



Trabajo Fin de Grado

Simulación por elementos finitos de la ruptura de adhesiones celulares en vasos sanguíneos

Finite element simulation of the rupture of cellular adhesions in blood vessels

Autor

Alberto Nieto Sandino

Directores

José Manuel García Aznar
Jorge Escribano Jiménez

TRABAJOS DE FIN DE GRADO / FIN DE MÁSTER



Escuela de
Ingeniería y Arquitectura
Universidad Zaragoza

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

(Este documento debe acompañar al Trabajo Fin de Grado (TFG)/Trabajo Fin de Máster (TFM) cuando sea depositado para su evaluación).

D./D^a. Alberto Nieto Sandino,

con nº de DNI 73134391-A en aplicación de lo dispuesto en el art.

14 (Derechos de autor) del Acuerdo de 11 de septiembre de 2014, del Consejo de Gobierno, por el que se aprueba el Reglamento de los TFG y TFM de la Universidad de Zaragoza,

Declaro que el presente Trabajo de Fin de (Grado/Máster) Grado _____, (Título del Trabajo)

Simulación por elementos finitos de la ruptura de adhesiones celulares en vasos sanguíneos

es de mi autoría y es original, no habiéndose utilizado fuente sin ser citada debidamente.

Zaragoza, 22 de Junio de 2017

Fdo: Alberto Nieto Sandino

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer la oportunidad de trabajar en el marco de investigación del proyecto del Plan Nacional DIMEEXT cuyos investigadores principales (José Manuel García Aznar y María José Gómez Benito) han hecho posible que realizara un TFG sobre una área tan interesante como es la biomecánica.

Me gustaría agradecer a los dos directores (José Manuel García Aznar y Jorge Escribano Jiménez) su confianza, apoyo y gran dedicación que han sido de gran ayuda, especialmente durante el tramo final de este TFG.

También me gustaría agradecer a María José su gran ayuda, pues, a pesar de no ser directora de este trabajo, ha sido una parte fundamental en la realización de éste.

Por último, me gustaría acordarme de toda la gente que he conocido en estos años. Sobretodo, de los amigos que me llevo, que valen más de lo que muchas veces uno se da cuenta mientras intenta no morir en el intento de acabar el grado.

No me perdonaría finalizar una sección de agradecimientos sin mencionar a las personas que más se merecen que les dé las gracias.

A mis padres, José Luis y Marian, por enseñarme todo lo que de verdad importa.

Simulación por elementos finitos de la ruptura de adhesiones celulares en vasos sanguíneos

RESUMEN

El proceso de extravasación celular es un momento clave de la cascada metastásica. En él, la célula cancerosa ubicada en el interior del vaso sanguíneo se adhiere a la monocapa celular de la pared de éste y la atraviesa, pudiendo así invadir órganos y completar la metástasis. En este proceso, es clave cómo se rompen las adhesiones entre las células que conforman la monocapa originando así la abertura por la que la célula cancerosa es capaz de extravasar el vaso sanguíneo.

Dentro de este proceso, este Trabajo Fin de Grado se ha centrado en estudiar la dinámica de rotura que se produce en la monocapa endotelial por el efecto de una onda de Calcio. La regulación de esta monocapa es de vital importancia, no solo en la metástasis, sino también en enfermedades como el edema pulmonar o la aterosclerosis.

Con el fin de conocer en mayor profundidad esta dinámica de rotura se creó un modelo comunicacional híbrido que simula las células endoteliales como elástico lineales y las adhesiones célula-célula de la monocapa mediante una subrutina de usuario compatible con Abaqus FEA para caracterizar el comportamiento de dichas uniones.

Se estudiaron los efectos que la contracción causada por una onda de Calcio tenía en la monocapa endotelial en función de la cilindridad de ésta. Para ello, se crearon modelos bidimensionales de tensión plana, para geometrías en las que el diámetro del vaso sanguíneo era lo suficientemente grande, y modelos tridimensionales, para estudiar el efecto de los distintos valores de cilindridad.

Finalmente, los resultados indicaron que se producía un mayor esfuerzo de tracción sobre las uniones que estaban situadas en vértices comunes a varias células. Esto conducía a la formación de agujeros en la monocapa endotelial, por los cuales se podría producir la extravasación de células tumorales. Para las distintas geometrías estudiadas, no se observó un efecto importante de la cilindridad sobre la rotura de las adhesiones de la monocapa.

Glosario

AJs	— Adhesiones Adherentes (<i>Adherens Junctions</i>)
α	— Coeficiente de dilatación térmica (C^{-1})
Cadherina-VE	— Cadherina Endotelial Vascular
D_{cadh}	— Densidad de cadherinas-VE disponibles para la unión en una monocapa endotelial
Δt	— Incremento de tiempo (s)
E	— Módulo de Young (Pa)
HUVECs	— Células Endoteliales de Cordón Umbilical Humano.
ECM	— Matriz Extracelular (<i>Extracellular Matrix</i>)
F	— Fuerza axial que soporta la adhesión (pN)
FAJs	— Uniones Adherentes Focales (<i>Focal Adherens Junctions</i>)
FAs	— Adhesiones Focales (<i>Focal Adhesions</i>)
FEA	— Análisis por Elementos Finitos (<i>Finite Element Analysis</i>)
F_{sat}	— Parámetro de fuerza de saturación de la adhesión (pN)
\mathbb{I}	— Matriz identidad
k_b	— Ratio de unión de la adhesión célula-célula
k_{ub}	— Ratio de rotura de la adhesión célula-célula
LAJs	— Uniones Adherentes Lineales (<i>Lineal Adherens Junctions</i>)
L_{cadh}	— Distancia entre dos puntos susceptibles de ser unidos por una adhesión célula-célula
ν	— Coeficiente de Poisson (-)
$prob_b$	— Probabilidad de unión (%)
$prob_{ub}$	— Probabilidad de rotura (%)
RSFs	— Fibras de Tensión Radial (<i>Radial Stress Fibers</i>)
φ_c	— Parámetro adimensional de la curva de <i>catch</i>
φ_s	— Parámetro adimensional de la curva de <i>slip bond</i>
.inp	— Fichero de entrada en Abaqus (<i>Input File</i>)

Índice general

1 Introducción	3
1.1. Introducción	3
1.2. Estado del arte	5
1.2.1. Modelos <i>in vitro</i>	5
1.2.2. Modelos <i>in silico</i> (simulación numérica)	6
1.3. Fundamentación teórica	6
1.3.1. Principales agentes en la regulación de la barrera endotelial	6
1.3.2. Regulación de la barrera endotelial: factores de permeabilidad	7
1.3.3. Interacción entre el citoesqueleto de actomiosina y las adhesiones célula-célula	9
1.3.4. Influencia de las tensiones en la organización y permeabilidad de las uniones	11
1.4. Objetivos, metodología y alcance	11
2 Materiales y métodos: Modelo paramétrico	12
2.1. Generación de la célula endotelial	13
2.1.1. Modelo en 3D	13
2.1.2. Modelo en 2D	13
2.2. Ensamblaje de la monocapa endotelial	13
2.2.1. Construcción de la geometría en 3D	15
2.3. Definición del comportamiento de las adhesiones célula-célula	17
2.3.1. Debilitación de la monocapa	17
2.3.2. Restauración de la monocapa	17
2.3.3. Ley de rotura	17
2.3.4. Ley de unión	18
2.4. Ambiente mecánico de la monocapa endotelial	20
2.4.1. Condiciones de contorno	20
2.4.2. Cargas mecánicas	20
2.5. Análisis estático	21
3 Resultados	23
3.1. Concentración de tensiones en los vértices de las células	23
3.2. Patrones de rotura de la monocapa endotelial	24
3.2.1. Fase de reposo: inestabilización	24
3.2.2. Fase de rotura: colapso	25
3.2.3. Restauración de uniones en la monocapa	27
3.3. Comportamiento mecánico de la monocapa	27

Índice general

4 Conclusiones, limitaciones y trabajo futuro	29
Bibliografía	31

Introducción 1

1.1. Introducción

La extravasación celular es un proceso en el que las células tumorales atraviesan los vasos sanguíneos. Forma parte de la denominada cascada metastásica, más conocida convencionalmente como metástasis. En ésta, las células cancerosas abandonan un tumor primario y son capaces de intravasar al flujo sanguíneo. Una vez en éste, estas células se mueven a través del torrente sanguíneo hasta que en un momento dado se anclan a la pared del vaso sanguíneo, formada por una monocapa de células endoteliales (endotelio), y extravasan para colonizar un nuevo tejido u órgano (Figura 1.1).

El proceso en el que se va a centrar el desarrollo de este Trabajo de Fin de Grado es la simulación por ordenador del proceso de la extravasación de la célula cancerosa desde el torrente sanguíneo. Para que se produzca dicha extravasación es necesario que se abra un hueco en la monocapa celular que conforma el tejido de los vasos sanguíneos a través del cual la célula cancerosa pueda escapar.

El endotelio es una de las capas que forma parte de la estructura de los vasos sanguíneos (Figura 1.2). Esta capa está formada por una fina lámina de células endoteliales que está

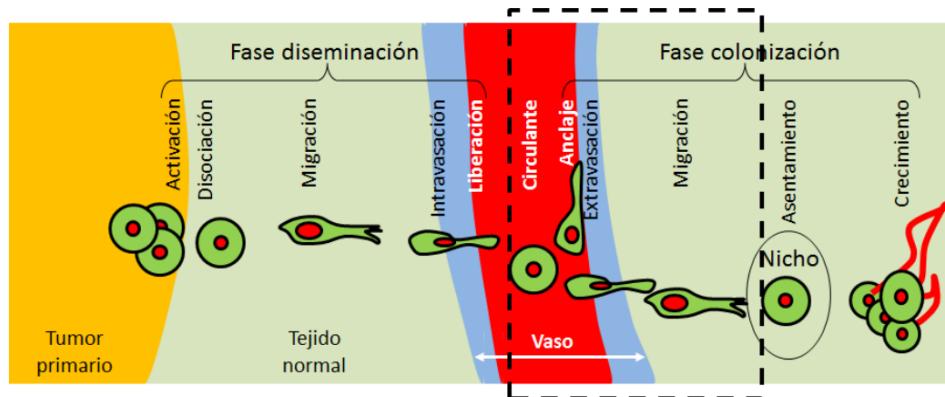


Figura 1.1: Fases de la metástasis, donde se muestra de forma esquemática la deformación mecánica de la célula y su núcleo. La célula cancerígena se disocia de un tumor primario, migra a un vaso sanguíneo (o linfático), entra en el vaso (intravasación) y transita por el flujo sanguíneo (o linfático) convirtiéndose en una célula circulante. Para colonizar un nuevo tejido debe atravesar el vaso (extravasación) y migrar en el nuevo tejido (invasión), asentándose en un nuevo nicho y produciendo un nuevo tumor, que recibirá nutrientes a través de nuevos vasos sanguíneos creados por angiogénesis (adaptado de Brodland y Vedhuis, 2012).

1.1. Introducción

separada de las capas más exteriores por una membrana elástica. La monocapa de células endoteliales, células unidas entre sí a través de un complejo de proteínas (Cadherina-VE, nectina, PECAM, etc) (Dejana 2004), es un entramado dinámico que está en continuo movimiento, en el cual se está produciendo la formación y rotura de uniones constantemente. Es precisamente debido a esta dinámica de formación y rotura de uniones por lo que se produce la formación de huecos en la monocapa a través de los cuales las células cancerosas son capaces de extravasar.

Las cantidades de tejido conectivo y músculo liso en la pared del vaso dependen de su diámetro y función, sin embargo, la monocapa endotelial está siempre presente (Alberts et al. 2002).

La formación e integridad de los tejidos celulares está controlada por procesos químicos y mecánicos. El endotelio está sujeto a unas condiciones mecánicas especialmente cambiantes (i.e. oscilaciones constantes del flujo sanguíneo y de la presión) que pueden resultar en la inducción cíclica de deformación en la dirección de las arterias. La oscilación del flujo sanguíneo también causa fuerzas tangenciales cíclicas en estas monocapas endoteliales. Cuando estas fuerzas se mantienen en el tiempo pueden ocasionar cambios en las propiedades mecánicas del tejido (Oldenburg y de Rooij, 2014).

Las células endoteliales, al igual que cualquier otro tipo de célula, sienten alteraciones en las condiciones mecánicas del ambiente y adaptan sus propiedades mecánicas intracelulares mediante la reorganización de su citoesqueleto. Este proceso es muy relevante en el desarrollo vascular y está relacionado con patologías vasculares que son normalmente asociadas con alteraciones en el ambiente mecánico. Algunas de las patologías más conocidas son aterosclerosis, causada por perturbaciones en las fuerzas tangenciales a la membrana o edemas pulmonares, causados por la pérdida de la función de barrera vascular debido a alteraciones mecánicas en la membrana vasal microvascular (Hahn y Swartz 2009; Wang et al. 2012).

