***Modelado híbrido 3D de la formación de redes vasculares.***

***ABSTRACTO***

Desarrollamos un modelo basado en agentes fuera de la red para describir la vasculogénesis, la formación de novo de los vasos sanguíneos. A partir de células progenitoras endoteliales durante el desarrollo.

 Las células endoteliales que forman nuestra red de vasos se ven como esferas linealmente elásticas que se mueven en respuesta a las fuerzas que experimentan.  Distinguimos dos tipos de células endoteliales: los elementos de los vasos están contenidos dentro de la red y las células de las puntas están ubicadas en los extremos de los vasos.

Las células de la punta se mueven en respuesta a las fuerzas mecánicas causadas por las interacciones con elementos de vasos vecinos y el entorno del tejido local, las fuerzas quimio tácticas y una fuerza de persistencia que explica su tendencia a continuar moviéndose en la misma dirección.

Los elementos de los vasos están sujetos a fuerzas mecánicas similares pero son insensibles a la quimio taxis.   Se introduce una fuerza de persistencia angular que representa las interacciones con el tejido local para estabilizar las inestabilidades de pandeo causadas por la proliferación celular.

Solo proliferan los elementos de los vasos, en Tasas que dependen de su grado de tramo: los elementos alargados han aumentado las tasas de proliferación, y Los elementos comprimidos tienen tasas reducidas. Tras la división, el destino de la nueva célula depende de la local Entorno mecánico: la probabilidad de formar un nuevo brote aumenta si el vaso principal es altamente comprimido y la probabilidad de ser incorporado en el vaso principal aumenta si el padre se estira.

Los resultados de la simulación revelan que nuestro modelo híbrido puede reproducir las características cualitativas clave de la vasculogénesis. Los extensos análisis de sensibilidad de los parámetros muestran que los cambios significativos en el tamaño de la red y la morfología son inducidos por la variación de la sensibilidad quimio táctica de las células de la punta, y las sensibilidades de la tasa de proliferación y la probabilidad de brotación al estiramiento mecánico.

 La variación de la sensibilidad quimio táctica influye directamente en la direccionalidad de las redes. El grado de ramificación, y por lo tanto la densidad de las redes, está influenciado por la probabilidad de brotación.

Los glifos que representan simultáneamente varias propiedades de red se presentan para mostrar cómo estas y otras cantidades de red cambian con el tiempo y también como varían los parámetros del modelo.

 También mostramos cómo los glifos equivalentes construidos a partir de datos in vivo podrían usarse para discriminar entre la vasculatura normal y la tumoral y, a más largo plazo, para la validación del modelo.  Concluimos que nuestro modelo biomecánico híbrido puede generar redes vasculares que son cualitativamente similares a las generadas a partir de experimentos in vitro e in vivo.

***1. Introducción***

Para asegurar su supervivencia, muchos tejidos biológicos están dotados de una red de vasos sanguíneos que suministran nutrientes vitales a las células, como el oxígeno y la glucosa, eliminan los productos de desecho y facilitan el intercambio de información entre diferentes órganos. (Folkman, 1995).Las redes de vasos se forman típicamente a través de la angiogénesis y / o vasculogénesis (Risau, 1997).

El proceso de angiogénesis ha sido ampliamente estudiado debido a su importancia en la cicatrización de heridas y el crecimiento de tumores. En este último contexto, la angiogénesis marca la transición de la fase relativamente inofensiva y localizada del crecimiento de tumores avasculares a Fase de crecimiento vascular potencialmente mortal (Carmeliet, 2005).Durante la angiogénesis, nuevos vasos sanguíneos emergen de vasos perfundidos preexistentes, las células endoteliales que constituyen los vasos siendo estimulados a proliferan y migran quimio tácticamente en respuesta a factores de crecimiento Producido por células que carecen de una adecuada abastecimiento de nutrientes.

