



Escuela de
Ingeniería y Arquitectura
Universidad Zaragoza



Proyecto Fin de Carrera

Ingeniería Industrial

Modelo computacional de la migración celular en matrices 3D basado en estímulos químicos y mecánicos

Autor

Javier Santos Antón

Director

Carlos Borau Zamora

Ponente

José Manuel García Aznar

Departamento Ingeniería Mecánica
Escuela de Ingeniería y Arquitectura (EINA)
Convocatoria Junio Curso Académico 2011/2012

Agradecimientos

Quiero que estas primeras líneas sirvan como muestra de agradecimiento a todas las personas que me han ayudado y apoyado durante la realización de este Proyecto.

En primer lugar y de una forma muy especial, a Carlos Borau y José Manuel García, director y ponente de este Proyecto, por la gran ayuda y atención recibida, sin la cual la realización del mismo no hubiese sido posible.

De igual modo me gustaría agradecer al resto de componentes del Área de Mecánica de Medios Continuos y Teoría de Estructuras por haberme permitido trabajar junto a ellos durante este tiempo.

Por último, me gustaría acordarme de todas aquellas personas que de una forma u otra están y han estado a mi lado hasta llegar a donde he llegado, porque sin su ayuda no hubiese sido posible. Especialmente de mis padres por su cariño, paciencia y comprensión en todo momento.

Resumen

El presente proyecto tiene como objetivo principal, el desarrollo de un modelo computacional 3D de la migración de una célula individual embebida en una matriz de gel. Con ello se pretende contribuir a la comprensión de los procesos subyacentes en este proceso, así como los diferentes estímulos que afectan al proceso general de la migración. Por otra parte se plantea ofrecer una plataforma de simulación de nuevos experimentos que contribuya a la obtención de unos mejores resultados y permita determinar de una forma predictiva cuáles serán las condiciones de ensayo más óptimas.

Este proyecto se enmarca dentro de un proyecto de investigación sobre el modelado computacional multiescala de la migración celular. En concreto el modelo aquí desarrollado ofrece un enfoque a escala celular, para lo que se lleva a cabo una discretización de la célula mediante vóxels. Esto posibilita el estudio de características referentes a la morfología de la célula como el factor de forma, el área de contacto célula matriz o la distribución de tensiones en la superficie celular. Al mismo tiempo, también permite el estudio de características propias de un modelo de migración a escala macro como son las velocidades o la distancias recorridas por la célula en el proceso migratorio.

El proceso de migración celular se determina a través de la aparición/desaparición de los vóxels que constituyen la célula, al actualizarse la forma de la célula en el transcurso del tiempo se computa la migración como el cambio de situación del centroide geométrico del conjunto de elementos que la constituyen. Las funciones que rigen la aparición/desaparición de vóxels recogen los estímulos que condicionan la migración celular en matrices 3D. En este modelo, de los múltiples estímulos que pueden condicionar la migración celular se han tenido en cuenta los factores mecánicos (*mechanotaxis*), químicos (*chemotaxis*) y de flujo.

La *mechanotaxis* se implementa mediante un modelo de *mechano-sensing* basado en un trabajo anterior[1], según el cual la célula contrae su citoesqueleto y ejerce fuerzas sobre la matriz extracelular (ECM) en función de las propiedades de la misma. Los estímulos químicos y de flujo, se obtienen mediante la simulación de un dispositivo microfluídico utilizando para ello las condiciones de un experimento real [2].

Los resultados obtenidos son postprocesados ofreciéndose diferentes modos de visualización entre los que destacan representaciones animadas de la célula migrando a través de la ECM. Estas animaciones muestran a la vez el estado tensional, así como la morfología de la célula en cada instante.

Índice

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 3 |
| Lista de Figuras..... | 7 |
| Lista de Tablas..... | 9 |
| 1. Introducción..... | 11 |
| 1.1 Motivación..... | 11 |
| 1.2 Origen del proyecto..... | 11 |
| 1.3 Migración celular: estado del arte..... | 12 |
| 1.3.1 Experimentación..... | 12 |
| 1.3.2 Modelado..... | 13 |
| 2. Modelo..... | 15 |
| 2.1 Modelo previo..... | 15 |
| 2.1.1 Mecanismo de mecano-sensing..... | 15 |
| 2.1.2 Adaptación del citoesqueleto..... | 17 |
| 2.1.3 Migración..... | 18 |
| 2.2 Modelo actual..... | 19 |
| 2.2.1 Mechano-sensing..... | 20 |
| 2.2.2 Factores fluido-químicos..... | 21 |
| 2.2.3 Funciones de probabilidad..... | 22 |
| 2.2.4 Degradación ECM..... | 25 |
| 2.3 Implementación numérica..... | 25 |
| 2.3.1 Análisis fluido-químico..... | 26 |
| 2.3.2 Análisis mecánico..... | 27 |
| 2.3.3 Cálculo de probabilidades..... | 28 |
| 2.3.4 Actualización forma célula..... | 30 |
| 2.3.5 Técnicas de visualización..... | 31 |
| 2.3.6 Software utilizado..... | 31 |
| 3. Resultados..... | 33 |
| 3.1 Simulación del microdispositivo..... | 33 |
| 3.2 Simulación fluido-química a nivel celular..... | 35 |
| 3.3 Simulación mecánica..... | 38 |
| 3.4 Simulación completa..... | 43 |
| 3.4.1 Caso (i)..... | 43 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.4.2 | Caso (ii)..... | 44 |
| 3.4.3 | Resultados | 44 |
| 4. | Discusión | 49 |
| 5. | Conclusiones y Trabajo Futuro..... | 53 |
| 6. | Referencias..... | 55 |
| | Anexo I: <i>Estado del arte. Experimentación migración celular.</i> | 59 |
| | Anexo II: <i>Estado del arte. Tipos de modelos existentes para simular la migración celular.</i> | 63 |
| | Anexo III: <i>Análisis paramétrico de las funciones de probabilidad.</i> | 65 |
| | Anexo IV: <i>Validación mecánica del modelo computacional.</i> | 71 |
| | Anexo V: <i>Validación fluido-química del modelo computacional.</i> | 77 |
| | Anexo VI: <i>Determinación factor de forma de la célula.</i> | 81 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura. 1: Posibles estímulos condicionantes de la migración celular. | 14 |
| Figura. 2: Esquema de las diferentes partes de la célula involucradas en el proceso de <i>mechano-sensing</i> y su modelado. | 16 |
| Figura. 3: Fuerza ejercida por el sistema actina-miosina (AM) en función del solapamiento entre filamentos (ε_c). | 16 |
| Figura. 4: Representación esquemática reorientación citoesqueleto celular | 18 |
| Figura. 5: Esquema iterativo del modelo de migración celular en cada incremento de tiempo. | 19 |
| Figura. 6: Dispositivo microfluídico utilizado para los ensayos. | 27 |
| Figura. 7: Posición y dimensiones iniciales de la célula. | 28 |
| Figura. 8: Esquema de la conectividad considerada-6 utilizado en la simulación. | 29 |
| Figura. 9: Esquema de la migración en función de la dirección del gradiente de tensión. | 29 |
| Figura. 10: Técnicas de visualización. | 31 |
| Figura. 11: Software utilizado en la simulación, postprocesado y visualización de resultados. | 32 |
| Figura. 12: Simulación fluidica del dispositivo. | 34 |
| Figura. 13: Caída de presión en el dispositivo microfluídico. | 35 |
| Figura. 14: Evolución de la célula para la simulación fluido-química a nivel celular. | 35 |
| Figura. 15: Volumen de control considerado par simulación fluido-química a nivel celular. | 36 |
| Figura. 16: Líneas de corriente y factor autocrino en la simulación fluido-química a nivel celular. | 37 |
| Figura. 17: Distribución de presiones causadas por el flujo intersticial en la superficie celular. | 37 |
| Figura. 18: Simulación de difusión de un factor químico a nivel celular. | 38 |
| Figura. 19: Gradiente de rigidez del gel (ECM) a lo largo de la dirección X. | 39 |
| Figura. 20: Velocidad y distancia recorrida por la célula tras 16 y tras 100 steps. | 40 |
| Figura. 21: Área proyectada y factor de forma para simulación mecánica. | 41 |
| Figura. 22: Mapa de tensiones en la célula y desplazamientos en la matriz extracelular. | 42 |
| Figura. 23: Degradación de la matriz extracelular. | 43 |
| Figura. 24: Esquema de los diferentes estímulos considerados en la simulación. Caso (i). | 44 |
| Figura. 25: Esquema de los diferentes estímulos considerados en la simulación. Caso (ii). | 44 |
| Figura. 26: Trayectoria de la migración celular bajo la influencia de diferentes estímulos. | 45 |
| Figura. 27: Resultados simulación basada en estímulos mecánicos y químicos. | 46 |
| Figura. 28: Célula adherida al extremo del dominio. | 47 |
| Figura. 29: Representación esquemática de los distintos tipos de dispositivos microfluídicos. | 60 |
| Figura. 30: Imágenes capturadas mediante 3D TFM durante la migración celular. | 61 |
| Figura. 31: Variación de las funciones de probabilidad en función de los estímulos considerados. | 66 |
| Figura. 32: Variación de las funciones de probabilidad con el ángulo θ | 67 |
| Figura. 33: Variación de las funciones de probabilidad con la constante de sensibilidad λ^σ | 68 |
| Figura. 34: Variación de las funciones de probabilidad con K^o | 69 |
| Figura. 35: Velocidad media y velocidad efectiva para simulación. | 72 |
| Figura. 36: Distancia total y distancia efectiva recorrida por la célula. | 72 |
| Figura. 37: Factor de forma de la célula para diferentes valores de rigidez. | 73 |

| | |
|--|----|
| Figura. 38: Área proyectada de la célula para valores bajo, medio y alto de rigidez. | 73 |
| Figura. 39: Histograma angular de la migración aleatoria. | 74 |
| Figura. 40: Histograma angular de la migración direccionada y aleatoria..... | 75 |
| Figura. 41: Comparativa de la trayectoria celular para los diferentes casos simulados..... | 78 |
| Figura. 42: Velocidad media y efectiva en la simulación para la validación fluido-química..... | 79 |
| Figura. 43: Esquema de obtención del factor de forma celular..... | 83 |

Lista de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Significado de las constantes presentes en las funciones de probabilidad..... | 22 |
| Tabla 2: Valores de los parámetros utilizados y condiciones impuestas para la simulación del dispositivo. | 26 |
| Tabla 3: Condiciones y parámetros en la simulación fluido-química a nivel celular. | 36 |

1. Introducción

1.1 Motivación

La migración celular es el término con el que se define al movimiento de las células, ya sean pertenecientes a un organismo unicelular o pluricelular. Se trata de un proceso fundamental en multitud de fenómenos biológicos a lo largo de la vida de un ser vivo, desde la embriogénesis y desarrollo embrionario hasta la regeneración de tejidos o la curación de heridas, dando respuesta inmunitaria a las posibles vías de infección a las que cada día se enfrenta un organismo. En los últimos años ha cobrado especial relevancia gracias, en parte, a los grandes avances alcanzados en las técnicas que permiten su estudio.

Numerosas enfermedades tienen como causa un tipo u otro de alteración en el proceso de migración celular. Por ejemplo, desordenes en el proceso de migración durante el desarrollo embrionario pueden producir enfermedades tan graves como malformaciones fetales, retraso mental, artritis, osteoporosis o metástasis del cáncer. A modo de ejemplo, la migración de fibroblastos y células del endotelio vascular es esencial en la curación de heridas [3]. La migración celular también está presente en la metástasis del cáncer [4], pues las células cancerígenas abandonan la masa tumoral original incorporándose al sistema sanguíneo o linfático en función de diversos factores que provocan una migración anormal. Debido a su importancia, es especialmente en este campo en donde más se están enfocando las investigaciones más recientes. Éstas han arrojado algo de luz sobre los estímulos que determinan la migración de células desde la masa original hasta los nuevos órganos. Según las observaciones realizadas, las condiciones mecánicas del sustrato, factores topográficos, químicos y la presencia de otras células influyen fuertemente en el desarrollo metastásico [5].

De gran interés es también el conocimiento a fondo del proceso completo de la migración celular, para su aplicación en la colonización de biomateriales en el creciente campo de la ingeniería de tejidos [6]. Ésta se basa en proporcionar a las células un medio local que permita y regule la diferenciación, proliferación y migración para la regeneración tisular, tratando de evitar el trasplante de órganos o la reconstrucción mediante cirugía. Por ejemplo, una de las novedosas estrategias de curación de heridas importantes, consiste en la sustitución de parte de un tejido por un biomaterial biodegradable con las condiciones idóneas para que se produzca la completa regeneración del tejido gracias a la proliferación y migración de las células del propio paciente[7].

1.2 Origen del proyecto

Este proyecto se encuadra en el marco de un proyecto de investigación que tiene como objetivo el modelado y la simulación computacional de la migración celular en diferentes escalas. En dicho proyecto se realiza un análisis de este proceso desde una escala macroscópica, en la que se aborda la migración celular basada en el proceso de *mechano-sensing* [8] (mecanismo utilizado por las células para detectar el entorno mecánico), hasta una

escala microscópica en la que se estudia el comportamiento del citoesqueleto (compuesto principalmente por filamentos de actina y proteínas de entrecruzamiento) cuya naturaleza dinámica es la responsable de diversas respuestas macroscópicas de la célula cuyo resultado final es la migración.

1.3 Migración celular: estado del arte

1.3.1 Experimentación

La migración celular es un proceso multidisciplinar y multiescala influenciado tanto por factores bioquímicos como por la interacción célula-matriz. Es un fenómeno sumamente complejo, y por tanto son necesarios experimentos *in vitro* aislando parte de las variables involucradas para valorar su influencia y comprender su funcionamiento.

Cabe destacar que los ensayos de migración se han realizado hasta la fecha en sustratos planos (2D) principalmente. Gracias a ellos se ha avanzado mucho en la comprensión de diversos fenómenos involucrados en la migración celular, sin embargo, para llegar a conocer completamente el proceso, son necesarios ensayos 3D en ambientes mucho más realistas y similares a las condiciones *in vivo*. De hecho, cuando las células están completamente rodeadas por una matriz extracelular, aparecen nuevos factores que no estaban presentes en 2D como los efectos de la exclusión de volumen [9] o diferencias relevantes en la morfología, formación de adhesiones y transducción de estímulos [10]. Investigaciones recientes sugieren que las diferencias entre ambientes 2D y 3D pueden ser incluso mucho más relevantes de lo que se pensaba [11], por lo que el desarrollo de nuevas técnicas para la realización de estudios 3D aumenta día a día.

Es por ello, que el desarrollo de los dispositivos microfluídicos ha aumentado en las últimas décadas. Su alto potencial y versatilidad a la hora de realizar experimentos y establecer diferentes condiciones de ensayo, han contribuido a que se conviertan en una componente clave en la investigación de la migración en 3D. Su principal ventaja reside en la posibilidad de controlar, tanto en el espacio como en el tiempo, los múltiples factores biofísicos y bioquímicos envueltos en un cultivo [12], así como monitorizar el proceso con instrumentos de alta resolución. Muestra de ello es el elevado número de experimentos realizados acerca del cultivo y la reacción frente a diversos estímulos tanto de células individuales como de grandes poblaciones [2, 6, 12]. En el Anexo I se ofrece una visión más completa del estado del arte de la experimentación sobre la migración celular.

1.3.2 Modelado

Además de la experimentación, para comprender el papel de cada uno de los procesos involucrados en la migración y su respectiva relevancia es necesario desarrollar modelos matemáticos y computacionales que ayuden en la predicción y entendimiento de los fenómenos migratorios.

Llegados a este punto, se hace necesaria una breve explicación de las principales fases de la migración celular así como de los diferentes condicionantes físicos-químicos que la afectan.

La migración celular en matrices 3D se puede explicar a través de 5 procesos que se suceden en el tiempo dando lugar al movimiento de la célula, éstos son: protrusión de pseudópodos en el extremo frontal, formación de contacto focal, proteólisis focalizada, contracción del sistema actina-miosina y por último desprendimiento y contracción del extremo trasero [4]. El fenómeno de migración comienza con la protrusión de pseudópodos, (formación y crecimiento de ramificaciones) en el frente celular debido a la presión de los filamentos de actina sobre la membrana celular. Estas protrusiones tienen un cierto carácter estocástico al tratarse de elementos exploratorios, aunque su formación está también condicionada por diversos factores como se verá a continuación. Una vez formados los pseudópodos, la integrina entra en contacto con los ligandos de la matriz extracelular y se agrupan en la membrana celular formando los contactos o adhesiones focales, por medio de los cuales los pseudópodos se adhieren al sustrato. A continuación se produce la degradación focalizada de la matriz por parte de las metaloproteasas (un tipo de enzima) de la célula. Por último, la célula se contrae por efecto del sistema actina-miosina. Cuando la fuerza soportada por las adhesiones traseras supera un cierto límite, los contactos focales se rompen y la célula se contrae.

Todo este complejo proceso, depende de multitud de estímulos recibidos por la célula (químicos, topográficos, mecánicos, etc.), determinando así la respuesta migratoria y la organización tisular (Figura. 1).

Uno de los principales estímulos que rigen la migración celular es la concentración de sustancias químicas diluidas (*chemotaxis*) así como de moléculas no solubles (*haptotaxis*)[13]. De igual modo, la topografía del sustrato en el que las células se encuentran embebidas juega un papel importante. Por ejemplo, se ha observado que los fibroblastos migran en matrices 3D siguiendo las direcciones de las fibras de colágeno (*contact guidance*) y que tienden a orientarse preferentemente con el eje de menor curvatura, donde la distorsión del citoesqueleto es mínima [14].

Los estímulos mecánicos juegan igualmente un papel esencial. Las células son capaces de generar fuerzas y migrar en función de la resistencia mecánica del medio (*mechanotaxis*, *durotaxis*)[15], así como de guiarse por el estado tensional del medio en el que se encuentran (*tensoaxis*)[16].



Figura. 1: Posibles estímulos condicionantes de la migración celular.

El comportamiento de las células viene determinado por diversidad de factores que pueden dividirse estímulos químicos (*haptotaxis* y *chemotaxis*), mecánicos (*mechanotaxis*, *tenso-taxis* y *durotaxis*) y topográficos (*contact guidance* y *curvature*) [17].

