



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Título del trabajo:

SIMULACIÓN Y ANÁLISIS 3D POR ELEMENTOS FINITOS DE LA MECÁNICA CELULAR EN AMBIENTES CONFINADOS

3D finite element analysis of migration under conditions of
mechanical confinement

Autor

Silvia Hervás Raluy

Directores

José Manuel García Aznar

María José Gómez Benito

ESCUELA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

CURSO 2016/2017

RESUMEN

La migración en ambientes confinados es un aspecto fundamental en el comportamiento de la célula y es imprescindible para el desarrollo de procesos tales como la regeneración de tejidos, la inflamación o el cáncer. Numerosos grupos de investigación se han centrado en experimentar *in vivo* o *in vitro* casos de migración en dos dimensiones por ser más sencillos y accesibles, y sólo unos pocos han investigado en tres dimensiones. No obstante, el conocimiento que se tiene de estos procesos todavía es muy pobre: los modelos bidimensionales no justifican el comportamiento que aparece en la migración tridimensional.

El objetivo de este proyecto es desarrollar un modelo computacional de migración en tres dimensiones, basado en un análisis por elementos finitos, que refleje el comportamiento celular en el proceso de migración confinada.

Para ello, se han ido realizando sucesivos modelos y simulaciones hasta conseguir reflejar el comportamiento de la célula en migración confinada. Posteriormente, se han modificado diversos parámetros en busca de entender mejor este proceso.

La deformación observada en la célula durante la migración confinada es similar a una expansión térmica. Por ello, se utilizan las ecuaciones que rigen este comportamiento para simular el avance y deformación de la célula en estos ambientes. Sin embargo, la deformación real sólo se consigue considerando una distribución de temperaturas heterogénea que se corresponde con la distribución de actina y miosina dentro de la célula en movimiento.

El resultado obtenido es un modelo en el cual las fuerzas generadas por la expansión de la actina en el frente y por la contracción de la miosina en la parte posterior provocan el desplazamiento de la célula en la coordenada longitudinal.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España [DP2 2015-64221-C2-1-R]. Es un proyecto parcialmente financiado por fondos FEDER.



ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS | 3 |
| Antecedentes | 4 |
| 2. MECÁNICA CELULAR..... | 6 |
| Migración celular..... | 7 |
| 3. ESTADO DEL ARTE | 12 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 16 |
| 1. Geometría y malla..... | 16 |
| 2. Comportamiento y materiales..... | 18 |
| 3. Condiciones de contorno y cargas..... | 19 |
| 4. RESULTADOS | 22 |
| Influencia de la fricción..... | 24 |
| Influencia de la distribución de actina | 25 |
| Influencia de la distribución de miosina..... | 27 |
| Ausencia de miosina | 28 |
| Migración de los leucocitos: influencia de la miosina en las distintas etapas..... | 29 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 30 |
| 6. LÍNEAS FUTURAS | 31 |
| 7. REFERENCIAS | 32 |

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La mecánica celular es un área altamente interdisciplinar que ha hecho importantes progresos en la última década [1]. Alteraciones de la mecánica celular se observan en distintas patologías: por ejemplo, la malaria produce una rigidización de las células [2, 3]. Durante los procesos patológicos, las estructuras de las células se someten a cambios en su composición y organización. Esto se manifiesta en cambios en las propiedades mecánicas como en el tamaño o la forma, deformación y adhesión celular. En las células cancerosas, estas deformaciones les confieren la habilidad de invadir y migrar durante la metástasis, siendo mucho más flexibles las células con capacidad de producir metástasis [1, 3]. Otro ejemplo de proceso celular fuertemente ligado con las propiedades mecánicas es la migración leucocitaria, donde los leucocitos salen del torrente sanguíneo para realizar sus funciones orgánicas [4].

La metástasis se define como la capacidad que desarrollan las células cancerosas para abandonar el tumor primario, viajar a través del torrente sanguíneo a otra ubicación, y formar un tumor secundario (Figura 1) [5]. Este proceso de atravesar el vaso sanguíneo (intravasación en el caso de entrada y extravasación en el caso de salida) es fundamental para que se produzca la invasión de otro órgano y la metástasis [6, 7]. La principal razón de las muertes por cáncer es debida a tumores secundarios: la metástasis representa más del 90% de las muertes por cáncer [8, 9]. Por ello, si se logran entender los mecanismos involucrados en ello, se dará un paso importante en el diseño de nuevos tratamientos. Al atravesar el torrente sanguíneo, las células cancerosas experimentan grandes cambios de forma: se deforman para adecuarse al paso estrecho que deben de atravesar [5]. Este confinamiento lo sufren también al invadir un órgano secundario para producir otro tumor.

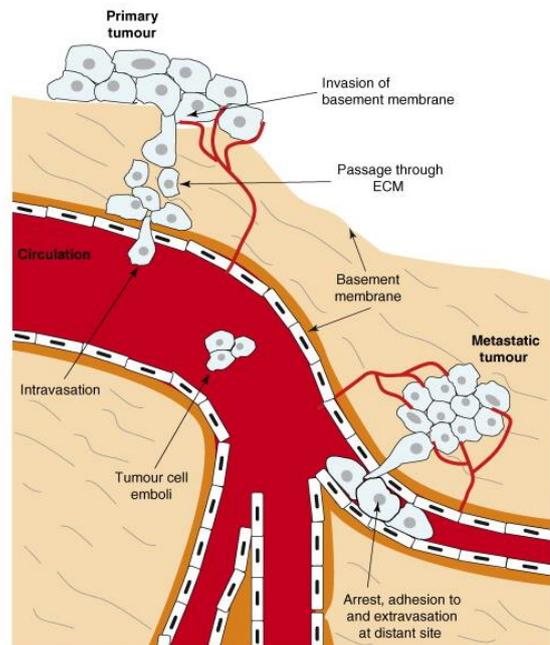


Figura 1. Metástasis: el diagrama esquematiza los diferentes pasos donde la célula cancerosa abandona el tumor primario para invadir un órgano diferente del cuerpo [3]

En el caso de la inflamación de tejidos, el sistema responde enviando leucocitos desde la corriente sanguínea hasta el tejido dañado para ejercer su función efectora [4]. En este proceso de migración

(Figura 2), los leucocitos atraviesan el torrente sanguíneo (extravasación) y sufren grandes deformaciones para atravesar este paso confinado [10].

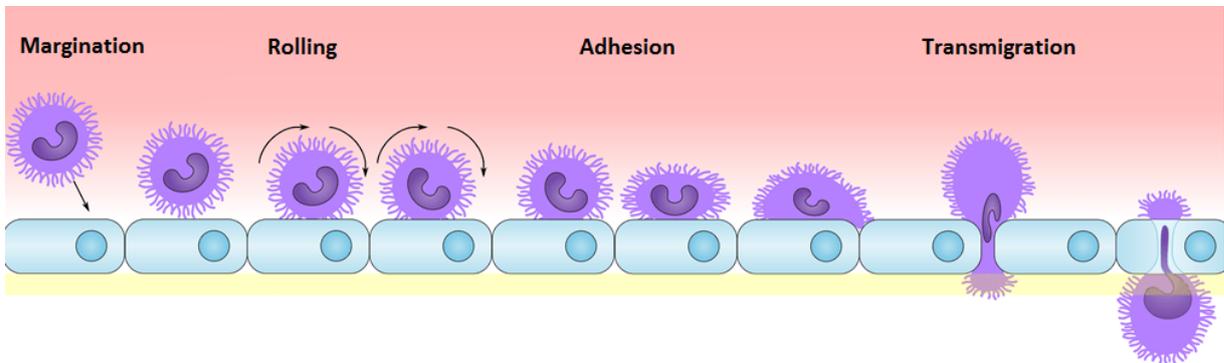


Figura 2. Trans migración leucocitaria: proceso de extravasación del leucocito [11].

Antecedentes

El ambiente confinado que experimentan las células durante su migración ha sido investigado por muchos grupos de investigación [12] en dos dimensiones (2D), ya que son experimentos más sencillos y que proporcionan visibles resultados. Sin embargo, dado que el confinamiento se da en tres dimensiones (3D), nuevos estudios han aparecido y están poniendo en cuestión lo obtenido en dos dimensiones, modificando así estos modelos iniciales [13].

El objetivo de este trabajo es conocer el nivel de deformación que experimentan las células durante el proceso de extravasación. Por ello, este trabajo se centra en entender la mecánica de la célula en los pasos confinados que atraviesan en sus procesos de migración a través de un modelo computacional.

Para ello se utilizarán nuevos resultados experimentales obtenidos con tecnologías novedosas muy apropiadas para estos análisis. Entre ellos destaca la microfluídica, que permite recrear el ambiente

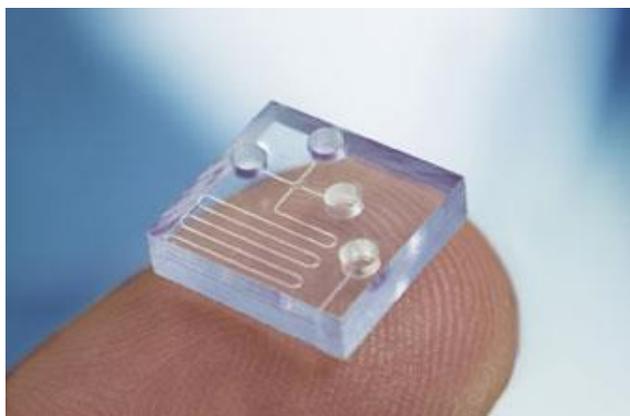


Figura 3. Dispositivo de microfluídica [14].

tridimensional en el que se encuentra la célula en un ambiente fisiológico y migrar a velocidades similares a las observadas en experimentos *in vivo* [15]. Un ejemplo de dispositivo se observa en la Figura 3.

La importancia de este trabajo radica en que el conocimiento del movimiento de las células en ambientes confinados tridimensionales es reducido, habiéndose estudiado en distintos grupos [16, 17] mediante células *in vitro*, sin embargo ningún grupo de investigación, por lo que nosotros sabemos, lo ha llevado al ámbito computacional. Por ello, el objetivo es generar un modelo capaz de reflejar todos los resultados obtenidos en los experimentos, y que a su vez permita obtener resultados de distintos tipos de células y en distintos ambientes.

2. MECÁNICA CELULAR

Desde un punto de vista físico, la célula es un sistema microscópico capaz de moverse autónomamente. Identificar los mecanismos básicos que inducen este movimiento es un gran reto: hasta ahora, los procesos celulares eran estudiados desde el punto de vista biológico. No obstante, en estos últimos años surgen problemas que han de ser abordados desde el punto de vista mecánico, como es el caso que se estudia en este trabajo fin de grado.

Para poder entender el movimiento celular es preciso conocer primero las propiedades y estructuras de la célula [18, 19, 20]. Éstas se desarrollarán en los siguientes apartados.

La mayoría de las células tienen un tamaño de 1 a 100 micras y están formadas por numerosos constituyentes [21]. Los tres elementos básicos son citoplasma, núcleo y membrana (Figura 4) [22].

- La membrana es la capa que envuelve a la célula y la protege del medio. Su elevada rigidez a axil hace que mantenga la forma de la célula. Sin embargo, su rigidez a flexión es despreciable [23].
- El citoplasma es una sustancia semilíquida, con un módulo elástico cuatro órdenes de magnitud inferior a la membrana [23]. La estructura se la confiere el citoesqueleto, que está formado por unos microtúbulos que contienen proteínas como la actina y la miosina que lo unen a la membrana [24].
- El núcleo contiene el material genético y es más rígido que el citoplasma.

