

# Anexo I:

## *Estado del arte. Experimentación migración celular.*

---

Históricamente, se ha conocido que los diferentes factores químicos tenían un efecto sobre el movimiento celular, y se han llevado a cabo diferentes ensayos convencionales como pueden ser: ensayos cámara Boyden, ensayos basados en micropipetas, etc. Estos tipos de ensayo, bastante simples, no son capaces normalmente de mantener y controlar los gradientes químicos u otras condiciones. Además, algunos de ellos no permiten la cuantificación en tiempo real de la migración celular a nivel de una única célula.

En los últimos años se ha producido un avance fundamental en el conocimiento de cómo los estímulos químicos afectan al proceso de migración celular, posible, entre otros motivos, gracias al desarrollo y la evolución sufrida por los dispositivos microfluídicos. Estos dispositivos han aportado una plataforma sobre la que realizar ensayos controlando multitud de variables tanto biofísicas como bioquímicas impensables hasta la fecha, así como aportar mejoras en cuanto a la monitorización del proceso se refiere

Estos dispositivos son encapsulados fabricados con láser que cuentan con canales microscópicos para la realización de experimentos. Permiten el establecimiento de gradientes de concentración bien definidos y constantes en el tiempo, y ofrecen numerosas ventajas en cuanto a bajo consumo de reactivos y flexibilidad en los ensayos. Además, consiguen una mejor mimetización de los entornos *in vitro*. En cuanto a monitorización y evaluación de resultados, hacen posible una valoración cuantitativa, continua y más eficiente de la migración celular.

Los dispositivos microfluídicos comúnmente se clasifican en [38]:

- **Dispositivos en Y (“Y” device) :**

Este tipo de dispositivos destaca fundamentalmente por su simplicidad y su principal característica es que solo permite flujo en 1D. Sus principales ventajas son: capacidad para generar gradientes estables y dinámicos, bajo consumo de agentes químicos, alto rendimiento y buena visualización de resultados. Sus principales inconvenientes son: solo permite generar gradientes en 1D y con formas limitadas, tensión cortante introducida por el fluido y requerimiento de control externo (Figura. 29C).

- **Dispositivos de red (Network device):**

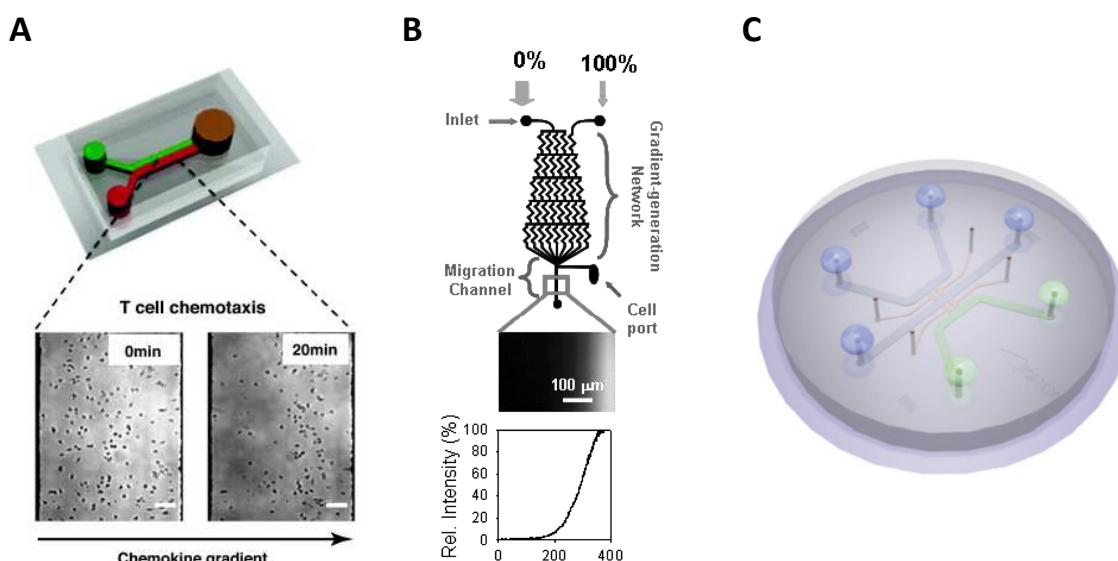
Este dispositivo es una versión mas compleja del anterior, por tanto su ventajas son las mismas que las de los dispositivos en Y, pero para este caso es posible generar gradientes arbitrarios. Las desventajas son como en el caso anterior la tensión cortante introducida por el fluido, gradiente limitado en 1D y requerimiento de control externo. Por otra parte para ampliar la forma de gradientes reproducibles se precisa un diseño del dispositivo más complejo (Figura. 29B).

- **Dispositivos de flujo libre (Flow-free Devices):**

Las ventajas del uso de este tipo de dispositivos son: el fluido no crea tensión cortante,

superposición de gradientes en 2D y 3D, bajo consumo de agentes químicos, alto rendimiento, menor necesidad de control externo. La principal desventaja que presenta este tipo de dispositivos es que no es posible un control tan preciso de los gradientes generados como en el caso anterior (Figura. 29C).

Como se ha comentado los diferentes tipos de microdispositivos existentes presentan diferentes ventajas y desventajas, por ello depende del tipo de ensayo a realizar la utilización de unos u otros. Los dispositivos clasificados como *Flow-free Devices* son sin duda los que aportan más posibilidades en cuanto a flexibilidad a la hora de recrear condiciones *in-vivo* y en cuanto a versatilidad se refiere, pero por contra, debido a su mayor complejidad de diseño, no es posible un control tan preciso de los gradientes generados. En cualquier caso éste es el tipo de dispositivos más utilizado.



**Figura. 29: Representación esquemática de los distintos tipos de dispositivos microfluídicos. De acuerdo a las condiciones químicas que los dispositivos microfluídicos pueden generar se clasifican en: (A) Dispositivos en Y [38], (B) Dispositivos de red [39], y (C) Dispositivos de flujo libre [40].**

Por otro lado, el desarrollo paralelo de numerosas técnicas de monitorización de procesos biológicos ha permitido una mejor evaluación de resultados. En este contexto se encuentran los microscopios de fuerzas de tracción 3D (3D TFM ) [41]. Mientras los microscopios tradicionales permiten la monitorización del proceso en experimentos 2D, las diferencias encontradas entre los resultados en la interacción célula-matriz en 2D y 3D hacían necesario el desarrollo de una nueva técnica. Los 3D TFM, rastreando el movimiento de indicadores fluorescentes embebidos en matrices de gel mediante la técnica de la microscopía óptica confocal (*laser scanning confocal microscopy*), hacen posible obtener los campos de desplazamientos y deformación y a partir de ellos obtener las fuerzas de tracción generadas por la célula. Al mismo tiempo, contribuyen a la visualización de la célula embebida en la matriz tridimensional. En la Figura. 30 se muestran las imágenes captadas durante el proceso de migración de fibroblastos mediante 3D TFM.

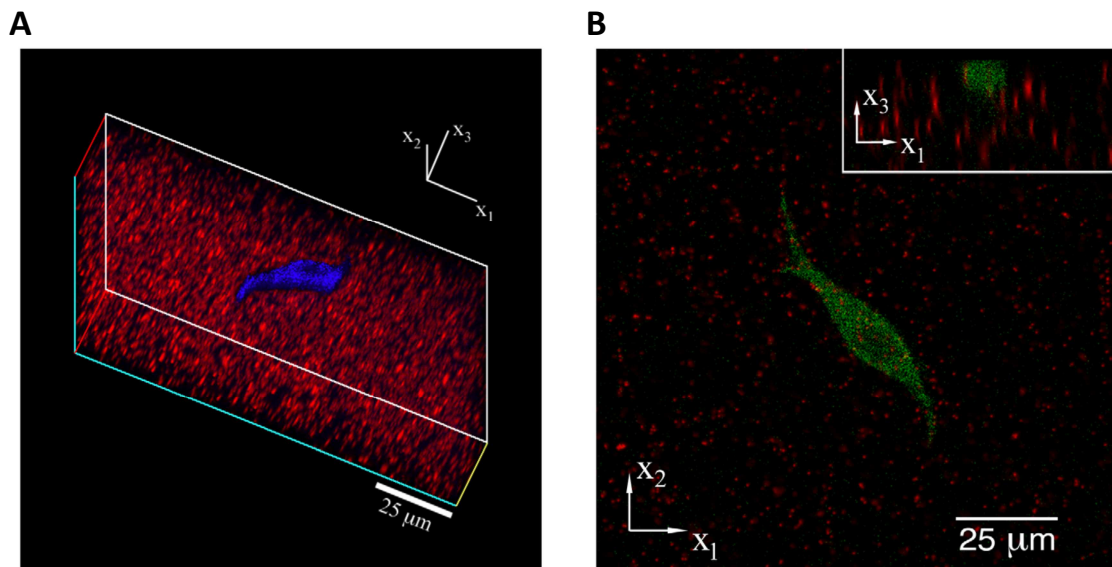


Figura. 30: Imágenes capturadas mediante 3D TFM durante la migración celular. Las imágenes mostradas han sido tomadas mediante 3D TFM y corresponden a la migración de fibroblastos [41]. (A) Renderizado 3D en el que se muestran la célula y los desplazamientos generados en la matriz (partículas fluorescentes de color rojo). (B) Representación en planta y sección de la célula y los desplazamientos.



