



**Universidad
Zaragoza**

Proyecto Fin de Carrera

**Simulación por elementos finitos de la
adhesión mecánica entre célula y sustrato.**

Autor

Mar Cóndor Salgado

Directores

José Manuel García-Aznar

Clara Valero Lázaro

Área de Mecánica de Medios Continuos y Teoría de Estructuras

Departamento de Ingeniería Mecánica

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

Zaragoza, Mayo 2013

*Mi más sincero agradecimiento a José Manuel García-Aznar y a M^a Ángeles
Pérez Ansón, por su interés, paciencia y constante apoyo durante
la realización de este Proyecto Fin de Carrera.*

*Gracias también a mi familia y amigos por su apoyo incondicional,
así como a mis compañeros del Área de Mecánica de Medios Continuos y
Estructuras, que sin su ayuda no hubiera sido posible la finalización
de este Proyecto Fin de Carrera.*

SIMULACIÓN POR ELEMENTOS FINITOS DE LA ADHESIÓN MECÁNICA ENTRE CÉLULA Y SUSTRATO

RESUMEN

El presente proyecto fin de carrera se desarrolla en el Área de Mecánica de Medios Continuos y Teoría de Estructuras, en el departamento de Ingeniería Mecánica de la Universidad de Zaragoza, en el campo de la Biomecánica computacional.

Los seres vivos están formados por unidades mínimas llamadas células. Todas las funciones químicas y fisiológicas básicas, por ejemplo, la reparación, el crecimiento, el movimiento, la inmunidad, la comunicación, y la digestión, ocurren en el interior de la célula. Por ello, numerosos estudios de investigación, se han basado en la comprensión del funcionamiento de cada una de estas funciones celulares.

Este proyecto se va a centrar en estudiar el movimiento y evolución de las células, en concreto del fenómeno de la adhesión focal, como respuesta a diferentes estímulos mecano-químicos que simulan la contracción celular.

Para ello se determinará el grado de adhesión mecánica entre una célula y un sustrato cualquiera, mediante un modelo computacional continuo basado en una interfaz a través del método de los elementos finitos, en concordancia a estudios realizados con anterioridad sobre la cinética de la adhesión focal.

Se formulará un elemento finito interfaz en el código FORTRAN, que será implementado con una rutina de usuario UMAT, en el código comercial de elementos finitos ABAQUS.

Una vez creado el modelo computacional 3D, con la ayuda de ABAQUS CAE se definirán distintos estados de cargas que simulen en lo posible una contracción real, con el fin de analizar el comportamiento del modelo.

Finalmente, se simulará el avance o retroceso de la Adhesión Focal en 2D y 3D, evaluando el grado de adhesión generado sobre la interfaz para cada caso.

ÍNDICE GENERAL

I Memoria	1
CAPITULO 1. Introducción	3
1.1. Introducción.....	3
1.2. Objetivos.....	5
1.3. Descripción del proyecto.....	6
1.4. Estado del arte.....	8
 CAPITULO 2. Descripción del modelo matemático de Adhesión focal	 11
2.1. Introducción.....	11
2.2. Formulación de un modelo de interfaz aplicado a las Adhesiones focales.....	12

2.2.1. Descripción mecánica del modelo y definición de las variables de estado.....	13
2.2.2. Evolución de las variables de estado.....	17
2.2.3. Contribuciones al potencial mecano-químico.....	19
2.2.3.1. Química.....	19
2.2.3.2. Elástica.....	20
2.2.3.3. Debidas a cambios conformacionales.....	21
2.2.3.4. Potencial límite.....	22
2.2.3.5. Formulación general y aproximaciones.....	22
2.3. Estimación de los parámetros.....	23
2.4. Implementación numérica del modelo.....	25
2.4.1. Introducción.....	25
2.4.2. Definición de geometrías 3D.....	26
2.4.3. Materiales y UMAT.....	28
2.4.4. Malla del modelo de elementos finitos.....	29
2.4.5. Cargas y condiciones de apoyo.....	30

CAPITULO 3. Simulación computacional de la adhesión celular bajo diferentes condiciones **33**

