

Modelado 3D del mecano-sensing y la migración celular

C. Borau^{1,2,3}, M.H. Doweidar^{1,2,3}, J.M. García-Aznar^{1,2,3}

¹ Grupo de mecánica estructural y modelado de materiales (GEMM) {cborau, mohamed, jmgazar}@unizar.es

² Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)

³ Instituto de investigación en ingeniería de Aragón (I3A)

Resumen

La migración celular es uno de los procesos biológicos esenciales para el desarrollo de tejidos en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas. Es un proceso complejo orquestado por la química, factores biológicos, microestructura y condiciones mecánicas del entorno. El mecano-sensing del sustrato implica una serie de procesos como la protrusión de pseudopodios o la formación de adhesiones focales. En este trabajo desarrollamos un modelo numérico tridimensional que simula el proceso de mecano-sensing y el movimiento asociado de acuerdo a: la rigidez del sustrato, condiciones mecánicas locales, fuerzas de tracción celulares y condiciones de contorno.

1. Introducción

La relevancia que el movimiento celular ha adquirido durante los últimos años es debida al papel fundamental que desempeña en procesos tan importantes como la morfogénesis, la respuesta inflamatoria o la regeneración de tejidos. La migración celular está guiada por señales provenientes del entorno. La naturaleza físico-química de la matriz extracelular (ECM) y su unión con la célula a través de la membrana, permite a esta comprobar las condiciones mecánicas del entorno y reaccionar a ellas de alguna manera específica. Para sentir las condiciones que la rodean, la célula extiende lamelipodios y filopodios que se anclan al sustrato y lo estiran mediante fuerzas de contracción para explorar sus propiedades en un proceso conocido como “mecano-sensing” [1]. Estas fuerzas son generadas por los motores de actina-miosina y transmitidas a la matriz a través de la membrana mediante proteínas (lo que se conoce como adhesiones focales) [2-4]. La influencia de la rigidez y la topografía de la matriz extracelular ha sido investigada recientemente [5-9]. Una de las conclusiones más importantes es que las células prefieren migrar hacia las partes más rígidas del sustrato [6,10-12]. Además las adhesiones focales son más estables y las fuerzas de tracción son mayores en sustratos más rígidos [6,10,12]. Sin embargo todavía no está claro si las células son capaces de sentir la tensión y/o la deformación.

Los estudios de la migración celular se han centrado especialmente en entornos 2D. Estos estudios han ayudado a entender los mecanismos utilizados por las células para migrar, sin embargo cuando las células están rodeadas por una matriz 3D, experimentan sensaciones y aparecen factores que no estaban presentes en 2D como la resistencia viscosa al movimiento, la degradación de la matriz, diferente concentración de fibras según la

dirección etc. Por lo tanto, para entender completamente cómo migran las células en vivo es necesario estudiar su movimiento en entornos 3D. Los estudios experimentales y el desarrollo de modelos tridimensionales han crecido sustancialmente en los últimos años [13-15].

Aquí se presenta un modelo de migración 3D regulada por el mecano-sensing celular. En él se tiene en cuenta los componentes celulares más relevantes, las fuerzas de tracción ejercidas y las principales fases de la migración celular: protrusión, formación de adhesiones focales, contracción celular, liberación de las adhesiones traseras y movimiento. El modelo incluye otros parámetros importantes como la rigidez del sustrato, su viscosidad efectiva, su geometría y sus condiciones de contorno. Con todo ello el modelo es capaz de predecir la tendencia de la migración celular en sustratos con diferentes rigideces y condiciones de contorno.

2. Formulación del modelo

Este trabajo se centra principalmente en la migración de una única célula que interactúa con el sustrato pero no con otras células. Por tanto su comportamiento sólo se ve afectado por las propiedades mecánicas del medio y las condiciones de contorno.

Cuando una célula migra, se activan complejos mecanismos que regulan su movimiento. En este modelo se considera que esos mecanismos se pueden simplificar fundamentalmente en tres: mecano-sensing, adaptación del citoesqueleto (CSK) y migración. La célula embebida en la matriz, extiende filopodios y lamelipodios para sentir las condiciones mecánicas. La célula se contrae para evaluar la rigidez del sustrato y por lo tanto se deforma y se tensiona. El citoesqueleto se reorienta y por tanto la célula se polariza. Debido a la mayor concentración de fuerzas de tracción en la parte delantera, las adhesiones focales de atrás se sueltan y se produce el movimiento.

