

Trabajo Fin de Máster

Simulación computacional del proceso de migración de células T mediante un modelo discreto

Computational simulation of the T cell migration process using a discrete model

Autora

Imán Laga Boul-Atarass

Director/es

José Manuel García Aznar

Inês Gonçalves

Máster Ingeniería Biomédica

Escuela de Ingeniería y Arquitectura (EINA)

Año 2021

Simulación computacional del proceso de migración de células T mediante un modelo discreto

RESUMEN

El objetivo del trabajo consiste en simular por ordenador, el proceso de migración celular que llevan a cabo los linfocitos T en un ambiente de elevada densidad celular. Como herramienta de simulación se utiliza *Physicell*, un código de acceso abierto, basado en un método numérico discreto, que se emplea para modelar sistemas multicelulares. Para validar el modelo computacional, permitiendo la comparación con datos experimentales, se toma como referencia un trabajo experimental en el que se cuantifican parámetros como la velocidad de migración o la direccionalidad (orientación) de este tipo de células. Estos experimentos se realizaron en unas condiciones que pretenden recrear el ambiente fisiológico de los nodos linfáticos empleando microcanales recubiertos de ICAM-1, de anchuras variables (entre 15 y 80 μm) y densamente poblados de linfocitos T.

Computational simulation of the T cell migration process using a discrete model

ABSTRACT

The aim of the work is to perform a computer simulation of the cell migration process carried out by T lymphocytes in an environment of high cell density. The open access code *Physicell*, based on a discrete numerical method and used to model multicellular systems, is employed as a simulation tool. In order to validate the model, it is taken as a reference an experimental work, in which parameters such as the migration speed or the order parameter (orientation) of this type of cells are quantified. These experiments were carried out under conditions that aim to recreate the physiological environment of the lymph nodes, using ICAM-1 coated microchannels, with variable widths (between 15 and 80 μm) and densely populated with T lymphocytes.

TABLA DE CONTENIDOS

1. Introducción	3
1.a. Migración de los linfocitos T	3
1.a.i. Maduración de linfocitos T en el timo	5
1.a.ii. Linfocitos T naive en los nodos linfáticos	6
1.a.iii. Linfocitos T activados en la zona de diferenciación	7
1.a.iv. Linfocitos T diferenciados en tejidos periféricos	7
1.b. Modelos basados en agentes (MBA)	8
1.b.i. Modelos basados en una malla	9
1.b. ii. Modelos sin malla	10
2. Simulación mediante <i>PhysiCell</i>	11
3. Evidencias experimentales de la migración de células T	14
3.a. Velocimetría de imágenes de partículas (PIV)	17
4. Descripción del modelo elaborado con <i>PhysiCell</i>	18
5. Resultados y discusión	24
6. Conclusiones y perspectivas futuras	28
7. Bibliografía	29
8. Anexos	31
ANEXO I	31
ANEXO II	34
ANEXO III	42
ANEXO IV	56

1. Introducción

1.a. Migración de los linfocitos T

Los linfocitos T son células procedentes del linaje linfoide (*figura 1*) que constituyen un elemento importante del sistema inmunitario. Se encuentran en constante circulación por el torrente sanguíneo, y desempeñan una labor exploratoria en todos los tejidos del organismo, donde buscan antígenos expuestos por células presentadoras de antígenos (*antigen-presenting cells*, APC), como los macrófagos o las células dendríticas.

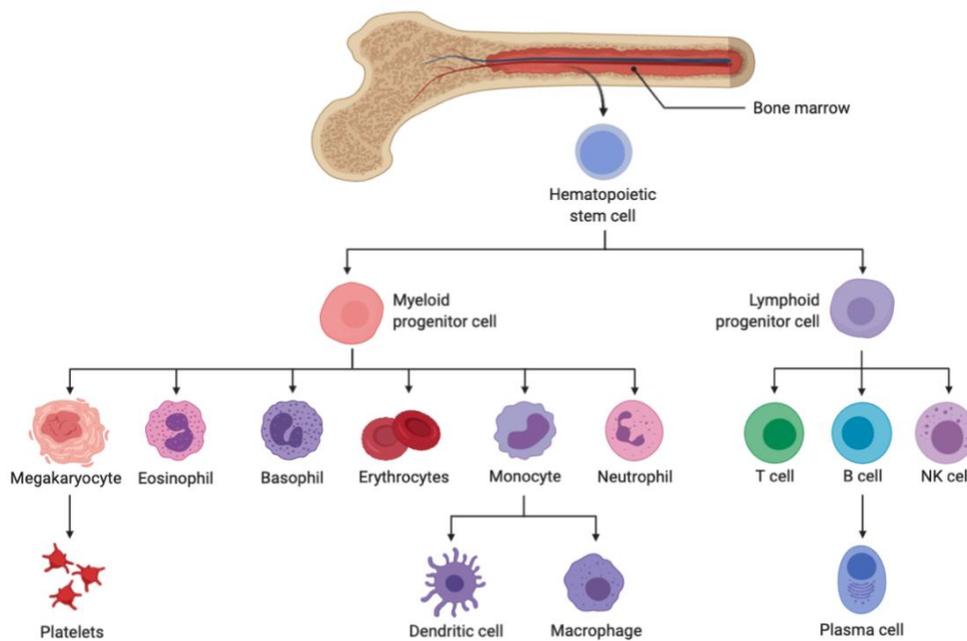


Figura 1. Esquema del proceso de hematopoyesis. Imagen tomada de [1].

Estas células exhiben una migración de tipo ameboide, caracterizada por una continua remodelación de la morfología celular en la que el citoesqueleto de actina desempeña un papel protagonista. Los filamentos de actina permiten la polarización de la célula durante la migración, dando como resultado tres partes diferenciadas: 1) protrusiones o lamelipodios emitidos en el frente celular (*leading edge*) ricos en filamentos de actina ramificados y entrecruzados, 2) una región central contráctil y 3) una parte final con capacidad de adhesión o uropodios (*trailing edge*), con filamentos de actina ubicados paralelos unos a otros (*figura 2*) [2].

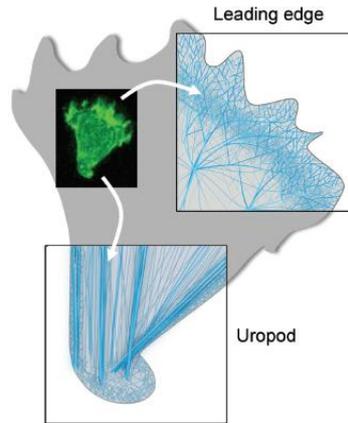


Figura 2. Organización del citoesqueleto de actina en los dos polos de la célula. Imagen tomada de [2].

Esta migración es consecuencia de la combinación de eventos de protrusión y de contracción, y presenta períodos de elevada velocidad, que coincide con los eventos de protrusión de lamelipodios, y períodos de inmovilidad que corresponden con la contracción de los mismos. Esta migración se encuentra también estimulada por factores químicos, como la presencia de quimioquinas, o factores topográficos, como la arquitectura estromal, pero es intrínseca de la célula: exhiben la misma velocidad y patrón de migración en ausencia de dichos estímulos [2].

La migración de los linfocitos puede ser aleatoria o dirigida (figura 3), en función del estado de activación celular y de las señales percibidas del microambiente, y es de gran relevancia, dada la labor exploratoria que desempeñan los linfocitos en el organismo [3].

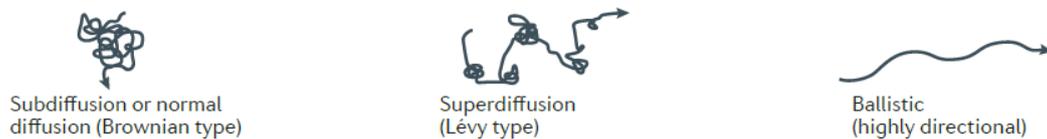


Figura 3. Tipos de motilidad linfocitaria de menor a mayor direccionalidad (de izquierda a derecha). Imagen modificada de [3].

1.a.i. Maduración de linfocitos T en el timo

Para producir linfocitos T funcionales, las células progenitoras acceden al timo, y allí tienen lugar dos procesos de selección:

1. **Selección positiva:** sucede en la parte cortical del timo, y consiste en el mantenimiento y supervivencia de únicamente aquellas células capaces de reconocer y unirse con elevada afinidad a antígenos, propios o ajenos, expuestos por las APCs, y la eliminación de aquellas que no sean capaz de interactuar con la suficiente afinidad con las APCs.
2. **Selección negativa:** sucede en la médula del timo, y en este caso se selecciona, de entre las que han sobrevivido al paso anterior, a las células no autorreactivas, es decir, aquellas que no se unen a antígenos propios, pero sí lo hacen a antígenos ajenos al organismo.

Una vez producida la selección positiva en la corteza, las células deben migrar hacia la médula para continuar con el proceso de maduración. Esta migración se ha demostrado que es de tipo balístico ^[3], siguiendo una trayectoria muy direccionada hacia la médula del timo gracias a la presencia de citoquinas (como CCR7) (figura 4).

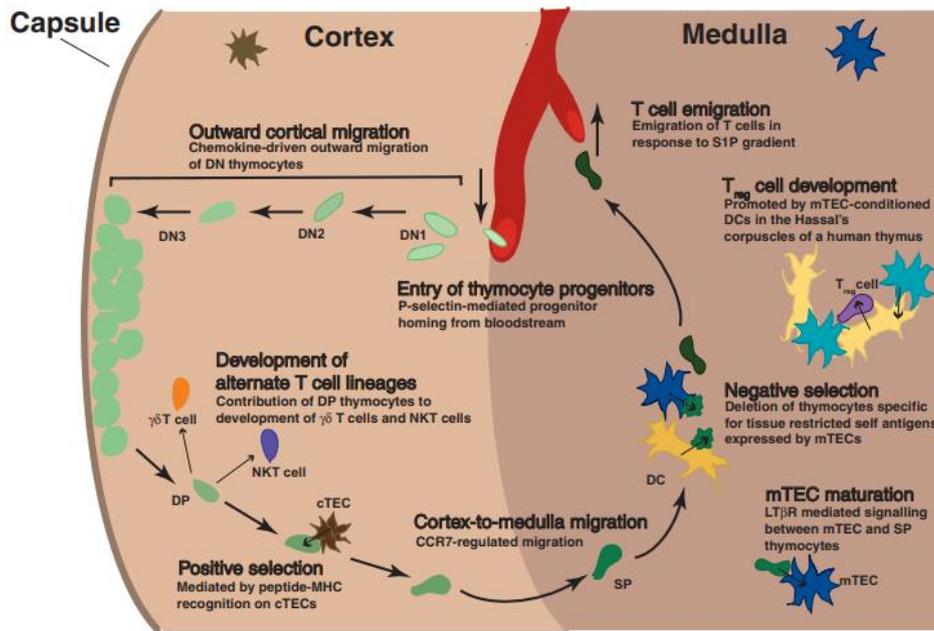


Figura 4. Compartimentalización del timo adulto y procesos de desarrollo, migración y maduración de linfocitos T. Imagen tomada de [5].