Existe un gran debate sobre el papel de cada uno de los factores según los diferentes tipos de células y procesos. Una misma célula puede comportarse de manera diferente en función de las condiciones que la rodean, e incluso un leve cambio puede producir resultados contradictorios. Es por ello que cada vez son más los modelos que se desarrollan para intentar arrojar algo de luz, y aportar información valiosa para mejorar el diseño de nuevos experimentos.

Existen diferentes modelos de migración, tanto para células individuales, como para poblaciones. Al desarrollarse a la par que los experimentos, existen muchos más modelos bidimensionales, aunque cada día son más los de migración 3D [18-21]. Una explicación más detallada sobre los tipos de modelos existentes y sus principales características se recoge en el Anexo II.

Como se puede observar en este breve resumen, aunque existen multitud de aproximaciones, todas se suelen centrar en un solo aspecto concreto de la migración celular. El paso natural, por lo tanto, es tratar de combinar cada una de esas aportaciones desarrollando un modelo multidisciplinar capaz de capturar a diferentes escalas el comportamiento celular y los procesos más relevantes de la migración.

2. Modelo

Este proyecto, como ya se ha comentado anteriormente, está integrado en el desarrollo de un proyecto de investigación sobre el modelado computacional multiescala de la migración celular. En dicho proyecto se desarrolla un modelo de migración celular (a escala *macro*) de elementos finitos en el cual, la célula se simula como un solo elemento. Su movimiento queda definido por un equilibrio de fuerzas celulares cuya relación con la matriz extracelular (ECM) se establece a través del proceso de mecano-sensing, como se explicará brevemente a continuación. Por otro lado, se simula la red de actina que compone el citoesqueleto celular y se estudia el fenómeno del mecano-sensing desde la perspectiva *micro*. El modelo desarrollado en el presente proyecto, corresponde también a una aproximación macro-escala de una única célula que incorpora no sólo estímulos mecánicos (*mechano-sensing*), sino también, químicos y de flujo. Las diferencias con el modelo anterior son que el presente no se trata de un modelo basado en fuerzas y, además, se adopta un enfoque más centrado en la célula. Para ello la célula es modelada como un conjunto de elementos, cada uno de los cuales presenta comportamientos validados con el modelo *micro*. Con todo ello, el modelo es capaz de obtener resultados relativos al enfoque macro como la velocidad de migración, y otros referentes a nivel celular, como la morfología de la célula, la deformación sufrida por el citoesqueleto o la distribución de tensiones en el cuerpo celular.

2.1 Modelo previo.

El modelo propuesto en este trabajo se desarrolla a partir de otro anterior [1] basado en elementos finitos y en el fenómeno del mecano-sensing, el cual será referido como modelo “macro” de aquí en adelante. En ese modelo, la célula, embebida en una matriz elástica 3D, se discretiza como un único elemento, no teniendo en cuenta por lo tanto ningún aspecto morfológico de la célula ni ningún estímulo químico, pero manteniendo la interacción mecánica entre matriz y célula. El proceso de migración se divide en 3 procesos diferentes: *mechano-sensing*, adaptación del citoesqueleto y movimiento celular. A pesar de que estos tres procesos ocurren en la realidad de forma simultánea, en el modelo macro, por simplicidad, ocurren de manera independiente aunque interrelacionada, como se verá a continuación.

2.1.1 Mecanismo de mecano-sensing

El citoesqueleto celular es una estructura mecánica que juega un papel fundamental en la locomoción celular [22]. El comportamiento del citoesqueleto celular es altamente dinámico y complejo, y sus características reológicas [23, 24] y contráctiles [25] se han estudiado intensivamente. Un modelo simplificado del citoesqueleto, basado en una estructura de muelles y un actuador, se utiliza para simular el comportamiento mecánico de la célula

2. Modelo

(Figura. 2). Los elementos celulares considerados por este modelo son: los filamentos de actina (simulados mediante un muelle de constante K_{act}), el sistema actina-miosina (simulado mediante un actuador contráctil) y por último la rigidez pasiva de la célula, debida en su mayor parte a los microtúbulos (simulada mediante un muelle de constante elástica K_{pas}). El citoesqueleto celular se une a la matriz extracelular por medio de adhesiones focales e integrinas transmembrana, que a modo de simplificación se consideran completamente rígidas.

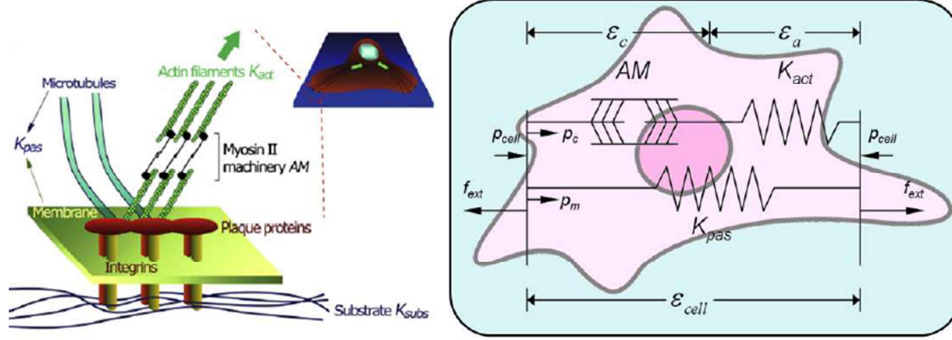


Figura. 2: Esquema de las diferentes partes de la célula involucradas en el proceso de *mechano-sensing* y su modelado.

El citoesqueleto se simplifica a una estructura de muelles que simulan la resistencia de los filamentos internos (K_{act} , referente a la rigidez de los filamentos de actina y K_{pas} rigidez pasiva de la célula producida por microtúbulos), más un actuador (AM) que simula el carácter contráctil del sistema actina-miosina. La deformación de la célula depende por tanto de la fuerza ejercida por el actuador y del valor de rigidez con que se simulan las diferentes partes de la célula[1].

La tensión activa generada por el actuador contráctil de acto-miosina (p_c) se relaciona con el solapamiento entre los filamentos de actina-miosina (ϵ_c) (Figura. 3).

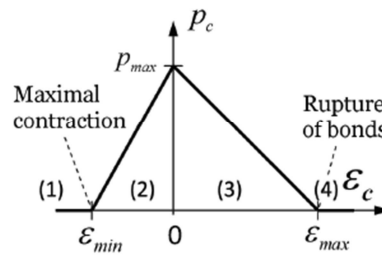


Figura. 3: Fuerza ejercida por el sistema actina-miosina (AM) en función del solapamiento entre filamentos (ϵ_c).

Zona 1: Comportamiento pasivo, el AM es sometido a compresión por cargas externas. Zona 2: Contracción, el AM ejerce fuerzas de para detectar las propiedades del medio. Zona 3: Tensión, el AM es traccionado por cargas externas pero todavía tiene capacidad de comprimirse para detectar las propiedades del medio. Zona 4: Comportamiento pasivo, las cargas de tracción son tan elevadas que el AM no puede ejercer una fuerza suficiente para contrarrestarlas.

Así pues la tensión que la célula ejerce sobre la matriz (p_{cell}) es dependiente de la deformación celular (ϵ_{cell}), que a su vez viene determinada por las condiciones de contorno. Por tanto, p_{cell} se puede expresar en función de los parámetros mecánicos como:

$$p_{cell}(\epsilon_{cell}) = \begin{cases} K_{pas} \epsilon_{cell} & \epsilon_{cell} < \epsilon_{min} \\ \frac{K_{pas} p_{max}}{K_{act} \epsilon_{min} - p_{max}} (\epsilon_{min} - \epsilon_{cell}) + K_{pas} \epsilon_{cell} & \epsilon_{min} < \epsilon_{cell} < (p_{max} / K_{act}) \\ \frac{K_{pas} p_{max}}{K_{act} \epsilon_{max} - p_{max}} (\epsilon_{max} - \epsilon_{cell}) + K_{pas} \epsilon_{cell} & (p_{max} / K_{act}) < \epsilon_{cell} < \epsilon_{max} \\ K_{pas} \epsilon_{cell} & \epsilon_{max} < \epsilon_{cell} \end{cases}$$

ec. 2-1

La célula se considera un cuerpo esférico de forma y volumen constante. Además tiene un comportamiento anisótropo, por tanto la tensión ejercida por la célula tiene dos componentes, una componente isótropa dependiente de la tensión calculada y de la deformación volumétrica (la célula se contrae por igual en todas las direcciones) y una segunda componente anisótropa que depende de la dirección de polarización de la célula, cuya obtención se explicará en la siguiente sección. Por lo tanto, la tensión ejercida por la célula se puede expresar como:

$$\sigma_{cell} = p_{cell}(\epsilon_{cell}) \mathbf{d}_{pol} \otimes \mathbf{d}_{pol} + p_{cell}(\theta_{cell}) \mathbf{I}$$

ec. 2-2

La resolución del problema implica la resolución de la ecuación de equilibrio global tanto para la célula como para el sustrato:

$$\nabla(\sigma_{cell}) = 0 \quad \text{en } \Omega_{cell}$$

ec. 2-3

$$\nabla(\sigma_{subs}) = \mathbf{f}_{ext} \quad \text{en } \Omega_{subs}$$

ec. 2-4

2.1.2 Adaptación del citoesqueleto

Observaciones experimentales recientes sugieren que el citoesqueleto celular forma fibras de tensión (*stress-fibers*)[26] orientadas preferentemente paralelas con la dirección principal de tensión[17]. En este modelo esto corresponde con la dirección de menor deformación y por tanto se considera que la célula se alinea gradualmente con ella mediante la siguiente expresión:

$$\Delta \mathbf{d}_{pol} = \frac{d(\mathbf{d}_{pol})}{dt} \Delta t = k \left(\mathbf{d}_{pol}^i \times (\mathbf{d}_\epsilon \times \mathbf{d}_{pol}^i) \right) \Delta t$$

ec. 2-5

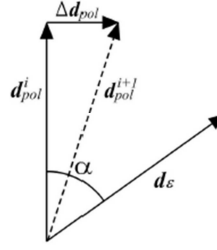


Figura. 4: Representación esquemática reorientación citoesqueleto celular

El citoesqueleto celular se reorienta para cada incremento del tiempo en función del vector de polarización anterior (d_{pol}^i) y el vector de variación (Δd_{pol}) [1].

donde d_{pol} es la dirección actual de polarización de la célula, d_{ϵ} la dirección principal de mínima deformación, α el ángulo que forman y κ la constante de reorientación (min^{-1}). Como se observa en la Figura. 4, la dirección de polarización se actualiza en cada intervalo de tiempo alineándose progresivamente con la dirección de deformación mínima, obteniéndose así la nueva dirección de polarización (d_{pol}^{i+1}).

2.1.3 Migración

La última fase del modelo consiste en la resolución del equilibrio de todas las fuerzas implicadas en el movimiento celular.

$$\mathbf{F}_{trac} + \mathbf{F}_{drag} + \mathbf{F}_{prot} = 0 \quad \text{ec. 2-6}$$

Las fuerzas que participan en este proceso son: fuerza de protrusión (\mathbf{F}_{prot}), calculada como un vector aleatorio y de módulo proporcional a $p_{cell}(\epsilon_{cell})$, fuerza de arrastre (\mathbf{F}_{drag}), proporcional a la velocidad y la viscosidad efectiva η de la ECM y la fuerza de tracción (\mathbf{F}_{trac}) ejercida por la célula, proporcional al área donde esta se aplique (a_a). Las fuerzas de tracción en la parte frontal y en la parte posterior tienen diferentes valores debido a la diferente densidad de adhesiones focales, (β_F y β_B). Por tanto, estas fuerzas pueden expresarse como:

$$\mathbf{F}_{drag} = \eta \mathbf{v}_{cell} \quad \text{ec. 2-7}$$

$$\mathbf{F}_{trac} = (\beta_F - \beta_B) p_{cell} a_a \mathbf{d}_{pol} \quad \text{ec. 2-8}$$

y la velocidad puede ser obtenida como:

$$\mathbf{v}_{cell} = (\mathbf{F}_{prot} + (\beta_F - \beta_B) p_{cell} a_a \mathbf{d}_{pol}) \eta^{-1} \quad \text{ec. 2-9}$$

2.2 Modelo actual

En el nuevo modelo, a diferencia del anterior, el proceso de migración se analiza a nivel celular, en él, la célula pasa de ser discretizada como un único elemento a ser discretizada como un conjunto de vóxeles. El vóxel es la unidad mínima procesable de una matriz tridimensional, o en otras palabras, cada una de las unidades cúbicas que compondrá el cuerpo celular y que posibilitará principalmente el estudio de su morfología. Estos vóxeles están embebidos en una matriz elástica 3D y aparecen y desaparecen con una probabilidad que viene dada en función de diversos parámetros, lo cual hace avanzar a la célula así como cambiar su forma.

Como se ha descrito anteriormente, el proceso de migración celular está influenciado por multitud de factores. Este modelo incorpora factores mecánicos, químicos y de flujo. Se tienen en cuenta por tanto: las propiedades mecano-químicas de la ECM (gradientes de rigidez, concentraciones químicas, direcciones de flujo) así como su geometría.

Se trata de un modelo iterativo (Figura. 5) que resuelve el equilibrio mecánico entre célula y matriz en cada incremento de tiempo. Por otro lado, el problema de flujo y difusión química en un dispositivo microfluídico se considera estacionario, con lo que las condiciones fluido-químicas son constantes durante las simulaciones del proyecto actual. Las hipótesis tomadas respecto a cada uno de los factores, son explicadas en detalle en la sección correspondiente.

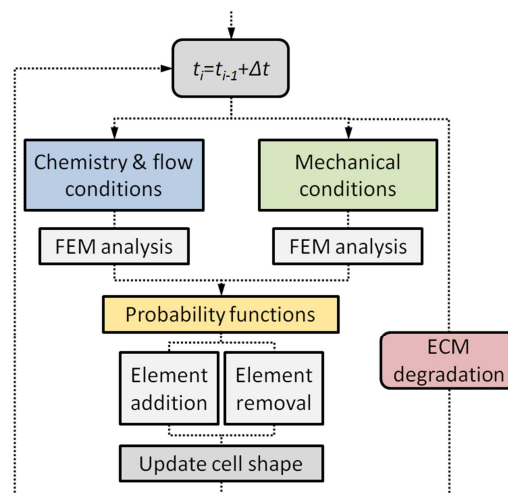


Figura. 5: Esquema iterativo del modelo de migración celular en cada incremento de tiempo.

La velocidad de la célula no es resuelta mediante ecuaciones de equilibrio, sino que viene dada intrínsecamente por medio de la aparición y desaparición de vóxeles, dependientes a su vez de las funciones de probabilidad. Estas funciones (detalladas en los siguientes apartados) dependen de los diferentes estímulos comentados (mecánicos, químicos y de flujo) así como del incremento temporal. Los elementos que componen la célula son actualizados en cada incremento de tiempo, determinando así la forma, el área, el volumen, el contorno etc.

A la hora de realizar el modelo se ha tratado, en la medida de lo posible, ceñirse lo máximo al proceso real de migración celular en el que se suceden temporalmente los cinco procesos ya mencionados en el apartado 1.3.2 [4]: protrusión de pseudópodos en la parte frontal, formación de contactos focales, proteólisis focalizada, contracción del sistema actina-miosina y desprendimiento del extremo trasero y consecuente avance. Cada uno de estos procesos se incorpora al modelo bien como un proceso en sí o bien como combinación de alguno de ellos. La protrusión de pseudópodos se implementa en dos fases: la primera incluye la formación de filopodios, estructuras de carácter explorativo (simuladas como elementos en las partes más externas del contorno en varias direcciones). La segunda es la formación de lamelipodios (estructuras más amplias que extienden la membrana celular) y se corresponde en el modelo con la aparición de elementos en la parte frontal de la célula. La formación de contactos focales no se modela específicamente, ya que se considera que los elementos perimetrales de la célula están perfectamente adheridos a la ECM. La proteólisis focalizada se asocia con la degradación que experimenta la matriz como consecuencia del paso de la célula, y se implementa como se explica en el apartado 2.2.4. Por último, el desprendimiento de la parte trasera se corresponde con la desaparición de vóxels, que unido a la aparición en la parte delantera producen la migración de la célula.

2.2.1 Mechano-sensing

Las células tienen la capacidad de detectar las propiedades mecánicas del medio en que se encuentran y actuar en consecuencia. Tal como se ha explicado anteriormente, este proceso se denomina *mechano-sensing*. Al igual que ocurría en el modelo previo, el citoesqueleto se modela mediante una estructura consistente en varios muelles y un actuador (Figura. 2), con la salvedad de que en este caso la célula deja de ser un único elemento y se convierte en un conjunto de vóxels, cada uno de los cuales se comporta según el modelo anteriormente descrito.

A diferencia del enfoque macro, ya no se tiene en cuenta la dirección de polarización de la célula completa, ya que cada elemento se evalúa de forma individual. Por tanto, en este caso, la ecuación que describe el comportamiento tensional de cada elemento que conforma la célula solo consta del término isótropo.

$$\sigma_{cell} = p_{cell}(\theta_{cell})\mathbf{I} \quad \text{ec. 2-10}$$

Igualmente, se debe satisfacer la ecuación de equilibrio global mecánico planteada anteriormente (ec. 2-3 y ec. 2-4). La resolución de este problema mecánico se realizara mediante un software de elementos finitos (Abaqus) como se detalla más adelante en el apartado 2.3.2. La tensión de equilibrio alcanzada por cada elemento de la célula, servirá, entre otros factores, para decidir la aparición de un nuevo elemento o la desaparición del mismo.

2.2.2 Factores fluido-químicos

El proceso de migración celular, además de estar condicionado por los estímulos mecánicos resultantes de la interacción de la célula con el medio, está influenciado por estímulos químicos. Como se ha comentado anteriormente, existen dos modos diferentes de migración celular en función de si los factores químicos presentes en el medio se encuentran diluidos (*chemotaxis*) o son insolubles y se encuentran dispersos por la ECM (*haptotaxis*). Este modelo, por simplicidad, se centra exclusivamente en la *chemotaxis*. Dentro de la misma, se distingue entre: quimiotaxis autóloga (*autologous chemotaxis*), cuando la propia célula segrega el factor químico que estimula el movimiento celular, o quimiotaxis paracrina (*paracrine chemotaxis*), término utilizado para denominar la respuesta de la célula frente a un factor químico externo a ella [27]. Mediante experimentos *in-vitro*, se ha constatado también la frecuente interacción entre la migración producida por factores químicos y la producida por la presencia de fluido intersticial [28], debido al arrastre de las concentraciones químicas que altera los gradientes percibidos por la célula.