# Anexo II:

## *Estado del arte. Tipos de modelos existentes para simular la migración celular.*

---

En el creciente mundo de la computación de fenómenos biológicos se encuadran los modelos computacionales de la migración celular. Cualquier modelo computacional tiene como objetivo la simulación del comportamiento de un sistema complejo, cuyo comportamiento no puede reproducirse por técnicas analíticas. Más que la búsqueda del algoritmo que describa un proceso, mediante un modelo computacional se pretende ajustar los parámetros que gobiernan tal modelo y observar los resultados obtenidos de sus modificaciones, para contribuir en la comprensión del proceso y predecir posibles resultados al cambiar las condiciones de ensayo.

Existen numerosos modelos computacionales de migración celular orientados tanto a la migración de una sola célula como a la migración de poblaciones. De igual modo, al igual que con el transcurso del tiempo la experimentación ha evolucionado de ensayos en 2D a ensayos en matrices 3D, los modelos también han sufrido esta evolución. Del gran número de modelos existente, cada uno se centra en un aspecto fundamental de la migración. Los diferentes modelos de la migración celular se pueden clasificar en [42]:

- **Modelos dinámicos basados en fuerzas**

En estos modelos se consideran fuerzas de tracción internamente generadas y se introducen parámetros como la densidad de la matriz, su rigidez y la adhesividad entre ésta y la célula a la hora de determinar los caminos de migración celular.

Las fuerzas consideradas en este modelo son: las fuerzas presentes en la parte frontal y posterior de la célula causadas por la protrusión de esta y las fuerzas de arrastre viscoso debido al movimiento en el interior de la ECM. Las fuerzas de la parte frontal y posterior son diferentes y dependientes de las propiedades mecánicas de la matriz. Por otra parte la fuerza viscosa es proporcional a la velocidad y depende de la forma de la célula y de la densidad de la ECM. En general, las principales desventajas de estos modelos son la incapacidad de simular migración de poblaciones de células en las que éstas se agregan y disocian formando grupos, la falta de consideración de cambio de forma de la célula y la variación de la fuerza de arrastre durante el avance de la célula en la ECM. Además, no se suele considerar la degradación de la matriz extracelular.

- **Modelo estocástico de caminos persistentes aleatorios**

En estos modelos el camino tomado por cada célula proviene de resolver numéricamente la ecuación de Langevin (dinámica Browniana). El modelo selecciona un elemento de volumen dentro del cual las células están distribuidas uniformemente. A cada una de las células se le asigna un vector velocidad cuyas componentes son seleccionadas aleatoriamente de una distribución Gaussiana proporcional a la magnitud del intervalo de tiempo. Después de cada intervalo de tiempo tanto la posición de la célula, como su velocidad se actualizan.

Los inconvenientes de este método son que no se tienen en cuenta efectos dinámicos como la tracción o el arrastre, ni relativos a la ECM como su rigidez o porosidad. Además, a pesar de trabajar con poblaciones celulares, no se considera la posibilidad de que puedan formar agregados.

- **Migración de esferoides multicelulares**

Estos modelos se basan en el movimiento de esferoides multicelulares debido a los gradientes de presión que se originan debido a diferentes ratios de proliferación y muerte celular. En este tipo de modelos se tienen en cuenta parámetros como el coeficiente de difusión, concentración de nutrientes, velocidad del fluido celular o un factor químico.

A pesar de considerarse buenos modelos para el estudio de tumores por el hecho de que combinan el movimiento aleatorio con gradientes de presión y la actividad química, no considera factores importantes de la migración *in-vivo* como son la densidad, la porosidad o la rigidez de la matriz.

- **Estudios mediante modelo de Monte Carlo**

El método de Monte Carlo está enfocado para resolver problemas matemáticos o numéricos, cuya solución depende de factores aleatorios por métodos analíticos o numéricos. Con este método se puede estudiar variedad de fenómenos a escalas de tiempo grandes con costes computacionales bajos. Sin embargo, su principal desventaja es la naturaleza cualitativa de los resultados, así como su sensibilidad a los parámetros de entrada.

El modelo desarrollado en el presente proyecto incluye características comunes a los diferentes tipos que se acaban de enumerar, aunque no se puede clasificar por completo en ninguna de las categorías. Un equilibrio de fuerzas es resuelto durante el problema de *mechano-sensing*, sin embargo esto no produce directamente el movimiento de la célula, sino que sirve de entrada para las funciones de probabilidad. Por otro lado, la aleatoriedad del proceso es también tenida en cuenta, aunque nuevamente es introducida a través de las funciones de probabilidad. Este y otros modelos de migración se están desarrollando en la actualidad, por lo que es seguro que la clasificación aquí listada se amplíe día a día.

## Anexo III:

### *Análisis paramétrico de las funciones de probabilidad.*

---

Para determinar los valores que se le dan a los diferentes parámetros de control contenidos en las funciones de probabilidad (Tabla 1) y valorar la influencia de cada uno de estos factores, se ha realizado un análisis paramétrico.

Como se explica en el apartado 2.2.3 la probabilidad añadir borrar elementos viene dada por las siguientes funciones:

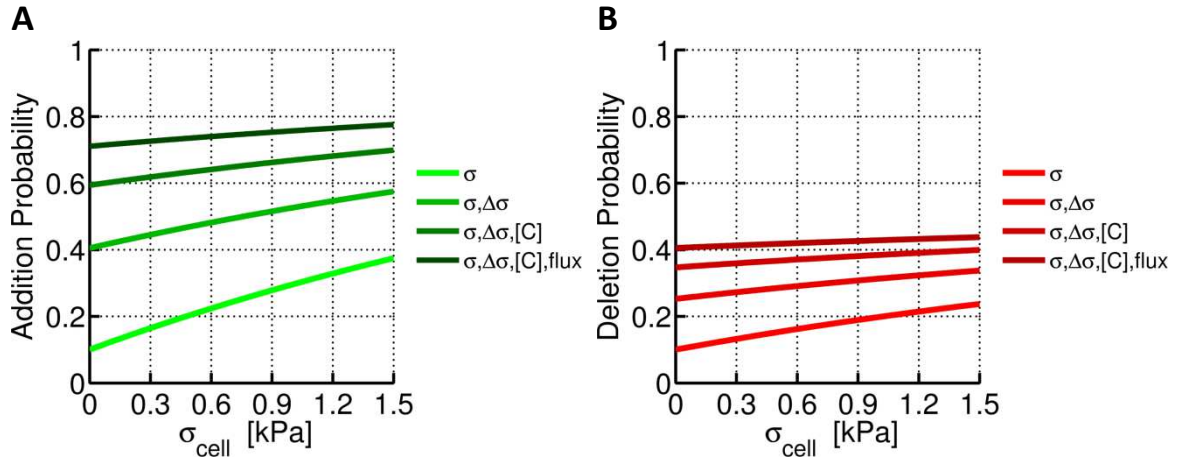
$$p_+ = p_+^0 + p_+^{\max} \left( 1 - e^{-k_+^0 (\lambda_+^\sigma d_+^\sigma + \lambda_+^{\Delta\sigma} d_+^{\Delta\sigma} + \lambda_+^C d_+^C + \lambda_+^F d_+^F) dt} \right)$$

$$p_- = p_-^0 + p_-^{\max} \left( 1 - e^{-k_-^0 (\lambda_-^\sigma d_-^\sigma + \lambda_-^{\Delta\sigma} d_-^{\Delta\sigma} + \lambda_-^C d_-^C + \lambda_-^F d_-^F) dt} \right)$$

En primer lugar se realiza un estudio en MATLAB en el que se valores de probabilidad aislados al conjunto de elementos de la célula para en cierto modo obtener una ligera idea del comportamiento de la célula en función de diferentes valores de probabilidad. De esta forma se determina el rango de valores que deben tomar las funciones de probabilidad para obtener los resultados deseados (por ejemplo la velocidad media de la célula). Se decide que ambas funciones tengan un valor mínimo ( $p_+^0$  y  $p_-^0$ ) de 0.1 para asegurar que el proceso no se quede bloqueado en ningún momento. De igual modo se asignan arbitrariamente un valor máximo de probabilidad de añadir elementos de 0.8 y de eliminar de 0.4. Por lo tanto, la probabilidad de añadir y borrar elementos está acotada superiormente en 0.9 y 0.5 respectivamente.

