



Nanotecnologías para el estudio de la migración celular

Xavier Serra-Picamal y Xavier Trepap

Una gran variedad de procesos fisiológicos y patofisiológicos como el desarrollo embrionario, la respuesta inmune, la metástasis y la cicatrización de tejidos dependen de la capacidad migratoria celular.

La migración celular involucra procesos bioquímicos y biomecánicos, pero se desconoce cómo estos procesos están integrados a escala molecular. El reciente desarrollo de bionanotecnologías como la microscopia de tracción o los biosensores FRET está permitiendo la medición directa de las fuerzas físicas que gobiernan la migración celular y los mecanismos por los cuales estas fuerzas se transducen en señales bioquímicas. El acceso experimental a estos procesos biofísicos ofrece nuevas posibilidades para la comprensión de los mecanismos que subyacen a enfermedades graves como la inflamación crónica o el cáncer.

La migración celular es un proceso fundamental para el desarrollo y mantenimiento de los organismos multicelulares.¹ Durante el desarrollo embrionario, la migración celular permite dar forma a estructuras complejas como el sistema nervioso, el sistema vascular, o el árbol bronquial. En los organismos adultos, la migración celular es esencial para la defensa inmunológica. En respuesta a una infección bacteriana, por ejemplo, los neutrófilos migran rápidamente hacia el lugar de la inflamación dirigidos por gradientes de señales químicas y, una vez llegados a su destino, proceden a eliminar los patógenos causantes de la infección.

La desregulación de los mecanismos que gobiernan la migración celular es el causante de enfermedades graves como la inflamación crónica o el cáncer. En este último caso, la migración celular es el proceso clave que permite a las células tumorales invadir los tejidos vecinos y penetrar los vasos sanguíneos y linfáticos para metastatizar en

órganos o tejidos distantes. En este sentido, varios autores han catalogado el cáncer como una *enfermedad de la migración*, ya que, si se pudiera controlar esta función de las células tumorales, la gran mayoría de muertes por cáncer se podrían evitar. Desgraciadamente, aún nos encon-

«Los biosensores, genéticamente codificados, pueden ser introducidos en las células como plásmidos y allí son transcritos y traducidos por la propia maquinaria celular. Esta posibilidad les convierte en una herramienta muy atractiva para la investigación en biología celular.»

tramos lejos de este objetivo, pero el desarrollo reciente de la nanotecnología y su aplicación a la migración celular está dando lugar a avances prometedores en la lucha contra el cáncer y enfermedades infecciosas.

Las leyes de Newton establecen que no es posible entender el movimiento de un objeto sin conocer las fuerzas que actúan sobre él, y las células no son una excepción a esta regla.² ¿Qué fuerzas genera una célula tumoral para poder invadir un tejido vecino? ¿Qué fuerza debe aplicar un neutrófilo para cruzar el endotelio y llegar al lugar de infección? Estas fuerzas se encuentran en el rango del nanonewton, y solo han podido ser medidas recientemente gracias al desarrollo de nanotécnicas como la microscopia de tracción y la microscopia de fuerza atómica. Gracias a estas técnicas hemos podido comprender los mecanismos básicos que permiten el movimiento de las células a escala nanométrica.

La migración celular se produce mediante un ciclo biomecánico consistente en cuatro pasos (fig. 1). El primero de estos pasos es la extensión de una protrusión en el polo anterior de la célula. Seguidamente, esta protrusión se adhiere al sustrato por medio de un complejo focal que involucra más de un centenar de proteínas diferen-

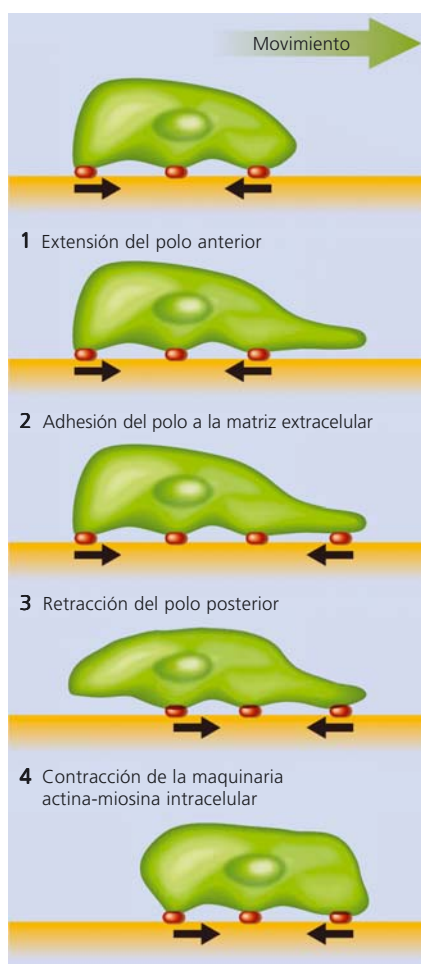


Figura 1. Mecanismo de la migración celular

La migración celular resulta de la combinación de ciclos de extensión-contracción y de adhesión-desenganche.