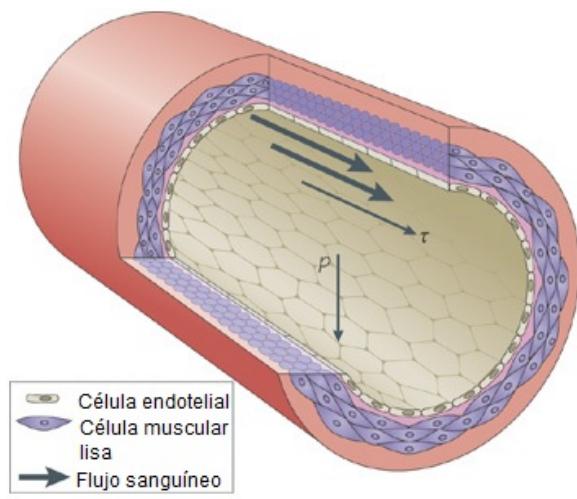


Figura 1.2: Estructura de un vaso sanguíneo (adaptado de Hahn y Schwartz, 2009)

Además de las implicaciones en cuanto al desarrollo vascular y enfermedades, la regulación mecánica del endotelio cumple la función fundamental de actuar como barrera. Por una parte debe dejar pasar a las células del sistema inmunitario, mientras que debe bloquear el paso de patógenos, glóbulos o células tumorales. Dentro de este mecanismo la contracción del citoesqueleto de actomiosina es un factor clave, aunque los detalles de este mecanismo siguen siendo investigados hoy en día.

1.2. Estado del arte

A pesar de la relevancia clínica de la metástasis y la extravasación tumoral, se conoce muy poco del ambiente mecánico que la regula (Kumar y Weaver, 2009). La idea de que la contracción celular pueda impactar en la funcionalidad de barrera celular lleva presente desde los años 70 cuando se identificaron distintas proteínas involucradas en este proceso (Schnittler, 2016). Durante las últimas cuatro décadas, ha quedado demostrado que dicha contracción mecánica es clave en su comportamiento mecánico y en su desarrollo, tanto en células como en tejidos (Wozniak y Chen, 2009).

De forma general, para comprender el proceso de la extravasación se modelan aspectos parciales a partir del análisis de las interacciones célula-célula o células-microambiente. Para ello, se suelen emplear dos enfoques distintos: modelos *in vitro* y modelos *in silico*.

1.2.1. Modelos *in vitro*

Estos modelos reproducen las condiciones simplificadas de la extravasación controlando los principales elementos involucrados (i.e. células, matriz extracelular, factores de crecimiento, etc.). Aunque en estos modelos no se puede controlar perfectamente el microambiente, sí que permiten establecer análisis comparativos y estudiar interacciones entre las células y la matriz extracelular (Uygur et al. 2011). Dentro del modelado *in vitro* destacan los dispositivos microfluídicos, los cuales sí que permiten un mayor control de los parámetros. Se han empleado tanto para el estudio de la migración celular como de la intravasación de barreras mecánicas (Mak et al. 2013) y de la extravasación (Jeon et al, 2013). Funamoto et al. (2017) estudiaron el comportamiento de la monocapa endotelial en condiciones de hipoxia mediante canales microfluídicos y Valent et al. (2016) midieron las fuerzas de contracción de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs) mediante un microscopio de fuerza de tracción (Figura 1.3).

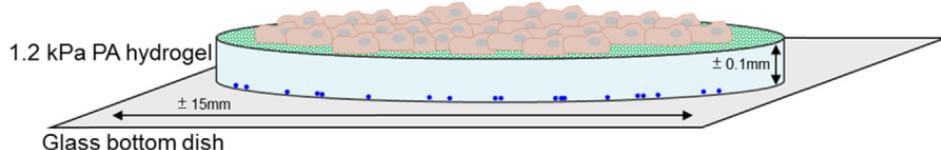


Figura 1.3: Experimento *in vitro* de Valent et. al (2016)

1.2.2. Modelos *in silico* (simulación numérica)

No hay una gran cantidad de modelos numéricos que simulen la extravasación. Destacan los modelos de Anderson et al. (2000), que propusieron utilizar un modelo discreto para la extravasación y un modelo continuo para la invasión celular, Brodland y Veldhuis (2012), que plantearon un modelo discreto para simular tanto la extravasación como la invasión celular, y Ramis-Conde et al. (2009) cuyo modelo matemático centrado en la intravasación de células cancerosas con un enfoque multiescala que tiene en cuenta tanto las proteínas intra e intercelulares, como la forma del vaso sanguíneo. Dentro de los pocos modelos realizados sobre monocapas celulares, cabe destacar el modelo creado por González Valverde y García Aznar (2017) donde se presenta un modelo híbrido centrado en la simulación de la dinámica en las monocapas combinando modelos numéricos discretos y continuos.

1.3. Fundamentación teórica

1.3.1. Principales agentes en la regulación de la barrera endotelial

La estructura mecánica de las células endoteliales está determinada por la interacción dinámica entre adhesiones célula-ECM (*Extracellular Matrix* o Matriz Extracelular, “sustrato” en el que se encuentran inmersas las células), redes citoesqueléticas y adhesiones célula-célula cuya integridad determina la resistencia de la barrera vascular (Oldenburg y de Rooij, 2014).

Las adhesiones célula-célula están formadas por un gran número de proteínas, dentro de las cuales destaca la cadherina endotelial vascular (Cadherina-VE) que juega un papel muy importante en la transmisión de fuerzas. Numerosos estudios (Lampugnani et al. 1995; Haselton y Heimark 1997; Taddei et al. 2008) han concluido que la pérdida de las adhesiones de Cadherinas-VE afecta a otras uniones célula-célula, compromete la integridad de la función de barrera y provoca profundos cambios de la estructura citoesquelética.

El citoesqueleto (figura 1.4) es una red de elementos fibrosos compuesto fundamentalmente de microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios que se encuentra en el citoplasma de las células eucariotas. Su función es proporcionar soporte estructural para la célula y permitir el movimiento de orgánulos, cromosomas y la propia célula (Lodish et al. 2003). Debido a su gran tamaño, el citoesqueleto puede cambiar la morfología de la célula tan solo con sus cambios estructurales. Los filamentos intermedios son normalmente los que determinan la elasticidad de las células y su capacidad para resistir deformaciones bajo presión (DePianto y Coulombe 2004).

El complejo de Cadherina-VE se conecta con el citoesqueleto de actina a través de la proteína α -catenina para formar las Adhesiones Adherentes endoteliales (*Adherens Junctions*, AJs) que forman un papel clave en la función de barrera de la monocapa. Los manojos de actina cercanos y paralelos a las uniones célula-célula ayudan al mantenimiento

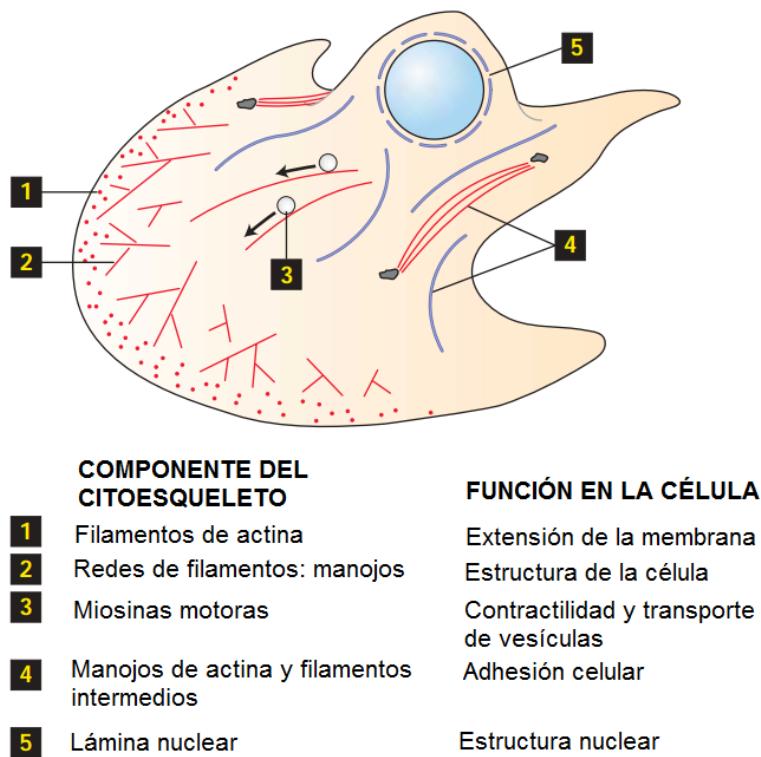


Figura 1.4: Esquema de los citoesqueletos de actina y de filamentos intermedios y de sus funciones. Los filamentos del citoesqueleto de actina (rojo) se encargan de mantener la forma de la célula y generar la fuerza para el movimiento de ésta. Los movimientos dentro de la célula y la contracción celular (3) son producidos por las proteínas miosinas motoras. Los citoesqueletos de actina (rojo) y de filamentos intermedios (morado) integran la célula y sus contenidos con otras células (4) a través de adhesiones celulares (adaptado de Lodish et al. 2003).

de dichas adhesiones, sin embargo la presencia de Fibras de Tensión Radial (*Radial Stress Fibers*, RSFs) en el centro de la célula endotelial ha sido asociada a menor estabilidad de estas adhesiones (Lum y Malik 1996).

Las adhesiones célula-Matriz Extracelular mediante la proteína integrina controlan la organización y la contractilidad de la red de actomiosina. Estas integrinas, organizadas en Adhesiones Focales (FAs), son centros de señalización que perciben información química (densidad y tipo de ECM) y mecánica (rigidez y deformación de la ECM). Por lo tanto, hay una retroalimentación mecánica entre el citoesqueleto de actomiosina y la ECM mediante las Adhesiones Focales que regula la organización y contractilidad del citoesqueleto para igualar las condiciones mecánicas a nivel celular y del medio (Ingber 2002).

1.3.2. Regulación de la barrera endotelial: factores de permeabilidad

Para regular la función de barrera del endotelio, los factores de permeabilidad influyen sobre los distintos elementos que determinan la arquitectura celular mencionados anteriormente: complejos de adhesión célula-célula, el citoesqueleto y la adhesión integrina-ECM.

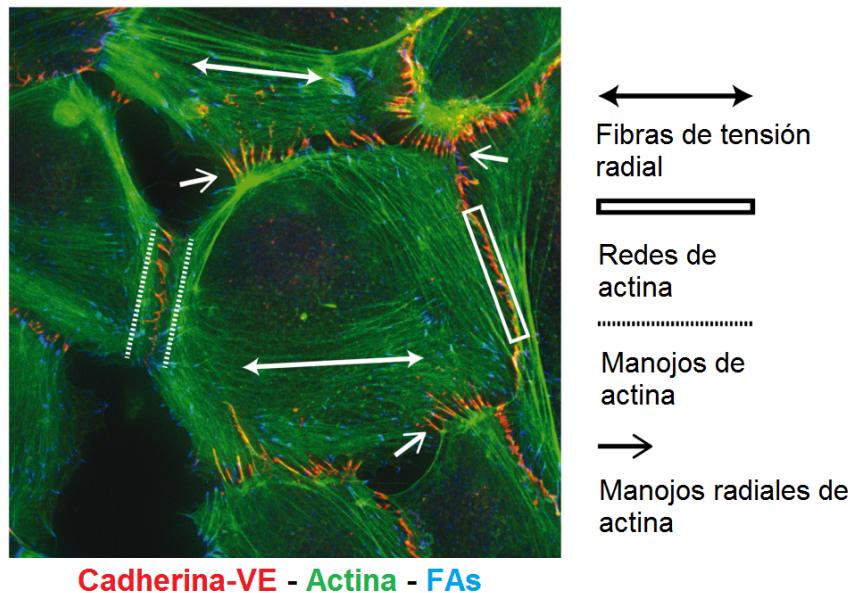


Figura 1.5: Vista general de las estructuras de actina involucradas en la adhesión celular. Imagen inmunofluorescente de una monocapa de Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana (HUVECs) con los elementos estructurales de la monocapa endotelial. El principal tipo de uniones célula-célula son las Uniones Adherentes (AJs) mediante Cadherinas-VE, mientras que el principal tipo de uniones en la Matriz Extracelular (ECM) son las Uniones Focales (FAs) (adaptado de Oldenburg y de Rooij, 2014)

Complejos de adhesión célula-célula

Los complejos de adhesión célula-célula son la última línea de defensa ante la permeabilidad vascular. Como se ha descrito en el apartado anterior, la adhesión de Cadherinas-VE es la más relevante, siendo ésta modificada químicamente mediante la fosforilación (adicción de un grupo fosfato, PO_4^{3-}) que afecta a la estabilidad de las uniones endoteliales (Wong et al. 2000). Este proceso de fosforilación regula las interacciones entre los miembros del complejo de Cadherinas-VE y el resto de complejos, lo que en última instancia determina la resistencia mecánica de las adhesiones célula-célula.

Citoesqueleto

La miosina motora presente en el citoesqueleto de actomiosina es un objetivo clave cuando se observan señales de permeabilización (Brieher y Yap 2013). El efecto de la miosina influye en las Fibras de Tensión Radial y en los manojos de actina, por lo que tiene un doble efecto:

- cuando se localiza cercana a las redes y manojos de actina ayuda a las adhesiones célula-célula, debido, seguramente, a que estabiliza su estructura (Shewan et al. 2005);
- mientras que cuando actúa sobre las RSFs en la zona central de la célula, éstas se estabilizan y aumenta la tensión contráctil en todas las estructuras conectadas al citoesqueleto (Ando et al. 2013).

1.3. Fundamentación teórica

Las alteraciones en los manojos de actina parecen influenciar más la arquitectura local y las tensiones en las uniones célula-célula. Por una parte, las alteraciones en los manojos de actina tienden a aumentar las distancias entre adhesiones célula-célula, mientras que los manojos radiales de actina brotan de aquellos conectados a los complejos de adhesiones célula-célula (la figura 1.5 ofrece una vista general de estos elementos). Por lo tanto, la distribución espacial de las fuerzas de tracción en las estructuras de actomiosina parece ser un factor clave en la permeabilidad de las células endoteliales. Birukova et al. (2009) ilustraron mediante un microscopio de fuerza atómica que al tratar las células endoteliales con agentes permeabilizantes se incrementaba la rigidez de las células y de las uniones célula-célula.