En el presente modelo se incorpora la dependencia de la migración respecto a factores fluido-químicos, incorporando la citada dependencia a las funciones de probabilidad para la aparición/desaparición de vóxeles. Se precisa por tanto conocer el valor tanto de la dirección del flujo, como de la concentración de factores químicos en cada uno de los elementos que rodean la célula. Para calcular el valor de las líneas y direcciones de flujo, así como del valor de concentración de los factores químicos se utilizará la ley de Brinkman para materiales porosos [29]:

$$\mu \nabla^2 \mathbf{v} - \frac{\mu}{\kappa} \mathbf{v} - \nabla P = 0 \quad \text{ec. 2-11}$$

donde μ designa a la viscosidad del fluido, \mathbf{v} la velocidad del fluido, κ hace referencia a la permeabilidad y P la presión.

La determinación de la difusión de un factor químico se obtiene a través de la ley de Fick:

$$\mathbf{j} = -D \nabla c \quad \text{ec. 2-12}$$

donde \mathbf{j} designa al flujo molar del factor químico difundido, D hace referencia al coeficiente de difusión y c a la concentración de factor químico.

Así mismo, se incorporan las ecuaciones de convección-difusión para el transporte de especies diluidas:

$$\nabla \cdot (-D \nabla c) + \mathbf{v} \cdot \nabla c = R \quad \text{ec. 2-13}$$

$$\mathbf{j} = -D \cdot \nabla c + \mathbf{v} \cdot c \quad \text{ec. 2-14}$$

donde D vuelve a ser la difusividad del medio, c la concentración de la sustancia que difunde, v la velocidad del fluido, R designa la tasa de consumo/secreción de la sustancia difundida y j , al igual que en el caso anterior, el flujo molar del factor difundido.

2.2.3 Funciones de probabilidad

La migración de la célula, está basada en la aparición y desaparición de los vóxels que la constituyen. En cada incremento de tiempo, ciertos elementos que eran parte de la célula dejan de serlo y algunos que anteriormente correspondían a la matriz extracelular pasan a ser ocupados por la célula, de modo que el cuerpo de la célula se va desplazando progresivamente durante el transcurso de la simulación.

La aparición y desaparición de vóxels viene gobernada por dos funciones de probabilidad en las que se consideran los estímulos mecánicos y fluido-químicos mencionados anteriormente. A cada uno de ellos le corresponde uno o varios parámetros como se detallará a continuación.

Las probabilidades de aparición/desaparición de vóxels son respectivamente:

$$p_+ = p_+^0 + p_+^{\max} \left(1 - e^{-k_+^0 (\lambda_+^\sigma d_+^\sigma + \lambda_+^{\Delta\sigma} d_+^{\Delta\sigma} + \lambda_+^C d_+^C + \lambda_+^F d_+^F) dt} \right) \quad \text{ec. 2-15}$$

$$p_- = p_-^0 + p_-^{\max} \left(1 - e^{-k_-^0 (\lambda_-^\sigma d_-^\sigma + \lambda_-^{\Delta\sigma} d_-^{\Delta\sigma} + \lambda_-^C d_-^C + \lambda_-^F d_-^F) dt} \right) \quad \text{ec. 2-16}$$

donde $d_{+,-}^\sigma$, $d_{+,-}^{\Delta\sigma}$, $d_{+,-}^C$, $d_{+,-}^F$ son parámetros variables en función de las condiciones que afectan a cada vóxel, y k y λ son parámetros constantes ajustados mediante ensayos numéricos (Anexo III). Sus valores y significados pueden ser consultados en las Tabla 1.

| Designación | Significado | Valor | Unidades |
|--|--|----------------|-----------------------|
| p_+^0, p_-^0 | Probabilidades mínimas de aparición/desaparición | 0.1, 0.1 | [-] |
| p_+^{\max}, p_-^{\max} | Probabilidades máximas de aparición/desaparición | 0.8, 0.4 | [-] |
| k_+^0, k_-^0 | Ratio de aparición/desaparición | 0.4, 0.4 | [min^{-1}] |
| $\lambda_+^\sigma, \lambda_-^\sigma$ | Constante de sensibilidad de aparición/desaparición relativo a la tensión máxima | 0.0035, 0.0035 | [-] |
| $\lambda_+^{\Delta\sigma}, \lambda_-^{\Delta\sigma}$ | Constante de sensibilidad de aparición/desaparición para gradientes de tensión | 0.004, 0.004 | [-] |
| λ_+^C, λ_-^C | Constante de sensibilidad de aparición/desaparición frente a un gradiente concentración factor químico | 0.3, 0.3 | [-] |
| λ_+^F, λ_-^F | Constante de sensibilidad de aparición/desaparición frente al flujo | 0.004, 0.004 | [-] |
| dt | Incremento de tiempo | 5 | [min] |
| d | Parámetro de degradación | 0.01 | [-] |

Tabla 1: Significado de las constantes presentes en las funciones de probabilidad

Estas funciones se aplican en cada uno de los elementos del contorno de la célula en función de las condiciones mecano-fluido-químicas. Con los parámetros de dichas funciones, se reflejan los estímulos considerados en este modelo para la migración celular: la magnitud de la tensión celular, el gradiente de tensión, la concentración de factores químicos y la dirección de flujo.

La tensión celular se introduce en las funciones a través de d_+^σ y $d_+^{\Delta\sigma}$, cuyo valor para la aparición de elementos viene dado por:

$$d_+^\sigma = \begin{cases} \frac{\sigma_{cell}}{\sigma_{max}} \cos \theta & -\frac{\pi}{2} < \theta < \frac{\pi}{2} \\ 0 & \frac{\pi}{2} \leq \theta \leq \frac{3\pi}{2} \end{cases} \quad d_+^{\Delta\sigma} = \begin{cases} \cos \theta & -\frac{\pi}{2} < \theta < \frac{\pi}{2} \\ 0 & \frac{\pi}{2} \leq \theta \leq \frac{3\pi}{2} \end{cases} \quad \text{ec. 2-17}$$

y para la desaparición por:

$$d_-^\sigma = \begin{cases} 0 & -\frac{\pi}{2} < \theta < \frac{\pi}{2} \\ \frac{\sigma_{cell}}{\sigma_{max}} |\sin \theta| & \frac{\pi}{2} \leq \theta \leq \frac{3\pi}{2} \end{cases} \quad d_-^{\Delta\sigma} = \begin{cases} 0 & -\frac{\pi}{2} < \theta < \frac{\pi}{2} \\ |\sin \theta| & \frac{\pi}{2} \leq \theta \leq \frac{3\pi}{2} \end{cases} \quad \text{ec. 2-18}$$

donde σ_{max} es la tensión máxima generada por la célula (determinada según los parámetros del modelo de *mechano-sensing*) y θ el ángulo que forma cada elemento con la dirección del gradiente de tensión. Estas definiciones, permiten por un lado enfatizar en la direccionalidad según el gradiente mecánico, así como obtener formas celulares alargadas en la dirección de movimiento, simulando la polarización mostrada por las células en experimentos *in-vitro*.

Los factores químicos que pueden condicionar la migración incluyen a través de d^C . Este parámetro compara el valor de la concentración de factor químico en cada elemento con los elementos adyacentes. Por tanto:

$$d_C = \frac{\Delta C_{cell}}{C_{max}} \quad \text{ec. 2-19}$$

donde ΔC_{cell} es la variación de la concentración de factor químico en cada elemento considerado y C_{max} el valor máximo que puede tomar la concentración de un determinado factor químico.

La dependencia respecto al fluido intersticial se introduce a través de d^F . Con ello se tiene en cuenta la dirección del flujo como posible condicionante de la migración celular. En condiciones normales, se ha detectado experimentalmente [2] que poblaciones pequeñas de células migran siguiendo las líneas de flujo, Sin embargo, se ha visto que la razón para ello es el arrastre aguas abajo de factores químicos segregados por la propia célula. Al bloquear ciertos receptores de la membrana, la célula cambia completamente su comportamiento, migrando

aguas arriba guiada por el estímulo mecánico de la mayor presión que le causa el flujo en la parte frontal.

Aunque se ha realizado un estudio detallado y completo (apartado 3.1), por simplicidad se ha introducido en las funciones de probabilidad como dos casos separados.

Caso normal:

$$d_+^F = \begin{cases} \cos \varphi & -\frac{\pi}{2} < \varphi < \frac{\pi}{2} \\ 0 & \frac{\pi}{2} \leq \varphi \leq \frac{3\pi}{2} \end{cases} \quad d_-^F = \begin{cases} 0 & -\frac{\pi}{2} < \varphi < \frac{\pi}{2} \\ |\sin \varphi| & \frac{\pi}{2} \leq \varphi \leq \frac{3\pi}{2} \end{cases} \quad \text{ec. 2-20}$$

Caso con receptores celulares bloqueados:

$$d_+^F = \begin{cases} 0 & -\frac{\pi}{2} < \varphi < \frac{\pi}{2} \\ |\cos \varphi| & \frac{\pi}{2} \leq \varphi \leq \frac{3\pi}{2} \end{cases} \quad d_-^F = \begin{cases} |\sin \varphi| & -\frac{\pi}{2} < \varphi < \frac{\pi}{2} \\ 0 & \frac{\pi}{2} \leq \varphi \leq \frac{3\pi}{2} \end{cases} \quad \text{ec. 2-21}$$

donde φ es el ángulo formado por dirección del flujo con la dirección de cada elemento. Al igual que ocurría en factores anteriores, las funciones para la aparición de elementos varían con el coseno del ángulo, mientras que la para la desaparición varían con el seno, ya que de nuevo, se trata de simular la polarización de la célula en la dirección del gradiente.

Adicionalmente a todos estos factores, se considera una probabilidad aleatoria completamente independiente para reproducir la naturaleza estocástica de la migración celular. Para ello, se introduce una dirección aleatoria y se calculan las probabilidades de manera muy similar a otros factores direccionales (como gradientes o flujo).

Estas probabilidades quedan:

$$p_+^{rand} = p_{+,max}^{rand} \left(1 - e^{\lambda_+^{rand} d_+^{rand}} \right) \quad \text{ec. 2-22}$$

$$p_-^{rand} = p_{-,max}^{rand} \left(1 - e^{\lambda_-^{rand} d_-^{rand}} \right) \quad \text{ec. 2-23}$$

donde $p_{+,max}^{rand}$, $p_{-,max}^{rand}$ son las probabilidades máximas de aparición y desaparición respectivamente, y λ_+^{rand} , λ_-^{rand} son las constantes de sensibilidad. Las variables aleatorias tomarán los siguientes valores:

$$d_+^{rand} = \begin{cases} \cos \gamma & -\frac{\pi}{2} < \gamma < \frac{\pi}{2} \\ 0 & \frac{\pi}{2} \leq \gamma \leq \frac{3\pi}{2} \end{cases} \quad d_-^{rand} = \begin{cases} 0 & -\frac{\pi}{2} < \gamma < \frac{\pi}{2} \\ |\sin \gamma| & \frac{\pi}{2} \leq \gamma \leq \frac{3\pi}{2} \end{cases} \quad \text{ec. 2-24}$$

donde γ es el ángulo formado entre la dirección aleatoria con la dirección de cada elemento.

2.2.4 Degradación ECM

En la migración proteolítica, la matriz se degrada por acción de secreciones celulares que rompen sus moléculas, deteriorando sus propiedades mecánicas y/o creando cavidades macroscópicas que hacen posible su movimiento [6]. Tras el paso de la célula se crean unos canales a lo largo de la trayectoria que sirven de guía para otras células facilitando su migración (*contact-guidance*)[30]. Dado que es un proceso complejo y que se está simulando la migración de una sola célula, la degradación de la ECM se ha incluido en el modelo de manera simplificada. En cada incremento se evalúa la posición de los elementos perimetrales, y los elementos de la matriz en contacto con ellos se degradan, sufriendo una reducción de su módulo elástico:

$$E = E_0(1 - d) \quad \text{ec. 2-25}$$

Donde E hace referencia al nuevo módulo elástico de la matriz, E_0 al módulo elástico anterior a la degradación y d se utiliza para designar al parámetro de degradación temporal. La determinación del parámetro d requeriría por sí sola la realización de experimentos específicos para determinar la pérdida de masa de la matriz debido a la acción de las metaloproteinasas celulares. Dado que esto está fuera del alcance del presente proyecto, se ha escogido d como un porcentaje fijo proporcional al incremento de tiempo (Tabla 1).

2.3 Implementación numérica

El modelo propuesto se implementa numéricamente siguiendo un esquema iterativo como el mostrado en la Figura. 5. Cabe destacar, que el problema fluido-químico se considera en estado estacionario y por lo tanto es calculado previamente y utilizado en todas las iteraciones. Además, se asume que los efectos de una sola célula en los resultados del análisis de un dispositivo microfluídico son despreciables. De esta manera, se separa del análisis mecánico, aunque ambos actúan como entrada para el cálculo de las funciones de probabilidad. El proceso completo se ordena de la siguiente manera:

- 1- Resolución del problema fluido-químico.
- 2- Posicionamiento inicial de la célula.
- 3- Resolución del problema mecánico.
- 4- Cálculo de probabilidades de aparición/desaparición de elementos
- 5- Actualización de la forma de la célula
- 6- Degradación de la ECM
- 7- Vuelta al punto 3.

2.3.1 Análisis fluido-químico

Para la simulación del problema fluido-químico, se toma como referencia el dispositivo microfluídico utilizado en [2] para el estudio de la migración de células cancerígenas. Se consideran las mismas condiciones del experimento y se validan los resultados obtenidos con los datos publicados.

Referente al dispositivo se han de hacer ciertas consideraciones de diseño y de las condiciones de ensayo, ya que ambas resultan determinantes en los resultados obtenidos. En el caso del dispositivo utilizado (Figura. 6) para la simulación de este modelo se distinguen 3 zonas bien diferenciadas: canal de acceso, zona de gel y canal de salida.

El canal de entrada y el canal de salida se utilizan para regular el flujo a través del gel por medio de presión hidrostática, así como las condiciones químicas mediante gradientes de concentración. Las células, son introducidas en la parte central del gel a través de unos canales laterales no mostrados en la figura. Esta zona, que actuará como la ECM para la célula, se sujeta mediante unos micropostes para evitar ser arrastrada por el flujo. Este gel es concretamente Colágeno I, un material poroso cuyo modulo elástico puede tomar valores en un rango bastante amplio y se citan adecuadamente en cada experimento realizado.

Estos dispositivos presentan una versatilidad enorme, y se pueden realizar numerosos ensayos en un mismo aparato simplemente fijando diferentes condiciones de entrada/salida. En nuestro modelo se establece una presión de 40Pa en los canales de entrada y de 0Pa en la salida, lo que genera un campo de flujo a través del gel (Figura. 6). Otra condición de contorno que es necesario determinar a la hora de llevar a cabo la simulación es considerar que tanto los postes como las paredes del dispositivos son zonas impermeables que el fluido no puede atravesar y en ellas la velocidad del fluido adquiere valor nulo ($v=0$). Esta condición recibe el nombre: *no-slip*. Los parámetros utilizados y condiciones impuestas pueden consultarse en la Tabla 2.

| Condición | Descripción | Valor | Unidades |
|----------------|--|------------|------------------------------|
| P_i | Presión canales entrada | 40 | [Pa] |
| P_o | Presión canales salida | 0 | [Pa] |
| $v_{boundary}$ | Velocidad en el contorno de las regiones impermeables (<i>no-slip condition</i>) | 0 | [$\mu\text{m}/\text{seg}$] |
| κ | Permeabilidad del medio | 10^{-13} | [m^2] |
| μ | Viscosidad del fluido | 1000 | [Pa·seg] |
| ρ | Densidad del fluido | 1000 | [Kg/ m^3] |

Tabla 2: Valores de los parámetros utilizados y condiciones impuestas para la simulación del dispositivo.

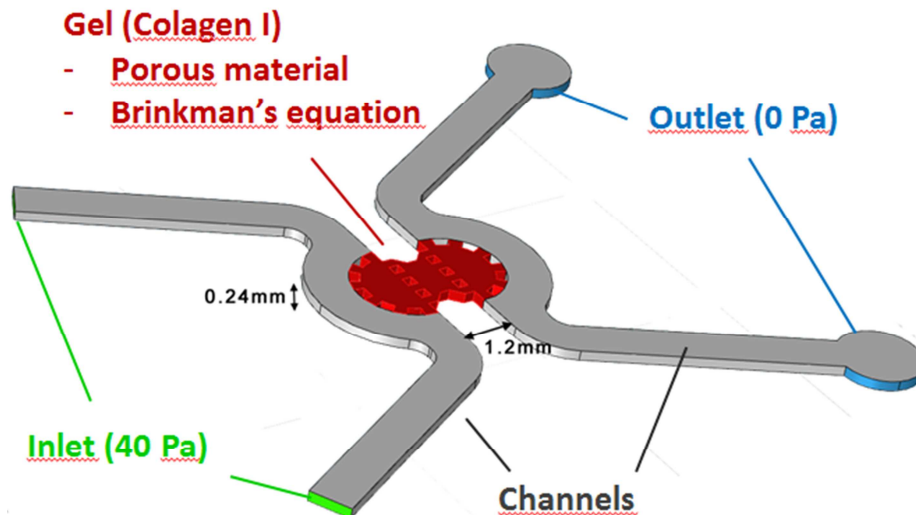


Figura. 6: Dispositivo microfluídico utilizado para los ensayos.

El dispositivo consta de: canales de entrada, canales de salida y zona de gel. En los canales de entrada se impone como condición de contorno una presión constante de 40Pa, y en los de salida una presión de 0Pa. De esta forma se produce un flujo intersticial que atraviesa la zona de gel. El material que constituye la ECM para la simulación es un material poroso (Colágeno I), por tanto la velocidad del flujo a que lo atraviesa se obtiene resolviendo la ecuación de Brinkman.

Para estudiar las líneas de flujo, perfil de velocidades y gradientes químicos, se resuelve la ecuación de Brinkman ya mencionada en el apartado 2.2.2 mediante un software de elementos finitos (MEF). Específicamente el módulo de microfluídica de COMSOL Multiphysics, especialmente indicado para dispositivos de este tipo. Debido a la necesidad de una alta precisión (ya que los resultados de esta simulación determinan las condiciones fluido-químicas del modelo completo) se ha utilizado una malla muy fina (430.000 tetraedros) lo cual ha implicado un alto coste computacional (70 Gb de memoria RAM, 10 h. de cálculo). Una vez alcanzado el estado estacionario, los resultados son almacenados en un fichero. De todo el dominio, se selecciona una pequeña parte de gel que será sobre la que trabaje para el resto de la simulación.