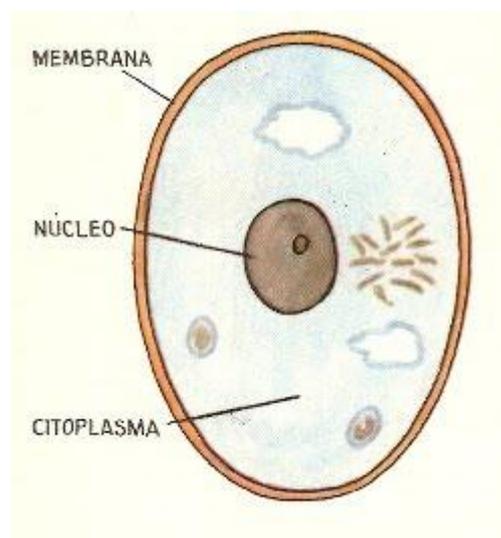


Figura 4. Partes de la célula [25]

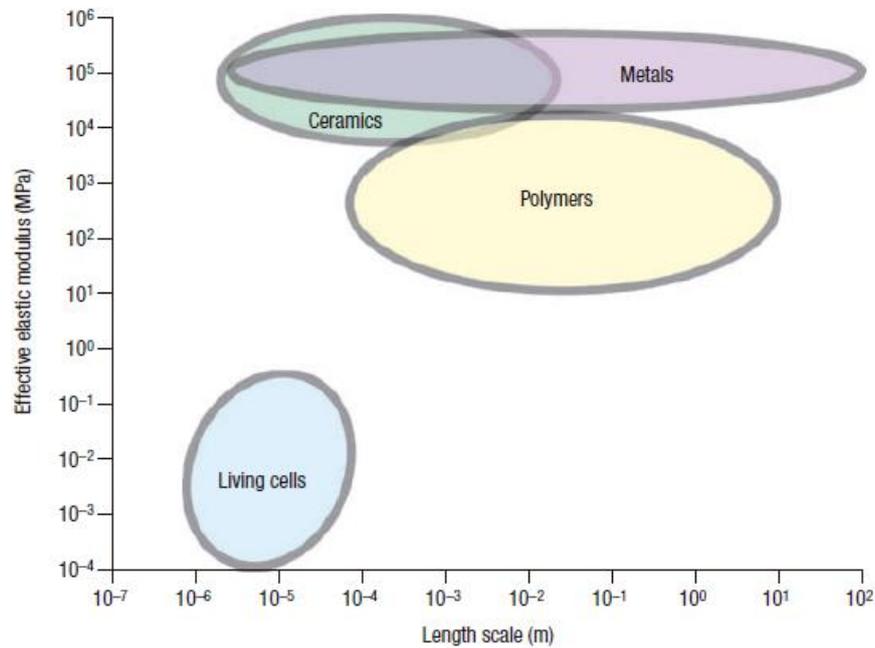


Figura 5. Comparación entre el rango aproximado del módulo elástico de las células biológicas y de distintos materiales: metales, cerámicas y polímeros [21].

El módulo elástico no es homogéneo, sino que varía según la zona de la célula, ya que su estructura es heterogénea. Sin embargo, es inferior a la mayoría de materiales con los que estamos familiarizados (Figura 5) [21].

El citoesqueleto es una matriz fibrosa de proteínas que se extiende por el citoplasma entre el núcleo y la membrana celular. Se encarga de la estabilidad y la forma celular, del movimiento y de la división entre otras funciones. [26].

Los componentes del citoesqueleto se pueden dividir en microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. Los microfilamentos están formados por la proteína actina [27]. La actina es la proteína más abundante en la mayoría de las células eucariotas. Se encuentra presente en dos formas: la actina G, que se trata de actina sin polimerizar, y la actina F, que es la que ya ha polimerizado.

Migración celular

La migración celular tiene que cumplir dos requerimientos básicos: la generación de fuerza, y con ello la correspondiente fuente de energía, y un balance de momentos con el medio, que depende del contacto establecido: fricción o adhesión entre otros [28].

La primera condición implica mecanismos de conversión de energía química en mecánica. El primer mecanismo es que la polimerización de la actina genera fuerzas sobre la membrana, dando lugar a protrusiones [29, 30]. El segundo mecanismo es la generación de fuerza desde los motores moleculares, como es la miosina, que pueden ejercer fuerzas de contracción en los filamentos del citoesqueleto.

El proceso de polimerización parte de la actina G, el monómero, que se va uniendo a otros monómeros hasta componer el polímero. Es necesaria una alta concentración de actina para que se dé el mecanismo de polimerización [31]. Esta polimerización va a desprender energía química, y será una proteína motora la encargada de transformarla en energía mecánica. Esta proteína motora es la miosina [32]. Dicha energía mecánica se traduce en fuerzas que empujarán a la membrana celular forzando el avance de la célula (Figura 6) [23, 31].

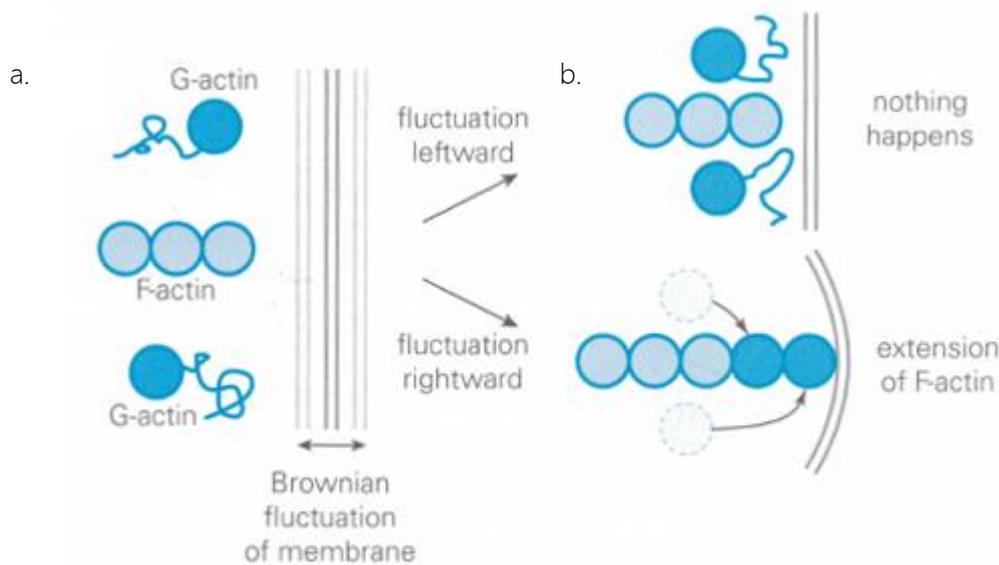


Figura 6. Esquema de la polimerización. (a) La G actina es el monómero individual y la F actina es el polímero ya formado. (b) Al polimerizar, las cadenas de actina se hacen más largas y empujan a la membrana formando protrusiones [23].

Estas fuerzas sobre la membrana provocan un flujo que provoca el movimiento de la membrana: el frente al ser empujado por la actina provoca que la membrana se desplace hacia atrás, influido también por la fuerza de contracción que hace la miosina [33].

La migración en tres dimensiones no puede ocurrir si la actina no forma en el frente estas protrusiones y a la par la miosina no genera contracción [13]. La importancia del conjunto polimerización y contracción todavía no se entiende por completo: hay modelos que sugieren que el incremento de actina conlleva un decremento de miosina [34], o que la combinación de ambos mecanismos puede dar lugar a distintos modos de movimiento [28]. Lo que parece claro es que existe una coordinación entre ambos fenómenos de modo que se induce la migración celular.

La actina se encuentra en la parte frontal de la célula y el avance producido en la migración se debe a la polimerización de la misma. La miosina se sitúa en la parte posterior y ejerce fuerzas de contracción que hacen que la cola de la célula se contraiga, empujando así a la célula a avanzar (Figura 7). A pesar de que la miosina se ubique principalmente en la parte posterior, las protrusiones de la membrana en el frente son también debidas a su actividad [35, 36].

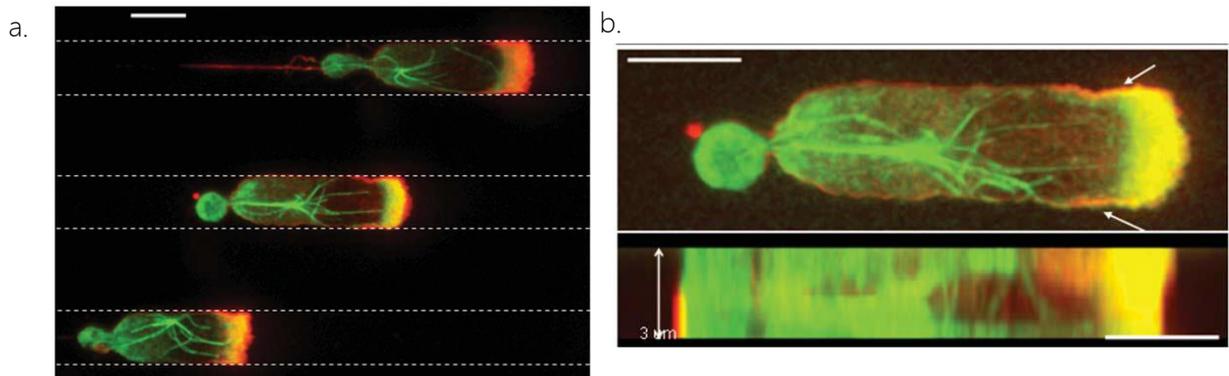


Figura 7. Migración celular: distribución del citoesqueleto, la actina y la miosina, (a) Localización de la actina y la miosina en célula migrando. La actina (en naranja) predomina en el frente, pero también está presente como una fina corteza en la cola. En verde, los microtúbulos del citoesqueleto. Escala = 10 μm (b) Vista en planta y perfil de una célula migrando. La actina (en naranja) está situada en el frente pero también en la corteza en contacto con la pared del canal. La célula está en contacto con el canal tanto en las paredes laterales como la superior y la inferior: está confinada. Escala = 6 μm [37].

Todas las fases de la migración conllevan interacciones entre el citoesqueleto y el núcleo, dando lugar a deformaciones del núcleo o a cambios de posición. Dependiendo del tipo de célula, el núcleo se mueve hacia el frente en un primer momento o hacia la cola de la célula. Este diferente comportamiento en distintas células todavía no está claro. Mecánicamente, el movimiento del núcleo se debe a la contracción ejercida por la miosina, mientras el frente está anclado. Por ello, la inhibición de la miosina lleva a defectos en la contracción de la cola y en el movimiento hacia el frente del núcleo [18]. Tras este primer paso, el núcleo avanza a la misma velocidad que la célula.

Uno de los cambios que se deben a la deformación se da en el citoesqueleto, caracterizado por la orientación de sus componentes a lo largo del eje de migración (Figura 8). El confinamiento a través de canales estrechos causa la acumulación de la actina en la corteza celular, y la orientación de la miosina a lo largo de dicho eje [38, 39].