3.1. Introducción.....	33
3.2. Análisis de resultados.....	34
3.2.1. Simulaciones a tracción pura.....	35
3.2.2. Simulaciones a tracción lineal.....	37
3.2.3. Simulaciones a tangencial pura.....	38
3.2.4. Simulaciones a tangencial lineal.....	39
3.2.5. Simulaciones aplicando la carga a 45 grados.....	40
3.2.6. Simulaciones aplicando la carga a 45 grados, lineal.....	41
3.3. Comparación de resultados.....	42
3.4. Sensibilidad de las propiedades de la célula.....	44
3.4.1. Simulaciones variando rigidez del sustrato.....	44

3.4.2. Simulaciones variando la distribución de la carga	
contráctil en el dominio de la adhesión focal.....	46
3.4.3. Simulaciones variando la distribución en el tiempo.....	47
CAPITULO 4. Conclusiones y líneas futuras de investigación	49
4.1. Introducción.....	49
4.2. Conclusiones.....	50
4.3. Líneas futuras de investigación.....	53
II Anexos	55
Anexo A. Base biológica de la adhesión focal	55
A.1. La biomecánica.....	55
A.2. Unión celular.....	57
A.2.1. Introducción.....	57
A.2.2. Tipos de unión celular.....	57
A.2.2.1. Uniones oclusivas.....	57
A.2.2.2. Uniones de adherencia.....	58
A.2.2.3. Uniones de comunicación.....	60
A.3. Fenómeno de adhesión focal.....	61
A.3.1. Definición.....	61
A.3.2. Partes que intervienen.....	63
A.4. Base biológica de la mecánica celular.....	67
Anexo B. Modelos teóricos	69
B.1. Introducción.....	69
B.2. Mecánica del daño Continuo.....	70
B.2.1. Conceptos fundamentales de la Mecánica del Daño Continuo...	70
B.2.2. Termomecánica del Daño Continuo.....	75
B.2.3. Ley de evolución del daño.....	78
B.3. Teoría de las superficies cohesivas.....	80
B.3.1. Revisión de los modelos de adhesión y superficies cohesivas....	81

B.3.2. La superficie cohesiva como una superficie discontinua.....	84
--	----

Anexo C. Rutina interfaz **87**

C.1. Introducción.....	87
C.2. Rutina Interfaz.....	88

Anexo D. Resultados numéricos de las simulaciones **99**

D.1. Introducción.....	99
D.2. Resultados gráficos.....	100
D.2.1. Simulaciones a tracción pura.....	100
D.2.2. Simulaciones a tracción lineal.....	101
D.2.3. Simulaciones a tangencial pura.....	102
D.2.4. Simulaciones a tangencial lineal.....	103
D.2.5. Simulaciones aplicando la carga a 45 grados.....	104
D.2.6. Simulaciones aplicando la carga a 45 grados, lineal.....	105
D.2.7. Simulaciones variando rigidez del sustrato.....	106
D.2.8. Simulaciones variando la distribución de la carga contráctil en el dominio de la adhesión focal.....	107
D.2.9. Simulaciones variando la distribución en el tiempo.....	108
D.3. Tablas de resultados.....	110
D.3.1. Simulaciones a tracción pura.....	110
D.3.2. Simulaciones a tracción lineal.....	110
D.3.3. Simulaciones a tangencial pura.....	111
D.3.4. Simulaciones a tangencial lineal.....	111
D.3.5. Simulaciones aplicando la carga a 45 grados.....	112
D.3.6. Simulaciones aplicando la carga a 45 grados, lineal.....	112
D.3.7. Simulaciones variando rigidez del sustrato.....	113
D.3.8. Simulaciones variando la distribución de la carga contráctil en el dominio de la adhesión focal.....	113
D.3.9. Simulaciones variando la distribución en el tiempo.....	114

