar a l'edat a . $G(a) = \int_R \Psi(\vec{X}(a)) d\vec{X}$ és l'anomenada *probabilitat de supervivència*, i. e., la probabilitat que $\vec{X}(a) \in R$. Si Ψ és aproximada per l'equació (2.9), podem obtenir una equació tancada per a G , en termes de G , \bar{x} i Q_{ij} .

Estem interessats en la regió on y és més gran que una constant, k , amb totes les altres variables variant sobre tots els seus rangs. Per tant, en aquest cas, l'expressió de G es redueix a:

$$\begin{aligned}
 G(a) &= \int_{y < k} \int_{\mathbb{R}^{d-1}} \frac{\Omega^{1/2}}{(2\pi)^{1/2} \sigma_y^{1/2}} e^{-\frac{\Omega}{2}(y - \bar{y}(a))^2 \sigma_y^{-1}} \times \\
 &\quad \times \left(\frac{\Omega}{2\pi} \right)^{(d-1)/2} \frac{1}{A^{1/2}} e^{-\frac{\Omega}{2}(\bar{X}_{|y} - b)^t A^{-1}(\bar{X}_{|y} - b)} d\bar{X}_{|y} dy = \quad (2.10) \\
 &= \int_{y < k} \frac{\Omega^{1/2}}{(2\pi)^{1/2} \sigma_y^{1/2}} e^{-\frac{\Omega}{2}(y - \bar{y}(a))^2 \sigma_y^{-1}} dy,
 \end{aligned}$$

on $\bar{X}_{|y} = (m, z, x_1, e_1, c_1, x, e_2, c_2)$, $A = |\sigma(a)|/\sigma_y$, $b = \bar{X}_{|y}(a) + \frac{\Sigma_{ij}}{\sigma_y} (y - \bar{y}(a))$ i $\Sigma_{ij} = \sigma_{jj} - \sigma_{ij}^T \sigma_{ii}^{-1} \sigma_{ij}$ (matriu de covariància condicionada).

Per tant, $G(a)$ pot ser reescrita usant la funció error, tal com segueix:

$$G(a) = \frac{1}{2} \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{\sqrt{\Omega}(k - \bar{y}(a))}{\sqrt{2\sigma_y}} \right) \right). \quad (2.11)$$

Així, doncs, l'equació per a la taxa de divisió s'obté derivant l'equació de G a (2.10):

$$\begin{aligned} \frac{dG(a)}{da} = & -\frac{1}{2} \frac{\frac{d}{da} \sigma_y(a)}{\sigma_y(a)} G(a) + \Omega \int_{y < k} \frac{d\phi(y)}{dy} \frac{dy(a)}{da} \Psi(y(a)) dy + \\ & + \Omega \frac{\frac{d}{da} \sigma_y(a)}{\sigma_y(a)} \int_{y < k} \phi(y) \Psi(y(a)) dy, \end{aligned} \quad (2.12)$$

on $\phi(y) = \frac{1}{2}(y - \bar{y}(a))^2 \sigma_y(a)^{-1}$.

Utilitzant el teorema de la divergència i desenvolupant per Taylor, la primera integral de l'equació (2.12) queda:

$$\begin{aligned} I_1 = & \left(\frac{\Omega}{2\pi\sigma_y} \right)^{1/2} \frac{dy(a)}{da} e^{-\Omega\phi(y)} \sum_i \frac{1}{i!} \Omega^i \phi(y)^i \Big|_{-\infty}^k = \\ = & \left(\frac{\Omega}{2\pi\sigma_y} \right)^{1/2} \frac{dy(a)}{da} \left(1 - e^{-\Omega\phi(y)} \right) \Big|_{-\infty}^k, \end{aligned}$$

mentre que la segona integral de l'equació (2.12) pot ser aproximada estenent el domini d'integració a $\pm\infty$:

$$\begin{aligned} I_2 = & \Omega \frac{\frac{d}{da} \sigma_y(a)}{\sigma_y(a)} \frac{1}{\sigma_y^{1/2}} \int_{-\infty}^{\infty} \phi(y) \left(\frac{\Omega}{2\pi} \right)^{1/2} e^{-\frac{\Omega}{2}(y - \bar{y}(a))^2 \sigma_y^{-1}} dy = \\ = & \frac{1}{2} \frac{\frac{d}{da} \sigma_y(a)}{\sigma_y(a)}. \end{aligned}$$

Hem comprovat mitjançant integració numèrica que l'error introduït en canviar el domini d'integració ($y < k$) per \mathbb{R} a I_2 és negligible.

Finalment, podem concloure que l'EDO que $G(a)$ ha de satisfer és:

$$\frac{dG(a)}{da} = -\frac{1}{2} \frac{\frac{d}{da} \sigma_y(a)}{\sigma_y(a)} (G(a) - 1) - \left(\frac{\Omega}{2\pi\sigma_y} \right)^{1/2} \frac{dy(a)}{da} e^{-\Omega\phi(k)}. \quad (2.13)$$

L'equació (2.13), resolta conjuntament amb les equacions (2.8) i (2.7), dona la taxa de divisió com a funció de l'edat i de la concentració d'oxigen.

La figura 4 mostra la probabilitat que la ciclina-CDK excedeixi el seu valor llimdar, $1 - G(a)$, usant l'equació (2.11) acoblada amb les equacions (2.8) i (2.7), i compara el resultat amb l'algorisme de simulació estocàstica de Gillespie [20].

A la figura 5 hem representat la taxa de divisió per a diferents concentracions d'oxigen. Com podem veure, el màxim valor de $b(a)$ ocorre a temps més avançats per a concentracions d'oxigen menors. Això confirma que la falta d'oxigen retarda que ocorri la transició G_1/S . A la figura 6 s'observa que la probabilitat de divisió té més variància si incrementem el soroll en el procés.

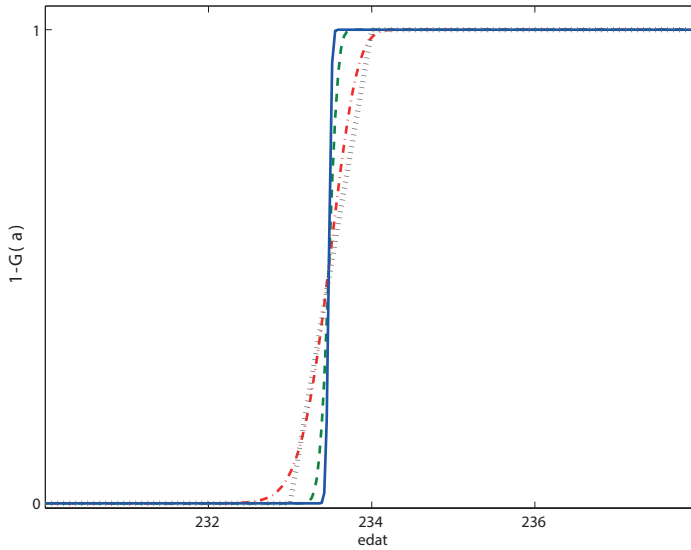


FIGURA 4: Comparació de diferents solucions de l'equació (2.11) i 100 realitzacions de l'algorisme de Gillespie amb $\Omega = 10^7$ (línia negra de guions verticals). Les solucions de l'equació (2.11) es donen per a $\Omega = 10^7$ (línia vermella de punts i guions), 10^8 (línia verda de guions), 10^9 (línia blava). S'ha pres $O_2 = 1.0$ i la condició inicial $\vec{x} = (5, 1.4, 0.01, 0.01, 0, 0.99, 0.01, 0, 0.01)$.

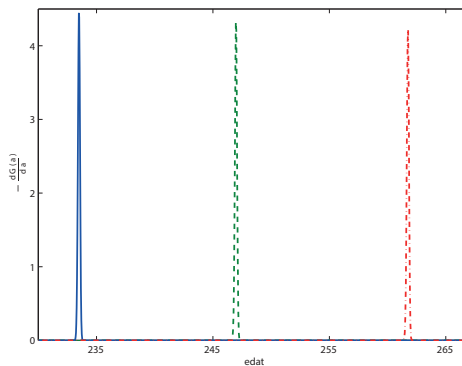


FIGURA 5: Equació (2.13): taxa de naixement per a diferents concentracions d'oxigen, amb $O_2 = 0.05$ (línia vermella de punts i guions), $O_2 = 0.1$ (línia verda de guions), $O_2 = 1$ (línia blava). Per a $\Omega = 10^7$ i condició inicial $\vec{x} = (5, 1.4, 0.01, 0.01, 0, 0.99, 0.01, 0, 0.01)$.

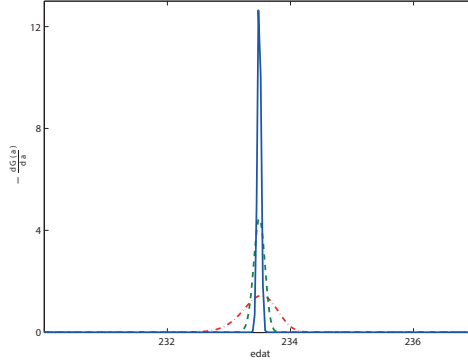


FIGURA 6: Comparació de les solucions de l'equació (2.13) per a diferents valors: $\Omega = 10^7$ (línia vermella de punts i guions), 10^8 (línia verda de guions), 10^9 (línia blava). S'ha pres $O_2 = 1.0$ i condició inicial $\vec{x} = (5, 1.4, 0.01, 0.01, 0, 0.99, 0.01, 0, 0.01)$.

3 Equació mestra estructurada per l'edat i aproximació WKB

3.1 Formulació de l'equació mestra estructurada per l'edat

Ara ja estem en disposició de formular el nostre model per a la dinàmica poblacional. Utilitzant el context anterior, calculem la taxa de naixement com a funció de l'edat cel·lular. Formulem un procés de naixement-mort que depèn de l'edat. Els paràmetres com la taxa de divisió que depèn de l'oxigen i de l'edat es determinen en termes dels models analitzats a l'escala intracel·lular, descrits a la secció anterior. Per obtenir l'equació mestra que depèn de l'edat, considerem la identitat següent:

$$\begin{aligned} \mathbf{P}(\bar{n}(a), a + \delta a, t + \delta t) &= W(\bar{n}(a) + 1, a, t) \delta t \mathbf{P}(\bar{n}(a) + 1, a, t) + \\ &+ (1 - W(\bar{n}(a), a, t) \delta t) \mathbf{P}(\bar{n}(a), a, t), \end{aligned} \quad (3.1)$$

on $\bar{n}(a, t)$ denota la població d'edat a al temps t i on $W(\bar{n}(a), a, t) = (\nu + b(a))\bar{n}(a)$, amb la taxa de divisió donada per $b(a) = -\frac{dG(a)}{da}$ i ν és la taxa de mortalitat, suposada constant.

