

Estudio de la influencia de la rigidez del sustrato en la evolución del glioblastoma en dispositivos microfluídicos

Marina Pérez-Aliacar¹, Lucía Palos Luzón¹, Clara Bayona Royo¹, Jacobo Ayensa-Jiménez¹, Ignacio Ochoa¹ y Manuel Doblare¹

¹ Tissue Microenvironment Lab (TMELab)
Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A)
Universidad de Zaragoza, Mariano Esquillor s/n, 50018, Zaragoza, Spain.
Tel. +34-976762707, e-mail: marina.perez@unizar.es

Resumen

La combinación de modelos matemáticos y dispositivos microfluídicos permite recrear procesos biológicos complejos como la evolución del glioblastoma (GBM). En este trabajo, se utiliza un enfoque multidisciplinar para evaluar las diferencias en el comportamiento tumoral en distintos sustratos, con el objetivo de estudiar su influencia en la progresión del tumor.

Introducción

El glioblastoma (GBM) es el tumor cerebral primario más común y letal, con una media de supervivencia de aproximadamente 15 meses, incluso en pacientes que han recibido tratamiento [1]. Se caracteriza por una rápida proliferación y una invasión agresiva, lo que lo hace difícil de erradicar, especialmente debido a la difusión e infiltración de células individuales. Recientemente, se ha observado que la componente mecánica del microentorno tumoral (TME) afecta considerablemente a la progresión del tumor [2].

El TME es un sistema dinámico complejo formado por células tumorales, otras células como las del sistema inmune, sustancias químicas como el oxígeno, y también por la matriz extracelular (ECM). Así, en el TME se combinan señales químicas, bioquímicas y mecánicas que fomentan el crecimiento y la invasión del GBM. Un parámetro mecánico de importancia es la rigidez de la matriz, la cual se incrementa durante el crecimiento del tumor, pudiendo aumentar desde 0,1 o 1 kPa (valores de un tejido cerebral sano) a 26 kPa [2].

Es de especial interés la interacción bidireccional entre las células de GBM y la ECM. Las células segregan metaloproteinasas (MMPs), las cuales son capaces de descomponer las proteínas que forman la matriz, reduciendo así su rigidez. Otros componentes del TME segregan colágeno, que incrementa la rigidez de la matriz. Se ha observado a su vez que la

variación de esta rigidez es percibida por las células y afecta a su comportamiento. Además, las células migran hacia las zonas de mayor rigidez, un fenómeno conocido como durotaxis [3].

En los últimos años, el estudio de este complejo sistema dinámico se ha facilitado gracias a nuevas técnicas de cultivo como la microfluídica, que permite recrear tridimensionalmente el TME y su evolución además de poder reproducir *in vitro* entornos con diferentes propiedades mecánicas. No obstante, la experimentación *in vitro* sigue presentando ciertas limitaciones por lo que cada vez más se combina con modelos matemáticos que permitan probar hipótesis y aislar fenómenos de una forma rápida y sencilla [4].

En este trabajo, se combinan resultados experimentales en dispositivos microfluídicos y modelos *in silico* para estudiar la influencia de la rigidez del sustrato en la evolución del GBM.

Metodología

Se cultivaron células de GBM de la línea comercial U251-MG durante 5 días en dispositivos microfluídicos (BEOnChip Ltd.), consistentes en una cámara central, en la que las células están embebidas en un hidrogel de colágeno que simula la ECM, y dos canales laterales, por los que se perfunde medio oxigenado. Así, en la cámara central se generan gradientes de oxígeno que conducen a la formación de núcleos necróticos, estructura característica del GBM. Se han utilizado dos hidrogeles distintos, con concentraciones de colágeno de 2 y 4 mg/mL respectivamente.

El modelo matemático considerado parte de un modelo existente [5], que se amplía para incluir las dependencias mecánicas de los distintos fenómenos, y el fenómeno de la durotaxis. Las ecuaciones de gobierno del modelo son:

$$\frac{\partial C_n}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(P \frac{\partial C_n}{\partial x} - K C_n \frac{\partial O_2}{\partial x} - M C_n \frac{\partial E}{\partial t} \right) + (f - d) C_n,$$

$$\frac{\partial C_d}{\partial t} = d C_n,$$

$$\frac{\partial O_2}{\partial t} = D \frac{\partial^2 O_2}{\partial x^2} - A C_n,$$

donde, en general, los distintos parámetros pueden depender de E , que respresenta la rigidez de la ECM.