Bibliografía

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1 Esquema de la Adhesión Focal.....	4
1.2 Esquema de la Adhesión Focal, según modelo de Olberding et al. [7].....	9
2.1 (a) Esquema de FA de forma discreta, (b) esquema interno de FA [30].....	12
2.2 Esquema de aplicación de la carga sobre una célula [30].....	13
2.3 Representación del modelo constitutivo en la dirección normal.....	14
2.4 Representación del modelo constitutivo en la dirección tangencial 2 y 3... 14	
2.5 Esquema de los estados de unión, separación y de la barrera de transición en términos energéticos.....	16
2.6 Esquema de los parámetros que definen la interfaz.....	24
2.7 Definición del elemento interfaz.....	26
2.8 Representación esquemática del modelo de Elementos Finitos.....	27
2.9 Representación gráfica del modelo numérico de Elementos Finitos.....	28
2.10 Malla del Modelo de Elementos Finitos.....	30
2.11 Modelo de Olberding et al. [7].....	31
3.1 Esquema de la aplicación de la carga para el caso de tracción pura.....	35
3.2 Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.1.....	36
3.3 Esquema de la aplicación de la carga para el caso de tracción lineal.....	37
3.4 Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.3.....	37

3.5 Esquema de la aplicación de la carga para el caso de tangencial pura.....	38
3.6 Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.5.....	38
3.7 Esquema de la aplicación de la carga para el caso de tangencial lineal.....	39
3.8 Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.7.....	39
3.9 Esquema de la aplicación de la carga a 45°.....	40
3.10 Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.9.....	40
3.11 Esquema de la aplicación de la carga a 45° lineal.....	41
3.12 Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.11.....	41
3.13 Representación gráfica del proceso de aplicación de carga tangencial [36].....	43
3.14 Esquema de la aplicación de la carga para las siguientes simulaciones...	44
3.15 Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.14, variando la rigidez del sustrato.....	45
3.16 Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.14, variando la distribución de carga en el dominio de la adhesión focal.....	46
3.17 Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.14, variando la distribución temporal, para un $t=1000$ segundos.....	47
3.18 Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.14, variando la distribución temporal, para un $t=500$ segundos.....	48
A.1 Esquema de la Biomecánica del Trailrunner.....	56
A.2 Uniones ocluyentes o herméticas.....	58
A.3 Uniones de adherencia o cinturones de unión.....	60
A.4 Uniones comunicantes o de nexo.....	61
A.5 Esquema de la Adhesión Focal (www.biosignaling.com).....	62
A.6 Diferentes patrones de adhesión: A) adherencia localizada, B) adherencia difusa, C) sin adherencia (http://www.scielo.org).....	63
A.7 Modelo esquemático de la arquitectura molecular de la Adhesión Focal (http://www.me.utexas.edu).....	64
A.8 Diferentes tipos de matrices extracelulares: A) Cartílago hialino, B) Matriz ósea compacta, C) Tendón, D) Cordón umbilical, E) paredes celulares del tallo de una planta, F) Células epiteliales, G) Tejido nervioso (www.biologiadelacelular.com).....	66
A.9 Visualización de filamentos de actina (verde), microtúbulos (blanco), filamentos intermedios del citoesqueleto(rojo), (www.wikipedia.es).....	68

B.1 Definición del daño a nivel micro-mesoscópico.....	72
B.2 Elemento dañado unidimensionalmente.....	72
B.3 Representación esquemática del concepto de tensión efectiva.....	74
B.4 Degradación estructural de un material sometido a fatiga.....	78
B.5 Diagrama de acumulación de daño no lineal para un preceso de fatiga con dos niveles de tensión.....	79
B.6 Discontinuidad fuerte.....	82
B.7 Discontinuidad débil.....	83
B.8 Superficie cohesiva.....	84
D.1 Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar tracción pura....	100
D.2 Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar tracción lineal..	101
D.3 Distribución de tensiones normales en la interfaz al aplicar tracción lineal.....	101
D.4 Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar tangencial pura.	102
D.5 Distribución de tensiones tangenciales en la interfaz al aplicar tracción lineal.....	102
D.6 Distribución de tensiones normales en la interfaz al aplicar tracción lineal.....	103
D.7 Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar tangencial lineal.....	103
D.8 Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar la carga a 45° ...	104
D.9 Distribución de tensiones tangenciales en la interfaz al aplicar carga a 45°.....	104
D.10 Distribución de tensiones normales en la interfaz al aplicar la carga a 45°.....	105
D.11 Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar carga lineal a 45°.....	105
D.12 Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar la carga lineal a 45°, variando la rigidez del sustrato.....	106
D.13 Distribución de tensiones tangenciales en la interfaz al aplicar carga a 45, variando la rigidez del sustrato.....	107
D.14 Distribución de tensiones tangenciales en la interfaz al aplicar carga a 45°, variando la rigidez del sustrato.....	107
D.15 Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar la carga lineal a 45°, variando la distribución de carga en el dominio de la adhesión focal.	108
D.16 Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar la carga lineal a 45°, variando la distribución en el tiempo, para un t=1000 segundos.....	109
D.17 Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar la carga lineal a 45°, variando la distribución en el tiempo, para un t=500 segundos.....	109