En contraste, la vasculogénesis es la formación de novo de nuevos vasos sanguíneos a partir de células endoteliales aisladas.  Como tal, no depende de la presencia de una red vascular preexistente y es una característica prominente de desarrollo embriónico. Mientras en Práctica, tanto vasculogénesis como la angiogénesis puede simultáneamente participar en la red vascular formación durante la cicatrización de heridas, el crecimiento de tumores y el desarrollo embrionario, sus contribuciones relativas siguen siendo muy debatidas (Drake, 2003). Como resultado, se necesita con urgencia una mayor comprensión de ambos procesos y sus interacciones. Tal comprensión también puede permitir a los experimentadores y médicos establecer la mejor manera de combinar los agentes de direccionamiento vascular con otros tratamientos para estimular la curación de heridas crónicas o para detener el crecimiento de tumores sólidos.

Existe una extensa literatura teórica dedicada al modelado matemático y computacional de la formación de redes vasculares. Los modelos se han desarrollado en todo el espectro de escalas fisiológicas de espacio y tiempo, utilizando una variedad de marcos. Los métodos más utilizados se basan en ecuaciones diferenciales ordinarias, ecuaciones diferenciales parciales y / o enfoques basados ​​en agentes. Se diferencian en la resolución geométrica y en los detalles que representan.

Los modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias describen la evolución temporal de cantidades globales, como el número de vasos y el volumen del tumor (Hahnfeldt et al., 1999).

Los modelos formulados usando ecuaciones diferenciales parciales típicamente describen la evolución temporal de las características de macro escala distribuidas espacialmente, como las fracciones de volumen de los vasos y las concentraciones de oxígeno y quimio atrayentes (Hubbard y Byrne, 2013), aunque la fase más reciente los modelos de campo proporcionan un marco para simular las características morfológicas de las redes vasculares con variables continuas (Vilanova et al., 2013).

Los enfoques basados ​​en agentes permiten un estudio más detallado de los Fenómenos, en una escala en la que se puede resolver la evolución espacial y temporal de los vasos sanguíneos individuales y / o las células endoteliales. En los párrafos que siguen, ilustramos brevemente cada una de las categorías antes mencionadas, centrándonos en los enfoques basados ​​en agentes, que son el tema del presente trabajo.

Hahnfeldt et al. (1999) y Arakelyan et al. (2003) propusieron modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias de dos partes para el crecimiento de un tumor vascular y su respuesta al tratamiento con un químico anti-angiogénico. De manera más general, los modelos continuos de resolución espacial presentan ecuaciones diferenciales parciales (PDE) para la fracción de volumen de células endoteliales que se acoplan a las PDE para quimio atrayentes, quimio resistentes y la matriz extracelular. Las ventajas clave de estos modelos continuos son el número relativamente pequeño de parámetros que contienen y que se pueden simular de manera eficiente.

Los inconvenientes son que las propiedades celulares individuales, los detalles geométricos de la morfología vascular y las redes subcelulares no se pueden incluir fácilmente. Siguiendo un enfoque continuo, Balding y McElwain (1985) desarrollaron un modelo que incluía densidades de vasos sanguíneos y puntas capilares que describen la formación de brotes y la fusión de una red preexistente en respuesta a factores angiogénicos tumorales.

Este modelo aplica el concepto de "camino de caracol" bajo el cual las puntas capilares móviles dejan atrás los vasos sanguíneos. Flegg et al. Desarrolló un modelo continuo similar con tres especies (concentración de oxígeno, densidad de la punta capilar, densidad de vasos sanguíneos) para estudiar la eficacia de la terapia de oxígeno hiperbárico para curar heridas crónicas (Flegg et al., 2009; Machado et al., 2011). Varios documentos de modelos han investigado los efectos que tiene en la estructura de la red, la deformación de la matriz extracelular. Por ejemplo, Edgar et al. (2013) han demostrado cómo la orientación de la fibra puede guiar el movimiento de las células de la punta. Otros enfoques basados ​​en modelos mecano químicos (Manoussaki et al., 1996), continuum (Namy et al., 2004 y Tosin et al., 2006), y el modelado continuo-discreto (Stephanou et al., 2015) han abordado este problema. Por ejemplo, Dyson et al. (2015) han utilizado un enfoque multifase para mostrar cómo las fibras incrustadas en la matriz del tejido pueden sesgar el movimiento celular y cómo el movimiento celular puede deformar las fibras. Sin embargo, ninguno de estos modelos combina el estrés mecánico que las células endoteliales experimentan con su crecimiento, proliferación y el fenotipo de sus células hijas.