A continuación se muestran la gráficas que se obtienen del análisis paramétrico de las funciones de probabilidad en función de diversos factores. En todos los casos se representan la probabilidad de añadir/borrar elementos respecto al valor de tensión del elemento de la célula.

En la Figura. 31 se puede observar como la probabilidad de añadir y quitar elementos aumenta conforme más estímulos son considerados. De este modo cuanto mayor sea el número de estímulos, más dinámico será el comportamiento de la célula. Esto no quiere decir que avance más o más rápido, ya que los estímulos pueden actuar por ejemplo en direcciones opuestas.



**Figura. 31: Variación de las funciones de probabilidad en función de los estímulos considerados.**

Las probabilidades tanto de añadir como de eliminar elementos varían en función del número de estímulos considerados. Cuantos más estímulos son considerados, mayores son los valores de probabilidad de añadir/borrar elemento para cualquier valor de  $\sigma_{cell}$ .

El peso de cada uno de los estímulos (o en otras palabras el incremento de probabilidad que produce), viene determinado por el factor  $\lambda$  correspondiente, cuyos valores han sido escogidos en una primera aproximación para que todos los factores tengan un peso similar (Tabla 1). También se aprecia como al tratarse de una función exponencial, el incremento de probabilidad producido conforme se añaden factores es cada vez más pequeño.

Una vez analizada la variación del valor de probabilidad en función de los diferentes estímulos considerados, el análisis paramétrico se centra en los estímulos mecánicos. En la Figura. 32 se muestra la influencia de la probabilidad con la dirección de máxima tensión. Para el caso de añadir elementos, cuando la dirección de máxima tensión está alineada con la dirección del elemento ( $\cos(\theta)=1$ ), la probabilidad es máxima, mientras que si las direcciones son perpendiculares ( $\cos(\theta)=0$ ), la probabilidad de ser añadido toma el valor mínimo (0.1).

La función de probabilidad de borrar elementos muestra un comportamiento similar al descrito anteriormente para la función de añadir con la salvedad de que la dependencia deja de ser cosenoidal y pasa a ser senoidal, es decir, se obtiene valor máximo de probabilidad para  $\sin(\theta)=1$  (dirección de la máxima tensión y dirección del elemento perpendiculares) y el valor mínimo para  $\sin(\theta)=0$  (direcciones paralelas). Esto, como se explica en la sección correspondiente (apartado 2.3.3) se define así para enfatizar el direccionamiento y la forma elongada de la célula. Debe notarse que dado que en este estudio únicamente se consideran la tensión y el gradiente de tensión como estímulos, los valores de probabilidad obtenidos están lejos del máximo como se explica con anterioridad.



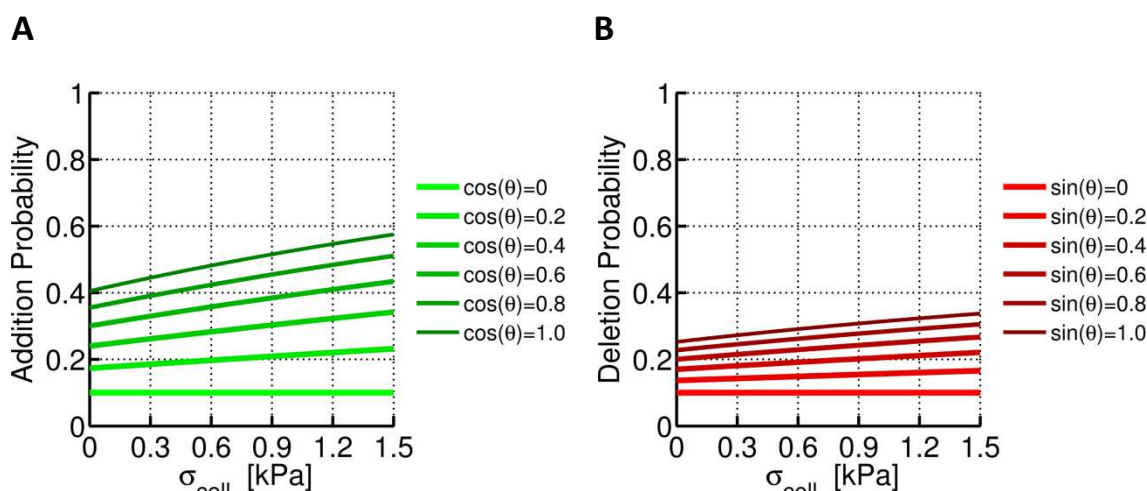


Figura. 32: Variación de las funciones de probabilidad con el ángulo  $\theta$ .

La alineación de la dirección de máxima tensión con la dirección del elemento determina el valor de las funciones de probabilidad. Para la función correspondiente a la adición elementos, la probabilidad será máxima cuando ambas direcciones estén alineadas ( $\cos\theta=1$ ) (A), por el contrario, para la correspondiente a la eliminación, la probabilidad será máxima cuando las direcciones sean perpendiculares entre sí ( $\sin\theta=1$ ) (B).

Como se puede observar, cuanto mayor es el alineamiento con la dirección del gradiente de tensión (en este caso) mayores son las probabilidades de añadir. Por otro lado, cuanto más perpendicular es la dirección del elemento con la del gradiente de tensión, mayor es la probabilidad de que ese elemento desaparezca.

De aquí en adelante, para el análisis de sensibilidad de otros parámetros se considera que la dirección del elemento está totalmente alineada con la dirección de máxima tensión ( $\cos(\theta)=1$ ) lo que se traduce en un *offset* de valor 0.3 para la probabilidad de añadir. Para el caso de borrar se considera que la dirección del elemento es perpendicular a la dirección de máxima tensión ( $\sin(\theta)=1$ ) lo que introduce un valor de *offset* de 0.15.

El siguiente parámetro a analizar es la constante de sensibilidad del módulo de tensión ( $\lambda^\sigma$ ). A la hora de fijar los valores de las diferentes constantes de sensibilidad se establece como criterio otorgar a todos los estímulos un peso similar en la función de probabilidad. Además se trata de que la suma de todos los parámetros involucrados en las funciones de probabilidad multiplicados por sus constantes de sensibilidad tengan un valor adecuado para que la zona de variación de la curva exponencial se encuentre entre los valores de tensión que es capaz de generar la célula (0-1.5kPa). En la Figura. 33 se observa como al aumentar el valor de  $\lambda^\sigma$  aumenta la pendiente de la función de probabilidad. Este cambio es más pronunciado en la función de añadir, dado que los parámetros de control seleccionados le otorgan por lo general valores mayores que a la función de desaparecer. El valor finalmente elegido como control es de  $\lambda_+^\sigma = 0.0035$  y  $\lambda_-^\sigma = 0.0035$  respectivamente.

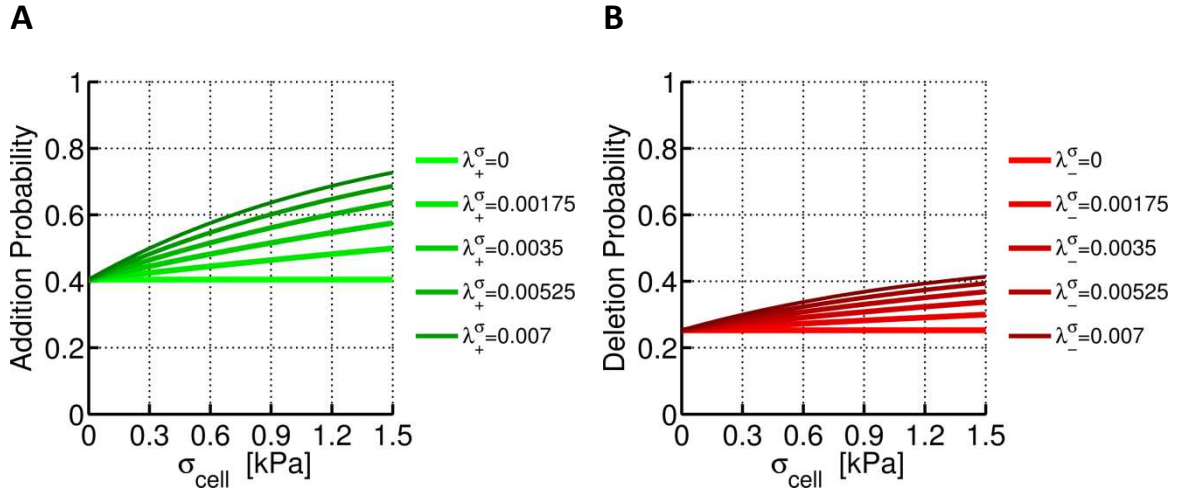


Figura. 33: Variación de las funciones de probabilidad con la constante de sensibilidad  $\lambda^\sigma$ .