Adhesión integrina-Matríz Extracelular

La regulación de la barrera endotelial en estas adhesiones puede producirse a dos niveles. A nivel de la ECM, lo que implicaría un proceso relativamente lento formado por la degradación y síntesis de proteínas y la reorganización estructural de ésta (Hahn y Schwartz 2009); y a nivel de las proteínas asociadas a la integrina que regulan las alteraciones en el citoesqueleto en respuesta a la ECM. Las acciones de estas proteínas están determinadas, al igual que las Cadherinas-VE, por la fosforilación de ciertas zonas que podrían ser zonas de señalización para la regulación de la barrera endotelial (Cohen y Guan 2005).

Concluyendo, las modificaciones químicas que regulan directamente las adhesiones celulares y las alteraciones en la estructura que regulan las características mecánicas de las uniones determinan de forma cooperativa la permeabilidad de la barrera endotelial.

1.3.3. Interacción entre el citoesqueleto de actomiosina y las adhesiones célula-célula

Para entender por qué la arquitectura del citoesqueleto es tan importante en la estabilidad de las adhesiones endoteliales célula-célula, hay que conocer cómo interacciona el citoesqueleto de actomiosina con las uniones célula-célula y cómo determina la organización de éstas. La interacción del citoesqueleto de actina con las Cadherinas-VE mediante la proteína α -catenina es aquella que se ha investigado más en profundidad. Aunque otras proteínas participan en la interacción modificando la resistencia mecánica de ésta, sin la presencia de α -catenina no tendría lugar este proceso (Twiss y de Rooij 2013).

Cuando estas uniones son observadas mediante imágenes inmunofluorescentes se distinguen dos tipos de organizaciones: Uniones Adherentes Lineales (*Linear Adherens Junctions*, LAJs) y Uniones Adherentes Focales (*Focal Adherens Junctions*, FAJs).

Uniones Adherentes Lineales

Estas uniones son continuas a lo largo de la frontera célula-célula y tienen una geometría que, aunque aparenta ser lineal, tiende a tener irregularidades y curvatura a lo largo de la

unión (figura 1.6, izquierda). Están alineadas con los manojos de actina en el citoesqueleto que siguen la curvatura de la unión y experimentan tensiones bajas a lo largo de su sección.

Uniones Adherentes Focales

Al contrario que las LAJs, las FAJs son discontinuas a lo largo de la frontera célula-célula y contienen Cadherinas-VE orientadas perpendicularmente al plano de contacto célula-célula. Están directamente en contacto con los manojos radiales de actina (figura 1.5, derecha) que surgen de los manojos de actina situados en la parte central de la célula. La separación entre estas uniones es más arbitraria que en las LAJs debido a la presencia de estructuras intermedias y soportan un nivel de tensiones más elevado que las LAJs.

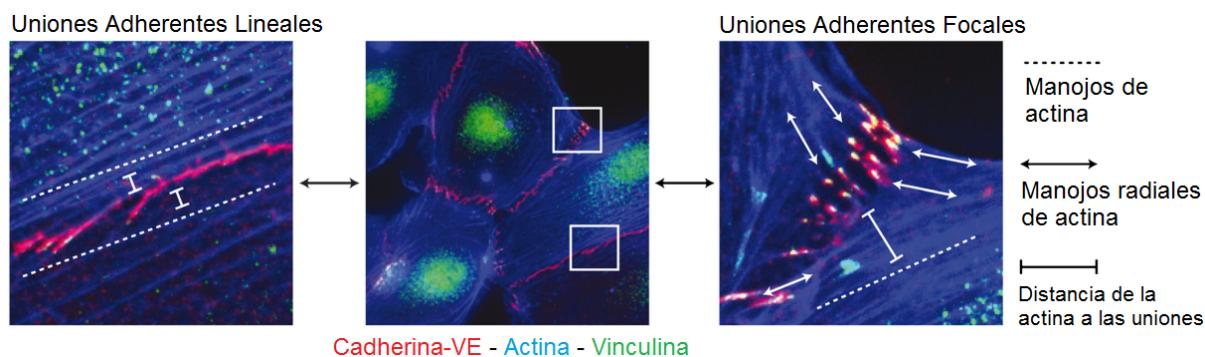


Figura 1.6: Regulación de la barrera endotelial en el entorno de las uniones célula-célula. Se trata de una imagen inmunofluorescente de HUVECs donde se pueden observar los distintos tipos de uniones. En la imagen izquierda, se ha realizado un zoom sobre las Uniones Adherentes Lineales, de naturaleza estable. En la imagen derecha, se ha realizado un zoom sobre las Uniones Adherentes Focales, cuya aparición se localiza en procesos de inestabilidad de la barrera endotelial (adaptado de Oldenburg y de Rooij, 2014).

La diferencia más notable a nivel molecular entre estos dos tipos de uniones es la presencia de Vinculina (proteína que interacciona con α -catenina y se une con actina) en las FAJs (Huvveneers et al. 2012). La diferencia de tensiones en el complejo de cadherina puede explicar este fenómeno: la hipótesis planteada es que la α -catenina se alarga cuando aumenta la tensión a lo largo del complejo de cadherina y, debido a este alargamiento, se produce una interacción intramolecular que refuerza las uniones con vinculina (Yonemura et al. 2010). La relación del alargamiento de la α -catenina con este mecanismo no ha sido demostrada de forma directa, sin embargo, sí que se ha probado que esta interacción molecular ocurre (Choi et al. 2012). Aunque tampoco ha sido demostrado, es de suponer que las tensiones que soportan las FAJs son superiores a las que soportan las LAJs, ya que los manojos radiales de actina (figura 1.6) aumentan las tensiones de las FAJs. Además, en un estudio de Huvveneers et al. (2012), la eliminación de miosina provocó la pérdida de vinculina en FAJs, transformándolas en LAJs, lo que sugiere que la presencia de vinculina se debe a fuerzas de contracción de la actomiosina.

1.3.4. Influencia de las tensiones en la organización y permeabilidad de las uniones

Siendo que la monocapa sufre tensiones debido a la contracción del citoesqueleto de actomiosina, cabría esperar que cuando estas tensiones se incrementaran hubiera una mayor permeabilidad de la monocapa endotelial debido a la rotura de las uniones adherentes. Sin embargo, aunque sí que hay evidencias de que mayores fuerzas de tracción en estas uniones provocan una mayor permeabilidad, esta tracción no es directamente la que está causando la separación de las adhesiones célula-célula (Oldenburg y de Rooij, 2014).

Aunque parece contraintuitivo de acuerdo con el comportamiento mecánico de la mayoría de materiales, el efecto que tiene incrementar las tensiones en las adhesiones célula-célula es la reclutación de vinculina por parte de las FAJs, aumentando su rigidez y limitando la formación de huecos entre células endoteliales (Huveneers et al. 2012). De hecho, Liu et al. (2010) encontraron que el crecimiento de las adhesiones célula-célula aumentaba proporcionalmente a las fuerzas de tracción en las Cadherinas-VE.

Sin embargo, el aumento de las tensiones producidas en el centro de la célula endotelial (Fibras de Tensión Radial) sí que están relacionadas con una mayor permeabilidad de la monocapa endotelial (Lum y Malik 1996), por lo tanto, es necesario que el proceso que está ocurriendo en la monocapa ocurra en dos fases distintas:

- una de desestabilización de las Uniones Adherentes Lineales, afectando a la permeabilidad de la barrera endotelial;
- y otra donde la formación de las Uniones Adherentes Focales restaura la función de barrera de ésta.

Este proceso será explicado con un mayor detenimiento en la sección 2.3.

1.4. Objetivos, metodología y alcance

Una de las cuestiones que más interés despierta sobre el proceso de la extravasación es cómo la arquitectura subcelular local del citoesqueleto de la actomiosina afecta a la organización y dinámica de las adhesiones celulares. El objetivo de este trabajo es crear un modelo computacional de simulación por elementos finitos que estudie el comportamiento mecánico de la monocapa de células endoteliales. El modelo incluye la simulación de las células como elementos continuos y la de las proteínas que las unen como elementos discretos. Se estudiará con especial detalle la dinámica de las uniones célula-célula a través de un modelo estocástico de comportamiento (catch bond), crucial en la formación de agujeros en la monocapa que favorece el proceso de extravasación tumoral.

Se construirá un modelo bidimensional paramétrico de tensión plana y otro tridimensional paramétrico donde se pueda observar el efecto de la cilindridad característica de los vasos sanguíneos sobre su comportamiento mecánico. Se estudiará el efecto de las fuerzas generadas dentro de la célula (contracción y paralelas a la membrana) en la dinámica de rotura de adhesiones y formación de agujeros.

Materiales y métodos: Modelo paramétrico 2

En este capítulo se describe todo el proceso llevado a cabo para realizar las simulaciones por elementos finitos que se han desarrollado en este Trabajo Fin de Grado. Para realizar dichas simulaciones se ha utilizado el software comercial Abaqus FEA con el desarrollo de una subrutina UMAT (programada en FORTRAN) y varios *scripts* (programados en Python) para modelar las simulaciones paramétricas llevadas a cabo. Dado que se van a realizar dos tipos fundamentales de modelos (2D y 3D) se comenzará explicando los aspectos que comparten para acabar definiendo las particularidades de cada modelo. La ejecución de dichos *scripts* y las simulaciones fueron llevadas a cabo en el cluster de supercomputación perteneciente al grupo Multiscale in Mechanical and Biological Engineering (M2BE, m2be.unizar.es) de la Universidad de Zaragoza.

El principal objetivo que tiene este TFG es construir un programa que facilite el análisis paramétrico para distintas condiciones geométricas, estructurales y de carga en una monocapa endotelial. Para ello se han desarrollado una serie de *scripts* que permiten la entrada de parámetros definidos por el usuario. Estos *scripts* se han escrito en el lenguaje de programación *Python*, ya que de esta forma se puede combinar la funcionalidad de la interfaz gráfica de Abaqus con la potencia de *Python*. Utilizar *scripts* permite automatizar tareas repetitivas y modificar parámetros de la simulación sin un coste de tiempo mayor que el que se necesita para ejecutar dicho *script*. Los parámetros de mayor interés en nuestras simulaciones son:

- La longitud característica de las células endoteliales (en micrómetros), que se corresponde con la longitud del lado de la célula de geometría hexagonal.
- El número de cadherinas-VE que se quiere asignar a cada lado de la célula.
- El número de células endoteliales que va a componer la monocapa endotelial, pudiendo controlar la longitud y altura de la monocapa.

El objetivo de estos *scripts* es obtener un fichero de entrada (*Input File*, extensión `.inp`) en base a los parámetros introducidos para que, a continuación, se realice el cálculo en el cluster junto con las instrucciones proporcionadas por la subrutina de usuario UMAT que modela el comportamiento de las adhesiones célula-célula.

Con el objetivo de detallar el proceso que llevan a cabo los *scripts*, se van a desglosar las instrucciones que ejecuta el programa desde su comienzo hasta la creación del archivo `.inp`.

2.1. Generación de la célula endotelial

El proceso de creación de la monocapa endotelial comenzará por la generación de una primera célula. Todas las células de la monocapa se van a generar a partir de esta primera, ya que como primera aproximación se asumirá homogeneidad de geometría y estructural entre ellas. Este proceso será distinto para el modelo en 3D y para el modelo de tensión plana en 2D.

2.1.1. Modelo en 3D

Se comienza por la creación del *sketch* de la célula de geometría hexagonal con lado igual al valor proporcionado por el usuario (figura 2.1a, con $l = 5 \mu\text{m}$). Se ha modelado la célula con un comportamiento elástico ($E = 1000 \text{ Pa}$ y $\nu = 0,45$) basado en los datos experimentales de diversos estudios (Zeng et al. 2009; Guz et al. 2014; Alcaraz et al. 2003), y con un coeficiente de expansión térmica $\alpha = 1$, cuyo valor es arbitrario ya que su finalidad es la incorporación de las cargas de contracción en el modelo que simulen el efecto de la miosina. Una vez se ha creado la parte como sólido deformable en tres dimensiones y se le ha asignado el material, se le asigna la sección que será homogénea y de tipo *Shell* con un espesor de 500 nm (Pries et al. 2000). Finalizada la creación de la parte (figura 2.1b), se realizan las particiones necesarias en los lados de la célula que servirán como referencia para la creación de las adhesiones célula-célula. El algoritmo creado iterará n veces realizando un número de particiones tal que el número de adhesiones por lado sea $2^n + 1$ (figura 2.1c, con $n = 5$).

2.1.2. Modelo en 2D

El proceso seguido por el *script* para este modelo es idéntico al del modelo en 3D, sin embargo, la parte creada será un sólido deformable de dos dimensiones (TWO_D_PLANAR). Al estar trabajando en 2D con tensión plana, la célula tendrá una sección de tipo sólida y homogénea sin un espesor asociado.

2.2. Ensamblaje de la monocapa endotelial

Con la célula ya definida, se procede a la formación de la estructura de la monocapa endotelial. Las células son posicionadas a una distancia igual a la definida por el usuario que corresponde con la longitud de las cadherinas-VE (50 nm para nuestra simulación (Davies et al. 1993)) dado que en nuestra simulación nos centramos en la simulación de FAJs cuya disposición es perpendicular a la membrana de la célula. Partiendo de la referencia en el origen de coordenadas, se van trasladando las células simétricamente de forma que se consiga la distribución descrita por el usuario en base al número de células y de filas, tal como se observa en la figura 2.2.