1.a.ii. Linfocitos T naive en los nodos linfáticos

Los linfocitos T *naive* son aquellos linfocitos maduros que han superado las etapas de selección positiva y negativa, pero que aún no han entrado en contacto con ningún antígeno y no han sido activados, y por lo tanto se encuentran migrando en los órganos linfoides secundarios (nodos linfáticos, bazo y tejido linfoide asociado a mucosa) en busca de un antígeno que inicie la activación linfocitaria.

Debido a que en general la concentración de antígenos en los nodos es muy pequeña, y a que no existen señales o mecanismos que dirijan al linfocito hacia los antígenos, la migración en este caso no es direccionada, sino que adopta una estrategia migratoria basada en movimiento Browniano o vuelo de Levy (alternancia entre movimiento browniano con giros frecuentes y de regiones de trayectorias más largas, lo que facilita barrer una mayor área) (figura 5) con frecuentes fluctuaciones de velocidad, permitiendo así a los linfocitos interactuar con las APCs presentes con igual probabilidad.

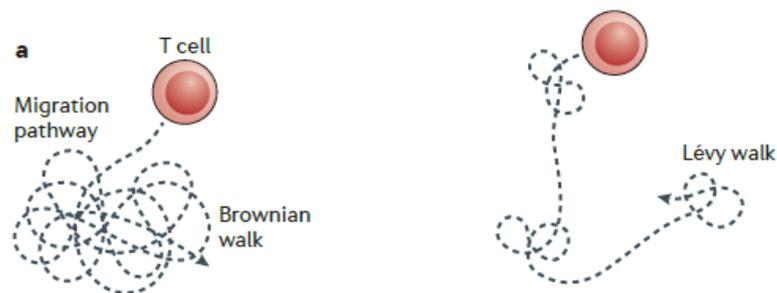


Figura 5. Representación de movimiento browniano o de tipo Levy que experimentan los linfocitos T. Imagen modificada de [6].

En estos cambios de velocidad se encuentra especialmente implicada una proteína del citoesqueleto, la miosina 1G (MYO1G), responsable de los frecuentes giros que experimentan los linfocitos en su trayectoria, así como de la disminución de velocidad y persistencia. El déficit de MYO1G da lugar a una migración más rápida y dirigida, lo que ocasiona una interacción antígeno-linfocito de menor duración, y una menor probabilidad de que se produzca la activación linfocitaria.

Si los linfocitos experimentan gran afinidad por el antígeno presentado por las APCs, ello significaría que se encuentra ante un antígeno extraño y, por tanto, se produciría la detención de la célula y la consiguiente interacción linfocito-APC que culminaría en la activación del linfocito (figura 6.a). Sin embargo, si la afinidad por el antígeno es baja (en caso de un autoantígeno), lo que se produciría sería un cambio de dirección y el linfocito continuaría migrando, deteniéndose solo lo suficiente para determinar si el antígeno al que se encuentra es o no ajeno al organismo. De esta forma, se consigue un veloz escaneo de las APCs, lo cual es necesario para que la respuesta inmunitaria sea

rápida, al mismo tiempo que se favorece el contacto con las APCs con una duración suficiente para que se produzca la activación linfocitaria, si procede [3].

1.a.iii. Linfocitos T activados en la zona de diferenciación

Cuando los linfocitos contactan con un antígeno y se produce la activación celular, se abandona el patrón de migración aleatorio anterior por uno más dirigido, controlado por las quimioquinas producidas por las APC, que se agregan junto con los linfocitos en los órganos linfoides secundarios hasta que se produce la completa maduración y diferenciación en linfocitos T CD4+ o T CD8+ (figura 6.b).

1.a.iv. Linfocitos T diferenciados en tejidos periféricos

Una vez que han adquirido todos los rasgos funcionales, los linfocitos T migran hacia los tejidos periféricos (figura 6.c) atraídos por gradientes quimiotácticos, donde se produce el re-encuentro con el antígeno y allí ejercen su función, que puede ser la producción de citoquinas (células T CD4+) para el reclutamiento de más células del sistema inmunitario allá donde sea necesario, o la eliminación (células T CD8+) de células infectadas o tumorales.

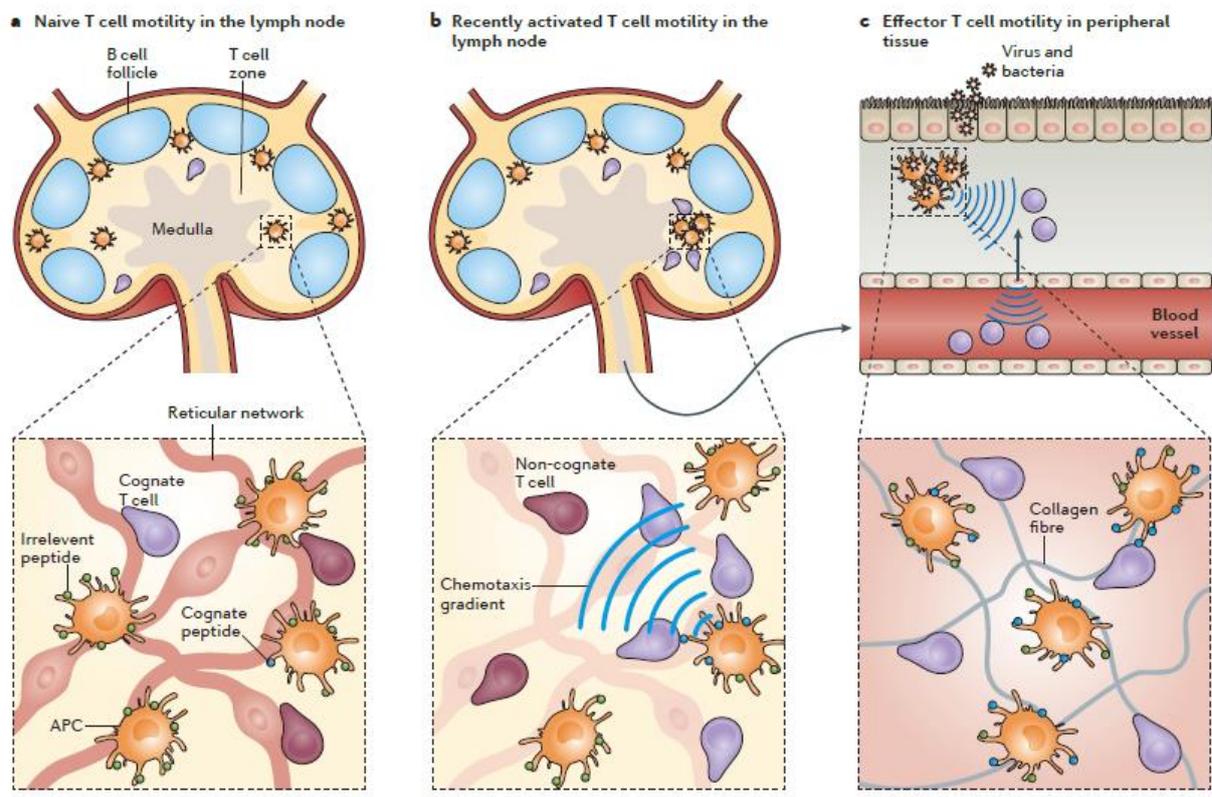


Figura 6. Migración linfocitaria en función del estado de activación de las células. Imagen modificada de [3].

1.b. Modelos basados en agentes (MBA)

El modelado de la mecánica celular y tisular es un campo de gran interés, pero no exento de dificultades, debido a la complejidad biológica y a la necesidad de aproximaciones multiescala para una fiel representación de los procesos fisiológicos.

Los modelos basados en agentes (MBA) son modelos discretos que consideran la presencia de componentes individuales (agentes), y que, aplicados al ámbito de la simulación multicelular, tienen la gran ventaja de que permiten distinguir células como entidades individuales y aisladas, que interactúan entre sí y dan lugar a propiedades emergentes. No sucede así en el caso de los modelos continuos, donde no se contempla la individualidad celular, y en los que se obtiene una visión macroscópica de la dinámica celular.

Es por ello que los MBA, además de proporcionar una aproximación multiescala a la mecánica tisular, también permiten considerar la intrínseca variabilidad que existe entre células diferentes, lo que en los últimos años ha demostrado ser imprescindible para la comprensión y abordaje de complejas patologías como el cáncer ^[7].

En función de la representación espacial que se adopte, se pueden encontrar dos tipos principales de MBAs ^[7], que serían los denominados Modelos basados en una malla y los Modelos sin malla:

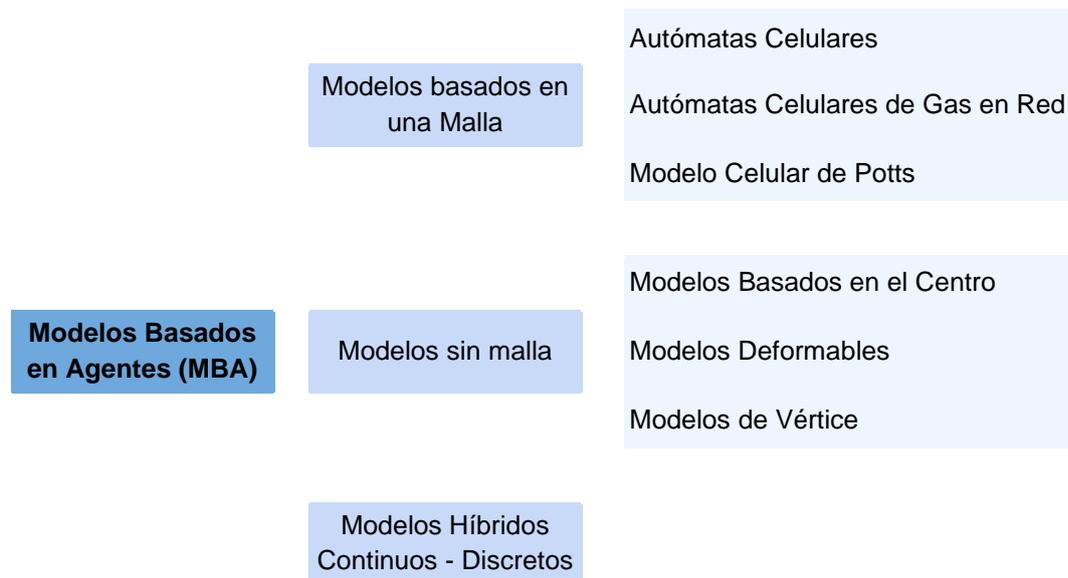


Figura 7. Clasificación tomada de Liedekerke et al. (2015) de los tipos de modelos basados en agentes.