El valor que adopta la constante de sensibilidad relativa a la tensión máxima condiciiona el valor de la función de probabilidad. Para diferentes valores de  $\sigma$ , al aumentar el valor de  $\lambda$  se modifica la función de probabilidad manera que para el rango de valores de  $\sigma$  contemplados (0-1.5kPa) adquiera un mayor carácter exponencial, mientras que valores reducidos de este parámetros obran el efecto contrario. En el caso límite de  $\lambda=0$ , la probabilidad no depende de  $\sigma$ .

Lógicamente se obtiene un comportamiento análogo para la variación de las constantes de sensibilidad del resto de parámetros.

Se ha estudiado también el efecto de la variación del parámetro global  $k^0$  que multiplica a todos los estímulos por igual. Designado con el nombre de ratio de aparición o desaparición, esta constante contribuye al ajuste de las funciones de probabilidad acentuando o disminuyendo el carácter exponencial de la curva. Valores elevados de esta constante conducen a la zona de saturación de la función de probabilidad, mientras que valores reducidos corresponden con la zona inicial de la función exponencial, de carácter prácticamente lineal (Figura. 34). Al mismo tiempo, una rápida saturación se traduce en una menor dependencia de la probabilidad con respecto a los estímulos actuantes (en este caso la tensión), por lo que es conveniente un ajuste cuidadoso para obtener los resultados deseados.

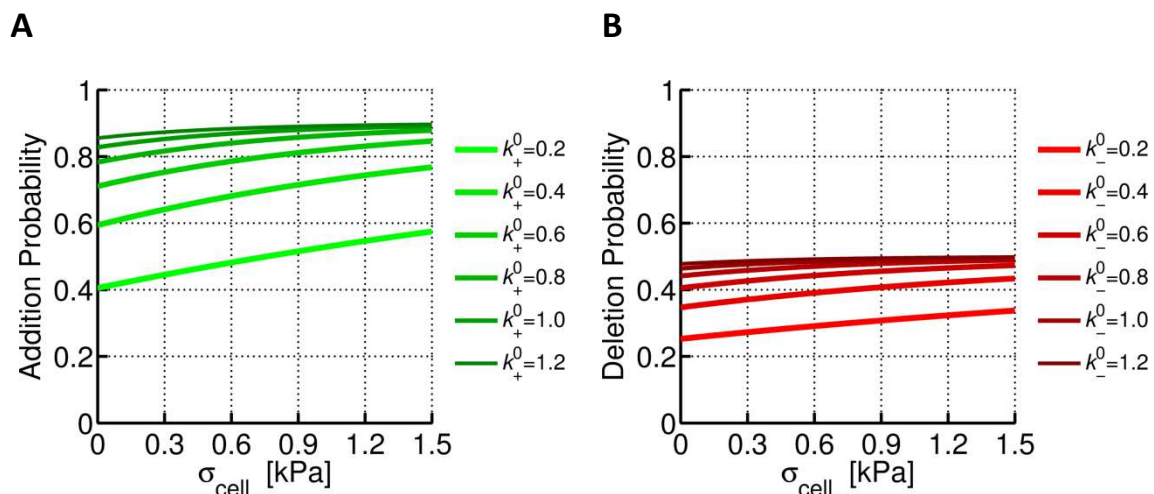


Figura. 34: Variación de las funciones de probabilidad con  $K^0$

El ratio de aparición/desaparición de elementos es una constante, acentúa o disminuye el carácter exponencial de las curvas de probabilidad, valores elevados de  $K^0$  conducen a regiones de la curva de probabilidad más próximas a la zona de saturación. Por lo contrario, para valores reducidos, la curva obtenida corresponde a la zona inicial de una curva exponencial negativa. Nótese que esta constante afecta a todos los estímulos considerados por tanto es la indicada para un ajuste grueso de las funciones de probabilidad.



## Anexo IV:

### *Validación mecánica del modelo computacional.*

---

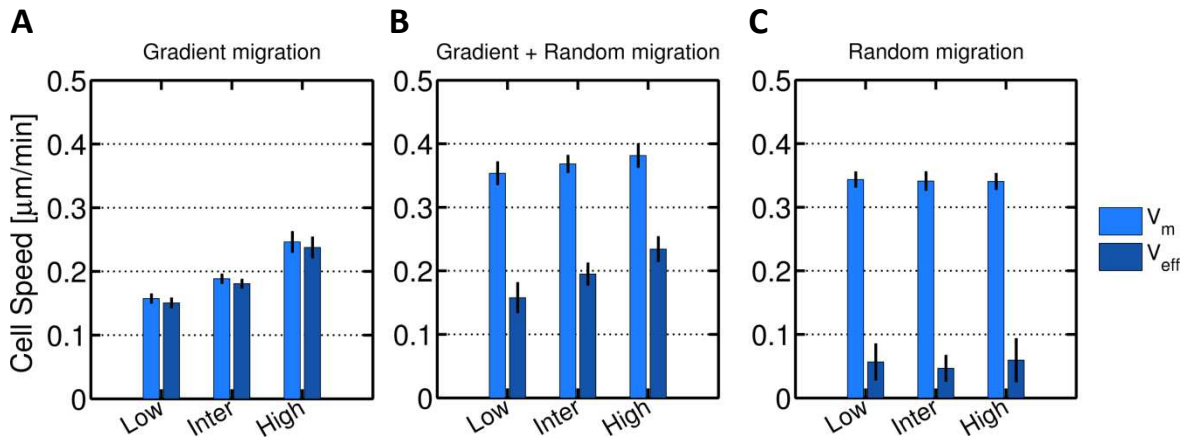
Una célula embebida en un medio con rigidez homogénea debería ejercer una tensión idealmente homogénea a lo largo de su superficie. Sin embargo, al resolver el problema computacionalmente, el efecto de la geometría, la morfología y la rigidez de la propia célula hacen que la tensión generada sea similar pero no exactamente igual, con lo que el análisis de ciertos aspectos del modelo se hace complicado. Por lo tanto, con el objetivo de validar los resultados correspondientes a la parte mecánica del modelo, se llevan a cabo una serie de simulaciones en las que se asume que todos los elementos de la célula están ejerciendo la misma tensión. Adicionalmente, para aislar los efectos del estímulo mecánico, no se considera ningún estímulo de flujo ni factores químicos.

Se realizan tres tipos de ensayos en función del movimiento experimentado por la célula: movimiento forzado (estableciendo manualmente la dirección deseada), movimiento completamente aleatorio y combinación de movimiento direccional y aleatorio. Cada uno de estos casos se realiza para tres valores de tensión diferentes, tensión elevada (1.5kPa), la que correspondería a un sustrato rígido ( $E > 200\text{kPa}$ ), tensión intermedia (0.6kPa) para rigidez media ( $E \sim 3.2\text{kPa}$ ), y tensión baja (0.1kPa) emulando rigidez baja ( $E < 0.4\text{kPa}$ ). Cada simulación consta de 50 incrementos temporales de 5 minutos de duración cada uno de ellos. Además, cada ensayo se repite al menos 10 veces con el fin de no incurrir en errores producidos por la aleatoriedad de un solo caso y confirmar la consistencia de los resultados.