Tras obtener la distribución geométrica que tendrán las células en la configuración indeformada, el *script* puede conocer la posición que deben ocupar las FAJs en la monocapa.

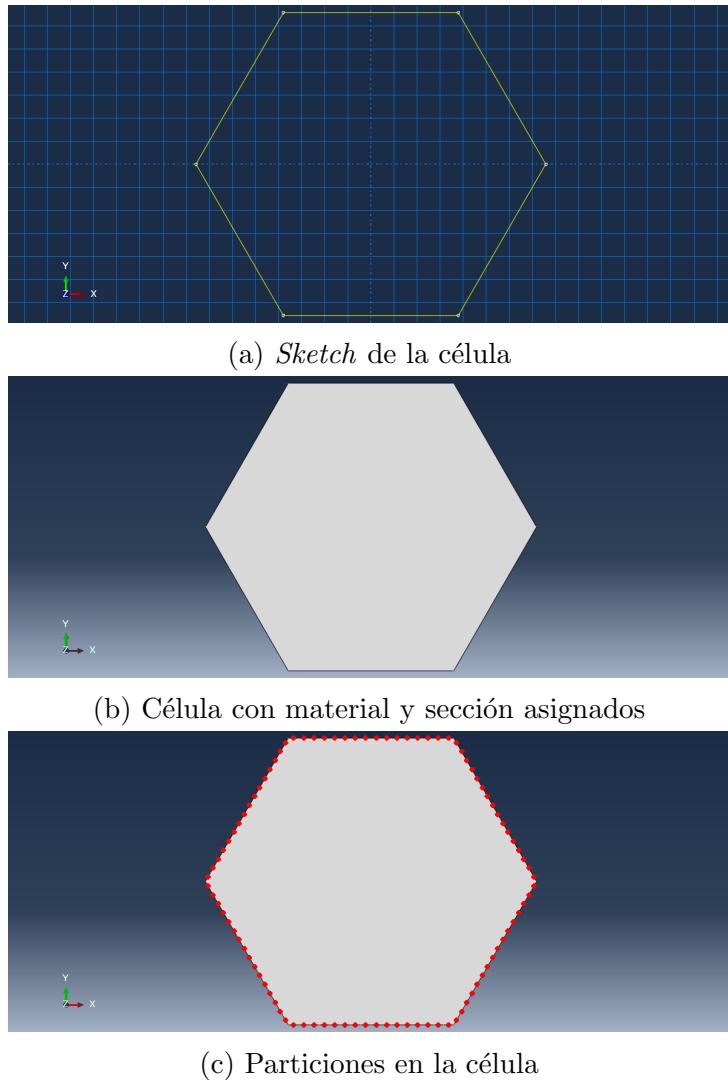


Figura 2.1: Generación de la parte de la célula

El algoritmo que se ocupa de la construcción de las cadherinas-VE tiene tres fases:

- Identificación de todos los puntos de interés susceptibles de formar una adhesión célula-célula.
- Iteración sobre esta lista de puntos para comparar la distancia relativa entre subconjuntos de dos puntos para conocer si forman una adhesión. En este punto hay diferencias entre los modelos 2D y 3D:
 - **Modelo en 2D.** En este modelo, se verifica si el subconjunto de puntos está a una distancia igual a la longitud de las cadherinas-VE. Si lo está y los puntos pertenecen a dos células distintas, se trata de una adhesión célula-célula.
 - **Modelo en 3D.** Para este modelo, además de verificar si el subconjunto de puntos está a una distancia igual a la longitud de las cadherinas-VE, hay que comprobar si el subconjunto pertenece a una adhesión célula-célula tal que, aunque no cumpla la condición de longitud en esta configuración geométrica, la cumpliera en caso de estar en la configuración geométrica cilíndrica. Esto se

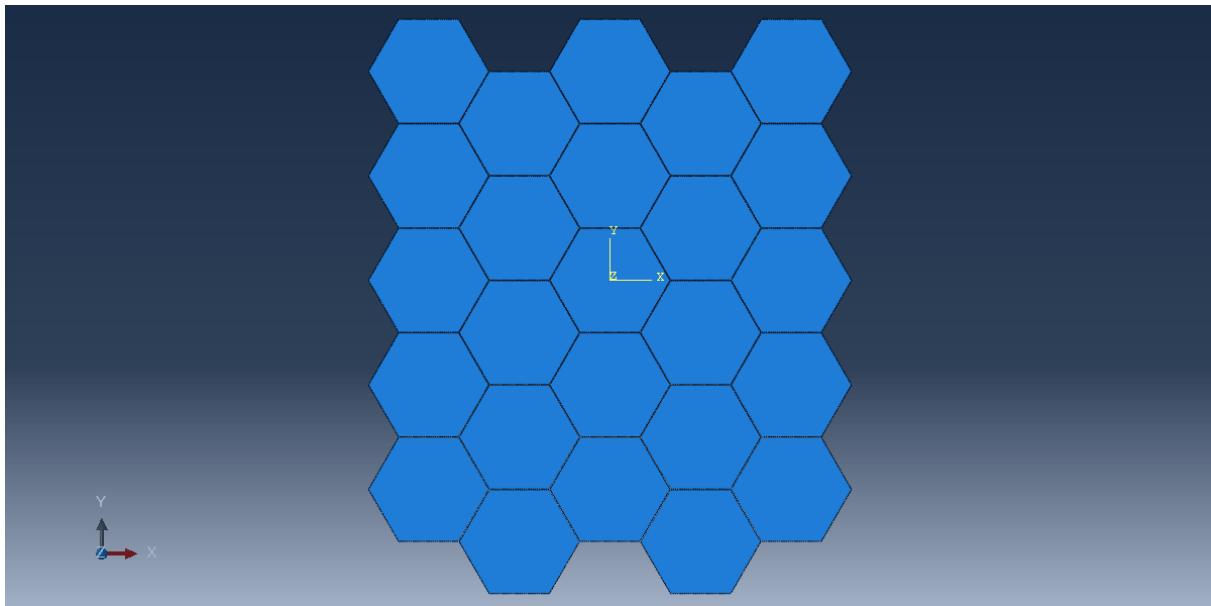


Figura 2.2: Distribución espacial de las células en el ensamblaje

debe a que el modelo 3D es posteriormente modificado para lograr la geometría cilíndrica de la monocapa endotelial y las uniones deben haber sido definidas previamente.

- Incorporación de los subconjuntos de puntos a un *sketch* con el que crear la parte correspondiente a las cadherinas-VE.

Una vez creada la parte (tal como se refleja en la figura 2.3), se le asigna un material definido por el usuario en una subrutina UMAT cuyo funcionamiento será descrito en la sección 2.3. Estas adhesiones van a ser modeladas mediante elementos cables (o TRUSS en Abaqus), debido a la similitud de su comportamiento mecánico con el de las adhesiones a simular:

1. las FAJs trabajan únicamente a axil, por lo que trabajar con elementos que también soportan esfuerzos flectores (e.g. *beams*) no simularía adecuadamente su comportamiento;
2. en el caso de darse la situación de que las células unidas por una adhesión sufrieran desplazamientos paralelos opuestos (esfuerzos de cizalla), los elementos TRUSS estarían actuando como LAJs (esfuerzos tangenciales) ya que su disposición sería prácticamente paralela a la membrana.

2.2.1. Construcción de la geometría en 3D

Para construir la geometría cilíndrica de la monocapa que se simula para el caso de 3D, se necesitan un total de tres *scripts*:

1. El primer *script* es el que define todo el modelo dibujado sobre una geometría bidimensional, al igual que para el modelo 2D, generando un archivo **inp**.

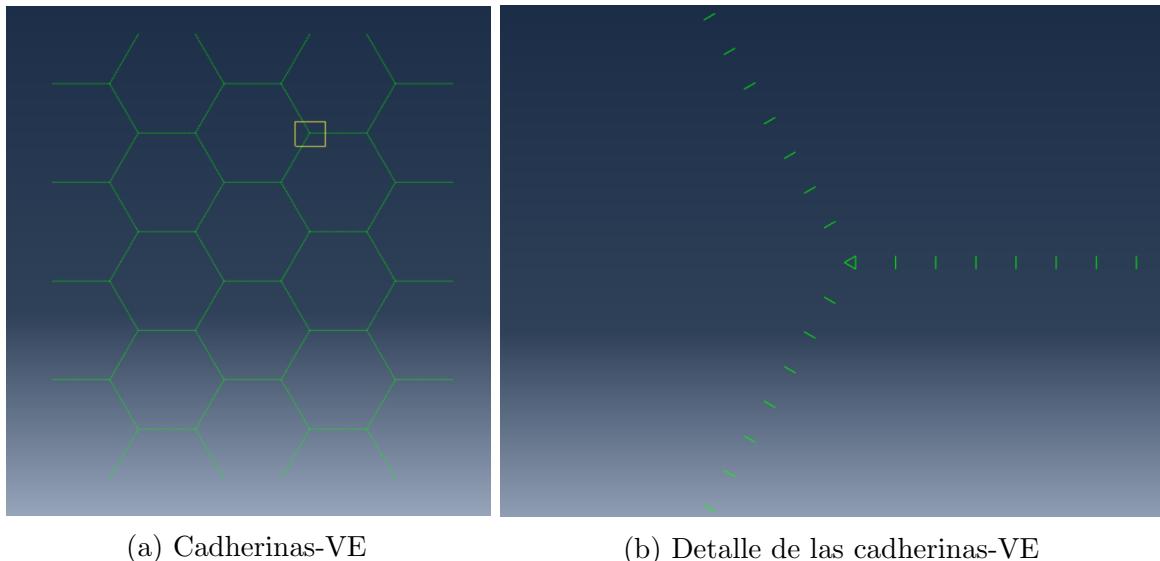


Figura 2.3: Distribución espacial de las adhesiones célula-célula en el ensamblaje. Las células han sido eliminadas de esta vista para una mejor visualización de las adhesiones

2. El segundo *script* realiza una transformación de las coordenadas de los nodos del archivo **inp** para crear la geometría cillíndrica.
3. El tercer *script* importa el archivo **inp** modificado y, además de unir las distintas instancias (células endoteliales con FAJs), incorpora las condiciones de contorno que se incorporaran al modelo 3D.

Para apreciar de forma gráfica las tareas realizadas por los *scripts*, podemos ver como partiendo de un archivo **inp** con un modelo como el de la figura 2.2, obtendremos una geometría como la de la figura 2.4.

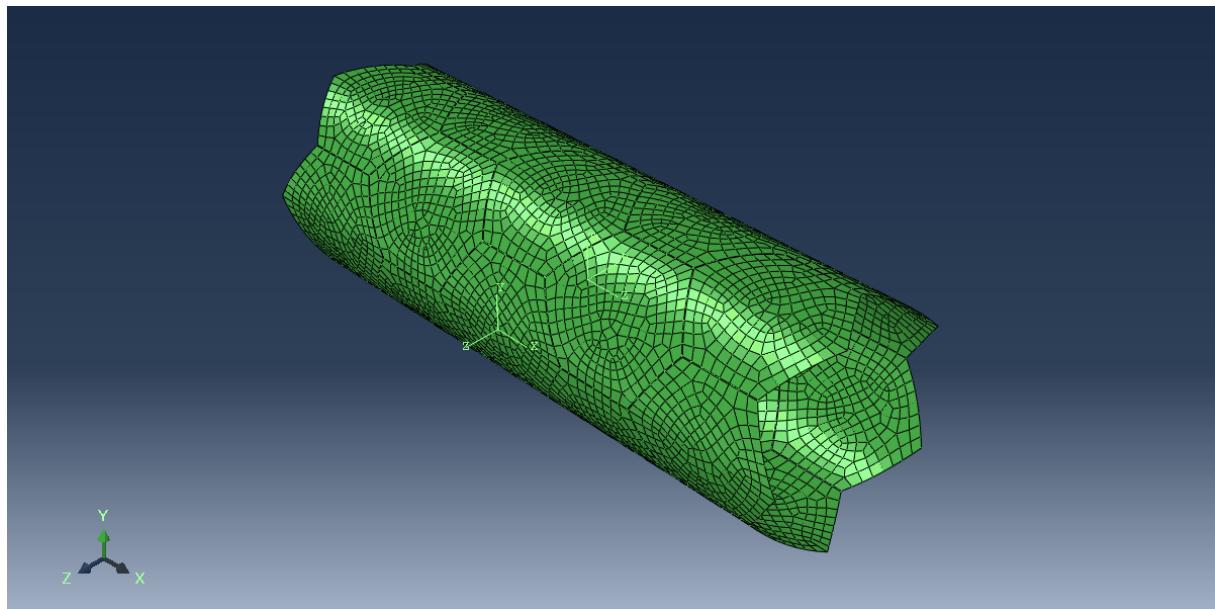


Figura 2.4: Geometría del modelo tridimensional de la monocapa endotelial. En este modelo hay 9 cadherinas-VE por lado de la célula.