Como ejemplo de un modelo de angiogénesis fuera de la red basado en agentes, nos referimos a Stokes y Lauffenburger (1991), que incluyen el movimiento de brotes como un camino aleatorio persistente sesgado, basado en una ecuación diferencial estocástica para la aceleración celular. Ver también Anderson y Chaplain (1998) y Plank and Sleeman (2004). La persistencia del movimiento está directamente vinculada a la quimiotaxis. Se puede encontrar más información sobre estos enfoques en los artículos de revisión de Mantzaris et al. (2004), Ambrosi et al. (2005), Merks y Koolwijk (2009), y Scianna et al. (2013).

Ahora destacamos algunos modelos de vasculogénesis basados ​​en agentes existentes. Blanco y Gerhardt (2013) resuelven la forma y el movimiento de los brotes de los vasos: cada célula se descompone en varios agentes conectados y la atención se centra en la influencia de Señalización delta en el inicio de brotes vasculares. Su trabajo se centra en pequeños segmentos de redes vasculares.

Otros autores han simulado la vasculogénesis y la formación de redes vasculares en escalas de mayor longitud. Por ejemplo, Merks et al. (2008) han utilizado el modelo celular de Potts (CPM) para investigar cómo la inhibición por contacto influye en el movimiento de los brotes capilares en respuesta a un quimio atrayente difusible y extracelular producido por las células endoteliales. El movimiento, la forma y la alineación de las células se determinan mediante la minimización de una función de energía que explica la unión célula-célula, las restricciones de volumen y la quimiotaxis, con el movimiento quimio táctico restringido a los sitios de la red que son adyacentes a los sitios ocupados por la matriz extracelular (ECM). Scianna et al. (2011) también utilizan el CPM para desarrollar un modelo multiescala que representa la activación, migración, polarización y adhesión celular, y en el que cada célula se descompone en una región nuclear y una citosólica. En el espacio intracelular, las concentraciones de ácido araquidónico, óxido nítrico y calcio se describen mediante ecuaciones de reacción-difusión. La energía funcional que determina la morfología celular y el movimiento explica la forma (área y perímetro), la adherencia (intracelular y los núcleos y el citosol dentro de la misma célula), la quimiotaxis, la inhibición por contacto y la persistencia en el movimiento celular. La concentración extracelular del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se describe mediante una ecuación de difusión de reacción. Sobre la base del CPM, Szabó et al. (2007, 2008, 2012) estudiaron los roles de la elongación celular y las interacciones célula-matriz en la formación de redes vasculares. En otro trabajo, van Oers et al. (2014) acoplaron un CPM a un modelo de elementos finitos para la deformación del sustrato. La función de energía en el CPM dependía de la tensión y la rigidez dependiente de la orientación de la matriz extracelular. Las simulaciones de sus modelos produjeron patrones realistas de formación de redes y brotes de grupos de células endoteliales.