1.b.i. Modelos basados en una malla

Son aquellos modelos en los que se utiliza una malla fija y solo se considera como variable la posición de las células. Dentro de este grupo, se pueden encontrar cuatro subcategorías ^[7, 8], en función del tamaño de las células con respecto al de los compartimentos de la red (figura 8):

Autómatas Celulares con múltiples células por malla (tipo A): los compartimentos de la red son mucho mayores que las células, y por tanto pueden ser ocupados por más de una unidad celular, que se divide e interacciona con las células vecinas en un mismo compartimento. En este tipo de modelos no se puede conocer de forma exacta la posición de la célula, pero sí qué compartimento la delimita. El tamaño y la morfología celular no son considerados en este tipo de modelos.

Autómatas Celulares (tipo B): ambos tamaños (célula y compartimento) son aproximadamente similares, y una célula ocupa como mucho un único compartimento. Esto permite que, al contrario que en el modelo tipo A, se pueda conocer de forma exacta la posición de la célula. El tamaño y la morfología de la célula en este caso depende la geometría de la red, y no son consideradas propiedades celulares.

Modelo celular de Potts (tipo C): en este caso, las células tienen un tamaño superior al de los compartimentos de la red, y pueden por tanto ocupar más de uno. Ello permite que se pueda considerar la morfología y el tamaño celular, así como simular la interacción de la célula con el sustrato en el que se encuentra.

Autómatas Celulares de Gas en Red (tipo D): puede ser considerada una subcategoría del tipo A, donde además se considera la velocidad de las células, no solo su posición.

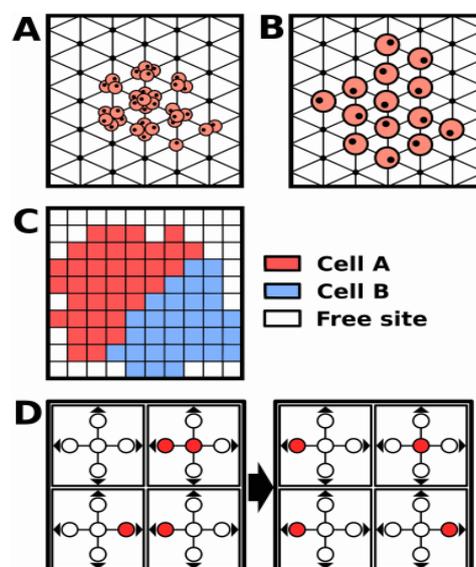


Figura 8. Tipos de modelos basados en una malla. Imagen tomada de [8].

1.b. ii. Modelos sin malla

En este tipo de modelos, la interacción entre células se describe en términos de fuerzas y potenciales, y los cambios de posición se determinan resolviendo ecuaciones de movimiento para cada una de las unidades celulares. Estos modelos (*figura 9*) tienen como ventajas principales el hecho de presentar una escala temporal bien definida, y consideran de forma más sencilla las interacciones célula - célula y célula - matriz extracelular. Se pueden clasificar en [7, 8]:

a. Modelos Basados en el Centro de la célula. En estos modelos, las células actúan como figuras geométricas indeformables (ej: un círculo o una esfera) cuya posición es representada por su centro y con trayectorias y velocidades descritas siguiendo ecuaciones del movimiento. Es posible considerar además aspectos como la interacción célula-célula y célula-sustrato (adhesión o repulsión), pero puede suceder que haya solapamiento en aquellos casos en los que hay una elevada densidad celular.

b. Modelos Deformables. Superan la limitación de los modelos anteriores, relacionada con el hecho de que no se pueden recrear las deformaciones morfológicas que experimentan las células al interactuar entre sí mismas o con el medio. En estos modelos deformables, el cuerpo celular es discretizado en nodos, conectados por elementos viscoelásticos. Una variante de estos modelos son los denominados *Modelos de Vértice*, que dotan a las células de una morfología poligonal, lo que resulta de especial utilidad para modelar situaciones en las que haya un elevado empaquetamiento celular.

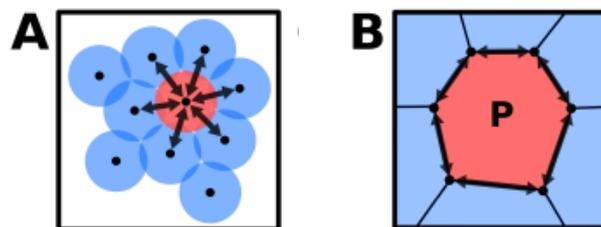


Figura 9. Tipos de Modelos sin malla. Imagen tomada de [8].

Modelos Híbridos Continuos-Discretos. Los modelos híbridos son una combinación de dos o más modelos anteriormente descritos, con la finalidad de superar las limitaciones de cada uno de ellos. Algunos ejemplos de modelos híbridos desarrollados son los siguientes [8]:

- Modelo Basado en el Centro combinado con un Modelo de Vértice para simular el proceso de cicatrización de Mosaffa & Muñoz (2017).
- Modelo Híbrido elaborado para el estudio de la migración celular por durotaxis, desarrollado por Escribano et al. (2018).

- Modelo Basado en el Centro combinado con un Modelo Deformable para simular la interacción tridimensional célula-célula de Odenthal et al. (2013).
- Modelo Sin Red combinado con un Modelo Continuo que simula la dinámica del tejido epitelial de González-Valverde & García-Aznar (2017).

2. Simulación mediante *PhysiCell*.

PhysiCell es un software de acceso libre en C ++ que permite elaborar modelos discretos basados en agentes y basados en el centro. Aunque fue desarrollado inicialmente para ser aplicado a la investigación del cáncer, se diseñó de forma que se pueda aplicar a muchos otros procesos biológicos. No solo permite simular el microambiente celular y la difusión de sustratos en el medio, sino que además da al usuario la opción de crear nuevos tipos celulares, así como definir sus propiedades y la interacción con otras células y con el medio, entre otros. Este trabajo considerará únicamente la componente discreta del software, sin incluir procesos de difusión.

PhysiCell cuenta con funciones estándar para recrear multitud de comportamientos a nivel de célula, como el ciclo y la muerte celular, la motilidad y las interacciones mecánicas que experimentan las células. Al aplicar esto a un gran número de células, emerge un comportamiento a nivel de tejido. Además, es posible modificar estas funciones o implementar otras nuevas y aplicarlas a todas las células o a un determinado grupo concreto, para simular procesos fisiológicos variados, como podría ser la respuesta inmunitaria o el crecimiento de un carcinoma ductal (en el *Anexo I* se recoge una breve guía introductoria al software).

Para el caso de la migración celular, *PhysiCell* actualiza la posición de una célula calculando su velocidad, que se determina por el balance de fuerzas que actúan sobre ella. Entre éstas, se encuentran las fuerzas de adhesión/repulsión entre células, o las de adhesión/repulsión entre las células y la membrana basal, que sirve de soporte a los tejidos y delimita unos de otros. Además, *PhysiCell* también considera la interacción de las células con el fluido y la matriz extracelular que las rodea (*figura 10*).

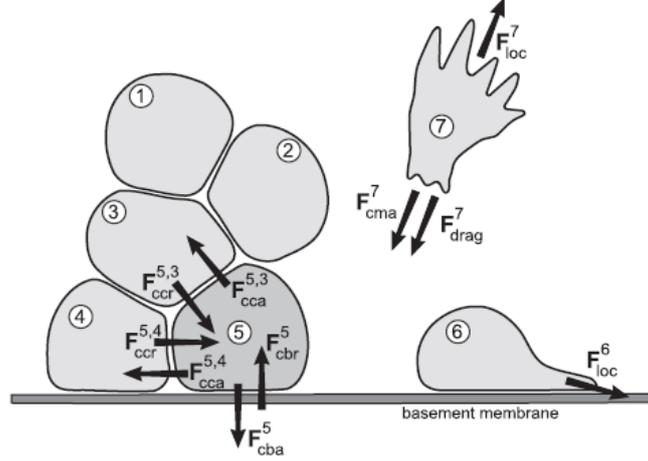


Figura 10. Representación esquemática de las fuerzas que actúan sobre una célula. Sobre la célula nº5: fuerza de repulsión y atracción célula-célula (F_{ccr} y F_{cca}) y fuerza de repulsión y adhesión célula-membrana basal (F_{cbr} y F_{cba}); sobre la célula nº6 se representa la fuerza locomotriz de una célula que se mueve adherida a la membrana basal, y sobre la célula nº7 se indica las fuerzas que actúan sobre una célula en movimiento en la matriz extracelular, como la fuerza de adhesión (F_{cma}) o el arrastre de fluido (F_{drag}). Imagen tomada de [9].

La velocidad (v_i) de la célula (i) viene dada por la suma global de todas las fuerzas de adhesión y repulsión que actúan sobre las células, y a su vez, está determinada por la viscosidad del medio en el que se encuentra. Esto se recoge en la siguiente expresión ^[10]:

$$\mu \cdot \mathbf{v}_i = \sum_{j \in \mathcal{N}(i)} \left(\begin{array}{c} \text{cell-cell adhesion} \\ -\sqrt{c_{cca}^i c_{cca}^j} \nabla \phi_{1,R_{i,A}+R_{j,A}}(\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j) \\ \text{cell-cell repulsion} \\ -\sqrt{c_{ccr}^i c_{ccr}^j} \nabla \psi_{1,R_i+R_j}(\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j) \end{array} \right) + \begin{array}{c} \text{cell-BM adhesion} \\ -c_{cba}^i \nabla \phi_{1,R_{i,A}}(-d(\mathbf{x}_i)\mathbf{n}(\mathbf{x}_j)) \\ \text{cell-BM repulsion} \\ -c_{cbr}^i \nabla \psi_{1,R_i}(-d(\mathbf{x}_i)\mathbf{n}(\mathbf{x}_j)) \end{array} + \mathbf{v}_{i,mot} \quad (1)$$

Donde:

μ es la viscosidad del medio en el que se encuentra la célula.

$\Phi_{n,R}(x)$ representa la función potencial de interacción de adhesión.

$\Psi_{n,R}(x)$ constituye la función potencial de interacción de repulsión.

c_{cca}^i y c_{ccr}^i son los parámetros de adhesión y repulsión célula-célula, respectivamente.

R es el radio celular.

$R_{i,A}$ es la máxima distancia de adhesión.