ÍNDICE DE TABLAS

2.1 Los parámetros usados en las simulaciones computacionales.....	25
D.1 Resultados de las simulaciones de aplicar tracción pura.....	110
D.2 Resultados de las simulaciones de aplicar tracción lineal.....	110
D.3 Resultados de las simulaciones de aplicar tangencial pura.....	111
D.4 Resultados de las simulaciones de aplicar tracción pura.....	111
D.5 Resultados de las simulaciones de aplicar la carga a 45 grados.....	112
D.6 Resultados de las simulaciones de aplicar la carga lineal a 45 grados.....	112
D.7 Resultados de las simulaciones de aplicar la carga lineal a 45 grados, variando la rigidez del sustrato.....	113
D.8 Resultados de las simulaciones de aplicar la carga lineal a 45 grados, variando la distribución de carga en el dominio de la adhesión focal.....	113
D.9 Resultados de las simulaciones de aplicar la carga lineal a 45 grados, variando la distribución en el tiempo, para un $t=1000$ segundos.....	114
D.10 Resultados de las simulaciones de aplicar la carga lineal a 45 grados, variando la distribución en el tiempo, para un $t=500$ segundos.....	114

Parte I

Memoria

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN

Las células son las unidades mínimas que configuran los seres vivos. Todas las funciones químicas y fisiológicas básicas, como el crecimiento, el movimiento, la inmunidad, la comunicación y la digestión, entre otras, ocurren en el interior de ella. Por eso es tan importante conocer como funcionan cada una de estas funciones celulares básicas.

Este proyecto, se va a centrar en el estudio del movimiento y evolución de las células, como respuesta a diferentes estímulos mecano-químicos.

Las células de la mayoría de los tejidos, se encuentran unidas directamente una a la otra por medio de uniones celulares. Éstas tienen numerosos propósitos, entre los cuales es el de la Adhesión mecánica, que sin su existencia, el cuerpo se desintegraría.

Las uniones celulares pueden ser tanto uniones de tipo intercelular, como uniones de tipo célula-matriz. Las células reconocen y se unen entre ellas, a la vez que se mueven y se ensamblan en tejidos y órganos, proceso conocido como adhesión celular.

Dentro de los distintos tipos funcionales de unión celular, este proyecto se centrará en estudiar el comportamiento y evolución de un tipo específico de uniones de adhesión, que son las Adhesiones Focales [1].

Las uniones de adhesión conectan el citoesqueleto de una célula al citoesqueleto de las células vecinas, o a la matriz extracelular. Dentro de éstas, están las conocidas como Adhesiones Focales, que son las que permiten a las células sostener la matriz extracelular, a través de las integrinas, que se unen intracelularmente a filamentos de actina, como se explica con mayor detalle en el Anexo A. Los dominios extracelulares de las proteínas integrina transmembrana se unen a un componente proteico de la matriz extracelular, mientras sus dominios intracelulares se unen indirectamente a paquetes de filamentos de actina vía proteínas de anclaje intracelular (talina, alfa-actinina, filamina, vinculina), [3] (ver figura 1.1).