En contraste con los modelos basados ​​en agentes mencionados anteriormente, donde una sola célula está representada por varios agentes, los autómatas celulares representan una célula por un agente. Por ejemplo, Stephanou et al. (2005) desarrollaron un marco basado en agentes en el que el movimiento de células individuales está influenciado por la quimiotaxis y la haptotaxis. En su modelo, las interacciones entre los vasos y la ECM desempeñan un papel importante en la regulación del movimiento celular. Además de los cambios en la estructura de la red, los radios de los vasos también se adaptan en respuesta a estímulos hidrodinámicos, metabólicos y angiogénicos. Watson y otros (2012) adaptaron este enfoque para desarrollar un modelo híbrido bidimensional del desarrollo del plexo vascular retiniano. El modelo explica los astrocitos individuales y las células de la punta endotelial que se mueven en una red, y utiliza un enfoque continuo para modelar la distribución de moléculas de señalización bioquímicas y componentes de ECM. Sobre la base de trabajos anteriores de Alarcón y otros (2005a), Owen y otros. (2009), Perfahl et al. (2011), Macklin et al. (2009), Shirinifard et al. (2009), y Welter et al. (2008, 2009) desarrollaron un modelo de autómata celular similar de crecimiento tumoral vascular. Una característica común del modelo de autómata celular mencionado anteriormente es que las interacciones entre células se basan en reglas: no se incluyen las fuerzas mecánicas. Además, los nodos de la red están restringidos a sitios de celosía, creando redes angulares y no fluidas. Los modelos fuera de la red se pueden usar para abordar estas limitaciones y también generalizar de forma natural a tres dimensiones. Se han utilizado ampliamente para investigar las interacciones célula-célula en sistemas multicelulares, incluido el hígado (Hoehme et al., 2010), desarrollo (McLennan et al., 2012), esferoides de tumores avasculares (Schaller y Meyer-Hermann, 2005) y la homeostasis en La cripta intestinal (Pitt-Francis et al., 2009). Jackson y Zheng (2010) propusieron un modelo híbrido de base mecánica para la formación de redes. En su enfoque, las células de la punta y el tallo se modelan como agentes elásticos interconectados. El movimiento quimio táctico de las células de la punta produce fuerzas mecánicas que actúan sobre las células del tallo vecinas cuyas tasas de proliferación dependen de su masa y madurez. En Drasdo et al. Se presentó un modelo alternativo de angiogénesis y crecimiento de tumores vasculares basado en agentes reticulados. (2010).

Similar a Drasdo et al. (2010), y en contraste con los modelos bidimensionales, basados ​​en celosías descritos anteriormente, en este artículo desarrollamos un modelo tridimensional (3D), sin celosía, híbrido de vasculogénesis, aunque se supone que las células (o agentes) Tienen forma fija, por simplicidad y para mejorar la eficiencia computacional. Como tal, el flujo sanguíneo no se considera parte de nuestro modelo. Además, no describimos las células endoteliales individuales que recubren un vaso sanguíneo de diámetro pequeño; Utilizamos elementos esféricos para representar secciones de pequeños vasos. Nuestro modelo está motivado por experimentos in vitro en los que se integraron segmentos de microvasos de rata fluorescentes verdes aislados dentro de la matriz que se encuentra encima de una gota que contiene células de cáncer de mama MDA-231 fluorescentes rojas inmortalizadas, de modo que el tumor y las células endoteliales no estaban en contacto directo. Las imágenes in vitro, adquiridas en los días 1, 4 y 6 utilizando un microscopio Zeiss Z1 Observe con un aumento de 5x, revelan la proliferación y migración de células endoteliales en respuesta a factores de crecimiento derivados del tumor y la formación de pequeñas redes no perfundidas (ver Fig. 1) . La motivación adicional para nuestro modelo híbrido proviene de experimentos diseñados para comprender cómo las células endoteliales responden al estiramiento mecánico (Liu et al., 2007; Zheng et al., 2008). Liu et al. (2007) muestran que las células endoteliales aumentan su velocidad de proliferación en el estiramiento y que tanto la adhesión célula-célula como el acoplamiento de la cadherina endotelial vascular son necesarios para transducir el estiramiento mecánico en señales proliferativas. En trabajos separados Zheng et al. (2008) mostraron que la respuesta de las células endoteliales al estiramiento estático al aumentar sus tasas de proliferación celular, formación de lumen y ramificación, y que la unión de VEGF es necesaria para mediar estas respuestas.