Per claredat, discretitzem la variable edat a en I_t grups, de manera que les p_{0j} divisions a edat a_j estan determinades per una variable aleatòria de Poisson amb mitjana (i variància) $\lambda_j = b(a_j)n(a_j)\delta t$, distribució que denotarem per \mathcal{P}_{λ_j} . La probabilitat de p_0 divisions en l'interval de temps $(t, t + \delta t)$ pot ser expressada com una suma de les divisions a temps t en els diferents grups d'edat a_j , és a dir, tots els possibles p_{0j} tals que $p_0 = \sum_{j \in I_t} p_{0j}$. Per tant,

$$\text{Prob}(p_0) = \mathbf{P}(\bar{n}(0) = 2p_0, t) = \sum_{\{p_{0j}\}_{j \in I_t}} \left(\prod_{j \in I_t} P_{\mathcal{P}_{\lambda_j}}(p_{0j}) \right) \delta_{\sum_j p_{0j}, p_0}, \quad (3.2)$$

on $P_{P_{\lambda_j}}(p_{0j}) = e^{-\lambda_j} \frac{\lambda_j^{p_{0j}}}{p_{0j}!}$ denota la probabilitat que la variable de Poisson de paràmetre $\lambda_j = b(a_j)n(a_j)\delta t$ valgui p_{0j} . Quan l'esdeveniment d'una divisió ocorre, el nombre de cèl·lules amb edat $a = 0$ s'incrementa en $2p_0$, mentre que el nombre de cèl·lules amb edat $a = a_j$ disminueix en p_{0j} .

Reordenant l'equació (3.1) i prenent el límit quan $\delta t \rightarrow 0$, obtenim:

$$\frac{\partial \mathbf{P}(\bar{n}, a, t)}{\partial t} + \frac{\partial \mathbf{P}(\bar{n}, a, t)}{\partial a} = W(\bar{n}(a) + 1, a, t)\mathbf{P}(\bar{n}(a) + 1, a, t) - W(\bar{n}(a), a, t)\mathbf{P}(\bar{n}(a), a, t). \quad (3.3)$$

Per tal de trobar una solució aproximada de l'equació (3.3), apliquem el mètode WKB proposat per Kubo *et al.* a [30], on es mostra que les taxes de transició $W(\bar{n}, a, t)$ han de ser funcions homogènies de \bar{n} per tal d'obtenir una solució de l'EM de la forma $P(\bar{n}(a), a, t) = C \exp(-\Omega s(n(a), a, t))$, amb $n(a) = \bar{n}(a)/\Omega$:

$$W(\bar{n}(a), a, t) = \Omega \mathbf{w}(n(a), a, t). \quad (3.4)$$

D'acord amb això, la probabilitat que passi una certa reacció en un interval infinitesimal de temps és proporcional a la mida del sistema i només és determinada per l'estat del sistema, representat pel conjunt de les variables intensives $n(a)$. La definició

$$P(n(a), a, t) = \Omega \mathbf{P}(\bar{n}(a), a, t),$$

juntament amb l'equació (3.4), fa que l'equació (3.3) tingui l'expressió següent:

$$\frac{1}{\Omega} \left(\frac{\partial P(n, a, t)}{\partial t} + \frac{\partial P(n, a, t)}{\partial a} \right) = (v + b(a))(n(a) + 1)P(n(a) + 1, a, t) - (v + b(a))n(a)P(n(a), a, t),$$

la qual cosa ens permet escriure l'EM (3.3) en forma WKB:

$$\frac{1}{\Omega} \left(\frac{\partial P(n, a, t)}{\partial t} + \frac{\partial P(n, a, t)}{\partial a} \right) = \left(e^{1/\Omega(\partial/\partial n(a))} - 1 \right) \mathbf{w}(n(a), a, t)P(n(a), a, t), \quad (3.5)$$

on hem utilitzat que $e^{-(\partial/\partial n(a))}$ és el generador de les translacions a l'espai d'estats del sistema.

Considerem ara la funció generatriu de cumulants, definida com $q(u, a, t) = \log(Q(u, a, t))$, on $Q(u, a, t)$ és la funció característica de $P(n, a, t)$, definida com la seva transformada de Fourier:

$$Q(u, a, t) = \int_{-\infty}^{+\infty} e^{iu n} P(n, a, t) dn.$$

Els cumulants, $q_k(a, t)$, es poden obtenir a partir de $q(u, a, t)$, com els coeficients del desenvolupament:

$$q(u, a, t) = \sum_{k=1}^{\infty} \frac{i^k}{k!} u^k q_k(a, t). \quad (3.6)$$

El procediment que seguim a continuació, que està basat en la feina de Kubo *et al.* a [30], és escriure una equació per a $Q(u, a, t)$ i construir desenvolupaments asimptòtics per a $Q(u, a, t)$, $q(u, a, t)$ i $q_k(a, t)$. Aquestes aproximacions donaran lloc a sistemes d'EDO per als cumulants i per als moments de la solució de l'EM. Estem interessats en el sistema d'equacions per al primer moment ($q_1(a, t)$) i per als elements de la matriu de covariància ($q_2(a, t)$), que ens permetran estudiar el comportament mitjà del sistema i les fluctuacions gaussianes al seu voltant.

Per obtenir l'equació per a $Q(u, a, t)$, prenem la transformada de Fourier de l'EM, equació (3.5):

$$\begin{aligned} \frac{1}{\Omega} \left(\frac{\partial Q(u, a, t)}{\partial t} + \frac{\partial Q(u, a, t)}{\partial a} \right) = \\ = \int_{-\infty}^{\infty} e^{iun} \left(e^{1/\Omega(\partial/\partial n(a))} - 1 \right) \mathbf{w}(n(a), a, t) P(n(a), a, t) dn. \end{aligned} \quad (3.7)$$

La integral del costat dret de l'equació (3.7) és:

$$\begin{aligned} \int_{-\infty}^{\infty} e^{iun} \left(e^{1/\Omega(\partial/\partial n(a))} - 1 \right) \mathbf{w}(n(a), a, t) P(n(a), a, t) dn = \\ = \sum_{k=1}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} e^{iun} \left(\frac{1}{\Omega} \frac{\partial}{\partial n} \right)^k \mathbf{w}(n, a, t) P(n, a, t) dn = \\ = \sum_{k=1}^{\infty} \frac{1}{k!} \left(i \frac{u}{\Omega} \right)^k \int_{-\infty}^{\infty} e^{iun} \mathbf{w}(n, a, t) P(n, a, t) dn. \end{aligned} \quad (3.8)$$

A més, substituint l'equació (3.8) a l'equació (3.7), reordenant termes i recordant que la transformada de Fourier del producte de dues funcions és igual a la convolució de les transformades de Fourier corresponents, obtenim finalment:

$$\begin{aligned} \frac{1}{\Omega} \left(\frac{\partial Q(u, a, t)}{\partial t} + \frac{\partial Q(u, a, t)}{\partial a} \right) = \\ = \frac{1}{2\pi} \left(e^{i\frac{u}{\Omega}} - 1 \right) \int_{-\infty}^{\infty} Q(u - v, a, t) \omega(v, a, t) dv, \end{aligned} \quad (3.9)$$

on $\omega(v, a, t)$ és una transformada de Fourier de $\mathbf{w}(n, a, t)$.

L'equació (3.9) necessita ser complementada amb condicions de frontera per a $P(n, a = 0, t)$, és a dir, per la probabilitat que el nombre de divisions en l'interval de temps $(t, t + \delta t)$ sigui $p_0 = n/2$. Tal com l'hem expressat a (3.2), el nombre de divisions en aquest interval de temps pot ser escrit com una suma de les p_{0j} divisions a temps t en els grups d'edat a_j , és a dir,

$$P(n = 2p_0, a = 0, t) = \sum_{\{p_{0j}\}} \left(\prod_j P_{p_{0j}}(p_{0j}) \right) \delta_{\sum_j p_{0j}, p_0},$$

on \mathcal{P}_{λ_j} és una distribució de Poisson de paràmetre $\lambda_j = b(a_j)n(a_j)\delta t$ i $P_{\mathcal{P}_{\lambda_j}}(p_{0j})$ denota la probabilitat que aquesta variable valgui p_{0j} :

$$P_{\mathcal{P}_{\lambda_j}}(p_{0j}) = e^{-\lambda_j} \frac{\lambda_j^{p_{0j}}}{p_{0j}!},$$

i, en conseqüència, la corresponent funció generatriu de cumulants per la variable aleatòria p_{0j} és $Q_j(s) = e^{\lambda_j(e^{is}-1)}$. Ara, com que $P(p_0)$ és una convolució, la funció generatriu de cumulants per a $P(p_0)$, $Q(s, a = 0, t)$, està determinada per [24]:

$$Q(s, a = 0, t) = \prod_j Q_j(s) = e^{\sum_j b(a_j)n(a_j)(e^{is}-1)\delta t},$$

que, prenent el límit quan $\delta t \rightarrow 0$, dóna:

$$Q(s, a = 0, t) = e^{\int_0^\infty (e^{is}-1)b(a)n(a)da}. \quad (3.10)$$

3.2 Anàlisi WKB de l'equació mestra estructurada per l'edat

Un cop hem formulat la nostra equació mestra estructurada per l'edat, o, més aviat, el problema equivalent per a la corresponent funció generatriu, equacions (3.9) i (3.10), podem dur a terme la seva anàlisi WKB [3, 30]. Abans de continuar, recordem que $Q(s, a, t)$ està relacionada amb la funció generatriu dels cumulants, $q(s, a, t)$: $Q(s, a, t) = \exp(q(s, a, t))$, una relació que pot ser reexpressada com:

$$Q(u - v, a, t) = e^{q(u-v, a, t)} = \exp\left(\sum_{k=0}^{\infty} \frac{i^k}{k!} u^k q^{(k)}(-v, a, t)\right), \quad (3.11)$$

on $q(u - v, a, t)$ ha estat reemplaçada per $q(u - v, a, t) = e^{u\partial_v} q(-v, a, t)$ i $q^{(k)}(-v, a, t) \equiv (\partial_u)^k q(u, a, t)|_{u=-v}$. Usant l'equació (3.11), l'equació (3.9) es converteix en:

$$\begin{aligned} & \frac{1}{\Omega} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{i^k}{k!} u^k \left(\frac{\partial q_k(a, t)}{\partial t} + \frac{\partial q_k(a, t)}{\partial a} \right) = \\ & = \frac{1}{2\pi} \left(e^{i\frac{u}{\Omega}} - 1 \right) \int_{-\infty}^{\infty} \frac{Q(u - v, a, t)}{Q(u, a, t)} \omega(v, a, t) dv = \\ & = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \left[\left(e^{i\frac{u}{\Omega}} - 1 \right) \exp\left(\sum_{j=1}^{\infty} \frac{i^j}{j!} u^j h_j(-v, a, t) \right) e^{q(-v, a, t)} \omega(v, a, t) dv \right]. \end{aligned} \quad (3.12)$$

Per conveniència, hem definit la quantitat següent:

$$h_j(-v, a, t) \equiv i^j (q^{(j)}(-v, a, t) - q^{(j)}(0, a, t))$$

i hem utilitzat que $q^{(0)}(-v, a, t) = q(-v, a, t)$.