Para obtener esta dependencia, se ajustan los parámetros a los resultados experimentales para ambas concentraciones de colágeno mediante optimización matemática. En este proceso, se desprecian las dependencias mecánicas, ya que inicialmente la rigidez es constante en el hidrogel y la duración de los experimentos es suficientemente corta como para ignorar la remodelación mecánica. Se disponía de 7 experimentos con concentración de 2 mg/mL y 6 experimentos con 4 mg/mL.

Los parámetros se han agrupado en dos grupos según la rigidez y se ha realizado el test U de Mann-Whitney para cada parámetro, para evaluar si hay diferencias entre los valores obtenidos para las dos concentraciones de colágeno.

Resultados

Se obtiene significación estadística para los parámetros relacionados con la migración celular (p -valor = 0.0012). Esto supone que ambos parámetros dependen de la rigidez. Por tanto, podemos concluir que la rigidez afecta a la migración de las células de GBM y, en particular, que estas migran más en el hidrogel más rígido (4 mg/mL).

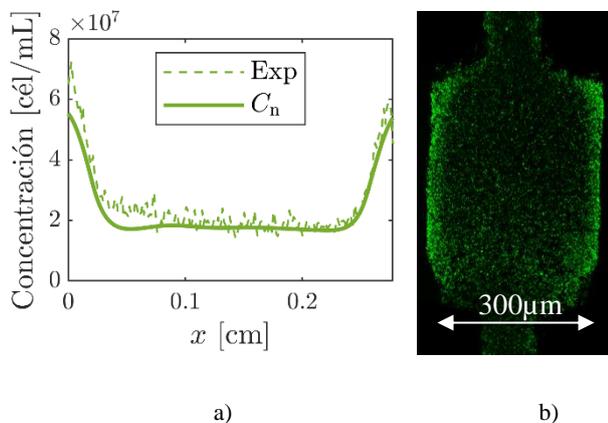


Figura 1. Concentración de colágeno de 2 mg/ml. a) Ajuste de datos experimentales. b) Células vivas en el dispositivo.

Conclusiones

La combinación de modelos *in vitro* e *in silico* tiene gran valor para el estudio de procesos biológicos complejos, como la evolución tumoral, en la que intervienen multitud de estímulos, como los producidos por la ECM. Los resultados obtenidos podrían permitir eventualmente definir relaciones funcionales entre la rigidez del microentorno tumoral y el comportamiento del tumor, que permitan predecir la evolución a largo plazo teniendo en cuenta la interacción entre células y sustrato.

REFERENCIAS

- [1]. ULRICH, Theresa A.; DE JUAN PARDO, Elena M.; KUMAR, Sanjay. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer research*, 2009, vol. 69, no 10, p. 4167-4174.
- [2]. WANG, Christine; TONG, Xinming; YANG, Fan. Bioengineered 3D brain tumor model to elucidate the effects of matrix stiffness on glioblastoma cell behavior using PEG-based hydrogels. *Molecular pharmaceutics*, 2014, vol. 11, no 7, p. 2115-2125.
- [3]. LO, Chun-Min, et al. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical journal*, 2000, vol. 79, no 1, p. 144-152.
- [4]. KALININ, Vladimir. Cell-extracellular matrix interaction in glioma growth. In silico model. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 2020, vol. 17, no 4.
- [5]. AYENSA-JIMÉNEZ, Jacobo, et al. Mathematical formulation and parametric analysis of in vitro cell models in microfluidic devices: application to different stages of glioblastoma evolution. *Scientific Reports*, 2020, vol. 10.

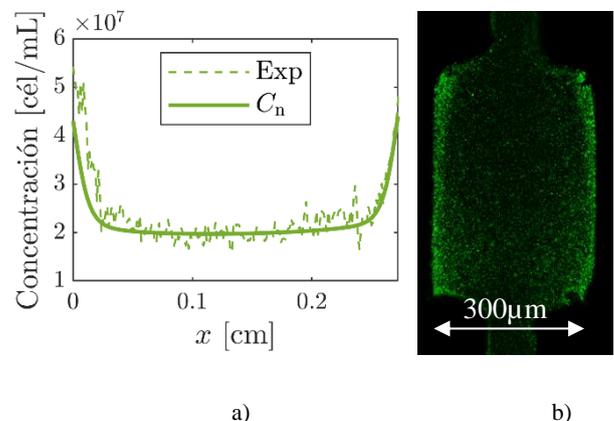


Figura 2. Concentración de colágeno de 4 mg/ml. a) Ajuste de datos experimentales. b) Células vivas en el dispositivo.

