

Dinámica de Filopodios en Células Tumoraes en
Cultivo: Análisis de Imágenes y Desarrollo de
Modelos Computacionales

Daniela Senra

Marzo 2019

Universidad Nacional de La Plata



Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Física
Licenciatura en Física Médica

Trabajo de Diploma

Dinámica de Filopodios en Células Tumorales en Cultivo: Análisis de Imágenes y Desarrollo de Modelos Computacionales

Daniela Senra

Directora **Dra. Nara Guisoni**
Instituto de Investigaciones Físico-Químicas Teóricas y
Aplicadas La PLata
UNLP-CONICET

Codirectora **Dra. Luciana Bruno**
Instituto de Física de Buenos Aires
UBA-CONICET

Jurado Lic. Agustina Corti, Dr. Gabriel Fabricius y Dr. Fernando
Montani

Marzo 2019

Daniela Senra

Dinámica de Filopodios en Células Tumorales en Cultivo: Análisis de Imágenes y Desarrollo de Modelos Computacionales

La Plata, Argentina. Marzo 2019

Jurado: Lic. Agustina Corti, Dr. Gabriel Fabricius y Dr. Fernando Montani

Directoras: Dra. Nara Guisoni y Dra. Luciana Bruno

Universidad Nacional de La Plata

Licenciatura en Física Médica

Departamento de Física

Facultad de Ciencias Exactas

Resumen

En este trabajo se estudian los filopodios, que son estructuras que protruyen del citoplasma de las células y que están involucrados en diferentes procesos celulares como la migración y la comunicación celular. Para ello se analizan imágenes de microscopía confocal de células de cáncer de próstata PC3 a partir de las cuales se caracterizan los filopodios. Mediante un análisis estadístico de las micrográficas se describe la longitud y la separación interfilopodial tanto para células aisladas como para células que presentan contactos celulares a través estas estructuras. Se desarrolla un modelo determinístico y otro estocástico de la iniciación de los filopodios sobre la membrana plasmática que permiten realizar predicciones acerca de la densidad de los filopodios en las células y de la distribución de distancias de separación entre ellos para el caso del modelo estocástico. También se trabaja con un modelo estocástico y uno determinístico del crecimiento de los filopodios a partir de los cuales se obtiene la longitud promedio que alcanzan estas protuberancias y su distribución para el caso del modelo estocástico. Finalmente se propone un modelo estocástico de comunicación con el entorno en el cual se simula el crecimiento de un filopodio en presencia de un gradiente quimiotáctico atractivo.

Agradecimientos

” *Esta tesis está dedicada a la memoria de Marta
“Martita” Cardozo quien despertó mi curiosidad
por la ciencia*

A mis directoras, Nara y Luciana, quienes me guiaron con mucha paciencia en esta etapa.

A mi familia, especialmente a mis padres, que me inculcaron siempre la importancia de la educación.

A Martín, mi compañero de la vida.

A mis amigos, mi cable a tierra.

A la UNLP que me formó desde niña y a todos los docentes que me crucé en el camino, que a pesar del contexto hostil que atraviesa la educación pública no se dan por vencidos.

Índice general

1	Introducción	1
2	El Sistema Biológico	5
2.1	La actina	5
2.2	Estructura de los filopodios	6
2.3	Funciones de los filopodios	7
2.4	Los filopodios en células tumorales	10
2.5	Mecanismos de formación de los filopodios	11
2.5.1	Modelo de elongación convergente	12
2.5.2	Modelo de nucleación de filamentos de novo	13
2.6	Patrones de filopodios	14
3	Análisis de imágenes de filopodios en células <i>in vitro</i>	19
3.1	Imágenes de microscopía de células PC3	19
3.2	Análisis cualitativo de filopodios	21
3.3	Estudio de filopodios en células aisladas	22
3.3.1	Distribución de filopodios en la membrana	22
3.3.2	Longitud de filopodios	25
3.4	Estudio de regiones de contacto	26
4	Patrones de separación de filopodios	29
4.1	Modelo determinístico de iniciación de filopodios	29
4.2	Modelo estocástico de iniciación de filopodios: simulaciones	31
4.2.1	Metodología	31
4.2.2	Resultados de las simulaciones	34
5	Crecimiento de filopodios	39
5.1	Modelo estocástico de crecimiento de filopodios	39
5.1.1	Metodología	40
5.1.2	Resultados	43
5.2	Aproximación de campo medio	46
6	Comunicación de filopodios	49
6.1	Modelo de comunicación	49
6.1.1	Resultados	51

7 Conclusiones

55

Bibliografía

57

Introducción

” *Todos los modelos están mal pero algunos son útiles.*

— **George E. P. Box**

La comprensión de los complejos mecanismos relacionados a la movilidad y comunicación de las células tumorales es de especial relevancia para el desarrollo y mejoramiento de técnicas terapéuticas, diagnósticas y preventivas. Este tema ha recibido atención por parte de diversas disciplinas dentro la comunidad científica tales como la Física, la Biología, la Medicina y la Computación, dando lugar a un enfoque holístico e interdisciplinario.

En particular, el entendimiento de los procesos involucrados en la migración celular es un tema de fundamental importancia para la oncología. Esto se debe a que la dinámica del movimiento celular se encuentra alterada y puede dar lugar, por ejemplo, a la invasión de diferentes órganos por las células neoplásicas [32]. Uno de los principales mecanismos de migración celular consiste en la formación de proyecciones citoplasmáticas conocidas como filopodios. Recientemente se ha demostrado que los filopodios, además de contribuir a la migración celular, también están involucrados en la comunicación entre células [21].

En esta tesis se estudia la dinámica de los filopodios a través de análisis de imágenes y modelos computacionales que sean capaces de predecir características de los filopodios cuantificables experimentalmente. Dentro de este contexto, la finalidad del trabajo es contribuir a una mejor comprensión y descripción de los filopodios, particularmente en células de cáncer de próstata.

Estructura de la tesis

Capítulo 2

Se realiza una introducción descriptiva del sistema biológico. Se resumen distintas propiedades de los filopodios como su estructura interna, morfología, dimensiones y sus funciones principales (migración y comunicación). Se hace hincapié en la

variabilidad de dichas estructuras entre diferentes células, en particular en células tumorales. Se detallan los modelos existentes para la formación de filopodios: el modelo de elongación convergente y el modelo de nucleación de filamentos *de novo*. El capítulo finaliza con una revisión de publicaciones científicas experimentales que serán de utilidad para los siguientes capítulos.

Capítulo 3

Se hace una descripción cualitativa y cuantitativa de las estructuras filopodiales en células de cáncer de próstata a partir de imágenes de microscopía confocal. El objetivo es determinar, a partir de datos experimentales, parámetros que caractericen la distribución y morfología de los filopodios que sean útiles para la comparación con las predicciones teóricas de los modelos desarrollados en los siguientes capítulos. Para ello, se analiza estadísticamente la separación entre filopodios vecinos y la longitud filopodial de células o regiones de células aisladas, mediante la obtención del valor medio y los histogramas de dichos parámetros. Finalmente se describen los contactos intercelulares formados por la unión de dos filopodios.

Capítulo 4

Se estudian los patrones de separación de los filopodios a lo largo de la membrana celular. Se detalla un modelo determinístico continuo de formación de filopodios que predice relaciones biológicas importantes. Por otro lado, se realiza un modelo estocástico continuo del mismo sistema, ambos propuestos por Mogilner y Rubinstein [30]. A partir de simulaciones de Montecarlo del modelo estocástico se obtienen distribuciones de filopodios a lo largo de una porción de membrana y la distancia de espaciamiento promedio entre filopodios vecinos o de igual forma, la densidad de filopodios. Se verifican las predicciones del modelo determinístico con los resultados de las simulaciones del modelo estocástico y se contrastan con los datos experimentales del capítulo anterior que se obtiene a partir del análisis de imágenes de microscopía confocal.

Capítulo 5

Se realiza un modelo estocástico continuo del crecimiento de un filopodio en el borde lamelipodial que predice la longitud estacionaria de los filopodios propuesto por Erban *et al* [6]. También se analiza el efecto de los distintos parámetros del modelo sobre la longitud filopodial estacionaria. Por otro lado, se realiza una aproximación teórica de la longitud de los filopodios y se contrasta con la que se obtiene para el modelo estocástico.

Capítulo 6

Se propone un modelo de comunicación de un filopodio. Se parte del modelo de crecimiento de un filopodio desarrollado en el capítulo anterior al cual le agrega

un mecanismo sencillo de comunicación. Este mecanismo consiste en modificar un parámetro del modelo de crecimiento cuando se advierte la presencia de una fuente quimiotáctica. Al detectar el quimiotáctico atractivo el filopodio aumenta su longitud y se reorienta hacia la dirección del gradiente.

El Sistema Biológico

El desarrollo embrionario, la homeostasis tisular, la cicatrización de heridas y muchos otros procesos fisiológicos dependen de la capacidad de las células para desplazarse. La migración celular también está implicada en distintas condiciones patológicas, como la inflamación y la metástasis. La capacidad de las células cancerosas para diseminarse desde el sitio primario y formar metástasis es la principal causa de morbilidad relacionada con el cáncer en pacientes con tumores sólidos. Por lo tanto, se ha invertido mucho esfuerzo en la identificación de las vías de señalización y las estructuras celulares involucradas en el proceso migratorio de las células. La migración celular está dirigida por estructuras de filamentos de actina protrusivas y contráctiles específicas, pero los tipos y las configuraciones de los filamentos de actina varían según el tipo de célula y el entorno de la célula. Los lamelipodios, filopodios y pseudópodos son algunos ejemplos.

Independientemente del modo migratorio empleado, la motilidad celular efectiva requiere que las células se adapten, interactúen y, a menudo, modifiquen su matriz extracelular circundante [13]. Durante este proceso las células extienden su membrana plasmática en la región anterior, luego desplazan el cuerpo de la célula y retraen la parte posterior. La fuerza motriz es proporcionada por la actina, una proteína que se encuentra en todos los eucariotas, y por motores celulares.

2.1 La actina

Como ya se ha mencionado los filamentos de actina son responsables de la fuerza contráctil de las células que migran. Los filamentos de actina son uno de los tres componentes fundamentales del citoesqueleto de las células eucariotas. El citoesqueleto es un entramado tridimensional dinámico de biofilamentos: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios; cuyas principales funciones son proveer soporte interno en las células, organizar las estructuras internas e intervenir en fenómenos de transporte y división celular [5].

Los filamentos de actina se forman por la polimerización de una proteína globular denominada actina-G. La actina es una proteína citosólica muy abundante y representa aproximadamente el 10% de las proteínas citosólicas. Una parte se en-

cuentra conformando filamentos (actina-F) y el resto son proteínas no polimerizadas (actina-G). Estos filamentos son polarizados y poseen un extremo denominado + (más), cargado positivamente, y otro denominado - (menos), cuya densidad de carga es negativa; también conocidos como extremos “barbado” y “punta de flecha” respectivamente por su aspecto al microscopio. En el extremo barbado predomina la polimerización, adición de nuevas moléculas de actina, respecto a la despolimerización, mientras que en el extremo puntiagudo predomina la despolimerización. Los filamentos de actina son estructuras dinámicas que se elongan (en el extremo +) y se acortan (en el extremo -) mediante la polimerización y despolimerización en un proceso que se conoce como *treadmilling* [24]. La polimerización en el extremo + y la despolimerización en el extremo - en el filamento de actina dan origen al flujo retrógrado que lleva a los filamentos de actina hacia el centro de la célula. Cuando se generan adhesiones focales, puntos de anclaje con la matriz extracelular, se impide el movimiento retrógrado de actina-F creando una fuerza de tracción que da lugar al movimiento de la célula hacia adelante.

Además del *treadmilling*, los filamentos de actina generan fuerzas a través de un mecanismo diferente que involucra a las proteínas motoras de la familia de la miosina. Aquí, los filamentos de actina sirven como pistas para moléculas de miosina que, según el tipo de miosina, viajan hacia el extremo + o - del filamento de actina y transportan diferentes tipos de carga o forman haces bipolares que pueden inducir la contracción de los entramados de filamentos de actina. Para asegurar la formación de las matrices de filamentos de actina deseadas en la ubicación correcta dentro de la célula, la organización y la dinámica de los filamentos de actina en las células están controladas por una gran variedad de proteínas de unión a actina. Las actividades de estas proteínas están relacionadas con diversas señales bioquímicas y mecánicas intracelulares y extracelulares a través de su regulación mediante fosforilación, familia Rho de pequeñas GTPasas y fosfolípidos de membrana plasmática [15].

2.2 Estructura de los filopodios

La polimerización coordinada de los filamentos de actina contra la membrana celular proporciona la fuerza para una serie de procesos, tales como la migración celular, la morfogénesis, la endocitosis y la fagocitosis. Durante estos procesos, los filamentos de actina se organizan en conjuntos tridimensionales que se adaptan constantemente para satisfacer las diversas necesidades de la célula. La migración celular es un proceso extensamente estudiado que depende de varios arreglos dinámicos de actina (Figura 2.1). Las estructuras protrusivas en el borde delantero de una célula en movimiento se llaman lamelipodio y filopodio. Un lamelipodio es una protrusión delgada (con un espesor $0,1 - 0,2 \mu m$) en forma de lámina que está conformada

internamente por una red ramificada de actina. Por el contrario, los filopodios son estructuras delgadas ($0,1 - 0,3 \mu\text{m}$) parecidas a dedos formadas por haces paralelos empaquetados de actina filamentosa (F), típicamente consisten en 15 a 30 filamentos individuales empaquetados. En ambos casos, los extremos en crecimiento de los filamentos de actina están orientados hacia la membrana plasmática. El alargamiento de estos filamentos empuja el frente de avance hacia delante y, por lo tanto, promueve la migración o extensión celular [27].

Los filopodios en general se encuentran incrustados o sobresaliendo de la red de actina de un lamelipodio. Además de la migración celular, los filopodios están implicados en una serie de procesos celulares, que incluyen la cicatrización de heridas, la adhesión a la matriz extracelular, la orientación hacia los quimiotácticos, la identificación neuronal del cono del crecimiento y el desarrollo embrionario. Las protrusiones y retracciones filopodiales se promueven por un equilibrio dinámico entre la polimerización de actina en los extremos “barbados” o “+” de un filamento y el flujo retrógrado del haz de filamentos de actina. Existen otras protuberancias celulares relacionadas morfológicamente pero más especializadas y estables, como microvellosidades y estereocilios (estructuras que aumentan la superficie de las células que tienen funciones de absorción o secreción). Los estudios sobre filopodios han revelado variaciones en la dinámica, longitud y posicionamiento de estas protuberancias en diferentes células, indicando que moléculas distintas o reguladas de manera diferente generan diferentes conjuntos de filopodios. Por ejemplo, los filopodios de fibroblastos y los filopodios de cono de crecimiento nervioso rara vez superan las $10 \mu\text{m}$ de longitud, mientras que en los embriones de erizo de mar los filopodios se extienden hasta $40 \mu\text{m}$ [47].

A pesar de los extensos estudios, las funciones biológicas de los filopodios y los mecanismos de ensamblaje de filopodios aún no se conocen por completo.

2.3 Funciones de los filopodios

En general, los filopodios se han descrito como “antenas” o “tentáculos” que utilizan las células para sensar su microambiente, por lo que sirven como guías durante la protrusión. Sin embargo, las funciones de los filopodios parecen diversas y en muchos casos siguen siendo vagas. Los filopodios han sido implicados en varios procesos fisiológicos fundamentales, de los cuales la migración celular es quizás la mejor caracterizada [27].

Los filopodios como sensores del microambiente

Los filopodios están relacionados con la potenciación de la migración celular dirigida. La abundancia de filopodios también se considera una característica de las células cancerosas invasivas [45]. Los filopodios contienen receptores para diversas moléculas de señalización y moléculas de matriz extracelular. Esto se correlaciona con el papel de los filopodios en la detección del entorno de la célula y que actúan como sitios para la transducción de señales. Sin entrar en detalle en los procesos químicos, se ha reportado que en las puntas de los filopodios se acumulan moléculas de adhesión celular (cadherinas) y receptoras de membrana (integrinas). Las integrinas están preparadas para sondear la matriz, mientras que las cadherinas crean sitios de adhesión al sustrato a lo largo del frente de avance.

Los filopodios en la migración

Además de la activación de las vías de señalización, el anclaje de los filopodios también desencadena una respuesta mecánica produciendo fuerzas de retracción. Luego de la formación del sitio de adhesión se reclutan diversos componentes que se encargan de reorganizar las estructuras de actina-F en fibras de estrés actínicas y complejos de adhesiones focales maduros que producen las fuerzas de contracción. Estas fuerzas son las responsables del desplazamiento de las células (ver Figura 2.1).

La variabilidad funcional de los filopodios en diferentes células

Las funciones de los filopodios son diversas y varían con los tipos celulares. Esto resulta importante pues la distribución y morfología de los filopodios, en consecuencia también presentan distintas características.

- Por ejemplo en los macrófagos, varios filopodios por célula exploran el medioambiente. Después de encontrar un patógeno, los filopodios se unirán a él y luego se retraerán hacia el cuerpo celular [20]. También se demostró que la inhibición de la formación de filopodios por el agotamiento de la miosina VII de las amebas de *Dictyostelium discoideum* disminuye las tasas de fagocitosis e inhibe la migración [43]. En ambos casos los filopodios se encuentran vinculados a la *actividad fagocítica de las células*.

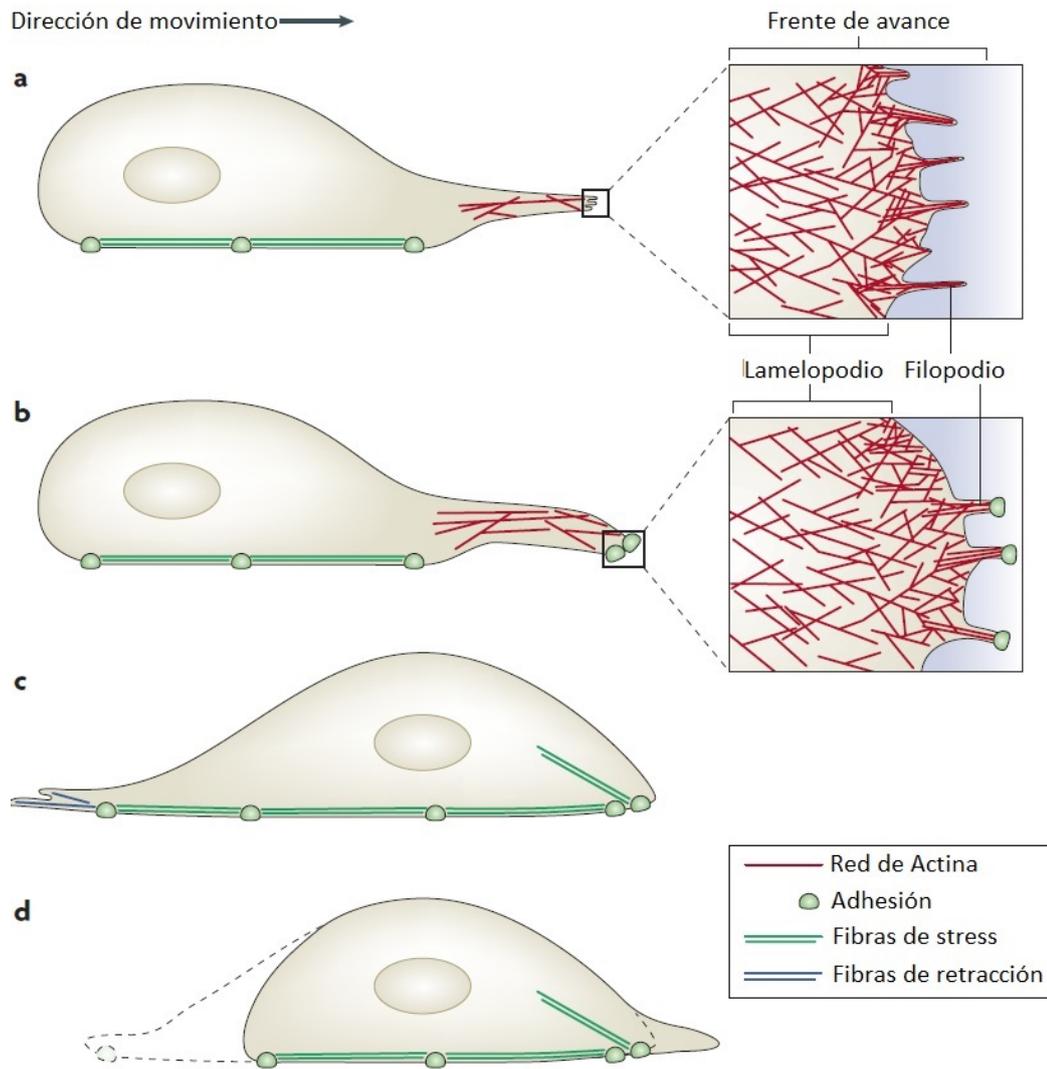


Figura 2.1: La migración celular depende de diferentes estructuras de filamentos de actina. (a) La movilidad se inicia por una protrusión del frente de avance, que está compuesto por lamelipodios y filopodios. Estas estructuras protrusivas contienen filamentos de actina, con los extremos barbados en crecimiento orientados hacia la membrana plasmática. (b) Durante la extensión celular, se forman nuevas adherencias con el substrato debajo del borde anterior. (c) A continuación, el núcleo y el cuerpo celular se desplazan hacia adelante a través de fuerzas de contracción que podrían estar mediadas por fibras focales de estrés vinculadas al complejo de adhesión. (d) Luego, las fibras de retracción tiran de la parte posterior de la célula hacia adelante, las adherencias en la parte posterior de la célula se desmontan y el borde posterior se retrae. Imagen adaptada de [27].