2.3. Definición del comportamiento de las adhesiones célula-célula

Para la creación del material que conforma las cadherinas-VE se ha necesitado de la creación de una subrutina UMAT, escrita en *FORTRAN*, que modele el comportamiento buscado para estas adhesiones célula-célula. En primer lugar, debe entenderse el proceso que ocurre en las adhesiones célula-célula, ya que no existe un comportamiento lineal en la transmisión de fuerzas de las uniones, sino que se trata de un proceso de dos fases:

2.3.1. Debilitación de la monocapa

En ausencia de fuerzas de contracción, las adhesiones predominantes en la monocapa son las LAJs. La formación de RSFs en las células endoteliales causa el movimiento del citoesqueleto de actina hacia el interior de la célula, lo que reduce la presencia de los manojos de actina que sirven como elementos de conexión para las LAJs. Esta reducción de actina es la causa de la desestabilización de las LAJs y, por tanto, de la creación de huecos en la barrera endotelial.

2.3.2. Restauración de la monocapa

Esta desestabilización, causada por las fuerzas de contracción en las células, tiene otro efecto opuesto: las zonas con presencia de adhesiones de cadherinas-VE resisten, lo que resulta en la aparición de FAJs. Se piensa que este proceso de formación de las FAJs podría ser un proceso estocástico (de carácter aleatorio) o podría ser provocado por inhomogeneidades desconocidas de las LAJs a niveles submicroscópicos (Oldenburg y de Rooij, 2014). Cuando estas adhesiones empiezan a soportar fuerzas de tracción, la α -catenina comienza a alargarse y se produce la reclutación de la vinculina en las adhesiones. Una vez estas uniones han sido reforzadas, se produce una señalización que lleva a la restauración de las LAJs.

Este comportamiento causa una dinámica muy activa y cambiante en la monocapa que no se puede modelar con las propiedades que Abaqus ofrece, para ello se ha escrito una subrutina UMAT con la que se puede simular el comportamiento buscado en las uniones. En esta subrutina, se define una ley estocástica de rotura y restauración de las uniones en función de la fuerza que éstas soportan.

2.3.3. Ley de rotura

La rotura de las uniones se define como una ley de *catch-slip bond* (Novikova y Storm, 2013) que proporciona un comportamiento estocástico a la rotura de las adhesiones. Esta ley se adapta al comportamiento mecánico observado en cadherinas-VE, donde las uniones sometidas a bajas fuerzas son inestables. A medida que la tensión en las uniones incrementa, éstas se hacen más estables hasta que llega un punto en el que las uniones no son capaces de soportar la tensión y la probabilidad de rotura comienza a crecer exponencialmente.

La probabilidad de rotura tiene la forma de la siguiente ecuación

$$k_{ub}(F) = e^{\varphi_c - \frac{F}{F_{sat}}} + e^{\frac{F}{F_{sat}} - \varphi_s} \quad (2.1)$$

$$prob_{ub} = 1 - e^{-k_{ub}\Delta t} \quad (2.2)$$

donde k_{ub} es el ratio de rotura que está en función de la relación entre F (fuerza de tracción en la adhesión célula-célula) y F_{sat} (parámetro de la fuerza de saturación de la unión) y de φ_c y φ_s (parámetros adimensionales de fuerza para la curva de *catch* y de *slip bond*, respectivamente). Se asume que el efecto de fuerzas de compresión no es capaz de causar daño sobre las uniones. La probabilidad de rotura, $prob_{ub}$, se comporta como una función exponencial que depende de la fuerza que soporta la unión ($k_{ub}(F)$) y del tiempo que la unión esta soportando dicha fuerza (Δt), ya que en procesos biológicos de rotura, el tiempo que una fuerza actúa sobre un material es determinante en el efecto que esa fuerza tiene sobre el material (e.g. úlceras por presión en la piel).

La evolución de esta ley se puede observar en la figura 2.5. Cuando las fuerzas de tracción son mínimas, no ha habido un reclutamiento de vinculina elevado por parte de las cadherinas-VE, por lo que las FAJs tienen una menor rigidez, lo que se ve reflejado en la mayor probabilidad de rotura en la zona de la gráfica con pendiente negativa. Tras esta fase, cuando las fuerzas de tracción aumentan y se sitúan dentro de un rango situado en el valle de la curva, las uniones están trabajando en su zona óptima, por lo que su probabilidad de rotura es baja. Conforme siguen subiendo las fuerzas de tracción, la probabilidad de rotura vuelve a subir exponencialmente a dicha fuerza y al tamaño de incremento que la soportan. De hecho, para una misma fuerza, puede haber gran diferencia en la probabilidad de rotura dependiendo de si se está aplicando en un incremento de tiempo grande ($\Delta t = 0,01$ s) o pequeño ($\Delta t = 0,00001$ s).

2.3.4. Ley de unión

Al igual que la ley de rotura, la unión también se caracteriza con una probabilidad estocástica de unión. La ecuación de la ley de unión es tal que

$$k_b(L_{cadh}) = D_{cadh} \left(1 - \frac{L_{cadh}}{L_{lim}} \right) \quad (2.3)$$

$$prob_b = 1 - e^{-k_b\Delta t} \quad (2.4)$$

donde k_b es el ratio de unión, que depende de la longitud de la cadherina inciativa (rota, con un módulo de Young del 1 % respecto a las activas), L_{cadh} . D_{cadh} representa la densidad de cadherinas-VE disponibles para unión en la monocapa y L_{lim} es la longitud máxima

2.3. Definición del comportamiento de las adhesiones célula-célula

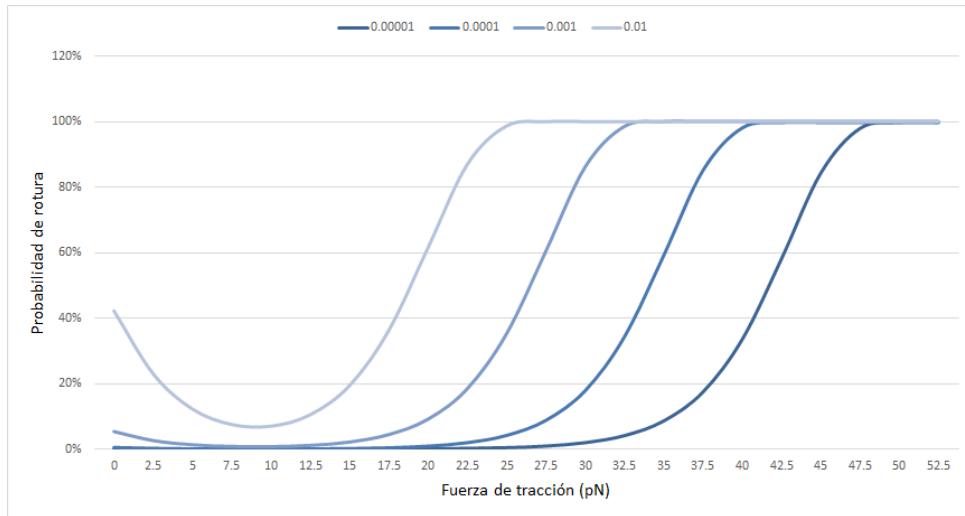


Figura 2.5: Evolución de la probabilidad de rotura de las adhesiones célula-célula en función de las fuerzas de tracción que soportan y del incremento de tiempo que actúan

para la que se permite la unión. La probabilidad de unión, $prob_b$, se comporta también como una función de distribución exponencial que depende de la longitud de la adhesión (L_{cadh}) y del incremento de tiempo (Δt) en el que se evalúa, al igual que se ha explicado antes.

La evolución de la gráfica se observa en la figura 2.6. Se puede observar como una vez se ha sobrepasado la longitud máxima, la probabilidad que tiene la adhesión de volver a unirse es nula. Vemos que el parámetro de la cadherina-VE (D_{cadh}) modifica la pendiente de la función, por lo que establece una probabilidad máxima de unión del 45 %. La probabilidad de unión aumenta proporcionalmente con el tamaño del incremento de tiempo, Δt , aunque la probabilidad de unión acumulada es aproximadamente constante.

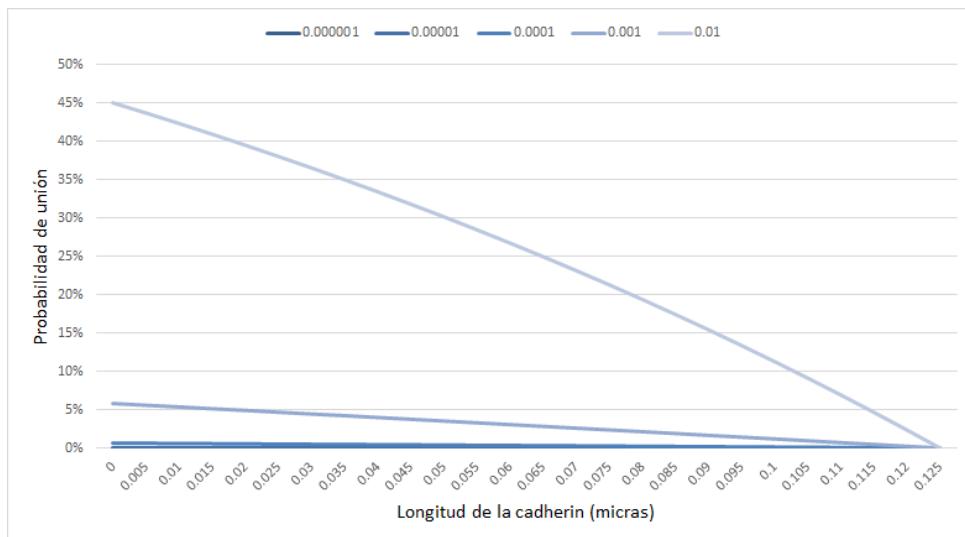


Figura 2.6: Evolución de la probabilidad de unión de las adhesiones célula-célula en función de la longitud de la adhesión y del incremento de tiempo

2.4. Ambiente mecánico de la monocapa endotelial

La monocapa endotelial es una estructura muy dinámica sometida a condiciones de contorno muy variables. Por ello, para realizar su modelado es necesario establecer ciertas hipótesis simplificadoras.

2.4.1. Condiciones de contorno

Las células endoteliales están inmersas en matriz extracelular, que actúa como “sustrato” que las mantiene en su posición cuando las condiciones mecánicas no son severas, y, además, están expuestas a la presión interior que ejerce el flujo sanguíneo. Con estas condiciones de contorno, cabe esperar que el desplazamiento radial que experimente la monocapa sea relativamente pequeño y poco influyente en la rotura de adhesiones célula-célula. Por lo tanto, el modelo de la monocapa endotelial en 3D tiene el desplazamiento impedido en la dirección radial (figura 2.7a). Además, se imponen condiciones de empotramiento en los extremos libres de la monocapa para evitar desplazamientos como sólido rígido del modelo. En el modelo de tensión plana bidimensional únicamente es necesario empotrar los extremos libres de las células endoteliales como se puede apreciar en la figura 2.7b.

2.4.2. Cargas mecánicas

La monocapa celular está sujeta continuamente a tensiones normales y tangenciales provocadas por el flujo sanguíneo que circula en su interior. Sin embargo, estas tensiones no son las principales causantes de la permeabilidad de la barrera endotelial. Uno de los mecanismos de permeabilidad de la monocapa endotelial más influyentes que se conocen es a través del incremento de la concentración intracelular de Calcio (Ca^{2+}). El aumento de la concentración de Calcio activa vías de señalización que afectan tanto a la organización estructural del citoesqueleto como a las adhesiones célula-célula de cadherinas-VE (Tiruppathi et al. 2002). Esto es debido a que proteínas dependientes del Calcio provocan la contracción de las células endoteliales, lo que conlleva un aumento de las fuerzas de tracción soportadas por las adhesiones. La propagación del Calcio a través de ondas ha sido ampliamente demostrada como factor en la modificación de la arquitectura de la monocapa endotelial (Long et al. 2012).

Las cargas que se simulan en el modelo son estas ondas de Calcio con el fin de observar el efecto que tienen sobre la rotura de las cadherinas-VE y, por tanto, sobre la permeabilidad de la monocapa. La onda comienza en un extremo de la monocapa endotelial y avanza en la dirección longitudinal de la geometría (eje z para 3D, eje x para 2D) de forma homogénea en cada grupo de células para una misma coordenada z (3D) o x (2D). La distribución de las fuerzas de contracción se muestra en la figura 2.8 donde cada línea representa una columna distinta de células.