Fuente: Adaptada de Trepap.⁴

tes. Una vez la protusión está firmemente adherida al sustrato, la célula activa su maquinaria contráctil y genera tensión. Finalmente las adhesiones del polo posterior de la célula ceden a este incremento de tensión, lo cual da lugar al avance del cuerpo celular.³

¿Cómo medir las fuerzas de tensión que ejerce la célula a través de sus adhesiones sobre el sustrato? La respuesta se halla en una nanotecnología aún poco conocida pero de gran proyección: la *microscopía de tracción* (fig. 2). Esta técnica se basa en estudiar las células migrando sobre un sustrato elástico y transparente. Si el sustrato es suficientemente blando, la tensión que ejercen las células es suficiente para deformarlo entre decenas y centenas de nanómetros.⁵ Estas deformaciones se pueden medir introduciendo nanomarcadores fluorescentes que se

visualizan utilizando microscopía óptica de gran aumento y algoritmos avanzados de procesamiento de imágenes. El resultado es un mapa bidimensional de la deformación del sustrato como consecuencia de las fuerzas ejercidas por las células.

Para obtener la localización y la magnitud de estas fuerzas es necesario resolver un problema inverso de mecánica de medios continuos. Conociendo la deformación de un material, ¿cómo podemos determinar las fuerzas que la causan? Este problema fue resuelto a finales del siglo XIX por Boussinesq para el caso de materiales con geometría sencilla y propiedades mecánicas ideales. Para condiciones experimentales reales, es necesario el desarrollo de modelos computacionales avanzados que tengan en cuenta la viscoelasticidad y la falta de linealidad de los geles fisiológicos así como su compleja geometría.²

Las primeras medidas de microscopía de tracción confirmaron la naturaleza cíclica de la motilidad celular y demostraron que el rango de fuerzas que las células generan para migrar se encuentra alrededor del nanonewton, aunque algunas células son capaces de migrar con fuerzas mucho menores.⁶ Pero quizás el descubrimiento más relevante y al mismo tiempo más inesperado es que las células son capaces no solo de generar fuerzas sino también de *medir* estas fuerzas. De este modo, las células migratorias pueden conocer las propiedades físicas de su entorno y actuar en consecuencia. ¡No es lo mismo andar sobre asfalto que en arenas movedizas! Esta función que permite la

medida de fuerzas por parte de las células se conoce como *mecanotransducción*.⁷

¿Cómo interaccionan las fuerzas físicas con los mecanismos moleculares que regulan la migración celular, incluyendo complejas vías de señalización o la activación de proteínas de la familia de las pequeñas GTPasas? El estudio de estos mecanismos moleculares se ha basado en gran medida en técnicas de inmunofluorescencia e *immunoblotting*. Sin embargo, estas técnicas tienen una resolución temporal y espacial limitada y, por lo tanto, no son ideales para detectar procesos rápidos, localizados y transitorios. Además no permiten el estudio de la colocación de la actividad mecánica y de la actividad bioquímica. Una solución a estas limitaciones la ofrece la combinación de microscopía de tracción y biosensores FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*).

Los biosensores FRET se basan en la transferencia de energía de un fluoróforo donador a un fluoróforo aceptor, dando lugar a un aumento en la fluorescencia emitida por el fluoróforo aceptor y a una disminución de la fluorescencia emitida por el donador.⁸ La eficiencia de los biosensores depende principalmente del área de superposición entre el espectro de emisión del fluoróforo donador y el espectro de excitación del fluoróforo aceptor (a más superposición, más transferencia de energía), de la orientación relativa de los dipolos de los fluoróforos y de la distancia entre el donador y el aceptor (la transferencia de energía solo se produce si los dos fluoróforos están a menos de