- Durante el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas las láminas de células epiteliales se fusionan. Los filopodios tienen un papel importante durante la formación de uniones adherentes entre el epitelio de las células, así como un papel durante la curación de heridas, el cierre dorsal y el sellado de la hoja epitelial en embriones de moscas *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* [44]. Lo que estos procesos tienen en común es que los filopodios interdigitados que sobresalen de las células opuestas ayudan a las láminas

de las células a alinearse y adherirse juntas. En resumen, en estas células los filopodios tienen papel en la *adhesión célula-célula*.

- Se pueden mencionar numerosos tipos celulares que presentan filopodios y que debido a sus necesidades exhiben diferentes características funcionales y morfológicas como lo son las células neuronales y las células tumorales.

2.4 Los filopodios en células tumorales

Como los filopodios son ampliamente utilizados por las células migratorias, tal vez no sea sorprendente que se hayan observado filopodios o estructuras similares a filopodios abundantes en actina en las células cancerosas (Figura 2.2). Por ejemplo, en las células de cáncer de ovario, un mayor número de estructuras similares a filopodios se correlacionan con la invasividad [14]. Además, en ratones, después de la inducción de un tumor en la cola, las células cancerosas que se extravasaron en el pulmón muestran protrusiones similares a los filopodios. Estas estructuras similares a los filopodios parecen ser críticas no solo para conducir la metástasis de las células cancerígenas, sino también para promover la supervivencia y la proliferación de las células de carcinoma diseminadas en un órgano secundario [39].

Los datos clínicos también sugieren que los filopodios tienen un rol durante la diseminación de células cancerígenas, ya que varias proteínas filopodiales se regulan positivamente en el cáncer humano y son necesarias para la invasión de células cancerosas *in vitro*. El ejemplo mejor estudiado es la fascina, una proteína que agrupa actina que promueve el ensamblaje de filopodios. La fascina no se expresa en el epitelio sano [7], pero se regula positivamente en varios cánceres agresivos y metastásicos de origen epitelial. Además, se ha demostrado que los niveles de “fascinación”¹ son elevados, especialmente en los bordes invasores de los tumores, y los niveles de fascinación aumentados a menudo se correlacionan con una supervivencia baja [26]. La sobreexpresión de fascina conduce a un aumento de la migración e invasión [45], mientras que el silenciamiento de genes de fascina conduce a una invasividad reducida [23]. Por lo tanto, es probable que la fascina participe en la fase temprana de la diseminación de células cancerígenas.

¹ Llamamos fascinación al entramado de fascina y actina-F donde la fascina actúa como *crosslinker* de los filamentos de actina, es decir que reticula los haces paralelos de actina, proporcionándole estabilidad al filopodio.

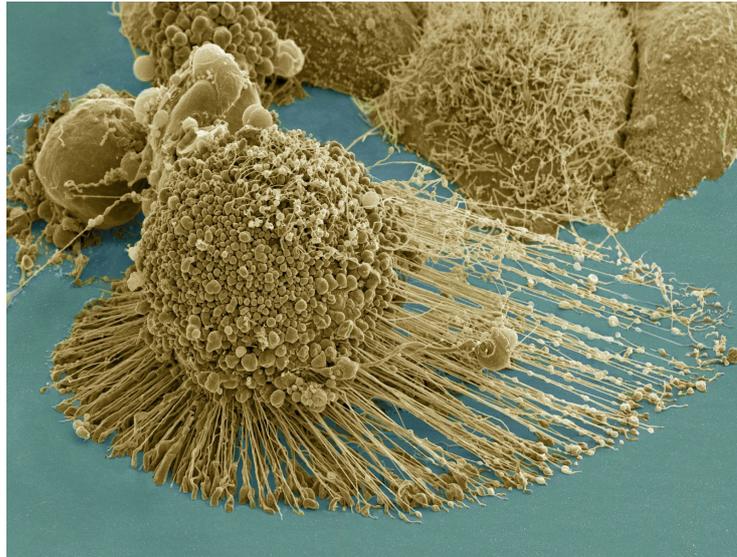


Figura 2.2: Imagen de microscopía electrónica de una célula HeLa. El linaje al cual pertenecen estas células deriva de una muestra de cáncer cérvico-uterino agresivo. La célula presenta extensiones citoplasmáticas del tipo filopodio. Imagen creada por *National Center for Microscopy and Imaging Research*. <https://www.flickr.com/photos/nihgov/>

2.5 Mecanismos de formación de los filopodios

Los filopodios no son estructuras protrusivas estables, experimentan extensión y retracción constantes, especialmente en células migratorias. El equilibrio entre la extensión y la retracción está controlado por la tasa de polimerización en las puntas de los filamentos así como por la despolimerización del filamento en la base del filopodio. Se han presentado dos modelos² alternativos para el mecanismo de iniciación de filopodios: el modelo de elongación convergente y el modelo de nucleación de filamentos *de novo* [11].

En el denominado modelo de elongación convergente, los filamentos de actina filopodial se derivan de la red de actina lamelipodial en un proceso en el que intervienen distintas proteínas (complejo Arp2/3, Ena/VASP y fascin son los principales). Mientras que el modelo alternativo propone que la formina (Dia2) realiza la mayoría de estas funciones: los filamentos de actina cortos son nucleados en las puntas filopodiales llamados conos terminales por las forminas.

Típicamente, los filopodios se encuentran en el borde delantero de una célula en migración, donde están conectados a la red de actina lamelipodial. Sin embargo, en las dendritas (prolongaciones ramificadas de las neuronas), por ejemplo, los precursores semejantes a filopodios probablemente se forman sin un conjunto de

²En este caso el término modelo se refiere a modelos descriptivos y no a modelos matemáticos.

actina dendrítica subyacente. Por lo tanto, es razonable que existan diferentes mecanismos moleculares que generen los filopodios.

2.5.1 Modelo de elongación convergente

En el modelo de elongación convergente de iniciación filopodial, los filopodios se forman a partir de una asociación gradual de un subconjunto de filamentos lamelipodiales ramificados en sus extremos barbados unidos a proteínas Ena/VASP. La asociación de proteínas Ena/VASP con los extremos barbados de los filamentos puede marcar la actina-F para la posterior formación de filopodios, presumiblemente agrupando los extremos barbados juntos, protegiéndolos del *capping*³ y permitiendo una rápida polimerización y posiblemente agrupando filamentos. La unión de la fascina convierte los filamentos agrupados en un haz filopodial y lo estabiliza (ver Figura 2.3)[42].

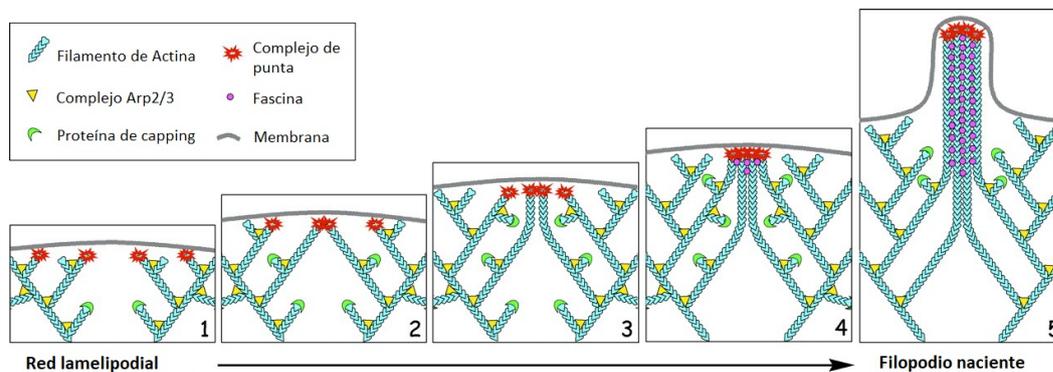


Figura 2.3: Modelo de elongación convergente para la iniciación de filopodios [42]. (1) La red lamelipodial se forma por nucleación dendrítica mediada por Arp2/3. El alargamiento de algunos extremos barbados en la red se bloquea por proteínas de *capping*, pero otros extremos barbados adquieren un estado privilegiado al unirse a un complejo de moléculas (*tip complex* o complejo de punta) que les permite alargarse continuamente. (2) Los extremos barbados privilegiados se desplazan lateralmente durante el alargamiento y colisionan entre sí. El complejo de punta interviene en el agrupamiento de extremos barbados privilegiados al colisionar. (3) Los filamentos convergentes con los extremos barbados unidos continúan alargándose juntos. Otros extremos barbados que se desplazan lateralmente se encuentran y se unen al conjunto inicial. Múltiples colisiones de los extremos barbados durante el alargamiento conducen a un agrupamiento gradual de sus extremos barbados, la multimerización de los complejos de las puntas asociadas y la convergencia de los filamentos. (4) El complejo de punta filopodial multimérico inicia la reticulación de filamentos al reclutar y activar fascina, lo que permite que el proceso de empaquetamiento del haz filopodial. (5) En el filopodio naciente, el complejo de punta filopodial conserva sus funciones de promover la elongación y el agrupamiento de filamentos coordinados, así como la fusión con otros filopodios.

³ *Capping* es el proceso por el cual se regula la elongación de los filamentos de actina mediante la unión de proteínas a los extremos barbados, bloqueando así la polimerización o despolimerización de dichos extremos. La familia de proteínas ENA/VASP son antagonistas de las proteínas de *capping* (previenen el *capping*) y se unen al extremo barbado posibilitando la polimerización de actina.

El complejo ARP2/3 es un complejo proteico que se une a un lado de un filamento de actina y nuclea un nuevo filamento como una rama del filamento madre, es decir, permite la bifurcación formando así los llamados precursores- Λ . De acuerdo con este modelo, por ejemplo, un subconjunto de filamentos de actina nucleados por ARP2/3 están protegidos del *capping* cuando sus extremos barbados están unidos a proteínas de complejo de punta (*tip complex*), que incluyen las mencionadas proteínas Ena/VASP. Estos filamentos que se alargan rápidamente se entrecruzarán posteriormente por la fascina, una proteína que empaqueta los filamentos de actina contiguos, para generar la arquitectura filopodial típica de filamentos de actina. Varios estudios han sugerido que los filopodios surgen de la red de actina-F ramificada del lamelipodio, en oposición al surgimiento a partir de la nucleación de filamentos *de novo*. La evidencia de este modelo ha sido proporcionada por microscopía de fluorescencia y electrónica; sin embargo, faltan datos genéticos que lo respalden. Los estudios que han sugerido que los filopodios se forman en ausencia de Arp2/3 ponen en duda el papel de Arp2/3 y la elongación convergente [41] [35].

La familia de proteínas Ena/VASP también tiene un papel bien establecido en la formación y mantenimiento de los filopodios. Estas proteínas se concentran a lo largo del borde delantero del lamelipodio y en las puntas de los filopodios, ambos caracterizados por una alta dinámica de actina. Las proteínas Ena/VASP se unen a la actina monomérica, a los filamentos de actina y a los extremos barbados, siendo también capaces de agrupar la actina-F. Además, estas proteínas previenen el *capping* de los filamentos al mismo tiempo que permiten la polimerización [2] [3], aunque este problema sigue siendo controvertido [22] [29]. Si bien el mecanismo molecular de la actividad Ena/VASP no está claro debido al uso de diferentes condiciones experimentales en varios estudios, se sabe que su actividad aumenta el número, la longitud y las tasas de crecimiento de los filopodios en muchos tipos celulares. Se necesitarán métodos más sofisticados para resolver si el rol de estas proteínas en la formación de filopodios es *anticapping*, unión a actina-F, agrupación o alguna combinación de estos. El componente final del modelo de elongación convergente es la proteína de unión de actina, la fascina, que es una proteína reticulante de actina-F. Aunque hay muchas otras proteínas que reticulan y unen actina-F, como fimbrina, filamina, los estudios sugieren que la fascina es fundamental para la formación de filopodio [46].

2.5.2 Modelo de nucleación de filamentos de novo

Resultados experimentales para filopodios de *Dictyostelium discoideum* revelaron la presencia de un filamento discontinuo de actina-F en el centro del filopodio, y filamentos individuales cortos convergiendo en el extremo de crecimiento llamado “cono terminal” [28]. Además, se sugirió que los filopodios también pueden formarse

en ausencia del complejo ARP2/3 tanto en *Dictyostelium discoideum* como en células de mamíferos [41], aunque un estudio reciente proporcionó evidencia de que el complejo ARP2/3 participa en la formación de filopodios al menos en células neuronales [18]. Estas observaciones condujeron a un modelo alternativo para la formación de filopodios, en el que los filamentos de actina de los filopodios no se derivan de la red lamelipodial subyacente, sino que están nucleados en las puntas filopodiales por las forminas.

Este mecanismo propuesto para la formación de los filopodios involucra a la formina relacionada con Diaphanous, Dia2. *In vitro* las forminas nuclean los filamentos de actina lineales, aceleran la polimerización de actina, ralentizan la despolimerización de filamentos, protegen los extremos barbados de las proteínas de *capping* y empaquetan la actina-F [19] [36]. Como vimos anteriormente, todas estas actividades de modulación de la actina también se producen en el modelo de elongación convergente pero por un conjunto de proteínas [4][40]. La sobreexpresión de Dia2 induce la formación de filopodios en un rango de tipos de células desde *Dictyostelium discoideum* hasta células de embriones de mamíferos como NIH3T3. Los estudios *knockout*⁴ mostraron que Dia2 es esencial para la formación de filopodios en *Dictyostelium* [37]. En el mecanismo propuesto de formación de filopodios mediado por Dia2, los filopodios surgen como resultado de la nucleación de filamentos *de novo*, aunque no está claro si esto ocurre *in vivo*. Aún no se conoce en detalle qué funciones realiza Dia2 durante este mecanismo alternativo de formación de filopodios. Además, en *Dictyostelium discoideum* parece que tanto Dia2 como VASP cooperan durante la formación de los filopodios, lo que plantea la cuestión de si estos dos mecanismos de iniciación de filopodio son independientes o si *Dictyostelium discoideum* forma filopodios por otro mecanismo.

2.6 Patrones de filopodios

Existen publicaciones en las cuales se ha investigado la distribución de filopodios en la membrana de distintas células. Entre ellas, se encuentra el trabajo de Paez *et al.* [33] donde se busca dilucidar el mecanismo por el cual la hemo oxigenasa-1 (HO-1), una enzima con propiedades anti-inflamatorias, inhibe la migración e invasión en células de cáncer de próstata PC3. Se sabe que la HO-1 inhibe la proliferación, la migración y la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* [9] aunque se desconoce cómo. Demostraron que la HO-1 está relacionada con la capacidad adhesiva de las células [10] llevando a los autores a indagar sobre su potencial implicación en la adhesión célula-célula y en la regulación de la actina en el borde lamelipodial. Para ello, se

⁴ Gene knockout o inactivación génica es una técnica de biología molecular en la que se sustituye un gen por una versión modificada obteniendo tejidos específicos u organismos que no expresan este gen.

cuantifica la densidad de filopodios en regiones libres de contactos y la densidad de contactos intercelulares (a través de filopodios), en células de PC3 tratadas con Hemina (inductora de HO-1) y control. Así, encuentran que curiosamente la cantidad de filopodios y de contactos aumenta al inducir la expresión de HO-1 (ver Figura 2.4). Concluyen que el incremento de estas protrusiones y de contactos favorece un fenotipo más adhesivo y menos agresivo (menos potencial metastásico), en contraparte con la clásica idea de que mayor cantidad de filopodios implica mayor motilidad. En base a los diagramas de caja se puede ver que la densidad de filopodios en las regiones libres y de contactos es del orden de $0,5\mu\text{m}^{-1}$, es decir una distancia interfilopodial aproximadamente de $2\mu\text{m}$, para células PC3 control (no tratadas con Hemina).

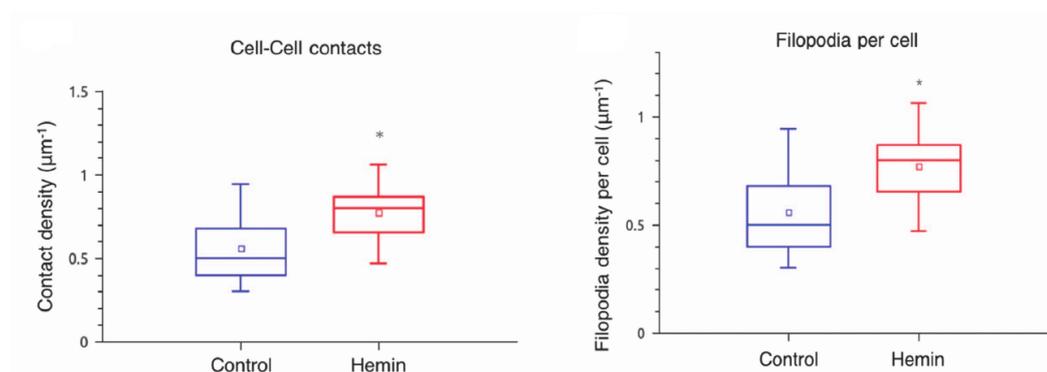


Figura 2.4: **Izquierda:** Diagrama de cajas de la densidad de contactos célula-célula de células tratadas con hemina y control. **Derecha:** Densidad de filopodio (zonas libres de contacto) de células en las diferentes condiciones. Diagramas tomados de [33].

Por otro lado, mediante estudios de transcriptómica⁵ y proteómica⁶ encontraron que HO-1 regula marcadores (sección de ADN) relacionados con la adhesión célula-célula y la comunicación celular y, proponen un mecanismo de regulación del citoesqueleto de las células de cáncer de próstata por parte de la HO-1.

Otro trabajo que estudia filopodios en el borde lamelipodial es el realizado por Oldenbourg *et al.* [31]. En este caso utilizan células de neuronas de *Aplysia*, un molusco. Los autores determinan la velocidad de movimiento lateral y de movimiento retrógrado mediante películas de micrografías (*time-lapse cinemicrography*) y proponen un modelo de mecanismo de movimiento lateral geométrico. El modelo tiene dos componentes principales: el movimiento retrógrado y la polimerización de actina, y encuentran que el movimiento lateral puede ser explicado por estos dos únicos mecanismos.

⁵ La transcriptómica estudia y compara transcriptomas, es decir, los conjuntos de ARN (ARNr, ARNt, ARNm, ARNi, miARN) presentes en una célula, tejido u organismo.

⁶ La proteómica es el estudio de la estructura y función de las proteínas. Conocer el proteoma permite entender la dinámica de todas las proteínas expresadas en determinadas condiciones y en un tiempo dado.

Mogilner y Rubinstein [30] utilizan la micrografía publicada anteriormente por Oldenbourg *et al.* (Figura 2.5 Izquierda) para obtener la separación interfilopodial promedio y el histograma de dicha distancia para 26 filopodios adyacentes (Figura 2.5 Derecha). La separación entre filopodios promedio que se obtiene es $2\mu\text{m}$. Mogilner y Rubinstein también miden el ángulo promedio relativo a la dirección de protrusión de los filopodios y concluyen que éste es $< 30^\circ$. Es notable la concordancia entre la separación promedio interfilopodial encontrada en células de neuronas de *Aplysia* por Mogilner y Rubinstein y en células de cáncer de próstata obtenidas por Paez *et al.*, ambas del orden de $2\mu\text{m}$.