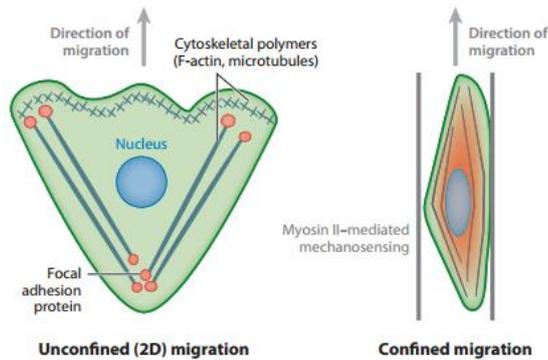


Figura 8. Vista esquemática de la morfología de la célula en confinamiento bidimensional versus tridimensional. Las células migrando en el confinamiento tridimensional alinean el citoesqueleto con la dirección del movimiento [38].

Además, es muy importante la condición que enlaza la célula con el medio. En la migración en dos dimensiones, la célula forma adhesiones, sin embargo, en el movimiento confinado, la manera de interactuar con el medio es la fricción (Figura 9) [40]. La célula aumenta significativamente la presión contra el canal, induciendo una alta fricción y dando lugar al movimiento [41]. Esta presión es generada también por la polimerización de la actina [42]. Además, algunos estudios revelan que la velocidad de la célula está estrechamente relacionada con la fricción [43, 44].

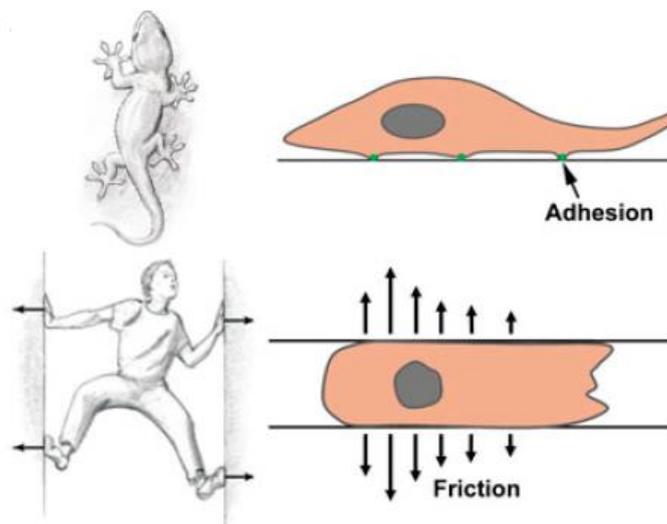


Figura 9. Analogía entre las fuerzas requeridas en confinamiento bi y tridimensional. El confinamiento en dos dimensiones requiere adhesión al sustrato, mientras que, en tres dimensiones, puede ser compensado con fuerzas ejercidas por la célula hacia el sustrato [28].

Cuando una célula migra a través de un canal confinado, adopta una forma alargada, que tiene una parte delantera corta, una parte final que se contrae y en el centro se sitúa el núcleo celular. Además, la membrana está en contacto con las paredes del canal para asegurar la fricción.

En función del medio en el que la célula migre, sufrirá más deformaciones o menos [12]. En los ambientes confinados, la célula sufre grandes deformaciones para adaptarse al medio (Figura 10).

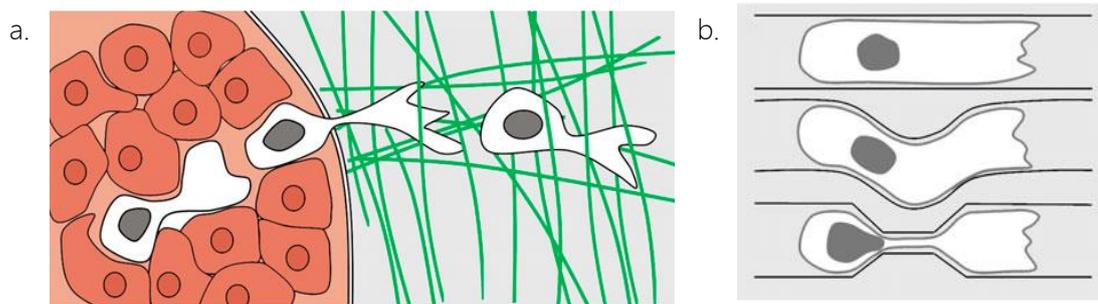


Figura 10. Analogía *in vivo* vs *in vitro*. (a) Durante su vida, la célula tiene que migrar por muchos ambientes confinados. (b) Dispositivos de microfluídica que reproducen las condiciones de migración confinada [28].

3. ESTADO DEL ARTE

Existen bastantes trabajos experimentales en este campo de investigación, aquí se presentan aquellos que se consideran representativos y definen mejor el proceso de migración celular que se va a estudiar.

En el trabajo de Wilson et. al. (2013) [16] se realiza un experimento en el cual la célula se introduce en un dispositivo de microfluídica para analizar su movimiento en un medio confinado. La célula se introduce en un canal cuadrado y se estudia su movimiento en dicho canal (Figura 11).

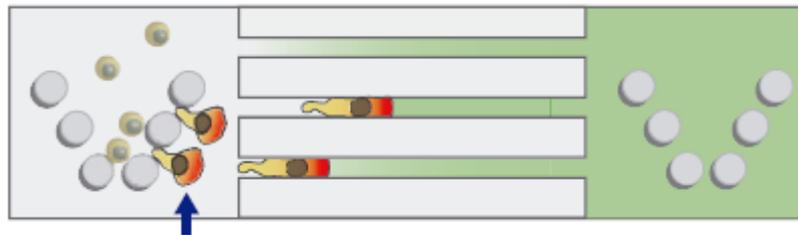


Figura 11. Esquema representativo de la célula migrando en el canal confinado [16].

Vistas de la célula mientras recorre el canal se muestran en las Figura 12 y 13. En ella se puede apreciar la forma rectangular que ha adoptado la célula para adaptarse al canal. La miosina está actuando en la parte posterior, formando una cola que ayuda al avance celular. En la parte delantera, en color más claro, está la actina.

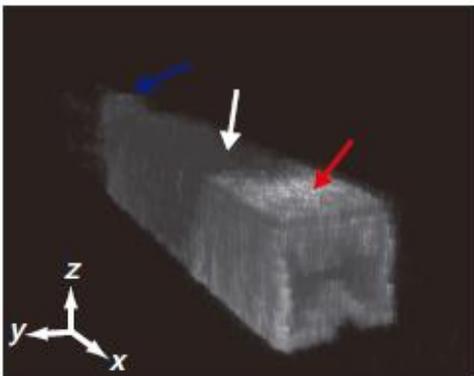


Figura 12. Vista en perspectiva. Se observa la miosina señalada por la flecha azul. La flecha blanca señala la posición del núcleo y la flecha roja indica la capa de actina que empuja la membrana [16].

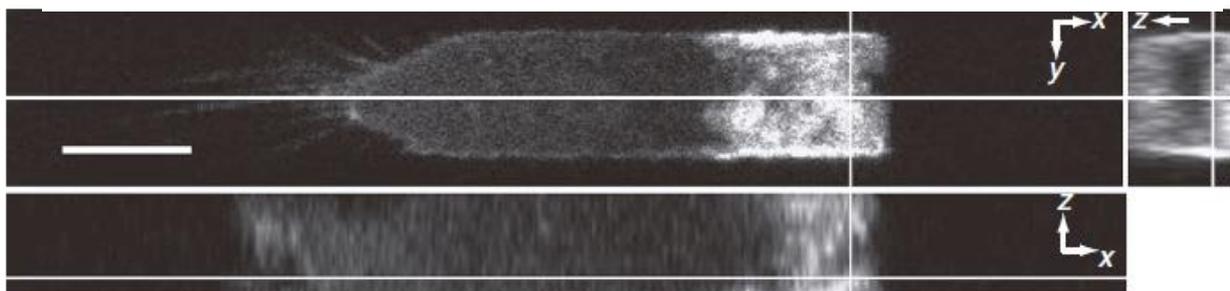


Figura 13. Diferentes vistas de la célula donde se aprecia el confinamiento en las tres dimensiones. Escala = 6 μm [16].

Este experimento [16] demuestra la existencia de dos capas de actina, la actina adherida y la actina libre (Figura 14). La actina libre se sitúa en el frente de la célula y dará lugar a protrusiones; la actina adherida se sitúa en la interfaz entre la célula y el canal. La actina adherida polimeriza en dirección perpendicular a la membrana y empuja a ésta hacia la pared, asegurando el contacto con el canal.

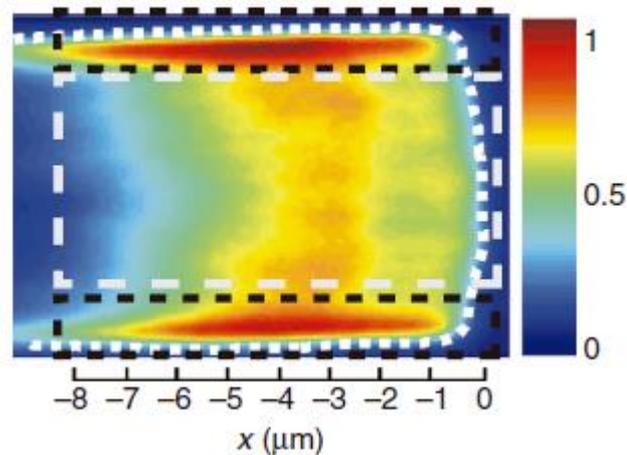


Figura 14. Distribución de la actina en el frente, vista de un corte en la mitad del canal. Se distinguen dos regiones: el área incluida en el rectángulo gris, en el centro, representa la actina adherida, mientras que el área incluida en los rectángulos negros representa la actina adherida [16].

La densidad de actina adherida es constante en todo el frente, así como el espesor de esta capa que forma. El objetivo de esta actina es mantener el contacto con la pared del canal. Las fuerzas que ejerce son perpendiculares a la membrana, y esto implica la compresión de la actina libre, obligándola a avanzar hacia delante y a formar nuevas polimerizaciones (Figura 15).

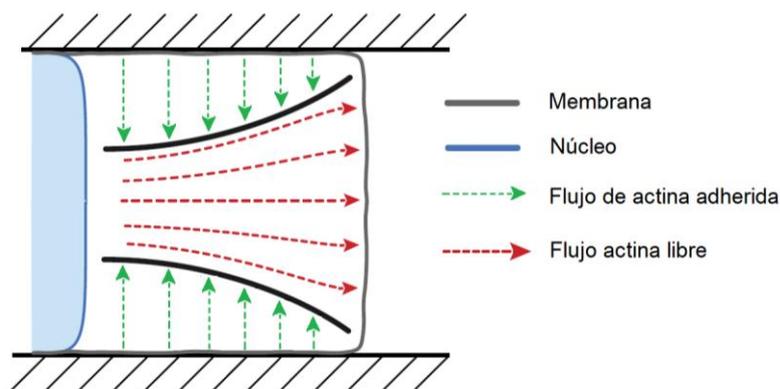


Figura 15. Esquema de los flujos de actina. Imagen modificada de [16].

Además, el experimento afirma que la densidad de actina libre no es constante [16, 45], teniendo un pico en el frente de la célula y luego descendiendo conforme se acerca al núcleo (Figura 16). Se confirma lo mostrado por otros experimentos [46] de que existe una fuerte polimerización en el ancho de 1 micra a partir del frente, y conforme se avanza hacia el núcleo aparece el fenómeno de despolimerización.