2.3.2 Análisis mecánico

Debido a que las dimensiones del dispositivo son muy grandes en comparación con la célula y que el análisis de toda la región de gel resultaría un cálculo demasiado costoso para el análisis mecánico, se considera únicamente una parte de la región de gel del dispositivo microfluídico (Figura. 7), asumiendo que la posición de la célula en las simulaciones nunca sobrepasará los límites establecidos. De igual modo se asume que las tensiones y desplazamientos generados por la célula tienen un carácter local y por lo tanto no se ven afectadas por las condiciones de contorno (siempre y cuando se encuentren los suficientemente lejos). A continuación se establecen las condiciones de contorno iniciales para el problema mecánico. Por las razones descritas anteriormente, las caras externas del gel se consideran empotradas (desplazamientos impedidos) y las únicas fuerzas actuantes son las ejercidas por la propia célula. La célula se sitúa en el centro de la pequeña porción de gel

seleccionada ($300\mu\text{m} \times 300\mu\text{m} \times 120\mu\text{m}$). Tanto la célula como la ECM están mallados con vóxels de $3\mu\text{m}$ de lado (Figura. 7). Esto hace un total de 400.000 elementos hexaédricos (tipo C3D8), de los cuales 515 son célula (inicialmente), con una morfología aproximadamente esférica y de diámetro $30\mu\text{m}$.

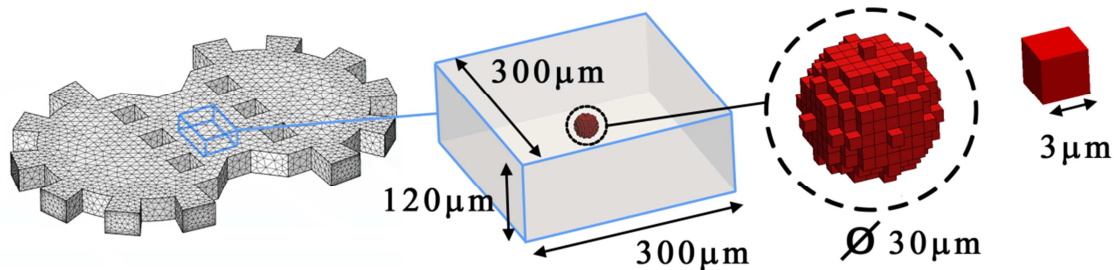


Figura. 7: Posición y dimensiones iniciales de la célula.

Para el análisis mecánico se considera únicamente una pequeña región de la zona de gel, en concreto una matriz en forma de paralelepípedo de dimensiones ($300\mu\text{m} \times 300\mu\text{m} \times 120\mu\text{m}$). Para llevar a cabo la simulación mediante el software de MEF se considera en el instante inicial un célula de $30\mu\text{m}$ de diámetro y constituida de vóxels cúbicos de $3\mu\text{m}$ de arista. La célula se posiciona inicialmente en el centro de la matriz. Nótese que la malla que constituye al gel en el dispositivo y la malla finalmente utilizada para el análisis mecánico (voxelizada) son distintas, y por lo tanto los resultados fluido-químicos son extrapolados a las coordenadas correspondientes.

El análisis mecánico correspondiente al proceso de *mechano-sensing* proporciona el mapa de tensiones y desplazamientos tanto en los elementos que forman la célula como en la matriz extracelular. Por medio de un paquete de software comercial (Simulia-ABAQUS FEA 6.9) mediante el uso de subrutinas de usuario se introduce el comportamiento activo de la célula. El coste computacional es de alrededor de 30 Gb de memoria RAM, y cada incremento de tiempo simulado (5 minutos) equivale a 2 horas reales. Todos los resultados obtenidos son exportados en cada incremento temporal para calcular las funciones de probabilidad, como se detalla en el siguiente apartado.

2.3.3 Cálculo de probabilidades

Las probabilidades de aparición o desaparición de elementos se computan mediante un script propio, usando el software MATLAB. Para ello se almacenan en matrices tridimensionales todos los parámetros obtenidos de los análisis fluido-químico y mecánico. A cada elemento de la célula, se le asignan los valores almacenados en los componentes correspondientes de dicha matriz. De hecho, las probabilidades de aparición/desaparición sólo se calculan para los elementos que conforman el contorno celular en cada incremento temporal. A la hora de comprobar las probabilidades de los elementos en contacto con el contorno celular, se considera conectividad 6 (Figura. 8), es decir, que únicamente son susceptibles de ser computados en el proceso de aparición/desaparición aquellos elementos que tengan por lo menos una cara en contacto con la del elemento del contorno tratado en ese momento.

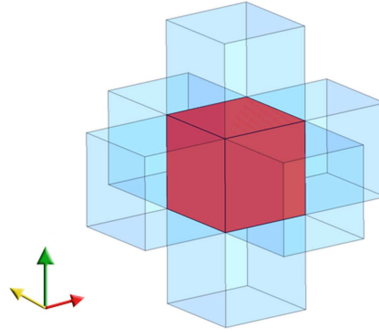


Figura. 8: Esquema de la conectividad considerada-6 utilizado en la simulación.

A modo de ejemplo, la Figura. 9 muestra los parámetros involucrados en el cálculo de probabilidad para el caso del gradiente de tensión (apartado 2.2.3). Se presentó θ como el ángulo comprendido entre cada elemento y el gradiente de tensión. La “dirección del elemento” hace referencia a la dada por el vector que va desde el centroide del elemento del contorno computado hasta el centroide de su adyacente (del cual se esta computando la probabilidad de aparecer o desaparecer) Al considerar conectividad 6 y estar todo el dominio compuesto por hexaedros regulares, esta dirección siempre será una de las direcciones cartesianas ($\pm X, Y, Z$). Para determinar la dirección del gradiente, se toma el elemento con mayor tensión (obtenido en el problema mecánico) y se une su centroide con el centroide geométrico de la célula. En el caso existir varios elementos con máxima tensión, se elige uno de ellos aleatoriamente. En el ejemplo mostrado en la figura, el elemento superior tendría cierta probabilidad de aparecer (en función de θ_1) mientras que el elemento lateral tendría probabilidad nula (al menos la correspondiente a este factor), al ser θ_2 mayor de 90° (ec. 2-17).

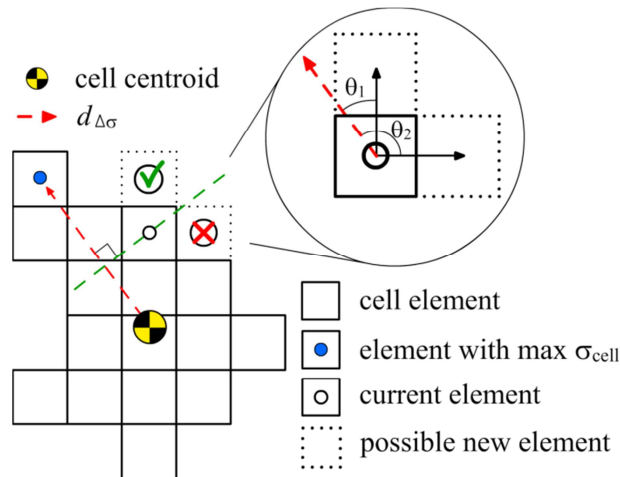


Figura. 9: Esquema de la migración en función de la dirección del gradiente de tensión.

La dirección de gradiente de tensión viene dada por el vector que une el centroide de la célula con el elemento de máxima tensión, en detalle se muestra la posible dirección de migración del elemento actual hacia sus adyacentes. Los ángulos θ_1 y θ_2 son los formados entre la dirección del elemento y la dirección del gradiente.

De igual forma se realiza el cómputo de probabilidades conforme al ángulo de la dirección del elemento con la dirección de flujo intersticial (φ). En general, los factores que conllevan una dirección, dividen la célula en dos partes. En la mitad delantera hay mayor

probabilidad de aparición de elementos y la mitad trasera de desaparición, con lo cual se espera que la célula avance preferentemente alineada con el factor correspondiente.

Por lo tanto, utilizando las funciones descritas hasta ahora, se asigna a cada uno de los elementos adyacentes a la célula un valor de probabilidad. Sin embargo, pueden surgir conflictos como consecuencia de la geometría (un mismo elemento puede aparecer por estar en contacto con diferentes elementos del contorno). Para solventarlos, se computan todas las probabilidades al mismo tiempo, y se elige aquella que sea mayor para cada posible elemento.

Cabe recordar, que aparte de las probabilidades condicionadas por factores, también se incluye una probabilidad de carácter estocástico. El cálculo es análogo al del ejemplo anterior, con la única diferencia de que la dirección “preferente” es obtenida aleatoriamente de una distribución equiprobable. Este factor, al igual que los anteriores, puede ser activado o desactivado en función del carácter de la simulación a realizar.

Para evitar posibles problemas derivados del excesivo decrecimiento del volumen de la célula o que su tamaño llegue a adquirir valores demasiado grandes, se acota el tamaño celular superior e inferiormente. El tamaño mínimo que la célula puede alcanzar es el de la célula de partida (515 elementos), y el máximo es 1,15 veces su volumen (592 elementos). Este valor se ha definido de manera arbitraria debido a la falta de datos experimentales en 3D en literatura.

2.3.4 Actualización forma célula

Una vez se ha asignado un valor probabilístico de aparición/desaparición a los elementos susceptibles de ser añadidos/eliminados, y de nuevo mediante un Script de MATLAB, se generan valores aleatorios para cada elemento y se computa cuales de ellos finalmente aparecerán/desaparecerán.

A continuación se actualiza la forma de la célula almacenando diferentes parámetros (volumen, área de adhesión, centroide geométrico, factor de forma etc.) así como los listados de los elementos que son célula, cuáles pertenecen al contorno, etc. Esta nueva geometría, es introducida de nuevo como entrada para el próximo incremento de tiempo, por lo que el problema mecánico es calculado de nuevo con la nueva distribución. Todo ello, además, es almacenado en ficheros para ser post-procesado permitiendo una visualización 3D de los cambios acontecidos en cada incremento de tiempo.

Por último, un script se encarga de simular la formación de filopodios. Para ello se calcula el elemento más alejado del centroide de la célula en cada dirección (y cada sentido de la misma) y se añade un elemento extra con una sola cara en contacto con el contorno. Este elemento “exploratorio”, gracias al proceso de *mechano-sensing*, permitirá a la célula un cálculo más preciso de la dirección de tensión máxima en el próximo incremento.

2.3.5 Técnicas de visualización

La visualización de los resultados obtenidos se realiza a través de diversas técnicas en función de la naturaleza de los mismos. Por un lado todas las variables de interés (tensiones, desplazamientos, trayectoria, factor de forma, área de adhesión, elementos que conforman la célula etc.) son almacenadas en ficheros de texto en formatos entendibles o bien por ParaView o bien por MATLAB, lo que permite su análisis de forma directa. Por otro lado y por medio de scripts, se automatiza el postprocesado de datos, haciendo que el análisis sea mucho más fácil y rápido.

Se hace especial hincapié en enfatizar que la migración simulada es un proceso tridimensional, y para ello los videos son la mejor herramienta para visualizar los resultados. Con tal fin, se ha desarrollado una rutina que permite obtener las coordenadas de los elementos del contorno y transformarlas a un formato legible por el software VMD. Con ello se consigue generar una superficie celular más suavizada y se obtienen las diferentes capturas que compondrán la correspondiente película.

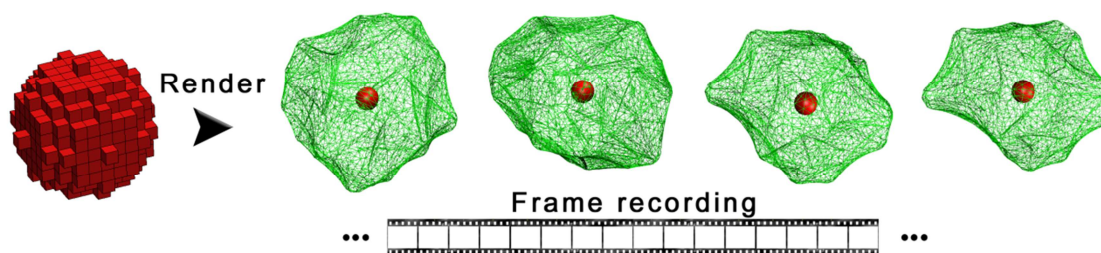


Figura. 10: Técnicas de visualización.

Las coordenadas del contorno y del centroide celular, son procesadas por un script de Matlab y transformadas a un formato entendible por VMD para una visualización 3D de mayor calidad.

2.3.6 Software utilizado

A lo largo de la implementación numérica se ha citado el software utilizado en cada parte de la simulación. Dada la variedad de software utilizado, se introduce esta sección a modo de síntesis (Figura. 11).

El código principal con el que se lleva a cabo la computación de la migración celular se ha implementado mediante diferentes scripts de MATLAB. La computación del proceso de migración, se basa en diferentes estímulos, tanto mecánicos como químicos. Los estímulos mecánicos provienen de resolver el problema mecánico (ecuaciones de equilibrio global tanto en la célula como en el sustrato, ec. 2-3 y ec. 2-4) para lo cual se utiliza el software ABAQUS. Los estímulos fluido-químicos provienen de la simulación del microdispositivo. Para ello se resuelven las ecuaciones de convección-difusión para el transporte de sustancias químicas, así como la ecuación de Brinkman para flujo a través de medios porosos (ec. 2-11) a través del software COMSOL MULTIPHYSICS.

La visualización de los resultados obtenidos tanto de la computación de la migración como de la resolución del problema mecánico se realiza mediante ParaView y VDM, ambos software libre. Para la simulación fluido-química a nivel celular, es necesario llevar a cabo un postprocesado de los resultados obtenidos. Mediante puntos del contorno se reconstruye por completo una superficie suavizada de la célula. Esto se hace mediante el software Rhinoceros, indicado especialmente para el tratamiento de imágenes.

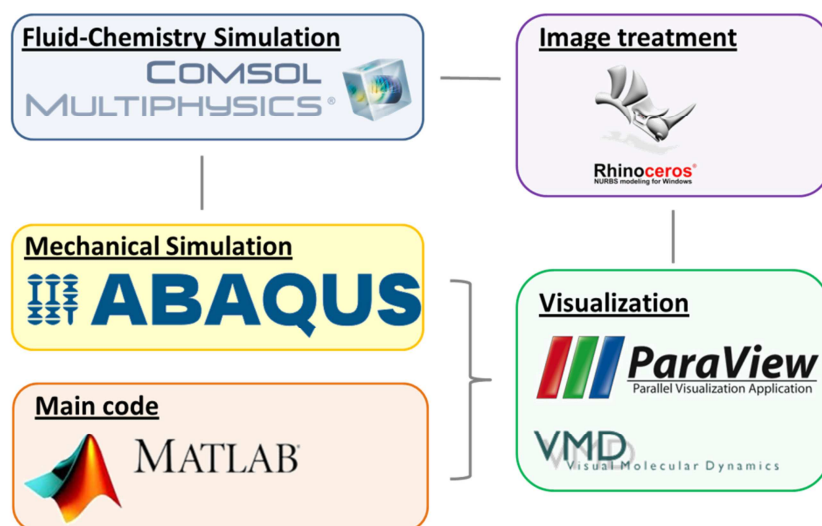


Figura. 11: Software utilizado en la simulación, postprocesado y visualización de resultados. El modelo computacional utilizado en este trabajo, se implementa principalmente a través de diferentes scripts de MATLAB, que componen el código principal. La computación se realiza en base a ciertos estímulos tanto mecánicos como fluido químicos, obtenidos de la realización de simulaciones independientes mediante el software ABAQUS y COMSOL respectivamente. Para ciertas simulaciones específicas, los resultados son procesados mediante un software de tratamiento de imágenes, Rhinoceros. Por último la visualización de resultados y el postproceso se produce a través del software libre ParaView y VMD.

3. Resultados

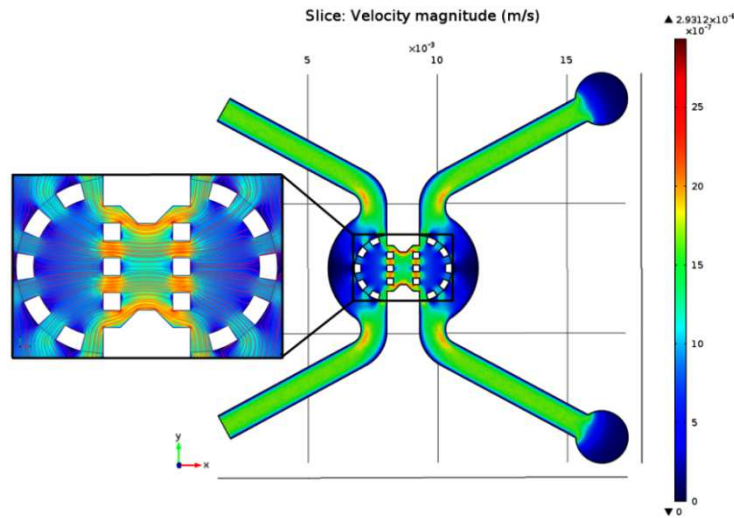
3.1 Simulación del microdispositivo

Como se comenta en el apartado 1.1, el efecto de una única célula sobre el estudio del flujo intersticial en un dispositivo completo se considera mínimo y por tanto se asume como despreciable. Además, se busca resolver el dispositivo en situación estacionaria, ya que es una vez desarrollado el flujo cuando se realizan las medidas experimentales. Por lo tanto y dado que las condiciones fluídicas adquieren un valor constante en el transcurso temporal, basta con realizar una simulación del dispositivo de forma previa a la simulación de la migración.

Bajo las condiciones expuestas en el apartado 2.3.1 se obtienen el valor de la velocidad de flujo, las líneas de flujo, caída de presión y concentración de sustancias químicas en todos los puntos del dispositivo. Los resultados muestran como la velocidad aumenta en las zonas de menor sección de paso, viéndose afectada en gran parte la parte central de la zona de gel donde la velocidad aumenta en la región existente entre los postes. En las zonas situadas tras los postes la velocidad decrece debido al “efecto sombra” ejercido por los postes de sujeción. Es en la zona situada en la parte central del gel en la que más debe centrarse el análisis, ya que de los valores aquí obtenidos dependerán los resultados a obtener de la simulación del proceso de migración. La velocidad máxima obtenida es $2.93\mu\text{m}/\text{seg}$, un valor muy similar al obtenido en [2] ($3\mu\text{m}/\text{seg}$) tanto experimentalmente como en una simulación 2D realizada con las mismas condiciones y geometría. Las líneas de corriente en la región central, presentan una orientación prácticamente alineada con la dirección X, como se observa en la (Figura. 12A).