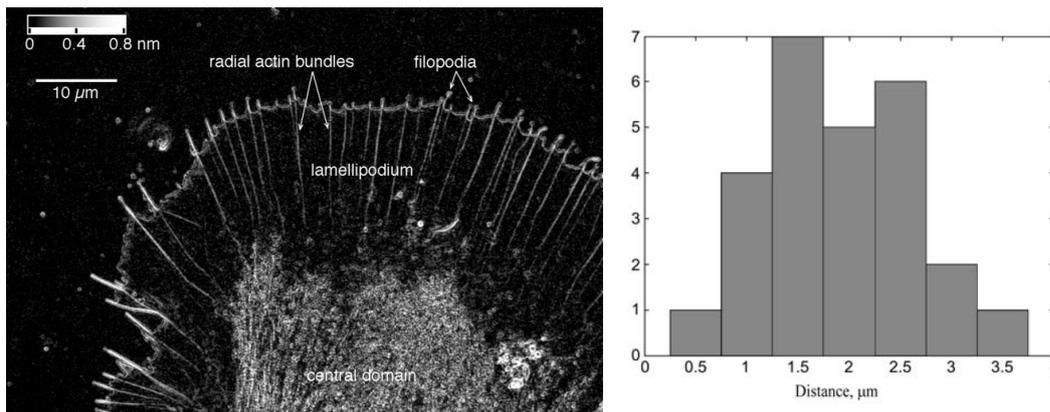


Figura 2.5: Izquierda: Célula de neurona de *Aplysia*. Imagen de microscopía de luz polarizada publicada en [31]. Derecha: Histograma de distancia interfilopodial. Histograma que realizan Mogilner y Rubinstein [30] utilizando la imagen de la izquierda.

El último trabajo que se mencionará es el desarrollado por Husainy *et al.* [12] en el cual estudian los patrones de separación entre filopodios y de longitud en fibroblastos de roedor Rat2 (células no cancerosas). Husainy *et al.* obtienen los histogramas de separación entre filopodios y de longitud de filopodios (Figura 2.6) y ajustan 4 funciones distintas, concluyendo que la función de densidad de probabilidad lognormal describe adecuadamente los histogramas empíricos, captando la unimodalidad y la larga cola que presentan.

Los autores testean las distribuciones perturbando los filopodios genética, química, y físicamente mediante la inducción de la expresión de una quinasa (*PI4KIIIβ*), el uso de una hormona (bradiquinina) y el uso de un sustrato (poli-D-lisina) respectivamente. Estas modificaciones estimulan la formación de filopodios. Los histogramas de la longitud de los filopodios y la separación entre ellos se modifica pero en todos los casos el comportamiento lognormal se mantiene. Esto conlleva a que los autores concluyan que los patrones de los filopodios presentan una distribución lognormal robusta, es decir que si bien se pueden modificar los parámetros, el comportamiento lognormal prevalece.

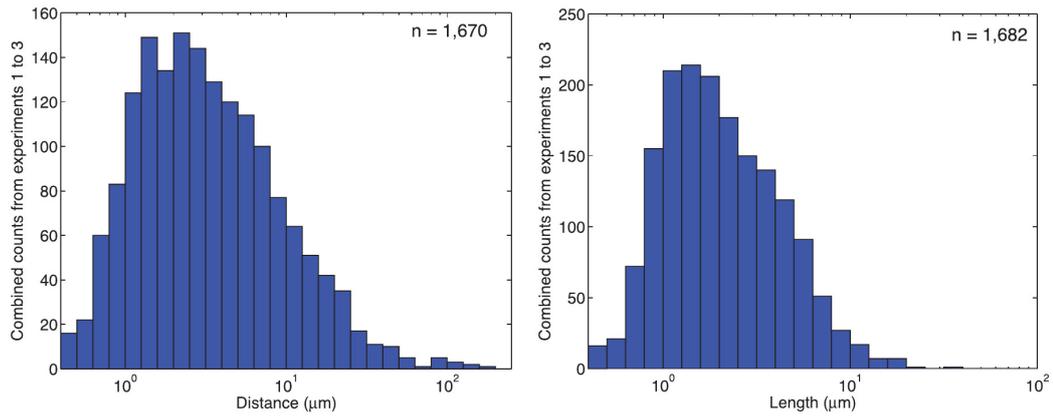


Figura 2.6: Izquierda: Histograma de la distancia de separación entre filopodios (N=1670). Derecha: Histograma de la longitud de los filopodios (N=1682). Ambos publicados en el trabajo de Husainy *et al.* [12]. Datos de células de fibroblastos de roedor.

La longitud media de los filopodios que obtienen es $2,79 \mu m$ y la separación promedio entre filopodios $6,18 \mu m$. La distancia de separación promedio entre filopodios es significativamente mayor que la reportada en los trabajos de Paez *et al.* [33] y de Mogilner y Rubistein [30]. Esto puede deberse a que la separación interfilopodial de las células de fibroblasto que utilizan presenta la particularidad de extenderse en un rango de hasta dos órdenes de magnitud [12], es decir a la variabilidad entre distintos tipos celulares.

Análisis de imágenes de filopodios en células *in vitro*

En este capítulo se realiza una descripción cualitativa y cuantitativa de las estructuras filopodiales en células de cáncer de próstata a partir de imágenes de microscopía confocal. El objetivo es determinar, a partir de datos experimentales, parámetros que caractericen la distribución y morfología de los filopodios que sean útiles para la comparación con las predicciones teóricas de los modelos desarrollados en los siguientes capítulos. Para ello, se analiza estadísticamente la separación entre filopodios vecinos y la longitud filopodial de células o regiones de células aisladas, mediante la obtención del valor medio y los histogramas de dichos parámetros. Finalmente se describen los contactos intercelulares mediante filopodios.

3.1 Imágenes de microscopía de células PC3

En esta sección se analizan imágenes de microscopía confocal de la línea de células de cáncer de próstata PC3 tratadas con rodamina-faloidina para marcar la red de actina. Éstas son células invasivas con un gran potencial metastásico, presentan una morfología similar a un adenocarcinoma poco diferenciado y exhiben lamelipodios y numerosos filopodios. La línea celular PC3 presenta características funcionales y morfológicas típicas de células neoplásicas de origen epitelial: numerosas estructuras protrusivas (microvilli, filopodios, lamelipodios, entre otras), complejos de unión, núcleos, nucleolos y mitocondrias anormales, laminillas anulares y cuerpos lipídicos [16].

Todas las imágenes utilizadas en el trabajo fueron facilitadas por la Dra. Geraldine Gueron (Laboratorio de Inflamación y Cáncer – IQIBICEN – UBA). Las imágenes fueron adquiridas por la Dra. Carla Pallavicini quien además proporcionó programas realizados por ella para analizar las imágenes [34]. Los detalles de las condiciones y equipos utilizados para la adquisición de las micrografías así como los procesos de preparación, fijación y tinción con rodamina-faloidina se describen en la publicación de Paez *et al.* [33]. La rodamina-faloidina permite marcar fluorescentemente la actina.

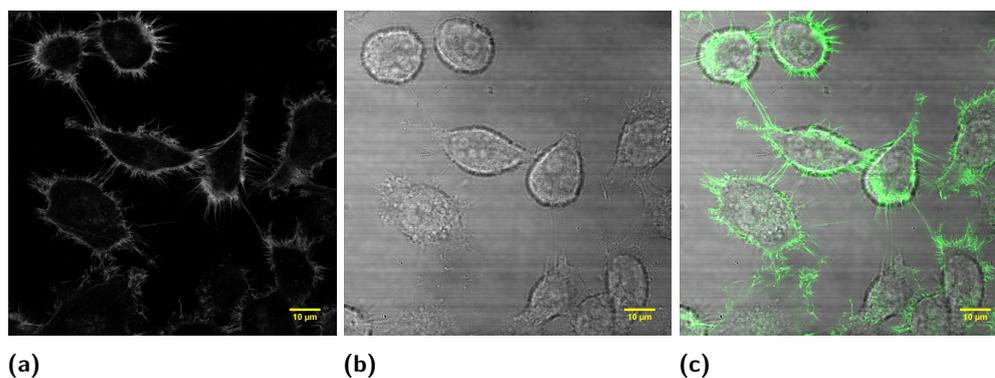


Figura 3.1: Imágenes de células de cáncer de próstata PC3 fijadas y tratadas con rodamina-faloidina para marcar actina, cortesía de la Dra. G. Guerón (IQUIBICEN, UBA). (a) Imagen de microscopía de fluorescencia confocal. (b) Imagen microscopía por contraste de fase. (c) Superposición de las imágenes 3.1a y 3.1b.

Las imágenes utilizadas en su mayoría fueron adquiridas en un mismo día y los parámetros de adquisición fueron en su mayoría constantes. Las imágenes son almacenadas en formato .Tiff, el tamaño de píxel de adquisición es $0,069 \mu\text{m}$ y en algunas pocas imágenes $0,066 \mu\text{m}$. Para visualizar las imágenes se utiliza el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) a través del cual también se exportan los datos como perfiles de intensidad del canal de fluorescencia. Los programas utilizados para analizar los datos (perfiles de intensidad) se desarrollaron en Matlab (<https://www.mathworks.com/>), un programa que posee diversas funciones para análisis de imágenes.

Con el fin de ilustrar las características de las imágenes (resolución, contraste, etc) y el tipo de células con las que se trabaja, se muestra un ejemplo en la Figura 3.1. Las proyecciones que emergen de la membrana de las células en la Figura 3.1a son filopodios. Las figuras 3.1a y 3.1b son imágenes de microscopía de fluorescencia confocal y de contraste de fase respectivamente, y 3.1c es la superposición de ambas. En algunos casos, la superposición de los dos tipos de imágenes y/o comparación visual puede ser útil para esclarecer la cantidad de células o sus límites. Por ejemplo, en la región inferior derecha de estas micrografías, mediante la Figura 3.1a no es posible distinguir la cantidad de células y sus contornos, sin embargo en la Figura 3.1b sí. Al superponer las micrografías se puede apreciar la información de ambas en simultáneo, tanto los filopodios, como los límites de las células y la cantidad de células.

Un aspecto importante que nos interesa estudiar en esta tesis es el contacto entre células. Se consideran contactos a aquellos filopodios de células vecinas que se unen en las imágenes de fluorescencia como los que se señalan con flechas rojas en las Figuras 3.2c y 3.2d.

3.2 Análisis cualitativo de filopodios

En las Figuras 3.1 y 3.2 se muestran algunas micrografías con las que se ha trabajado. En ellas se advierten las células de cáncer de próstata que presentan morfología fibroblastoide, por lo que tienen formas no definidas y heterogéneas. Se puede observar que las dimensiones de estas células son variables, del orden de las decenas de μm , en concordancia con la bibliografía.

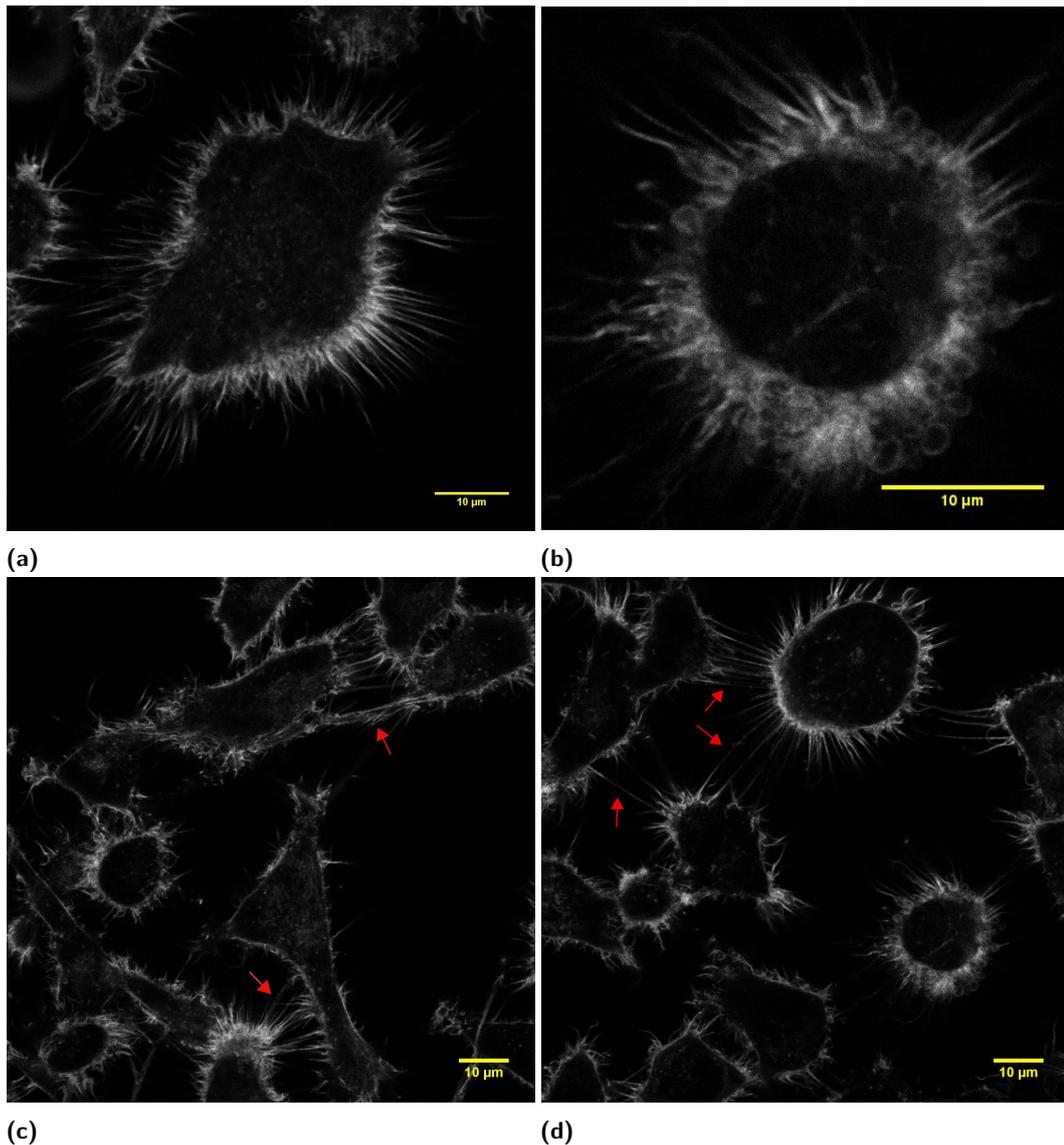


Figura 3.2: Imágenes confocales de células de cáncer de próstata PC3, cortesía de la Dra. G. Guerón (IQUIBICEN, UBA). (a) y (b) - Micrografías donde al menos una porción de las células no tienen contacto con otras células (regiones libres). (c) y (d) - Imágenes donde se pueden detectar contactos entre filopodios de células adyacentes señalados con flechas rojas. La figura 3.2b es la célula que se encuentra en la región inferior derecha en la Figura 3.2d ampliada, dicha célula parece estar libre de contactos con otras células mientras que el resto de las que se observan en la imagen sí presentan interacciones mediante filopodios. Las barras amarillas representan $10\mu m$.

Como se ha mencionado anteriormente, las células PC3 son abundantes en filopodios. En las imágenes, estas estructuras son evidentes: se observan en el contorno de las células como prolongaciones alargadas que emergen aproximadamente perpendiculares a la membrana y tienen una longitud menor a $10 \mu m$ (Figuras 3.2a y 3.2b). Llamaremos “células aisladas” a aquellas que presentan este patrón de filopodios.

Por otro lado, las células que se hallan muy cerca de otras (como las que se encuentran en las Figuras 3.2c y 3.2d) presentan filopodios que pueden desviarse notablemente de la normal a la sección de membrana, en particular en las zonas de mayor cercanía a las células vecinas. Otra cualidad distintiva respecto de las células aisladas, es que en las regiones de contacto los filopodios alcanzan longitudes significativamente mayores, incluso aún mayores que las células (ver Figuras 3.2c y 3.2d y parte superior de la Figura 3.1a). En lo que respecta a la separación entre filopodios se puede observar que en las regiones de contacto entre células cercanas aumenta la densidad, como reportan Paez *et al.* (Figuras 3.2c y 3.2d). A éstas las llamamos “células en contacto”.

3.3 Estudio de filopodios en células aisladas

3.3.1 Distribución de filopodios en la membrana

Obtención de los perfiles de intensidad

Se estudia la distribución de filopodios en la membrana a partir del análisis de las imágenes de microscopía. Se emplea el programa ImageJ para visualizar las imágenes y exportar los datos. El objetivo es cuantificar la cantidad de filopodios por unidad de longitud de membrana y la separación entre los filopodios. Para ello se traza una línea segmentada que circunscribe las células a la menor distancia respecto a la membrana tal que se distingan los filopodios (ver Figura 3.3 Izquierda).

A continuación, se recupera el perfil de intensidades a lo largo de dicha línea (Figura 3.3 Derecha). Se utiliza el programa Matlab que posee diversas funciones para análisis de imágenes. Se predetermina un umbral de intensidad en base a la comparación entre los perfiles de intensidad y las imágenes. Todos los picos con intensidades mayores al umbral se consideran filopodios como se muestra Figura 3.3 Derecha. Las fluctuaciones estadísticas inherentes a todas las imágenes introducen incertezas. Para reducirlas se aplica un filtro suavizador que es un simple pasabajos FIR (función *smooth* en Matlab) y se establece un umbral que es la mínima intensidad que tiene que cumplir un máximo para ser considerado un filopodio y no ruido estadístico (umbral $\sim 20\%$ del máximo de intensidad). Aunque existe la posibilidad

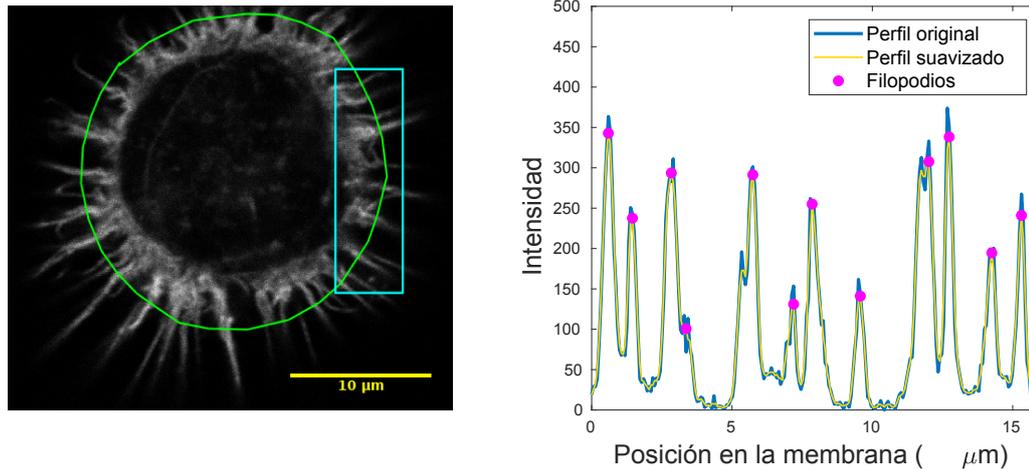


Figura 3.3: **Izquierda** - Imagen de una célula de cáncer de próstata PC3. En verde: línea segmentada trazada para obtener los perfiles de intensidad con los cuales se determina la distancia entre filopodios. Micrografía cedida por la Dra. G. Guerón (IQUIBICEN, UBA). **Derecha** - Perfil de intensidades que se obtiene para la línea segmentada delimitada por el cuadro celeste en la imagen de la izquierda. La curva azul es el perfil original obtenido directamente de las imágenes, la curva amarilla representa el perfil luego de la aplicación de un filtro. Los puntos fucsias son los picos de intensidad que superan el umbral de intensidad y son considerados filopodios.

de falsos positivos y falsos negativos, resulta necesario aplicar el filtro y establecer un umbral para automatizar el procedimiento e independizarse de las subjetividades inter-observador e intra-observador.

Siguiendo el procedimiento anterior para todos los perfiles de intensidad, se determinan las posiciones de los filopodios y, en consecuencia, las distancias entre filopodios adyacentes. Se obtienen $N=2395$ datos experimentales de distancias entre filopodios vecinos de 61 perfiles de intensidad. La caracterización más sencilla de la distribución es a través de la media ($\langle d \rangle$) y la desviación estándar (σ_d) de las distancias interfilopodiales:

$$\langle d \rangle = 2,1\mu m$$

$$\sigma_d = 2,6\mu m.$$

Como es de esperar, nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Paez *et al.* [33] y mostrados en la Figura 2.4. Este resultado permite calcular la densidad promedio de filopodios $\langle \rho \rangle = \frac{1}{\langle d \rangle} \approx 0,5\mu m^{-1}$.