2.1. Mecano-sensing

El citoesqueleto es una estructura dinámica que mantiene la forma de la célula, la protege y juega un papel fundamental en procesos como la división celular, el transporte interno o la migración. Los elementos celulares que llevan a cabo una función relevante en la mecánica de la célula aquí considerados son: los filamentos de actina (K_{act}), el mecanismo contráctil actina-miosina (AM) y la resistencia pasiva del resto del cuerpo celular

(principalmente microtúbulos y membrana K_{pas}). El CSK está ligado a la ECM a través de adhesiones focales e integrinas transmembrana asumidas perfectamente rígidas en nuestro modelo el cual está basado principalmente en un trabajo anterior [16]. [Fig.1]

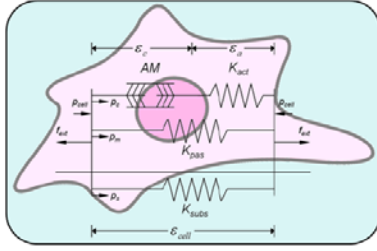


Figura 1. Modelo de mecano-sensing de la célula. Diagrama con los componentes mecánicos más importantes.

p_{cell} es la fuerza transmitida efectivamente a la matriz. Su magnitud depende de la deformación de la célula y es la suma de la contribución del sistema actina-miosina (AM) y la fuerza absorbida por los elementos pasivos (p_c y p_m respectivamente).

$$p_{cell} = p_c + p_m = p_c(\epsilon_c) + K_{pas} \cdot \epsilon_{cell}$$

Donde p_c es función del solapamiento de los filamentos de actina-miosina [Fig.2]. Por tanto, aplicando condiciones de equilibrio, la magnitud de p_{cell} puede obtenerse como función de la deformación de la célula en la dirección de polarización.

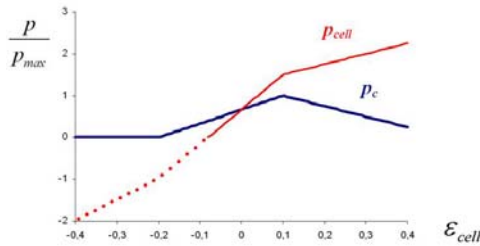


Figura 2. Predicciones del modelo. Fuerza activa (p_c) y fuerza neta (p_{cell}) de la célula en función de la deformación celular en la dirección de polarización (ϵ_{cell})

2.2. Adaptación del citoesqueleto

El mecano-sensing permite a la célula detectar las direcciones principales de deformación (d_{ei}). El citoesqueleto se reorienta en un principio con la primera dirección principal. La parte frontal y trasera de la célula se determina respectivamente según el punto de máxima y mínima tensión en el sustrato en la dirección de polarización. Habiendo definido una dirección y un sentido, la célula queda polarizada. Esta polarización afecta indirectamente al mecano-sensing, de manera que la dirección principal de deformación “elegida” por la célula no es siempre la primera, sino la más cercana a la dirección de polarización (d_{pol}). La explicación biológica para esta hipótesis es que el mayor número de receptores y adhesiones focales en la parte frontal de la célula conllevan un mecano-sensing anisótropo que da “prioridad” a la dirección en la que la célula está orientada.

2.3. Migración

La última fase del modelo está diseñada para predecir el movimiento celular a partir de un equilibrio de fuerzas en el centroide de la célula de donde se despeja la velocidad de migración. La fuerza total en la célula se divide en fuerza de tracción, fuerza de protrusión y fuerza resistiva que se opone al movimiento. Este equilibrio se puede expresar como [13]:

$$F_{tot} = F_{drag} + F_{trac} + F_{prot} = 0$$

F_{prot} , que proviene de la polimerización de actina y de las adhesiones célula-matriz, introduce un comportamiento estocástico en el modelo.