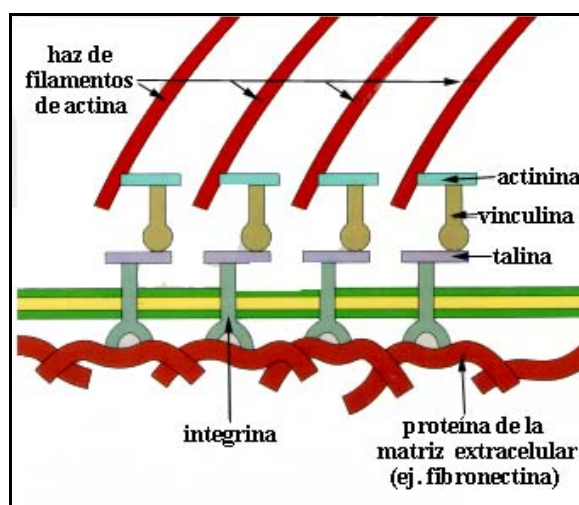


Figura 1.1: Esquema de la Adhesión Focal. (Fuente: SAH, <http://www.ht.org.ar>)

La matriz extracelular (ECM) es un entramado de moléculas, el cual sintetizan y secretan las propias células. Ésta tiene numerosas funciones, como aportar propiedades mecánicas a los tejidos, mantener la forma celular, permite la adhesión de las células para formar los tejidos, formar sendas por las que moverse las células, etc.

En los últimos años, se ha demostrado en numerosos experimentos biológicos, que la fuerza puede ser transmitida a las adhesiones focales a través de los filamentos de actina para llegar a la matriz extracelular. Esta fuerza puede ser generada por la contracción producida al interactuar las proteínas actina y miosina, o debida a una manipulación exterior, con por ejemplo con una micropipeta. Las adhesiones focales transmiten esta fuerza a la matriz extracelular, provocando cambios conformacionales en la célula, que se traducen en el crecimiento o no de las adhesiones focales. Este crecimiento, depende fuertemente del valor de la fuerza aplicada como se demuestra en numerosos estudios, entre otros factores [2, 3, 4, 5].

1.2. OBJETIVOS

El presente Proyecto Fin de Carrera tiene como objetivo, determinar el grado de adhesión mecánica entre una célula y un sustrato cualquiera, mediante un modelo computacional de interfaz a través del método de los elementos finitos, en base a estudios realizados con anterioridad sobre la cinética de la adhesión focal.

Este Proyecto Fin de Carrera, se engloba dentro de un proyecto de investigación europeo titulado: “Predictive modelling and simulation in mechano-chemobiology: a computer multi-approach”; donde uno de los objetivos consiste en ayudar a comprender el proceso de mecanotransducción en las adhesiones focales, en concreto para la interacción célula-material, mediante modelos computacionales macroscópicos.

Hasta el momento se han propuesto numerosos modelos para la simulación de la cinética de la Adhesión focal, explicados más adelante en el subapartado del estado

del arte, en los cuales se aborda el problema de la adhesión focal a nivel global y no a nivel individual como se implementará en nuestro modelo.

Para ello, se trasladarán los resultados obtenidos en diferentes estudios biológicos a un modelo físico-mecánico de adhesión focal, usando un modelo matemático que nos defina el estado mecánico de la adhesión célula-sustrato, utilizando los principios de la mecánica del daño continuo.

Se desarrollará e implementará numéricamente un modelo de interfaz mecánico, con el cual se simulará la formación o rotura de adhesiones focales entre la célula y el sustrato, en función de las fuerzas generadas en la célula y de las propiedades del sustrato y ésta.

Se formulará un elemento finito interfaz en el código FORTRAN, que será implementado con una rutina de usuario UMAT, en el código comercial de elementos finitos ABAQUS.

Una vez creado el modelo computacional, con la ayuda de ABAQUS se simularán distintos estados de cargas, correspondiendo lo más similar posible a los estados de carga producidos en las células, partiendo de datos experimentales de los estudios biológicos en células ya existentes.

Finalmente, se simulará el avance o retroceso de la adhesión focal en 2D y 3D.

Entendiendo el comportamiento de las adhesiones focales, es decir ampliando nuestros conocimientos sobre la mecánica celular a nivel molecular, se podrán desentrañar muchos misterios que plantean las células a la biología y a la química, como por ejemplo entender cómo avanzan las células cancerígenas cuando un tumor se expande, entre muchos otros.

1.3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

El proyecto consta de cinco capítulos, descritos a continuación:

En el **Capítulo 1** se realiza una breve descripción del Proyecto Fin de Carrera, mostrando las motivaciones que llevaron a su realización, así como los principales objetivos que se pretenden alcanzar con el mismo.