El hecho de llevar a cabo una simulación tridimensional del dispositivo posibilita el estudio de la variación de la velocidad y líneas de corriente con la profundidad. Como se observa en los resultados el efecto de los límites superiores e inferiores, es claramente reconocible por una menor velocidad de flujo en la cercanía del contorno (hasta hacerse nula en las paredes) y mayor velocidad en la parte central de las secciones de paso (Figura. 12B). De nuevo los resultados de mayor interés son los pertenecientes a la región central de la zona de gel, en donde se estudiará la migración celular utilizando el modelo desarrollado.

A



B

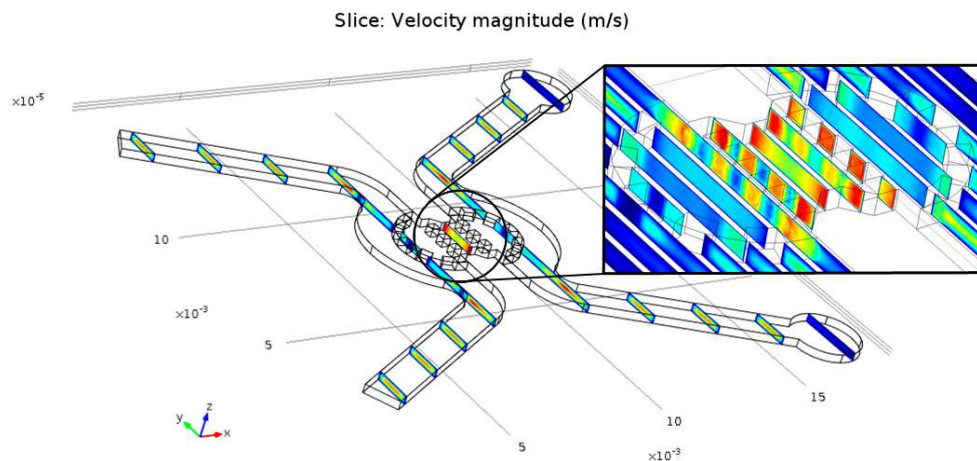


Figura. 12: Simulación fluídica del dispositivo.

Se simula el dispositivo bajo la influencia de un flujo intersticial estacionario obteniéndose (A) el perfil de velocidades en todo el dispositivo y líneas de flujo y perfil de velocidades en la zona de gel, donde se simula la migración celular, (B) diferentes planos transversales al dispositivo en los que se muestran la variación de la velocidad en esta dirección y evidencian la tridimensionalidad de la simulación.

Con respecto a la presión se observa que la mayor caída se produce en el medio poroso (gel), mientras que la pérdida de carga en los canales en estado estacionario es prácticamente nula. La caída de presión en la región central de la zona de gel adquiere un valor prácticamente lineal con X, más concretamente cae desde 25Pa hasta adquirir un valor de 15Pa (Figura. 13). De igual modo la concentración química en estado estacionario presenta un perfil eminentemente lineal, como se muestra en el apartado siguiente.

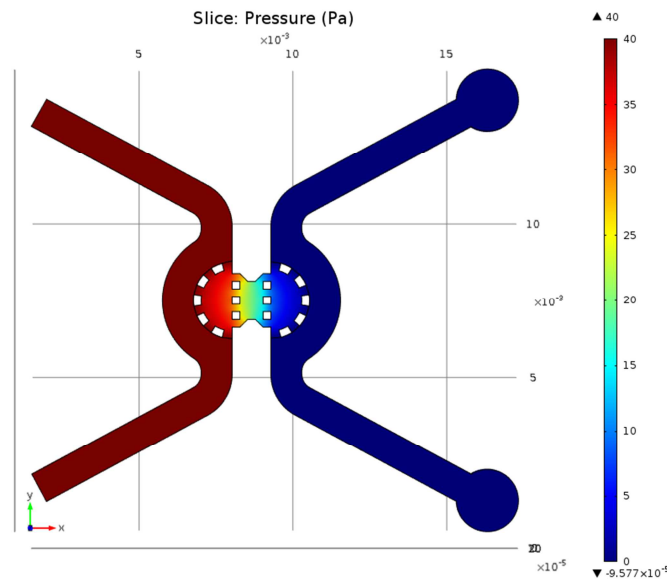


Figura. 13: Caída de presión en el dispositivo microfluídico.

La caída de presión producida en los canales por pérdidas de carga es totalmente despreciable respecto a la producida en la zona de gel (material poroso). En la región central de la zona de gel, la caída de presión adquiere un valor lineal con la coordenada x .

3.2 Simulación fluido-química a nivel celular

Una vez resuelto el problema global, para valorar el efecto que la presencia de una célula tiene sobre el flujo intersticial y viceversa, y sobre la posible presencia de un factor químico autocrino secretado por la célula, se lleva a cabo una simulación fluido-química a nivel celular. Partiendo de una célula generada en una simulación anterior y elegida por su morfología polarizada, se malla su superficie en función de los vóxeles que la constituyen utilizando un script de Matlab combinado con el software VMD. Posteriormente se lleva a cabo un renderizado de la malla mediante el Software Rhinoceros (Figura. 14). De esta forma se obtiene un volumen que puede ser importado por COMSOL para someterse a la simulación. Para ello se considera la célula embebida en un volumen control cúbico en cuyas fronteras se imponen condiciones de contorno obtenidas en la simulación del dispositivo microfluídico (Figura. 15).

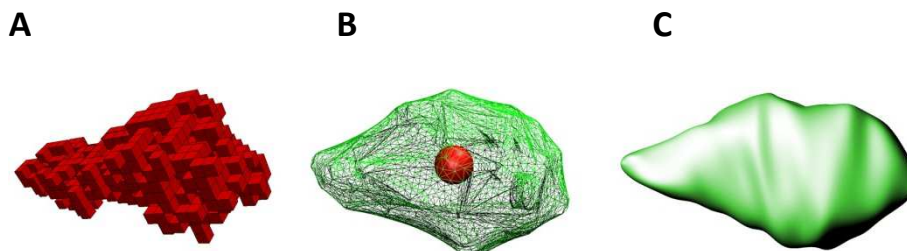


Figura. 14: Evolución de la célula para la simulación fluido-química a nivel celular.

La célula se discretiza en el modelo como (A) un conjunto de vóxeles que aparecen y desaparecen durante el transcurso de la simulación de acuerdo con las funciones de probabilidad. (B) Mediante VMD (software de dinámica molecular) se realiza una representación aproximada de la membrana y su núcleo y (C) mediante Rhinoceros se adapta la malla para para simular en COMSOL la interacción entre la célula, el fluido y un factor autocrino segregado por la propia célula.

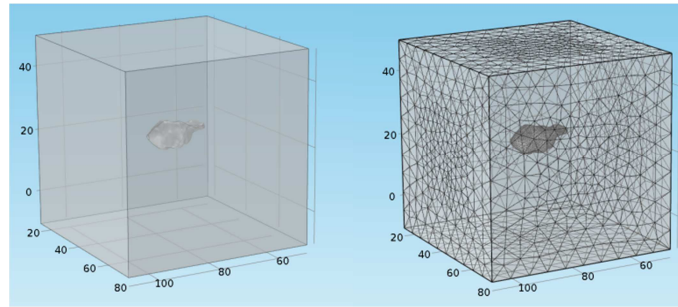


Figura. 15: Volumen de control considerado par simulación fluido-química a nivel celular.

Concretamente se establecen los perfiles de velocidad en la cara frontal y trasera del dominio, considerando en el resto de caras condiciones periódicas. Así mismo, se establece que la velocidad en la superficie celular es 0, y que dicha superficie mantiene de forma constante una concentración de factor autocrino. El resto de condiciones y parámetros utilizados para llevar a cabo la simulación se recogen en la siguiente tabla:

| Condición | Descripción | Valor | Unidades |
|-----------------|----------------------------------|--------------|-----------------------|
| v_i | Velocidad entrada | $2.96e^{-6}$ | [m/s] |
| v_o | Velocidad salida | $2.96e^{-6}$ | [m/s] |
| $v_{cell,surf}$ | Velocidad superficie celular | 0 | [m/s] |
| D | Coeficiente de difusión | 10^{-9} | [m ² /s] |
| c_i | Concentración entrada | 1 | [mol/m ³] |
| c_o | Concentración salida | 0 | [mol/m ³] |
| c_{cell} | Concentración superficie celular | 1 | [mol/m ³] |

Tabla 3: Condiciones y parámetros en la simulación fluido-química a nivel celular.

A la vista de los resultados obtenidos, se observa como la presencia de la célula apenas altera la distribución de las líneas de corriente y que al alejarse ligeramente de la superficie celular su efecto es despreciable incluso en un dominio de estudio tan pequeño, siendo las líneas prácticamente paralelas a la dirección del eje X (Figura. 16A).

El factor químico autocrino previamente comentado, es segregado a través de la superficie celular de forma constante. Como puede observarse en la Figura. 16B, el factor químico se ve arrastrado por la corriente a la que se ve sometida la célula, provocando una concentración media mayor aguas abajo de la célula.

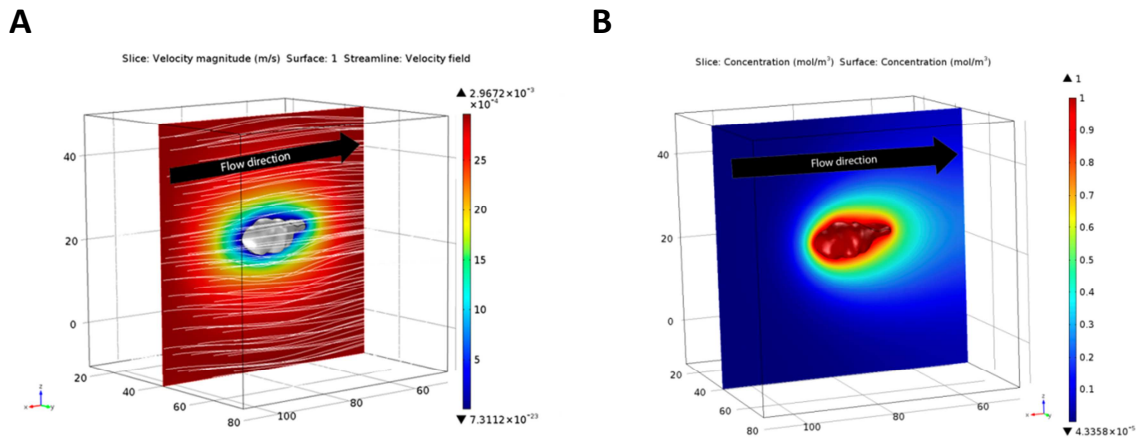


Figura. 16: Líneas de corriente y factor autocrino en la simulación fluido-química a nivel celular.

(A) La interacción sólido-célula provoca que las líneas de flujo se vean alteradas por su presencia, sin embargo, su efecto es tan pequeño que puede considerarse despreciable a nivel del dispositivo completo. (B) En el caso de que la célula segregue un factor químico, la presencia de flujo intersticial provoca que este se vea arrastrado en el sentido de la corriente, creando una acumulación de concentración mayor aguas abajo.

Al igual que la célula ofrece una ligera influencia sobre las líneas de corriente, el fluido interacciona con la superficie celular generando tensiones en función de la exposición de la célula al flujo. La zona que recibe mayor presión es aquella en que la célula es atacada por el flujo, viéndose reducido su valor al avanzar en la dirección del flujo (Figura. 17).

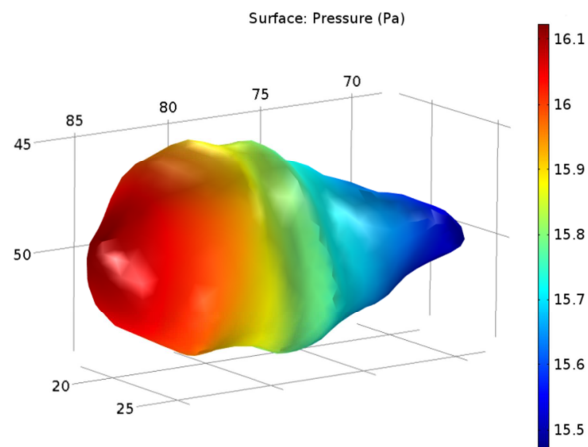


Figura. 17: Distribución de presiones causadas por el flujo intersticial en la superficie celular. Las presiones producidas por el flujo sobre la superficie celular son mayores en la zona de la célula que es atacada directamente por el flujo.

Por otro lado, se lleva a cabo una simulación de un factor químico presente en el medio, cuyos resultados se muestran en la Figura. 18. Como se puede observar la presencia de la célula no ejerce apenas influencia sobre la difusión del factor químico y la concentración de este varía únicamente linealmente con la dirección X.

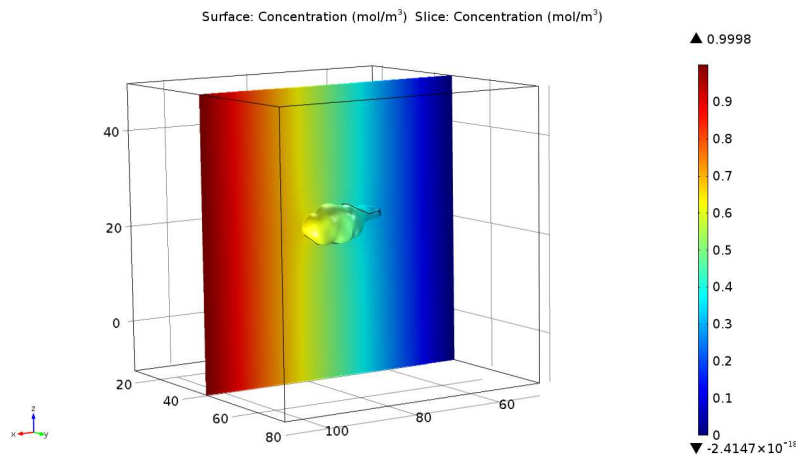


Figura. 18: Simulación de difusión de un factor químico a nivel celular.

Al llevarse a cabo la simulación de difusión de un factor paracrino con carácter estacionario, se obtiene una distribución lineal con la dirección X del gradiente de concentración, no ejerciendo la presencia de la célula apenas influencia.

Estos resultados, en concordancia con otras simulaciones y experimentos recientes [31], confirman las hipótesis utilizadas en la definición de las funciones de probabilidad, aunque como se ha comentado anteriormente, se ha simplificado por el exceso de esfuerzo computacional que supondría una simulación de estas características en cada incremento temporal.

3.3 Simulación mecánica

Tras llevar a cabo el análisis y la validación del modelo mecánico (Anexo IV) se está en condiciones de realizar una simulación completa de la migración considerando el comportamiento mecánico de la célula dentro del dispositivo de ensayo. Para esta simulación, se considera que la célula migra exclusivamente debido a la interacción mecánica célula-matriz (*mechano-sensing*) presentada en el apartado 2.2.1. Por lo tanto, tanto los factores fluido-químicos como el aleatorio no son considerados en este análisis.

En este estudio se han considerado geles de igual geometría pero con diferentes rigideces para poder comparar los resultados obtenidos. En primer lugar se utiliza una matriz cuyo módulo elástico varía linealmente con la coordenada X, (valor 0,001kPa para valor 0 de abscisa y 100kPa en el extremo contrario) (Figura. 19). En segundo lugar se utiliza el mismo tipo de matriz, lineal en x con valor máximo de rigidez 100kPa, pero se considera la matriz de un material degradable. Por último se emplea una matriz, de material no degradable, cuyo módulo elástico toma un valor bajo (0.1kPa) constante al inicio, aumenta exponencialmente en la zona media y se mantiene en un valor alto constante en la zona final (100kPa) (Figura. 19). Los cálculos realizados simulan un tiempo de 500 minutos (8 horas y 20 minutos) implementadas en 100 incrementos temporales de 5 minutos.

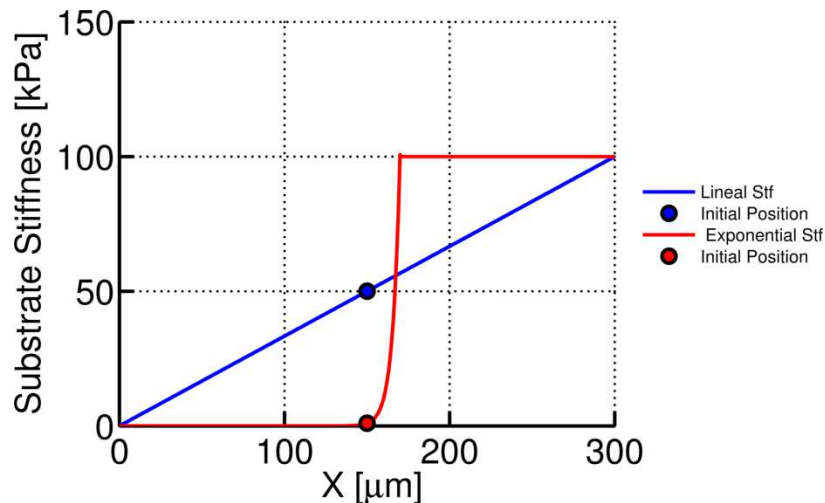


Figura. 19: Gradiente de rigidez del gel (ECM) a lo largo de la dirección X.