F_{drag} representa la resistencia viscosa al movimiento. Es proporcional a la forma de la célula (c), la viscosidad efectiva de la matriz (η) y a la velocidad de la célula (v).

$$F_{drag} = c \cdot v \cdot \eta$$

F_{trac} es la fuerza de tracción ejercida por la célula para moverse. Tiene dos componentes, la tracción en la parte frontal de la célula (F_{tracF}) y la tracción en la parte trasera (F_{tracB}). La tracción delantera es mayor debido al mayor número de receptores y adhesiones focales. Para reflejar esto, consideramos el término “adhesividad” (β) que es proporcional (k) al número de receptores (n) y a la concentración de ligandos ($[L]$).

$$\beta_F = k_F \cdot n_F \cdot [L_F]$$

$$\beta_B = k_B \cdot n_B \cdot [L_B]$$

Por el momento en nuestras simulaciones estos parámetros se consideran constantes. La magnitud de las fuerzas de tracción depende además de p_{cell} , que a su vez depende de la deformación de la célula (ϵ_{cell}) en la dirección de polarización (d_{pol}). Por tanto la fuerza de tracción resultante puede expresarse como:

$$F_{trac} = F_{tracF} - F_{tracB} = \beta_F p_{cell} d_{pol} - \beta_B p_{cell} d_{pol}$$

3. Implementación numérica

Para llevar a cabo la simulación, utilizamos el método de los elementos finitos (FEM) a través del software comercial ABAQUS 6.8 y subrutinas de usuario.

La célula está embebida en un sustrato tridimensional (modelado como una malla de hexaedros C3D8) y situada en el centro de un elemento cualquiera (el tamaño de la célula es comparable al del elemento). La célula ejerce fuerzas de contracción (proyectadas a los nodos mediante funciones de forma) de manera que el elemento queda totalmente a compresión y los elementos vecinos a tracción. Estas fuerzas producen desplazamientos, tensiones y deformaciones en el sustrato que sirven como variables de entrada para el modelo constitutivo. De esta forma se evalúa la dirección de polarización (dependiente de las tensiones) el sentido de movimiento de la célula (dependiente de los desplazamientos) y la magnitud de las fuerzas (dependiente de la deformación). Resolviendo la

ecuación de equilibrio de fuerzas se obtiene la velocidad de migración y con ello la nueva posición de la célula para comenzar el próximo incremento. Se utilizan incrementos de tiempo de 600 segundos. Este es aproximadamente el tiempo requerido para completar un ciclo migratorio en muchos tipos de células como los fibroblastos, células epiteliales etc. [13]

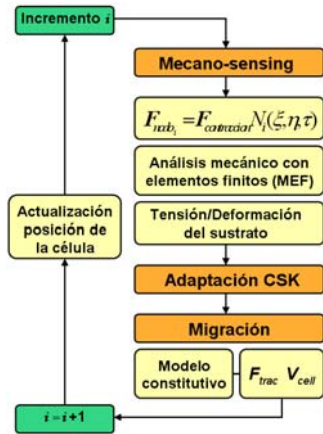


Figura 3. Esquema del algoritmo en cada incremento de tiempo. La célula ejerce fuerzas de contracción para sentir el entorno. La tensión y la deformación producida determinan la polarización y la magnitud de las fuerzas ejercidas para moverse.

4. Ejemplo de aplicación y resultados

Se presenta la simulación de un sustrato con diferentes rigideces ($E_2 > E_1$) y diferentes condiciones de contorno. Se distinguen tres casos con diferentes condiciones en los lados del sustrato:

Caso1: Más rígido empotrado-Menos rígido libre.

Caso2: Ambos lados empotrados.

Caso3: Más rígido libre-Menos rígido empotrado.

El sustrato una forma rectangular de $200 \times 200 \times 400 \mu m$ y esta modelado como una malla regular de 16000 elementos hexaédricos. El tiempo simulado es de 3 horas (18 incrementos) mientras que el tiempo de computación es de unos 10 minutos. Las características de cada caso se muestran en las figuras. El movimiento de la célula está plasmado mediante esferas que representan el centroide de la célula.