El rango de velocidades en el que se puede mover una célula depende mucho de que tipo de célula se trate. En este proyecto se han ajustado los parámetros para obtener velocidades consistentes con las obtenidas para fibroblastos en ensayos experimentales [6, 43]. A la vista de los resultados, se observa como al no considerarse fuerzas viscosas la velocidad aumenta según aumenta la rigidez del sustrato (Figura. 35A). Si se considera un movimiento aleatorio acompañando a la migración direccional, la velocidad media aumenta respecto al caso de la migración en una dirección forzada, mientras que la velocidad efectiva permanece constante (Figura. 35B). Si se comparan los valores obtenidos para la migración en el caso del movimiento aleatorio (Figura. 35C), se observa una tremenda diferencia entre la velocidad media y la efectiva, lo que pone en evidencia que en el tiempo recorrido los puntos inicial y final se encuentran próximos entre sí. Como era de esperar en este último caso, la velocidad de migración no se ve afectada para los diferentes valores de tensión.

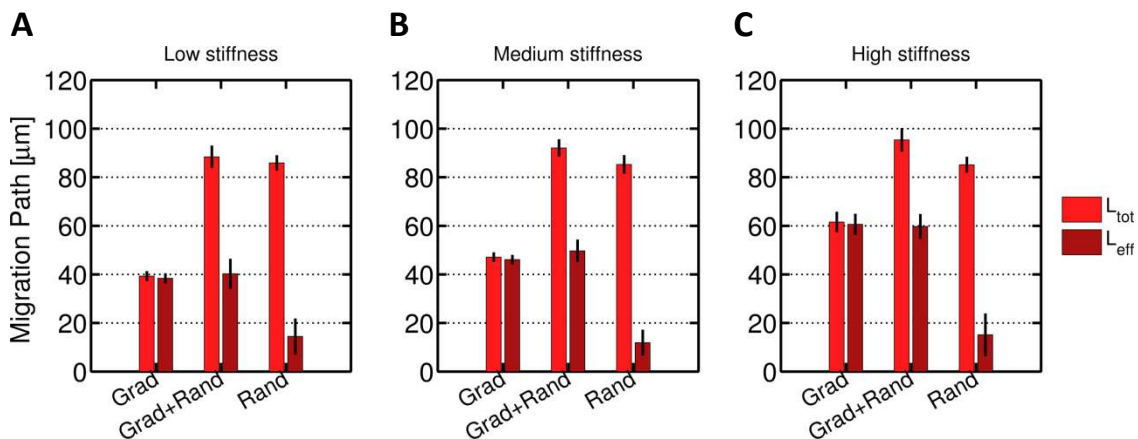
La misma tendencia a la observada en las gráficas de la velocidad puede obtenerse de las gráficas de la distancia recorrida por las células (Figura. 36) en la que observa como el camino efectivo aumenta con la rigidez en todos los casos menos en el aleatorio, donde permanece prácticamente invariable. Mención especial merece la diferencia entre el camino recorrido y el camino efectivo para cada uno de los factores considerados. Al establecer unas probabilidades claramente direccionadas, la célula avanza en esa dirección prácticamente en línea recta, por lo que la diferencia entre longitud media y efectiva es prácticamente nula. Al añadir un cierto componente aleatorio, esta diferencia aumenta. La célula continúa migrando

(globalmente) de manera direccionada, pero la trayectoria recorrida ya no es recta. Si se considera únicamente migración aleatoria, lógicamente la longitud efectiva recorrida mengua considerablemente. Esta relación es consistente para todas las rigideces estudiadas.



**Figura. 35: Velocidad media y velocidad efectiva para simulación.**

Validación de la parte mecánica del modelo de migración celular para diferentes valores de rigidez del sustrato. Los ensayos se realizan fijando 3 valores de tensión (0.1, 0.6, 1.5 kipá) correspondientes a rigideces 0.4, 3.2 y 200kPa respectivamente. (A) Ensayo en el que se fuerza a la célula a migrar en una dirección, emulando lo que pasaría al establecer un gradiente de rigidez en el sustrato en dicha dirección. (B) Ensayo forzando la célula a migrar en una dirección y añadiendo una componente aleatoria. (C) Ensayo considerando únicamente direcciones aleatorias.

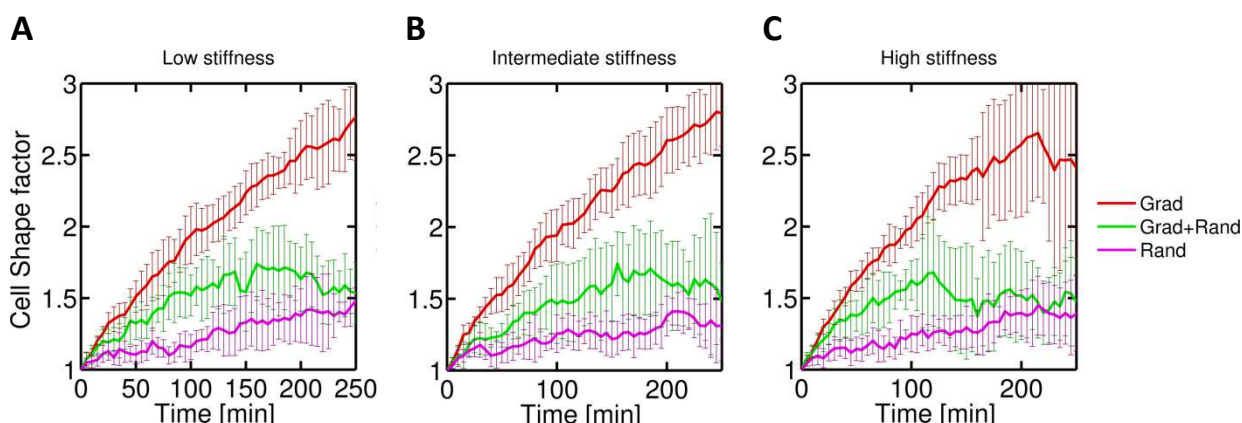


**Figura. 36: Distancia total y distancia efectiva recorrida por la célula.**

Se muestran las distancias recorridas para (A) rigidez de la matriz baja (B) media y (C) alta para los casos de dirección forzada, dirección forzada y componente aleatoria y únicamente dirección aleatoria en cada caso. Para todos los valores de rigidez, la relación entre distancia media y efectiva es similar para cada caso. Cuando existe una dirección clara de migración (ej. gradiente de rigidez) las distancia media y efectiva son similares. Cuando se incluye cierta aleatoriedad, el camino total aumenta, aunque la distancia efectiva recorrida se conserva, indicando que la célula se mueve más rápido pero sin seguir una dirección concreta. Considerando únicamente aleatoriedad, la diferencia entre distancia total y efectiva aumenta notablemente.

Referente al factor de forma, la Figura. 37 muestra como este factor depende más del tipo de estímulo considerado que del valor absoluto de la rigidez o las tensiones alcanzadas. La célula tiende a elongarse en una cierta dirección conforme avanza la simulación. Esta elongación es mayor en el caso de migración direccionada (gradiente) y la célula alcanza valores de hasta 3 veces más “larga” que “ancha”. Al introducir cierta aleatoriedad, el factor de

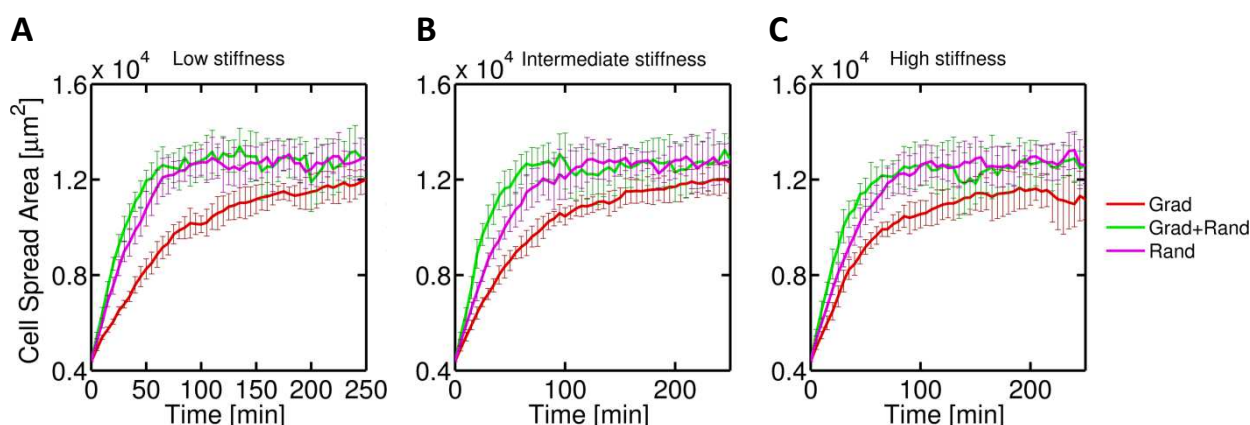
forma disminuye hasta valores por lo general inferiores a 2. Si se considera únicamente migración aleatoria, la célula presenta un aspecto prácticamente esférico, con factores de forma inferiores a 1.5



**Figura. 37:** Factor de forma de la célula para diferentes valores de rigidez.

Para todos los valores de rigidez (A, rigidez alta; B rigidez media; C rigidez baja) se observa como el ratio disminuye al incorporar al modelo una dirección de migración aleatoria que provoca que la célula no se polarice siempre en la misma dirección, como ocurre en el caso de gradiente. Este fenómeno se potencia todavía más cuando la migración se produce para una dirección aleatoria diferente en cada incremento temporal. El factor de forma se ve incrementado ligeramente conforme aumenta la rigidez del sustrato aunque la dispersión de los resultados es también mayor. Aun así, las tendencias son muy similares en todos los casos.