Para simular la contracción de la miosina asociada a estas ondas de Calcio, se utiliza una analogía termoelástica que permite identificar el incremento de temperatura como el

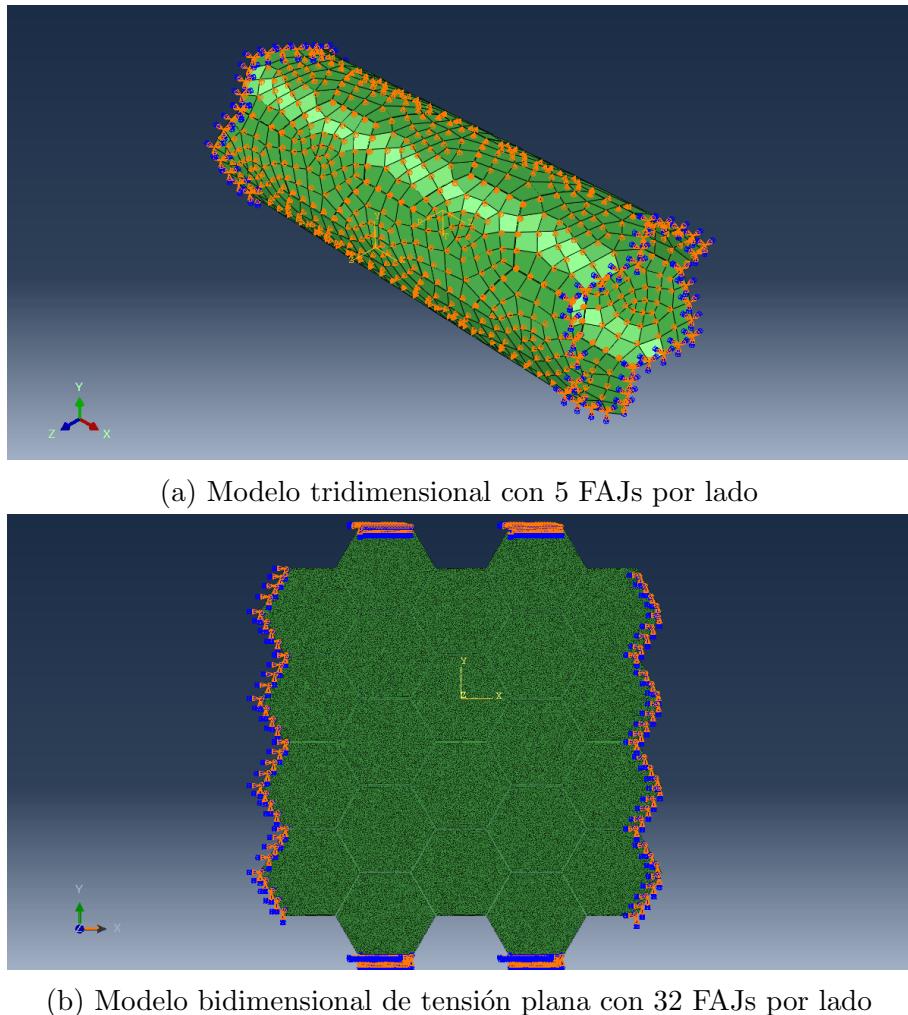


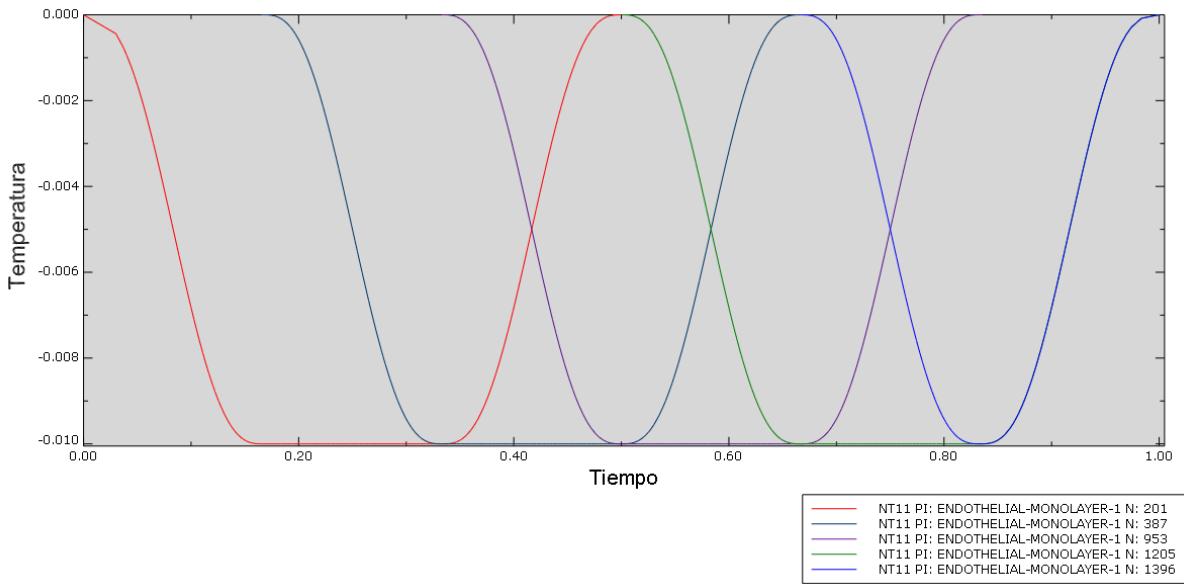
Figura 2.7: Condiciones de contorno aplicadas a la monocapa endotelial

estímulo asociado al flujo de Calcio, considerándose el coeficiente de dilatación térmica igual a la identidad.

$$\underline{\alpha} = \underline{\mathbb{I}} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (2.5)$$

2.5. Análisis estático

Como consecuencia de esta definición de las cadherinas-VE, se producirán muchos cambios en las propiedades mecánicas del material de cada adhesión durante la simulación. Cuando la adhesión se define como “rota” se reduce su módulo elástico hasta un 1 % del valor original, provocando una gran pérdida de rigidez en la unión. Estas pérdidas de rigidez provocan una gran no linealidad en las tensiones que sufren las adhesiones dificultando la convergencia de un análisis estático por elementos finitos, ya que Abaqus continuará



iterando hasta que estas discontinuidades sean lo suficientemente pequeñas y las tolerancias de los equilibrios sean satisfechas.

Cuando es posible, Abaqus usa el método de Newton-Raphson para solucionar los problemas no lineales. En algunos casos, se utiliza una implementación exacta del método de Newton con el Jacobiano definido exactamente, y en otros, el Jacobiano se aproxima de forma que se trabaja con un método de Newton modificado. Por defecto, en cada incremento de un análisis no lineal, Abaqus estima la solución del incremento extrapolando linealmente la solución del incremento anterior para alcanzar antes la solución. Sin embargo, dado que tenemos cambios repentinos en las tensiones, la extrapolación puede causar un número de iteraciones excesivo. Por ello, el análisis no hace uso de la extrapolación de Abaqus.

Los análisis estáticos no lineales pueden ser inestables. En nuestro caso, los cambios en la rigidez del material pueden llevar a inestabilidades locales donde haya una transferencia de energías de deformación de una parte a otra del modelo, haciendo que los métodos globales usados para llegar a la solución no funcionen. Esto se resuelve mediante la estabilización automática con un coeficiente de amortiguamiento constante de forma que, en el caso de que una región se volviera inestable, absorbería parte de la energía de deformación disipándola a través del amortiguamiento.

Las cadherinas-VE van a sufrir grandes deformaciones, por lo que evaluar las deformaciones y tensiones respecto a su configuración indeformada no aportaría soluciones reales. Por ello, se realiza la simulación con la hipótesis de grandes desplazamientos.

Resultados 3

En este apartado se detallan los resultados obtenidos en las simulaciones realizadas sobre los distintos modelos creados. Con la finalidad de observar el efecto que tiene la cilindridad en los resultados se van a simular cuatro tipos de modelos:

- Modelo de tensión plana bidimensional (como el mostrado en la figura 2.7b), en el que se interpreta que el radio del vaso sanguíneo es lo suficientemente grande como para no haber efecto de la cilindridad sobre las fuerzas que actúan en éste.
- Modelo tridimensional con un radio de $5,55 \mu\text{m}$ cuya estructura se compone de 4 filas de células (figura 3.1a). Este modelo corresponderá al del tamaño evaluado más pequeño.
- Modelo tridimensional con un radio $6,93 \mu\text{m}$ con 5 filas de células (figura 2.4). Será el vaso sanguíneo de tamaño medio evaluado.
- Modelo tridimensional con un radio $8,32 \mu\text{m}$ con 6 filas de células (figura 3.1b). Será el vaso sanguíneo de mayor tamaño que se analice.

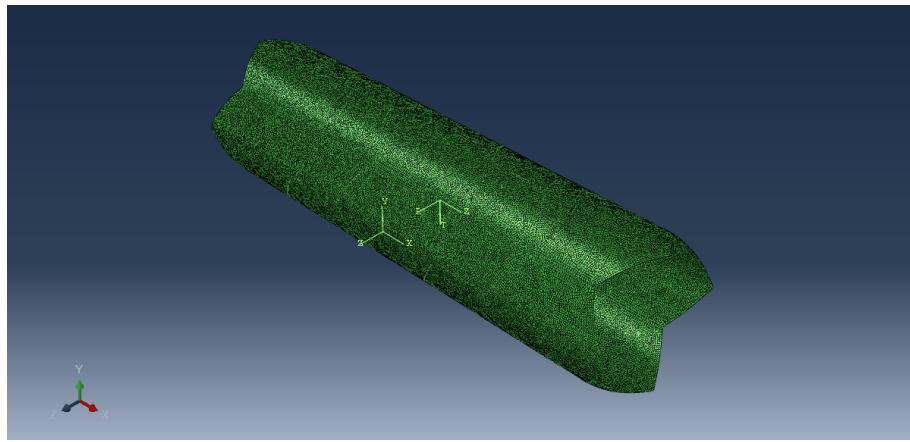
En los análisis se ha observado el comportamiento mecánico que sufre la monocapa endotelial y el daño que han sufrido las adhesiones célula-célula causado por una onda de Calcio que viaja por la monocapa. Se ha variado la severidad de la contracción celular para tres casos distintos ($\varepsilon^{\Delta T} = \alpha \Delta T \mathbb{I}$, con $\alpha \Delta T = -1\%, -2\%, -3\%$) con los que se ha conseguido ver su comportamiento para distintos ambientes mecánicos.

Empleando una mayor densidad de cadherinas se consiguen resultados más acordes con la realidad, sin embargo, el coste de computación que requiere calcular las adhesiones célula-célula limita el número que se pueden incorporar al modelo. Para las simulaciones se han empleado modelos con un número máximo de 33 adhesiones.

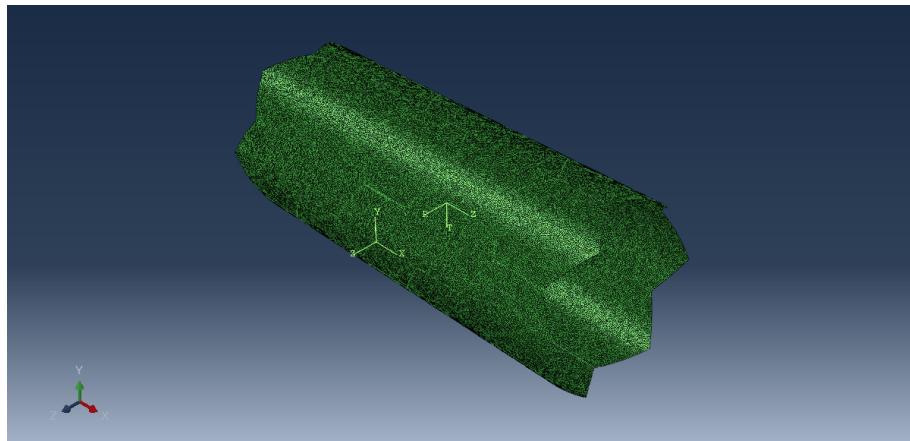
Los resultados más relevantes obtenidos en las simulaciones se comentan a continuación.

3.1. Concentración de tensiones en los vértices de las células

Uno de los resultados más relevantes es la localización de las concentraciones de tensiones de la célula endotelial. Como podemos ver en las figuras 3.2, las máximas tensiones se encuentran de forma general en los vértices donde coinciden tres células distintas.



(a) Modelo tridimensional con un radio de $5,55 \mu\text{m}$



(b) Modelo tridimensional con un radio de $8,32 \mu\text{m}$

Figura 3.1: Variaciones del modelo tridimensional estudiadas

Estos resultados apuntan a que una mayor tensión en las uniones situadas en estos puntos causa que sean más propensas a romper ya que soportan unas tensiones mayores que las demás. Esto implica que los agujeros en la monocapa endotelial son formados normalmente en las adhesiones localizadas en estos vértices, siendo estos agujeros posibles sitios por donde se produce la extravasación.

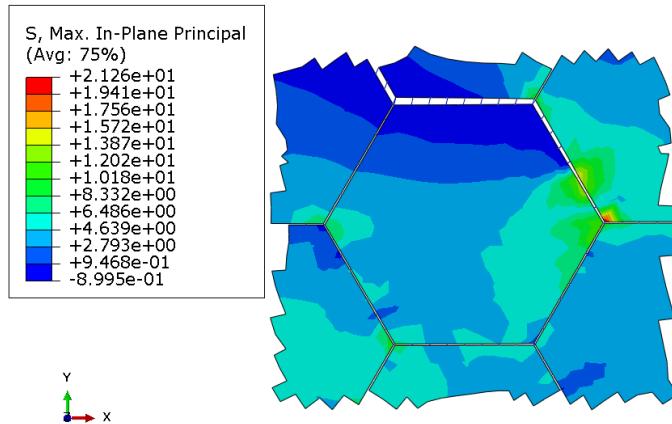
3.2. Patrones de rotura de la monocapa endotelial

Como ya se ha explicado anteriormente, la monocapa endotelial tiene una dinámica muy activa y cambiante. Esto causa que su comportamiento mecánico sea muy distinto para distintos ambientes mecánicos. Se pueden distinguir tres fases principales de trabajo: fase de reposo, de trabajo y de rotura.