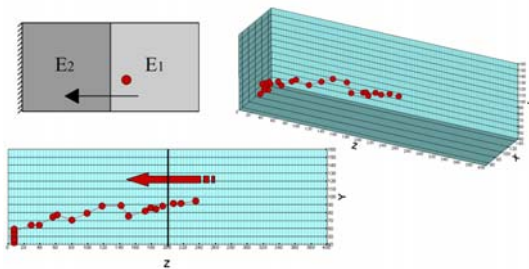


Figura 4. Caso 1

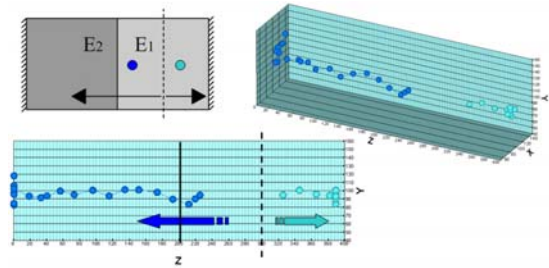


Figura 5. Caso 2

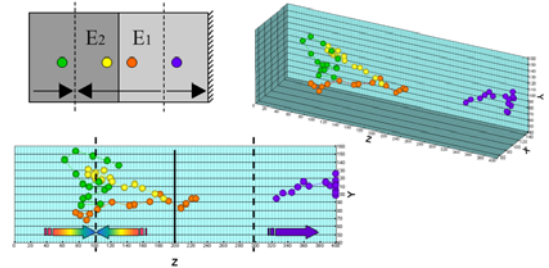


Figura 6. Caso 3

Un gran número de simulaciones han sido ejecutadas y los resultados consistentes. Las condiciones de contorno modifican las propiedades del sustrato principalmente de manera horizontal, por lo que los comentarios sobre los resultados se centran en la migración en esta dirección.

En el primer caso, no importa donde se sitúe inicialmente la célula ya que siempre se desplaza hacia el extremo empotrado (que además tiene mayor módulo de Young E_2). La célula nunca va de la parte más rígida a la menos rígida. Si la célula llega hasta el empotramiento, empieza a moverse aleatoriamente pero sin alejarse de él [Fig.4].

En el segundo caso, la parte menos rígida del sustrato también esta empotrada. Esto produce un plano imaginario (línea de puntos en la figura) donde las células cambian el sentido de migración. Una célula situada cerca del empotramiento del lado menos rígido (derecha), migra hacia ese empotramiento. En cambio, las células situadas a la izquierda del plano imaginario, presentan una clara tendencia a migrar hacia el empotramiento de la parte más rígida del sustrato (izquierda). Igual que en el primer caso, si las células llegan a cualquiera de los empotramientos comienzan a moverse aleatoriamente pero sin alejarse [Fig.5].

En el tercer caso hay una diferencia sustancial. Se pueden distinguir tres zonas diferenciadas dentro del sustrato separadas por dos planos imaginarios. De izquierda a derecha, en la primera zona, las células situadas cerca del extremo libre migran hacia el interior del sustrato. Sin embargo, una vez que atraviesan el plano imaginario dan la vuelta. Después vuelven a cruzar el plano y así sucesivamente de manera indefinida. Este fenómeno afecta también a las células situadas inicialmente en la zona intermedia, las cuales migran hacia la izquierda hasta que cruzan el plano donde permanecen moviéndose de manera aleatoria. Las células situadas en la última zona migran directamente hacia el empotramiento de la derecha [Fig.6].

5. Discusión

Este trabajo está basado en un equilibrio de fuerzas en el centroide de la célula con incrementos de tiempo discretos. Aunque la migración 3D es diferente a la migración 2D, nuestros resultados y predicciones se pueden comparar con datos experimentales [6]. Particularmente, el experimento de Lo et al. que consiste en un sustrato con dos rigideces diferentes donde se colocan algunas células. Sus conclusiones son que las células situadas en la parte menos rígida del sustrato tienden a migrar a la parte más rígida, mientras que las situadas desde un principio en la parte más rígida nunca cruzan la interfaz que separa las partes. Esto sugiere, como se propone en este trabajo, que las células son capaces de sentir el ambiente mecánico y actuar en consecuencia. Según se propone las células migrarían hacia donde las tensiones generadas son mayores. Esto implica que la célula no sólo es capaz de sentir la rigidez propiamente dicha (módulo de Young) sino también las condiciones de contorno. Por ejemplo en el caso 2, si la célula está situada cerca del empotramiento de la derecha irá hacia él a pesar de encontrarse en la parte del sustrato con menor módulo de Young ya que las tensiones son mayores a su izquierda. En cambio cualquier célula situada a la izquierda del plano imaginario, sentirá mayores tensiones a su izquierda debido a la proximidad la zona con mayor rigidez y por tanto migrará hacia la parte izquierda. Además, otra de las conclusiones del experimento es que la fuerza de tracción ejercida por la célula en sustratos rígidos es mayor que en sustratos más blandos, lo cual concuerda también con el modelo ya que sustratos rígidos conllevan deformaciones menores y por tanto mayor p_c , p_{cell} y consecuentemente F_{trac} .