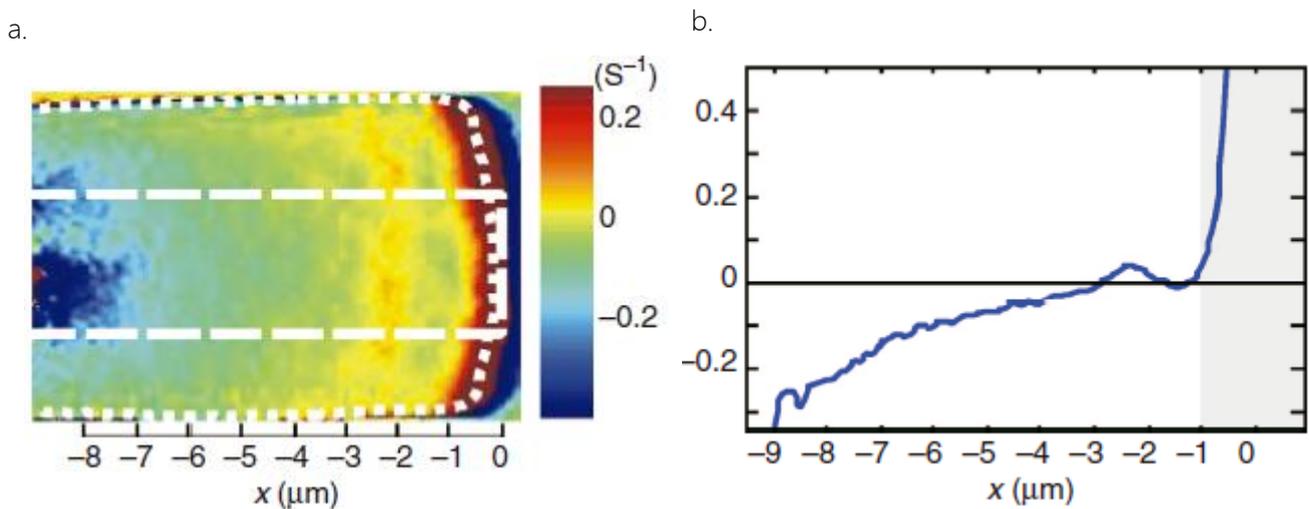


Figura 16. (a) Evolución de la densidad de actina en el frente. Los colores más cálidos representan una rápida variación de la densidad de actina, que va decreciendo conforme se acerca al núcleo (colores fríos). (b) Curva de evolución de la densidad de actina. La región sombreada en gris representa zonas muy próximas a la membrana [16].

Otro grupo de investigadores, Chabaud et. al. [47], analizan el comportamiento de los leucocitos en el proceso de extravasación. Para ello, utilizan un dispositivo de microfluídica en el cual se introducen células individuales para el análisis de un modo similar al experimento explicado anteriormente (Figura 17).

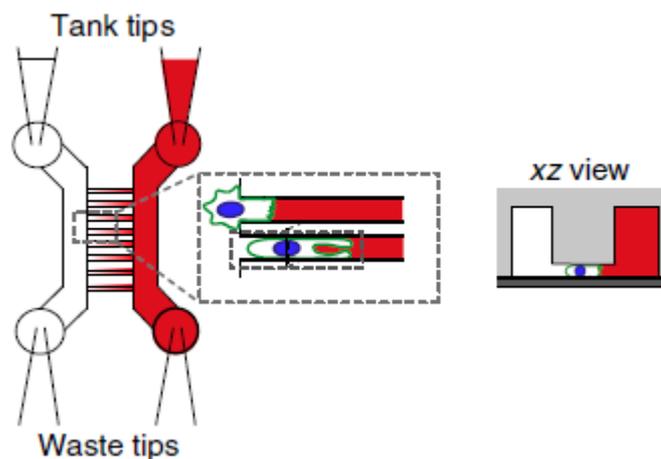


Figura 17. Dispositivo de microfluídica usado en el experimento [47].

Este experimento [47] analiza la situación de la miosina en la célula durante el proceso de migración celular. La función de los leucocitos es migrar hasta la zona infectada, donde se detienen para realizar su función orgánica, y después continúan migrando. Esta habilidad para detenerse se consigue a través del balance de actina-miosina y con un aumento de la adhesión [48]. En este paso, la miosina avanza hasta la parte delantera para frenar el movimiento, y vuelve a la parte posterior en el momento en el que la migración debe continuar.

En la Figura 18 se puede observar que la densidad de miosina no es constante a lo largo de la célula: en el frente no aparece miosina, mientras que en la parte posterior está distribuida según la dirección longitudinal. Se aprecia la etapa en la que la velocidad es nula, y como la densidad de miosina en la parte delantera se ha equilibrado con la trasera.

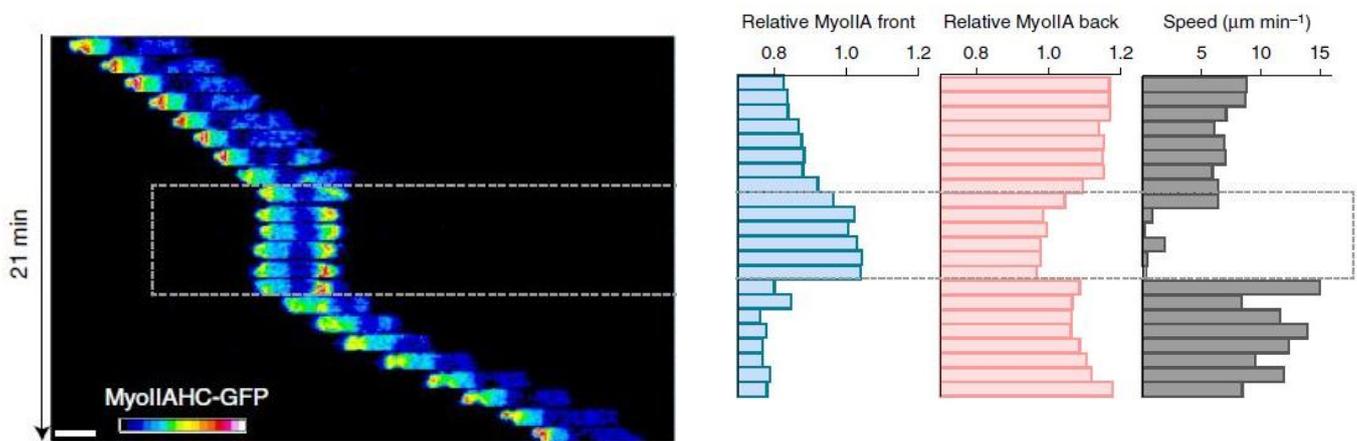


Figura 18. Secuencia de la miosina durante la migración y parada del leucocito. Los colores más cálidos indican mayor densidad de miosina. En la secuencia de parada, la densidad de miosina es prácticamente similar en la cola y en el frente. [47]

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El entorno a simular consta de una célula y un canal rígido que simulará el confinamiento de la célula en el proceso de extravasación. La gran diferencia del modelo con las simulaciones existentes en la literatura [42] es que en este caso la célula está confinada en tres dimensiones, es decir: su aspecto inicial se ve reducido hasta llenar el hueco que dispone. Por lo tanto, el canal simula las células endoteliales que atraviesa la célula durante su migración. La célula adoptará las dimensiones restringidas por el efecto del confinamiento.

Así, se simulará la migración celular en un ambiente confinado. El modelo seguirá un proceso en el cual la célula primeramente se deformará rellenando el canal rígido, asegurando el contacto, y después empezará el proceso de migración a través de las fuerzas ejercidas por la actina y la miosina.

1. Geometría y malla

Geometría

El modelo se va a componer de un canal cuadrado de gran longitud y una célula con forma de prisma confinada en su interior. El canal tendrá una sección de $12 \times 12 \mu\text{m}^2$.

En la célula, se diferencia el núcleo, en la parte central. Está envuelta por una capa de $0.05 \mu\text{m}$ de espesor que simula la membrana. Las medidas de la célula proceden de las imágenes captadas en el trabajo de Berget et. al, mostradas en la Figura 19 [43].

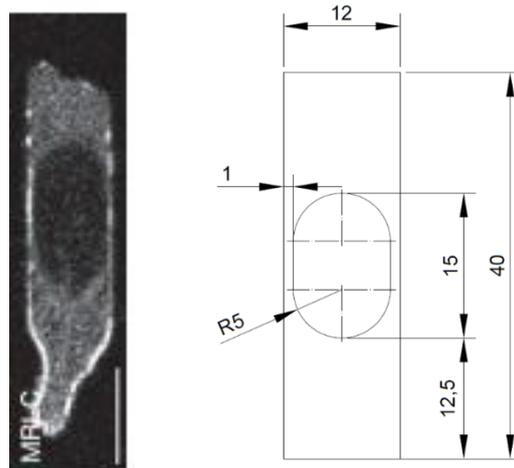


Figura 19. Comparativa entre la célula experimental y la célula modelada por elementos finitos. La célula es captada en el experimento [43] y el plano de la célula modelada está basado en las medidas (en μm) que se observan *in vitro*.

El modelo adoptará como configuración inicial aquella en la que la célula se sitúe concéntrica en el canal. (Figura 20)

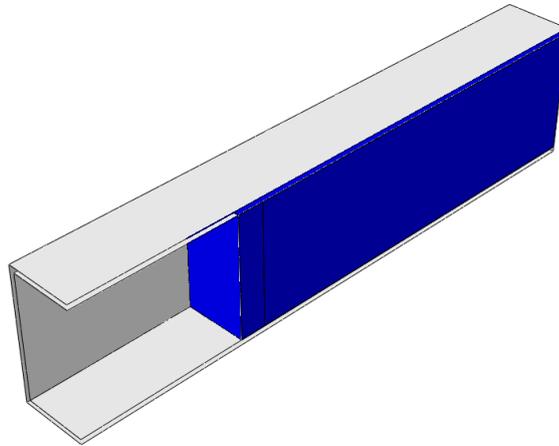


Figura 20. Corte del modelo a simular. En gris se observa el canal rígido y en azul la célula confinada.

Mallado

El modelo se hace inicialmente con una malla media-fina de tamaño $0.7 \mu\text{m}$ (Figura 21), y posteriormente se hace un estudio de sensibilidad de la malla. Los resultados con una malla más fina (tamaño de elemento entre $0.6 \mu\text{m}$ y $0.1 \mu\text{m}$ los más pequeños) (Figura 22) son muy similares a los de la malla previa. Debido al alto coste computacional que genera la malla fina, optaremos por realizar el modelo con el mallado inicial.

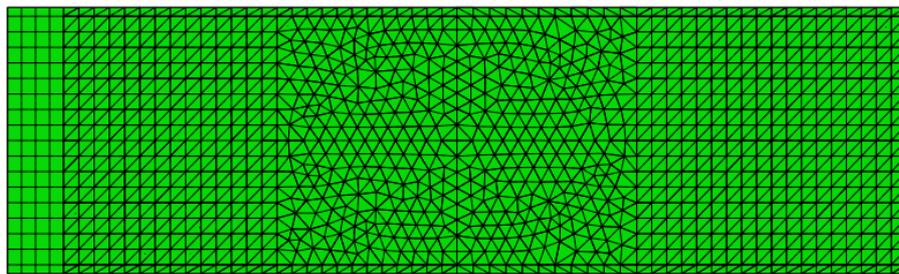


Figura 21. Modelo de malla media fina. Consta de 141316 elementos y 25685 nodos.