Para cada una de las matrices en las que se representa la variación de su módulo elástico en función de la coordenada x, así como el valor de la rigidez en el punto donde se posiciona la célula previo a la simulación

A continuación se exponen, para los tres casos considerados, los resultados obtenidos en relación a: la trayectoria (posición del centroide en cada incremento temporal), el camino recorrido, la velocidad de migración, el factor de forma, el área de adhesión y el mapa de tensiones y desplazamientos. Se analizan por una parte los resultados al comienzo de la simulación y por otra los resultados finales. Con este análisis se pretende remarcar el efecto inmediato de un cambio de rigidez tan brusco (exponencial) y cómo sus efectos se suavizan una vez se alcanza la saturación. Tras los primeros 16 incrementos (punto donde se alcanza dicha saturación) se calcula: la distancia total recorrida (teniendo en cuenta todos los movimientos), la distancia efectiva (distancia entre posición final e inicial), la velocidad media (utilizando la distancia total) y la velocidad efectiva (distancia efectiva recorrida en el tiempo considerado). En todos los casos la distancia total recorrida es muy similar $\sim 25\mu\text{m}$ (Figura. 20A), siendo ligeramente mayor para el caso que considera degradación de la matriz, $27.2\mu\text{m}$. Sin embargo, la distancia efectiva es claramente mayor en el caso con gradiente exponencial ($20.9\mu\text{m}$ frente a $6.9\mu\text{m}$ y $3.4\mu\text{m}$). Así mismo, se observa como, a pesar de que la velocidad media adquiere un valor muy similar para los tres casos considerados ($\sim 0.32\mu\text{m}/\text{min}$), la velocidad efectiva para las matrices de gradiente lineal es bastante menor que la obtenida para la matriz con gradiente de rigidez exponencial (Figura. 20C), concretamente 0.04 y $0.08\mu\text{m}/\text{min}$ frente a $0.25\mu\text{m}/\text{min}$.

Para las matrices de gradiente lineal, a pesar de que la dirección de migración sigue preferentemente la dirección del gradiente (eje X), tiene un marcado carácter aleatorio y por tanto el avance efectivo es mucho menor. Este comportamiento se explica debido a que las dimensiones de la célula son tan pequeñas que apenas existe diferencia entre los valores de rigidez entre el frente y la parte trasera de la célula. Además, para estos valores de rigidez la fuerza ejercida por la célula ha alcanzado casi su valor de saturación, por lo que para variaciones pequeñas de la rigidez, la fuerza ejercida por la célula casi no varía. Por lo tanto, aunque las probabilidades de aparición son altas debido a las altas tensiones, el direccionamiento no está claramente definido y por lo tanto el avance es muy lento. Por otro lado, para la matriz con gradiente de rigidez exponencial la diferencia de valores entre la rigidez de la ECM en la parte frontal y la posterior son bastante pronunciados durante los

3. Resultados

primeros incrementos temporales y por tanto su migración tiene un marcado carácter direccional en la dirección del eje X.

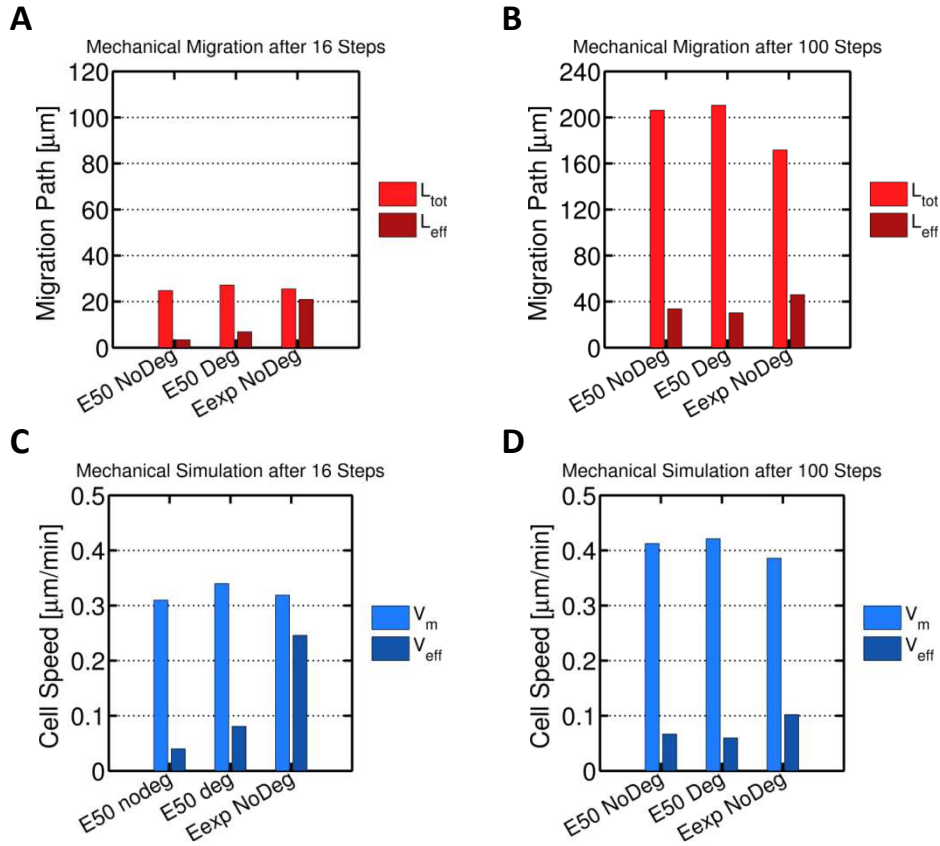


Figura. 20: Velocidad y distancia recorrida por la célula tras 16 y tras 100 steps.

En el caso exponencial fundamentalmente la migración celular tras 16 incrementos temporales muestra un comportamiento diferente al mostrado en los casos lineales tras el mismo transcurso de tiempo. La migración en el caso exponencial tiene un mayor carácter direccional, y consecuentemente menos aleatorio, debido a la mayor diferencia de rigidez entre la parte anterior y posterior de la célula. Por tanto, distancia efectiva y la velocidad son mayores en el caso exponencial que en los casos lineales. Tras la simulación de 100 incrementos temporales los valores de velocidad y distancia obtenidos se mueven en el mismo rango, lo que tiene su explicación en un mayor carácter aleatorio del proceso de migración.

Si se observan los resultados obtenidos tras 100 incrementos temporales, se constata como tanto los valores de velocidad media y efectiva adquieren en los tres casos valores similares ($\sim 0.4 \mu\text{m}/\text{min}$) (Figura. 20C). Para el caso exponencial, una vez superada la zona donde aumenta la rigidez, la célula continúa migrando en esa dirección, pero de forma mucho más aleatoria (por las mismas razones previamente expuestas). Por tanto, debido a la rápida y direccionada migración en los primeros incrementos temporales, la longitud efectiva continua siendo superior a los casos de gradiente lineal, aunque la diferencia es menos pronunciada (Figura. 20D). Si se comparan la velocidad media de cada caso tras 16 y tras 100 steps se observa un incremento de ésta con el transcurso del tiempo. Al ocurrir la migración a lo largo de un gradiente de rigidez, la velocidad de migración aumenta con la rigidez (mayores probabilidades) contribuyendo a un aumento progresivo de la velocidad media de migración, de 0.32 a $0.38 \mu\text{m}/\text{min}$.

En todos los casos estudiados, la evolución del área de la célula es similar. Al representarla en el transcurso del tiempo de simulación se observa como el área de la célula crece en los primeros minutos hasta adquirir un valor medio de $\sim 13500\mu\text{m}^2$ (Figura. 21A).

El factor de forma (ratio entre la parte más larga de la célula con respecto a la más corta), adquiere valores bastante cambiantes debido a las protrusiones formadas a lo largo de la simulación, aunque su valor está acotado entre 1 y 2. En los primeros minutos, se observan valores inferiores a 1.5, lo que significa una baja polarización, ya que la célula todavía está evolucionando desde su forma esférica inicial. Sin embargo progresivamente adquiere valores mayores, sin llegar a superar salvo en algún instante concreto, un factor de forma de 2 (Figura. 21B).

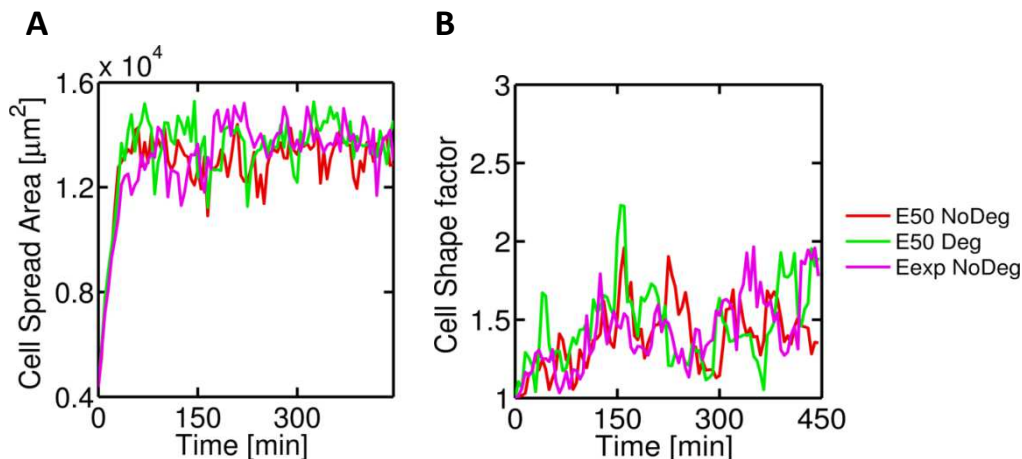


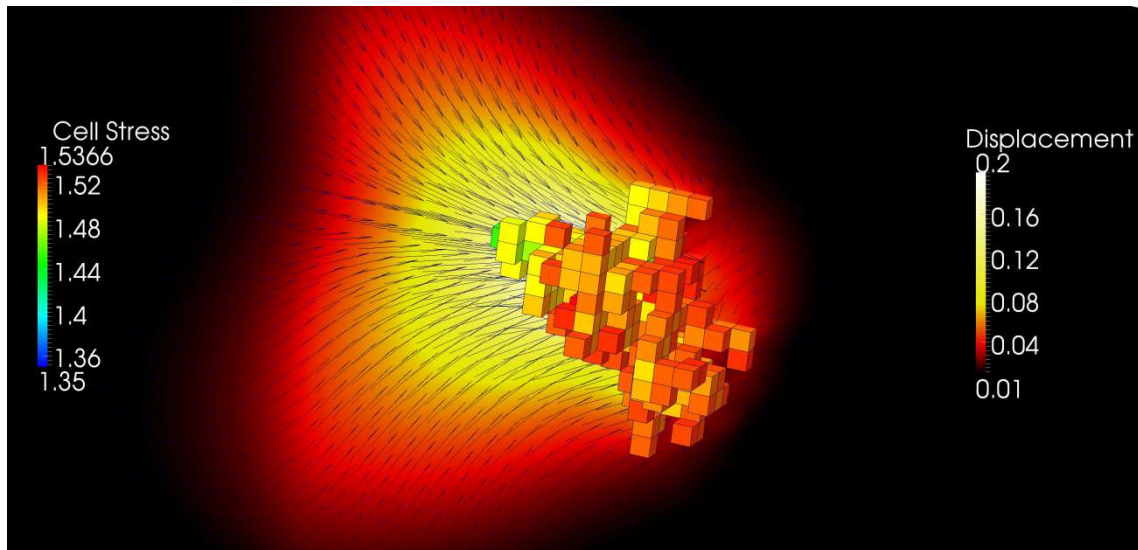
Figura. 21: Área proyectada y factor de forma para simulación mecánica.

(A) El área proyectada experimenta un rápido crecimiento en los primeros incrementos temporales, posteriormente se mantiene en torno a un valor fijo, con variaciones debido a que la morfología celular varía a lo largo de la simulación. (B) El factor de forma muestra un crecimiento al inicio de la simulación que evidencia la polarización celular y tras este periodo de polarización los valores que adquiere van variando en función de la morfología que va adquiriendo la célula con el paso del tiempo.

La Figura. 22 muestra la distribución de tensiones en la célula y los desplazamientos provocados en la ECM. En el caso de gradiente de rigidez exponencial se observa claramente como la tensión de la célula aumenta con el eje x y los desplazamientos son mucho mayores en la parte trasera, donde el módulo elástico es menor (Figura. 22A). En los casos lineales, sin embargo, la distribución de tensiones es más homogénea, ya que la transición del módulo elástico es menos pronunciada. Esto conlleva adicionalmente que la variación en los desplazamientos se produzca de forma más gradual (Figura. 22B).

Si se observan únicamente los resultados obtenidos para las matrices de gradiente lineal, con y sin degradación de la ECM, se constata que el comportamiento en cuanto a velocidad de migración, distancia, factor forma y área proyectada es muy similar no observándose ninguna diferencia significativa. En la Figura. 23 se muestra la degradación del gel por parte de la célula, como se ha descrito anteriormente, la degradación es proporcional al tiempo que un elemento del contorno de la célula ocupa cada posición, por lo que los puntos más alejados y en dirección opuesta al avance son los menos degradados

A



B

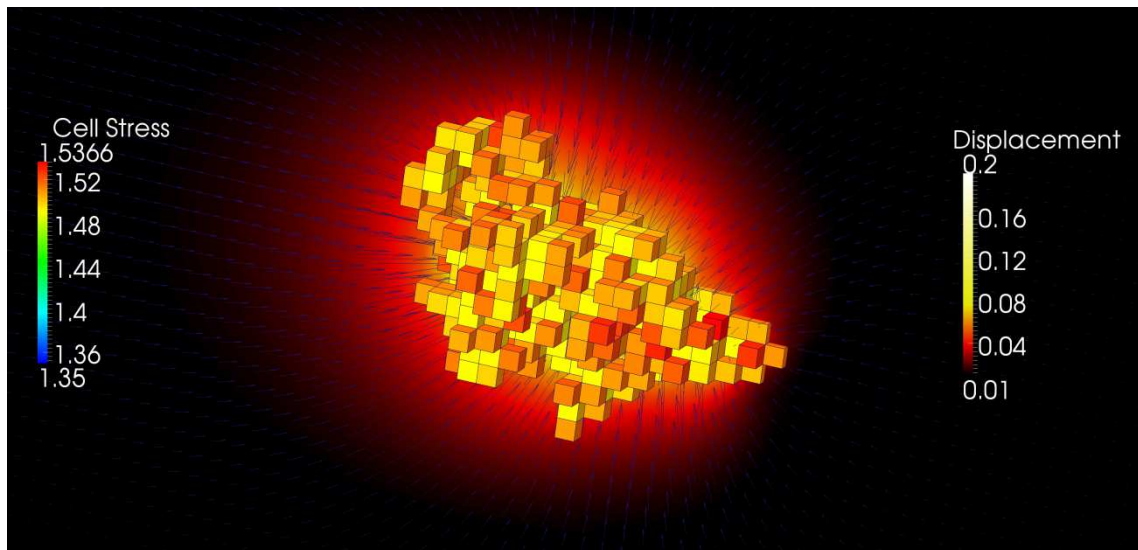


Figura. 22: Mapa de tensiones en la célula y desplazamientos en la matriz extracelular. Las tensiones (kPa) generadas en la célula y los desplazamientos (μm) producidos en la matriz extracelular varían en función del tipo de gradiente de rigidez presente en la matriz. Se muestran las tensiones en los elementos de la célula y los desplazamientos en la ECM tras dos horas de tiempo simulado (A) En el caso de gradiente de rigidez exponencial, se observa como las tensiones celulares aumentan gradualmente en la dirección X y los desplazamientos son altos debido a la menor rigidez del sustrato en la parte trasera. (B) En el caso de gradiente de rigidez lineal, al variar la rigidez de forma menos pronunciada tanto las tensiones como los desplazamientos generados tienen una distribución más homogénea, aunque igualmente direccionada en X.

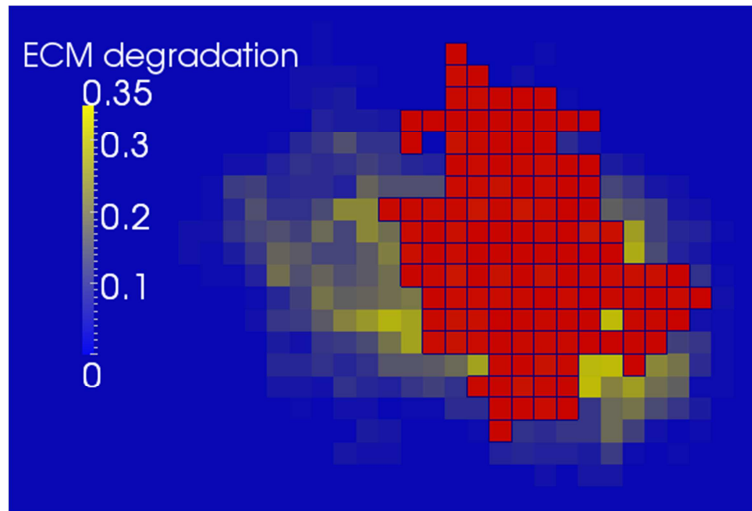


Figura. 23: Degradación de la matriz extracelular.

Tras el transcurso completo de la simulación, en el caso de un sustrato degradable, la célula ha digerido parte de las proteínas que forma la matriz reduciendo su módulo elástico. Se muestra la posición actual de la célula y la degradación llevada a cabo sobre la ECM durante la migración previa.

3.4 Simulación completa

En la siguiente simulación se consideran todos los estímulos condicionantes de la migración celular implementados en el modelo desarrollado, tanto químicos y de flujo como mecánicos. Para poder contrastar las diferentes condiciones de ensayo que se pueden reproducir, se varían las direcciones en las que afectan los diferentes factores considerados. Se simulan los siguientes casos: (i) gradiente de rigidez, flujo intersticial, y gradiente de factor químico: todos ellos en la dirección X y (ii) gradiente de rigidez en la dirección Y, flujo intersticial y factor químico en X.

3.4.1 Caso (i)

En este caso se simula la migración incluyendo todos los estímulos implementados en el modelo actuando en la dirección X con el objetivo de observar que sucede en el caso límite de que todos los condicionantes estimulen a la célula a migrar en la misma dirección. El sustrato simulado será Colágeno I (considerando el material como elástico-lineal) En relación al estímulo mecánico, se introduce un gradiente de rigidez lineal, el mismo al utilizado en el apartado 1.1. El factor químico se implementa de manera normalizada adquiriendo valores que aumentan linealmente con la coordenada X. Toma un valor de 0 en el origen y 1 al final del dominio. Las direcciones del flujo intersticial se introducen a través de los datos obtenidos en la simulación del microdispositivo (apartado 1.1). El resto de constantes, pertenecientes a las funciones de probabilidad toman los valores recogidos en la Tabla 1.

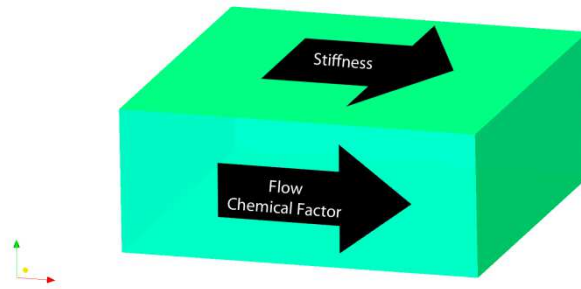


Figura. 24: Esquema de los diferentes estímulos considerados en la simulación. Caso (i).