Los resultados obtenidos referentes al área proyectada (Figura. 38) muestran un comportamiento similar para los diferentes valores de rigidez. Se observa que en todos los casos simulados, la curva está acotada superiormente (debido a la restricción del número máximo de elementos que componen la célula). Al considerar una migración totalmente direccionada simulando un gradiente de tensión, la forma de la célula está más polarizada y presenta menos protuberancias y elongaciones en su cuerpo, por tanto el área proyectada es menor.

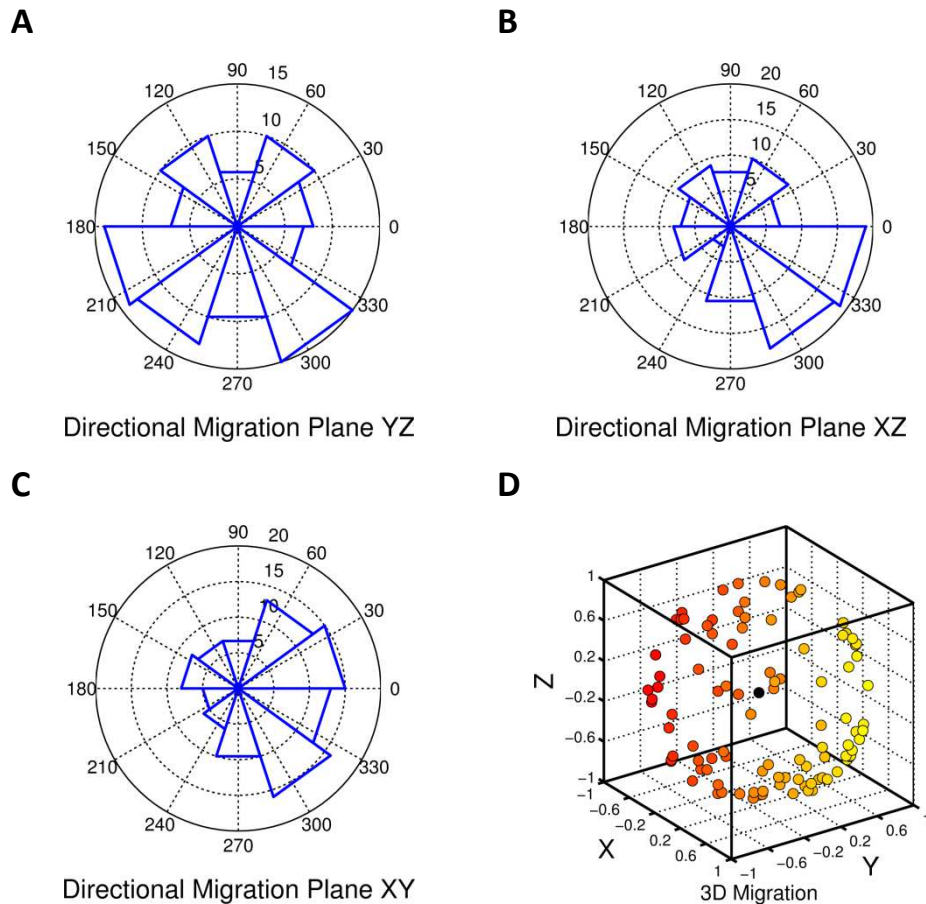


**Figura. 38:** Área proyectada de la célula para valores bajo, medio y alto de rigidez.

Para los casos simulados, (A) valor bajo de rigidez, (B) valor medio de rigidez y (C) valor alto de rigidez, se observa el aumento del área celular conforme avanza la simulación. Esta área está acotada debido a la restricción del número de elementos máximo que pueden componer la célula. La diferencia en la morfología al incluir o prescindir de la dirección aleatoria es observable. Cuanto menos polarizada está la célula, mayor número de protuberancias presenta, aumentando por tanto la superficie proyectada.



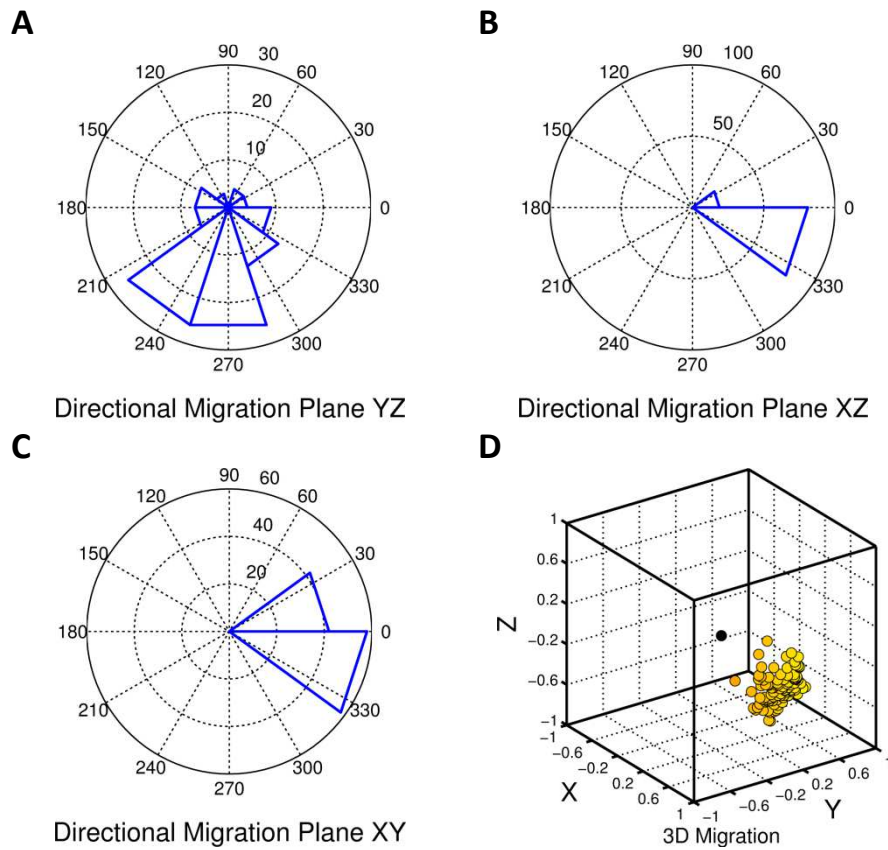
Adicionalmente, y con el objetivo de validar la aleatoriedad del modelo de migración, se toma el caso en el que tan solo se considera migración celular de acuerdo a una dirección aleatoria generada en cada incremento temporal. Se simulan 100 repeticiones consistentes cada una de ellas en 50 incrementos temporales de 5 minutos de duración cada uno de ellos. Como resultado se toma el vector que va desde el punto que ocupa el centroide celular en el instante inicial hasta el punto que ocupa en el instante final. Al normalizar este vector y tras procesar todos los casos, se obtiene una nube de puntos que confirman que la distribución es efectivamente aleatoria (Figura. 39).



**Figura. 39: Histograma angular de la migración aleatoria.**  
**Mapas direccionales mostrando la distribución de ángulos que forman los vectores trayectoria (que unen el punto final e inicial de cada simulación) proyectados sobre (A) el plano YZ (B) el plano XZ y (C) el plano XY. La figura (D) muestra la distribución en 3D de los puntos finales alcanzados en cada simulación con respecto al punto inicial (círculo negro), que como se observa tiene un carácter aleatorio.**

El mismo procedimiento es llevado a cabo para el caso de migración de acuerdo a una dirección forzada combinada con el factor aleatorio (grad+rand). En este caso, a diferencia del anterior se observa la predominancia de migración en dirección X (la dirección del gradiente), a la vez que existe una pequeña dispersión de puntos alrededor de este eje, debido a la componente aleatoria.





