

Marco experimental y computacional para caracterizar la migración de células inmunes en el microambiente del glioblastoma

Raquel B. Arroyo-Vázquez¹, Guillermo Mora-Ruiz^{1,2}, Marina Pérez-Aliacar¹, Teodora Randelović², Ignacio Ochoa^{1,2,3}, Manuel Doblaré^{1,2,3}, José A. Sanz-Herrera⁴, Jacobo Ayensa-Jiménez^{1,2}

¹ Tissue Microenvironment Lab (TME Lab)

Instituto Universitario de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A)
Universidad de Zaragoza, Mariano Esquillor s/n, 50018, Zaragoza, España.

Tel. +34-976762707, e-mail: rbarroyo@unizar.es

² Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IISA), Zaragoza, España.

³ Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Madrid.

⁴ Escuela Técnica Superior de Ingeniería. Universidad de Sevilla, España.

Resumen

Se presenta un marco que combina experimentos microfluídicos con modelado basado en agentes (ABM) para caracterizar la dinámica inmune en el microambiente del glioblastoma (GB), estudiando el efecto de los quimioatrayentes tumorales y las propiedades de la matriz extracelular (ECM) en la migración de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

Introducción

El GB es uno de los tumores cerebrales más agresivos e invasivos, con una media de supervivencia de tan sólo 8 meses después del diagnóstico. Este tumor presenta un microambiente muy complejo, secretando quimiocinas que modulan la migración inmune, y con una matriz densa formada por colágeno, fibronectina y proteoglicanos que pueden restringir la difusión de las quimiocinas y modificar la infiltración inmune. Es por ello, que la caracterización de dicha infiltración en el GB, permite predecir la efectividad de estas terapias y optimizar su aplicación [1].

Diversos modelos computacionales han sido empleados para describir la migración celular [2]. Entre ellos, los ABMs han ganado especial relevancia al representar cada célula como una entidad autónoma capaz de percibir y responder a estímulos locales del entorno. Sin embargo, muchos de estos modelos se apoyan en descripciones a nivel individual de la motilidad celular difíciles de ajustar, frente a medidas cuantitativas en entornos tridimensionales macroscópicos, lo que limita su capacidad predictiva en sistemas complejos.

En este trabajo combinamos estrategias experimentales y computacionales — ensayos microfluídicos, ABMs y herramientas de optimización — para caracterizar cómo el microambiente tumoral de la línea celular de glioblastoma U-251 MG regula la migración de PBMCs en configuraciones 3D.

Modelo in vitro

Los datos experimentales se obtuvieron usando dispositivos microfluídicos compuestos por una cámara central y dos canales laterales. Las células de GB se sembraron en uno de los canales para establecer un gradiente quimioatrayente, mientras que los PBMCs se introdujeron en el lado opuesto de la cámara. La cámara central se rellenó con gel de colágeno a diferentes concentraciones (2 y 4 mg/mL), actuando como variable moderadora que simula la ECM y condiciona la migración celular, y se tomaron imágenes con el confocal cada 2 min, para obtener vídeos del movimiento de los PBMCs en día 0 y día 1, para las dos condiciones de colágeno.

Las trayectorias de las células fueron extraídas mediante el software abierto `trackPy` a partir de las imágenes de microscopio en campo claro, obteniendo coordenadas espaciotemporales para cada célula rastreada.

Modelo computacional

Para replicar los resultados experimentales, se ha usado el software de código abierto `PhysiCell` [3]. El ABM incluye una población de células que puede migrar e interactuar mecánicamente entre sí y con la matriz extracelular. Las ecuaciones son las siguientes:

$$\mathbf{v} = \sum(\mathbf{F}_{ccr} + \mathbf{F}_{loc}), \quad \mathbf{F}_{loc} = c \frac{b \mathbf{d} + \xi(1-b)}{\|b \mathbf{d} + \xi(1-b)\|}.$$

Donde $\mathbf{v}$ es la velocidad celular, $\mathbf{F}_{ccr}$ la fuerza de repulsión entre células, c la velocidad de migración, b el sesgo de migración, $\mathbf{d}$ un vector de migración dirigida, y ξ un vector aleatorio.