3.4.2 Caso (ii)

La simulación se lleva a cabo considerando un sustrato que presenta un gradiente lineal de rigidez del mismo valor que el considerado para realizar la simulación basada en estímulos mecánicos (apartado 1.1), con la diferencia de que en este caso el gradiente de rigidez se encuentra en la dirección Y. Por otro lado, en la dirección X, actúan tanto la dirección del flujo como un gradiente de factor químico. Este factor, al igual que en el caso (i) se considera como un valor normalizado que por lo tanto, toma valor 0 en el extremo de menor concentración y valor 1 en el extremo donde la concentración es máxima. Igualmente, las constantes presentes en las funciones de probabilidad adquieren los valores recogidos en la Tabla 1.

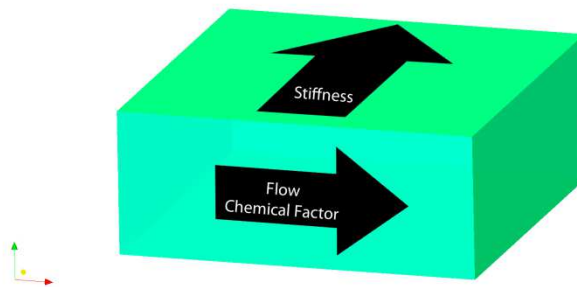


Figura. 25: Esquema de los diferentes estímulos considerados en la simulación. Caso (ii).

3.4.3 Resultados

Los resultados obtenidos de la simulación llevada a cabo para los casos (i) y (ii) muestran como los diferentes estímulos pueden influir en diversos aspectos de la migración celular (trayectoria, distancia recorrida, velocidad, área y factor de forma).

Al actuar varios estímulos en una misma dirección, los efectos considerados para los casos aislados se superponen. En la Figura. 26 se muestran las trayectorias seguidas por la célula en el primer caso (marcadores verdes) y en el segundo (marcadores morados). A modo de comparación se incluye la trayectoria seguida por una célula migrando en dirección X por efecto únicamente de estímulos mecánicos (marcadores rojos) en una matriz de similar rigidez a la del caso (i) (datos obtenidos de la simulación anterior, apartado 1.1).

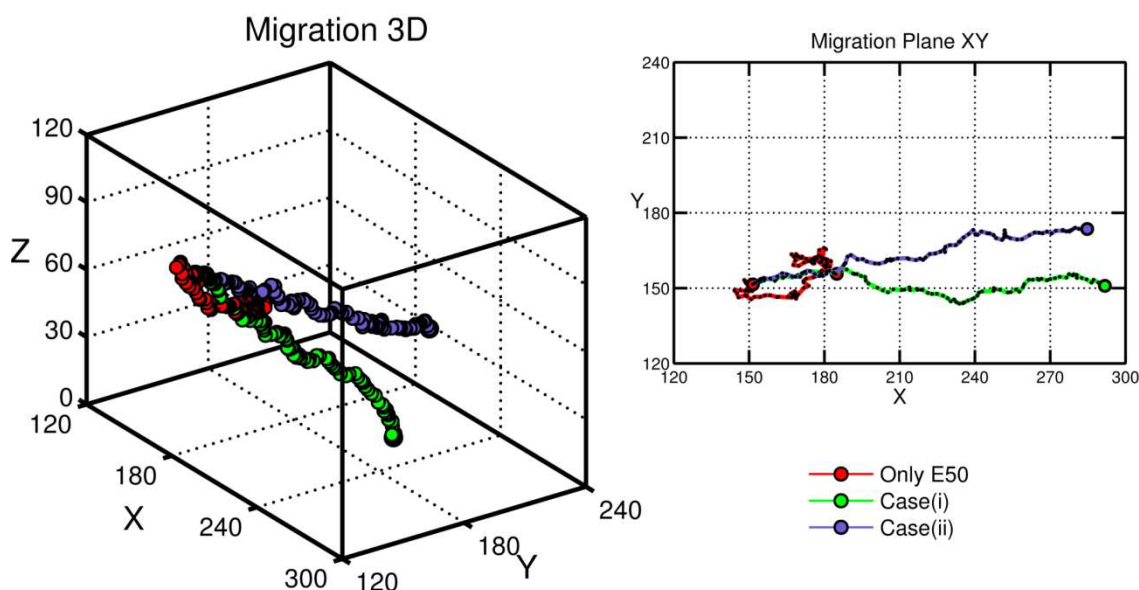


Figura. 26: Trayectoria de la migración celular bajo la influencia de diferentes estímulos.

Se representan los siguientes casos de migración: caso(i) gradiente de rigidez, gradiente químico y flujo intersticial, todos ellos en la dirección X (marcadores verdes). Caso(ii) gradiente de rigidez en dirección Y, gradiente químico y flujo intersticial en la dirección X (marcadores morados). Además se muestra un tercer caso donde no hay química ni flujo, y existe un gradiente de rigidez en dirección X (marcadores rojos). Tanto la migración 3D como la proyección en el plano XY muestran la direccionalidad de la migración para los diferentes casos simulados.

Se observa como en el caso en el que solo influyen factores mecánicos la célula experimenta un movimiento mucho más aleatorio que en los casos en que además se consideran estímulos químicos y de flujo. Para el caso(i) el movimiento transcurre durante toda la simulación casi de forma paralela a la dirección X, siendo las coordenadas de la posición del centroide en el último incremento temporal: 291, 151, 42.5 (inicialmente la célula se sitúa en la posición 150,150,60). En el caso(ii) la célula tiene el estímulo mecánico actuando perpendicularmente al resto de factores, avanzando por tanto también en la dirección del eje Y. Las coordenadas en la última posición del centroide de la célula son en este caso: 285, 173.5, 82.

Los resultados obtenidos acerca de la longitud recorrida en el tiempo total de la simulación (Figura. 27A) muestran un valor similar para ambos casos (197.6 μm frente a 190.9 μm de longitud total y 141.6 frente a 136.6 de longitud efectiva respectivamente). La pequeña diferencia entre los valores de longitud media y efectiva evidencia, que la célula en su movimiento de migración apenas se desvía de la línea que una el punto inicial y final. Es decir, que a pesar de presentar cierta aleatoriedad, se trata de un proceso claramente direccionado. En ambos casos los valores de la longitud efectiva recorrida por la célula adquieren un valor elevado en comparación con los resultados obtenidos al considerar únicamente los estímulos mecánicos, donde la longitud efectiva es de 33.5 μm .

En cuanto a los valores que adopta la velocidad, tanto media como efectiva, como se observa en la Figura. 27B, se sitúan en el mismo rango (0.395 $\mu\text{m}/\text{min}$ y 0.28 $\mu\text{m}/\text{min}$ para el caso(i) y 0.382 $\mu\text{m}/\text{min}$ y 0.27 $\mu\text{m}/\text{min}$ para el caso(ii) respectivamente).

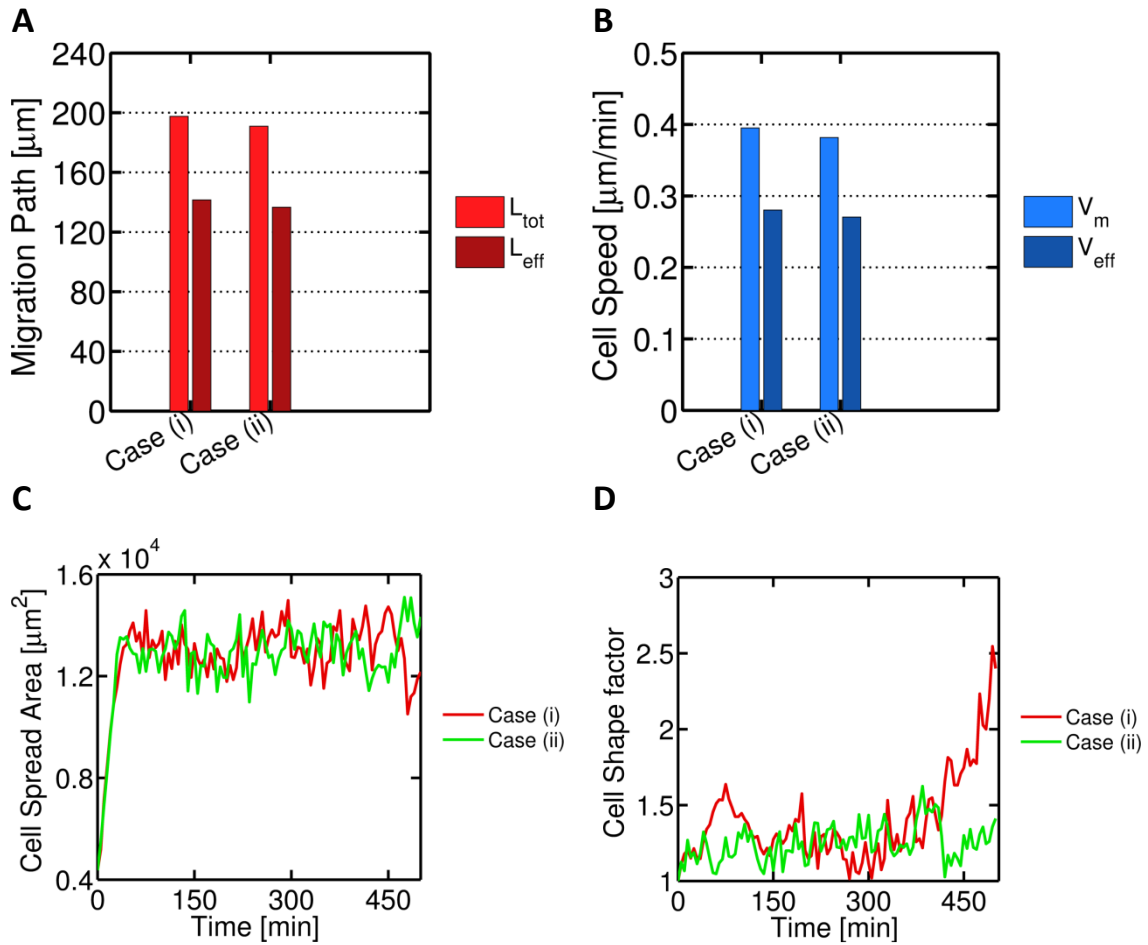


Figura. 27: Resultados simulación basada en estímulos mecánicos y químicos.

En todas las figuras se representan al mismo tiempo los resultados correspondientes a los casos (i) y (ii) de simulación, de forma que se puedan comparar los valores obtenidos para uno y otro caso. A pesar de migrar la célula en diferentes direcciones por los estímulos considerado en cada uno de los ejes coordenados, la distancia recorrida (A), la velocidad de migración (B), el área de proyección (C) y el factor de forma (D) adquieren valores similares. Los valores correspondientes al factor de forma en los últimos incrementos de la simulación son debidos a que la célula ha alcanzado los límites de la región de gel elegida para llevar a cabo la simulación mecánica y al no ser posible el avance en la dirección X, el crecimiento se produce en el plano XY.

El área de la célula (Figura. 27C), como ya se comenta anteriormente en el apartado 1.1, aumenta en los primeros incrementos temporales adquiriendo tras ellos un valor medio prácticamente constante y acotado de aproximadamente $13000\mu\text{m}^2$ para ambos casos. El factor de forma de la célula (Figura. 27D) adquiere valores alternos debido al carácter cambiante de la morfología celular, comprendidos en su gran mayoría entre 1 y 2. Sin embargo, para el caso (ii) se observa como al final de la simulación el factor de forma aumenta hasta valores superiores. Este resultado se explica por el hecho de que debido a las grandes velocidades obtenidas, para este momento la célula ha alcanzado los límites del fragmento de gel considerado para la simulación mecánica. Al no poder avanzar hacia adelante, la célula se extiende en el plano XY, aumentando así su factor de forma. Aunque esto se debe dejar fuera del análisis por tratarse de un caso extremo, es interesante observar lo que ocurriría al llegar a una superficie plana de material infinitamente rígido para caracterizar la respuesta de la célula ante tal situación (por ejemplo un pilar del microdispositivo). Al no poder deformar el sustrato, la célula ejerce una tensión alta, sobre todo en los puntos en contacto con la superficie (Figura.

28). Además, al no poder añadir elementos por la parte delantera, comenzaría a extenderse lateralmente, hasta alcanzar con el suficiente tiempo una forma de disco adherida a la pared, lo cual ha sido observado en experimentos.

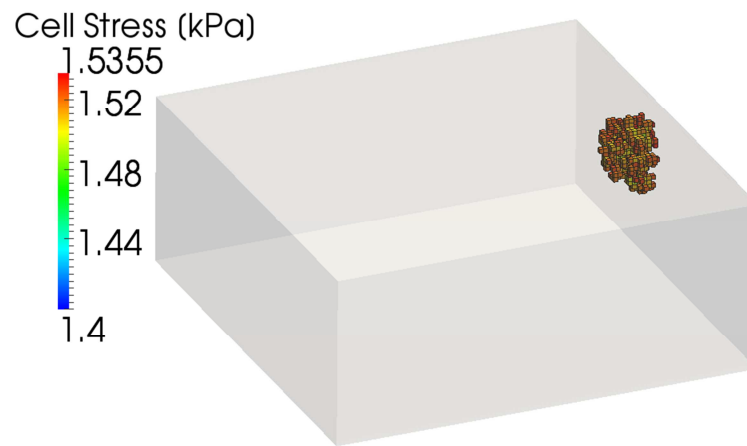


Figura. 28: Célula adherida al extremo del dominio.

Debido a las altas velocidades obtenidas en el caso(ii), la célula alcanza el contorno del gel (cuyos desplazamientos están restringidos). Al no poder deformar la pared, la célula queda adherida, ejerciendo altas tensiones y expandiéndose lateralmente.

4. Discusión

De entre todos los tipos de modelos de migración celular existentes, no existe hasta la fecha ningún modelo de simulación que permita al mismo tiempo ofrecer una perspectiva general del proceso de migración (trayectoria, velocidad) y por otro lado obtener información cuantitativa acerca de aspectos relevantes a nivel celular como el área de adhesión, el factor de forma o las tensiones generadas. Por lo tanto, con este modelo se pretende cubrir en cierto modo esta carencia, planteándolo de tal manera que pueda ser fácilmente manipulado y perfeccionado en el futuro.

Este modelo simula la migración celular mediante la aparición y desaparición de vóxels, que en el transcurso del tiempo van actualizando la forma celular. La aparición y desaparición de vóxels ocurre de acuerdo a unas funciones de probabilidad que asignan a cada elemento un valor en base a varios estímulos. De los múltiples posibles estímulos que condicionan la migración celular, únicamente algunos de ellos han sido incorporados, concretamente de carácter mecánico, químico y de flujo.

En primer lugar, siguiendo el orden seguido para llevar a cabo la simulación, se discuten los resultados obtenidos de la simulación del microdispositivo, así como de la simulación fluido-química a nivel celular. Más adelante se discutirán los resultados obtenidos de la simulación mecánica y por último los resultantes de la simulación completa (teniendo en cuenta todos los factores).

Los resultados obtenidos de la simulación del microdispositivo en estado estacionario, muestran el perfil de velocidades y la presión en todos los puntos. Como se observa en la Figura. 12, los valores de velocidad obtenidos para la zona de gel se sitúan en el rango comprendido entre 1 y 1.5 $\mu\text{m}/\text{seg}$, valores consistentes con los utilizados en ensayos sobre la influencia del flujo intersticial en la migración celular [31]. Por otra parte si se observa el valor de la velocidad se ve considerablemente influida por la geometría del dispositivo, observándose los valores máximos de velocidad allí donde las secciones de paso son menores o en las partes, en las que debido a la geometría se producen cambios en las direcciones del flujo. Referente a la caída de presión, según se muestra en los resultados y acorde con las condiciones de contorno adoptadas (40Pa a la entrada y 0 a la salida), se produce casi en su totalidad en la región de gel. Estos resultados, se tomarán como datos de entrada para la simulación de migración completa.

Por otra parte, con los resultados obtenidos de la simulación fluido-química a nivel celular se valida una de las simplificaciones más importantes asumidas en el modelo. Como se observa en la Figura. 16A, la dirección de las líneas de corriente apenas se ven alteradas por la presencia de la célula aun considerando las dimensiones minúsculas del dominio, por lo tanto, la aproximación de considerar las líneas de corriente constantes durante toda la simulación (o asumir estado estacionario para el flujo) es válida. De igual modo, se valida la simplificación aplicada a las funciones de probabilidad según la activación/inhibición de receptores en concordancia con [31]. En la Figura. 16B se muestra como el factor autocrino es arrastrado por la corriente de flujo intersticial, lo cual haría migrar a la célula aguas abajo. También se observa

como las tensiones en la parte delantera de la célula son mayores (Figura. 17) al estar su superficie más expuesta al flujo. Inhibiendo los receptores del factor autocrino, la diferencia de presiones explicaría la tendencia de las células a migrar contracorriente[2].

El proceso de *mechano-sensing* ha sido heredado de un modelo previo [1], el cual determina que la fuerza ejercida por la célula crece con la rigidez hasta alcanzar la saturación, lo cual ha sido demostrado experimentalmente [32, 33]. En el apartado 1.1 se ha comprobado como esto también se cumple en el modelo actual. La Figura. 22 muestra como la tensión de la célula es mayor para mayor rigidez, y como los desplazamientos sufridos por la matriz disminuyen cuanto mayor es el módulo elástico. Además, de forma consistente a lo obtenido mediante experimentos [34], la velocidad de migración celular también aumenta conforme aumenta la rigidez (Figura. 20) hasta alcanzar un valor constante para valores elevados de la rigidez (para los cuales la fuerzas ejercida por la célula están próximas a la saturación,).

Los resultados obtenidos para la velocidad de migración celular media y efectiva para matrices con gradientes de rigidez lineales y exponencial presentan diferencias significativas. Si se centra el análisis en los primeros 16 incrementos temporales se observa como la velocidad efectiva para gradiente de rigidez exponencial ($0.25\mu\text{m}/\text{min}$) es muy superior a la obtenida para gradiente de rigidez lineal ($0.8\mu\text{m}/\text{min}$ en el caso máximo). Esto se explica debido a que la variación en los valores de rigidez entre la región posterior y anterior de la célula es mucho mayor que en el caso lineal, y por tanto la migración tiene un marcado carácter direccional en la dirección de este gradiente. Estas diferencias se reducen conforme transcurre el tiempo de simulación, ya que en las matrices de gradiente de rigidez lineal, la célula va migrando progresivamente hacia posiciones más rígidas y por tanto presentará mayor velocidad de migración.