Centrem-nos ara en el primer cumulants $q_1(a, t) = \langle n(a, t) \rangle$, que està determinat pels termes $O(\epsilon)$ a l'equació (3.12). Desenvolupant les exponencials del costat dret de l'equació (3.12) i conservant només els termes de primer ordre, obtenim:

$$\epsilon \left(\frac{\partial q_1(a, t)}{\partial t} + \frac{\partial q_1(a, t)}{\partial a} \right) = -\frac{\epsilon}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} e^{q(-v, a, t)} \omega(v, a, t) m_0(\epsilon, v, a, t) dv, \quad (3.13)$$

on $\epsilon \equiv \Omega^{-1}$ i $m_k(\epsilon, v, a, t)$ està definida per:

$$\exp \left(\sum_{j=1}^{\infty} \frac{i^j}{j!} u^j h_j(-v, t) \right) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{i^k}{k!} u^k m_k(\epsilon, v, a, t). \quad (3.14)$$

L'equació (3.13) ha de ser equilibrada correctament respecte del petit paràmetre ϵ . Aquest equilibri s'aconsegueix si, a l'ordre dominant, $m_0(\epsilon, v, a, t) = O(\epsilon^0)$, que, de fet, se satisfà, ja que $m_0(\epsilon, v, a, t) = 1$ (vegeu l'equació (3.14)) i $q_1(a, t) = O(\epsilon^0)$.

Repetint el mateix per al segon cumulants, $q_2(a, t)$, obtenim:

$$\begin{aligned} \frac{\epsilon}{2} \left(\frac{\partial q_2(a, t)}{\partial t} + \frac{\partial q_2(a, t)}{\partial a} \right) &= \\ &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \left(-\epsilon m_1(\epsilon, v, a, t) + \frac{\epsilon^2}{2} m_0(\epsilon, v, a, t) \right) e^{q(-v, a, t)} \omega(v, a, t) dv. \end{aligned} \quad (3.15)$$

Equilibrant l'equació (3.15), s'obté l'escalament següent a l'ordre dominant: $q_2(a, t) = O(\epsilon)$ i $m_1(\epsilon, v, a, t) = O(\epsilon)$. Es pot comprovar que aquestes relacions d'escalament són coherents amb l'equació (3.14).

En general, podem veure que la substitució d'escalament

$$\begin{aligned} q_k(a, t) &= \epsilon^{k-1} q_{k1}(a, t) + \epsilon^k q_{k2}(a, t) + O(\epsilon^{k+1}), \\ m_k(\epsilon, v, a, t) &= \epsilon^k m_{k1}(v, a, t) + \epsilon^{k+1} m_{k2}(v, a, t) + O(\epsilon^{k+2}), \end{aligned}$$

és coherent amb l'equació (3.14) i porta a equacions equilibrades per als cumulants $q_k(a, t)$.

A ordre dominant, l'equació per a $q_1(a, t)$ és de la forma:

$$\left(\frac{\partial q_1(a, t)}{\partial t} + \frac{\partial q_1(a, t)}{\partial a} \right) = -\frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} e^{q(-v, a, t)} \omega(v, a, t) dv, \quad (3.16)$$

mentre que l'equació corresponent per a $q_2(a, t)$ és:

$$\begin{aligned} \frac{\epsilon}{2} \left(\frac{\partial q_2(a, t)}{\partial t} + \frac{\partial q_2(a, t)}{\partial a} \right) &= \\ &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \left(-\epsilon m_1(\epsilon, v, a, t) + \frac{\epsilon^2}{2} \right) e^{q(-v, a, t)} \omega(v, a, t) dv. \end{aligned} \quad (3.17)$$

L'aproximació a l'ordre dominant de l'equació (3.17) s'obté de la manera següent. De les definicions de les quantitats h_j i m_j , n'obtenim l'expressió següent per a h_j :

$$h_j(-v, a, t) = i^{-j} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{i^{k+j}}{k+j} (\partial_u)^j \left(u^{(k+j)} q_{(k+j)}(a, t) \right) \Big|_{u=-v}.$$

Per a $j = 1$, de l'equació (3.14), deduïm que $m_1 = h_1$. Tenint en compte la substitució d'escalament de m_k i q_k , obtenim l'aproximació d'ordre $O(\epsilon)$ següent:

$$\epsilon m_{11}(v, a, t) = \epsilon \frac{i}{2} \partial_v (v^2 q_{21}(a, t)). \quad (3.18)$$

Per tant, substituint l'equació (3.18) i quedant-nos només amb les contribucions de l'ordre dominant, l'equació per a $q_{21}(a, t)$ queda així:

$$\left(\frac{\partial q_{21}(a, t)}{\partial t} + \frac{\partial q_{21}(a, t)}{\partial a} \right) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} (-iv q_{21}(a, t) + 1) e^{q(-v, a, t)} \omega(v, a, t) dv.$$

A més a més, la substitució d'escalament per a $q_k(a, t)$ i l'equació (3.6) porten a:

$$q(u, a, t) = \frac{1}{\epsilon} \rho(\epsilon, u, a, t),$$

$$\rho(\epsilon, u, a, t) = \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{i^j}{j!} u^j \left(\epsilon^{j+k-1} q_{jk}(a, t) \right). \quad (3.19)$$

Això pràcticament completa la nostra deducció de les equacions d'evolució per a $q_1(a, t)$ i $q_2(a, t)$. A l'ordre dominant, l'equació (3.19) pot ser reescrita com a:

$$\rho(\epsilon, u, a, t) = \epsilon \rho_1(u, a, t) + O(\epsilon^2), \quad (3.20)$$

$$\rho_1(u, a, t) = iu q_{11}(a, t). \quad (3.21)$$

Substituint les equacions (3.20) i (3.21) a l'equació (3.16), obtenim que, a l'ordre dominant, les equacions per a $q_{11}(a, t)$ i $q_{21}(a, t)$ són les següents:

$$\left(\frac{\partial q_{11}(a, t)}{\partial t} + \frac{\partial q_{11}(a, t)}{\partial a} \right) = -\frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} e^{q(-v, a, t)} \bar{w}(v, a, t) dv = c(q_{11}, t),$$

on $\bar{w}(v, a, t)$ és la transformada de Fourier de $w(n, a, t)$ i, per tant, tenim $c(q_{11}, t) = -(v + b(a))q_{11}$.

Finalment, l'equació d'evolució per a $n(a, t) = q_{11}(a, t)$ és:

$$\left(\frac{\partial n(a, t)}{\partial t} + \frac{\partial n(a, t)}{\partial a} \right) = -(v + b(a))n(a, t),$$

$$n(0, t) = 2 \int_0^{\infty} b(a)n(a, t) da, \quad (3.22)$$

mentre que l'equació per a la variància i $\sigma_n(a, t) = q_{21}(a, t)$ és:

$$\left(\frac{\partial \sigma_n(a, t)}{\partial t} + \frac{\partial \sigma_n(a, t)}{\partial a} \right) = (\nu + b(a)) \sigma_n(a, t) - (\nu + b(a)),$$

$$\sigma_n(0, t) = 4 \int_0^\infty b(a) n(a, t) da. \quad (3.23)$$

3.3 Aproximació gaussiana per al model estocàstic multiescala

Després dels càlculs de les seccions anteriors, ara ja podem escriure l'aproximació gaussiana per al model multiescala representat esquemàticament a la figura 1. El sistema acoblat que determina aquesta aproximació és el següent:

- Concentració d'oxigen, O_2 :

$$\frac{dO_2}{dt} = S - \kappa O_2 M, \quad \text{on } M(t) = \int_0^\infty n(a, t) da, \quad (3.24)$$

on O_2 és la concentració d'oxigen consumida per la població total, $M(t)$; S és la taxa de distribució d'oxigen a la població, la qual nosaltres suposem constant, i κ és la taxa de consum d'oxigen per cèl·lula, la qual suposem que és independent de l'edat.