**Figura. 40: Histograma angular de la migración direccionada y aleatoria.**

Como resultado de la simulación de 100 casos en los que se impone una dirección de migración y una componente aleatoria, se obtienen los ángulos del vector definido por la el punto inicial y final de la trayectoria, con las diferentes direcciones proyectado sobre los planos coordenados (A) YZ, (B) XZ y (C) XY. Mediante la representación de las trayectorias normalizadas en 3D (D) se observa como existe una clara tendencia a la migración en el eje X (dirección del gradiente de rigidez), con ciertas desviaciones provocadas por el factor aleatorio incluido.



# Anexo V:

## *Validación fluido-química del modelo computacional.*

---

Al igual que se realiza para la parte mecánica del modelo, se llevan a cabo una serie de simulaciones para validar la implementación numérica del modelo bajo la influencia de estímulos químicos y de flujo. Para la realización de este ensayo se simula mediante el software COMSOL el dispositivo microfluídico con una matriz de gel en la que se supone que está embebida la célula. De este modo se obtienen las direcciones del fluido intersticial en cada uno de los puntos de interés así como la concentración de sustancias químicas.

Se llevan a cabo varias simulaciones:

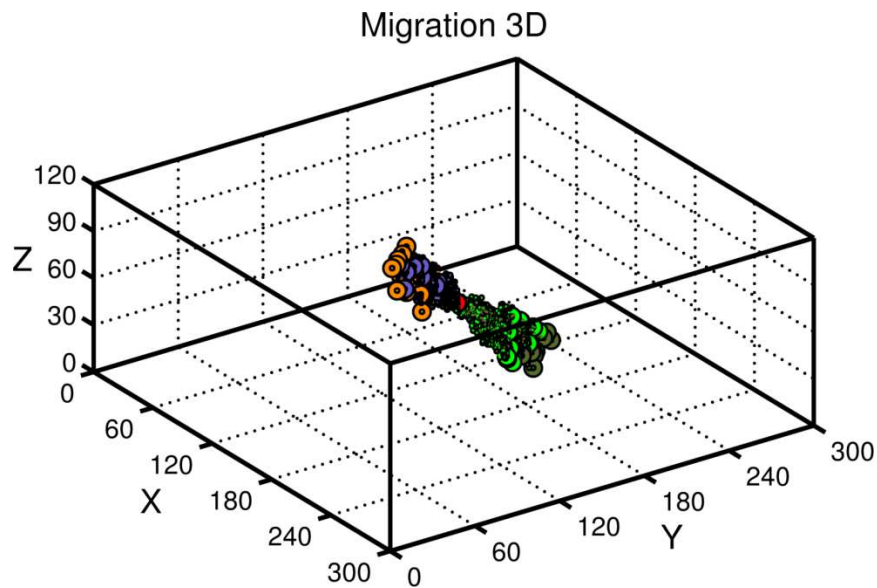
- 1) dependencia únicamente del factor químico
- 2) y 3) dependencia del flujo y del factor químico con una concentración alta y baja respectivamente
- 4) y 5) análogos a los anteriores pero bloqueando los receptores celulares del factor autocrino, lo que según se ha explicado en el apartado 2.2.3, implica una migración a contracorriente del flujo.

Para validar el modelo se comparan los resultados obtenidos con los realizados por Shields et al. 2007 [44]; para experimentos *in-vitro* similares a los llevado a cabo en esta simulación. En ellos se estudia la migración de diferentes tipos de células cancerígenas afectadas por el flujo intersticial (CCI21) y gradiente químico (liberado por las células endoteliales linfáticas) y considerando el caso de bloquear los receptores celulares (CCR7)[28].

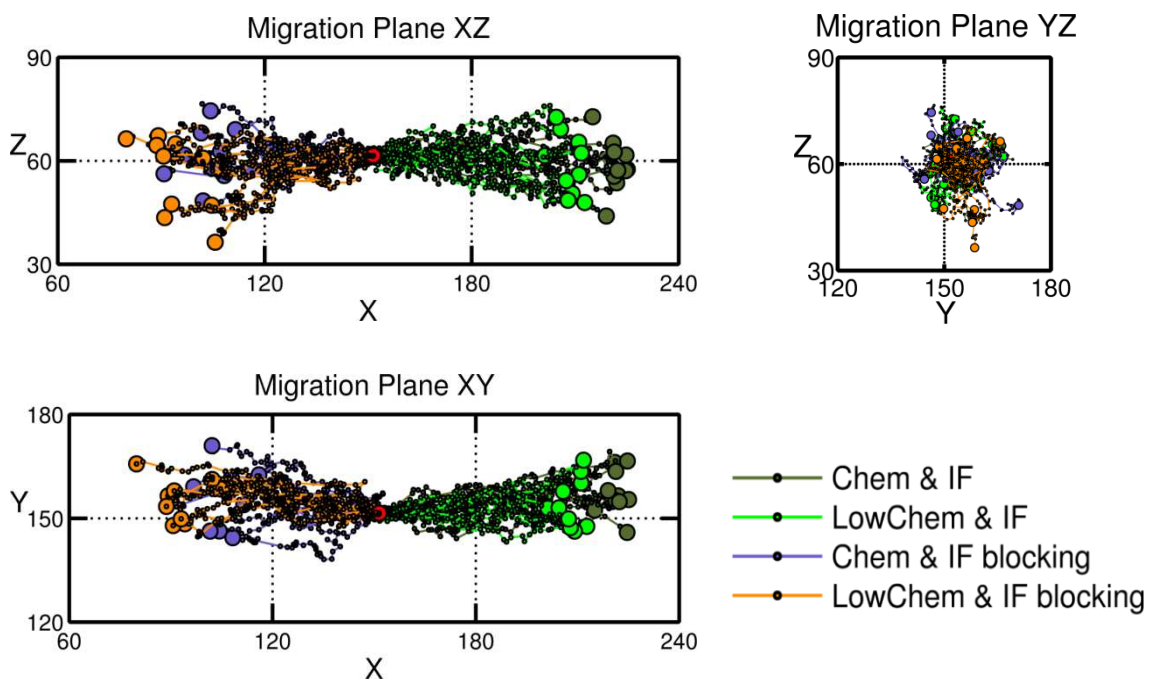
En los resultados obtenidos tras la realización de esta simulación se observa como si no actúa flujo intersticial, es decir, si solo existe como estímulo un factor químico diluido en la matriz, la célula migra en la dirección del gradiente químico. Si los receptores celulares no están bloqueados la célula migra en el sentido de la corriente, debido al arrastre que produce el flujo de la concentración de factores autocrinos. En cuanto a la diferencia entre las velocidades de migración en función de la variación de la concentración del factor químico, se obtiene lógicamente que a mayor gradiente químico mayor velocidad de migración y por tanto mayor distancia recorrida por la célula (Figura. 41).

Por otra parte, los resultados obtenidos en los casos en los que se bloquean los receptores celulares, muestran como la célula migra en dirección contraria al flujo a pesar de haber un gradiente de factor químico en la dirección de la corriente. Para estas simulaciones, y al actuar los factores químicos (paracrino y autocrino) en direcciones opuestas, la velocidad de migración para un gradiente bajo de factor paracrino es mayor que la obtenida para un gradiente elevado de este factor, y por lo tanto la distancia recorrida es también mayor (Figura. 41).

**A**



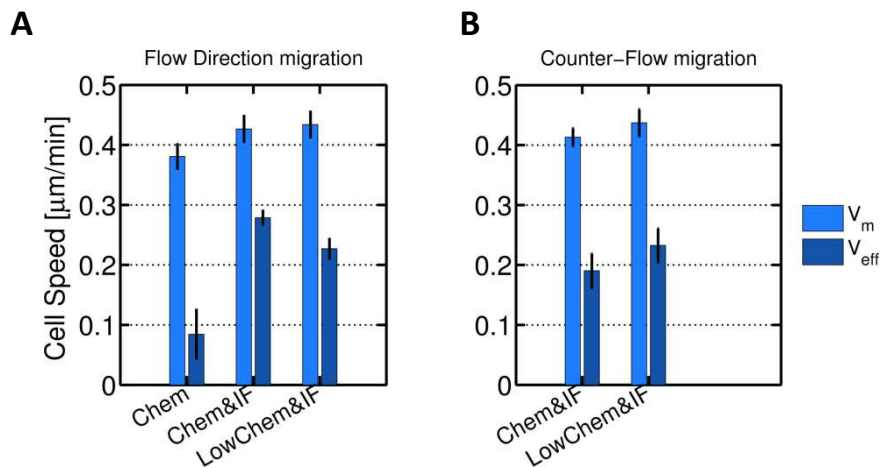
**B**



**Figura. 41:** Comparativa de la trayectoria celular para los diferentes casos simulados. Se representan las diferentes trayectorias para los casos de simulación 2) y 3) fluido intersticial y gradiente químico alto (Chem&IF) y bajo (LowChem&IF), y 4) y 5) receptores bloqueados, fluido intersticial y gradiente de factor químico alto (Chem&IF blocking) y bajo (LowChem&IF blocking) respectivamente. (A) vista 3D de las diferentes trayectorias celulares sobre la geometría de gel en que se realiza la simulación, (B) vista destallada de las trayectorias en proyectadas sobre el sistema de planos cartesiano (XZ, YZ, XY).