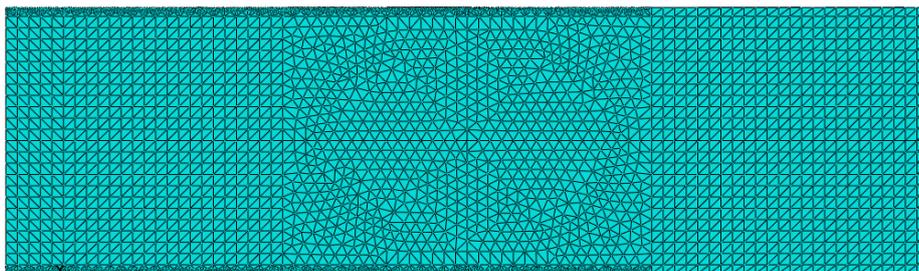


Figura 212. Modelo de malla fina. Consta de 1106142 elementos y 213161 nodos.

Tabla 1. Comparación de elementos de las mallas.

| Elementos | Malla fina | Malla media-fina |
|--|------------|------------------|
| Tetraedros lineales (C3D4) | 842650 | 130728 |
| Hexaedros lineales (C3D8) | 0 | 1296 |
| Elemento membrana triangular lineal (M3D3) | 263492 | 8680 |
| Elemento membrana cuadrilátero lineal (M3D4) | 0 | 612 |
| Total | 1106142 | 141316 |

La discretización elegida está formada por elementos tetraédricos en la mayor parte de la célula por ser los que mejor se adaptan a la geometría circular del núcleo. Sin embargo, el frente tiene elementos hexaédricos porque son los que mejor se adaptan a la deformación del frente originada por las protrusiones, es decir, por la fuerza que ejerce la actina debida a su polimerización. Los elementos de la membrana son tipo *membrana* porque representan la rigidez a axil que tiene la membrana y no admiten esfuerzos a flexión o cizalladura [23]. Todos los elementos de la malla son lineales, ya que generan menor coste computacional y el resultado con elementos cuadráticos es muy similar.

2. Comportamiento y materiales

Material

La célula se modelará como un material elástico lineal. Además, la membrana se simulará como una "skin", es decir, una capa de 50 nanómetros [49] de espesor con las propiedades ya indicadas.

Dentro de la célula, es necesario definir las distintas estructuras celulares, véase núcleo, citoplasma y membrana. Éstas se simularán a través de distintos materiales, todos ellos se consideran isotropos y elástico-lineales, cuyas propiedades definan su comportamiento. El módulo de Young y el coeficiente de Poisson bastan para definir el material en cada una de las tres zonas en las que se divide la célula (Tabla 2).

Tabla 2. Propiedades de los materiales [18, 19, 20]

| | Módulo elástico (KPa) | Coefficiente de Poisson |
|------------|-----------------------|-------------------------|
| Citoplasma | 0.8 | 0.38 |
| Núcleo | 8 | 0.38 |
| Membrana | 10 | 0.45 |

La zona que tiene actina libre, es decir, la mitad delantera de la célula, tiene un coeficiente de expansión ortótropo en la dirección longitudinal. Esto es debido a que la actina polimeriza principalmente en la dirección del movimiento y, por lo tanto, la expansión en el resto de direcciones no justificaría el movimiento celular.

El canal, como tiene una rigidez muy superior a la de la célula y, por tanto, no influye en el movimiento celular, se simulará como un sólido rígido.

3. Condiciones de contorno y cargas

Para asegurar el contacto, se crea un primer paso de carga en el que la célula, inicialmente más grande que el canal, se contraiga a través de una presión externa, soltándose luego para acomodarse al canal. De esta manera, la célula se sitúa inicialmente en el centro y se somete a una presión que incide perpendicular a la membrana. Así, la célula se deforma y reduce su tamaño. Ahora la célula se sitúa en medio del canal forzada por esta presión. Al eliminar esta fuerza, la célula se recupera elásticamente hasta llegar a las paredes del canal, consiguiendo así el contacto, que será clave en el movimiento y además el confinamiento de la célula.

Una vez asegurado el contacto, comienza la migración celular. En este paso, la actina va a polimerizar en el frente haciendo que éste avance, a la vez que la miosina generará fuerzas de contracción que harán que la cola se reduzca. Es importante que, tal y como se ha observado experimentalmente [16], mientras la célula avanza a través de estas fuerzas, el núcleo avance a la misma velocidad.

La migración se va a producir dependiendo de la distribución de actina y de miosina de la célula. Distinguiremos tres zonas: la actina libre, la actina adherida y la miosina.

El canal se fijará para que no se mueva en ningún momento del cálculo.

Contacto célula-canal

El contacto entre la célula y el canal asegurará el confinamiento. Se propone un contacto entre la membrana y la superficie interior del canal con un coeficiente de fricción de 0.5, aunque posteriormente se evaluará su influencia mediante el estudio de distintos coeficientes de fricción.

Polimerización de la actina

Dado el paralelismo en la deformación producida por la contracción de la célula y la expansión térmica, el fenómeno de polimerización y despolimerización de la actina se simula a través incrementos de temperaturas, de tal manera que la polimerización se modela como un incremento de temperatura y la despolimerización como un decremento.

Se van a introducir incrementos de temperatura, de tal manera que estos incrementos corresponderán a la variación de la densidad de actina.

La actina se introducirá como se ha explicado en dos zonas: la actina libre y la actina adherida.

La actina adherida se sitúa en la interfaz pared-célula con un espesor de media micra. Esta actina va a polimerizar, ejerciendo fuerza sobre la membrana en dirección perpendicular a la pared. Además, de esta manera se asegura el contacto de la célula con la pared. Este comportamiento se simula como un incremento de temperatura lo suficientemente alto como para mantener el contacto pero sin que llegue a ser tan alta como para deformar el núcleo, que es mucho más rígido que el citoplasma.

En el frente de la célula se localiza la actina libre, que polimeriza en la parte delantera y va despolimerizando a medida que se aproxima al núcleo. La variación neta de actina no es constante sino que tiene una distribución como la que se indica en la figura 22, con lo cual se va a simular la variación de actina en función de la coordenada longitudinal de la célula.

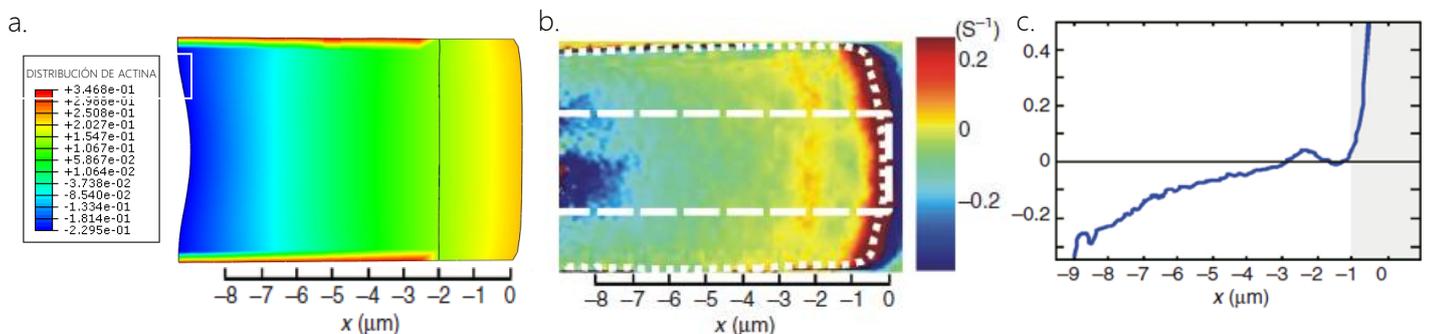


Figura 22. Comparación de la distribución de actina. (a) Modelo simulado. (b) Modelo experimental [16]. (c) Curva de distribución [16].

Contracción de la miosina

Además de la actuación de la actina, se consideran también otras fuerzas en la parte de atrás generadas por la miosina. La miosina es la responsable de la contracción celular y hace que la parte de atrás se contraiga, contribuyendo a la migración celular. Esta contracción se va a simular de nuevo como un decremento de temperatura.

Sabiendo que la miosina no se distribuye uniformemente en la parte posterior, se va a simular dependiente de la coordenada longitudinal.

Con todo esto, el mapa de variación de la miosina en la célula se muestra en la figura 23.

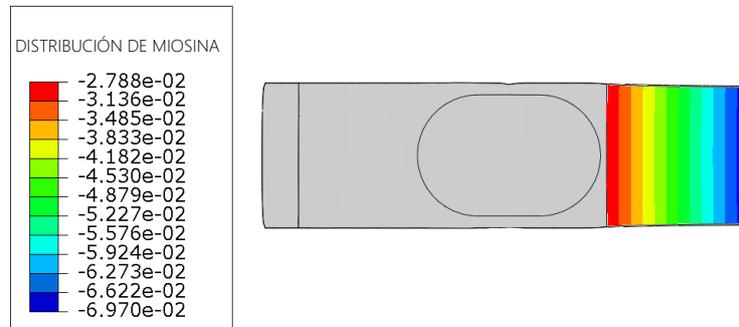


Figura 23. Distribución de miosina en la cola.

4. RESULTADOS

Se han realizado múltiples simulaciones y, entre los resultados obtenidos, el modelo que más se aproxima al movimiento celular en ambiente confinado es el que incluye una distribución variable de miosina en la cola y de actina en el frente, así como una capa de actina adherida a la membrana (Figura 24).

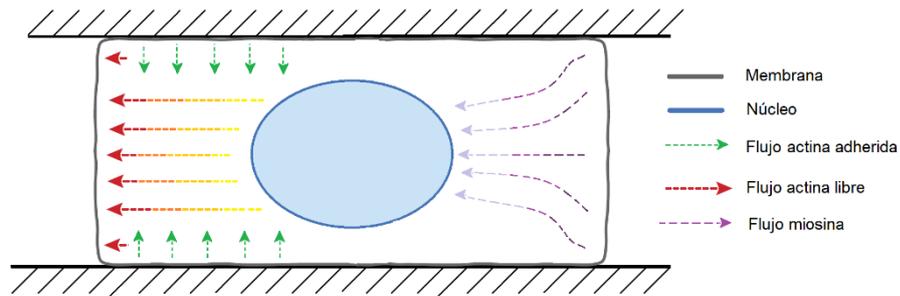


Figura 24. Dibujo esquemático de las proteínas y su distribución del modelo.

En él se observa (Figura 25) que el desplazamiento de la célula en la dirección longitudinal es igual en el frente que en el núcleo, es decir: el núcleo avanza a la misma velocidad que el frente. El desplazamiento máximo se consigue en la cola de la célula debida a la alta contracción de la miosina.