Para concluir, se puede decir que el modelo presentado es capaz de predecir la migración celular a partir de las propiedades mecánicas del sustrato así como de las condiciones de contorno. La velocidad de la célula es obtenida a partir de un equilibrio de fuerzas cuya magnitud depende de la deformación de la célula. Además, se propone una orientación del citoesqueleto dependiente de la deformación celular y una dirección de movimiento dependiente de las tensiones. Las hipótesis principales parecen concordar con resultados experimentales aunque nuevos factores como la remodelación de la matriz extracelular, la interacción célula-célula o la mecano-química deben ser introducidos para completar el modelo.

Agradecimientos

Este trabajo está apoyado por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España (DPI 2009-14115-CO3-01)

Referencias

- [1] Discher DE, Janmey P, Wang YL (2005). 'Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate'. *Science* 310 (5751): 1139_1143
- [2] Bershadsky AD, Balaban NQ, Geiger B (2003). 'Adhesion-dependent cell mechanosensitivity'. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19:677
- [3] Yang TY, Zaman MH (2007). 'Free energy land-scape of receptor-mediated cell adhesion'. *Journal of Chemical Physics* 126(4):045103
- [4] Yang TY, Zaman MH (2010). 'Estimation of Cellular Adhesion Forces Using Mean Field Theory'. *Cellular and Molecular Bioengineering* 3(2): 190_194
- [5] Pelham RJ, Wang YL (1997). 'Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(25):13661_13665
- [6] Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL (2000). 'Cell movement is guided by the rigidity of the substrate'. *Biophysical Journal* 79(1):144_152
- [7] Engler A, Bacakova L, Newman C, Hategan A, Griffin M, Discher D (2004). 'Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses'. *Biophysical Journal* 86(1):617_628
- [8] Baker EL, Bonnecaze RT, Zamao MH (2009). 'Extracellular Matrix Stiffness and Architecture Govern Intracellular Rheology in Cancer'. *Biophysical Journal* 97(4):1013_1021
- [9] Sanz-Herrera JA, Moreo P, Garcia-Aznar JM, Doblare M (2009). 'On the effect of substrate curvature on cell mechanics.'. *Biomaterials* 30(34):6674_86
- [10] Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM (2001). 'Taking cell-matrix adhesions to the third dimension'. *Science* 294(5547):1708_1712
- [11] I. B. Bischofs, U. S. Schwarz (2003). 'Cell organization in soft media due to active mechanosensing'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(16):9274_9279
- [12] U. S. Schwarz, I. B. Bischofs (2005). 'Physical determinants of cell organization in soft media'. *Medical Engineering & Physics* 27(9):763_772
- [13] Zaman MH, Kamm RD, Matsudaira P, Lauffenburger DA (2005). 'Computational model for cell migration in three-dimensional matrices'. *Biophysical Journal* 89(2):1389_1397
- [14] Vickerman V, Blundo J, Chung S, Kamm RD (2008). 'Design, fabrication and implementation of a novel multi-parameter control microfluidic platform for three-dimensional cell culture and real-time imaging'. *Lab On A Chip* 8(9):1468_1477
- [15] Chung S, Sudo R, Vickerman V, Zervantonakis IK, Kamm RD (2010). 'Microfluidic Platforms for Studies of Angiogenesis, Cell Migration, and Cell-Cell Interactions'. *Annals of Biomedical Engineering* 38(3): 1164_1177
- [16] Moreo P, Garcia-Aznar JM, Doblare M (2008). 'Modeling mechanosensing and its effect on the migration and proliferation of adherent cells'. *Acta Biomaterialia* 4(3):613_621