- Taxa de divisió que depèn de l'edat i de l'oxigen (secció 3):

$$\dot{\bar{x}} = \sum_i r_i w_i(\bar{x}(a), r, a, O_2),$$

$$\dot{Q}_{ij}(a) = \sum_k \left(Q_{ik} \frac{\partial c_j(\bar{x}, a)}{\partial \bar{x}_k} + \frac{\partial c_i(\bar{x}, a)}{\partial \bar{x}_k} Q_{kj} \right) + \sum_r r_i r_j w(\bar{x}, r, a, O_2), \quad (3.25)$$

$$-b(a) = \frac{dG(a)}{da} = -\frac{1}{2} \frac{d}{da} \frac{\sigma_y(a)}{\sigma_y(a)} (G(a) - 1) - \left(\frac{\Omega}{2\pi\sigma_y} \right)^{1/2} \frac{dy(a)}{da} e^{-\Omega\phi(k)}.$$

- Mitjana i variància de la població estructurada per l'edat (subseccions 3.1 i 3.2):

$$\frac{\partial n(a, t)}{\partial t} + \frac{\partial n(a, t)}{\partial a} = -(\nu + b(a)) n(a, t),$$

$$n(0, t) = 2 \int_0^\infty b(a) n(a, t) da, \quad (3.26)$$

$$\frac{\partial \sigma_n(a, t)}{\partial t} + \frac{\partial \sigma_n(a, t)}{\partial a} = (\nu + b(a)) \sigma_n(a, t) - (\nu + b(a)),$$

$$\sigma_n(0, t) = 4 \int_0^\infty b(a) n(a, t) da.$$

4 Esquema numèric: mètode de salt τ que depèn de l'edat

En aquesta secció, descrivim un mètode numèric estocàstic per comparar la solució de l'EM (3.3)–(3.2) amb les solucions de l'aproximació WKB donades pel sistema d'equacions (3.24)–(3.26).

Utilitzem una extensió del mètode de simulació de salt τ en el procés naixement-mort descrit per l'EM (3.3)–(3.2), on la probabilitat de divisió està determinada per l'equació (2.11). Utilitzant un salt τ a cada grup d'edat a_i present a la població, generem un pas de temps a cada edat, τ_i . El pas de temps global, τ , es tria de forma que sigui el mínim dels τ_i per a tot i . Arribats a aquest punt, podem calcular el nombre d'esdeveniments divisió i esdeveniments mort que ocorreran durant el lapse de temps τ a cada grup d'edat a_i , que són modelats per distribucions de Poisson $\mathcal{P}(d_{ij}\tau)$, on:

$$d_{i1} = b(a_i)n(a_i), \tag{4.1}$$

$$d_{i2} = \nu n(a_i). \tag{4.2}$$

Les igualtats (4.1) i (4.2) donen les probabilitats de divisió i de mort durant un (petit) interval de temps de durada τ per a cèl·lules d'edat a_i . Els esdeveniments amb probabilitats donades per (4.1) i (4.2) produeixen canvis associats a la població $n(a_i)$ donats per $r_{i1} = -1$ i $r_{i2} = -1$, respectivament. Addicionalment, un esdeveniment divisió (la probabilitat del qual és donada per (4.1)) té un canvi associat a les cèl·lules nounades, és a dir, a les cèl·lules amb edat $a = 0$, donat per $r_0 = 2$.

Primer, introduïrem el mètode i explicarem com generalitzar-lo al nostre problema estructurat per l'edat. Després, procedirem a descriure l'algorisme usat en les nostres simulacions.

4.1 Mètode de salt τ estructurat per l'edat

En aquesta secció, explicarem el mètode de salt τ descrit a [12, 21] i la modificació que nosaltres n'hem fet. L'algorisme de simulació estocàstica de Gillespie (SSA) [20] proporciona realitzacions exactes de la densitat de probabilitat que resolen l'equació mestra corresponent. Per aconseguir-ho, el que fa l'algorisme és dur a terme tots els esdeveniments en el camí de mostra, la qual cosa significa que aquest mètode pot ser molt lent, en particular, per a sistemes que involucrin processos tant ràpids com lents. L'algorisme de simulació estocàstica SSA també genera una gran quantitat d'informació detallada de cada camí mostral, el coneixement de la qual pot ser innecessari en moltes aplicacions. En vista d'aquesta situació, el mètode de salt τ [21] va ser proposat amb l'objectiu d'accelerar la simulació dels processos de Markov, la qual cosa respon a la qüestió següent: amb quina freqüència es produeix cada procés en l'interval següent de temps especificat τ ? El fonament matemàtic d'aquest algorisme pot remuntar-se a l'anomenada *representació dels processos de Markov*. Més específicament, suposem un procés de Markov, $X(t)$, la densitat

de probabilitat del qual satisfà l'equació mestra:

$$\frac{d\Psi(X, t)}{dt} = \sum_i (W_i(X - r_i, t)\Psi(X - r_i, t) - W_i(X, t)\Psi(X, t)). \quad (4.3)$$

Cada reacció i , involucrada en el procés descrit per l'equació (4.3), està caracteritzada per una distribució de temps d'espera exponencial [20]:

$$P_i(t_w | X(t)) = W_i(X, t)e^{-t_w/W_i(X, t)}.$$

Per tant, sabem que el nombre de vegades que el canal i és utilitzat en l'interval de temps $(0, t)$ és $\mathcal{P}\left(\int_0^t W_i(X, s) ds\right)$, on $\mathcal{P}(\lambda)$ és un nombre aleatori amb distribució de Poisson amb paràmetre λ ; vegeu [24]. Aleshores, $X(t)$ es pot representar formalment com:

$$X(t) = X(t=0) + \sum_i r_i \mathcal{P}\left(\int_0^t W_i(X, s) ds\right).$$

Utilitzant la propietat de Markov, $X(t + \tau)$ pot ser expressat en termes de $X(t)$ com:

$$X(t + \tau) = X(t) + \sum_i r_i \mathcal{P}\left(\int_t^{t+\tau} W_i(X, s) ds\right). \quad (4.4)$$

Així, doncs, la qüestió que el mètode de salt τ pretén respondre pot ser reformulada de la forma següent: sota quines condicions l'equació (4.4) pot ser aproximada per

$$X(t + \tau) \simeq X(t) + \sum_i r_i \mathcal{P}(W_i(X, t)\tau).$$

Dit d'una altra manera, necessitem estimar τ de forma que $\int_t^{t+\tau} W_i(X, s) ds \simeq W_i(X, t)\tau$. Aquest és un problema per al qual encara no es coneix cap solució sistemàtica. En canvi, s'han donat diverses estimacions, conegudes com a *condicions de salt*, sota certes hipòtesis [12, 21]. A grans trets, podem dir que τ necessita ser triat de forma que $|W_i(X, t + k_i) - W_i(X, t)|$ sigui acotat per una quantitat petita.

Per tal de generalitzar aquest mètode al nostre model estructurat per l'edat, considerem primer un vector d'edats, les components del qual són $n(a_i)$ amb $i \in I_t$, on I_t es mou en el conjunt de les edats presents a la població a l'instant t , és a dir, de forma que $n(a_i) > 0$ a temps t . El primer problema és triar un valor per a τ que satisfaci la condició de salt. La generalització més simple de l'algorisme de salt τ estàndard és triar un valor de salt, τ_i , per a cada edat, a_i , amb $i \in I_t$, d'acord amb el criteri establert a [12], i després triar el mínim entre tots ells.

Comencem calculant el temps, τ_i , per a cada edat, a_i , amb $i \in I_t$, utilitzant el mètode formulat per Cao *et al.* a [12], que millora els resultats previs de Gillespie i Petzold a [22], ja que s'ajusta millor a la condició de salt tot acotant

uniformement els canvis relatius en les funcions de tendència. A més a més, aquest mètode és més ràpid que el procediment suggerit a [22], ja que el nombre de passos auxiliars utilitzats per calcular el salt de temps s'incrementa linealment amb el nombre d'espècies reactants, en lloc de fer-ho de forma quadràtica amb el nombre de canals de reacció [12].

L'estratègia darrere d'aquest procediment de selecció dels τ_i és acotar els canvis relatius en el nombre d'individus de les poblacions, de forma que els canvis relatius en les funcions de tendència siguin tots aproximadament acotats per un valor específic ϵ ($0 < \epsilon < 1$). Sigui

$$\Delta_{\tau_i} n(a_i) \equiv n(a_i)(t + \tau_i) - n(a_i)(t) = - \sum_{j=1}^2 \mathcal{P}(d_{ij}\tau_i). \quad (4.5)$$

La selecció de τ l'hem de basar en la condició

$$\Delta_{\tau_i} n(a_i) \leq \max\{\epsilon d_{ij}, 1\}, \quad \text{per a } i \in J_{rs} \text{ i } j = 1, 2, \quad (4.6)$$

on J_{rs} denota el conjunt d'índexs de tota la població amb edat diferent (o sigui, $i \in J_{rs}$ si i només si d_{ij} és l'argument de com a mínim una funció de tendència).

Com que les variables aleatòries Poisson $\mathcal{P}(d_{ij}\tau_i)$ del costat dret de l'equació (4.5) són estadísticament independents i tenen mitjanes i variàncies $d_{ij}\tau_i$, la mitjana i la variància de la combinació lineal de l'equació (4.5) poden ser calculades fàcilment,

$$\langle \Delta_{\tau_i} n(a_i) \rangle = \sum_j -d_{ij}\tau_i, \quad \text{var}\{\Delta_{\tau_i} n(a_i)\} = \sum_j d_{ij}\tau_i. \quad (4.7)$$

Utilitzant el mateix raonament que es va fer servir en la derivació del procediment de Gillespie i Petzold per a la selecció de τ [22], nosaltres considerarem que la cota (4.6) de $\Delta_{\tau_i} n(a_i)$ serà satisfeta substancialment, si és satisfeta simultàniament per la mitjana absoluta i la desviació estàndard de $\Delta_{\tau_i} n(a_i)$:

$$|\langle \Delta_{\tau_i} n(a_i) \rangle| \leq \max\{\epsilon d_{ij}, 1\}, \quad \sqrt{\text{var}\{\Delta_{\tau_i} n(a_i)\}} \leq \max\{\epsilon d_{ij}, 1\}, \quad i \in J_{rs}, \quad j = 1, 2. \quad (4.8)$$

Substituint la fórmula (4.7) a les condicions (4.8), obtenim les cotes següents per a τ

$$\tau_i \leq \frac{\max\{\epsilon d_{ij}, 1\}}{|\sum_j d_{ij}|}, \quad \tau_i \leq \frac{\max\{\epsilon d_{ij}, 1\}^2}{|\sum_j d_{ij}|}, \quad \text{per a } i \in J_{rs}, \quad j = 1, 2,$$

i, per tant, prenem

$$\tau_i = \min_{j=1,2} \left\{ \frac{\max\{\epsilon d_{ij}, 1\}}{|\sum_j d_{ij}|}, \frac{\max\{\epsilon d_{ij}, 1\}^2}{|\sum_j d_{ij}|} \right\}.$$

Arribats a aquest punt, hem computat el salt de temps per a cada edat, τ_i . Per tal de fer avançar el sistema en temps, prenem el mínim τ_i que satisfà la condició de salt corresponent,

$$\tau = \min_{i \in J_{rs}} \{\tau_i\},$$

i calculem les quantitats $k_{ij} = \mathcal{P}(d_{ij}\tau)$ i $\lambda_i = \sum_j k_{ij}$. Finalment, fem efectiu el salt, de manera que reemplacem t per $t + \tau$ i $n(a_i)$ per $n(a_i) - \lambda_i$. Si $k_{i1} = \mathcal{P}(d_{i1}\tau)$ no és zero per a una certa edat i , significa que en la població d'edat a_i hi ha hagut divisions i , consegüentment, la població d'edat zero és $n(0, t + \tau) = 2 \sum_i \mathcal{P}(d_{i1}\tau)$. Això, al seu torn, també implica que el vector numèric d'edats té ara una nova component, és a dir, $I_{t+\tau} = I_t + 1$.