$d(x)$ es la distancia a la membrana basal (BM) más próxima (si existe).

$\mathbf{n}(x)$ es un vector unitario normal a la membrana basal.

$\mathbf{v}_{i,mot}$ es la velocidad de migración de la célula

En esta expresión, además de la adhesión y repulsión célula-célula/célula-BM, interviene también una quinta aportación, indicada como $v_{i, mot}$. Este término corresponde a la velocidad de migración de la célula debida a la reorganización del citoesqueleto celular y se determina en función de un vector unitario aleatorio (ξ) que representa todas las direcciones posibles del espacio sin ningún sesgo, un parámetro de protrusión (s_{mot}), de la dirección de migración (d_{bias}) expresada como un vector unitario especificado por el usuario y la tendencia o *bias* (b) a migrar hacia esa dirección, que puede tomar valores comprendidos entre 0 y 1, siendo 0 una migración totalmente aleatoria, y 1 una migración totalmente dirigida. Si $b=0$, d_{bias} se anula y se consigue una migración aleatoria gracias al vector ξ , mientras que si $b=1$, la migración queda determinada por el vector indicado por el usuario [10]:

$$v_{mot} = \frac{(1 - b)\xi + b d_{bias}}{\|(1 - b)\xi + b d_{bias}\|} \quad (2)$$

Esta velocidad de migración cambia de forma estocástica con una determinada probabilidad (P), determinada por el tiempo de persistencia de la célula (T_{per}) y escala temporal en la que suceden los procesos mecánicos celulares (Δt_{mech}):

$$P = \frac{\Delta t_{mech}}{T_{per}} \quad (3)$$

En este trabajo se estudiará la influencia de los parámetros de adhesión y repulsión célula-célula y célula-membrana basal. Otros parámetros, como el radio celular ($R = 4.4 \mu m$) y la distancia máxima de adhesión ($R_{i,A} = 1.25 R$) se mantendrán constantes (más detalles sobre los parámetros empleados en el apartado 4).

Los fenómenos de adhesión y repulsión se modelan mediante potenciales análogos a los aplicables a la interacción entre dos moléculas (figura 11), que dependen del tamaño celular, la distancia máxima de adhesión, los parámetros de repulsión y adhesión, y la distancia con respecto a otras células.

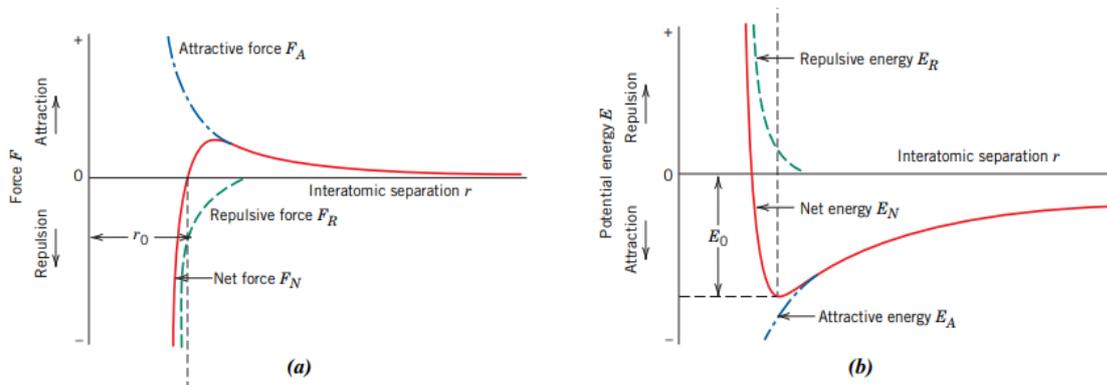


Figura 11. Variación de energía potencial (derecha) y fuerza de interacción (izquierda) entre dos átomos aislados. Imagen tomada de [11].

3. Evidencias experimentales de la migración de células T

Park & Doh (2019) ^[12] han realizado unos experimentos de migración de células T que se han elegido para simular con un modelo y comprobar la validez del mismo. La validación del modelo es de naturaleza cualitativa, y se efectúa en base al comportamiento celular observado en los resultados de dicho trabajo. En él, los autores fabrican microcanales de polidimetilsiloxano o dimeticona (PDMS) de distintas dimensiones y los llenan con linfocitos T hasta alcanzar un alto grado de empaquetamiento celular en el interior de los mismos (*figura 12*). Posteriormente, mediante velocimetría de imágenes de partículas (PIV) (*apartado 3.a.*), los autores extraen parámetros cinemáticos como la velocidad de migración o el grado de direccionalidad de las células en el interior de los canales.

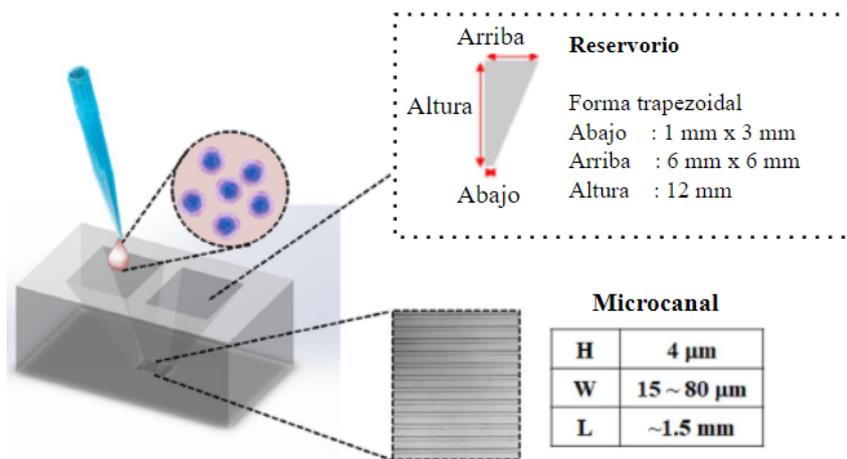


Figura 12. Representación de los microcanales de PDMS con reservorios de morfología trapezoidal en los extremos, y una altura (H) y longitud (L) fijas de 4 µm y 1.5 mm respectivamente, y una anchura (W) variable. Imagen modificada de [12].

Se emplearon canales de una longitud fija de 1.5 mm, 4 µm de alto y anchuras variables comprendidas entre 15 µm y 80 µm. En los extremos, se fabricaron dos reservorios con forma trapezoidal, en los que se depositó medio con una concentración celular de 10^7 células / mL, que sedimentaron hacia la entrada de los microcanales y migraron hacia el interior de los mismos.

Los microcanales con los que se obtuvieron los datos fueron recubiertos con la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), ligando del antígeno asociado a la función linfocitaria 1 (LFA-1) presente en los linfocitos. Con este recubrimiento y transcurridas 9h tras el sembrado, se alcanzó una densidad de llenado en los microcanales de $\sim 2.5 \cdot 10^{-3}$ células/ μm^3 (0.89). Otros ligandos ensayados para el recubrimiento de los canales fueron la albúmina sérica bovina (BSA) y un surfactante no iónico (Pluronic F-127), obteniendo densidades de llenado mucho menores tras 3 y 9h desde el sembrado (*figura 13*).

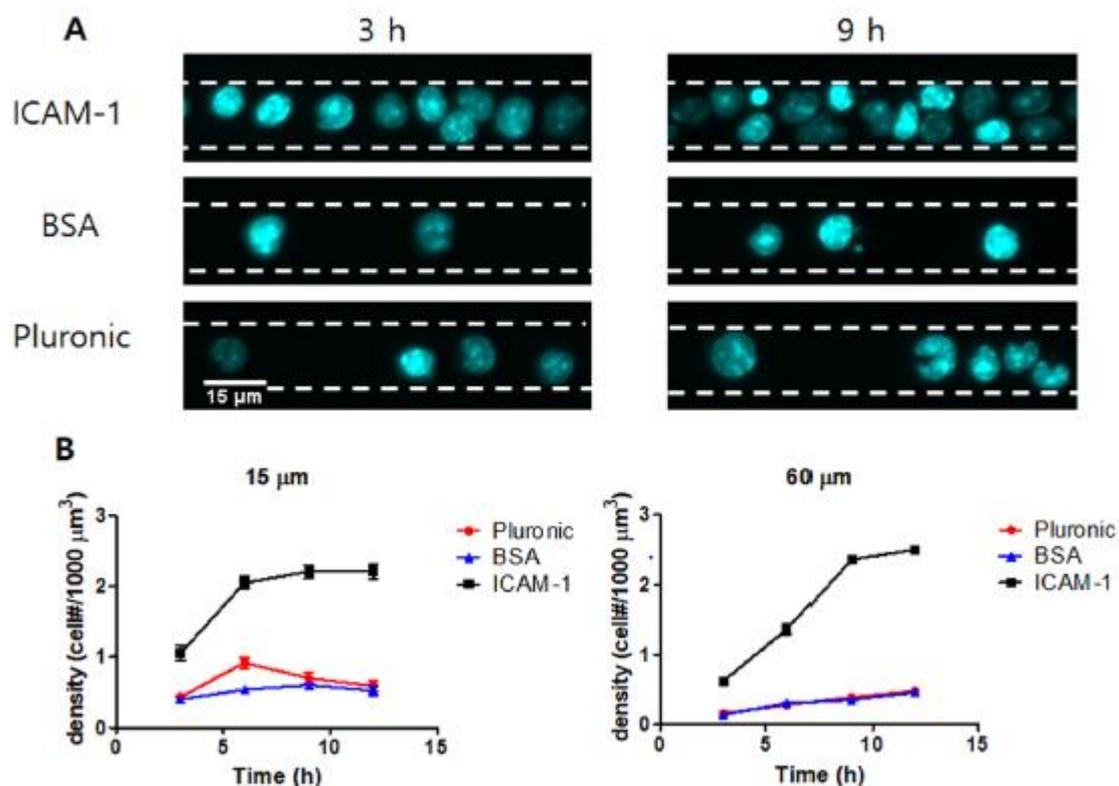


Figura 13. Cinética de llenado de linfocitos T para los tres tipos de recubrimientos ensayados transcurridas 3 y 9h tras el sembrado en canales de 15 y 60 μm. Imagen tomada de [12].

Para estudiar la migración celular en los microcanales se empleó microscopía de lapso de tiempo durante 10 min en intervalos de 15 s, y se obtuvieron imágenes mediante PIV con píxeles de 3.5μm x 3.5μm que fueron posteriormente analizadas (apartado 3.a). Debido a que se emplearon linfocitos T de ratón en estado de latencia, y al hecho de que el tiempo de análisis es reducido, la división celular es mínima, así como la influencia de ésta sobre el análisis.