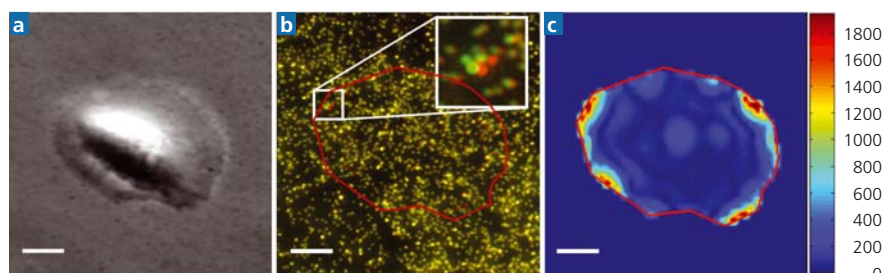


Figura 2. Microscopía de tracción

a) Imagen de una célula epitelial (línea celular MCF-10A) sobre un gel recubierto con colágeno. b) Superposición de las imágenes de los nanomarcadores fluorescentes tomadas cuando la célula está presente sobre el sustrato (en rojo) o una vez ésta ha sido despegada con tripsina (verde). El color amarillo indica que no se observa desplazamiento de los nanomarcadores entre las dos imágenes. La zona ampliada muestra una región donde se observa claramente el desplazamiento de los nanomarcadores inducido por la célula. c) Fuerzas de tracción (en pascales) ejercidas por la célula. La dirección de las fuerzas es centrípeta.

Barra de escala = 10 µm.

10 nN) (fig. 3). Esta gran sensibilidad de la eficiencia FRET con la distancia entre donador y aceptor permite el uso de las sondas FRET como biosensores de deformación a escala nanométrica.

Los biosensores, genéticamente codificados, pueden ser introducidos en las células como plásmidos, y allí son transcritos y traducidos por la propia maquinaria celular. Esta posibilidad les convierte en una herramienta muy atractiva para la investigación en biología celular. La estructura de los biosensores puede ser de dos tipos. En primer lugar, los *biosensores intramoleculares* son diseñados como una sola cadena peptídica que contiene los dos fluoróforos y una región intermedia que modifica su estado conformacional cuando el sensor se activa. Como consecuen-

cia de este cambio conformacional, se altera la distancia y/o la orientación de los fluoróforos y, en consecuencia, la eficiencia FRET. En segundo lugar, los *biosensores intermoleculares* se basan en fusionar los fluoróforos, separadamente, a dos proteínas distintas, permitiendo así monitorizar la interacción de estas proteínas: la proximidad o separación de las dos proteínas afectará la eficiencia FRET entre los fluoróforos. Adicionalmente, en la estructura del biosensor se pueden añadir secuencias de posicionamiento específicas, de modo que el biosensor se sitúe en un compartimento celular determinado, como por ejemplo la membrana celular o el retículo citoplasmático.

Los biosensores FRET han contribuido a avances notables en varios aspectos de

la migración celular. En un estudio reciente se caracterizaron los eventos moleculares que se producen en las protrusiones de células en migración utilizando biosensores para monitorizar la actividad de RhoA, Cdc42 y Rac1 (proteínas de la familia de las GTPasas Rho).⁹ Se consiguió, así, entender la función de estas proteínas con elevada resolución temporal (segundos) y espacial (micrómetros) (fig. 4). Concretamente, se descubrió que RhoA es activa en la parte más anterior de la protrusión celular, y que Cdc42 y Rac1 se activan aproximadamente 2 μm detrás y con un retraso de 40 segundos respecto la activación de RhoA. Otro interesante estudio permitió comprender la activación de Src, proteína tirosina quinasa relacionada con procesos tumorigénicos, mediante un biosensor FRET.¹⁰ Además de activarse mediante estímulos bioquímicos, se pudo comprobar y visualizar que Src puede ser activado a través de la aplicación de fuerzas físicas externas, y que esta activación mecánica se propaga en forma de onda a través de la membrana plasmática.¹⁰ Además de los biosensores descritos previamente, se ha desarrollado una gran cantidad de biosensores para el estudio de las distintas fases y eventos que se producen durante la migración celular (activación de pequeñas GTPasas, quinasas o proteínas de adhesión, entre otros). Una relación exhaustiva de los biosensores existentes y las características de los mismos se puede encontrar en línea.¹¹

Si bien la información que proporcionan los biosensores FRET es muy valiosa, su implementación puede resultar compleja. Existen distintas cuestiones que dificultan su uso y la interpretación de los resultados. En primer lugar, se debe conseguir un nivel de expresión que proporcione una relación señal/ruido adecuada. Una concentración elevada de biosensor produce una señal más intensa, pero su sobreexpresión puede provocar saturación de la vía de señalización o de la proteína que se quiere monitorizar. Por otra parte, los espectros de emisión y excitación de los dos fluoróforos están parcialmente superpuestos, lo cual es inherente a la técnica FRET, de modo que la fluorescencia proveniente del donador puede entrar en el canal de detección del aceptor. Este fenómeno se debe tener en cuenta y corregir a posteriori. Finalmente, en el caso FRET intermolecular, se debe conseguir una estequiometría donador: aceptor adecuada que permita la detección FRET.