Un estimador típico de la densidad de probabilidad de un conjunto del datos de una variable aleatoria es el histograma. La selección de la discretización del histograma (*bin*) cambia su forma por lo que es importante utilizar un criterio adecuado. Se elige el ancho de la discretización según el método de Scott [38]: ancho de

$bin = 3,5\sigma_d N^{-\frac{1}{3}}$. En la Figura 3.4 se muestra el histograma de separación entre filopodios.

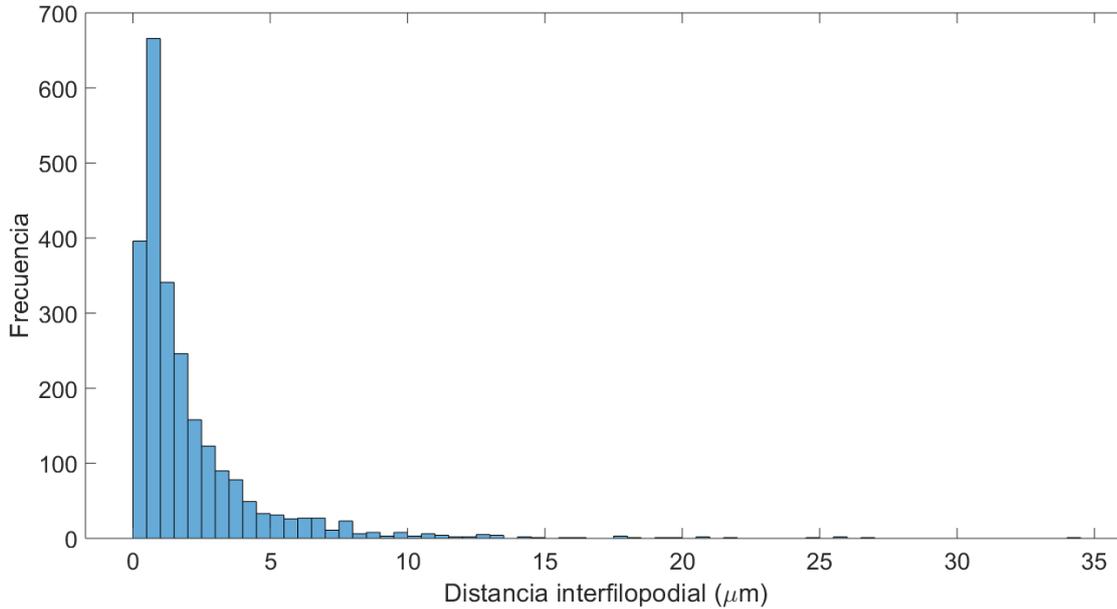


Figura 3.4: Histograma de la distancia entre filopodios en células PC3. El histograma se obtiene a partir de 61 perfiles de intensidad. El ancho de la discretización (bin) se determina según el método de Scott [38] ($N = 2395$).

Comparando los resultados experimentales obtenidos con las referencias descritas en la Sección 2.6 se observa que la densidad o la separación coincide en el intervalo de error con el reportado por Mogilner y Rubinstein [30] a partir de la micrografía publicada por Oldenbourg *et al.* [31] (distancia de separación $\sim 2\mu m$). Sin embargo, la forma de la distribución discrepa de la obtenida por Mogilner y Rubinstein (Figura 2.5 derecha). Esto puede deberse en parte a la poca estadística del histograma de Mogilner y Rubinstein ($N = 26$) y a la variabilidad entre distintos tipos celulares. El valor medio de la distancia de separación que reporta Husainy *et al.* [12] ($6,18\mu m$) difiere significativamente del obtenido en el presente trabajo. Por otro lado, si bien ambos histogramas exhiben un comportamiento unimodal, el mostrado en el trabajo de Husainy *et al.* (Figura 2.6 Izquierda) se dispersa en un rango mayor ($0 - 10^2$) y presenta una caída menos abrupta. Esto también podría deberse a la diferencia en las células empleadas. Así mismo, tampoco se puede descartar que la diferencia se deba al criterio utilizado por los autores en los trabajos mencionados para detectar los filopodios, ya que la metodología empleada no se encuentra mencionada en detalle.

Husainy *et al.* [12] perturban las células con diferentes agentes que alteran los filopodios y concluyen que, aunque se modifique el valor medio y la desviación de los histogramas, persiste una distribución con forma lognormal. Parece que esta característica se mantiene también al utilizar distintas células. Si bien se observan

variaciones en los valores medios y los histogramas de los trabajos citados con el obtenido aquí, todos parecen tener una distribución lognormal.

3.3.2 Longitud de filopodios

Otra característica importante de los filopodios que es de interés es la longitud. Se emplea nuevamente el programa ImageJ, se trazan líneas segmentadas por encima de los filopodios para medir la longitud de los mismos (Figura 3.5a). En esta sección se mide la longitud de filopodios que pueden considerarse aislados, es decir, que no se encuentran en contacto con filopodios de otras células. Además para minimizar la posibilidad de la existencia de mecanismos de comunicación que puedan alterar la longitud no se consideran filopodios que estén cercanos a otros de células vecinas como aquellos dentro del cuadro rojo en la Figura 3.5a.

Como se puede observar en la Figura 3.5a muchos filopodios tienen un ángulo respecto a la normal a la membrana y/o se encuentran pandeados. Esto dificulta la medición de la longitud a partir de las imágenes pues es frecuente observar filopodios que se superponen o muestran formas erráticas. Tampoco se consideran este tipo de estructuras en el análisis.

Se repite el procedimiento para 7 micrografías y se obtiene un histograma de la longitud de los filopodios (Figura 3.5b).

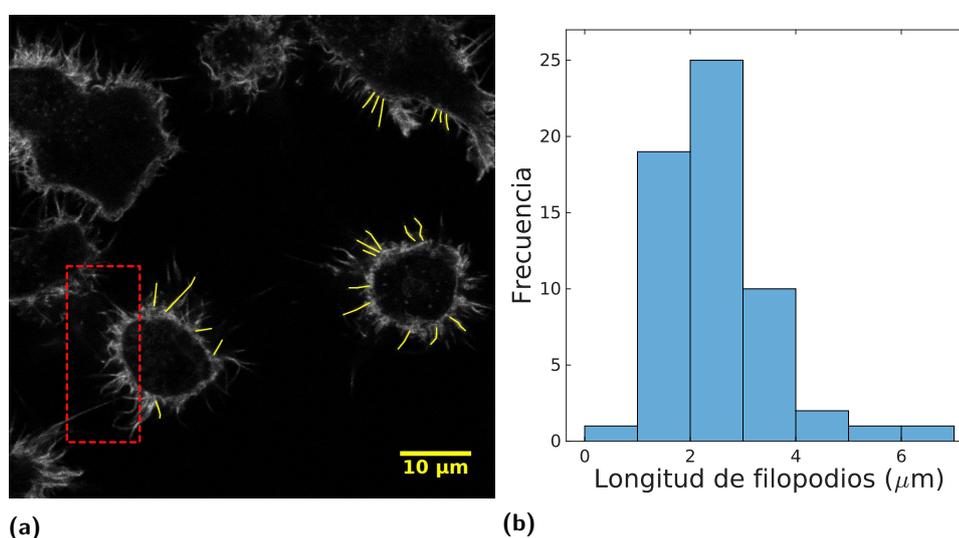


Figura 3.5: (a) Imagen ampliada de microscopía confocal de células de cáncer de próstata PC3 fijadas y tratadas con rodamina-faloidina, cortesía de la Dra. G. Guerón (IQUIBICEN, UBA). Las líneas segmentadas amarillas son trazadas manualmente sobre los filopodios para medir sus longitudes, dentro del cuadro punteado rojo se muestran ejemplos de filopodios que están cercanos a otros de células vecinas y que no se consideran y la barra amarilla representa $10\mu m$. (b) Histograma de longitud de filopodios de células PC3. Se selecciona ancho de la discretización (*bin*) según el método de Scott [38] ($N=59$).

El histograma presenta una forma unimodal con asimetría positiva al igual que el que obtienen Husainy *et al.* [12] (Figura 2.6). La longitud promedio es $3(1) \mu\text{m}$ y coincide en el intervalo de error con el reportado por los autores ($2,79 \mu\text{m}$). A pesar de la poca estadística ($N = 59$) es posible hacer una estimación de la longitud promedio de los filopodios aislados y de su distribución.

3.4 Estudio de regiones de contacto

Las zonas de contacto presentan filopodios que pueden llegar a tener longitudes significativamente mayores que los de regiones aisladas. En lo que respecta a la separación entre filopodios se puede observar que en las regiones de contacto entre células cercanas aumenta la densidad como reportan Paez *et al.* (Figuras 3.2c y d).

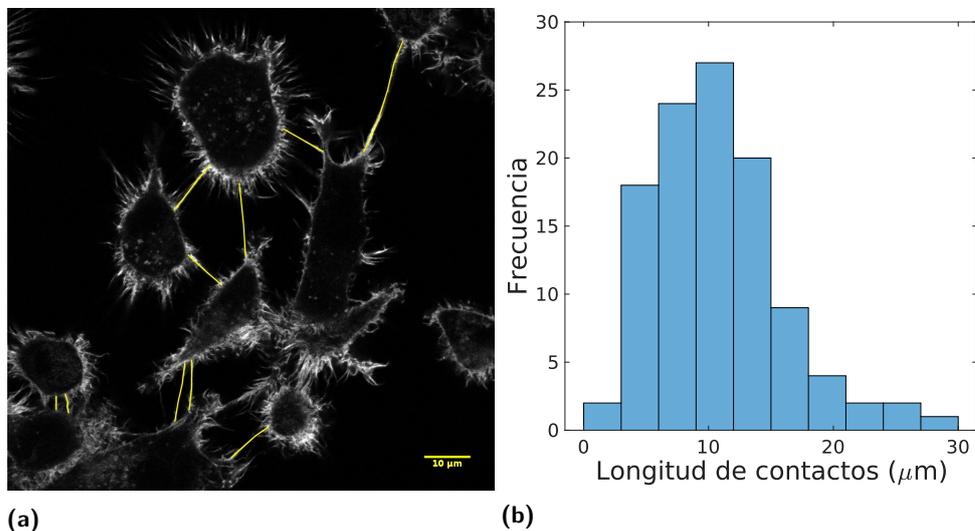


Figura 3.6: (a) Imagen de microscopía confocal de células de cáncer de próstata PC3 fijadas y tratadas con rodamina-faloidina, cortesía de la Dra. G. Guerón (IQUIBICEN, UBA). Las líneas segmentadas amarillas son trazadas manualmente sobre los contactos para medir sus longitudes y la barra amarilla representa $10\mu\text{m}$. (b) Histograma de longitud de contactos. Se analizan 13 micrografías y se mide la longitud de 109 contactos. El ancho de la discretización (*bin*) se determina mediante el método de Scott [38].

Se determina la longitud de los contactos mediante el procedimiento descrito en la Sección 3.3.2 trazando líneas segmentadas sobre los contactos (Figura 3.6a). Realizando esto para 13 micrografías se obtiene un histograma de la longitud de contactos (Figura 3.6b). A partir del histograma se puede concluir que los filopodios que forman parte de contactos intercelulares pueden alcanzar longitudes notablemente mayores que los que se encuentran aislados. La máxima longitud de contacto que se mide es $\simeq 27,4 \mu\text{m}$, asumiendo que los dos filopodios involucrados en la unión miden lo mismo, es decir que los filopodios llegan a la mitad de la distancia entre células, la longitud máxima de los filopodios en contacto es $27,4/2 \mu\text{m} = 13,7 \mu\text{m}$, lo cual es mayor al doble del filopodio aislado medido más largo ($6,3 \mu\text{m}$). El histograma

de los contactos presenta una forma similar al de los filopodios libres (unimodal positiva); sin embargo, se extiende en un rango mayor de longitudes y su valor medio también es mayor ($11(5) \mu m$).

El aumento de la longitud y de la densidad de filopodios en contacto (la última no fue medida en el presente trabajo sin embargo Paez *et al.* midieron la densidad de contactos entre células) podría explicarse considerando la existencia de mecanismos de comunicación y regulación intercelular. Gallo *et al.* revisan algunos trabajos en los que se analiza cómo la comunicación puede afectar a los filopodios en células neuronales [8]. En base a estudios experimentales proponen que en presencia de gradientes quimiotácticos la longitud de los filopodios aumenta por inhibición de los mecanismos de retracción de los filopodios: el flujo retrógrado de la actina-F y la tasa de despolimerización de actina-G. Cuando los filopodios detectan sustancias quimiotácticas atractivas se orientan y crecen hacia las regiones donde la concentración de ellas es mayor. En presencia de este mecanismo de direccionamiento se observa una mayor densidad de filopodios en la dirección del gradiente [48]. En el Capítulo 6 exploraremos estos efectos.

Patrones de separación de filopodios

En este capítulo se analizan los patrones de separación de los filopodios a lo largo de la membrana celular. Se detalla un modelo determinístico de formación de filopodios que predice relaciones biológicas importantes. Por otro lado, se implementa un modelo estocástico continuo del mismo sistema, ambos propuestos por Mogilner y Rubinstein [30]. A partir de simulaciones de Monte Carlo del modelo estocástico se obtienen distribuciones de filopodios a lo largo de una porción de membrana y la distancia de espaciamiento promedio entre filopodios vecinos o la densidad de filopodios. Se verifican las predicciones del modelo determinístico con los resultados de las simulaciones del modelo estocástico y se contrastan con los datos experimentales del capítulo anterior que se obtiene a partir del análisis de imágenes de microscopía confocal.

4.1 Modelo determinístico de iniciación de filopodios

Se investiga el espaciado entre los filopodios utilizando un modelo determinista que revela escalas biológicas importantes. En este modelo continuo que se basa en el modelo de elongación convergente (Sección 2.5.1), se introducen densidades (número por μm) de precursores, $\lambda(x, t)$, y de protuberancias filopodiales, $f(x, t)$, a lo largo del borde anterior lamelipodial. Estas densidades cambian de acuerdo con la siguiente dinámica:

$$\frac{d\lambda}{dt} = b - m\lambda - 2r_1\lambda - r_2\lambda, \quad (4.1)$$

$$\frac{df}{dt} = m\lambda + r_1\lambda - r_3f, \quad (4.2)$$

donde b es la tasa de generación de los precursores- Λ , m es la tasa de maduración de los precursores en las protuberancias filopodiales; r_1 es la tasa efectiva de colisión de dos precursores, que se combinan en una protuberancia filopodial (Figura 4.1b); r_2 es la tasa efectiva de colisión de un precursor con una protuberancia filopodial,

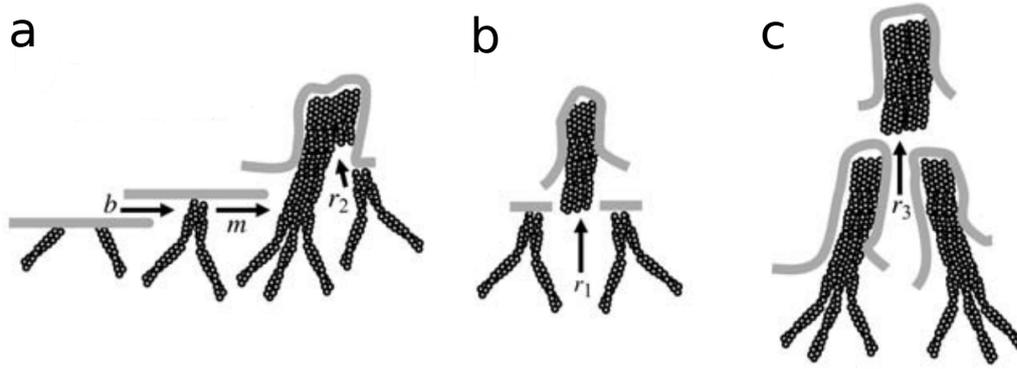


Figura 4.1: Esquema del modelo determinista de la dinámica de filopodios y precursores en el borde lamelipodial. (a) Generación de precursores con tasa b , maduración de precursores en filopodios con tasa m y colisión de un precursor con un filopodio con tasa efectiva r_2 . (b) Combinación de dos precursores que dan lugar a un filopodio con tasa efectiva r_1 . (c) Fusión de dos precursores en otro con tasa efectiva r_3 . Imagen adaptada de *The physics of filopodial protrusion* [30].

como resultado de lo cual el precursor desaparece fusionándose con el filopodio (Figura 4.1a). Finalmente, r_3 es la tasa efectiva de colisión de dos filopodios que se fusionan en uno solo (Figura 4.1c).

La tasa r_1 es definida como el inverso del tiempo promedio de colisión entre precursores, y puede ser estimada como la distancia promedio entre los precursores, $1/\lambda$, dividida por la velocidad promedio de estos (la deriva lateral), v_d : $r_1 \simeq v_d \lambda$. Del mismo modo, $r_2 \simeq v_d f$, $r_3 \simeq v_d f$. Así, se obtiene el sistema de ecuaciones para las densidades de los haces de actina:

$$\frac{d\lambda}{dt} = b - m\lambda - 2v_d\lambda^2 - v_d\lambda f, \quad (4.3)$$

$$\frac{df}{dt} = m\lambda + v_d\lambda^2 - v_d f^2. \quad (4.4)$$

Estas ecuaciones se pueden adimensionalizar utilizando variables adimensionales

$$f' = \frac{f}{\sqrt{b/v_d}}, \quad \lambda' = \frac{\lambda}{\sqrt{b/v_d}} \text{ y } t' = \frac{t}{1/\sqrt{bv_d}}:$$

$$\frac{d\lambda'}{dt'} = 1 - \epsilon\lambda' - 2\lambda'^2 - \lambda'f', \quad (4.5)$$

$$\frac{df'}{dt'} = \epsilon\lambda' + \lambda'^2 - f'^2. \quad (4.6)$$

Aquí, $\epsilon = m/\sqrt{bv_d}$ es la relación adimensional de la tasa de maduración respecto a la tasa efectiva de fusión de los haces de actina.

El análisis de las ecuaciones (4.5)(4.6) en estado estacionario muestra que existe una única solución estable que tiene sentido biológico (es decir, con $\lambda^* \geq 0$ y $f'^* \geq 0$, donde el símbolo * indica que nos referimos al estado estacionario). Se puede estudiar analíticamente diferentes límites para las ecuaciones (4.5)(4.6) en estado estacionario según el valor de ϵ . Primero, cuando la tasa de maduración adimensional es muy pequeña, $\epsilon \ll 1$, las densidades promedio de precursores y filopodios son aproximadamente iguales: $\lambda^* \simeq f'^* \simeq 1/\sqrt{3}$. Por otro lado, cuando los precursores maduran rápidamente, $\epsilon \gg 1$, la densidad de los precursores es baja, $\lambda^* \simeq 1/\epsilon$, mientras que $f'^* \simeq 1$. Para valores intermedios de ϵ , $f'^* \sim 1$. Si se tiene en cuenta que $f'^* = \frac{f^*}{\sqrt{b/v_d}}$, la conclusión importante es que el orden de magnitud de la densidad filopodial estacionaria está relacionada con la velocidad lateral y la tasa de generación de precursores de la forma:

$$f^* \sim \sqrt{b/v_d}. \quad (4.7)$$

4.2 Modelo estocástico de iniciación de filopodios: simulaciones

El modelo de formación de filopodios que se presenta en esta sección, propuesto por Mogilner y Rubinstein [30], es una versión estocástica del modelo determinístico discutido en la Sección 4.1. La estocasticidad del modelo es esencial para el cometido del trabajo: obtener distribuciones de filopodios en el borde lamelipodial y conocer la función de densidad de probabilidad de separación interfilopodial para la contrastación experimental. Un modelo determinístico, como vimos en la Sección 4.1 sólo proporciona el valor medio de la separación entre filopodios y no la distribución de los filopodios a lo largo de la membrana.

4.2.1 Metodología

En el modelo estocástico cada paquete o haz de actina (ya sea precursor o filopodio) se caracteriza por su posición a lo largo del borde lamelipodial $x_i(t)$, la velocidad lateral $v_i(t)$ y el índice de madurez m_i , el cual es igual a cero para un precursor y a la unidad para un filopodio. En las simulaciones se considera el espacio de forma continua.