Calibración paramétrica

A partir de estas trayectorias se calcularon magnitudes estadísticas de interés (QoI), como la posición celular media y su dispersión, que permiten cuantificar y comparar la respuesta migratoria de las PBMCs bajo las distintas condiciones experimentales y calibrar los parámetros del ABM a través de la optimización de una función de coste.

Resultados

En la Figura 1 se pueden observar las trayectorias centradas en el origen para los cuatro casos (en azul los resultados experimentales y en naranja los computacionales). El valor de los parámetros y otras métricas estadísticas (como la velocidad media, el avance medio o la tortuosidad), ofrecen información cuantitativa sobre el comportamiento migratorio de las PBMCs bajo las distintas condiciones experimentales.

Los resultados indican que concentraciones más altas de colágeno se asocian con una reducción de la migración dirigida, reflejada en una disminución del parámetro b , y confirmada estadísticamente. Este efecto podría responder a dos mecanismos no excluyentes entre sí: un efecto físico, por el que una ECM más densa restringe mecánicamente el desplazamiento celular, o un efecto quimiosensorial, por el que el aumento de densidad de la matriz atenúa la difusión efectiva de las quimiocinas, reduciendo la capacidad de los PBMCs para orientarse a lo largo de estos gradientes.

Además, se observa también un patrón entre el día 0 y el día 1 para ambas concentraciones de colágeno: tanto el avance medio, como el desplazamiento neto disminuyen al igual que el parámetro b mientras que la tortuosidad aumenta, denotando un movimiento menos dirigido. Además, la velocidad promedio y el parámetro c disminuyen, indicando que se produce cierto agotamiento inmune, tal y como se sugiere en otros trabajos [4].

Conclusiones

Este trabajo presenta un marco que: proporciona información sobre los aspectos físicos, químicos y biológicos de la migración en un sistema que mimetiza las condiciones in vivo; permite validar las predicciones computacionales frente a datos experimentales, mejorando la fiabilidad y especificidad del modelo; facilita una interpretación mecanística que complementa el análisis estadístico para identificar los principales reguladores de la infiltración inmune; y establece una plataforma tecnológica versátil, fácilmente adaptable a otras poblaciones celulares y contextos tumorales. En particular, los resultados para GB muestran el impacto del decaimiento de la señal y del agotamiento en la penetrabilidad de las células inmunes.

REFERENCIAS

- [1]. KOHLI, K., PILLARISETTY, V.G. Key chemokines direct migration of immune cells in solid tumors. *Cancer Gene Therapy*. 2022, 29, 10-21.
- [2]. BUTLER, George; RUDGE, Jonathan y DASH, Philip R. *Mathematical modelling of cell migration*. *Essays in Biochemistry*, 2019, vol. 63, n.º 5, p. 631-637. DOI: 10.1042/EBC20190020.
- [3]. GHAFARIZADEH, A. and MACKLIN, P. PhysiCell: An open source physics-based cell simulator for 3-D multicellular systems. *PLoS Computational Biology*. 2018.
- [4]. YU, Catherine; HSIEH, Kristin; CHERRY, Daniel R.; et al. *Immune Escape in Glioblastoma: Mechanisms of Action and Implications for Immune Checkpoint Inhibitors and CAR T-Cell Therapy*. *Biology*, 2023, vol. 12, n.º 12, art. 1528.

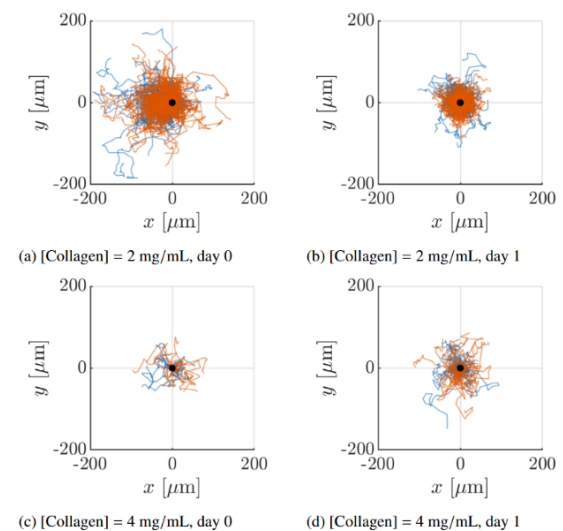


Figura 1. Comparación de trayectorias simuladas (naranjas) vs experimentales (azules).