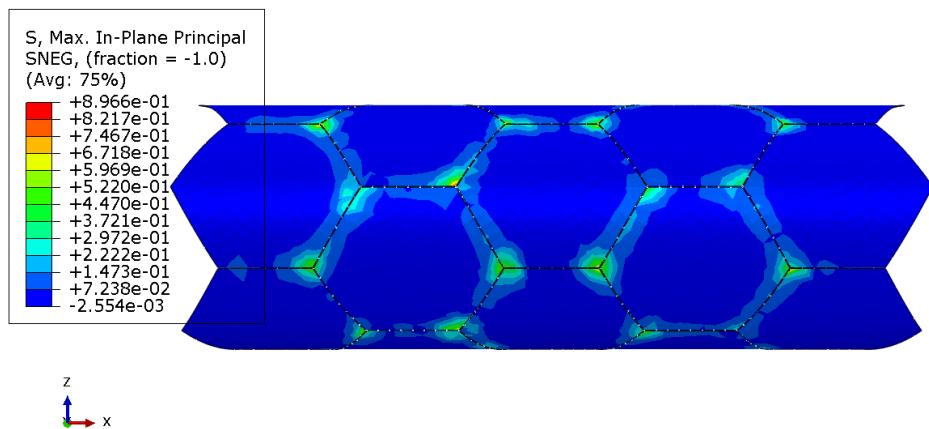
3.2.1. Fase de reposo: inestabilización

Esta situación ocurre cuando las fuerzas de contracción en la monocapa son muy bajas, es decir, la onda de Calcio circulante por la monocapa no causa una contracción elevada,

3.2. Patrones de rotura de la monocapa endotelial



(a) Modelo 2D (Esfuerzos en *Pa*)



(b) Modelo 3D (Esfuerzos en *Pa*)

Figura 3.2: Concentraciones de tensiones en la monocapa endotelial

por lo que las tensiones que experimentan las cadherinas-VE son muy bajas (figura 3.3). Cuando las fuerzas de tracción son muy bajas no hay reclutamiento de vinculina, por lo que las uniones son poco estables y su rigidez es baja.

Esta situación se refleja en el modelo de forma que la monocapa tiene un daño elevado. Sin embargo, al haber muy poca hay deformación de las adhesiones, la posibilidad de su restauración es muy elevada (ecuación 2.4), por lo que se crea una dinámica muy activa en la que las uniones rompen y se vuelven a unir constantemente. Esta fase se correspondería con la primera parte de la gráfica de la figura 2.5 donde la probabilidad de rotura es alta justo antes de llegar al “valle” donde disminuye esta probabilidad.

3.2.2. Fase de rotura: colapso

Cuando las fuerzas superan los límites de rotura de las adhesiones célula-célula, estas empiezan a romper. Cuantas más adhesiones se rompen, más tensiones deben soportar las adhesiones que no rompen por lo que su probabilidad de rotura aumenta. Esto causa que la rotura que se produce en la monocapa sea similar en forma a la propagación de una

3.2. Patrones de rotura de la monocapa endotelial

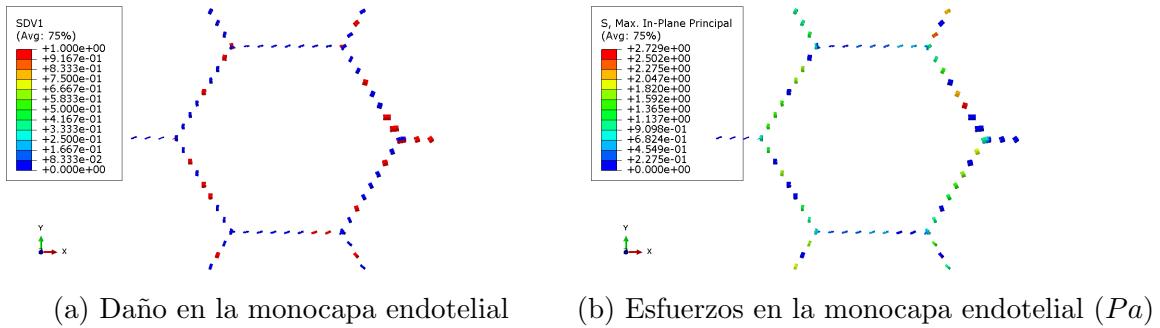


Figura 3.3: Adhesiones célula-célula inestables en la monocapa endotelial. Se representan únicamente las uniones, ya que la célula en este caso no aporta ninguna información. SDV1 es la variable que mide el daño: SDV1=1 significa que la adhesión está rota , SDV1=0 significa que la adhesión está en buen estado. La apariencia de los TRUSS ha sido modificada para mejorar su visibilidad.

grieta (figura 3.4).

Esta situación no se produce en condiciones normales de trabajo de la monocapa endotelial, sino que se daría en casos extremos donde la integración de la monocapa se ve totalmente comprometida. Para los casos tridimensionales estudiados se ha detectado mayor severidad en la rotura cuanto mayor es el radio de la monocapa endotelial (figura 3.5). En monocapas de mayor tamaño hay un mayor efecto de la contracción sobre las tensiones que sufren las uniones al aumentar la deformación que éstas sufren, lo que provoca un mayor daño en la integridad de la barrera endotelial.

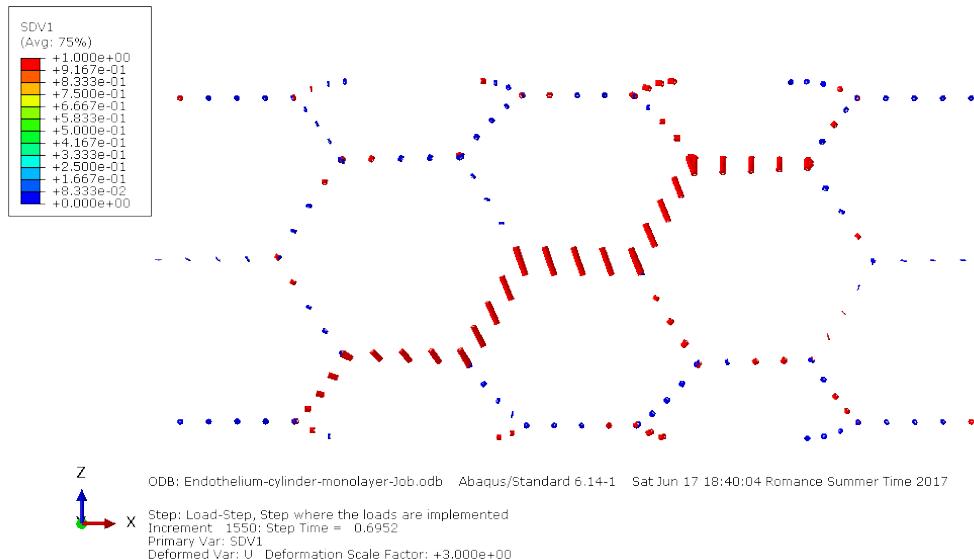


Figura 3.5: Grieta generada en una monocapa endotelial de radio $8,32 \mu\text{m}$ cuando se produce una contracción celular causada por una onda de Calcio.

3.3. Comportamiento mecánico de la monocapa

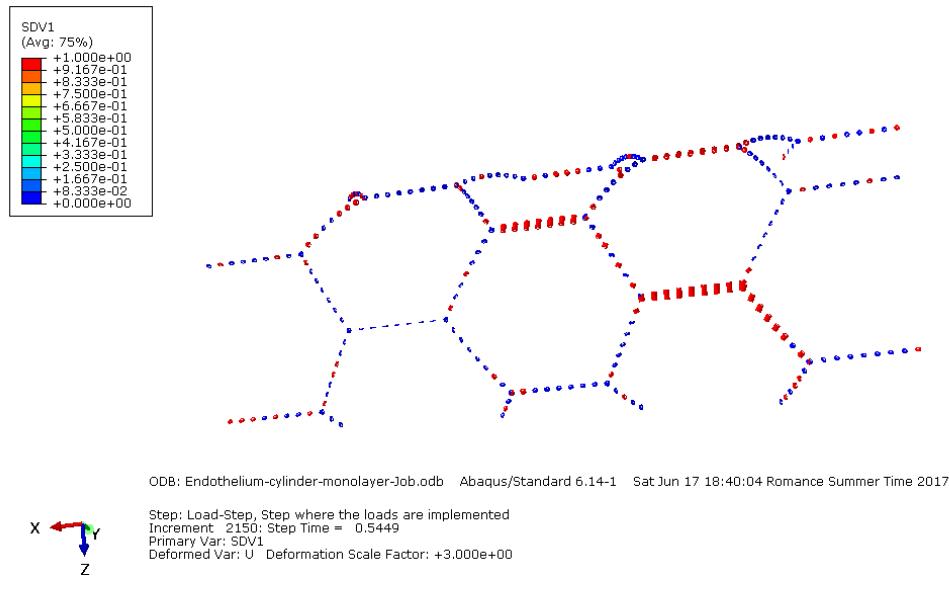
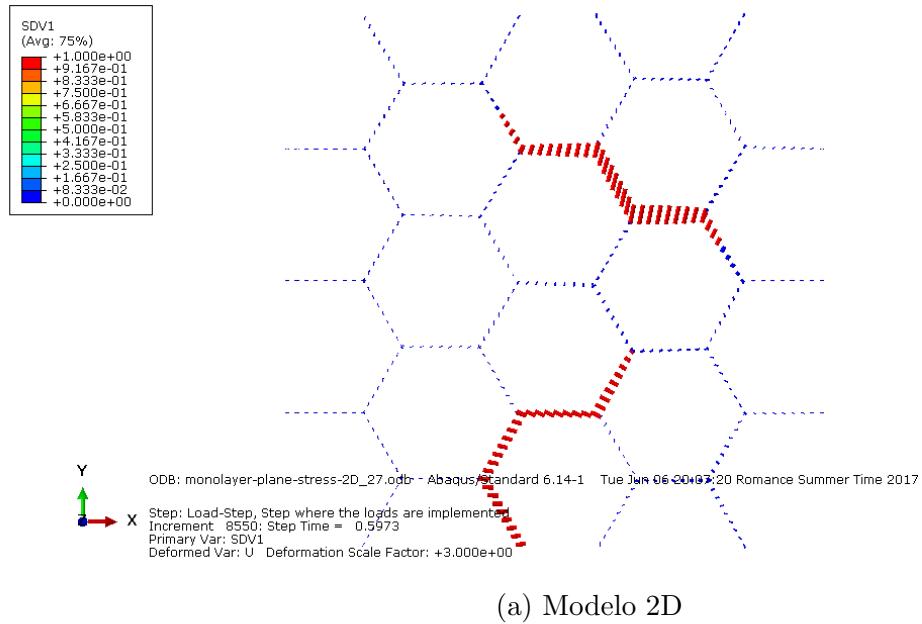


Figura 3.4: Patrón de rotura de la monocapa endotelial

3.2.3. Restauración de uniones en la monocapa

Después de la fase de rotura, una vez ha pasado la onda de Calcio, la contracción celular disminuye y las uniones vuelven a restaurarse en función de si recuperan su geometría original. En el proceso de unión se crea un efecto “cremallera” donde las adhesiones rotas empiezan a unirse en su mayoría una vez cesa la contracción celular.

3.3. Comportamiento mecánico de la monocapa

Este comportamiento descrito en la sección 3.2.2 no es el que ocurre de forma habitual en una monocapa, sino que sería un caso extremo de rotura. La situación de mayor interés

3.3. Comportamiento mecánico de la monocapa

es aquella donde la monocapa sufre un daño estocástico tal que se crean agujeros en las adhesiones por los que pueden extravasar células tumorales, en el caso de la cascada metastásica.

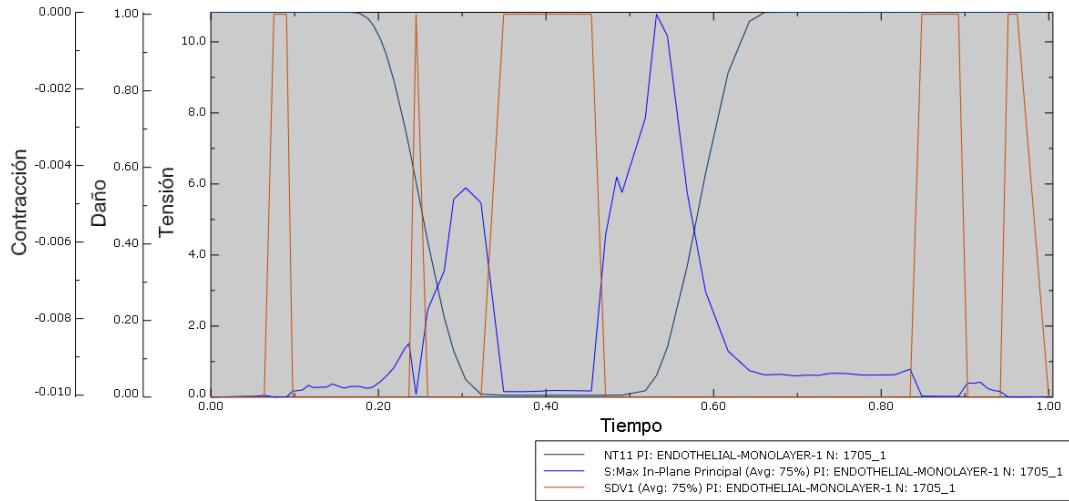


Figura 3.6: Gráfica de la evolución de las tensiones y el daño en un adhesión célula-célula en función del tiempo. La contracción mostrada es la que sufren las células en la misma en contacto con la adhesión (en tanto por uno).

En la figura 3.6, se observa la gráfica de una de las uniones de la monocapa endotelial. Al principio, en ausencia de contracción, las tensiones son prácticamente nulas y se produce su rotura por la inestabilidad característica de esta fase. Cuando comienza a aumentar la contracción y las fuerzas de tracción incrementan, se observa una rotura (en $F = 6$ pN). Al no haber una deformación muy elevada, la adhesión se restaura en $t \approx 0,45$ s y llega a resistir fuerzas de más de 10 pN antes de que desaparezca la contracción. Cuando se encuentra prácticamente libre de tensiones en la fase final, se observa que vuelve a la fase inicial de inestabilidad con dos roturas a bajas tensiones.