Per calcular d_{i1} , necessitem saber el valor de la taxa de divisió, $b(a_i)$, al nou temps $t + \tau$. Per això, resollem el sistema (3.24)-(3.25) en l'interval de temps $(t, t + \tau)$ per a cada edat utilitzant el vector $\overrightarrow{n(a_i)}$. Per fer-ho, hem utilitzat un mètode implícit Runge-Kutta de segon ordre implementat a la GNU Scientific Library (GSL). Ara, doncs, tenim la probabilitat de divisió a temps t . Utilitzant l'equació (2.11), obtenim $1 - G(a_i)_t$ a temps t . Així, calculem la taxa de divisió per a cada edat:

$$b(a_i) = \frac{(1 - G(a_i)_t) - (1 - G(a_i)_{t+\tau})}{\tau}.$$

4.2 Descripció de l'algorisme

L'algorisme de simulació és:

1. Inicialització. Començar amb un vector d'edats inicial, $\overrightarrow{n(a, 0)}$ a $t = 0$, les components del qual, $n(a_i, 0)$, donen la població corresponent a cada grup d'edat present a la població inicial. La dimensió d'aquest vector es denota per I , i correspon al nombre de grups d'edat amb població inicial diferent de zero. A $t = 0$, $b(a_i) = 0$ per a qualsevol edat.
2. Computar les taxes de divisió i de mortalitat per a cada edat:
 $d_{i1} = b(a_i)n(a_i)$ i $d_{i2} = \nu n(a_i)$.
3. Determinar el salt de temps τ , d'acord amb la condició del salt (vegeu la subsecció 4.1).
4. Actualitzar les variables del sistema:
 $n(a, t) \leftarrow n(a, t) - (\mathcal{P}(d_{i1}\tau) + \mathcal{P}(d_{i2}\tau))_{i \in I}$, $t \leftarrow t + \tau$, $a \leftarrow a + \tau$.
5. Determinar el nombre de naixements: $n(0, t) = 2 \sum_i \mathcal{P}(d_{i1}\tau)$. Si el nombre de naixements $n(0, t)$ és diferent de zero, hem d'afegir la nova component al vector distribució d'edats, és a dir, $I \leftarrow I + 1$.
6. Resoldre l'equació per a la concentració d'oxigen a l'interval $(t, t + \tau)$: $\partial_t O_2 = F - \kappa O_2 M$, on $M(t) = \sum_i n(a_i, t)$ és la població total.
7. Calcular les taxes de divisió, $b(a_i)$, usant les probabilitats de divisió a temps t : usant l'equació (2.11), obtenim $1 - G(a_i)_t$ a temps t i, aleshores, calculem la taxa de divisió, $b(a_i) = \frac{(1 - G(a_i)_{t-\tau}) - (1 - G(a_i)_t)}{\tau}$.
8. Bucle de l'ítem 2 al 7 fins que $t \geq T$.

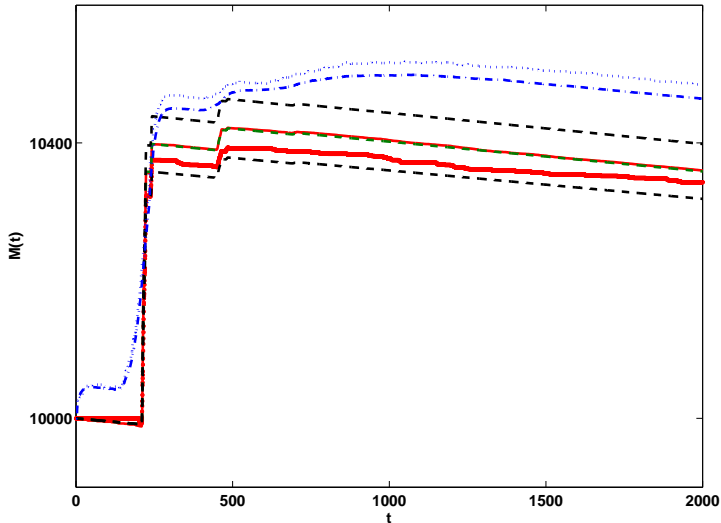


FIGURA 7: Una realització (en traç de guions verticals) i 100 realitzacions (en línia blava de guions i punts) de l'algorisme de simulació de salt τ de l'equació (3.3)-(3.2) amb $\Omega = 10^3$, i, també, una realització en vermell gruixut i 100 realitzacions en línia vermella del mateix algorisme amb $\Omega = 10^7$, comparades amb la solució de l'equació (3.22) (línia de guions verda) amb error calculat usant l'equació (3.23) (línies de guions negres), amb $\Omega = 10^4$ i condició inicial $\vec{x} = (5, 1.4, 0.01, 0.01, 0, 0.99, 0.01, 0, 0.01)$.

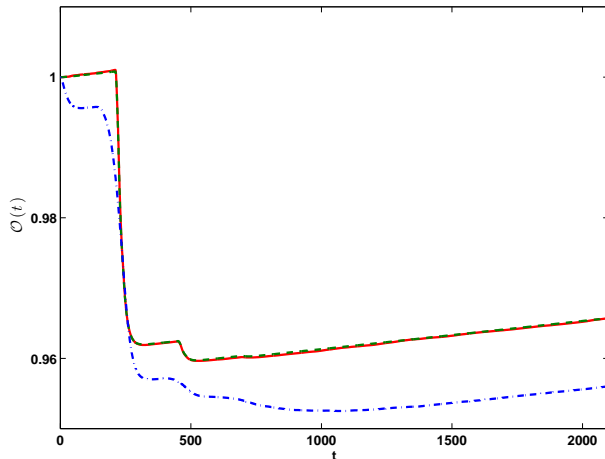


FIGURA 8: Comparació del consum d'oxigen utilitzant 100 realitzacions de l'algorisme de simulació de salt τ de l'equació (3.3)-(3.2) per a $\Omega = 10^3$ (línia de guions i punts blava) i per a $\Omega = 10^7$ (línia vermella) amb el consum d'oxigen que s'obté usant l'equació (3.22) (línia de guions verda), amb $\Omega = 10^4$, $\nu = 0.0001$ i condició inicial $\vec{x} = (5, 1.4, 0.01, 0.01, 0, 0.99, 0.01, 0, 0.01)$.

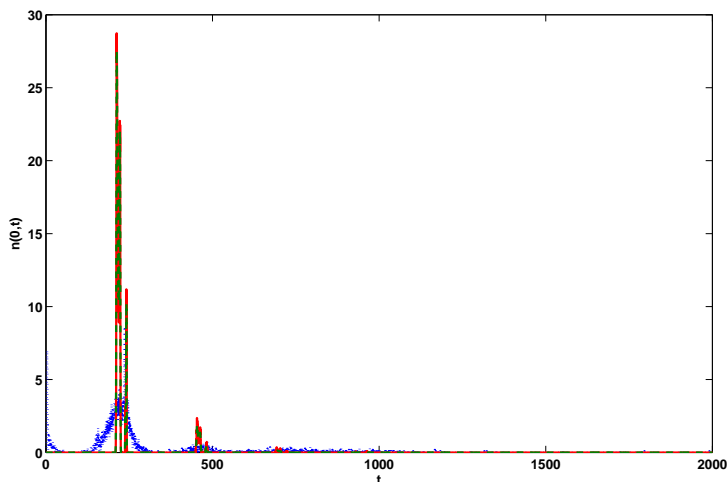


FIGURA 9: Comparació del nombre de naixements utilitzant 100 realitzacions de l'algorisme de simulació de salt τ de l'equació (3.3)-(3.2) per a $\Omega = 10^3$ (línia de guions verticals blava) i per a $\Omega = 10^7$ (línia vermella) amb els naixements que s'obtenen usant l'equació (3.22) ($n(0, t)$ és la línia de guions verda), amb $\Omega = 10^4$, $\nu = 0.0001$ i condició inicial $\vec{x} = (5, 1.4, 0.01, 0.01, 0, 0.99, 0.01, 0, 0.01)$.

Els resultats de les simulacions usant aquest algorisme es poden veure a les figures 7 i 9, on l'algorisme de simulació de salt τ estructurat per l'edat es compara amb la solució numèrica del sistema d'equacions (3.22), per tal de validar l'aproximació WKB-gaussiana. L'aproximació gaussiana de les equacions (3.22) implica que el 68.2% de les realitzacions hauria d'estar dins de la regió delimitada per les cotes superior i inferior donades per $n(t, a) \pm \Omega^{-\alpha_0/2} \sigma_n(t, a)$. La figura 7 mostra que les realitzacions estocàstiques generades pel nostre algorisme estan entre les cotes previstes per a l'aproximació gaussiana.

5 Conclusions i discussió

En aquest article, presentem una formulació d'un model estocàstic multiescala de la dinàmica de les poblacions cel·lulars on nivells d'organització biològica diferents, caracteritzats per escales temporals diferents (vegeu la figura 1), estan acoblats. Descriu la dinàmica estocàstica de la població cel·lular (*escala cel·lular*, usant la mateixa terminologia que a [2]) mitjançant un procés de naixement i mort on la taxa de divisió és descrita per un model de progressió en el cicle cel·lular regulada per l'oxigen (*escala intracel·lular*, usant la terminologia de [2]), i, per tant, acoblem les escales cel·lular i intracel·lular. El sistema acoblat resultant és una població cel·lular estocàstica estructurada per l'edat. La taxa

de divisió es descriu en termes d'un nou mètode basat en un enfocament de temps mitjà de primer pas, el qual ens permet determinar la taxa de divisió com la taxa mitjana a la qual les proteïnes clau involucrades en la regulació del cicle cel·lular creuen el valor llindar d'activació en funció de l'edat cel·lular (és a dir, el temps que ha transcorregut des de la darrera divisió cel·lular). La nostra metodologia, per tant, ens permet analitzar l'acoblament entre les fluctuacions causades per soroll molecular a nivell intracel·lular i el soroll cel·lular a causa de la mida finita de la població.