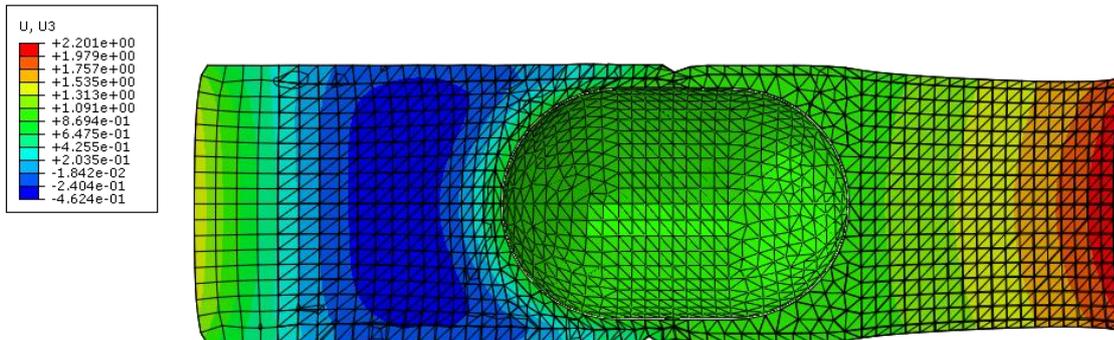


Figura 25. Desplazamiento en la dirección longitudinal (μm)

Dado que el núcleo celular es el que rige gran parte del comportamiento de la célula, se van a estudiar también las tensiones en él. De hecho, procesos celulares como la diferenciación, muerte y migración se encuentran relacionados con los estímulos mecánicos que siente la célula y más concreto el núcleo celular [19].

La tensión máxima principal se muestra en la Figura 26a. Se observa que la mitad delantera del núcleo está sometida siempre a compresión, mientras que la parte de atrás está sometida a tracción. Las tensiones son del orden de 0.1 KPa.

La tensión mínima principal (Figura 26b) es de compresión en todo el núcleo, lo que implica que la zona delantera está siempre trabajando a compresión mientras que la posterior tiene tensiones de los dos tipos. Es también del orden de 0.1 KPa.

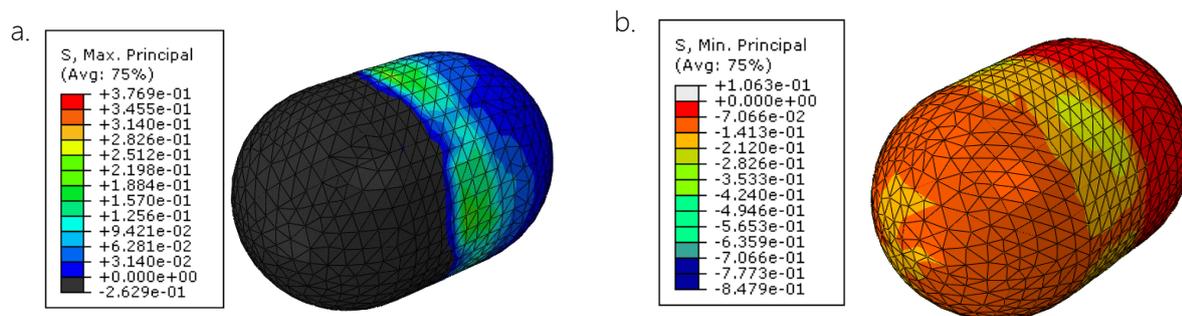


Figura 26. Tensiones principales en el núcleo (KPa). (a) Tensión máxima principal. (b) Tensión mínima principal.

A continuación se analizarán los distintos factores involucrados en el movimiento de la célula: el coeficiente de fricción del canal, la distribución de actina y miosina o la ausencia de las mismas.

Influencia de la fricción

Para evaluar la influencia de la fricción se simulan cuatro modelos con distintos coeficientes de fricción: 0.6, 0.25, 0.1, 0.01; además del modelo de referencia con un coeficiente de fricción de 0.5.

Se comparan los desplazamientos del mismo nodo del frente en el mismo instante de tiempo en los cinco modelos, el resultado se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Desplazamientos en función de la fricción del canal

| Coeficiente de fricción del canal | Desplazamiento en la dirección longitudinal (μm) |
|-----------------------------------|---|
| 0.6 | 0.699 |
| 0.5 | 0.699 |
| 0.25 | 0.703 |
| 0.1 | 0.731 |
| 0.01 | 0.841 |

Como se puede observar, cuanto menor es el coeficiente de fricción es decir, cuanto menos rugosa es la superficie, más se desplaza la célula. Con esto se concluye que la célula necesita un mínimo de fricción con el canal para que se produzca movimiento; sin embargo, conforme mayor es éste, menor es el desplazamiento.

Influencia de la distribución de actina

La distribución de actina en el frente es algo que está en proceso de estudio y análisis. Por ello, se hace una comparación para contrastar los resultados obtenidos experimentalmente, en los que la variación de actina no es constante, con un modelo de actina constante a lo largo del frente (Figura 27).

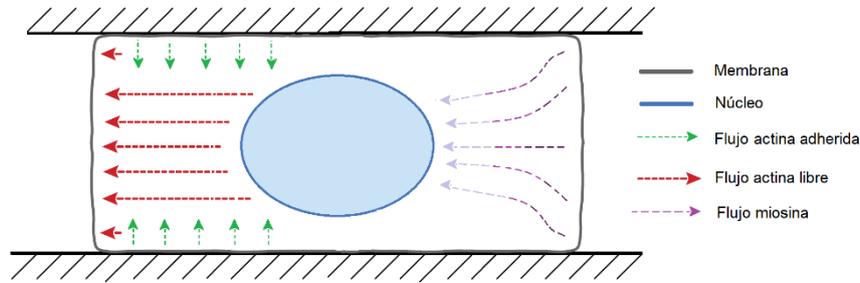


Figura 27. Dibujo esquemático de las proteínas y su distribución del modelo.

Los campos de variación de actina son los mostrados en la Figura 28. La figura muestra la célula deformada, y se puede apreciar una gran expansión en el frente en el caso de la distribución uniforme. Esto es debido a que la actina genera una gran fuerza de expansión, que obliga a la célula a avanzar.

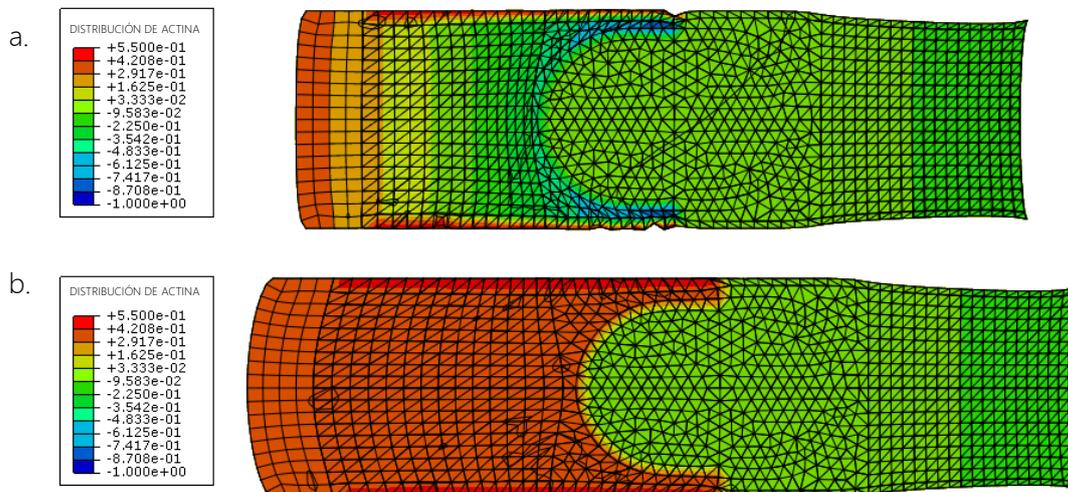


Figura 28. Distribución de actina. (a) Modelo con actina variable en función de la coordenada longitudinal. (b) Modelo con actina uniforme.

El modelo de actina uniforme supone que la actina polimeriza en toda la mitad posterior de la célula antes del núcleo. Sin embargo, el modelo de actina variable reproduce una densidad de actina que polimeriza en el frente, pero en las zonas cercanas al núcleo se produce la despolimerización.

El volumen de célula en el que se considera la distribución de actina uniforme es considerablemente mayor al volumen de célula que polimeriza en el modelo variable. Por ello, la deformación es mucho mayor, originando que la célula se alargue.

Tras analizar la distribución de actina, se estudia qué efecto genera en la migración celular. Los desplazamientos se muestran en la Figura 29. En ella, se aprecia que el frente avanza considerablemente más rápido ($4.5 \mu\text{m}$ en lugar de $1.5 \mu\text{m}$), sin embargo, el núcleo no avanza y la célula se va estirando debido a que la actina es incapaz de generar un movimiento general de la célula y la deformada no se corresponde con la obtenida en los experimentos.

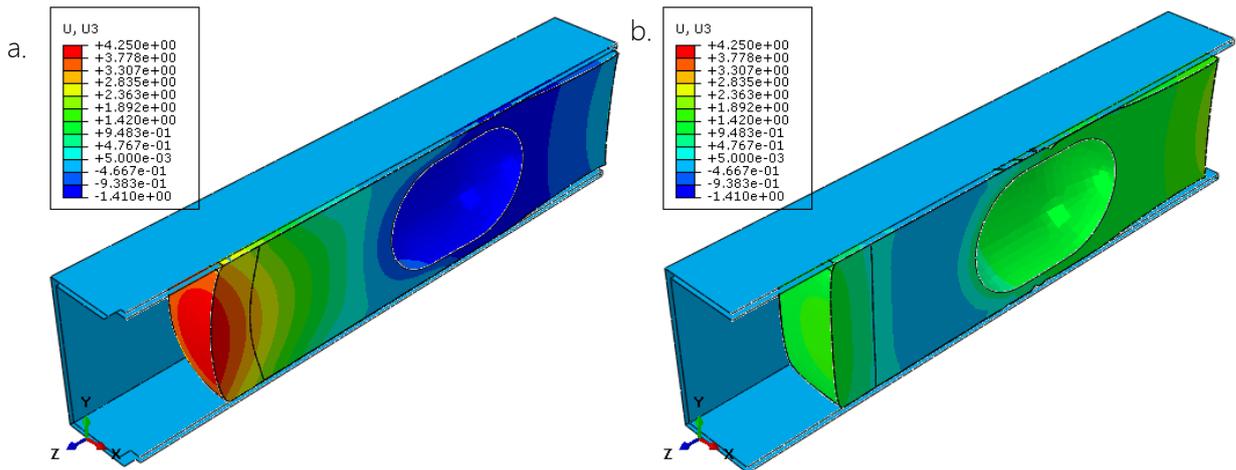


Figura 29. Desplazamiento en μm en la dirección longitudinal de la célula. (a) Modelo con actina constante. (b) Modelo con actina variable.

Analizando el movimiento del núcleo por separado (Figura 30) se observa que se desplaza hacia atrás en todo momento, arrastrado por la contracción de la miosina y debido a la incapacidad de la actina constante para arrastrarlo. Sin embargo, la despolimerización de la actina que se da cerca del núcleo en el modelo variable provoca que la zona próxima al núcleo se contraiga, arrastrando al núcleo a avanzar a la par que el frente.