En el **Capítulo 2** se describe el modelo matemático de interfaz aplicado a las Adhesiones Focales, haciendo referencia a los principios de la Mecánica del Fractura, así como las contribuciones mecano-químicas más relevantes. En este capítulo, también se describe la implementación numérica del modelo en elementos finitos.

En el **Capítulo 3** se muestran los resultados de las diferentes simulaciones computacionales realizadas sobre nuestro modelo teórico de interfaz célula-sustrato, bajo diferentes condiciones de carga y variando algunos parámetros con el fin de determinar el comportamiento de ésta. Se analizan y comparan los resultados obtenidos en las diferentes simulaciones.

En el **Capítulo 4** se detallan las conclusiones más importantes del proyecto y las líneas futuras de investigación.

Además para una mejor comprensión del Proyecto Fin de Carrera se incluyen varios Anexos.

En el **Anexo A** se describe brevemente la anatomía celular y se explican los diferentes tipos de uniones celulares que se pueden presentar en las células, profundizando en las Adhesiones Focales, que es el fenómeno a estudiar en este Proyecto, con el objetivo de familiarizar al lector con la terminología clínica. En el **Anexo B** se describe de manera resumida los fundamentos de la Mecánica de Daño Continuo y la Teoría de Superficies Cohesivas, en los cuales se basa el modelo matemático formulado en este proyecto. En el **Anexo C** se incluye la rutina programada en el código comercial FORTRAN que se ha usado para implementar el modelo de daño o adhesión. En el **Anexo D** se presentan la totalidad de los resultados obtenidos para las diferentes simulaciones realizadas en elementos finitos, tanto gráfica como numéricamente.

1.4. ESTADO DEL ARTE

En los últimos años se han realizado numerosos avances en el campo de la mecánica celular, centrándose principalmente en entender aspectos estructurales celulares, como su organización espacial o sus propiedades mecánicas [12,13]. Para lo cual se requiere entender el papel que desarrolla cada una de las partes más importantes de las células, que son el citoesqueleto, la membrana y la matriz extracelular [9], así como su interacción.

Se ha demostrado que las células son sensibles y responden ante fuerzas, tanto internas como son las de contracción, como externas a través de las adhesiones focales [14, 15, 16, 17]. Numerosos estudios, se han centrado en la aplicación de cargas cíclicas uniaxiales de tracción sobre las células, las cuales han demostrado que inducen inestabilidad en la adhesión celular, causando la reorientación de las células en la dirección de aplicación de la carga [18, 19, 20, 21, 22, 23, 24]. Sin embargo, recientes experimentos basados en la aplicación de cargas de exteriores sobre las células mediante micropipetas, revelan que estas fuerzas pueden inducir el crecimiento de las adhesiones focales, respuestas contradictorias a los experimentos anteriormente citados [2, 3, 25, 26].

Motivados por estos resultados, numerosos investigadores han planteado estudios teóricos del mecanismo de la Adhesión focal (FA), en concreto en 2004, Nicolas y Safran desarrollan el primer modelo teórico que formula el crecimiento de las adhesiones focales al aplicar fuerzas de tracción sobre las células, las cuales son transmitidas a través de los filamentos de actina [2, 3, 4, 27]. Esta fuerza puede ser generada no sólo por agentes externos, sino también por la propia contracción celular producida al interactuar las proteínas actina y miosina y es transmitida por la adhesión focal a la matriz extracelular [6,7]. El crecimiento o no de las adhesiones focales, depende fuertemente del valor de la fuerza aplicada como se demuestra en numerosos estudios, entre otros factores [2, 3, 4, 5, 6, 7].

Lemmon et al. en 2010 [28], demuestran que la fuerza de tracción que genera el crecimiento de la adhesión celular es proporcional a la distancia al centro de la célula, es decir, que la fuerza es proporcional al radio de la célula. Por otro lado, Tee S-Y et al. en 2011 [29], afirman que la forma celular puede estar regulada por la interacción célula-matriz y la rigidez del sustrato. Balaban et al [3], demuestran que las adhesiones focales producidas por las fuerzas de contracción, poseen un área proporcional a la fuerza aplicada en ellas, para tensiones en torno a 5,5KPa.