Los parámetros de interés determinados a partir del estudio de las imágenes obtenidas fueron la velocidad, V , y la orientación, χ , tomando el valor medio de todos los píxeles para el microcanal completo. La V se obtiene como la resultante de la velocidad en el eje x y en el eje y , mientras que la χ toma valores comprendidos entre 0 y 1, y se determina a partir del coseno del ángulo que forma dicha resultante con respecto al eje x (figura 14). Cuanto menor sea dicho ángulo, mayor será la orientación y las células migrarán de forma más paralela a la pared del microcanal, mientras que cuanto mayor sea el ángulo, menor será la direccionalidad en el eje x .

También se evaluó el valor de dichos parámetros en función de la posición de la célula con respecto al centro del canal (V_y , χ_y), y se representaron los resultados frente a la posición normalizada Y (figura 14), determinada como el cociente entre la posición en la coordenada y de la célula en valor absoluto, y la anchura del canal (15, 40 y 80 μm), y que alcanza valores comprendidos entre 0 y 0.5, donde 0 es el centro del microcanal, y 0.5 es la pared.

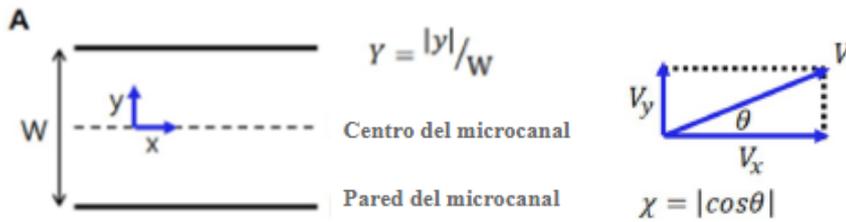


Figura 14. Representación de los parámetros estimados. Imagen modificada de [12].

Entre los resultados obtenidos por los autores (figura 15), se encuentra que las células presentaban una velocidad media de $\sim 7 \mu\text{m}/\text{min}$. Este valor medio es similar para todos los anchos de microcanal ensayados (figura 15.B), pero no así sucede con el perfil de velocidad que presentan las células en función de la posición normalizada (Y) con respecto al centro para cada uno de los microcanales (figura 15.C).

Se aprecia que para los microcanales más estrechos, de 15 y 40 μm , la velocidad de las células parece ser independiente de la posición en la que se encuentren, mientras que en el caso del canal de 80 μm , la velocidad cambia de forma creciente a medida que la célula se aproxima al borde del microcanal ($Y \sim 0.5$).

La orientación de las células experimenta una clara tendencia descendente a medida que aumenta la anchura del microcanal (figura 15.D), y se observa que al igual que sucede con la velocidad, también aumenta a medida que la célula se aproxima al extremo del microcanal ($Y \sim 0.5$) y disminuye cuando la célula está cerca del centro ($Y \sim 0$) (figura 15.E).

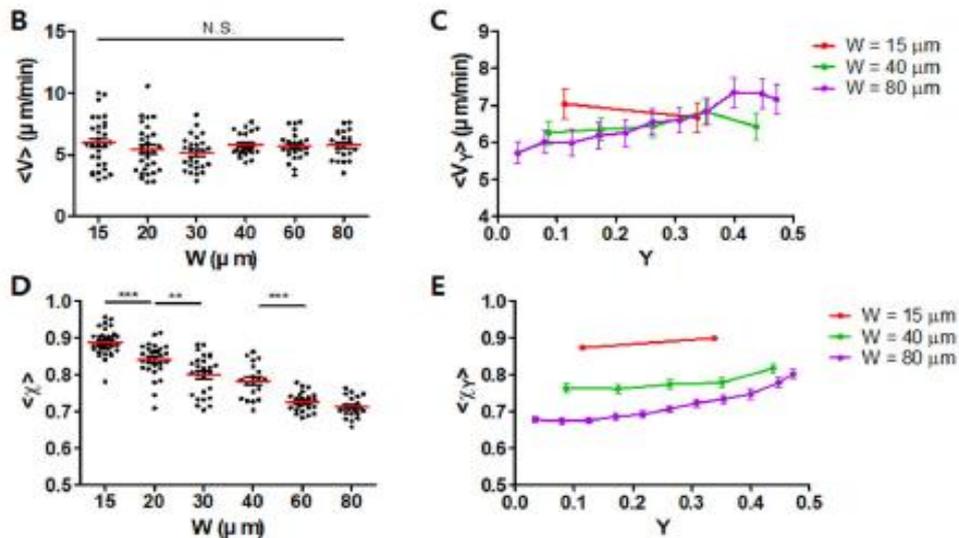


Figura 15. B) Representación de la velocidad (V) de los linfocitos en microcanales de anchura variable; C) Representación de la velocidad de los linfocitos en función de la posición normalizada, Y ; D) Grado de direccionalidad de las células en los microcanales de anchura variable (X); E) Grado de direccionalidad de las células en función de la posición normalizada, Y . $n=32$ para canal de 15 μm , $n=29$ para el de 20 μm , $n=26$ para el de 30 μm , $n=20$ para el de 40 μm , $n=24$ para el de 60 μm y $n=21$ para el de 80 μm . Imagen tomada de [12].

3.a. Velocimetría de imágenes de partículas (PIV)

La técnica de toma de datos empleada por los autores, denominada velocimetría de imagen de partículas (PIV) es una técnica óptica basada en imagen para la obtención de múltiples medidas de velocidad de partículas trazadoras en un fluido. En el caso de las células de este trabajo, los autores marcaron los linfocitos T con la tinción fluorescente DiI vybrant 0.3% (figura 16).

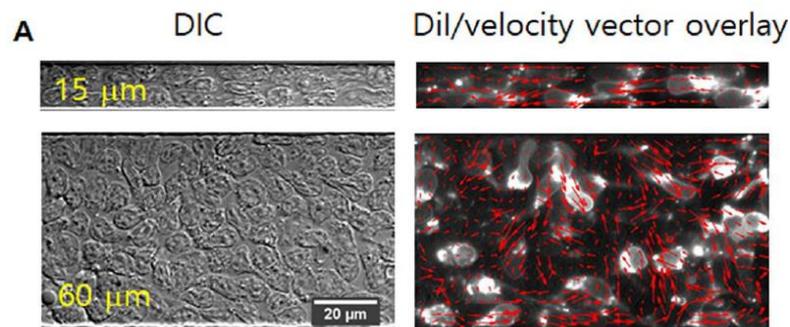


Figura 16. Izquierda: imágenes de las células en microcanales de 15 y 60 μm obtenidas mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) y derecha: imagen de linfocitos marcados con tinción fluorescente solapada con el mapa vectorial obtenido tras análisis PIV. Imagen tomada de [12].

Esta técnica se basa en la medición de la posición de una partícula entre dos pulsos de luz, y distingue dos etapas: una primera etapa de adquisición de imágenes, seguida de una segunda etapa de análisis y evaluación de las mismas.

En la primera etapa se ilumina el fluido en el que están inmersas las partículas con un haz de luz y una cámara CCD captura una imagen del área iluminada en cada pulso (figura 17). Una vez obtenida la secuencia de imágenes, cada una se subdivide en pequeñas regiones denominadas “áreas de interrogación” o “ventanas” (I_1 para un instante t , y I_2 para un instante $t+1$), que se comparan entre sí dos a dos mediante correlación cruzada, obteniendo como resultado el desplazamiento de las partículas y un mapa vectorial de velocidades instantáneas. Si se repite esto para todas las áreas de interrogación de la imagen, se obtiene el vector local de desplazamientos de la región iluminada [13].

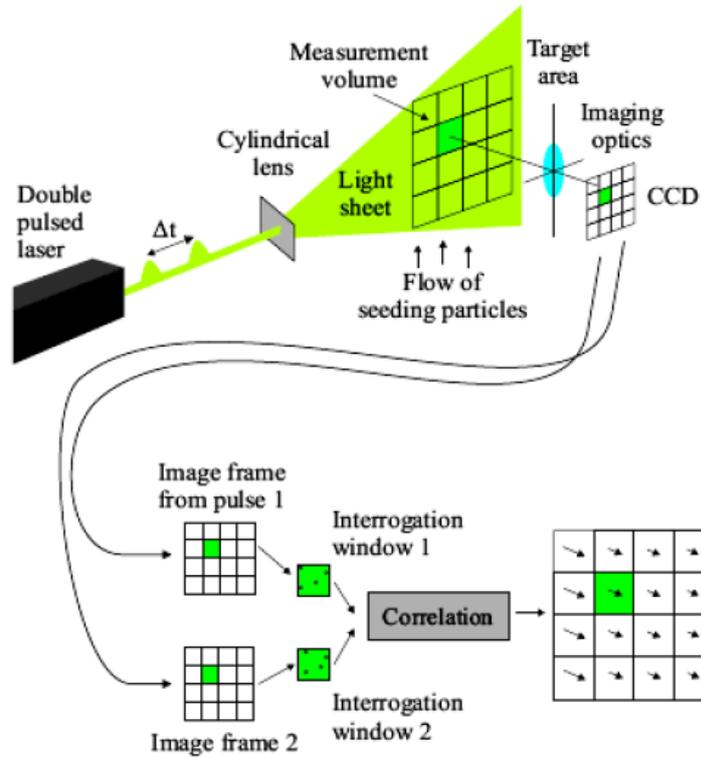


Figura 17. Representación del proceso de captura y análisis de imágenes mediante PIV. Imagen tomada de [14].

Como resultado de la comparación de las ventanas de interrogación, se obtienen valores de velocidad que son posteriormente sometidos a un proceso de validación de vectores mediante softwares como *Cleanvec*, que aplica una serie de filtros para eliminar vectores incorrectos, interpola aproximando por mínimos cuadrados los valores eliminados y suaviza las imágenes aplicando un filtro gaussiano.

A continuación, se efectúan los cálculos correspondientes para obtener los valores de velocidad, y se elaboran diagramas con los resultados obtenidos. A pesar de que los filtros anteriormente aplicados suelen para filtrar bien las imágenes, debido a que son dependientes de la elección de un valor umbral, es posible que haya vectores incorrectos que queden sin eliminar. Por ello, se suele recurrir al cálculo del valor medio de un número considerable de campos vectoriales obtenidos para distintos instantes de tiempo, aunque se pierde con ello información relativa a la evolución del campo vectorial de velocidades con el paso del tiempo [15].

4. Descripción del modelo elaborado con *PhysiCell*

El modelo elaborado para reproducir los resultados es un modelo bidimensional, en el que se ha descartado la altura de los microcanales, y se ha considerado únicamente su longitud (1.5

mm) y las anchuras variables (15-80 μm) (más información sobre la representación gráfica de los microcanales en el *Anexo II: código 1*). En la *figura 18* se representan las dimensiones de cada canal.