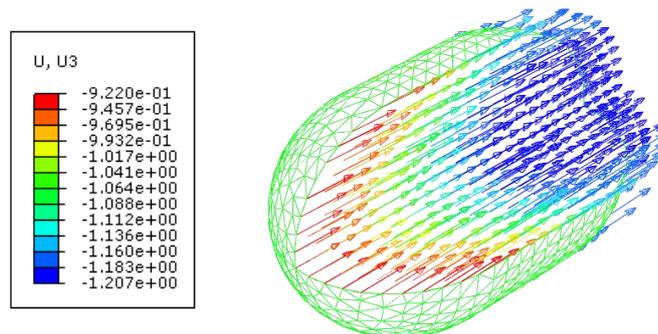


Figura 30. Corte del núcleo. Las flechas señalan la dirección y la magnitud del desplazamiento (μm)

La combinación entre volumen que polimeriza y volumen que despolimeriza es muy importante a la hora de que el núcleo se mueva a la par que el frente, y la célula mantenga su tamaño inicial.

Influencia de la distribución de miosina

Al igual que la actina, la miosina en el modelo final está distribuida de manera variable en función de la coordenada longitudinal. Inicialmente el modelo contenía una distribución de miosina constante en la parte final de la célula (Figura 31).

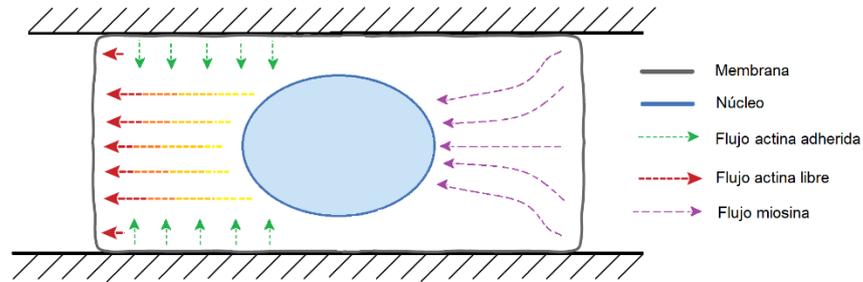


Figura 29. Dibujo esquemático de las proteínas y su distribución del modelo.

La distribución constante de la miosina genera contracción en un gran volumen de la célula, lo que lleva a generar una serie de tensiones que impiden que el núcleo se desplace a la par que el frente (Figura 32). La solución propuesta para este problema fue una distribución variable con la distancia al núcleo, tal y como muestran los resultados experimentales, de tal manera que próximo a él la contracción es leve, y se hace máxima en la cola. Así, el modelo avanza a la par que se forma la cola característica que se da en la migración confinada, y se consigue que el núcleo avance a la misma velocidad que el frente.

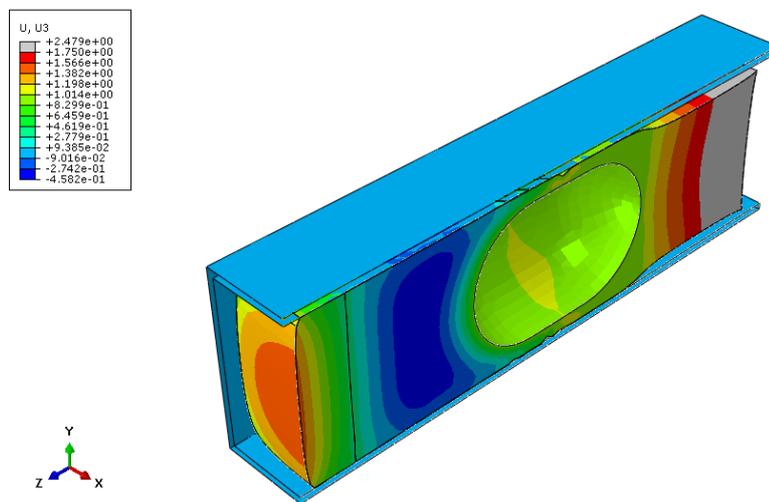


Figura 30. Desplazamiento en la dirección longitudinal del modelo (μm). Se observa que el núcleo avanza pero no tanto como el frente.

Ausencia de miosina

Cuando no se considera la miosina, el modelo sólo incluye la actividad de la actina: en el frente se da una actividad de polimerización y despolimerización. Se va a omitir la curva de comportamiento de la miosina para ver qué efecto tiene. Por ello, la distribución de proteínas se restringe a la curva de actina en el frente, como se muestra en las figuras 33 y 34.

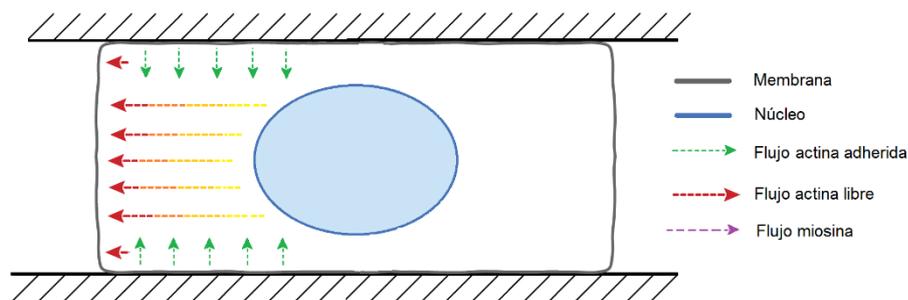


Figura 33. Dibujo esquemático de las proteínas y su distribución del modelo.

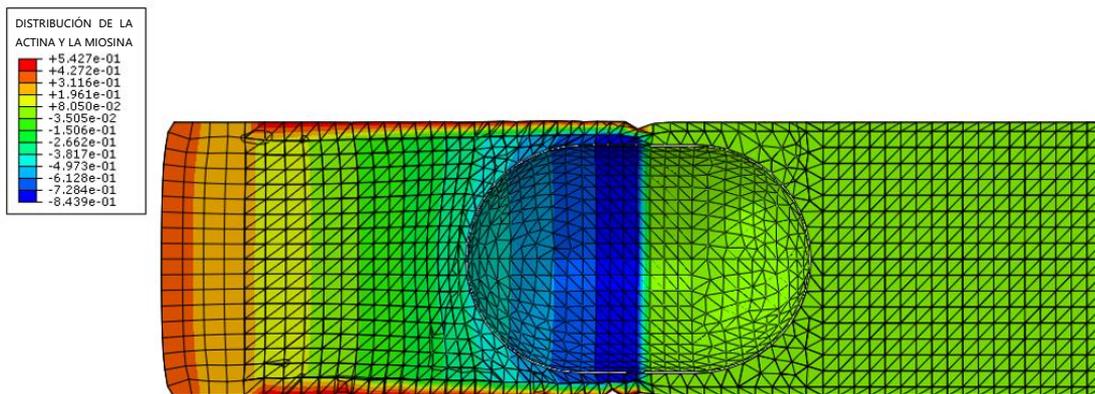


Figura 314. Distribución de la actina y la miosina. La actina sigue una distribución variable en el frente, pero en la cola no actúa miosina.

Los desplazamientos resultantes se observan en la Figura 35, y se aprecia que el frente sí que se mueve, pero el núcleo y la cola se mueven la mitad que el frente.

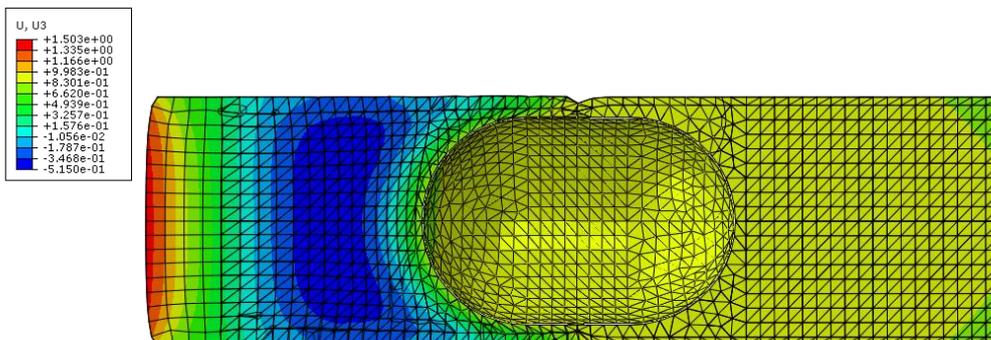


Figura 32. Desplazamiento en la dirección longitudinal (μm).

Migración de los leucocitos: influencia de la miosina en las distintas etapas

Como se ha explicado en el apartado 3, los leucocitos migran en tres etapas: una etapa de avance, una etapa de parada en la que realizan su función celular y una nueva etapa de avance. Esto está basado en la distribución de la miosina en la célula: en las etapas de avance la miosina se sitúa en la parte posterior generando contracción y en la etapa de parada la miosina se distribuye también por el frente (Figura 36).

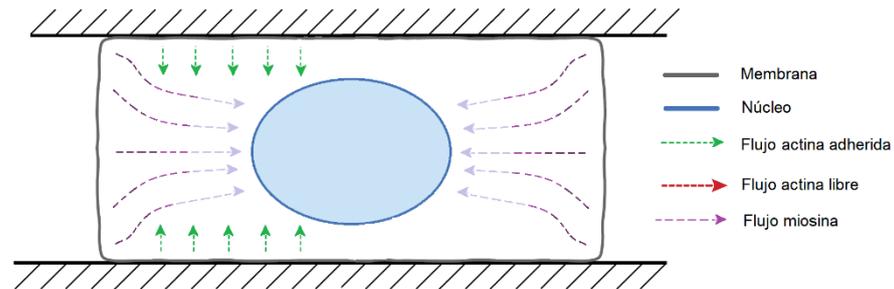


Figura 33. Dibujo esquemático de las proteínas y su distribución del modelo.

En esta simulación se introducen dos etapas posteriores a la migración, la de parada y una nueva de avance. La distribución de la miosina en la etapa de parada es simétrica respecto al eje central de la célula, mientras que la actina libre desaparece. La actina adherida se mantiene, y se aumenta para simular el incremento de adhesión que se produce en esta etapa.

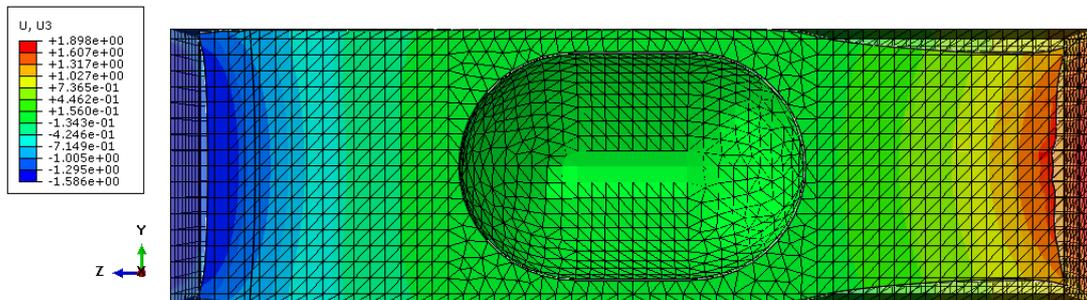


Figura 34. Vista de los desplazamientos en la dirección longitudinal en la deformada e indeformada (μm). Se observa en sombreado la indeformada, y con menos transparencia la configuración deformada. Los resultados muestran como la célula se contrae globalmente, mientras el núcleo tiene un desplazamiento nulo.

El movimiento generado (Figura 37) es muy próximo a cero, observándose que la célula se reduce y se mantiene con un tamaño menor que la configuración inicial. Además, el núcleo permanece inmóvil.

Esto a su vez confirma la teoría de que sin actina no se produce el movimiento y que ambas fuerzas actuando a la par son necesarias para que se produzca la migración.