En la Tabla 4.1 se muestra un pseudocódigo que resume las principales componentes del código realizado en el lenguaje C. Se considera un segmento de membrana L de $30 \mu m$ y se generan nuevos precursores en él con tasa $b = 0,01 \mu m^{-1} s^{-1}$ tal como se esquematiza en la Figura 4.2C (paso 1 en la Tabla 4.1). Cada precursor naciente

-
- 1: Generación de nuevo precursor i con probabilidad $bL\Delta t$
 - 2: **if** *Se genera un precursor* **then**
 - 3: Inicialización de los parámetros del precursor $(x_i, v_i, \theta_i, m_i)$
 x_i n° aleatorio entre 0 y L, $m_i = 0$, θ_i n° aleatorio entre -30° y 30° y
 $v_i = v \tan \theta_i$
 - 4: Actualización de la posición de todos los haces: $x_i(t + \Delta t) = x_i(t) + v_i \Delta t$,
 $i = 0, 1, 2 \dots n$ donde n es la cantidad de haces
 - 5: Maduración de todos los precursores en filopodios con probabilidad $m \Delta t$
 - 6: **if** *Madura un precursor* **then**
 - 7: $m_i = 0 \rightarrow m_i = 1$
 - 8: **if** *Colisionan haces vecinos* **then**
 - 9: **if** *Son dos precursores* **then**
 - 10: Se fusionan en un precursor o en un filopodio con igual probabilidad cuya
 $vlat = \min [|vlat_1|, |vlat_2|]$
 - 11: **else if** *Son dos filopodios* **then**
 - 12: Se fusionan en un filopodio que se desliza con una tasa de movimiento
 lateral $vlat = \min [|vlat_1|, |vlat_2|]$
 - 13: **else if** *Son un filopodio y un precursor* **then**
 - 14: Se fusionan en un filopodio que tiene la tasa de movimiento lateral $vlat$
 del filopodio original
 - 15: Actualizar $t = t + \Delta t$
 Continuar con el paso 1
-

Tabla 4.1: Pseudocódigo de un paso temporal del modelo de iniciación de filopodios sobre una porción de membrana de largo L.

se inicializa en una ubicación aleatoria entre 0 y L, tiene un ángulo de inclinación aleatorio también distribuido uniformemente en el intervalo $-30^\circ < \theta_i < 30^\circ$ y se desliza a lo largo de la membrana con una velocidad $v_i = v \tan(\theta_i)$, donde $v = 0,05 \mu m/s$ es la tasa de protrusión (pasos 2-4 en la Tabla 4.1). Los precursores maduran (m_i cambia de 0 a 1) en filopodios con tasa constante $m = 0,01 s^{-1}$, en la Figura 4.2C se muestra una ilustración (paso 6 en la Tabla 4.1).

Los haces se mueven lateralmente, cuando dos de ellos se encuentran (distancia de separación $d < 30 nm$) se combinan y el número de haces disminuye; en la célula, según el modelo de elongación convergente, sus filamentos se alinean y los paquetes se fusionan como se ilustra Figura 2.3. Cada colisión da como resultado la fusión de la pareja (pasos 8-14 en la Tabla 4.1). Cuando dos precursores se combinan, el paquete de actina resultante se convierte en otro precursor o se transforma en un filopodio (Figura 4.2D) con la misma probabilidad. Cuando un precursor se encuentra con un filopodio, o dos filopodios chocan, se produce un solo filopodio (Figura 4.2A). Si dos precursores o dos filopodios colisionan, la tasa de movimiento lateral del paquete resultante es igual a la del paquete cuya velocidad de desplazamiento tiene el menor

valor absoluto. Si se combinan un precursor y un filopodio (Figura 4.2C) la tasa de movimiento lateral del filopodio resultante será igual a la del filopodio original.

Se utilizan condiciones de contorno abiertas: los paquetes de actina, ya sean precursores o filopodios, que se mueven más allá de los bordes de la membrana ($x < 0$ o $x > 30 \mu m$) son desconsiderados. La secuencia de pasos descrita en la Tabla 4.1 define un paso de Monte Carlo.

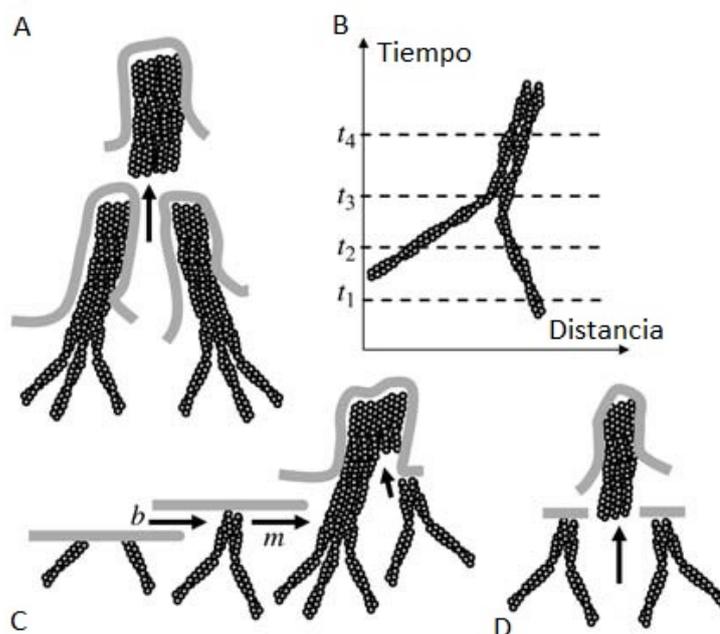


Figura 4.2: A. Fusión de dos filopodios en otro. B. Esquemática del movimiento lateral. Las líneas punteadas representan la membrana en cuatro instantes de tiempo consecutivos. C. Generación de precursores con tasa b , maduración con tasa m , y combinación entre un filopodio y un precursor. D. Colisión entre dos precursores dando lugar a un filopodio. Imagen publicada en [30].

El paso temporal utilizado en las simulaciones fue de $\Delta t = 1 s$. Su selección fue definida en función del valor de las tasas utilizadas ($b = 0,01 \mu m^{-1} s^{-1}$ y $m = 0,01 s^{-1}$) para que las probabilidades $b L \Delta t$ y $m \Delta t$ sean $\ll 1$ y puedan ser considerados como probabilidades.

En las simulaciones se emplean inicialmente los valores de los parámetros b , m , θ y v_d que utilizan Mogilner y Rubinstein (Tabla 4.2). Los autores utilizan la micrografía publicada por Oldenbourg *et al.* (Figura 2.5), a partir de ella estiman que el ángulo promedio al que se inclinan los haces de actina respecto a la dirección de la protrusión es $< 30^\circ$. La tasa de movimiento lateral promedio es determinada por Oldenbourg *et al.* mediante películas de micrografías (*time-lapse cinemicrography*). Conociendo v_d y utilizando la densidad de filopodios reportada por Oldenbourg *et al.* ($f \simeq 0,5 \mu m$), se estima b mediante la ecuación (4.7) ($b \sim v_d f^2$) lo cual resulta en $b \sim 0,001 - 0,01 \mu m^{-1} s^{-1}$. No hay mediciones disponibles de esta tasa, pero esta

Parámetros del modelo

Tasa de generación de precursores	$b = 0,01 \mu m^{-1} s^{-1}$
Tasa de maduración de precursores en filopodios	$m = 0,01 s^{-1}$
Velocidad de protrusión	$v = 0,05 \mu m/s$
Ángulo promedio de inclinación de las estructuras	$\theta = 30^\circ$
Distancia de colisión	$d = 30 nm$
Sección de membrana	$L = 30 \mu m$

Tabla 4.2: Valores de los parámetros del modelo de la dinámica de los filopodios en el borde lamelipodial (obtenidos de Mogilner y Rubinstein [30]).

estimación parece compararse bien con las observaciones reportadas en Svitkina *et al* [42]. Además, las micrografías de Svitkina *et al.* indican que las densidades de precursores- Λ y protuberancias filopodiales son comparables, por lo que, la tasa de maduración de los precursores no puede ser mayor que la tasa de generación $0,01/s$.

4.2.2 Resultados de las simulaciones

Análisis del modelo

Si se grafica la posición de los diferentes precursores y filopodios en el eje x y el tiempo en el eje y podemos visualizar sus trayectorias unidimensionales (Figura 4.3). Así, la trayectoria de una estructura con velocidad positiva (negativa) será una recta con pendiente positiva (negativa), siendo la pendiente de esta recta igual a la velocidad lateral. También se aprecian y se señalan con flechas los distintos eventos que pueden ocurrir: la maduración de un precursor y todas las variedades de colisiones entre las distintas estructuras. Si se fija el tiempo en la Figura 4.3 se tiene el perfil de la membrana con sus filopodios y precursores en ese instante.

Al evolucionar el tiempo en las simulaciones se generan nuevos filopodios, tanto por colisión como por maduración, aumentando así la densidad f . Para analizarlo, se grafica la densidad de filopodios promedio en función del tiempo (Figuras 4.4a y c). Se observa que la cantidad de filopodios no alcanza un estado estacionario para el intervalo temporal que se evalúa. El sistema llegará a un estado estacionario pues la cantidad de filopodios no puede crecer indiscriminadamente dado que el modelo tiene una discretización inherente debida a la distancia de colisión (dos filopodios separados por una distancia menor que la distancia de colisión se combinan). No se hacen realizaciones para tiempos mayores debido a que implica tiempos de cómputos innecesariamente grandes pues carece de sentido biológico, para tiempos mayores

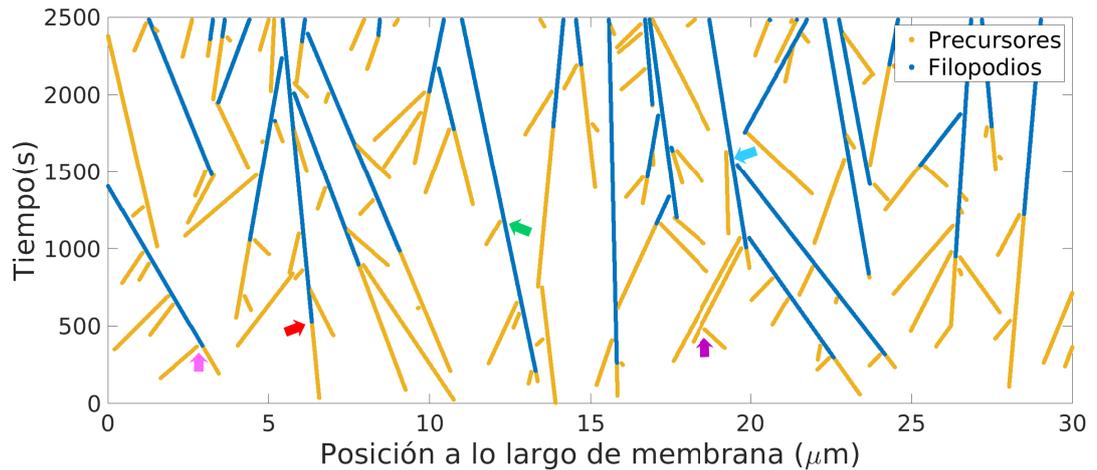


Figura 4.3: Evolución temporal de la posición de los filopodios y precursores. Resultados de simulaciones de Monte Carlo del modelo estocástico de iniciación de filopodios. El eje horizontal es la posición a lo largo de la porción de membrana en μm y el eje vertical el tiempo en s ($\Delta t = 1 s$). La flecha roja señala la maduración de un precursor en un filopodio mientras que la fucsia, violeta, verde y azul indican la fusión de dos precursores en un filopodio, dos precursores en otro precursor, un precursor y un filopodio en un filopodio, y dos filopodios en un filopodio respectivamente.

a 1000 s los filopodios pierden estabilidad y sería necesario agregar la extinción de ellos al modelo.

Para conocer la distribución de filopodios en el borde lamelipodial que predice el modelo se realizan histogramas de separación entre filopodios vecinos, del mismo modo que se realiza experimentalmente en la Sección 3.3 y que lo hacen Mogilner y Rubinstein [30]. Las figuras 4.4a y b corresponden a los parámetros de la Tabla 4.2 ($b = 0,01 \mu m^{-1} s^{-1}$), mientras que en las figuras 4.4c y d se considera $b = 0,8 \mu m^{-1} s^{-1}$, manteniendo el valor de los demás parámetros como en la Tabla 4.2. Se observa que la tasa de generación de precursores (b) tiene un rol importante en el modelo: aumentarla resulta en patrones de filopodios menos separados. Esto da lugar a una mayor densidad filopodial y a un histograma desplazado hacia valores menores.

Se repiten simulaciones variando los parámetros del modelo que modifican la densidad de filopodios (b , v_d y m) y se obtienen los histogramas de separación entre filopodios (Figura 4.5a-c). En la Figura 4.5a se muestran los histogramas que se obtienen variando v_d un orden de magnitud y dejando los demás parámetros constantes. Al aumentar la velocidad de desplazamiento salen más estructuras (filopodios y precursores) de la sección de membrana simulada, lo cual resulta en menos filopodios y, en consecuencia aumenta la separación interfilopodial. Así, cuanto mayor es la velocidad de desplazamiento los histogramas alcanzan valores más grandes de separación entre filopodios y el valor más probable es menos pronunciado. También se grafican los histogramas al variar la tasa de maduración

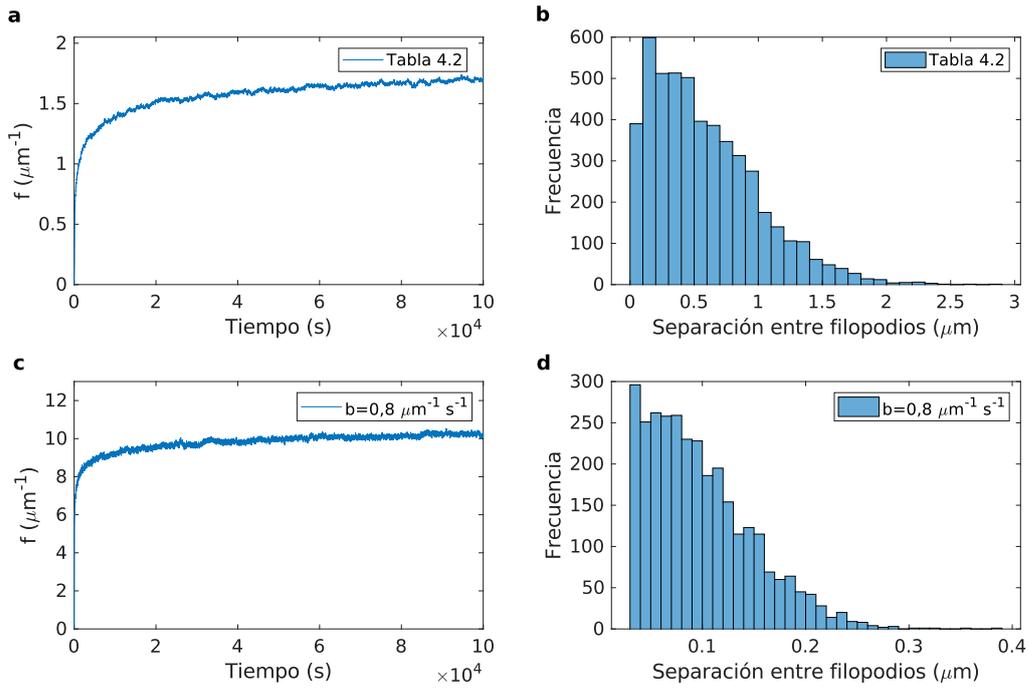


Figura 4.4: (a) Evolución temporal de la densidad promedio de filopodios para los parámetros de la Tabla 4.2. (b) Histograma de separación entre filopodios que se obtiene para el tiempo final (10^5 s) de la Figura 4.4a. Se utiliza un intervalo temporal $\Delta t = 1$ s y se corren 100 realizaciones para lo cual se obtiene $N=4980$ distancias de separación entre filopodios. (c) Evolución temporal de la densidad promedio de los filopodios para $b = 0,8 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$. (d) Histograma de separación entre filopodios para el tiempo final de la Figura 4.4c. Se utiliza un $\Delta t = 0,01$ s para que $b\Delta tL$ sea considerada una probabilidad y se corren 10 simulaciones para obtener el promedio de densidad y para que el histograma tenga un N mayor ($N=3045$). Los parámetros restantes se mantienen igual a la Tabla 4.2. En ambos histogramas se emplea el método de Scott [38] para la elección de la discretización (bin).

de los precursores m mientras se mantienen fijos los parámetros restantes (Figura 4.5b). Al incrementar m en un orden de magnitud para cada histograma, estos se contraen, predominando valores de distancia de separación menores y presentando el pico del valor más probable de forma más pronunciada. El comportamiento es esperable pues a mayor m hay más filopodios, disminuyendo la separación entre ellos. Por otro lado, al aumentar la tasa de generación de precursores (b) dejando los demás parámetros fijos (Figura 4.5c), aumenta la cantidad de precursores, por lo tanto también de filopodios y, en consecuencia disminuye la distancia de separación entre filopodios vecinos. Esto se traduce en histogramas más contraídos desplazados hacia valores menores de distancia de espaciamiento interfilopodial. Al comparar las Figuras 4.5a y 4.5c vemos que la disminución de la velocidad de desplazamiento (v_d) y el aumento de la tasa de generación de precursores (b) tienen efectos equivalentes en lo que respecta a la separación entre filopodios.

El comportamiento del modelo al variar los parámetros coincide con lo esperado. Se puede observar que la velocidad y la tasa de generación de precursores afectan

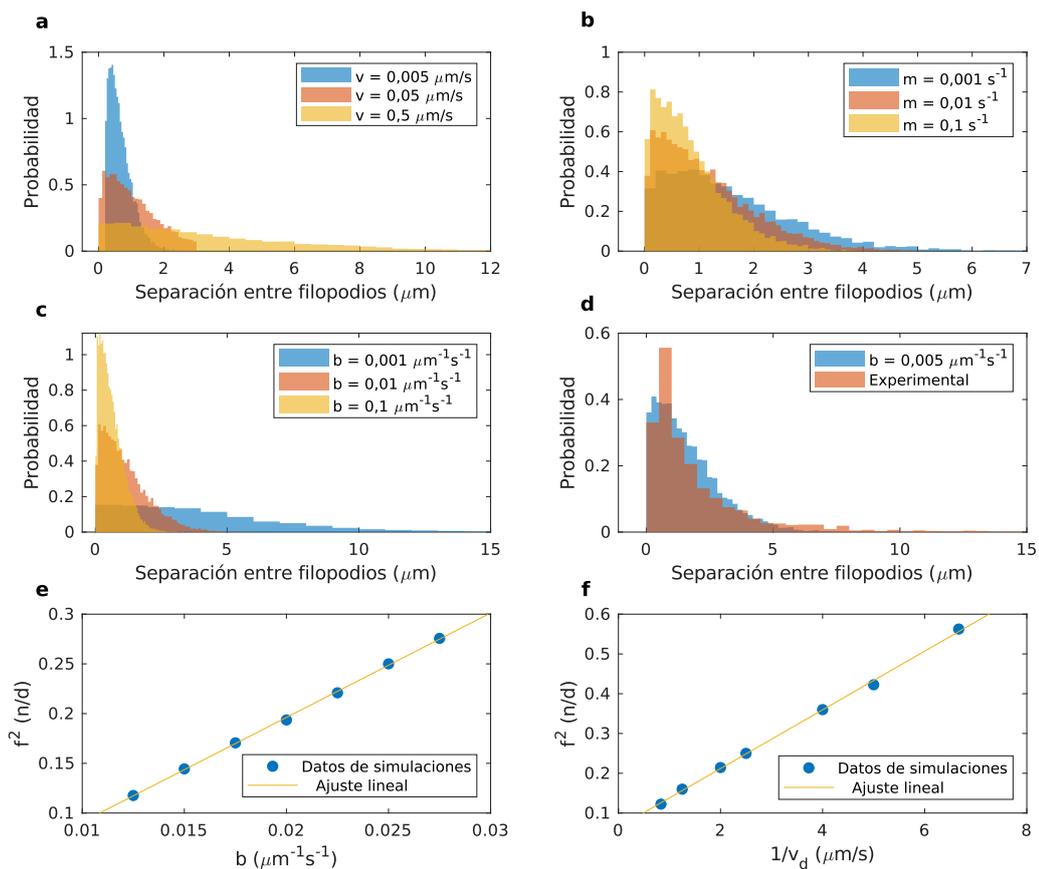


Figura 4.5: (a-c) Histograma de separación entre filopodios variando v_d , m y b respectivamente. En cada caso los otros dos parámetros se mantienen fijos ($v_d = 0,05 \mu\text{m}/\text{s}$, $m = 0,01 \text{s}^{-1}$, $b = 0,01 \mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$). (d) Superposición de histogramas experimental y teórico con $b = 0,005 \mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$. Todos los histogramas fueron normalizados tal que el área que ocupan sea equivalente a 1, siendo así estimadores de la función de densidad de probabilidad. En todos los histogramas el criterio para la elección de la discretización (bin) se realiza según el método de Scott [38]. Para todos los histogramas se consideran corridas de 500 s con $\Delta t = 1 \text{ s}$. (e) Resultados de las simulaciones de Monte Carlo (puntos azules) que confirman la predicción analítica de la relación de proporcionalidad entre la densidad (f) y raíz cuadrada de la tasa de generación de precursores b . (f) Resultados de las simulaciones de Monte Carlo (puntos azules) que confirman la predicción analítica de la relación lineal entre la densidad (f) y la raíz cuadrada del inverso de la velocidad (v_d).

en mayor medida la cantidad de filopodios presentes en la membrana, y por consiguiente los histogramas, que la tasa de maduración de los precursores. La menor importancia de m se debe a que la aparición de filopodios tiene dos componentes, la colisión (gobernada por v_d) y la maduración (gobernada por m e indirectamente por b). En la Figura 4.3 se puede notar que la mayor cantidad de filopodios son generados por colisiones y en menor medida por eventos de maduración. Si se disminuye m por debajo de $0,001 \text{ s}^{-1}$ se siguen generando precursores fundamentalmente por colisiones y si se aumenta más allá de 1 s^{-1} no cambia la cantidad de filopodios pues no pueden madurar más precursores de los que hay, es decir que b limita m . Si

m se modifica más allá de los valores que se utilizan en las simulaciones de la Figura 4.5b es cada vez menos apreciable la alteración de los histogramas.