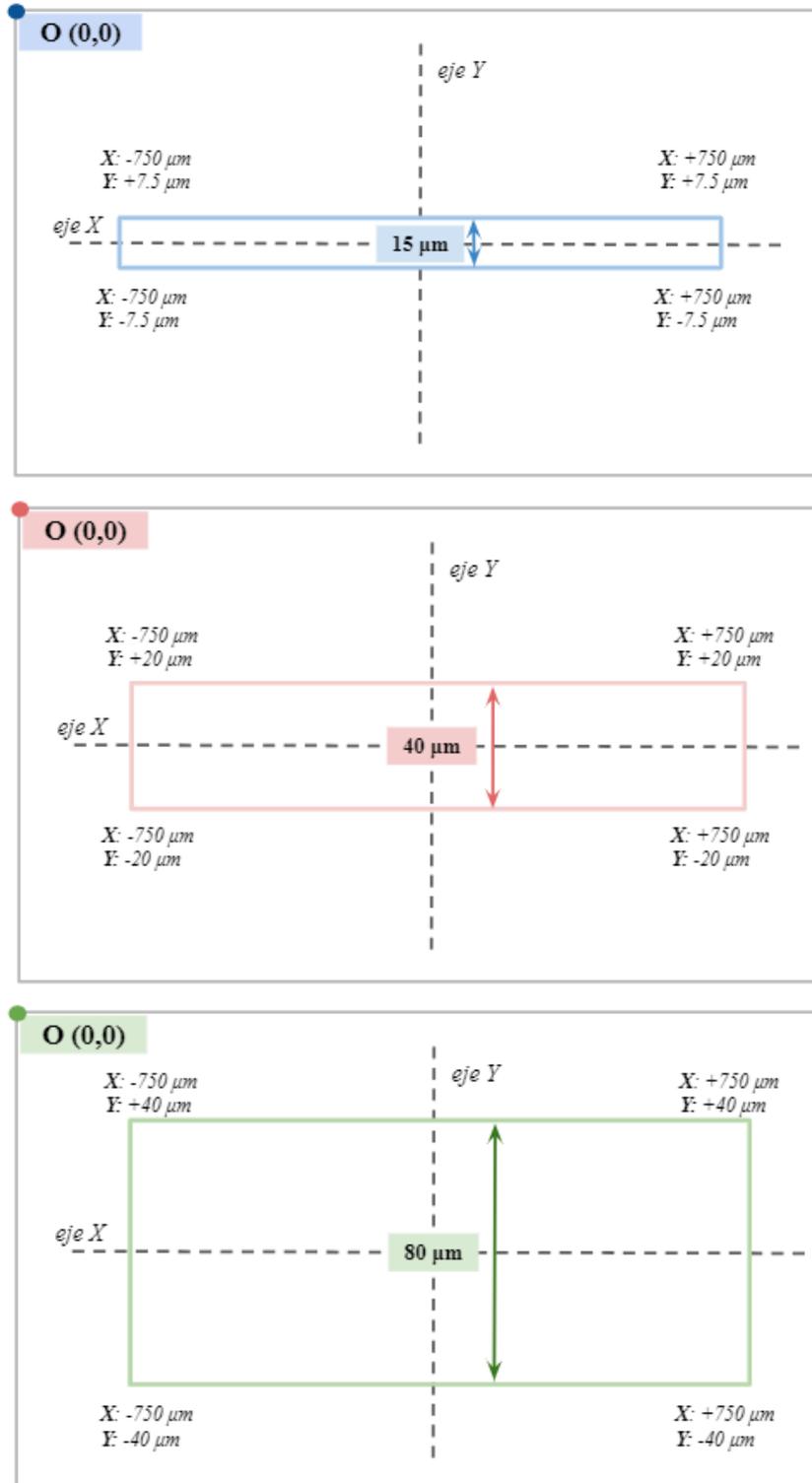


Figura 18. Representación de las dimensiones de los canales.

Con la finalidad de emular el ciclo celular de las células empleadas en el artículo de referencia, donde la división celular es casi nula, se ha bloqueado el ciclo celular durante la simulación, y para cada microcanal, se ha calculado el número de células necesario para alcanzar la mencionada densidad de 0.89, estimada como el cociente entre el área de las células que ocupan el microcanal, y el área del microcanal en cuestión.

$$\frac{\text{Área}_{células}}{\text{Área}_{canal}} = 0.89 \quad (4)$$

De dicha expresión, se despeja el área de las células, que viene dado por el producto de la densidad deseada y el área del canal, la cual a su vez se puede determinar a partir de las dimensiones físicas del microcanal:

$$\text{Área}_{células} = 0.89 \cdot \text{Área}_{canal} \quad (5)$$

$$\text{Área}_{canal} = \text{Anchura}_{canal} \cdot \text{Longitud}_{canal} \quad (6)$$

Una vez obtenido el valor de área que ocupan todas las células en el microcanal para que satisfagan esa densidad requerida, sabiendo el área de una única célula (considerando como radio el mencionado valor en el artículo de $r = 4.4 \mu\text{m}$) se puede estimar el número de células que debe haber en cada microcanal (*tabla 1*):

$$\text{Área}_{célula} = \pi r^2 = 60.82 \mu\text{m}^2 \quad (7)$$

Anchura del microcanal	15 μm	20 μm	30 μm	40 μm	60 μm	80 μm
Área canal (μm^2)	22 500	30 000	45 000	60 000	90 000	120 000
Área células (μm^2)	20 025	26 700	40 050	53 400	80 100	106 800
Número de células	329	439	659	878	1317	1754

Tabla 1. Áreas y número de células considerados para cada microcanal.

A partir de estos resultados, se ha intentado aproximar lo máximo posible el número de agentes presentes en las simulaciones para cada caso, obteniendo 332 agentes para el canal de 15 μm , 434 para el canal de 20 μm , 668 agentes para el canal de 30 μm , 868 agentes para el canal de 40 μm , 1302 agentes para el canal de 60 μm y 1736 agentes para el de 80 μm .

Los parámetros de adhesión, repulsión, dirección de migración... etc. introducidos para la simulación se recogen en la *tabla 2*:

	15 μm	20 μm	30 μm	40 μm	60 μm	80 μm
Repulsión célula - célula ($\mu\text{m}/\text{min}$)	2	2	2	2	2	2
Adhesión célula - célula ($\mu\text{m}/\text{min}$)	0	0	0	0	0	0
Repulsión célula - MB ($\mu\text{m}/\text{min}$)	65	65	65	65	65	65
Adhesión célula - MB ($\mu\text{m}/\text{min}$)	1	1	1	1	1	1
Ángulo impacto	80°	80°	80°	80°	80°	80°
Velocidad ($\mu\text{m}/\text{min}$)	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Bias	0.7	0.60	0.55	0.53	0.52	0.51
Vector de dirección	{1.0,0}	{1.0,0}	{1.0,0}	{1.0,0}	{1.0,0}	{0.99,0.11,0}
Tiempo de persistencia (min)	1	1	1	1	1	1

Tabla 2. Parámetros considerados en las simulaciones para cada canal.

Debido a la mencionada limitación de los MBA basados en el centro, en los que la posición de la célula viene dada por su núcleo y no es posible representar las deformaciones por contacto célula-célula o célula-ECM ya desde los primeros instantes de tiempo aparecen solapamientos las células, debido a la elevada densidad celular que hay en los microcanales. En el instante 0, se disponen las células alejadas del extremo derecho del canal para evitar que haya acumulación de células en dicha posición tras 10 min de migración y que algunas vean impedido su movimiento por estar cerca de la pared (*figura 19*). En el *Anexo II: código 2* se describe en más detalle el procedimiento llevado a cabo para el llenado de los microcanales.

Además, con la intención de limitar el movimiento de las células más allá del microcanal, se dispuso de una función en *PhysiCell*, gracias a la cual las células no migran más allá del dominio especificado (más detalles en el *Anexo II: código 3*).

Para replicar la ventana temporal de experimentación, se asigna un tiempo total de simulación de 10 min, con toma de datos (posición células, velocidad, orientación ... etc.) cada 15 s, con lo que se obtienen para cada canal 68 archivos de extensión *.mat*, que son posteriormente postprocesados mediante funciones de MATLAB elaborada para dicho fin.

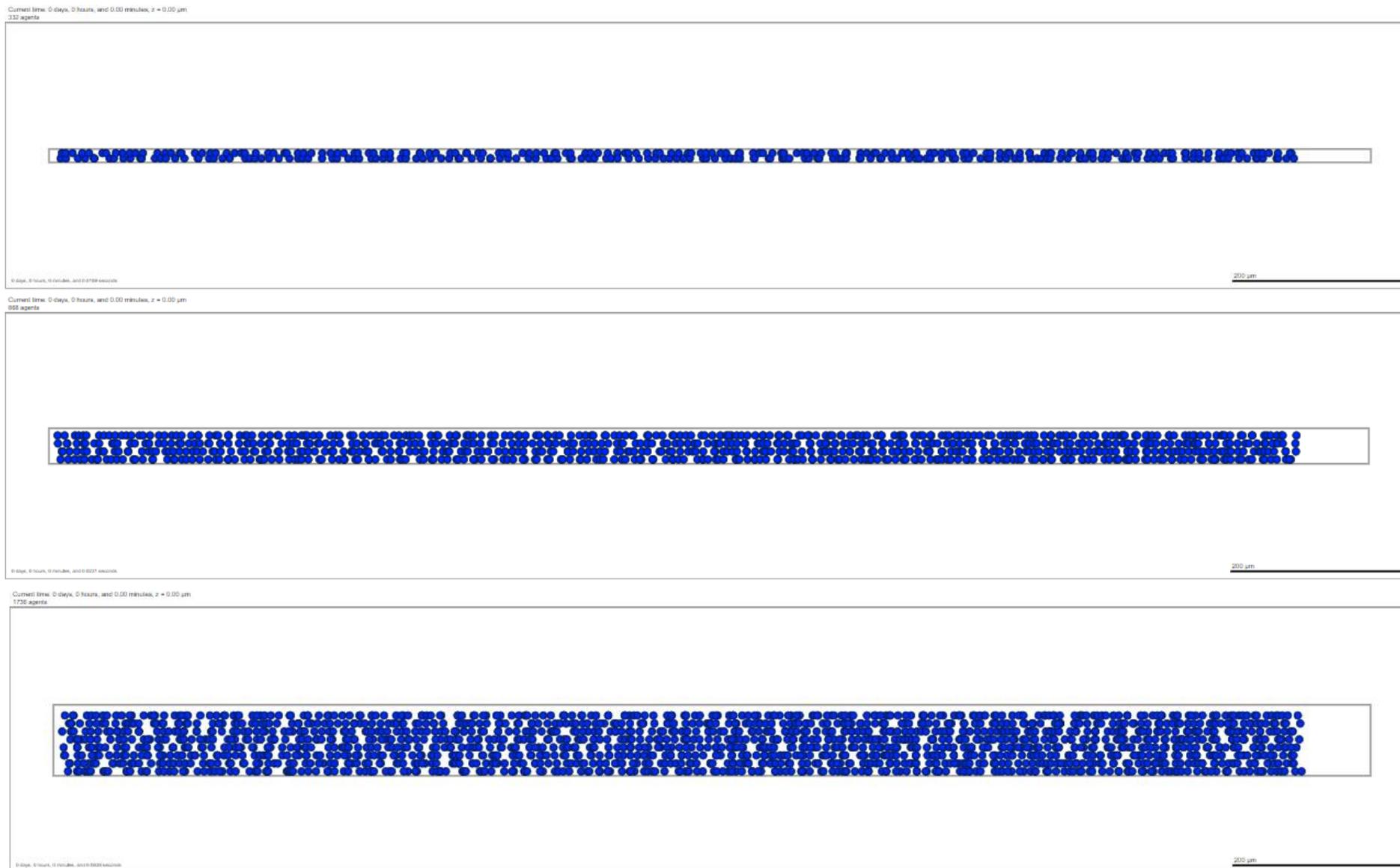


Figura 19. Disposición de las células en el primer instante de la simulación para el microcanal de 15 μm (superior), 40 μm (central) y 80 μm (inferior).