Conclusiones, limitaciones y trabajo futuro

4

En este proyecto se ha observado el comportamiento estocástico de la monocapa celular ante distintas condiciones mecánicas de su ambiente. Según las tensiones que la monocapa soporta tiene un comportamiento inestable (cuando las tensiones son mínimas), estable con aberturas de agujeros en determinados momentos (zona normal de trabajo) y de rotura (cuando las tensiones máximas se superan). De esta forma se ha conseguido un mejor entendimiento del efecto que una onda de Calcio podría tener en una monocapa endotelial.

Hoy en día se están llevando a cabo numerosos estudios acerca del comportamiento de las adhesiones célula-célula en monocapas celulares, por lo que es posible que se descubran nuevos mecanismos que rigen la rotura y reconstrucción de estas adhesiones. Ciertos autores se inclinan más a pensar que este comportamiento no es solo estocástico, sino que mecanismos desconocidos o inhomogeneidades no descubiertas en las LAJs son también parte del proceso que lleva a estas uniones a romperse.

De acuerdo con la bibliografía actual se han detectado mayores concentraciones de tensiones en las “esquinas” de las células, lo que causa una mayor probabilidad de creación de agujeros en la monocapa por el cual las células tumorales puedan extravasar. La hipótesis de que estas zonas son aquellas donde es más propensa la extravasación de células tumorales está siendo investigada hoy en día.

La versatilidad de un modelo paramétrico ofrece la posibilidad de realizar simulaciones muy distintas sin un tiempo elevado para construir un modelo nuevo, por lo que se podría adaptar su funcionalidad para otros tipos de simulaciones sin dificultad.

Las simulaciones realizadas tienen limitaciones con respecto a la situación que ocurre en el endotelio, principalmente porque solo estamos evaluando los procesos de señalización mecánica que ocurren en éste. A nivel estructural, la geometría del modelo también constituye una limitación, ya que las adhesiones célula-célula están limitadas a conectarse únicamente entre dos puntos. Sin embargo, estas adhesiones pueden ser formadas entre dos células de la monocapa endotelial que estén lo suficientemente cerca.

El tiempo de computación también constituye una limitación. Cuanto mayor densidad de cadherinas-VE se simulan, mejores resultados se alcanzan. Sin embargo, el tiempo de computación que cada unión necesita es elevado, especialmente debido a las dificultades de convergencia que se experimentan con análisis no lineales en los que el número de iteraciones es elevado.

Conseguir mejorar la densidad de las adhesiones célula-célula sin incrementar el tiempo de computación en gran cantidad sería una línea de trabajo que arrojaría resultados interesantes donde la probabilidad estocástica de rotura de las uniones podría ser apreciada mejor. Además, como se ha comentado anteriormente, si la monocapa fuera capaz de regenerar su geometría mientras se ejecuta la simulación y formar adhesiones distintas a las originales podríamos observar una dinámica más realista.

Bibliografía

- [1] Abdallah Abu Taha y Hans-J Schnittler. “Dynamics between actin and the VE-cadherin/catenin complex”. En: *Cell Adhesion & Migration* (2014). ISSN: 1933-6918. DOI: 10.4161/cam.28243.
- [2] Jordi Alcaraz y col. “Microrheology of Human Lung Epithelial Cells Measured by Atomic Force Microscopy”. En: *Biophysical Journal* 84.3 (2003), págs. 2071-2079. ISSN: 00063495. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)75014-0.
- [3] A. R. A. Anderson y col. “Mathematical Modelling of Tumour Invasion and Metastasis”. En: *Journal of Theoretical Medicine* 2.2 (2000), págs. 129-154. ISSN: 1027-3662. DOI: 10.1080/10273660008833042.
- [4] Koji Ando y col. “Rap1 potentiates endothelial cell junctions by spatially controlling myosin II activity and actin organization”. En: *The Journal of Cell Biology* 202.6 (sep. de 2013), págs. 901-916. ISSN: 0021-9525. DOI: 10.1083/jcb.201301115.
- [5] Anna A. Birukova y col. “Endothelial permeability is controlled by spatially defined cytoskeletal mechanics: Atomic force microscopy force mapping of pulmonary endothelial monolayer”. En: *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 5.1 (mar. de 2009), págs. 30-41. ISSN: 15499634. DOI: 10.1016/j.nano.2008.07.002.
- [6] William M Brieher y Alpha S Yap. “Cadherin junctions and their cytoskeleton(s)”. En: *Current Opinion in Cell Biology* 25.1 (feb. de 2013), págs. 39-46. ISSN: 09550674. DOI: 10.1016/j.ceb.2012.10.010.
- [7] G. Wayne Brodland y col. “The Mechanics of Metastasis: Insights from a Computational Model”. En: *PLoS ONE* 7.9 (sep. de 2012). Ed. por Zvia Agur, e44281. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0044281.
- [8] B A Camley y W-J Rappel. “Physical models of collective cell motility: from cell to tissue”. En: *Journal of Physics D: Applied Physics* 50.11 (2017), pág. 113002. ISSN: 0022-3727. DOI: 10.1088/1361-6463/aa56fe.
- [9] Elizabeth P. Canović y col. “Tensional homeostasis in endothelial cells is a multicellular phenomenon”. En: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* (2016). ISSN: 0363-6143. DOI: 10.1152/ajpcell.00037.2016.
- [10] H.-J. Choi y col. “alphaE-catenin is an autoinhibited molecule that coactivates vinculin”. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.22 (mayo de 2012), págs. 8576-8581. DOI: 10.1073/pnas.1203906109.
- [11] Lee Ann Cohen y Jun-Lin Guan. “Mechanisms of focal adhesion kinase regulation.” En: *Current cancer drug targets* 5.8 (dic. de 2005), págs. 629-43. ISSN: 1568-0096.
- [12] Peter F. Davies, Andre Robotewskyj y M L Griem. “Endothelial cell adhesion in real time”. En: *J. Clin. Invest.* 91 (1993), págs. 2640-2652.

- [13] E. Dejana, F. Orsenigo y M. G. Lampugnani. “The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability”. En: *Journal of Cell Science* 121.13 (jul. de 2008), págs. 2115-2122. ISSN: 0021-9533. DOI: 10.1242/jcs.017897.
- [14] D DePianto y P Coulombe. “Intermediate filaments and tissue repair”. En: *Experimental Cell Research* 301.1 (nov. de 2004), págs. 68-76. ISSN: 00144827. DOI: 10.1016/j.yexcr.2004.08.007.
- [15] Kenichi Funamoto y col. “Endothelial monolayer permeability under controlled oxygen tension”. En: (). DOI: 10.1039/c7ib00068e.
- [16] Ismael González-Valverde y José Manuel García-Aznar. “A hybrid computational model to explore the topological characteristics of epithelial tissues”. En: *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering* (ene. de 2017), e2877. DOI: 10.1002/cnm.2877.
- [17] Natalia Guz y col. “If Cell Mechanics Can Be Described by Elastic Modulus: Study of Different Models and Probes Used in Indentation Experiments”. En: *Biophysical Journal* 107.3 (2014), págs. 564-575. ISSN: 00063495. DOI: 10.1016/j.bpj.2014.06.033.
- [18] Cornelia Hahn y Martin A. Schwartz. “Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis”. En: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10.1 (ene. de 2009), págs. 53-62. ISSN: 1471-0072. DOI: 10.1038/nrm2596.
- [19] Stephan Huvemeers y col. “Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling”. En: *The Journal of Cell Biology* 196.5 (mar. de 2012), págs. 641-652. ISSN: 0021-9525. DOI: 10.1083/jcb.201108120.
- [20] Donald E Ingber. “Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology.” En: *Circulation research* 91.10 (nov. de 2002), págs. 877-87. ISSN: 1524-4571.
- [21] Sanjay Kumar y Valerie M Weaver. “Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell.” En: *Cancer metastasis reviews* 28.1-2 (jun. de 2009), págs. 113-27. ISSN: 1573-7233. DOI: 10.1007/s10555-008-9173-4.
- [22] M G Lampugnani y col. “The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin).” En: *The Journal of cell biology* 129.1 (abr. de 1995), págs. 203-17. ISSN: 0021-9525.
- [23] Harvey Lodish y col. “Molecular Cell Biology Fifth Edition”. En: () .
- [24] Juexuan Long y col. “Calcium Wave Propagation in Networks of Endothelial Cells: Model-based Theoretical and Experimental Study”. En: doi.org 12.12 (1991), e1002847. ISSN: 1553-7358. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002847.
- [25] H Lum y A B Malik. “Mechanisms of increased endothelial permeability.” En: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 74.7 (jul. de 1996), págs. 787-800. ISSN: 0008-4212.

- [26] Michael Mak, Cynthia A Reinhart-King y David Erickson. “Elucidating mechanical transition effects of invading cancer cells with a subnucleus-scaled microfluidic serial dimensional modulation device.” En: *Lab on a chip* 13.3 (feb. de 2013), págs. 340-8. ISSN: 1473-0189. DOI: 10.1039/c2lc41117b.
- [27] José Manuel García Aznar y María José Gómez Benito. “Memoria científico-técnica de proyecto nacional (DIMEXT). Diseño y fabricación de dispositivos microfluídicos para el estudio mediante análisis de imagen y modelos numéricos de la mecánica de la extravasación tumoral”. En: (2015).
- [28] Elizaveta A. Novikova y Cornelis Storm. “Contractile fibers and catch-bond clusters: A biological force sensor?” En: *Biophysical Journal* 105.6 (2013), págs. 1336-1345. ISSN: 00063495. DOI: 10.1016/j.bpj.2013.07.039.
- [29] Joppe Oldenburg y Johan de Rooij. “Mechanical control of the endothelial barrier”. En: *Cell and Tissue Research* 355.3 (mar. de 2014), págs. 545-555. ISSN: 0302-766X. DOI: 10.1007/s00441-013-1792-6.
- [30] A.R. Pries, T.W. Secomb y P. Gaehtgens. “The endothelial surface layer”. En: *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 440.5 (sep. de 2000), págs. 653-666. ISSN: 0031-6768. DOI: 10.1007/s004240000307.
- [31] Ignacio Ramis-Conde y col. “Multi-scale modelling of cancer cell intravasation: the role of cadherins in metastasis”. En: *Physical Biology* 6.1 (mar. de 2009), pág. 016008. ISSN: 1478-3975. DOI: 10.1088/1478-3975/6/1/016008.
- [32] H J Schnittler y col. “Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium.” En: *The Journal of physiology* 431 (dic. de 1990), págs. 379-401. ISSN: 0022-3751.
- [33] Hans Schnittler. “Contraction of endothelial cells: 40 years of research, but the debate still lives”. En: *Histochemistry and Cell Biology* 146.6 (dic. de 2016), págs. 651-656. ISSN: 0948-6143. DOI: 10.1007/s00418-016-1501-0.
- [34] Annette M Shewan y col. “Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts.” En: *Molecular biology of the cell* 16.10 (oct. de 2005), págs. 4531-42. ISSN: 1059-1524. DOI: 10.1091/mbc.E05-04-0330.
- [35] Andrea Taddei y col. “Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5”. En: *Nature Cell Biology* 10.8 (ago. de 2008), págs. 923-934. ISSN: 1465-7392. DOI: 10.1038/ncb1752.
- [36] Chinnaswamy Tiruppathi y col. *Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability*. 2002. DOI: 10.1016/S1537-1891(03)00007-7.
- [37] Floor Twiss y Johan de Rooij. “Cadherin mechanotransduction in tissue remodeling”. En: *Cellular and Molecular Life Sciences* 70.21 (nov. de 2013), págs. 4101-4116. ISSN: 1420-682X. DOI: 10.1007/s00018-013-1329-x.

- [38] Berna Uygur y Wen-Shu Wu. “SLUG promotes prostate cancer cell migration and invasion via CXCR4/CXCL12 axis.” En: *Molecular cancer* 10 (nov. de 2011), pág. 139. ISSN: 1476-4598. DOI: 10.1186/1476-4598-10-139.
- [39] Erik T. Valent y col. “Traction force dynamics predict gap formation in activated endothelium”. En: *Experimental Cell Research* (2016). ISSN: 10902422. DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.07.029.
- [40] Shijun Wang y col. “Pericytes Regulate Vascular Basement Membrane Remodeling and Govern Neutrophil Extravasation during Inflammation”. En: *PLoS ONE* 7.9 (sep. de 2012). Ed. por Edward F. Plow, e45499. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0045499.
- [41] Elaine Y M Wong y col. “Vascular endothelial growth factor stimulates dephosphorylation of the catenins p120 and p100 in endothelial cells”. En: *Biochem. J* 346 (2000), págs. 209-216.
- [42] Michele A. Wozniak y Christopher S. Chen. “Mechanotransduction in development: a growing role for contractility”. En: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10.1 (ene. de 2009), págs. 34-43. ISSN: 1471-0072. DOI: 10.1038/nrm2592.
- [43] Shigenobu Yonemura y col. “ α -Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development”. En: (). DOI: 10.1038/ncb2055.
- [44] Dehong Zeng y col. “Young’s modulus of elasticity of Schlemm’s canal endothelial cells.” En: *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 9.1 (feb. de 2010), págs. 19-33. ISSN: 1617-7940. DOI: 10.1007/s10237-009-0156-3.