El modelo determinístico predice que en el estado estacionario existe una relación entre la densidad de filopodios (f), la velocidad de desplazamiento y la tasa de generación de precursores: $f \sim \sqrt{b/v_d}$. Para evaluarla en el modelo estocástico se realizan simulaciones de Monte Carlo variando los parámetros b y v_d uno a la vez. En la Figura 4.5e se verifica la relación entre f y b y, en la Figura 4.5f se comprueba la dependencia entre f y V_d .

Las simulaciones de las Figuras 4.5 no corresponden al estado estacionario pues en la mayoría de los casos éste se alcanza para tiempos que no tienen sentido en el contexto biológico en el cual se encuentra enmarcado el modelo. Cabe destacar que independientemente de esto, se verifica la relación que predice el modelo determinístico entre f , v_d y b , evidenciando su robustez. Mogilner y Rubinstein parecen no percatarse de esta situación ya que no mencionan llegar al estado estacionario en sus simulaciones estocásticas y utilizan como tiempo final valores iguales a 500 s.

Comparación con datos experimentales

El objetivo de esta parte del trabajo es encontrar un modelo que prediga la distribución de filopodios obtenida experimentalmente en este trabajo. Como se muestra en la Figura 4.5a-c modificar los parámetros del modelo resulta en distribuciones diferentes. Para hacer la comparación con los experimentos se elige modificar b pues éste no es un parámetro medido experimentalmente sino que Mogilner y Rubinstein estiman que se encuentra en el rango de $0,01 - 0,001 \mu m^{-1} s^{-1}$ [30]. Los autores ajustan la tasa de generación b para obtener una distribución que coincida con los datos experimentales que obtienen de analizar la imagen de Oldenbourg *et al.* [31].

Se modifica la tasa de generación de precursores b y se superpone con el histograma obtenido experimentalmente en la Sección 3.3. Se encuentra que para $b = 0,005 \mu m^{-1} s^{-1}$ el histograma tiene un comportamiento similar al experimental, como se muestra en la Figura 4.5d. Según el modelo, el valor medio de la separación entre filopodios vecinos es $\langle d \rangle = 1,6 \mu m$ y la desviación estándar $\sigma_d = 1,3 \mu m$. Experimentalmente se obtuvo $\langle d \rangle = 2,1 \mu m$ y $\sigma_d = 2,6 \mu m$. Si bien los histogramas se asemejan se observa que el experimental posee una cola de distribución mayor.

Crecimiento de filopodios

Como se introdujo en el Capítulo 2 el crecimiento de los filopodios en el borde lamelipodial es un proceso dinámico. La polimerización y despolimerización de actina-G en los extremos de los filamentos y el flujo retrógrado son los mecanismos que rigen el crecimiento de los filopodios. En el modelo de nucleación *de novo* las proteínas forminas se unen a los extremos barbados promoviendo el crecimiento de los filamentos, mientras que las proteínas de *capping* se adicionan a los extremos barbados inhibiendo la elongación de los filamentos mediante el bloqueo de la polimerización. En la Figura 5.1 Izquierda se esquematiza dicho proceso. Recordemos que este fenómeno aún no se conoce en detalle y existe otro modelo de iniciación de filopodios, el modelo de elongación convergente, en el cual un conjunto de proteínas son responsables de la regulación (ARP 2/3, fascina, *tip complex* y las proteínas de *capping*.)

En este capítulo se realiza un modelo estocástico continuo del crecimiento de un filopodio en el borde lamelipodial que predice la longitud estacionaria de los filopodios. También se analiza el efecto de los distintos parámetros del modelo sobre la longitud filopodial estacionaria. Por otro lado, se realiza una aproximación de campo medio para la longitud de los filopodios y se contrasta con la que se obtiene para el modelo estocástico.

5.1 Modelo estocástico de crecimiento de filopodios

En esta sección se utiliza un modelo de crecimiento de un filopodio propuesto por Erban *et al.* [6]. Este consiste en tres componentes principales: la polimerización/despolimerización de actina-G en los extremos barbados de los filamentos y el flujo retrógrado. Para ello se considera que las moléculas de actina-G entran al filopodio y se mueven dentro él describiendo un movimiento browniano. Además estas moléculas se polimerizan en el extremo barbado del filamento (se considera la posición de un filamento de actina promedio) con una tasa de polimerización constante que llamaremos k^+ . Por otro lado, se implementa la despolimerización en el extremo barbado, restando el tamaño efectivo de una molécula de actina-G a la longitud del filamento con una tasa de despolimerización que denominaremos

k^- . También se tiene en cuenta el movimiento retrógrado del filamento promedio lo cual se lleva al cabo considerando que éste se desplaza en sentido retrógrado a velocidad constante (v) disminuyendo la longitud del filamento en $v\Delta t$ en cada paso temporal.

5.1.1 Metodología

Para modelar el crecimiento de los filopodios se implementa un modelo molecular de reacción-difusión presentado por Erban *et al* [6]. El modelo es desarrollado en espacio continuo (*off-lattice*). En el mismo trabajo los autores han desarrollado un modelo compartimental y lo contrastan con el modelo continuo. Muestran que las diferencias de los resultados son del orden del $\sim 5\%$, lo cual se debe justamente a la discretización del espacio. Decidimos utilizar el modelo continuo.

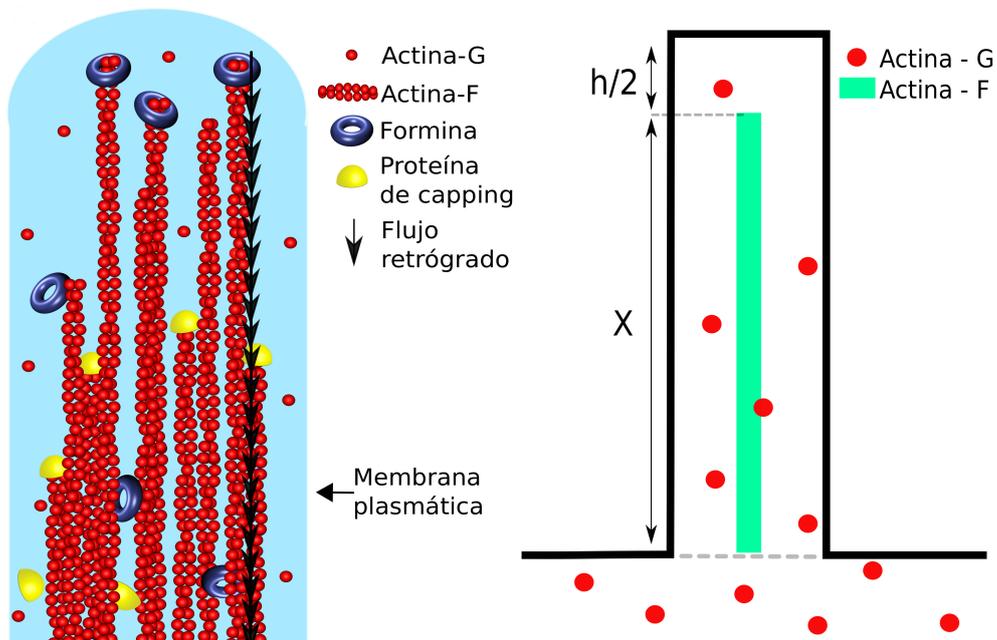


Figura 5.1: Izquierda: Ilustración de las principales componentes que intervienen en el crecimiento de un filopodio. Las hélices bicatenarias rojas son los filamentos de actina (actina-F). Las partículas rojas representan la actina globular (actina-G) libre en el filopodio disponible para la polimerización. Los toroides violetas son las forminas, proteínas de la familia Rho GTP-asa que catalizan la polimerización de actina en el extremo barbado (+). Por el contrario, las proteínas de *capping* (semiesferas amarillas) se unen a la actina-F de rápido crecimiento bloqueando la polimerización. Derecha: Representación esquemática simplificada del modelo estocástico de crecimiento de un filopodio. En color rojo se esquematizan las moléculas de actina-G libres, en verde se representa la posición promedio de los filamentos de actina-F cuya longitud es $X(t)$; el filopodio tiene un largo de $X(t) + h/2$, donde $h/2$ es la separación promedio entre los filamentos y la membrana plasmática.

En el modelo no se consideran los filamentos individuales de actina-F, sino un filamento promedio. Tampoco se considera las forminas, las proteínas de *capping* o las proteínas presentes en el modelo de elongación convergente. En la Figura 5.1 derecha

se muestra un esquema del modelo donde $X(t)$ representa la longitud promedio de los filamentos de actina (línea verde) y los puntos rojos son las moléculas de actina-G que se encuentran libres, disponibles para la polimerización en el extremo barbado.

La posición de cada molécula de actina-G se modela explícitamente. En el instante t , se tienen $n(t)$ moléculas de actina-G en el filopodio en las posiciones $y_i(t)$, $i = 1, 2, \dots, n(t)$. Dado un intervalo de tiempo fijo (Δt), se evoluciona $y_i(t)$ considerando que las moléculas de actina-G son partículas Brownianas con coeficiente de difusión D :

$$y_i(t + \Delta t) = y_i(t) + \sqrt{2D\Delta t}\xi_i \quad (5.1)$$

donde ξ_i son números aleatorios distribuidos normalmente con media cero y varianza unitaria. En las simulaciones, se utiliza un paso de tiempo $\Delta t = 10^{-6}s$. El desplazamiento espacial promedio durante un paso de tiempo ($\sqrt{2D\Delta t}$) es igual a $0,79 \text{ nm}$ para los valores de los parámetros dados en la Tabla 5.2. Se propone que el extremo del filopodio está a una distancia fija $h/2$ por encima del extremo barbado (+) del filamento de actina-F. Por lo tanto,

$$y_i(t) \in \left[0, X(t) + \frac{h}{2}\right], \quad i = 1, 2, \dots, n(t). \quad (5.2)$$

En la Tabla 5.1 se presenta un pseudocódigo de un paso temporal del algoritmo. En los pasos 2-8 se implementan las condiciones de contorno del modelo. Se impone una condición de borde de reflexión en $X(t) + h/2$ en los pasos 2 y 3. En los pasos 4-7 se implementa la condición de contorno de absorción en la base del filopodio $y = 0$. Si $y_i(t + \Delta t)$ calculada por la ecuación (5.1) es negativa, entonces la molécula debe eliminarse del sistema (pasos 4 y 5). Sin embargo, existe la posibilidad de que una molécula toque el límite inferior del filopodio durante el paso de tiempo finito incluso si $y_i(t + \Delta t)$ calculada por (5.1) es positiva; es decir, durante el intervalo de tiempo $[t, t + \Delta t]$, la molécula podría haber cruzado a y_i negativo y luego volver a cruzar a y_i nuevamente positivo [1]. Esta situación es considerada en los pasos 6 y 7. El citoplasma (región inferior a la línea punteada gris en la Figura 5.1 Derecha) se considera una fuente de actina-G con concentración constante \bar{A} . La introducción de moléculas desde el citoplasma se simula en el paso 8. Se introduce una nueva molécula de actina G al sistema con probabilidad

$$\frac{2\bar{A}}{h} \sqrt{\frac{D\Delta t}{\pi}} \quad (5.3)$$

-
- 1: Poner $n(t + \Delta t) = n(t)$. Actualizar las posiciones de todas las moléculas de actina-G $y_i(t + \Delta t)$, $i = 1, 2, \dots, n(t + \Delta t)$ en el tiempo $t + \Delta t$ utilizando 5.1
 - 2: **if** $y_i(t + \Delta t) > X(t) + h/2$, $i = 0, 1, \dots, n(t + \Delta t)$ **then**
 - 3: $y_i(t + \Delta t) = 2X(t) + h - y_i - \sqrt{2D\Delta t}\xi_i$, reflexión en espejo
 - 4: **if** $y_i(t + \Delta t) < 0$ **then**
 - 5: Eliminar la i -ésima molécula
 - 6: **if** $y_i(t + \Delta t) > 0$ **then**
 - 7: Eliminar la i -ésima partícula con probabilidad $e^{-y_i(t)y_i(t+\Delta t)/(D\Delta t)}$
 - 8: Introducir una nueva molécula de actina al sistema con una probabilidad dada por 5.3. Su posición inicial $y_j(t + \Delta t)$ se define con la distribución de probabilidad 5.4. $n(t + \Delta t) = n(t + \Delta t) + 1$ y $j = n(t + \Delta t)$
 - 9: $X(t + \Delta t) = X(t)$. Polimerización: las moléculas de actina que satisfacen $y_i(t + \Delta t) \in [X(t) - h/2, X(t) + h/2]$ se unen al extremo barbado con probabilidad $k^+ \Delta t$. Si la polimerización ocurre, quitar la molécula de la solución ($n(t + \Delta t) = n(t + \Delta t) - 1$) y actualizar $X(t + \Delta t) = X(t + \Delta t) + \delta$
 - 10: La despolimerización ocurre con probabilidad $k^- \Delta t$. Si ocurre $n(t + \Delta t) = n(t + \Delta t) + 1$, introducir una nueva molécula de actina en $y_j(t + \Delta t) = X(t + \Delta t)$, donde $j = 0, 1, \dots, n(t + \Delta t)$ y actualizar $X(t + \Delta t) = X(t + \Delta t) - \delta$
 - 11: Flujo retrógrado: $X(t + \Delta t) = X(t + \Delta t) - v\Delta t$
 - 12: Actualizar $t = t + \Delta t$. Continuar con el paso 1
-

Tabla 5.1: Pseudocódigo de un paso temporal del modelo de la dinámica de actina en un filopodio.

durante cada paso del tiempo. El intervalo temporal Δt se elige lo suficientemente pequeño tal que (5.3) sea significativamente menor que 1 y pueda interpretarse como una probabilidad. Si la molécula se introduce en el dominio, entonces se inicializa en una posición x elegida al azar distribuida de acuerdo con la distribución de probabilidad:

$$\frac{\pi}{4D\Delta t} \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{\sqrt{4D\Delta t}}\right) \quad (5.4)$$

donde $\operatorname{erfc}(z) = 2/\sqrt{\pi} \int_z^\infty e^{-s^2} ds$ es la función de error complementaria. La solución a la 2ª Ley de Fick semi-infinita, es decir con condición de contorno $C(x, t_0) = C_0 = \text{constante}$, es $C(x, t) = C_0 \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right)$, donde $C(x, y)$ es la concentración de moléculas para un tiempo t y posición x y C_0 es la concentración en $x = 0$ para todo t . Normalizando tal que el área sea 1 se obtiene función de densidad de probabilidad dada por (5.4). Sorteando un número aleatorio dado por esta distribución se obtiene la posición en la que se introduce la nueva molécula de actina-G al filopodio. Existen

Parámetros del modelo molecular

Distancia promedio entre el extremo barbado y el borde del filopodio	$h = 25 \text{ nm}$
Constante de difusión de actina-G	$5/16 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$
Tasa de polimerización en el extremo barbado	$k^+ = 21,8 \text{ s}^{-1}$
Tasa de despolimerización en el extremo barbado	$k^- = 1,4 \text{ s}^{-1}$
Tamaño efectivo del monómero de actina	$\delta = 2,7 \text{ nm}$
Velocidad de flujo retrógrado	$v = 70 \text{ nm/s}$
Concentración de actina-G en el citoplasma multiplicado por el volumen	$\bar{A} = 5,3$

Tabla 5.2: Valores de los parámetros del modelo en las simulaciones de la dinámica de actina dentro de un filopodio (obtenidos de Erban *et al.* [6]).

diferentes métodos para sortear números aleatorios con una determinada densidad de probabilidad, acá se utiliza el método de *table lookup* e interpolación [17]⁷.

El movimiento del extremo barbado del filamento de actina-F se rige por la polimerización/despolimerización de actina-G y el flujo retrógrado (pasos 9-11 en el Algoritmo 5.1). Para simular la reacción de polimerización en el paso 9, se consideran todas las moléculas de actina-G en el intervalo $[X(t) - h/2, X(t) + h/2]$. Siendo k^+ la tasa de polimerización de actina-G en el extremo barbado, cada una de estas moléculas puede unirse al extremo de barbado con probabilidad $k^+\Delta t$ (siempre que Δt se elija lo suficientemente pequeño). La despolimerización ocurre con probabilidad $k^-\Delta t$ en el paso 10, siendo k^- la tasa de despolimerización. En ambos casos, se actualizan la longitud del filamento $X(t + \Delta t)$, sumando o restando el tamaño efectivo del monómero, y el número de moléculas de actina-G libres $n(t + \Delta t)$. Los valores de los parámetros que utilizan Erban *et al.* [6] se muestran en la Tabla 5.2.

5.1.2 Resultados

Se realizan simulaciones utilizando los parámetros de la Tabla 5.2. En estas condiciones, las probabilidades $k^+\Delta t = 2,18 \times 10^{-5}$ y $k^- = 1,4 \times 10^{-6}$ son mucho más pequeñas que 1 y los pasos 9 y 10 implementan correctamente los eventos de polimerización y despolimerización. El valor de (5.3) es $6,69 \times 10^{-2}$ y también puede interpretarse como una probabilidad.

En la Figura 5.2 izquierda se muestra la longitud del filamento promedio en función del tiempo. El filamento crece asintóticamente hasta alcanzar el estado estacionario para $t \sim 100 \text{ s}$ (señalado con línea punteada). Luego su longitud oscila entorno

⁷ Este método consiste en introducir una secuencia equiespaciada de la posición de la molécula de actina (x) y otra tabla con los valores de la función de distribución acumulada de las respectivas posiciones, luego se sortea un número aleatorio con distribución uniforme entre 0 y 1 y se interpola para encontrar la posición correspondiente a esa probabilidad. Esta técnica se puede aplicar porque la función de distribución acumulada es monótona creciente.

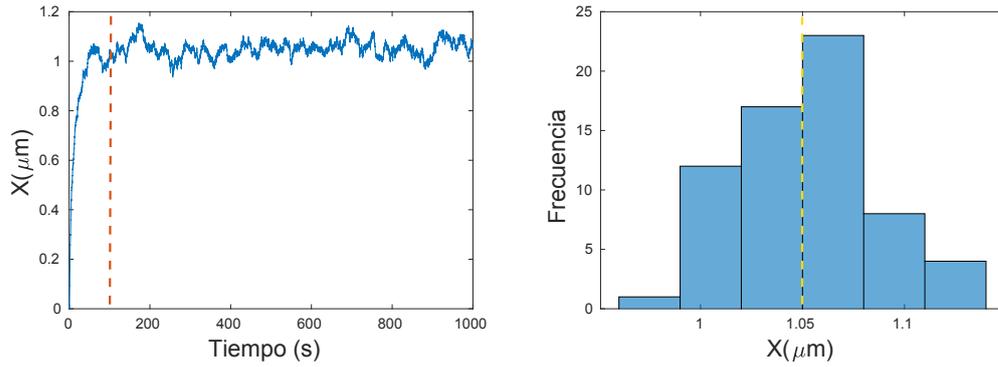


Figura 5.2: Izquierda Longitud (X) en μm en función del tiempo en s para los parámetros de la Tabla 5.2. La línea punteada indica el tiempo a partir del cual se considera que el sistema se encuentra en estado estacionario. Para la elección del ancho de *bin* se utiliza el criterio de Scott [38]. Derecha: Histograma de la longitud (X) en estado estacionario donde la línea punteada amarilla marca el valor medio.

al valor medio: $1,05(3) \mu m$. La fluctuación de los valores de longitud en el estado estacionario puede ser observada al realizarse un histograma como se muestra en el Figura 5.2 derecha. En caso de haberse considerado un mayor tiempo de simulación se espera que el histograma presente una distribución normal, con el valor medio coincidiendo con el valor más probable.