Amb l'objectiu d'analitzar el comportament del nostre model, a la secció 3, hem estès un mètode asimptòtic de tipus WKB inicialment proposat per Kubo *et al.* [3, 30] per obtenir una solució aproximada de l'equació mestra (3.5) de naixement i mort estructurada per l'edat. Duent a terme aquesta aproximació a un ordre menor, obtenim una aproximació gaussiana per a la densitat de probabilitat (estructurada per l'edat), on la mitjana corresponent, $n(a, t)$, i la variància $\sigma_n(a, t)$ són les solucions de dues EDP semilineals acoblades (vegeu les equacions (3.24)–(3.26)).

Les EDP semilineals per a $n(a, t)$ i $\sigma_n(a, t)$ estan acoblades a escala intracel·lular a través de la seva dependència de la taxa de divisió (que depèn de l'edat), $b(a, t)$. Aquesta quantitat s'obté en termes del temps mitjà de primer pas per al model del cicle cel·lular que depèn de l'oxigen (els detalls es donen a la secció 2): considerem que la cèl·lula entra en la fase de proliferació del cicle cel·lular quan la concentració de CycB està per sobre d'un valor llindar determinat. La taxa de divisió, per tant, és donada per la taxa a la qual el sistema creua el valor llindar esmentat anteriorment. Per tal de resoldre aquest problema, duem a terme una aproximació WKB [3, 30] de l'equació mestra corresponent (vegeu l'equació (2.1) i la taula 1) per obtenir una aproximació gaussiana, la qual està determinada per la solució del sistema d'EDO per a la mitjana, (2.6), i per a la variància, (2.7). Això, al seu torn, ens permet trobar una aproximació a la solució del problema de temps mitjà de primer pas i, per tant, a la taxa de divisió que depèn de l'edat.

La nostra formulació per a la progressió del cicle cel·lular regulada per l'oxigen és descrita pel temps mitjà d'activació de primer pas. L'aproximació per a la divisió es calcula usant la probabilitat que la ciclina-CDK estigui per sota d'un valor llindar, que correspon a la probabilitat d'extinció, equació (2.10), de forma que el procés de reproducció ocorre amb probabilitat complementària d'aquella. Per calcular el procés d'activació, hem usat el mètode WKB per obtenir una solució aproximada a l'EM del cicle cel·lular. Aquest resultat és una sèrie de sistemes d'EDO per als cumulants d'ordre n ; hem usat ordre 2 per obtenir una solució de l'EM, (2.9). D'acord amb la comparació entre els resultats del nostre model reduït i les simulacions de Gillespie, podem afirmar que el nostre enfocament és una bona aproximació només per a soroll intracel·lular petit i mida gran del sistema, d'ordre $\Omega = 10^7$ o superior (vegeu la figura 3). Per obtenir una aproximació millor, hem d'utilitzar un ordre més gran que 2 en

l'aproximació WKB. El sistema s'acobla a través d'un mecanisme de retroalimentació negatiu, on la població consumeix oxigen que, al seu torn, regula la progressió del cicle cel·lular i, per tant, la taxa de divisió.

Per tal de validar el nostre enfocament asimptòtic en el model estocàstic multiescala, hem introduït una extensió estructurada per l'edat del mètode de simulació de salt τ en el procés naixement-mort associat a les equacions (3.3)-(3.2), amb la taxa de divisió calculada amb l'equació (2.11). Comparem els resultats de les simulacions estocàstiques amb l'aproximació WKB de la dinàmica de la població cel·lular estructurada per l'edat a la figura 7, on es poden veure realitzacions del procés generades utilitzant el nostre model de salt τ estructurat per l'edat amb l'aproximació asimptòtica gaussiana. A la figura 8 hi representem l'evolució temporal de la concentració d'oxigen, i a la figura 9 hi mostrem el nombre de naixements per l'aproximació asimptòtica i les simulacions estocàstiques. Aquesta comparació ens permet avaluar tant la precisió com el rang d'aplicabilitat del nostre mètode asimptòtic. Els nostres resultats confirmen que, per al model intracel·lular considerat en aquest article, l'aproximació asimptòtica és precisa només si considerem que l'escala per al nombre de proteïnes al model del cicle cel·lular intracel·lular, Ω , sigui prou gran. En aquest cas, com es pot veure a les figures 7, 8 i 9, trobem que la concordància entre els resultats numèrics i asimptòtics és bona. Aquesta limitació pel que fa al nombre de proteïnes prové del fet que, en el model del cicle cel·lular considerat en aquest treball, la transició que anuncia l'inici de la proliferació (és a dir, quan CycB arriba al valor llindar) està precedida d'una bifurcació sella-node. A prop d'aquesta transició de fase dinàmica, s'espera que l'aproximació gaussiana sigui incapaç de capturar les estadístiques de les fluctuacions [8]. Així, doncs, per tal de capturar la dinàmica del sistema amb precisió, ens mourem només en el règim de les fluctuacions petites (*i. e.*, Ω gran). Això significa, però, que el nostre model seria capaç de capturar el comportament de sistemes que no exhibissin aquest tipus de bifurcacions en un règim molt més ampli.

Una alternativa al mètode WKB usat en aquest article seria fer servir el desenvolupament de la mida del sistema de Van Kampen [60], també coneguda com *aproximació del soroll lineal* (LNA), que està molt relacionada amb l'aproximació WKB de Kubo *et al.* [30]. Malgrat les similituds entre ambdues metodologies, aquestes no són ben bé equivalents. L'aproximació del soroll lineal (LNA) suposa que la variable aleatòria pot ser escrita com a $X(t) = \phi(t) + \Omega^{1/2}\xi(t)$, on $\phi(t)$ és la solució de les equacions de camp mitjà i $\xi(t)$ és una variable aleatòria que satisfà una equació de Fokker-Planck lineal, d'on poden ser deduïdes equacions diferencials ordinàries (lineals) per al primer i el segon moment de $\xi(t)$. L'aproximació WKB està basada en un Ansatz sobre la forma de la solució de l'EM, la qual cosa significa que, pel que sabem a partir dels nostres resultats, les equacions per a la variància de $X(t)$ no són, en general, les mateixes, tot i que s'obté en ambdós casos la mateixa aproximació de camp mitjà.

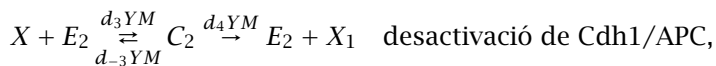
La metodologia presentada en aquest article es pot generalitzar de diverses formes, i es pot aplicar a una àmplia varietat de situacions. Una d'aquestes situacions que seria interessant d'analitzar, en relació amb l'evolució del càncer i la seva teràpia, és la introducció de quiescència induïda per la hipòxia. Les cèl·lules cancerígenes tenen l'habilitat de tornar-se quiescents sota condicions d'hipòxia; vegeu [1, 7]. Per tant, seria interessant introduir aquesta capacitat en el nostre model, especialment, en el context de models de competència entre cèl·lules que no manifesten quiescència induïda per hipòxia (*cèl·lules normals*) i cèl·lules que sí que passen a ser quiescents (*cèl·lules cancerígenes*) [2]; en particular, quan es tracta de predir el resultat de teràpies específiques del cicle cel·lular, on les cèl·lules es maten quan entren en fases determinades del cicle cel·lular [44]. Aquesta anàlisi es posposa per a un treball futur.

Un problema relacionat que seria interessant d'explorar usant la metodologia descrita en aquesta publicació és el problema del metabolisme de les cèl·lules cancerígenes (és a dir, l'efecte Warburg). D'entre els diversos canvis fenotípics induïts per l'efecte Warburg, un dels més remarcables, juntament amb l'increment de la taxa d'acidificació extracel·lular, és la reducció de la taxa de consum d'oxigen (OCR) [13]. Seria interessant d'analitzar l'efecte de considerar tipus de cèl·lules diferents caracteritzades per estats metabòlics diferents, és a dir, taxes de consum d'oxigen diferents i, més especialment, la seva relació amb els efectes de la hipòxia. Aquest tema serà estudiat més profundament en una recerca futura.

Ens proposem també estendre el nostre context estocàstic multiescala per tal d'incloure graus de llibertat en l'espai i l'acoblament a un model d'angiogènesi induïda per tumors. Per tal de fer-ho, necessitem recórrer a mètodes de simulació estocàstica més eficients, com, per exemple, el mètode de la reacció següent [19].

A Apèndix

Aquest apèndix està dedicat a establir la relació entre els paràmetres del nostre model estocàstic, $d_1, d_{-1}, d_2, d_3, d_{-3}, d_4$, i els valors dels paràmetres *macroscòpics* donats a [1]. Per tal d'aconseguir-ho, apliquem l'aproximació de l'estat quasi estacionari (QSSA) a l'esquema de reacció següent:



on els paràmetres $d_1, d_{-1}, d_2, d_3, d_{-3}, d_4$ estan relacionats amb aquells que apareixen a [1] a través de la QSSA proposada per Briggs i Haldane.