Nuestro modelo fuera de celosía basada en agentes representa la vasculatura como una red de esferas cuyos centros están conectados por resortes lineales y cuyo movimiento en 3D se determina mediante la aplicación de equilibrio de fuerza local. Distinguimos dos tipos de agentes de células endoteliales: elementos de vasos que son contenidas dentro de la red y proliferan, y las células de la punta que están ubicadas en los extremos de los vasos, no proliferan y responden mediante quimiotaxis a gradientes espaciales en factores angiogénicos como el VEGF. Para simplificar, asumimos que las células de la punta y los elementos de los vasos no cambian el fenotipo ni la posición de intercambio, aunque existe evidencia experimental de estos fenómenos (Blanco y Gerhardt, 2013). En contraste con los modelos híbridos existentes y motivados por el trabajo de Liu et al. (2007) y Zheng et al. (2008), aquí proliferación celular y

Se supone que las ramificaciones dependen del grado de estiramiento mecánico (o compresión) experimentado por los elementos de recipientes individuales. Por lo tanto, dos procesos clave impulsan el movimiento de las células endoteliales: el movimiento quimio táctico de las células de la punta crea una atracción que actúa sobre los elementos de los vasos contenidos dentro de la red, mientras que la proliferación celular crea un impulso mitótico que actúa sobre las células de la punta. Las simulaciones numéricas revelan que nuestro modelo híbrido mecano químico puede reproducir las características clave de la vasculogénesis.

Se realizan cálculos extensos para mostrar cómo los cambios de parámetros influyen en el desarrollo de la red. Dado que las simulaciones de modelos son estocásticas, las comparaciones de red exactas no son posibles. En cambio, nuestros análisis de sensibilidad de parámetros se basan en características de red extraídas de múltiples simulaciones generadas con diferentes semillas aleatorias. Las métricas utilizadas para caracterizar las redes incluyen lo siguiente: la longitud total de la red, el número promedio de puntos de bifurcación por unidad de longitud, la tortuosidad y la distribución de las longitudes del segmento del barco. Notamos que estas métricas también pueden extraerse de datos experimentales in vitro e in vivo y, por lo tanto, podrían facilitar las comparaciones entre nuestro modelo y los datos disponibles. Dado que la variación de los parámetros del modelo puede afectar a múltiples métricas, también introducimos glifos simultáneamente para visualizar varias métricas de red.

Un glifo es un objeto gráfico cuyo los atributos están vinculados a los datos (Maguire et al., 2012). Los glifos bidimensionales que desarrollamos nos permiten presentar con claridad datos o métricas multidimensionales en una sola entidad gráfica. Los principales logros del documento se resumen a continuación:

• El desarrollo de un modelo híbrido fuera de la red de vasculogénesis en el que el estiramiento mecánico regula la proliferación de células endoteliales y la formación de brotes capilares.

• La identificación de métricas cuantitativas que se pueden usar de manera robusta para caracterizar y comparar las redes de buques y para estudiar el impacto de las perturbaciones externas en la estructura de la red.

• El diseño y uso de glifos como una forma objetiva de agregar múltiples funciones de red en un diagrama.

• Una demostración de que los estímulos mecánicos por sí solos pueden generar trabajos netos cuyas características morfológicas son cualitativamente similares a las observadas in vitro e in vivo.

El resto del documento está estructurado de la siguiente manera, el modelo matemático se presenta en la Sección 2, los resultados de la simulación se presentan en la Sección 3, el documento concluye en la Sección 4, donde discutimos nuestros hallazgos y resumimos las instrucciones para el trabajo futuro.

***2. Métodos***

En esta sección presentamos el modelo basado en agentes 3D que hemos desarrollado, utilizando un enfoque fuera de la red, para simular la vasculogénesis. Nuestro objetivo es establecer si se pueden generar redes de vasos físicamente realistas cuando la proliferación de células endoteliales y la formación de brotes capilares están reguladas por efectos mecánicos.