El postprocesamiento se diseñó con la intención de replicar en lo posible la técnica de análisis de imagen que acompaña a la técnica PIV que emplean los autores del artículo de referencia para el análisis de sus datos. Se pueden distinguir varias etapas:

1. Determinación de la velocidad y de la direccionalidad.

Este cálculo se itera para cada una de las células en cada instante de tiempo a partir de las coordenadas (x, y) proporcionadas por el archivo *.mat* de *PhysiCell*.

2. Clasificación y asignación de las células.

Como se ha indicado anteriormente, el empleo de PIV trae consigo el manejo de píxeles de imagen obtenidos en instantes sucesivos de tiempo, y cuya comparación dos a dos permite determinar el desplazamiento de células en ese intervalo de tiempo, y un mapa de velocidades correspondiente a cada píxel.

Para simular esto, primero se divide el dominio de los microcanales en “píxeles” de dimensiones $3.5\mu\text{m} \times 3.5\mu\text{m}$. Esta discretización se realiza dividiendo el ancho de cada canal (15, 40 u $80\mu\text{m}$) entre $3.5\mu\text{m}$, de modo que se obtienen en total 4 píxeles para el canal de $15\mu\text{m}$, 10 píxeles para el canal de $40\mu\text{m}$ y 22 píxeles para el canal de $80\mu\text{m}$ en la dimensión *y*. A continuación, se clasifican las células en función de su posición, y se asigna a cada píxel la velocidad y la orientación de las células que lo ocupan.

Algo similar se implementa también en la dimensión *x*. Debido a que el diámetro celular simulado es de $8.8\mu\text{m}$, se considera que las células ocupan 3 píxeles en el eje *x*, y por ello el valor de velocidad y orientación de un píxel es también asignado a los píxeles adyacentes.

3. Representación de resultados

Una vez obtenidos todos los datos de velocidad y orientación de todas las células, y una vez que éstos han sido adjudicados a los píxeles cuya posición ocupen, se procede a estimar el valor medio de velocidad de cada píxel. De ahora en adelante, la mención de píxel hace referencia a cada una de las subunidades que componen el dominio de los microcanales en la dimensión *y*; esto es 2, 5 y 11 píxeles para el canal de 15, 40 y $80\mu\text{m}$, respectivamente.

Para cada píxel, se estima el valor medio de velocidad y orientación de todas las células, en todos los instantes de tiempo y en todo el largo del canal. De esta forma, se obtienen los valores necesarios para representar los resultados de la *figura 15.C* y *figura 15.E*, con 2 valores correspondientes a 2 píxeles para el microcanal de $15\mu\text{m}$, 5 valores para el de $40\mu\text{m}$ y 11 valores para el de $80\mu\text{m}$, todos ellos representados frente a la posición normalizada del centro del píxel.

Finalmente, estimando la media de todos los píxeles se obtiene el valor medio de velocidad y orientación en todo el microcanal, y ese valor medio es lo que se representa en la *figura 15. B* y *figura 15.D*. Habrá tantos valores como simulaciones (o experimentos, en el caso de los autores) se efectúen.

En el *Anexo III* se incluye información más detallada sobre el postprocesamiento llevado a cabo, tomando el microcanal de 40 μm como ejemplo.

5. Resultados y discusión

Velocidad de la migración en los microcanales

En relación a la velocidad de las células en los microcanales más estrechos (15-40 μm), aunque gráficamente parece haber diferencias entre los resultados obtenidos de la simulación con respecto a los publicados por Park & Doh, los autores concluyen en su publicación que, en estos dos casos, la velocidad de las células es independiente de la posición en la que se encuentran (*figura 20*). Es por ello que se puede considerar que el modelo consigue simular adecuadamente la velocidad tanto para el canal de 15 μm , con una velocidad constante de aproximadamente 7 $\mu\text{m}/\text{min}$, como en el canal de 40 μm , en cuyo caso el modelo muestra una ligera tendencia ascendente cerca de la pared del microcanal, seguida de un leve descenso de la velocidad similar al mostrado por los autores.

En el caso del canal de 80 μm , sin embargo, no ha sido posible capturar la tendencia ascendente que muestran los autores a medida que las células se aproximan a las paredes que las delimitan. Park & Doh consideran que este incremento de velocidad es una probable consecuencia de una reducción de eventos de colisión célula-célula cerca de las paredes en comparación con las regiones centrales del microcanal, así como de una protrusión celular guiada por las fronteras físicas del microcanal. Dada la naturaleza del modelo, que es un modelo basado en el centro de las células, no es posible recrear dichos resultados, debido a que una limitación del mismo es la imposibilidad de simular las deformaciones necesarias para la protrusión, así como los eventos de repulsión célula-célula responsables de la reducida velocidad en el centro del microcanal en comparación con la que presentan las células en las proximidades de las paredes.

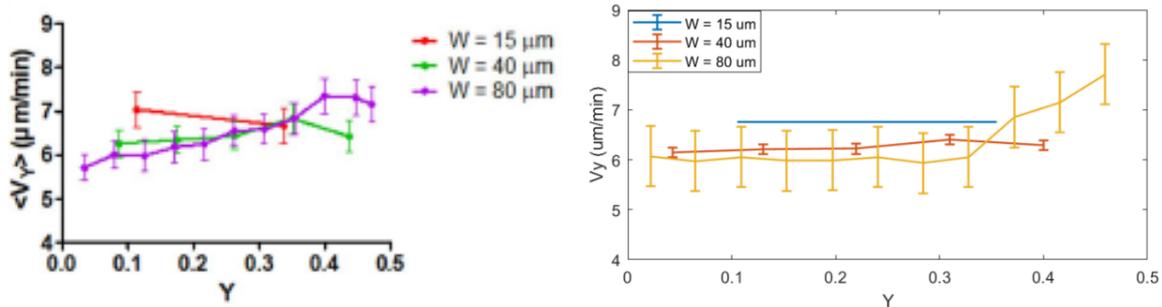


Figura 20. Velocidad media de las células en los microcanales en posiciones normalizadas. Imagen superior: resultados del trabajo experimental de Park & Doh (2017). Imagen inferior: resultados de la simulación. En ambos casos, $n=32$ para el canal de $15\ \mu\text{m}$, $n=20$ para el de $40\ \mu\text{m}$ y $n=21$ para el de $80\ \mu\text{m}$.

La velocidad media de las células simuladas en los microcanales se encuentra comprendida entre los $6\text{-}7\ \mu\text{m}$ (ver tabla en *Anexo IV* con las velocidades medias de cada simulación), valor que se asemeja al promedio obtenido también por los autores (*figura 21*). Sin embargo, no ha sido posible obtener tanta variabilidad entre simulaciones como la que se observa en los datos experimentales. Esto probablemente se pueda atribuir a que el modelo y el postprocesamiento de los datos no son capaces de replicar la complejidad de la técnica de PIV y el análisis posterior que se realiza. Además, la variabilidad experimental observada puede deberse a las interacciones que se dan entre las células densamente empaquetadas en el canal, y la representación de ese tipo de interacciones es precisamente una de las limitaciones del modelo, por lo que la variabilidad obtenida es muy reducida.

En un intento de reproducir la gran variabilidad que se muestra en los resultados experimentales, se modificó la función de velocidad estándar de *PhysiCell*. Dicha modificación consiste en el empleo de una función de distribución normal ya implementada en *PhysiCell*, denominada *NormalRandom*, que requiere como variables de entrada un valor de media, que en este caso se ha tomado $6.5\ \mu\text{m}/\text{min}$ para aproximar al valor experimental, y un valor de desviación típica. Éste último parámetro se fue variando para evaluar el cambio en la dispersión de los datos, sin obtener mejoras relevantes en la variabilidad de los resultados (en el *Anexo II: código 4* se recogen más detalles sobre esta implementación, así como los resultados obtenidos).

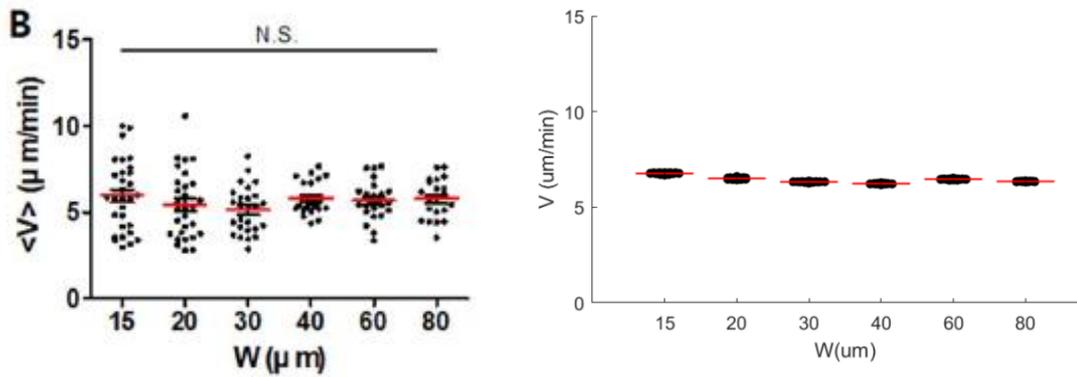


Figura 21. Velocidad media de las células en los microcanales. Imagen superior: resultados del trabajo experimental de Park & Doh (2017). Imagen inferior: resultados de la simulación. En ambos casos, $n=32$ para el canal de $15 \mu\text{m}$, $n=29$ para el de $20 \mu\text{m}$, $n=26$ para el de $30 \mu\text{m}$, $n=20$ para el de $40 \mu\text{m}$, $n=24$ para el de $60 \mu\text{m}$ y $n=21$ para el de $80 \mu\text{m}$.