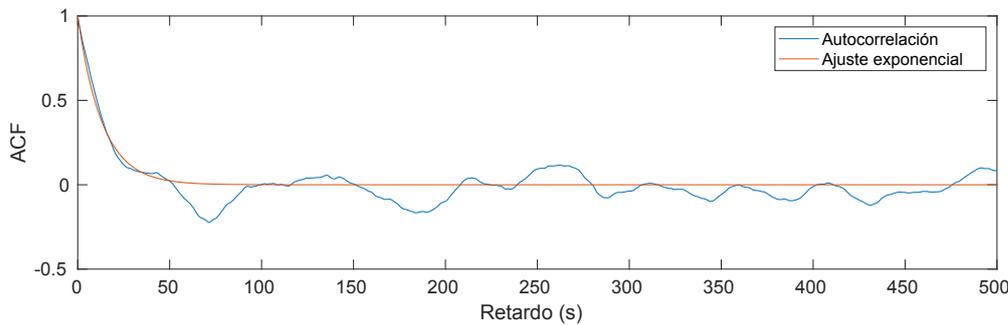


Figura 5.3: Función de autocorrelación de la serie temporal $X(t)$ en azul. El retardo es el desplazamiento temporal considerado. En naranja se muestra un ajuste exponencial ($ACF = e^{-retardo/\tau}$) donde el tiempo característico de correlación (τ) que se obtiene es $\sim 14 s$.

Para saber si los valores de longitud de filamento obtenidos en la simulación están muy correlacionados, se construye una serie temporal con la función de autocorrelación (ACF del inglés *Autocorrelation function*) de la longitud estacionaria ($t > 100 s$). A esta serie temporal se le ajusta una función exponencial decreciente y se encuentra el tiempo característico de correlación τ (Figura 5.3). La función de autocorrelación que se muestra en la Figura 5.3 se obtiene para una realización, si se realiza un promedio para distintas corridas se espera que la función de autocorrelación promedio presente un decaimiento exponencial bien definido con menos fluctuación para valores pequeños de autocorrelación. Para construir el histograma (Figura

5.2 derecha) se muestrea la serie temporal cada 20 s para que los datos puedan considerarse descorrelacionados.

También se realizan simulaciones para distintos valores de los parámetros del modelo: coeficiente de difusión de actina-G, tasa de polimerización y despolimerización en el extremo barbado, y velocidad retrógrada. El valor estacionario de la longitud promedio de los filamentos resulta un balance entre la polimerización y despolimerización de actina-G y el flujo retrógrado.

La evolución temporal de la longitud promedio de los filamentos $X(t)$ se presenta en la Figura 5.4 para distintos valores de los parámetros D (0,1; 0,31 y 0,5 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$), k^- (0; 1,4 y 3 s^{-1}), k^+ (10; 21,8 y 30 s^{-1}) y v (60; 70 y 80 nm/s). La longitud estacionaria del filamento aumenta con el coeficiente de difusión (Figura 5.4a), esto es esperable pues hay mayor disponibilidad de actina-G alrededor del extremo del filamento para ser polimerizada. De igual modo, al incrementar la tasa de polimerización aumenta la longitud estacionaria del filamento debido a que la adición de monómeros de actina-G en el extremo barbado crece (Figura 5.4c). Ambas modificaciones, es decir, el incremento de D y k^+ , dan lugar a que la polimerización tenga mayor peso respecto a las otras dos componentes del modelo desplazando la longitud estacionaria hacia valores mayores. El crecimiento de la longitud estacionaria del filopodio debido al incremento k^+ está limitada por D . Así, si aumenta k^+ indiscriminadamente manteniendo D , se llega a una situación donde no hay moléculas de actina-G libres para ser polimerizadas. Esto se puede ver en la Figura 5.4c donde el incremento de la tasa de polimerización de 10 s^{-1} a 21,8 s^{-1} da lugar al crecimiento de la longitud estacionaria del filamento en más de 0,5 μm ; sin embargo, para $k^+ = 30 \text{ s}^{-1}$ el cambio en la longitud estacionaria es significativamente menor.

Por otro lado, en la Figura 5.4b se observa que la modificación de la tasa de despolimerización tiene un efecto significativamente menor sobre la longitud estacionaria del filamento en comparación con los demás parámetros. Además, el incremento de la velocidad del flujo retrógrado resulta en filopodios más cortos (Figura 5.4d). Observar que el cambio relativo de la velocidad del flujo retrógrado respecto al de la Tabla 5.2 es menor que el que se elige para los demás parámetros, que en general se evalúan en un rango de 3 veces el de referencia. El motivo por el cual se decide presentar las realizaciones para esos valores radica en que cambios pequeños en la velocidad retrógrada dan lugar a cambios grandes en la longitud estacionaria del filamento.

Erban *et al.* [6] reportan un tiempo de cómputo de al menos 12 horas para las simulaciones de series temporales de 10^3 s con los parámetros de la Tabla 5.2 utilizando Matlab en un procesador AMD Athlon 64 X2 dual core processor 5200+.

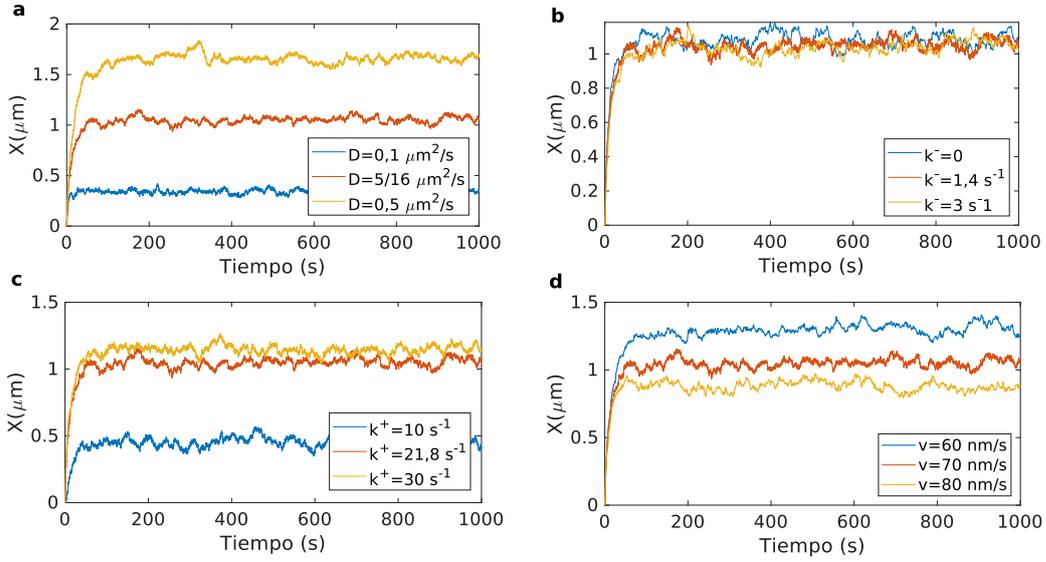


Figura 5.4: Evolución temporal de la longitud del filamento para distintos valores de los parámetros. Se varía: **(a)** el coeficiente de difusión, **(b)** la tasa de despolimerización, **(c)** la tasa de polimerización y **(d)** la velocidad del flujo retrógrado. En todos los casos los parámetros restantes se mantienen iguales a los valores de la Tabla 5.2.

Aquí se utiliza un procesador Intel Core i7-7700HQ 2.80GHz y el algoritmo se implementa en lenguaje C, las simulaciones finalizan en menos de 1 hora para la misma serie temporal, presentando una evidente optimización en el tiempo de cómputo.

5.2 Aproximación de campo medio

Es relativamente directo estimar el valor estacionario de la longitud promedio del filamento L_{est} en una aproximación de campo medio [6]. Sea $c(x)$ la concentración (número de moléculas por unidad de volumen) de actina-G en estado estacionario y teniendo en cuenta la definición de dominio (5.2); la concentración en estado estacionario $c(x)$ se define para $x \in [0, L_{est} + h/2]$. La concentración citoplasmática de actina es constante e igual a $c(0) = \bar{A}/V$, donde \bar{A} se da en la Tabla 5.2, $V = \pi a^2 h/4$ y $a = 150nm$ es el diámetro de filopodio [6]. La concentración en estado estacionario $c(x)$ varía linealmente en la región entre $x = 0$ y la punta del filamento $x = L_{est}$, es decir,

$$c(x) = \frac{\bar{A}}{V} - \beta x, \quad \text{para } x \in [0, L_{est}] \quad (5.5)$$

Tabla 5.2		$D(\mu\text{m}^2\text{s}^{-1})$		$k^+(\text{s}^{-1})$		$k^-(\text{s}^{-1})$		$v(\text{nm}/\text{s})$	
		0,1	0,5	10	30	0	3	60	80
$L_{est}^{sim}(\mu\text{m})$	1,05(3)	0,36(8)	1,6(1)	0,47(8)	1,14(4)	1,08(4)	1,04(4)	1,29(6)	0,88(4)
$L_{est}^{CM}(\mu\text{m})$	0,98	0,31	1,56	0,62	1,06	0,99	0,96	1,19	0,82

Tabla 5.3: Longitud del filamento promedio en estado estacionario que se obtiene a partir de las simulaciones (L_{est}^{sim}) y de la aproximación de campo medio (L_{est}^{CM}) mediante la ecuación (5.10) para distintos valores de los parámetros D , k^+ , k^- y v . En todos los casos los parámetros no mencionados toman los valores de referencia que se muestran en la Tabla 5.2.

donde β es una constante positiva. En el estado estacionario, la velocidad de la extensión del filamento (debido a la polimerización) se equilibra mediante la despolimerización y el flujo retrógrado, en consecuencia,

$$k^+ + V\delta = k^-\delta + v. \quad (5.6)$$

El flujo difusivo de la actina G en la punta del filamento también se equilibra con la diferencia entre las tasas de polimerización y despolimerización. Es decir,

$$-D \frac{\partial c}{\partial x}(L_{est}) = \frac{c(L_{est})k^+\delta - k^-}{V/h}. \quad (5.7)$$

Usando (5.5) en el lado izquierdo y (5.6) en el lado derecho de (5.7) se obtiene

$$\beta = \frac{vh}{DV\delta}. \quad (5.8)$$

Sustituyendo β en (5.5) y evaluando la función resultante en $x = L_{est}$, se obtiene

$$c(L_{est}) = \frac{\bar{A}}{V} - \frac{vh}{DV\delta}L_{est}. \quad (5.9)$$

Sustituyendo $c(L_{est})$ en (5.6) y resolviendo para L_{est} , se obtiene la aproximación de campo medio de la longitud del filamento estacionario

$$L_{est} = \frac{D\delta}{vh} \left(\bar{A} - \frac{k^-}{k^+} \right) - \frac{D}{hk^+}. \quad (5.10)$$

Para los valores de los parámetros de la Tabla 5.2 se tiene $L_{est} = 0,98 \mu\text{m}$. La longitud del filopodio en estado estacionario es $L_{est}^{filo} = L_{est} + h/2$ que en este caso resulta $1,00 \mu\text{m}$. En la Tabla 5.3 se muestran valores de L_{est} para diferentes valores de los parámetros D y k^+ .

Para distintos valores de los parámetros se compara la longitud estacionaria que se estima mediante (5.10) en la aproximación de campo medio con respecto a la que se obtiene de las simulaciones a partir del valor medio de las series temporales (Tabla

5.3). Se puede observar que (5.10) es una buena aproximación de la dependencia de L_{est} con los parámetros. La mayor discrepancia se observa para el caso de $k^+ = 10 \text{ s}^{-1}$ donde la aproximación de campo medio estima una longitud $\sim 0,62 \mu\text{m}$ y la simulación $\sim 0,47(8) \mu\text{m}$. Sin embargo, (5.10) capta la dependencia de L_{est} con los parámetros del modelo en el sentido que el aumento de D y k^+ resulta en longitudes del filamento estacionarias mayores, del mismo modo que el incremento de v da lugar a filopodios más cortos y que el efecto de la variación de k^- es significativamente menor que el de los demás parámetros.

Comunicación de filopodios

En este capítulo se propone una primera versión de un modelo de comunicación para filopodios. Se utiliza el modelo de crecimiento de un filopodio desarrollado en el capítulo anterior al cual se le agrega un mecanismo sencillo de comunicación con el ambiente. Este mecanismo consiste en modificar el parámetro v (velocidad retrógrada) del modelo de crecimiento y alterar la dirección de crecimiento del filopodio cuando se advierte la presencia de una fuente quimiotáctica. Al detectar el quimiotáctico atractivo el filopodio disminuye v , aumentando así su longitud y se reorienta hacia la dirección del gradiente.

6.1 Modelo de comunicación

En la Sección 3 vimos en las micrografías de células de cáncer de próstata que la longitud de los filopodios aumenta cuando hay células cercanas, produciéndose contactos entre filopodios de células vecinas. Mencionamos que esto puede explicarse considerando la existencia de mecanismos de comunicación y regulación intercelular. Gallo *et al.* revisan algunos trabajos en los que se analiza cómo la comunicación puede afectar a los filopodios en células neuronales [8]. En base a estudios experimentales proponen que en presencia de gradientes quimiotácticos la longitud de los filopodios aumenta por inhibición de los mecanismos de retracción de los filopodios: el flujo retrógrado de la actina-F y la tasa de despolimerización de actina-G. Cuando los filopodios detectan sustancias quimiotácticas atractivas estos se orientan y crecen hacia las regiones donde la concentración del quimiotáctico es mayor. En presencia de este mecanismo de direccionamiento se observa una mayor densidad de filopodios en la dirección del gradiente [48]. Actualmente este proceso no se conoce bien, sin embargo, es probable que intervenga la gelsolina, una proteína de corte de actina-F [25].

En esta sección se aborda un modelo de crecimiento de un filopodio en presencia de una fuente quimiotáctica, esta fuente que genera el gradiente quimiotáctico atractivo podría ser un filopodio de una célula cercana. Se trabaja sobre el modelo estocástico de crecimiento de un filopodio de la Sección 5, es decir, que en ausencia de una fuente el comportamiento del filopodio se mantiene igual al modelo de crecimiento analizado anteriormente. Para implementar un mecanismo de bloqueo

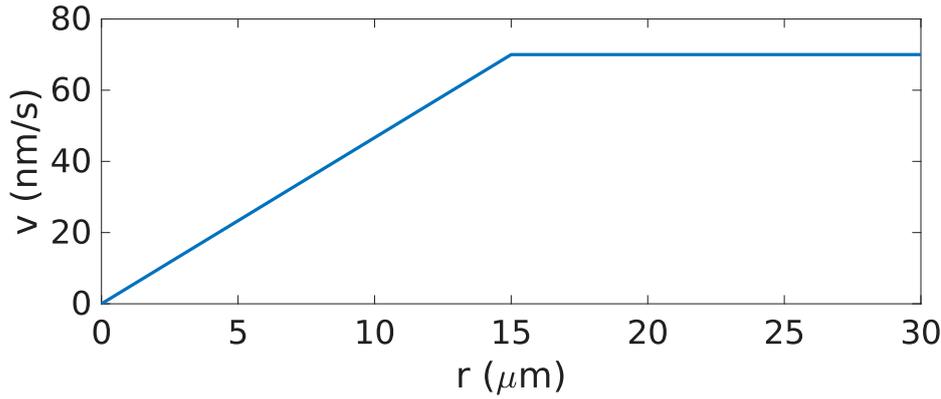


Figura 6.1: Velocidad retrógrada (v) en función de la distancia entre la punta del filopodio y la fuente (r). Para distancias menores a $15 \mu\text{m}$ la velocidad depende linealmente con r , para distancias mayores se mantiene la velocidad en el valor de la Tabla 5.2 ($v = 70 \text{ nm/s}$).

de la retracción de los filopodios y teniendo en cuenta que en el modelo estocástico de crecimiento la tasa de despolimerización k^- produce un efecto mínimo sobre la longitud del filopodio, se decide implementar la disminución de la velocidad retrógrada v . Debido al desconocimiento de la naturaleza de los agentes quimiotácticos no es posible caracterizar el gradiente de concentración en el espacio y tiempo minuciosamente, si se conociese la constante de difusión podría utilizarse una gaussiana, pero éste no es el caso. Por consiguiente, se propone una relación sencilla: una dependencia lineal entre la concentración y la distancia entre la punta del filopodio y la fuente (r). Se supone que la velocidad retrógrada es afectada por una fuente a una distancia r en forma proporcional a la concentración del agente quimiotáctico:

$$v(r) = \frac{v_{ini}}{r_{máx}} r, \quad r \leq r_{máx}, \quad (6.1)$$

$$v(r) = v_{ini}, \quad r > r_{máx},$$

donde v_{ini} es la velocidad retrógrada en ausencia de quimiotácticos, 70 nm/s (Tabla 5.2) y $r_{máx}$ es la distancia máxima para la cual hay comunicación entre el filopodio y la fuente. Una fuente cuya distancia al extremo del filopodio sea mayor a $r_{máx}$ no afectará la dinámica del crecimiento de la protuberancia. Se puede estimar $r_{máx}$ a partir del análisis de imágenes (Sección 3) como la máxima longitud de un filopodio en contacto, utilizamos $r_{máx} = 15 \mu\text{m}$. De este modo, la velocidad retrógrada de la protuberancia filopodial depende linealmente con la distancia entre su extremo y la fuente; si esta distancia es mayor a $r_{máx}$ el filopodio no se ve afectado por la presencia de la fuente y su velocidad retrógrada es la de un filopodio aislado (Figura 6.1). Cuanto más cerca se encuentra la fuente respecto a la punta filopodial

será mayor el efecto sobre la velocidad retrógrada (o sea, menor la inhibición en el crecimiento debido a v).

Anteriormente, se consideraban filopodios que crecían perpendiculares a la membrana. Ahora, en presencia de una fuente quimiotáctica, se direcciona el filopodio hacia la fuente donde la concentración es mayor. La elección del desplazamiento angular $\Delta\theta$ que se realiza en cada paso de tiempo Δt es arbitraria pues no se encuentran reportes de éste en la bibliografía. Sólo se tiene en cuenta que el movimiento angular sea gradual para el intervalo de tiempo elegido Δt .

6.1.1 Resultados

Introduciendo una fuente quimiotáctica en una posición arbitraria (en este caso en $x = y = 2\mu m$ para un filopodio que empieza a crecer en $x = y = 0$) se realiza una simulación del modelo de comunicación manteniendo los parámetros en los valores de referencia (Tabla 5.2) (a excepción v y θ que se ven afectados por la presencia del gradiente quimiotáctico). Se utiliza un paso temporal $\Delta t = 10^{-6}$ s igual que en el modelo de crecimiento de un filopodio aislado. La fuente se introduce en $t = 250$ s, por lo que hasta ese instante el filopodio crece del mismo modo que en la Sección 5. A partir de $t = 250$ s comienza el mecanismo de comunicación, disminuyendo la velocidad retrógrada según la ecuación 6.1 y cambiando la dirección del filopodio ($\Delta\theta = 5 \times 10^{-8}$ en radianes en cada paso de tiempo en dirección a la fuente).

En la Figura 6.2 se muestran 8 instantáneas del filopodio para distintos tiempos. En el instante inicial no hay ninguna protrusión en el borde lamelipodial (Figura 6.2a). Al avanzar el tiempo comienza a crecer el filopodio aislado, hasta que llega al estado estacionario (Figuras 6.2b y c). Como vimos en la Sección 5 cuando el filopodio alcanza el estado estacionario su longitud oscila entorno a $\sim 1\mu m$ (Figura 6.3), esto sucede mientras no haya ninguna fuente ($t < 250$ s). Cuando se introduce la fuente el filopodio se inclina hacia la fuente y comienza a aumentar su longitud (Figuras 6.2d, e y f). La longitud de la protuberancia se incrementa hasta que toma contacto con la fuente (Figura 6.2g). Una vez que la punta del filopodio y la fuente están en contacto el filopodio mantiene su longitud (Figura 6.2h). En la Figura 6.3 se puede observar cómo evoluciona la longitud del filamento con el tiempo para la situación descrita en la Figura 6.2. Para $t \leq 250$ s la dinámica de crecimiento es la de un filopodio aislado, éste crece hasta alcanzar el estado estacionario en el cual la longitud oscila al rededor de un valor promedio $\sim 1\mu m$. Al introducirse la fuente ($t = 250$ s) la longitud del filamento vuelve a aumentar hasta que éste entra en contacto con la fuente, lo que ocurre para $t \sim 300$ s. A partir de este instante de tiempo el filopodio mantiene constante el valor de su longitud.