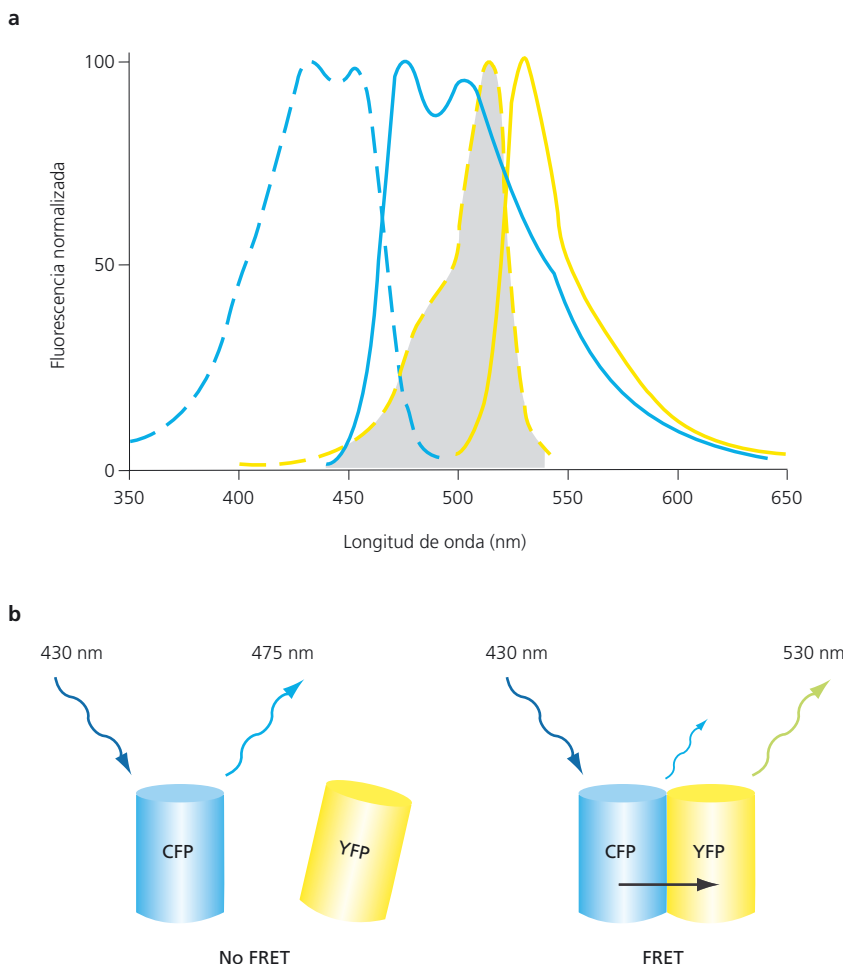


Figura 3. Principio de los biosensores FRET

a) Espectros de excitación (líneas discontinuas) y emisión (líneas continuas) de CFP (*Cyan Fluorescent Protein*, en cian) y YFP (*Yellow Fluorescent Protein*, en amarillo), fluoróforos comúnmente utilizados como donador y aceptor en FRET. El área gris delimita la superposición entre la emisión de CFP y la excitación de YFP. b) Esquemas del funcionamiento de un biosensor FRET. En la izquierda, los fluoróforos no están suficientemente cerca ni correctamente orientados, de modo que no hay FRET, lo que sí ocurre en la parte derecha.