Direccionalidad de la migración en los microcanales

En relación a la orientación que presentan las células simuladas (figura 22), se aprecia que de nuevo en el microcanal de $15 \mu\text{m}$, las células migran de forma casi paralela a las paredes de del microcanal, probablemente debido a que el reducido tamaño del dominio permite que las paredes guíen la migración celular. Algo similar sucede con el canal de $40 \mu\text{m}$, donde la influencia de las paredes da lugar a una orientación casi constante para todas las posiciones.

El microcanal simulado de $80 \mu\text{m}$ vuelve a mostrar considerables diferencias con respecto a los resultados publicados por los autores. A pesar de que se ha podido obtener una ligera tendencia a migrar de forma más paralela con respecto a la pared en las posiciones más cercanas a ésta, este incremento no se observa desde las posiciones más centrales del microcanal, como sí que sucede en el caso experimental. Ello de nuevo puede atribuirse al hecho de que las colisiones célula - célula son las responsables del cambio de dirección de las células tras el choque y la consiguiente pérdida de direccionalidad, siendo éste un comportamiento que no ha podido recogerse en el modelo debido a la limitación en cuanto a la representación de las interacciones célula - célula.

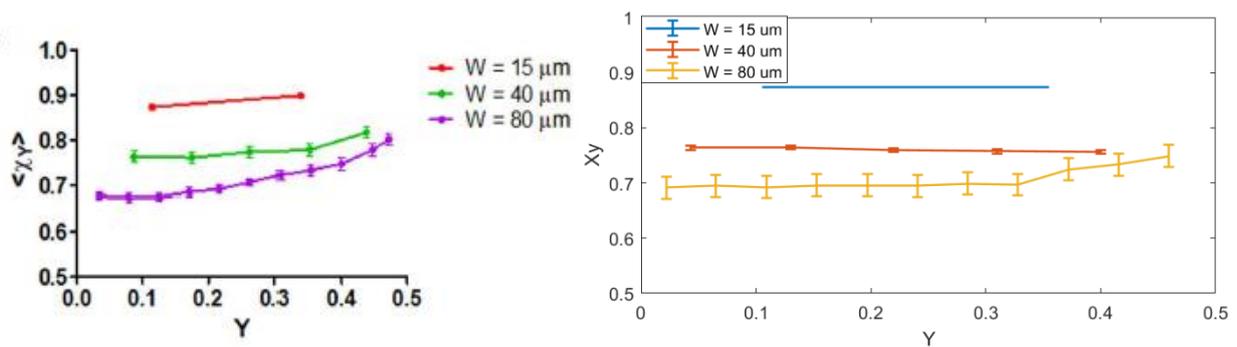


Figura 22. Orientación media de las células en los microcanales en posiciones normalizadas. Imagen izquierda: resultados del trabajo experimental de Park & Doh (2017). Imagen derecha: resultados de la simulación. En ambos casos, $n=32$ para el canal de $15 \mu\text{m}$, $n=20$ para el de $40 \mu\text{m}$ y $n=21$ para el de $80 \mu\text{m}$.

La representación del valor medio de χ para cada microcanal simulado (figura 23) muestra un gradual descenso similar al obtenido por Park & Doh a medida que aumenta el ancho del canal (ver tabla en Anexo IV con las orientaciones medias de cada simulación). En los canales más estrechos, la motilidad está altamente influida por las paredes de los microcanales. Al igual que en el caso de la velocidad media de las simulaciones en cada microcanal, la variabilidad de nuevo es muy reducida en comparación con la de los resultados experimentales, debido a la deficiente representación de las interacciones célula-célula que presenta el modelo.

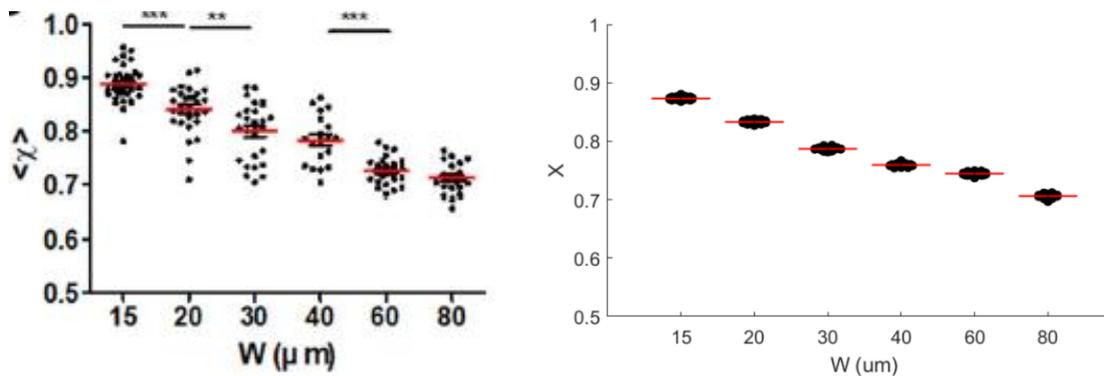


Figura 23. Orientación media de las células en los microcanales. Imagen superior: resultados del trabajo experimental de Park & Doh (2017). Imagen inferior: resultados de la simulación. En ambos casos, $n=32$ para el canal de $15 \mu\text{m}$, $n=29$ para el de $20 \mu\text{m}$, $n=26$ para el de $30 \mu\text{m}$, $n=20$ para el de $40 \mu\text{m}$, $n=24$ para el de $60 \mu\text{m}$ y $n=21$ para el de $80 \mu\text{m}$.

6. Conclusiones y perspectivas futuras

Las interacciones célula-célula, así como la deformación celular que experimentan los linfocitos T al migrar son dos elementos fundamentales que caracterizan la motilidad de este tipo celular. El modelo elaborado es capaz de simular de forma aproximada la velocidad y direccionalidad de células en microcanales estrechos (15 - 40 μm), donde ambos parámetros son relativamente constantes debido a la influencia que ejercen las paredes de los microcanales sobre la migración de las células que albergan. Sin embargo, en el caso de los microcanales anchos (60 - 80 μm) donde la influencia de las paredes no es tan notoria en regiones centrales alejadas de las paredes y toman un papel más protagonista las interacciones célula - célula, el modelo ha demostrado ser no muy eficiente a la hora de simular la velocidad y orientación de las células.

Esta limitación puede superarse empleando otro tipo de modelos, como los modelos deformables o los modelos en vértice, que contemplen las alteraciones que tienen lugar en la morfología celular durante la migración, y que reproduzcan de forma fiel los frecuentes eventos de repulsión que experimentan las células en ambientes con elevada densidad celular.

7. Bibliografía

- [1]. A., T. (2021). Immunology: What cells have a myeloid lineage and how are they identified? Recuperado de <https://blog.cellsignal.com/immunology-what-cells-have-a-myeloid-lineage-and-how-are-they-identified>.
- [2]. Dupré, L., Houmadi, R., Tang, C., & Rey-Barroso, J. (2015). T Lymphocyte Migration: An Action Movie Starring the Actin and Associated Actors. *Frontiers In Immunology*, 6. doi: 10.3389/fimmu.2015.00586
- [3]. Krummel, M., Bartumeus, F., & Gérard, A. (2016). T cell migration, search strategies and mechanisms. *Nature Reviews Immunology*, 16(3), 193-201. doi: 10.1038/nri.2015.16
- [4]. Witt, C., Raychaudhuri, S., Schaefer, B., Chakraborty, A., & Robey, E. (2005). Correction: Directed Migration of Positively Selected Thymocytes Visualized in Real Time. *Plos Biology*, 3(10), e373. doi: 10.1371/journal.pbio.0030373
- [5]. Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T., & Robey, E. (2006). Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nature Immunology*, 7(4), 338-343. doi: 10.1038/ni1323
- [6]. Masopust, D., & Schenkel, J. (2013). The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nature Reviews Immunology*, 13(5), 309-320. doi: 10.1038/nri3442
- [7]. Van Liedekerke, P., Palm, M., Jagiella, N., & Drasdo, D. (2015). Simulating tissue mechanics with agent-based models: concepts, perspectives and some novel results. *Computational Particle Mechanics*, 2(4), 401-444. doi: 10.1007/s40571-015-0082-3
- [8]. González Valverde, I. (2018). *Modeling and simulation of multi-cellular systems using hybrid FEM/Agent-based approaches* (Ph. D). University of Zaragoza.
- [9]. Macklin, P., Edgerton, M., Thompson, A., & Cristini, V. (2012). Patient-calibrated agent-based modelling of ductal carcinoma in situ (DCIS): From microscopic measurements to macroscopic predictions of clinical progression. *Journal Of Theoretical Biology*, 301, 122-140. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.02.002>
- [10]. Ghaffarizadeh, A., Heiland, R., Friedman, S., Mumenthaler, S., & Macklin, P. (2018). PhysiCell: An open-source physics-based cell simulator for 3-D multicellular systems. *PLOS Computational Biology*, 14(2), e1005991. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005991>
- [11]. Callister, W., & Rethwisch, D. (2015). *Fundamentals of materials science and engineering: an integrated approach*. (5th ed., p. 28). United States of America: Wiley.
- [12]. Park, H., & Doh, J. (2019). T cell migration in microchannels densely packed with T cells. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43569-w>
- [13]. *Measurement Principles of PIV - Dantec Dynamics | Precision Measurement Systems & Sensors*. Dantec Dynamics | Precision Measurement Systems & Sensors. (2021). Recuperado de

<https://www.dantecdynamics.com/solutions-applications/solutions/fluid-mechanics/particle-image-velocimetry-piv/measurement-principles-of-piv/>.

[14]. ÖZTÜRK, N. (2006). *INVESTIGATION OF FLOW CHARACTERISTICS IN HEAT EXCHANGERS OF VARIOUS GEOMETRIES*. UNIVERSITY OF ÇUKUROVA.

[15]. Cavazzini, G., Dazin, A., Pavesi, G., Dupont, P., & Bois, G. (2012). Post-Processing Methods of PIV Instantaneous Flow Fields for Unsteady Flows in Turbomachines. *The Particle Image Velocimetry - Characteristics, Limits And Possible Applications*. <https://doi.org/10.5772/37273>