5. CONCLUSIONES

Como se ha ido viendo, el movimiento celular es el resultado de un conjunto de fuerzas provocadas por mecanismos biológicos. Para que la migración se produzca, las fuerzas deben actuar todas ellas a la vez, existiendo una coordinación entre las fuerzas contráctiles de la miosina y las fuerzas debidas a la polimerización y despolimerización de la actina.

Se concluye que la actuación de la actina y la miosina han de ser simultáneas, ya que con ambas por separado no se observa el avance de la célula similar al de las observaciones experimentales. La importancia radica en el resultado obtenido al introducir fuerzas de contracción en la cola y de expansión en el frente. La fuerza de expansión arrastra el núcleo hacia delante, que consigue que la célula vaya creciendo por el frente. Para contrarrestar este crecimiento, ha de actuar la miosina, que genera fuerzas de contracción que evitan que el volumen de la célula crezca y a su vez ayuda a mover el núcleo hacia delante.

Además, la actina ha de actuar con una distribución de polimerización variable: se da una fuerte polimerización en el frente, cerca de la membrana, que va decayendo conforme llega al núcleo. Esto se traduce en una expansión mecánica en el frente, mientras que la contracción en las zonas cercanas al núcleo genera esfuerzos de compresión que arrastran al núcleo a avanzar a la par que la célula.

De la misma manera, la miosina también sigue una distribución variable: en la parte trasera de la célula la contracción es elevada de tal manera que se forma la cola característica de la migración, mientras que en las zonas más cercanas al núcleo la contracción es más suave. Esto es debido a que si la miosina actuase en toda la parte posterior, la contracción sería mucho más grande y arrastraría al núcleo hacia atrás, impidiendo el movimiento coordinado de frente y núcleo. Por tanto, es clave que se produzca una distribución heterogénea no uniforme tanto de la actina como de la miosina en el cuerpo celular.

En la migración leucocitaria es imprescindible el paso de la miosina al frente y el cese de la actuación de la actina para que el leucocito pueda detenerse para ejercer sus funciones orgánicas. Esto es debido a que, con el paso de la miosina al frente, se equilibran las fuerzas con la parte posterior, evitando que se genere movimiento.

El modelo simula la actina y la miosina, que pertenecen a la parte activa de la célula. No obstante, no se está incluyendo ningún modelo dinámico de adhesión y a ello se debe el comportamiento observado en función del coeficiente de fricción, que contradice los resultados obtenidos *in vitro* [43].

El modelo obtenido concuerda con los resultados experimentales [16], gracias a la distribución espacial de la actina y la miosina el frente avanza con la misma rapidez que el núcleo.

6. LÍNEAS FUTURAS

El modelo simulado refleja la parte mecánica de la célula: la distribución de actina y miosina y las fuerzas que éstas ejercen con el fin de provocar la migración. Sin embargo, no se ha incorporado el modelo dinámico de la adhesión de la célula que reflejaría mejor todos los mecanismos que se dan en la migración confinada. Se pretende seguir investigando para poder incorporarlo al modelo.

Además, se pretende estudiar la migración en otros tipos de células para poder hacer una comparativa.

El objetivo es crear un modelo que permita establecer predicciones del comportamiento celular en este caso de migración, y compararlo con experimentos propios realizados *in vitro*. Además, este primer modelo computacional ya realizado es de gran utilidad a la hora de entender cómo una célula avanza confinada dentro de un canal.

En esta línea, se van a desarrollar una serie de planos para los dispositivos y distintas simulaciones en el módulo de fluidos de Abaqus (Abaqus CFD) y se espera poder hacer los experimentos en un breve plazo.

7. REFERENCIAS

- [1] Hou, Han Wei, et al. "Microfluidics for applications in cell mechanics and mechanobiology." *Cellular and Molecular Bioengineering* 4.4 (2011): 591-602..
- [2] LIM, Chwee Teck. "Single cell mechanics study of the human disease malaria." *Journal of Biomechanical Science and Engineering* 1.1 (2006): 82-92.
- [3] Lee, Gabriel YH, and Chwee T. Lim. "Biomechanics approaches to studying human diseases." *Trends in biotechnology* 25.3 (2007): 111-118.
- [4] Vestweber, Dietmar. "How leukocytes cross the vascular endothelium." *Nature Reviews Immunology* (2015)..
- [5] Leber, Mathias Felix, and Thomas Efferth. "Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review)." *International journal of oncology* 34.4 (2009): 881.
- [6] Tsuji, Takanori, Soichiro Ibaragi, and Guo-fu Hu. "Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis." *Cancer research* 69.18 (2009): 7135-7139.
- [7] Keenan, Thomas M., and Albert Folch. "Biomolecular gradients in cell culture systems." *Lab on a Chip* 8.1 (2008): 34-57..
- [8] Mehlen, Patrick, and Alain Puisieux. "Metastasis: a question of life or death." *Nature Reviews Cancer* 6.6 (2006): 449-458.
- [9] Wirtz, Denis, Konstantinos Konstantopoulos, and Peter C. Searson. "The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis." *Nature Reviews Cancer* 11.7 (2011): 512-522.
- [10] Friedl, Peter, and Bettina Weigelin. "Interstitial leukocyte migration and immune function." *Nature immunology* 9.9 (2008): 960-969.
- [11] Stomp On Step1. (2017). Acute Inflammation (Part 2): Cytokines and Leukocyte Extravasation. [Online] Available at: <http://www.stomponstep1.com/histamine-prostaglandin-leukotrienes-bradkinin-pge2-ltb4-chemotactic-factors/> [Accessed 15 Jun. 2017].
- [12] Bergert, Martin, et al. "Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.36 (2012): 14434-14439.
- [13] DeSimone, Douglas W., and A. Rick Horwitz. "Many modes of motility." *science* 345.6200 (2014): 1002-1003.

- [14] <http://www.interempresas.net/Plastico/Articulos/42011-El-moldeo-por-inyeccion-motor-de-la-innovacion-en-la-tecnologia-medica.html>
- [15] Jacobelli, Jordan, et al. "Confinement-optimized three-dimensional T cell amoeboid motility is modulated via myosin IIA-regulated adhesions." *Nature immunology* 11.10 (2010): 953-961.
- [16] Wilson, Kerry, et al. "Mechanisms of leading edge protrusion in interstitial migration." *Nature communications* 4 (2013).
- [17] Prentice-Mott, Harrison V., et al. "Biased migration of confined neutrophil-like cells in asymmetric hydraulic environments." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.52 (2013): 21006-21011.
- [18] Friedl, Peter, Katarina Wolf, and Jan Lammerding. "Nuclear mechanics during cell migration." *Current opinion in cell biology* 23.1 (2011): 55-64..
- [19] Vaziri, A., H. Lee, and MR Kaazempur Mofrad. "Deformation of the cell nucleus under indentation: mechanics and mechanisms." *Journal of materials research* 21.08 (2006): 2126-2135.
- [20] Trepap, Xavier, Guillaume Lenormand, and Jeffrey J. Fredberg. "Universality in cell mechanics." *Soft Matter* 4.9 (2008): 1750-1759.
- [21] Bao, Gang, and Subra Suresh. "Cell and molecular mechanics of biological materials." *Nature materials* 2.11 (2003): 715-725.
- [22] Membrana, nucleo y citoplasma,
<https://biologiarubenurjc.wordpress.com/2012/03/19/membrana-nucleo-y-citoplasma/>
- [23] Jacobs, Christopher R., Hayden Huang, and Ronald Y. Kwon. *Introduction to cell mechanics and mechanobiology*. Garland Science, 2012.
- [24] Ridley, Anne, and Rebecca Heald. "Cell structure and dynamics." (2011): 1-3.
- [25] Rivero G., Partes de la célula y sus funciones,
http://genesigil.blogspot.com.es/2015/03/partes-de-la-celula-y-sus-funciones_8.html, 2015
- [26] Wickstead, Bill, and Keith Gull. "The evolution of the cytoskeleton." *The Journal of cell biology* 194.4 (2011): 513-525.
- [27] Howard, Jonathon. "Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton." (2001).
- [28] Heuzé, Mélina L., et al. "Migration of dendritic cells: physical principles, molecular mechanisms, and functional implications." *Immunological reviews* 256.1 (2013): 240-254.
- [29] Mogilner, Alex, and George Oster. "Force generation by actin polymerization II: the elastic ratchet and tethered filaments." *Biophysical journal* 84.3 (2003): 1591-1605.

[30] Pollard, Thomas D., and Gary G. Borisy. "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." *Cell* 112.4 (2003): 453-465.

[31] Mitchison, T. J., and L. P. Cramer. "Actin-based cell motility and cell locomotion." *Cell* 84.3 (1996): 371-379.

[32] Harvey, Lodish, Berk Arnold, and Matsudaira Paul. "Biología celular y molecular." *Médica Panamericana* (2010): 37.

[33] Hawkins, Rhoda J., et al. "Spontaneous contractility-mediated cortical flow generates cell migration in three-dimensional environments." *Biophysical Journal* 101.5 (2011): 1041-1045.

[34] Yang, Qing, et al. "Arp2/3 complex-dependent actin networks constrain myosin II function in driving retrograde actin flow." *J Cell Biol* 197.7 (2012): 939-956.

[35] Parsons, J. Thomas, Alan Rick Horwitz, and Martin A. Schwartz. "Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension." *Nature reviews Molecular cell biology* 11.9 (2010): 633-643.

[36] Charras, Guillaume T., et al. "Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs." *The Journal of cell biology* 175.3 (2006): 477-490.

[37] Irimia, Daniel, et al. "Polar stimulation and constrained cell migration in microfluidic channels." *Lab on a Chip* 7.12 (2007): 1783-1790.

[38] Paul, Colin D., et al. "Engineered models of confined cell migration." *Annual Review of Biomedical Engineering* 18 (2016): 159-180.

[39] Yam, Patricia T., et al. "Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility." *J Cell Biol* 178.7 (2007): 1207-1221.

[40] Friedl, Peter. "To adhere or not to adhere?." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11.1 (2010): 3-3.

[41] Lämmermann, Tim, et al. "Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing." *Nature* 453.7191 (2008): 51-55.

[42] Hawkins, Rhoda J., et al. "Pushing off the walls: a mechanism of cell motility in confinement." *Physical review letters* 102.5 (2009): 058103.

[43] Bergert, Martin, et al. "Force transmission during adhesion-independent migration." *Nature cell biology* 17.4 (2015): 524-529.

[44] Byun, Sangwon, et al. "Characterizing deformability and surface friction of cancer cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.19 (2013): 7580-7585.

[45] Mogilner, Alex, and Leah Edelstein-Keshet. "Regulation of actin dynamics in rapidly moving cells: a quantitative analysis." *Biophysical journal* 83.3 (2002): 1237-1258.

[46] Ponti, A., et al. "Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells." *Science* 305.5691 (2004): 1782-1786.

[47] Chabaud, Mélanie, et al. "Cell migration and antigen capture are antagonistic processes coupled by myosin II in dendritic cells." *Nature communications* 6 (2015).

[48] Lämmermann, Tim, and Ronald N. Germain. "The multiple faces of leukocyte interstitial migration." *Seminars in immunopathology*. Vol. 36. No. 2. Springer Berlin Heidelberg, 2014.

[49] Nelson, David L., Albert L. Lehninger, and Michael M. Cox. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan, 2008.