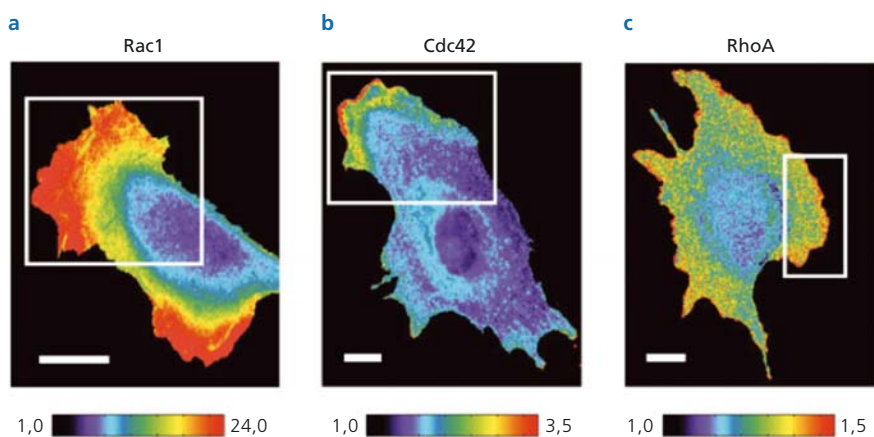


Figura 4. Actividad de GTPasas Rho en fibroblastos embrionarios de ratón obtenidas con biosensores FRET

Activación de Rac1 (a), Cdc42 (b) y RhoA (c) en fibroblastos embrionarios de ratón en migración. La caja blanca indica la zona de protrusión celular. La escala de color indica la respuesta del biosensor.

Barra de escala = 20 μ m.

Fuente: Adaptada de Machacek et al.⁹

La microscopía de tracción y los sensores FRET son solo dos ejemplos de nanotecnologías que están permitiendo avances sustanciales en nuestra comprensión de la migración celular. Otras nanotecnologías como las pinzas magnéticas y ópticas, la microscopía de fuerza atómica, o la nanofabricación de patrones también están contribuyendo a la caracterización biomecánica de las células migratorias a escala nanométrica. La combinación de estas nanotécnicas con el desarrollo de sofisticadas herramientas de biología molecular están contribuyendo, sin lugar a dudas, a descifrar los mecanismos que gobiernan la migración celular, pero al mismo tiempo plantean un nuevo reto: ¿cómo podemos organizar y sintetizar la inmensa cantidad de información que obtenemos a escala nanométrica para

poder generar modelos con capacidad predictiva? Desconocemos la respuesta a este reto, pero podemos asegurar que implicará necesariamente una colaboración estrecha entre investigadores de campos tan dispares como la biología molecular, la informática, la física, y la bioquímica. #

.....
Xavier Serra-Picamal

BECARIO FPU
FACULTAD DE MEDICINA,
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Xavier Trepát

INVESTIGADOR ICREA SENIOR, INSTITUTO
DE BIOINGENIERÍA DE CATALUÑA
PROFESOR ASOCIADO, FACULTAD DE
MEDICINA, UNIVERSIDAD DE BARCELONA

► Bibliografía

- Friedl P, Gilmour D. «Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer». *Nature reviews* 2009; 10: 445-57.
- Trepát X., Wasserman M.R., Angelini T.E., Millet E., Weitz D.A., Butler J.P., Fredberg J.J. «Physical forces during collective cell migration». *Nature Phys* 2009; 5: 426.
- Ridley A.J., Schwartz M.A., Burridge K., Firtel R.A., Ginsberg M.H., Borisy G., Parsons J.T., Horwitz A.R. «Cell migration: integrating signals from front to back». *Science* 2002; 302: 1704-9.
- Trepát X. «Mecánica de la migración celular». *Investigación y Ciencia* 2009; 398: 16-7.
- Dembo M., Wang Y.L. «Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts». *Biophysical journal* 1999; 76: 2307-16.
- Álamo J.C. del, Meili R., Alonso-Latorre B., Rodríguez-Rodríguez J., Aliseda A., Firtel R.A., and Lasheras J.C. «Spatio-temporal analysis of eukaryotic cell motility by improved force cytometry». *Proc Nat Acad Sci USA* 2007; 104: 13343-8.
- Río A. del, Pérez-Jiménez R., Liu R., Roca-Cusachs P., Fernández J.M., Sheetz M.P. «Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding». *Science* 2009; 323: 638-41.
- Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. «FRET imaging». *Nat Biotechnol* 2003; 21: 1387-95.
- Machacek M., Hodgson L., Welch C., Elliott H., Pertz O., Nalbant P., Abell A., Johnson G.L., Hahn K.M., Danuser G. «Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion». *Nature* 2009; 461: 99-103.
- Wang Y., Botvinick E.L., Zhao Y., Berns M.W., Usami S., Tsien R.Y., Chien S. «Visualizing the mechanical activation of Src». *Nature* 2005; 434: 1040-5.
- Cell Migration Gateway. Disponible en http://www.cellmigration.org/resource/biosensors/biosen_probes.shtml.