En cualquier caso, tanto los valores de velocidad como de longitud recorrida por las células al migrar son consistentes tanto con los valores obtenidos en la simulaciones de validación del modelo mecánico como el químico. Además, estos valores se encuentran dentro de los rangos experimentales (ej.: la velocidad de los fibroblastos oscila alrededor de $0.2\text{-}0.7\mu\text{m}/\text{min}$) [11, 35]. Es preciso destacar sin embargo, que existe una gran disparidad de resultados en función del ensayo y del tipo de célula considerado.

En referencia al área proyectada, los resultados obtenidos por el modelo (Figura. 21 y Figura. 27), son consistentes con los obtenidos en las simulaciones de validación (Figura. 37) pues para todos los casos se obtienen valores dentro del rango. Aunque bien es cierto que este parámetro está condicionado por la restricción de tamaño impuesta a la célula, es interesante ver como el valor medio se mantiene para todas las simulaciones. Sin embargo, los valores obtenidos son hasta diez veces superiores a los logrados mediante ensayos experimentales [36]. Esta diferencia es fundamentalmente debida a la diferencia en los métodos de medida utilizados en los ensayos y en la computación. En los ensayos se suele determinar el área de adhesión determinando el contorno a partir de imágenes 2D y realizando estimaciones. Otras técnicas estiman el área de contacto celular a partir de tintes fluorescentes. Estos tintes se vuelven visibles únicamente en zonas de la célula activas (ej. Adhesiones focales), por lo que la medida predice el área sobre la que la célula ejerce fuerzas. En esta simulación, sin embargo, se considera toda el área de contacto célula-matriz, cuyo valor se calcula como la suma de

todas las caras libres de los elementos del contorno. Por otro lado, al discretizar el volumen con vóxeles, se sobrestima el área que tendría un volumen suavizado de dimensiones similares.

Comparando los resultados de velocidad media y efectiva obtenidos en la simulación exclusivamente mecánica con los obtenidos en la simulación completa, se observa como la diferencia entre las velocidades media y efectiva es mucho mayor en el caso mecánico. Para los casos con gradiente de rigidez lineal, los valores de velocidad media y efectiva son $\sim 0.4\mu\text{m}/\text{min}$ y $0.05\mu\text{m}/\text{min}$ respectivamente, sin embargo, para los casos que incluyen además estímulos químicos y flujo, la velocidad media es de $\sim 0.37\mu\text{m}/\text{min}$ y la efectiva $\sim 0.26\mu\text{m}/\text{min}$. Este resultado evidencia que la migración debida a estímulos fluido-químicos presenta un marcado carácter direccional, mientras que la debida exclusivamente a estímulos mecánicos es más estocástica. Esta aleatoriedad, viene en parte dada por las pequeñas diferencias de rigidez en la ECM (salvo en casos extremos como el exponencial), y por otro lado por el modo en el que el gradiente de tensión es computado. Cuando dos o más elementos presentan tensiones altas muy similares (algo habitual en casos normales), el elemento que determinará la dirección a seguir se escoge al azar.

Considerando la complejidad del proceso, a la hora de desarrollar el modelo ha sido necesario asumir ciertas simplificaciones. Por ejemplo, para resolver el problema mecánico que da como resultado la tensión en cada elemento de la célula se considera que la matriz de “Colágeno I” tiene un comportamiento elástico lineal, cuando en realidad se trata de un material visco-elástico. Aunque se considera que esta aproximación es suficientemente válida, sería interesante incorporar este comportamiento si se buscasen unos resultados detallados y más realistas de la interacción célula-matriz.

Por otra parte, siguiendo con los estímulos mecánicos, solo se consideran las fuerzas generadas por el comportamiento activo de la célula, dejándose a un lado por ejemplo la fuerza de arrastre, de vital importancia cuando se considera el comportamiento viscoso del material que constituye la ECM. En este modelo, la velocidad de migración siempre aumenta con la rigidez (mayor rigidez implica mayor tensión y por lo tanto mayores probabilidades de aparición/desaparición). Sin embargo, para valores muy altos de rigidez la velocidad de migración experimenta en realidad una reducción al aumentar arrástrela resistencia viscosa al avance sobre la superficie celular [1]. Aunque por simplicidad esto no se ha tenido en cuenta, sería fácilmente incorporable al modelo. Bastaría con añadir un parámetro con peso negativo y proporcional a la rigidez a las funciones de probabilidad, de manera que su efecto fuese bajo para sustratos blandos y alto para sustratos rígidos, consiguiendo así un óptimo de velocidad a rigideces intermedias[1, 37].

En cuanto a los estímulos fluido-químicos, en este modelo se incluyen en las funciones de probabilidad de una forma sencilla debido al alto coste computacional que supondría el realizar los cálculos en cada incremento temporal. Como se explica anteriormente, las células en presencia de flujo intersticial pueden segregar un factor químico autocrino que es arrastrado por el flujo y en última instancia provoca que la célula migre en la dirección de la corriente. Sin embargo, si se bloquean ciertos receptores, las células dejan de verse afectadas por este factor químico, migrando en dirección contraria. Según se recoge en [2, 31], la presión ejercida por el flujo sobre la célula es la causante de este comportamiento: en ausencia de

estímulos químicos, la célula migra en dirección al gradiente de presión que siente sobre su cuerpo, es decir, contra la dirección del flujo que es el causante de esta presión. Con el fin de observar los efectos del flujo intersticial, tanto en la presión ejercida sobre la célula como sobre el arrastre del factor autocrino, se ha realizado un estudio en detalle de la interacción fluido-célula. Los resultados de tal simulación confirman como la parte de la célula que sufre las mayores tensiones por efecto del fluido es la más expuesta al flujo. Los resultados obtenidos en la validación del modelo fluido-químico (Anexo II) muestran que, los estímulos fluido-químicos, pese a ser implementados de una forma sencilla, presentan tendencias similares a las obtenidas en [2].

Por otra parte, la implementación de la migración celular bajo la influencia de un flujo intersticial tiene únicamente en cuenta la dirección de dicho flujo, pero no la magnitud de la velocidad. Esto es importante para determinar el arrastre del factor autocrino, y su efecto ha sido estudiado experimentalmente. Además, las líneas de corriente se consideran constantes durante todo el transcurso de la simulación (estado estacionario) sin considerarse la influencia que pudiera tener la forma celular. Aunque en cierto modo realizar una simulación fluido-química en cada incremento temporal arrojaría resultados mucho más precisos, como se ha expresado anteriormente su coste computacional sería demasiado elevado y por tanto se prefiere simplificar el modelo.

La degradación del gel por parte de la célula se ha implementado mediante la reducción del módulo elástico del material que constituye la matriz. Los resultados obtenidos no muestran variación aparente con respecto a los casos en los que la degradación no está activada. Los estudios muestran sin embargo, que para ciertos tipos de matrices, el proceso de degradación es de vital importancia en el proceso de migración [6], dejando las células a su paso un canal en la matriz, por el que otras células migran con mayor facilidad. Para nuestro caso, al estudiarse la migración de una célula, este fenómeno no tiene demasiado valor. A pesar de ello, se trata de un fenómeno altamente complejo que todavía se está dilucidando en la actualidad, por lo que merece la pena tenerlo en cuenta para versiones futuras. Para ello sería necesario incorporar un modelo completo dedicado al proceso de degradación.

El modelo desarrollado presenta la complejidad de que la velocidad, distancia y sentido de la migración no se determinan por medio de la resolución numérica de una serie de ecuaciones, sino que está basado en funciones de probabilidad que determinan la aparición/desaparición de vóxels. A pesar de que esto permite la activación/desactivación o incluso la incorporación de nuevos factores de manera sencilla, también conlleva un complejo proceso de ajuste. Por lo tanto, al existir esta dependencia del azar, son necesarias numerosas pruebas hasta poder concluir que los resultados son consistentes.

5. Conclusiones y Trabajo Futuro

Como se ha venido haciendo hincapié a lo largo de toda la memoria, la migración celular es un proceso complejo en el que influyen numerosos factores de diferente naturaleza (estímulos mecánicos, químicos, de flujo, topográficos etc.) y su comprensión es de vital importancia para el avance en ingeniería tisular y en el tratamiento de numerosas enfermedades.

En este trabajo, se ha desarrollado un modelo computacional 3D basado en probabilidades capaz de simular la migración de una célula en función de factores mecánicos, químicos y de flujo, creando así una herramienta que permite analizar de una vez multitud de características como la interacción célula-matriz (tensión y deformación generada, degradación), la velocidad de migración, el camino recorrido, la forma adquirida por la célula etc. cuyo estudio sería de otra forma muy costoso, o requeriría de un gran número de experimentos. Para su desarrollo se ha utilizado software diverso y se ha requerido el uso de un clúster de computación.

Al estar el modelo basado en probabilidades, y por tanto depender hasta cierto punto del azar, presenta una fuerte dependencia de los parámetros utilizados. Este, aparentemente, hándicap es sin embargo una de las mayores virtudes del mismo. Y es que, sin establecer directamente una ley de comportamiento, el modelo es capaz de capturar el comportamiento emergente a nivel macro de una célula migrando en un ambiente 3D. En este punto reside el verdadero potencial de esta aproximación, y en su mejora debe centrarse el desarrollo futuro.

Con este trabajo se ha completado la primera versión de un modelo cuyo potencial se extenderá en líneas de trabajo futuras como:

- **Introducción de nuevos factores influyentes en la migración** (ej. estímulos eléctricos o presión): nuevos avances y experimentos son realizados día a día, por lo que si con el modelo se pretende ofrecer una plataforma de ayuda, debe estar en permanente actualización.
- **Modelado en detalle de factores simplificados** (ej. degradación ECM o química de la célula): las simplificaciones consideradas en la primera versión del modelo, deben revisarse en función de la orientación que se le dé en un futuro.
- **Mejora del modelo de *mechano-sensing* introduciendo una dependencia temporal en función de la activación de los motores moleculares:** esta línea de trabajo, actualmente ya en funcionamiento, pretende mejorar el modelo teórico de *mechano-sensing*, introduciendo un nuevo componente al esquema celular que simule la activación paulatina de los motores moleculares (encargados de realizar la contracción). Con ello, el modelo será capaz de estudiar por ejemplo, la evolución temporal de la tensión antes de que la célula migre de su posición.
- **Simulado específico de adhesiones focales en ciertos puntos del contorno celular:** la formación de adhesiones focales es un tema crucial para comprender la fuerza

generada por las células. Debido a su fuerte componente bioquímico, se trata de un problema de gran complejidad, por lo que el seguimiento de esta línea conllevaría una orientación del modelo muy focalizada a este fenómeno.

- **Incorporación de más células a la simulación:** aunque la simulación de células individuales es de gran interés y sirve para el estudio de factores de manera aislada, la incorporación de poblaciones es un paso necesario y obligatorio si se pretende introducir el modelo en el campo de regeneración de tejidos. Además de los cambios pertinentes en la programación, sería necesario el desarrollo y la incorporación a los presentes códigos de un modelo de interacción célula-célula.

6. Referencias

1. Borau, C., R.D. Kamm, and J.M. García-Aznar, *Mechano-sensing and cell migration: a 3D model approach*. Physical Biology, 2011. **8**(6): p. 066008.
2. Polacheck, W.J., J.L. Charest, and R.D. Kamm, *Interstitial flow influences direction of tumor cell migration through competing mechanisms*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(27): p. 11115-11120.
3. Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz, *Cell migration: A physically integrated molecular process*. Cell, 1996. **84**(3): p. 359-369.
4. Friedl, P. and K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 362-74.
5. Yamaguchi, H., J. Wyckoff, and J. Condeelis, *Cell migration in tumors*. Current Opinion In Cell Biology, 2005. **17**(5): p. 559-564.
6. Ehrbar, M., et al., *Elucidating the Role of Matrix Stiffness in 3D Cell Migration and Remodeling*. Biophysical Journal, 2011. **100**(2): p. 284-293.
7. Tabata, Y., *Biomaterial technology for tissue engineering applications*. J R Soc Interface, 2009. **6 Suppl 3**: p. S311-24.
8. Moreo, P., J.M. Garcia-Aznar, and M. Doblare, *Modeling mechanosensing and its effect on the migration and proliferation of adherent cells*. Acta Biomaterialia, 2008. **4**(3): p. 613-621.
9. Simpson, M.J., et al., *Migration of breast cancer cells: Understanding the roles of volume exclusion and cell-to-cell adhesion*. Physical Review E, 2010. **82**(4): p. 041901.
10. Fraley, S.I., et al., *A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(6): p. 598-604.
11. Hakkinen, K.M., et al., *Direct Comparisons of the Morphology, Migration, Cell Adhesions, and Actin Cytoskeleton of Fibroblasts in Four Different Three-Dimensional Extracellular Matrices*. Tissue Engineering Part A, 2011. **17**(5-6): p. 713-724.
12. Chung, S., et al., *Microfluidic Platforms for Studies of Angiogenesis, Cell Migration, and Cell-Cell Interactions*. Annals of Biomedical Engineering, 2010. **38**(3): p. 1164-1177.
13. Aznavoorian, S., et al., *Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells*. J Cell Biol, 1990. **110**(4): p. 1427-38.
14. Sanz-Herrera, J.A., et al., *On the effect of substrate curvature on cell mechanics*. Biomaterials, 2009. **30**(34): p. 6674-86.
15. Bischofs, I.B. and U.S. Schwarz, *Cell organization in soft media due to active mechanosensing*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(16): p. 9274-9279.

16. Lin, S.-L., et al., *Effects of compressive residual stress on the morphologic changes of fibroblasts*. Medical and Biological Engineering and Computing, 2009. **47**(12): p. 1273-1279.
17. Schwarz, U.S. and I.B. Bischofs, *Physical determinants of cell organization in soft media*. Medical Engineering & Physics, 2005. **27**(9): p. 763-772.
18. Zaman, M.H., et al., *Computational model for cell migration in three-dimensional matrices*. Biophysical Journal, 2005. **89**(2): p. 1389-1397.
19. Harjanto, D. and M.H. Zaman, *Computational study of proteolysis-driven single cell migration in a three-dimensional matrix*. Ann Biomed Eng, 2010. **38**(5): p. 1815-25.
20. Groh, A. and A.K. Louis, *Stochastic modelling of biased cell migration and collagen matrix modification*. Journal of Mathematical Biology, 2010. **61**(5): p. 617-647.
21. Groh, A. and M. Wagner, *Biased three-dimensional cell migration and collagen matrix modification*. Mathematical Biosciences, 2011. **231**(2): p. 105-119.
22. Burnette, D.T.B.D.T., et al., *A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells*. Nature Cell Biology, 2011. **13**(4): p. 371-U88.
23. Kim, T., W. Hwang, and R.D. Kamm, *Computational Analysis of a Cross-linked Actin-like Network*. Experimental Mechanics, 2009. **49**(1): p. 91-104.
24. Kim, T., et al., *Computational Analysis of Viscoelastic Properties of Crosslinked Actin Networks*. Plos Computational Biology, 2009. **5**(7): p. e1000439.
25. Deshpande, V.S., R.M. McMeeking, and A.G. Evans, *A bio-chemo-mechanical model for cell contractility*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(38): p. 14015-14020.
26. Walcott, S. and S.X. Sun, *A mechanical model of actin stress fiber formation and substrate elasticity sensing in adherent cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(17): p. 7757-7762.
27. Lázár-Molnár, E., et al., *AUTOCRINE AND PARACRINE REGULATION BY CYTOKINES AND GROWTH FACTORS IN MELANOMA*. Cytokine, 2000. **12**(6): p. 547-554.
28. Shields, J.D., et al., *Autologous Chemotaxis as a Mechanism of Tumor Cell Homing to Lymphatics via Interstitial Flow and Autocrine CCR7 Signaling*. Cancer Cell, 2007. **11**(6): p. 526-538.
29. Brinkman, H., *A calculation of the viscous force exerted by a flowing fluid on a dense swarm of particles*. Applied Scientific Research, 1949. **1**(1): p. 27-34.
30. Painter, K.J., *Modelling cell migration strategies in the extracellular matrix*. J Math Biol, 2009. **58**(4-5): p. 511-43.
31. Fleury, M.E., K.C. Boardman, and M.A. Swartz, *Autologous morphogen gradients by subtle interstitial flow and matrix interactions*. Biophys J, 2006. **91**(1): p. 113-21.

32. Mitrossilis, D., et al., *Single-cell response to stiffness exhibits muscle-like behavior*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(43): p. 18243-18248.
33. Trichet, L., et al., *Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(18): p. 6933-8.
34. Zaman, M.H., et al., *Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis (vol 103, pg 10889, 2006)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(37): p. 13897-13897.
35. Lo, C.M., et al., *Cell movement is guided by the rigidity of the substrate*. Biophysical Journal, 2000. **79**(1): p. 144-152.
36. Yeung, T., et al., *Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2005. **60**(1): p. 24-34.
37. Dokukina, I.V. and M.E. Gracheva, *A Model of Fibroblast Motility on Substrates with Different Rigidities*. Biophysical Journal, 2010. **98**(12): p. 2794-2803.
38. Li, J. and F. Lin, *Microfluidic devices for studying chemotaxis and electrotaxis*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(8): p. 489-97.
39. Saadi, W., et al., *A parallel-gradient microfluidic chamber for quantitative analysis of breast cancer cell chemotaxis*. Biomed Microdevices, 2006. **8**(2): p. 109-18.
40. Chung, S., et al., *Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform*. Lab On A Chip, 2009. **9**(2): p. 269-275.
41. Franck, C., et al., *Three-Dimensional Traction Force Microscopy: A New Tool for Quantifying Cell-Matrix Interactions*. Plos One, 2011. **6**(3): p. e17833.
42. Rangarajan, R. and M.H. Zaman, *Modeling cell migration in 3D: Status and challenges*. Cell Adh Migr, 2008. **2**(2): p. 106-9.
43. Ware, M.F., A. Wells, and D.A. Lauffenburger, *Epidermal growth factor alters fibroblast migration speed and directional persistence reciprocally and in a matrix-dependent manner*. J Cell Sci, 1998. **111** (Pt 16): p. 2423-32.
44. Shields, J.D., et al., *Autologous chemotaxis as a mechanism of tumor cell homing to lymphatics via interstitial flow and autocrine CCR7 signaling*. Cancer Cell, 2007. **11**(6): p. 526-38.