 A continuación se incluye una descripción detallada del modelo computacional, mientras que la información sobre el algoritmo y los valores de los parámetros utilizados para generar simulaciones numéricas se proporciona en los Materiales complementarios. Para caracterizar los cambios morfológicos que se producen de manera objetiva a medida que las redes evolucionan y / o los parámetros del sistema varían, se introducen varias métricas (por ejemplo, la longitud total del barco, la tortuosidad y el número de puntos de ramificación por unidad de unidad) y se aplican a las redes. Los glifos que representan simultáneamente múltiples métricas también se introducen y se utilizan para presentar, de manera concisa, atributos de red.

***2.1. El modelo computacional***

Nuestro modelo tridimensional, fuera de la red, basado en agentes, tiene como objetivo describir la formación de novo de las redes vasculares que se produce durante la vasculogénesis. Distinguimos dos tipos de células endoteliales: células de la punta y elementos vasculares (ver Fig. 2). Las células de la punta están ubicadas en el extremo romo de cada brote capilar y todos los demás segmentos (internos) son elementos de vasos. Si bien los resultados experimentales recientes han demostrado que las células de la punta pueden cambiar de posición (y fenotipo) con las células endoteliales ubicadas en el mismo brote (Hellström et al., 2007), aquí, por simplicidad, descuidamos tales efectos y asumimos que la identidad del líder La célula de la punta en un brote particular es fija. Las células de la punta y los elementos de los vasos se modelan como esferas linealmente elásticas y todos los pares de células o elementos conectados ejercen fuerzas iguales y opuestas (mecánicas) entre sí.

En nuestro modelo, las células de la punta y los elementos de los vasos difieren en dos formas importantes (ver Fig. 2): los elementos de los vasos pueden proliferar mientras que las células de la punta no pueden; las células de la punta están sujetas a una fuerza quimio táctica causada por gradientes espaciales en los niveles locales del factor angiogénico difusible, VEGF, mientras que los elementos del vaso no son sensibles al VEGF (se ha demostrado que los contactos célula-célula inhiben la señalización inducida por VEGF dentro de un vaso (Merks et al., 2008)). Por lo tanto, como se muestra en la Fig. 2 (A), las células de la punta realizan una caminata aleatoria persistente, sesgada por la quimiotaxis en respuesta de gradientes espaciales en VEGF y restringidos por fuerzas mecánicas debidas a interacciones célula-célula (linealmente elásticas) y fuerzas de arrastre debido a interacciones con la matriz tisular local. Los elementos de los recipientes están sujetos a fuerzas de arrastre, mecánicas y aleatorias y una fuerza de persistencia angular, estas dos últimas fuerzas explican las interacciones de las células con el entorno local.

A continuación, presentamos las formas funcionales utilizadas para modelar cada fuerza, pero primero explicamos cómo derivamos las ecuaciones de movimiento para cada elemento de los vasos. Supongamos que en el tiempo t, la red comprende **N= N (t)** elementos (celdas de punta y elementos de vaso) que se ubican dentro de un dominio cartesiano tridimensional de tamaño **Wx X Wy X Wz**. Denotamos por xi (t) la posición del centro del segmento del vaso **i (i = 1,..., N),** y registramos en una matriz E de adyacencia los números de nodo de todos los pares de elementos del vaso conectados. Utilizamos la segunda ley de Newton para derivar las ecuaciones de movimiento. En el límite excesivamente amortiguado, descuidamos los efectos de inercia y obtenemos los siguientes equilibrios de fuerza para la celda de punta **i** y el segmento de vaso **j**, respectivamente:

En las ecs. (1) y (2), asumimos que la fuerza de arrastre en el elemento del vaso i es proporcional a su velocidad **dxi / dt**, la constante positiva **μ** que denota el coeficiente de arrastre. Denotamos la fuerza mecánica por , la fuerza aleatoria por , la fuerza quimio táctica por y las fuerzas de persistencia direccionales y angulares pory , respectivamente. Estas fuerzas se prescriben de la siguiente manera.