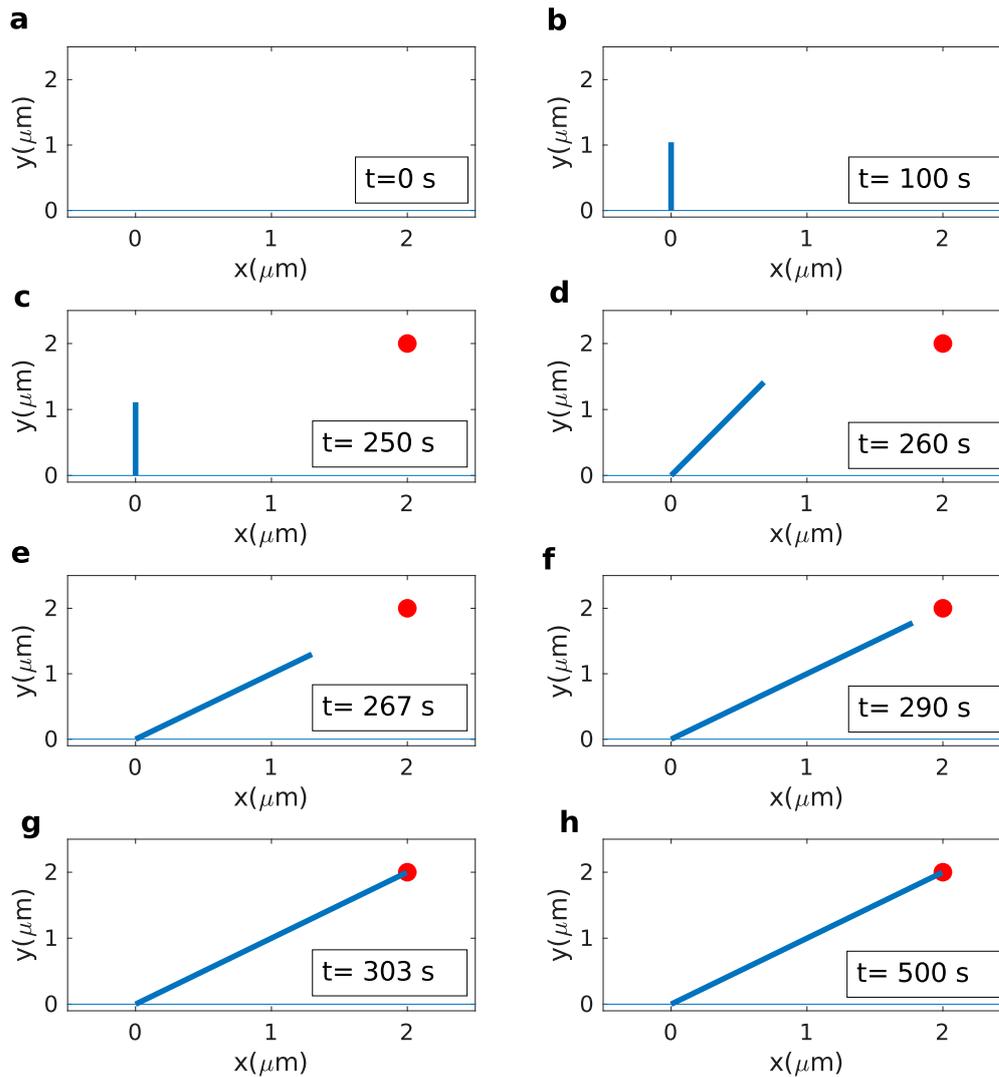


Figura 6.2: Representación del crecimiento del filopodio en presencia de una fuente emisora de quimiotácticos para distintos tiempos. La línea azul representa el filopodio, la línea horizontal delgada azul es la membrana plásmatica y el punto rojo simboliza la fuente quimiotáctica. Las coordenadas espaciales en los ejes x y y están en μm .

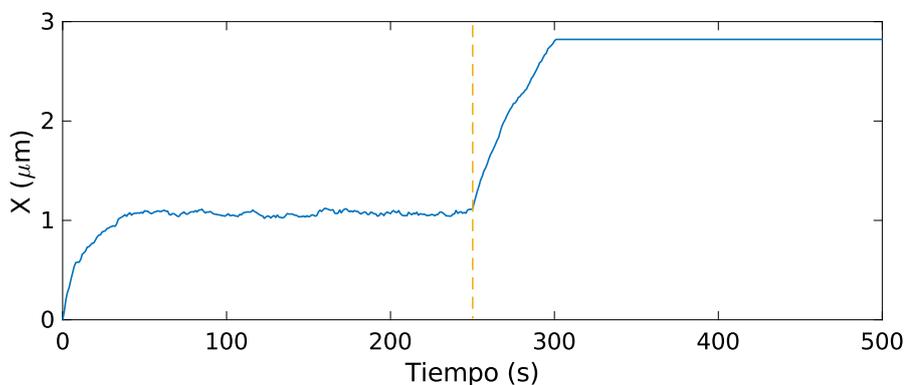


Figura 6.3: Evolución temporal de la longitud del filamento. La línea punteada naranja señala el tiempo en el cual se introduce la fuente quimiotáctica (250 s).

Los resultados mostrados en el presente capítulo constituyen un primer ensayo para mostrar de qué forma se puede incluir la comunicación (ya sea con el entorno o con otros filopodios) en el modelo de crecimiento de filopodios.

Conclusiones

Se analizaron imágenes de microscopía confocal de células de cáncer de próstata PC3. Así, se caracterizó estadísticamente mediante el valor medio y la función de densidad de probabilidad, la longitud de los filopodios y la distancia de separación entre ellos. También se estudiaron los contactos intercelulares obteniéndose la distribución y el valor medio de sus longitudes. Se encontró que los filopodios involucrados en contactos celulares presentan longitudes significativamente mayores que aquellos que se encuentran aislados. Este resultado sugiere la existencia de comunicación entre células.

Se presentó un modelo determinístico para la iniciación de filopodios que predice una relación entre los parámetros del modelo en estado estacionario. Se implementó un modelo estocástico de iniciación de filopodios sobre el borde lamelipodial y se verificaron las predicciones realizadas por el modelo determinístico a pesar de la falta de estacionariedad de los resultados en las escalas temporales estudiadas. Ambos modelos fueron propuestos por Mogilner y Rubinstein [30]. Además, a partir del modelo estocástico se obtuvo la distribución de la distancia de separación entre filopodios adyacentes y se estudió el efecto de variar los distintos parámetros del modelo. El histograma de distancias determinado con el modelo fue contrastado con la distribución obtenida experimentalmente y se encontró que ambas presentan una forma similar aunque el histograma experimental posee una cola de distribución más larga que el teórico.

Se implementó un modelo estocástico de crecimiento de un filopodio y se presentó un cálculo de campo medio para la longitud estacionaria del filamento, ambos propuestos por Erban *et al.* [6]. También se analizó la influencia de la modificación de los parámetros del modelo en la longitud estacionaria del filamento. Se compararon los resultados entre el cálculo aproximado y las simulaciones para los distintos parámetros estudiados, encontrándose que ambos modelos presentan la misma dependencia de los parámetros en la longitud del filamento.

Finalmente se presentó un modelo que incluye la comunicación con el entorno para un filopodio en crecimiento. En base a la bibliografía y teniendo en cuenta el efecto de los parámetros del modelo de crecimiento de un filopodio aislado se propuso un mecanismo de regulación de su longitud en presencia de un gradiente quimiotáctico

atractivo. El modelo reproduce el aumento de la longitud del filopodio al introducir una fuente emisora de quimiotácticos.

Para el futuro se propone la unificación del modelo de iniciación con el modelo de crecimiento estocástico la cual no se realizó por falta de tiempo. Para ello, sería óptimo desarrollar modelos discretos en el espacio para disminuir el tiempo de cómputo y sería necesario realizar nuevas consideraciones respecto a la combinación de los filopodios. Por ejemplo: debería estipularse si los filopodios inclinados se combinan en la base o en la punta. Además, se podría añadir la comunicación celular y considerar las fuentes quimiotácticas como puntas de filopodios de células cercanas. De esta forma, se podrían simular secciones de membranas con filopodios enfrentados o células completas interactuando. Aquí también surgirían nuevos interrogantes, por ejemplo: ¿se comunican los filopodios de una misma célula? Cabe destacar que esto requeriría tiempos de cómputo sustancialmente mayores respecto a los que han tomado las simulaciones realizadas en este trabajo.

Bibliografía

- [1] Steven S Andrews y Dennis Bray. “Stochastic simulation of chemical reactions with spatial resolution and single molecule detail”. En: *Physical biology* 1.3 (2004), pág. 137.
- [2] Melanie Barzik, Tatyana I Kotova, Henry N Higgs, Larnele Hazelwood, Dorit Hanein, Frank B Gertler y Dorothy A Schafer. “Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins”. En: *Journal of Biological Chemistry* (2005).
- [3] James E Bear, Tatyana M Svitkina, Matthias Krause, Dorothy A Schafer, Joseph J Loureiro, Geraldine A Strasser, Ivan V Maly, Oleg Y Chaga, John A Cooper, Gary G Borisy y col. “Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility”. En: *Cell* 109.4 (2002), págs. 509-521.
- [4] Dennis Breitsprecher, Antje K Kiesewetter, Joern Linkner, Marlene Vinzenz, Theresia EB Stradal, John Victor Small, Ute Curth, Richard B Dickinson y Jan Faix. “Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation”. En: *The EMBO Journal* 30.3 (2011), págs. 456-467.
- [5] Helena Curtis. *Biología*. 574/577 CUR. Editorial Médica Panamericana, 2008.
- [6] Radek Erban, Mark B Flegg y Garegin A Papoian. “Multiscale stochastic reaction-diffusion modeling: application to actin dynamics in filopodia”. En: *Bulletin of mathematical biology* 76.4 (2014), págs. 799-818.
- [7] Juan Carlos Fierro-González, Melanie D White, Juan Carlos Silva y Nicolas Plachta. “Cadherin-dependent filopodia control preimplantation embryo compaction”. En: *Nature cell biology* 15.12 (2013), pág. 1424.
- [8] Gianluca Gallo y Paul C Letourneau. “Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues”. En: *Journal of neurobiology* 58.1 (2004), págs. 92-102.
- [9] Geraldine Gueron, Adriana De Siervi, Mercedes Ferrando, Marcelo Salierno, Paola De Luca, Belen Elguero, Roberto Meiss, Nora Navone y Elba S Vazquez. “Critical role of endogenous heme oxygenase 1 as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells”. En: *Molecular cancer research* (2009), págs. 1541-7786.
- [10] Geraldine Gueron, Jimena Giudice, Pia Valacco, Alejandra Paez, Belen Elguero, Martin Toscani, Felipe Jaworski, Federico Coluccio Leskow, Javier Cotignola, Marcelo Marti y col. “Heme-oxygenase-1 implications in cell morphology and the adhesive behavior of prostate cancer cells”. En: *Oncotarget* 5.12 (2014), pág. 4087.
- [11] Stephanie L Gupton y Frank B Gertler. “Filopodia: the fingers that do the walking”. En: *Sci. STKE* 2007.400 (2007), re5-re5.

- [12]Asma N Husainy, Anne A Morrow, Theodore J Perkins y Jonathan M Lee. “Robust patterns in the stochastic organization of filopodia”. En: *BMC cell biology* 11.1 (2010), pág. 86.
- [13]Guillaume Jacquemet, Hellyeh Hamidi y Johanna Ivaska. “Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion”. En: *Current opinion in cell biology* 36 (2015), págs. 23-31.
- [14]Guillaume Jacquemet, David M Green, Rebecca E Bridgewater, Alexander von Kriegsheim, Martin J Humphries, Jim C Norman y Patrick T Caswell. “RCP-driven $\alpha 5\beta 1$ recycling suppresses Rac and promotes RhoA activity via the RacGAP1–IQGAP1 complex”. En: *J Cell Biol* 202.6 (2013), págs. 917-935.
- [15]Brigitte M. Jockusch. *The actin cytoskeleton*. Springer, 2017.
- [16]ME Kaighn, K Shankar Narayan, Y Ohnuki, JF Lechner y LW Jones. “Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3).” En: *Investigative urology* 17.1 (1979), págs. 16-23.
- [17]Rex A Kerr, Thomas M Bartol, Boris Kaminsky, Markus Dittrich, Jen-Chien Jack Chang, Scott B Baden, Terrence J Sejnowski y Joel R Stiles. “Fast Monte Carlo simulation methods for biological reaction-diffusion systems in solution and on surfaces”. En: *SIAM journal on scientific computing* 30.6 (2008), págs. 3126-3149.
- [18]Farida Korobova y Tatyana Svitkina. “Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells”. En: *Molecular biology of the cell* 19.4 (2008), págs. 1561-1574.
- [19]David R Kovar, Jeffrey R Kuhn, Andrea L Tichy y Thomas D Pollard. “The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin”. En: *The Journal of cell biology* 161.5 (2003), págs. 875-887.
- [20]Holger Kress, Ernst HK Stelzer, Daniela Holzer, Folma Buss, Gareth Griffiths y Alexander Rohrbach. “Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity”. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.28 (2007), págs. 11633-11638.
- [21]Yueheng Lan y Garegin A Papoian. “The stochastic dynamics of filopodial growth”. En: *Biophysical journal* 94.10 (2008), págs. 3839-3852.
- [22]Cecile Lebrand, Erik W Dent, Geraldine A Strasser, Lorene M Lanier, Matthias Krause, Tatyana M Svitkina, Gary G Borisy y Frank B Gertler. “Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1”. En: *Neuron* 42.1 (2004), págs. 37-49.
- [23]Ang Li, John C Dawson, Manuel Forero-Vargas, Heather J Spence, Xinzi Yu, Ireen König, Kurt Anderson y Laura M Machesky. “The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion”. En: *Current biology* 20.4 (2010), págs. 339-345.
- [24]Harvey Lodish, Arnold Berk, James E Darnell, Chris A Kaiser, Monty Krieger, Matthew P Scott, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Paul Matsudaira y col. *Molecular cell biology*. Macmillan, 2008.
- [25]Mei Lu, Walter Witke, David J Kwiatkowski y Kenneth S Kosik. “Delayed retraction of filopodia in gelsolin null mice”. En: *The Journal of cell biology* 138.6 (1997), págs. 1279-1287.

- [26] Laura M Machesky y Ang Li. "Fascin: Invasive filopodia promoting metastasis". En: *Communicative & integrative biology* 3.3 (2010), págs. 263-270.
- [27] Pieta K Mattila y Pekka Lappalainen. "Filopodia: molecular architecture and cellular functions". En: *Nature reviews Molecular cell biology* 9.6 (2008), pág. 446.
- [28] Ohad Medalia, Martin Beck, Mary Ecke, Igor Weber, Ralph Neujahr, Wolfgang Baumeister y Günther Gerisch. "Organization of actin networks in intact filopodia". En: *Current biology* 17.1 (2007), págs. 79-84.
- [29] Marisan R Mejillano, Shin-ichiro Kojima, Derek Anthony Applewhite, Frank B Gertler, Tatyana M Svitkina y Gary G Borisy. "Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end". En: *Cell* 118.3 (2004), págs. 363-373.
- [30] Alexander Mogilner y Boris Rubinstein. "The physics of filopodial protrusion". En: *Biophysical journal* 89.2 (2005), págs. 782-795.
- [31] R Oldenbourg, K Katoh y G Danuser. "Mechanism of lateral movement of filopodia and radial actin bundles across neuronal growth cones". En: *Biophysical Journal* 78.3 (2000), págs. 1176-1182.
- [32] Jessica L Ouderkerk y Mira Krendel. "Non-muscle myosins in tumor progression, cancer cell invasion, and metastasis". En: *Cytoskeleton* 71.8 (2014), págs. 447-463.
- [33] Alejandra V Paez, Carla Pallavicini, Federico Schuster, Maria Pia Valacco, Jimena Giudice, Emiliano G Ortiz, Nicolás Anselmino, Estefania Labanca, Maria Binaghi, Marcelo Salierno y col. "Heme oxygenase-1 in the forefront of a multi-molecular network that governs cell-cell contacts and filopodia-induced zippering in prostate cancer". En: *Cell death & disease* 7.12 (2016), e2570.
- [34] Carla Pallavacini. "Mecánica y dinámica del citoesqueleto en células vivas". Tesis doct. Departamento de Física - Universidad de Buenos Aires, 2017. Directora Dra. Luciana Bruno, Codirectora Dra. Valeria Levi.
- [35] Stéphanie Pellegrin y Harry Mellor. "The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2". En: *Current Biology* 15.2 (2005), págs. 129-133.
- [36] Stéphane Romero, Christophe Le Clainche, Dominique Didry, Coumaran Egile, Dominique Pantaloni y Marie-France Carlier. "Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis". En: *Cell* 119.3 (2004), págs. 419-429.
- [37] Antje Schirenbeck, Till Bretschneider, Rajesh Arasada, Michael Schleicher y Jan Faix. "The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia". En: *Nature cell biology* 7.6 (2005), pág. 619.
- [38] David W Scott. "On optimal and data-based histograms". En: *Biometrika* 66.3 (1979), págs. 605-610.
- [39] Tsukasa Shibue, Mary W Brooks y Robert A Weinberg. "An integrin-linked machinery of cytoskeletal regulation that enables experimental tumor initiation and metastatic colonization". En: *Cancer cell* 24.4 (2013), págs. 481-498.
- [40] Justin Skoble, Victoria Auerbuch, Erin D Goley, Matthew D Welch y Daniel A Portnoy. "Pivotal role of VASP in Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, actin branch-formation, and *Listeria monocytogenes* motility". En: *J Cell Biol* 155.1 (2001), págs. 89-100.

- [41]Anika Steffen, Jan Faix, Guenter P Resch, Joern Linkner, Juergen Wehland, J Victor Small, Klemens Rottner y Theresia EB Stradal. "Filopodia formation in the absence of functional WAVE-and Arp2/3-complexes". En: *Molecular biology of the cell* 17.6 (2006), págs. 2581-2591.
- [42]Tatyana M Svitkina, Elena A Bulanova, Oleg Y Chaga, Danijela M Vignjevic, Shin-ichiro Kojima, Jury M Vasiliev y Gary G Borisy. "Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network". En: *J Cell Biol* 160.3 (2003), págs. 409-421.
- [43]Richard I Tuxworth, Igor Weber, Deborah Wessels, Gregory C Addicks, David R Soll, Günther Gerisch y Margaret A Titus. "A role for myosin VII in dynamic cell adhesion". En: *Current Biology* 11.5 (2001), págs. 318-329.
- [44]Valeri Vasioukhin, Christoph Bauer, Mei Yin y Elaine Fuchs. "Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion". En: *Cell* 100.2 (2000), págs. 209-219.
- [45]Danijela Vignjevic, Marie Schoumacher, Nancy Gavert, Klaus-Peter Janssen, Gloria Jih, Marick Laé, Daniel Louvard, Avri Ben-Ze'ev y Sylvie Robine. "Fascin, a novel target of β -catenin-TCF signaling, is expressed at the invasive front of human colon cancer". En: *Cancer research* 67.14 (2007), págs. 6844-6853.
- [46]Danijela Vignjevic, Shin-ichiro Kojima, Yvonne Aratyn, Oana Danciu, Tatyana Svitkina y Gary G Borisy. "Role of fascin in filopodial protrusion". En: *J Cell Biol* 174.6 (2006), págs. 863-875.
- [47]Matthew D Welch y R Dyché Mullins. "Cellular control of actin nucleation". En: *Annual review of cell and developmental biology* 18.1 (2002), págs. 247-288.
- [48]James Q Zheng, JJ Wan y MM Poo. "Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient". En: *Journal of Neuroscience* 16.3 (1996), págs. 1140-1149.

Declaración

Declaro que la tesina de grado ha sido completamente desarrollada por mi persona, Daniela Senra, bajo la dirección y ayuda de las Dras. Nara Guisoni y Luciana Bruno.

El trabajo de diploma se llevó al cabo en el marco de una “Beca Estímulo a las Vocaciones Científicas” del Consejo Interuniversitario Nacional (CIN).

Las imágenes de microscopía confocal han sido facilitadas por la Dra. Geraldine Gueron (Laboratorio de Inflamación y Cáncer – IQIBICEN – UBA).

Los códigos de las simulaciones fueron escritos en lenguaje C, y los códigos para análisis de datos, imágenes y gráficos en *Matlab*. A excepción de los códigos de análisis de la densidad de filopodios que han sido cedidos por la Dra. Carla Pallavecini y adaptados para los fines de este trabajo, la totalidad de los códigos han sido desarrollados por mi persona.

La Plata, Argentina, Marzo 2019

Daniela Senra