Aquestes equacions de camp mitjà per a aquest mecanisme de reacció estan donades per un sistema d'EDO, equació (A.1), per a les taxes de canvi de cada

una de les espècies involucrades:

$$\begin{aligned}
 \frac{dx_1}{da} &= -d_1x_1e_1 + d_{-1}c_1 + d_4ymc_2, \\
 \frac{de_1}{da} &= -d_1x_1e_1 + (d_{-1} + d_2)c_1, \\
 \frac{dc_1}{da} &= d_1x_1e_1 - (d_{-1} + d_2)c_1, \\
 \frac{dx}{da} &= -d_3xy me_2 + d_{-3}ymc_2 + d_2c_1, \\
 \frac{de_2}{da} &= -d_3xy me_2 + (d_{-3} + d_4)ymc_2, \\
 \frac{dc_2}{da} &= d_3xy me_2 - (d_{-3} + d_4)ymc_2, \\
 \frac{dy}{da} &= a_4 - (a_1 + a_2x + a_3z)y,
 \end{aligned} \tag{A.1}$$

on $x_1 = [X_1]$, $x = [X]$, $c_i = [C_i]$ i $e_i = [E_i]$. A més, hem usat les lleis de conservació: $\frac{de_i}{da} + \frac{dc_i}{da} = 0$, d'on podem concloure que la concentració total de l'enzim és constant: $c_i + e_i = e_0$ ($i = 1, 2$), i $\frac{dx_1}{da} + \frac{dc_1}{da} + \frac{dx}{da} + \frac{dc_2}{da} = 0$, de manera que la concentració total de Cdh1 es conserva: $x_1 + c_1 + x + c_2 = s_0$.

Per tal de continuar, introduïm, fent un canvi d'escala, les variables següents:

$$\bar{x}_1 = \frac{x_1}{s_0}, \quad \bar{x} = \frac{x}{s_0}, \quad \bar{c}_i = \frac{c_i}{e_0}, \quad (i = 1, 2), \quad \tau = d_3e_0y_0a, \quad \epsilon = \frac{e_0}{s_0}, \quad \bar{y} = \frac{y}{y_0},$$

d'acord amb les quals obtenim el sistema següent:

$$\begin{aligned}
 \frac{d\bar{x}_1}{d\tau} &= -\frac{d_1}{d_3y_0}\bar{x}_1(1 - \bar{c}_1) + \frac{d_{-1}}{d_3y_0s_0}\bar{c}_1 + \frac{d_4}{d_3s_0}\bar{y}m\bar{c}_2, \\
 \epsilon \frac{d\bar{c}_1}{d\tau} &= \frac{d_1}{d_3y_0}\bar{x}_1(1 - \bar{c}_1) - \frac{(d_{-1} + d_2)}{d_3y_0s_0}\bar{c}_1, \\
 \frac{d\bar{x}}{d\tau} &= -\bar{x}\bar{y}m(1 - \bar{c}_2) + \frac{d_{-3}}{d_3s_0}\bar{y}m\bar{c}_2 + \frac{d_2}{d_3y_0s_0}\bar{c}_1, \\
 \epsilon \frac{d\bar{c}_2}{d\tau} &= \bar{x}\bar{y}m(1 - \bar{c}_2) - \frac{(d_{-3} + d_4)}{d_3s_0}\bar{y}m\bar{c}_2.
 \end{aligned}$$

Ara, prenem l'aproximació de l'estat quasi estacionari, $\epsilon \frac{d\bar{c}_i}{d\tau} = 0$ ($i = 1, 2$), que ens porta a:

$$\begin{aligned}\bar{c}_1 &= \frac{d_1 \bar{x}_1}{\frac{d_{-1}+d_2}{s_0} + d_1 \bar{x}_1}, \\ \bar{c}_2 &= \frac{\bar{x}_2}{\bar{x}_2 + \frac{d_{-3}+d_4}{d_3 s_0}}, \\ \frac{d\bar{x}}{d\tau} &= -\frac{\bar{y}m\bar{x} \left(\frac{d_4}{d_3 s_0} \right)}{\bar{x} + \frac{d_{-3}+d_4}{d_3 s_0}} + \frac{d_2}{d_3 \gamma_0 s_0} \frac{d_1 \bar{x}_1}{d_1 \bar{x}_1 + \frac{d_{-1}+d_2}{s_0}}.\end{aligned}\tag{A.2}$$

Un cop arribats a aquest punt, utilitzem la llei de conservació $\frac{d\bar{x}_1}{d\tau} + \epsilon \frac{d\bar{c}_1}{d\tau} + \frac{d\bar{x}}{d\tau} + \epsilon \frac{d\bar{c}_2}{d\tau} = 0$, és a dir, $\bar{x}_1 + \bar{x} = 1$, de manera que l'equació (A.2) pot ser reescrita com:

$$\frac{d\bar{x}}{d\tau} = -\frac{\bar{y}m\bar{x} \left(\frac{d_4}{d_3 s_0} \right)}{\bar{x} + \frac{d_{-3}+d_4}{d_3 s_0}} + \frac{d_2}{d_3 \gamma_0 s_0} \frac{(1 - \bar{x})}{1 - \bar{x} + \frac{d_{-1}+d_2}{d_1 s_0}},$$

la qual cosa dóna lloc a la relació següent entre els paràmetres del nostre model estocàstic i aquells que apareixien a l'aproximació de camp mitjà de la referència [58]: $d_2 = (1 + b_3 u) s_0 / e_0$, $d_4 = b_4 s_0 / (\gamma_0 e_0)$, $d_{-1} = J_3 s_0 d_1 - d_2$, $d_{-3} = J_4 s_0 d_3 - d_4$, on b_i i J_i ($i = 3, 4$) són, respectivament, taxes constants (b_3 i b_4) i les constants de Michaelis-Menten (J_3 i J_4). Aquesta equivalència ens permet donar valors als paràmetres del nostre model estocàstic, de manera que el comportament de camp mitjà és el mateix que en els models d'Alarcón *et al.* a [1] i Tyson i Novak a [58].

Agraïments

Els autors agraeixen al Ministeri de Ciència i Innovació espanyol (MICINN) el seu finançament, sota les beques MTM2011-29342; a la Generalitat de Catalunya, el finançament sota la beca 2009SGR345, i a la Wellcome Trust (098325).

Referències

- [1] ALARCÓN, T.; BYRNE, H. M.; MAINI, P. K. «A mathematical model of the effects of hypoxia on the cell-cycle of normal and cancer cells». *J. Theoret. Biol.*, 229 (3) (2004), 395-411.
- [2] ALARCÓN, T.; BYRNE, H. M.; MAINI, P. K. «A multiple scale model for tumor growth». *Multiscale Model. Simul.*, 3 (2) (2005), 440-475.
- [3] ALARCÓN, T.; PAGE, K. M. «Mathematical models of the VEGF receptor and its role on cancer therapy». *J. R. Soc. Interface*, 4 (13) (2007), 283-304.

- [4] ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALSON, J. D. *Molecular biology of the cell*. 3a ed. Nova York: Garland Publishing, 1994.
- [5] ANDERSON, A. R. A.; CHAPLAIN, M. A. J. «Continuous and discrete mathematical models of tumor-induced angiogenesis». *Bull. Math. Biol.*, 60 (5) (1998), 857-899.
- [6] BALL, K.; KURTZ, T. G.; POPOVIC, L.; REMPALA, G. «Asymptotic analysis of multiscale approximations to reaction networks». *Ann. Appl. Probab.*, 16 (4) (2006), 1925-1961.
- [7] BEDESSEM, B.; STÉPHANOU, A. «A mathematical model of HiF-1 α -mediated response to hypoxia on the G1/S transition». *Math. Biosci.*, 248 (2014), 31-39.
- [8] BINNEY, J. J.; DOWRICK, N. J.; FISHER, A. J.; NEWMAN, M. E. J. *The theory of critical phenomena: An introduction to the renormalization group*. Oxford: Oxford University Press, 1992.
- [9] BOX, A. H.; DEMETRICK, D. J. «Cell-cycle kinase inhibitor expression and hypoxia-induced cell-cycle arrest in human cell lines». *Carcinogenesis*, 25 (12) (2004), 2325-2335.
- [10] BREWARD, C. J. W.; BYRNE, H. M.; LEWIS, C. E. «The role of cell-cell interactions in a two-phase model for avascular tumour growth». *J. Math. Biol.*, 45 (2) (2002), 125-152.
- [11] BYRNE, H. M. «Dissecting cancer through mathematics: from the cell to the animal model». *Nature Reviews Cancer*, 10 (3) (2010), 221-230.
- [12] CAO, Y.; GILLESPIE, D. T.; PETZOLD, L. R. «Efficient step size selection for the tau-leaping simulation method». *J. Chem. Phys.*, 124 (2006), 044109.
- [13] CHEN, Y.; CAIRNS, R.; PAPANDREOU, I.; KOONG, A.; DENKO, N. C. «Oxygen consumption can regulate the growth of tumors, a new perspective on the Warburg effect». *PLoS ONE*, 4 (9) (2009), e7033.
- [14] DEISBOECK, T. S.; WANG, Z.; MACKLIN, P.; CRISTINI, V. «Multiscale cancer modeling». *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13 (2011), 127-155.
- [15] DURRETT, R. «Cancer modeling: a personal perspective». *Notices Amer. Math. Soc.*, 60 (3) (2013), 304-309.
- [16] FUNK, J. O. «Cancer cell-cycle control». *Anticancer Res.*, 19 (1999), 4778-4780.
- [17] GARDINER, C. *Stochastic methods*. A handbook for the natural and social sciences. 4a ed. Berlín: Springer-Verlag, 2009. (Springer Series in Synergetics)
- [18] GARDNER, L. B.; LI, Q.; PARK, M. S.; FLANAGAN, W. M.; SEMENZA, G. L.; DANG, C. V. «Hypoxia inhibits G₁/S transition through regulation of p27 expression». *J. Biol. Chem.*, 276 (11) (2001), 7919-7926.