Si se estudian las velocidades de migración para los diferentes casos simulados se observa como, dados los parámetros utilizados, el efecto del flujo intersticial tiene mayor importancia. Muestra de ello es un aumento notable de la velocidad efectiva ya que ambos factores contribuyen a la migración en la misma dirección. Además, al bloquear los receptores, el flujo intersticial y el factor químico estimulan a la célula a migrar en direcciones opuestas entre sí.

La célula termina migrando contracorriente (y en contra del gradiente químico) sin reducir de velocidad de manera apreciable. Interés especial tiene el crecimiento de la velocidad media al reducir la concentración de factor químico, ya que indica que la migración en este caso es mayor pero con un menor carácter direccional (Figura. 42).



**Figura. 42: Velocidad media y efectiva en la simulación para la validación fluido-química.** Se comparan las diferentes velocidades de migración celular obtenidas para las diferentes simulaciones. (A) Comparación de los casos 1), 2) y 3), al no estar los receptores celulares bloqueados la célula migra en la dirección del flujo y del gradiente químico, con una velocidad efectiva mayor cuanto mas alta es la concentración química. (B) Al bloquear los receptores la célula migra en contra de la dirección de flujo. Al disminuir la intensidad del gradiente químico, tanto la velocidad media como la efectiva aumentan, ya que el gradiente actúa en dirección contraria a la producida por efecto del flujo.



# Anexo VI:

## Determinación factor de forma de la célula.

---

El factor de forma de la célula pretende ser una medida del aspecto más o menos elongado que toma la misma conforme va migrando. Debido a la discretización mediante vóxeles y a la multitud de protuberancias y “brazos” que aparecen durante la simulación, el cálculo de este factor no es un proceso trivial. La manera de proceder es por tanto calcular la distribución de masa de la célula y así determinar la dirección en la que está polarizada. Ya que todos los vóxeles son exactamente iguales el cálculo de esta distribución será equivalente al cálculo de la inercia del cuerpo celular. Así, la dirección con menor inercia será la que mayor masa contenga y viceversa. Por lo tanto, el factor de forma puede calcularse como el cociente entre la máxima distancia entre elementos respecto a la dirección de mayor masa y la máxima distancia entre elementos respecto a la dirección de menor masa. O lo que es lo mismo hablando de inercias:

$$SF = \frac{d_{\min I}}{d_{\max I}}$$

donde  $d_{\max I}$  y  $d_{\min I}$  corresponden a las elongaciones máximas de la célula en la dirección de mayor y menor inercia respectivamente. El primer paso para llegar a obtener el valor de estas elongaciones es plantear el valor del tensor de inercia de un caso genérico:

$$\mathbf{I} = \begin{pmatrix} I_{xx} & I_{xy} & I_{xz} \\ I_{yx} & I_{yy} & I_{yz} \\ I_{zx} & I_{zy} & I_{zz} \end{pmatrix}$$

$$\begin{aligned} I_{xx} &= \int_V \rho(y^2 + z^2) dx dy dz & I_{yy} &= \int_V \rho(x^2 + z^2) dx dy dz & I_{zz} &= \int_V \rho(x^2 + y^2) dx dy dz \\ I_{xy} &= I_{yx} = \int_V -\rho(xy) dx dy dz & I_{xz} &= I_{zx} = \int_V -\rho(xz) dx dy dz & I_{yz} &= I_{zy} = \int_V -\rho(yz) dx dy dz \end{aligned}$$

Particularizando estas expresiones a un cubo de arista “a” se obtiene:

$$\begin{aligned} I_{xx} &= \frac{1}{12} a^3 \rho(a^2 + a^2) = \frac{1}{6} \rho a^5 & I_{yy} &= \frac{1}{6} \rho a^5 & I_{zz} &= \frac{1}{6} \rho a^5 \\ I_{xy} &= I_{yx} = 0 & I_{xz} &= I_{zx} = 0 & I_{yz} &= I_{zy} = 0 \end{aligned}$$

Computados los valores del tensor de inercia para uno de los vóxeles se pasa a calcular el tensor de inercia para la célula como el conjunto de todos los vóxeles. Por medio del teorema de Steiner se obtiene:

$$I_{xx\_solid} = \sum_{i=1}^n \left( I_{xx\_i} + M \left( (y_i - y_{CG})^2 + (z_i - z_{CG})^2 \right) \right)$$

$$I_{yy\_solid} = \sum_{i=1}^n \left( I_{yy\_i} + M \left( (x_i - x_{CG})^2 + (z_i - z_{CG})^2 \right) \right)$$

$$I_{zz\_solid} = \sum_{i=1}^n \left( I_{zz\_i} + M \left( (x_i - x_{CG})^2 + (y_i - y_{CG})^2 \right) \right)$$

$$I_{xy\_solid} = \sum_{i=1}^n \left( I_{xy\_i} - M \left( (x_i - x_{CG})(y_i - y_{CG}) \right) \right)$$

$$I_{xz\_solid} = \sum_{i=1}^n \left( I_{xz\_i} - M \left( (x_i - x_{CG})(z_i - z_{CG}) \right) \right)$$

$$I_{yz\_solid} = \sum_{i=1}^n \left( I_{yz\_i} - M \left( (y_i - y_{CG})(z_i - z_{CG}) \right) \right)$$

Una vez calculado el tensor de inercia, y dado que la forma de la célula es para gran mayoría de los casos irregular y compleja, se diagonaliza la matriz para determinar las direcciones principales de inercia, obteniendo:

$$\mathbf{I} = \begin{pmatrix} I_1 & 0 & 0 \\ 0 & I_2 & 0 \\ 0 & 0 & I_3 \end{pmatrix}$$

donde  $I_1, I_2$  y  $I_3$  son los valores principales de inercia y cumplen que  $I_1 > I_2 > I_3$ . La dirección de inercia correspondiente a  $I_1$  es la dirección de mayor inercia tomada como la dirección sobre la que medirá  $d_{\max I}$  y la dirección correspondiente a  $I_3$ , es la dirección de menor inercia y sobre la que se obtiene la medida  $d_{\min I}$ .

Como se ha explicado anteriormente, debido a que la célula habitualmente adquiere una forma muy irregular y frecuentemente surgen ramificaciones y espacios vacíos, para determinar el alargamiento máximo de la célula  $d_{\min I}$  se buscan los elementos de la célula cuya distancia proyectada sobre la dirección de menor inercia resulte en una distancia mayor. De igual modo se procede para determinar  $d_{\max I}$ . En la figura se muestra de manera esquemática el método utilizado para llevar a cabo la obtención de las dimensiones  $d_{\max}$  y  $d_{\min}$ .



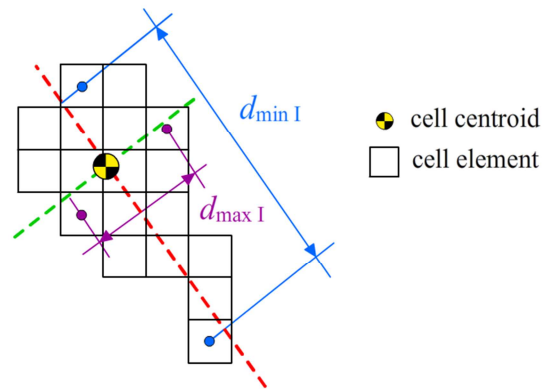


Figura. 43: Esquema de obtención del factor de forma celular.

La distancia entre los elementos más alejados proyectada sobre la dirección de mínima inercia (donde más masa celular hay) determina  $d_{\min I}$ . Análogamente, la distancia entre los elementos más alejados proyectada sobre la dirección de máxima inercia determina  $d_{\max I}$ . El cociente entre ambas distancias es lo que se denomina el factor de forma, y da una idea de la relación de aspecto de la célula.