- [19] GIBSON, M. A.; BRUCK, J. «Efficient exact stochastic simulation of chemical systems with many species and many channels». *J. Phys. Chem. A*, 104 (9) (2000), 1876–1889.
- [20] GILLESPIE, D. T. «A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions». *J. Computational Phys.*, 22 (4) (1976), 403–434.
- [21] GILLESPIE, D. T. «Approximate accelerated stochastic simulation of chemically reacting systems». *J. Chem. Phys.*, 115 (2001), 1716.
- [22] GILLESPIE, D. T.; PETZOLD, L. R. «Improved leap-size selection for accelerated stochastic simulation». *J. Chem. Phys.*, 119 (2003), 8229.
- [23] GREEN, S. L.; FREIBERG, R. A.; GIACCIA, A. J. «p21^{Cip1} and p27^{Kip1} regulate cell cycle reentry after hypoxic stress but are not necessary for hypoxia-induced arrest». *Mol. Cell. Biol.*, 21 (2001), 1196–1206.
- [24] GRIMMETT, G. R.; STIRZAKER, D. R. *Probability and random processes*. 3a ed. Nova York: Oxford University Press, 2001.
- [25] HAND, P. E.; GRIFFITH, B. E. «Adaptive multiscale model for simulating cardiac conduction». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107 (33) (2010), 14603–14608.
- [26] HESTER, S. D.; BELMONTE, J. M.; GENS, J. S.; CLENDENON, S. G.; GLAZIER, J. A. «A multi-cell, multi-scale model of vertebrate segmentation and somite formation». *PLoS Comput. Biol.*, 7 (10) (2011), e1002155.
- [27] JIANG, Y.; PJSIVAC-GRBOVIC, J.; CANTRELL, C.; FREYER, J. P. «A multiscale model for avascular tumor growth». *Biophys. J.*, 89 (6) (2005), 3884–3894.
- [28] KIM, Y.; OTHMER, H. G. «A hybrid model of tumor-stromal interactions in breast cancer». *Bull. Math. Biol.*, 75 (8) (2013), 1304–1350.
- [29] KITANO, H. «Cancer as a robust system: implications for anticancer therapy». *Nature Reviews Cancer*, 4 (2004), 227–235.
- [30] KUBO, R.; MATSUO, K.; KITAHARA, K. «Fluctuation and relaxation of macrovariables». *J. Stat. Phys.*, 9 (1) (1973), 51–96.
- [31] LAND, S.; NIEDERER, S. A.; LOUCH, W. E.; SEJERSTED, O. M.; SMITH, N. P. «Integrating multi-scale data to create a virtual physiological mouse heart». *Interface Focus*, 3 (2013), 20120076.
- [32] LIGNET, F.; CALVEZ, V.; GRENIER, E.; RIBBA, B. «A structural model of the VEGF signalling pathway: emergence of robustness and redundancy properties». *Math. Biosci. Eng.*, 10 (1) (2013), 167–184.
- [33] LOWENGRUB, J. S.; FRIEBOES, H. B.; JIN, F.; CHUANG, Y.-L.; LI, X.; MACKLIN, P.; WISE, S. M.; CRISTINI, V. «Nonlinear modelling of cancer: bridging the gap between cells and tumours». *Nonlinearity*, 23 (1) (2010), R1–R91.
- [34] MACKLIN, P.; MCDOUGALL, S.; ANDERSON, A. R. A.; CHAPLAIN, M. A. J.; CRISTINI, V.; LOWENGRUB, J. «Multiscale modelling and nonlinear simulation of vascular tumour growth». *J. Math. Biol.*, 58 (4–5) (2009), 765–798.

- [35] MAIER, R. S.; STEIN, D. L. «A scaling theory of bifurcations in the symmetric weak-noise escape problem». *J. Statist. Phys.*, 83 (3-4) (1996), 291-357.
- [36] MCCULLOCH, A. D. «Systems biology and multi-scale modelling of the heart». A: *Biomedical Science & Engineering Conference, 2009. BSEC 2009. First Annual ORNL*. Piscataway, NJ: IEEE, 2009, 1-3.
- [37] MCDUGALL, S. R.; ANDERSON, A. R. A.; CHAPLAIN, M. A. J. «Mathematical modelling of dynamic adaptive tumour-induced angiogenesis: clinical implications and therapeutic targeting strategies». *J. Theoret. Biol.*, 241 (3) (2006), 564-589.
- [38] MCDUGALL, S. R.; ANDERSON, A. R. A.; CHAPLAIN, M. A. J.; SHERRATT, J. A. «Mathematical modelling of flow through vascular networks: implications for tumour-induced angiogenesis and chemotherapy strategies». *Bull. Math. Biol.*, 64 (4) (2002), 673-702.
- [39] MENENDEZ, J.; JOVENC, J.; CUFÍ, S.; COROMINAS-FAJA, B.; OLIVERAS-FERRAROS, C.; CUYÀS, E.; MARTIN-CASTILLO, B.; LÓPEZ-BONET, E.; ALARCÓN, T.; VAZQUEZ-MARTIN, A. «The Warburg effect version 2.0: metabolic reprogramming of cancer stem cells». *Cell Cycle*, 12 (8) (2013), 1166-1179.
- [40] OATES, A. C.; GORFINKIEL, N.; GONZÁLEZ-GAITÁN, M.; HEISENBERG, C.-P. «Quantitative approaches in developmental biology». *Nature Reviews Genetics*, 10 (200), 517-530.
- [41] OSBORNE, J. M.; WALTER, A.; KERSHAW, S. K.; MIRAMS, G. R.; FLETCHER, A. G.; PATHMANATHAN, P.; GAVAGHAN, D.; JENSEN, O. E.; MAINI, P. K.; BYRNE, H. M. «A hybrid approach to multi-scale modelling of cancer». *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. A Math. Phys. Eng. Sci.*, 368 (1930) (2010), 5013-5028.
- [42] OWEN, M. R.; ALARCÓN, T.; MAINI, P. K.; BYRNE, H. M. «Angiogenesis and vascular remodelling in normal and cancerous tissues». *J. Math. Biol.*, 58 (4-5) (2009), 689-721.
- [43] PERFAHL, H.; BYRNE, H. M.; CHEN, T.; ESTRELLA, V.; ALARCÓN, T.; LAPIN, A.; GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J.; LLOYD, M. C.; MAINI, P. K.; REUSS, M.; OWEN, M. R. «Multiscale modelling of vascular tumour growth in 3D: the roles of domain size and boundary conditions». *PLoS ONE*, 6 (4) (2011), e14790.
- [44] POWATHIL, G. G.; ADAMSON, D. J. A.; CHAPLAIN, M. A. J. «Towards predicting the response of a solid tumour to chemotherapy and radiotherapy treatments: clinical insights from a computational model». *PLoS Comput. Biol.*, 9 (7) (2013), e1003120.
- [45] PREZIOSI, L.; TOSIN, A. «Multiphase and multiscale trends in cancer modelling». *Math. Model. Nat. Phenom.*, 4 (3) (2009), 1-11.
- [46] REDNER, S. *A guide to first-passage processes*. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.
- [47] REJNIAK, K. A.; ANDERSON, A. R. A. «Hybrid models of tumor growth». *WIREs Syst. Biol. Med.*, 3 (1) (2011), 115-125.

- [48] RIBBA, B.; COLIN, T.; SCHNELL, S. «A multiscale mathematical model of cancer, and its use in analyzing irradiation therapies». *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 3 (2006), 7.
- [49] SCHNELL, S.; MAINI, P. K.; NEWMAN, S. A.; NEWMAN, T. J. (ed.). *Multi-scale Modeling of Developmental Systems*. Oxford: Academic Press, 2008.
- [50] SETTY, Y. «Multi-scale computational modeling of developmental biology». *Bioinformatics*, 28 (15) (2012), 2022–2028.
- [51] SMITH, N. P.; NICKERSON, D. P.; CRAMPIN, E. J.; HUNTER, P. J. «Multiscale computational modelling of the heart». *Acta Numer.*, 13 (2004), 371–431.
- [52] STACEY, D. W. «Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells». *Current Opinion in Cell Biology*, 15 (2) (2003), 158–163.
- [53] STÉPHANOU, A.; MCDUGALL, S. R.; ANDERSON, A. R. A.; CHAPLAIN, M. A. J. «Mathematical modelling of flow in 2D and 3D vascular networks: applications to anti-angiogenic and chemotherapeutic drug strategies». *Math. Comput. Modelling*, 41 (10) (2005), 1137–1156.
- [54] STREBHARDT, K.; ULLRICH, A. «Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress». *Nature Reviews Cancer*, 8 (2008), 473–480.
- [55] SZABO, A.; MERKS, R. M. H. «Cellular Potts modeling of tumor growth, tumor invasion, and tumor evolution». *Front. Oncol.*, 3 (2013), 87.
- [56] TRACQUI, P. «Biophysical models of tumour growth». *Rep. Progr. Phys.*, 72 (2009), 056701.
- [57] TRAVASSO, R. D. M.; CORVERA POIRÉ, E.; CASTRO, M.; RODRÍGUEZ-MANZANEQUE, J. C.; HERNÁNDEZ-MACHADO, A. «Tumor angiogenesis and vascular patterning: a mathematical model». *PLoS ONE*, 6 (5) (2011), e19989.
- [58] TYSON, J. J.; NOVAK, B. «Regulation of the eukaryotic cell cycle: molecular antagonism, hysteresis, and irreversible transitions». *J. Theoret. Biol.*, 210 (2) (2001), 249–263.
- [59] VAN DROGEN, F.; SANGFELT, O.; MALYUKOVA, A.; MATSKOVA, L.; YEH, E.; MEANS, A. R.; REED, S. I. «Ubiquitylation of cyclin E requires the sequential function of SCF complexes containing distinct hCdc4 isoforms». *Molecular Cell*, 23 (1) (2006), 37–48.
- [60] VAN KAMPEN, N. G. *Stochastic processes in Physics and Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 2007.
- [61] VISINTIN, R.; PRINZ, S.; AMON, A. «CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis». *Science*, 278 (5337) (1997), 460–463.
- [62] WALPOLE, J.; PAPIN, J. A.; PEIRCE, S. M. «Multiscale computational models of complex biological systems». *Annual Review of Biomedical Engineering*, 15 (2013), 137–154.
- [63] ZACHARIAE, W.; NASMYTH, K. «Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex». *Genes Dev.*, 13 (1999), 2039–2058.

PILAR GUERRERO
DEPARTMENT OF MATHEMATICS
UNIVERSITY COLLEGE LONDON
GOWER STREET
LONDON WC1E 6BT, UK
I
CENTRE DE RECERCA MATEMÀTICA
CAMPUS DE BELLATERRA, EDIFICI C
08193 BELLATERRA, BARCELONA, SPAIN
pguerrero@ucl.ac.uk

TOMÁS ALARCÓN
CENTRE DE RECERCA MATEMÀTICA
CAMPUS DE BELLATERRA, EDIFICI C
08193 BELLATERRA, BARCELONA, SPAIN
I
DEPARTAMENT DE MATEMÀTIQUES
UNIVERSITAT ATONÒMA DE BARCELONA
08193 BELLATERRA, BARCELONA, SPAIN
talarcon@crm.cat