Ante estas afirmaciones se proponen diferentes modelos teóricos para explicar la biofísica del crecimiento de la adhesión focal basándose en observaciones experimentales y aplicando métodos de la mecánica de fractura extendida a sistemas de reacción-difusión [7], algo similar a lo que trataremos de implementar en nuestro modelo.

Olberding et al [7], consideran para su estudio la longitud total de la zona adherida entre célula-sustrato, como un complejo de adhesión focal (FA). En él aplican la Teoría del Estado de Transición, creando la tasa o grado de adhesión del complejo en base al desequilibrio termodinámico y químico. Discuten la adhesión o no en términos de simetría, con respecto a los extremos de la célula, generada por diferentes contribuciones mecano-químicas. Ellos presentan tres estados en función del extremo en el que se produce el crecimiento o separación del complejo FA: crecimiento, estabilidad, decrecimiento (ver Figura 1.2).

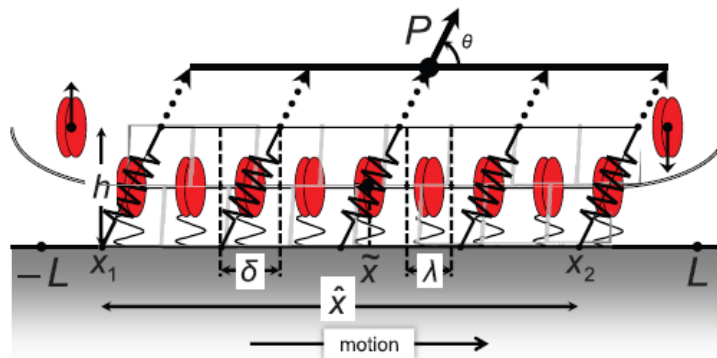


Figura 1.2: Esquema de la Adhesión Focal, según modelo de Olberding et al. [7]

En este Proyecto Fin de Carrera se propone un modelo de interfaz célula-sustrato, basado en los principios energéticos del modelo de Olberding et al [7], en el cual se abordará el problema no como un complejo de adhesión focal, sino estudiando el comportamiento local de la adhesión focal (FA), como se presentará en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO 2

DESCRIPCIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO DE ADHESIÓN FOCAL

2.1. INTRODUCCIÓN

El principal objetivo de este capítulo es el desarrollo de un modelo matemático de interfaz que simule el proceso de adhesión o separación de una célula a un sustrato cualquiera, al aplicar una fuerza de tracción sobre ésta.

Par ello, se trasladarán los resultados obtenidos en diferentes estudios biológicos a un modelo físico-mecánico de adhesión focal, y será el modelo matemático, el que nos defina el estado mecánico de la interfaz célula-sustrato, formulando los principios de la Mecánica del Daño Continuo combinado con la Mecánica de la Fractura Lineal (ver Anexo B).

En primer lugar se presentará el modelo matemático, así como las contribuciones más importantes al potencial químico-mecánico, y posteriormente se desarrollará la implementación numérica con el Método de Elementos Finitos del modelo en cuestión.

2.2. FORMULACIÓN DE UN MODELO DE INTERFAZ APLICADO A LAS ADHESIONES FOCALES

Los modelos de interfaz, debido a su amplia aplicación se han usado para múltiples estudios en los últimos años, como en la simulación de la delaminación en materiales compuestos laminados, en la simulación de la unión cemento-vástago para prótesis de cadera [8], en la simulación de la cicatrización de heridas, entre otros muchos. En particular su uso se ha extendido en el campo de la biomecánica y mecanobiología [38].

Nuestro modelo, se basará en estudios biológicos de mecánica celular, en los cuales se demuestra que la fuerza se transmite a las adhesiones focales a través de los filamentos de actina, y que ésta se transmite a la matriz extracelular, provocando cambios conformacionales en la célula, los cuales se traducen en el crecimiento o no de las adhesiones focales. Por tanto, se puede así evaluar la dinámica de la adhesión celular bajo dos comportamientos de la interfaz claramente diferenciados, el de adhesión o el de separación entre la célula y sustrato [2, 3, 4, 5].

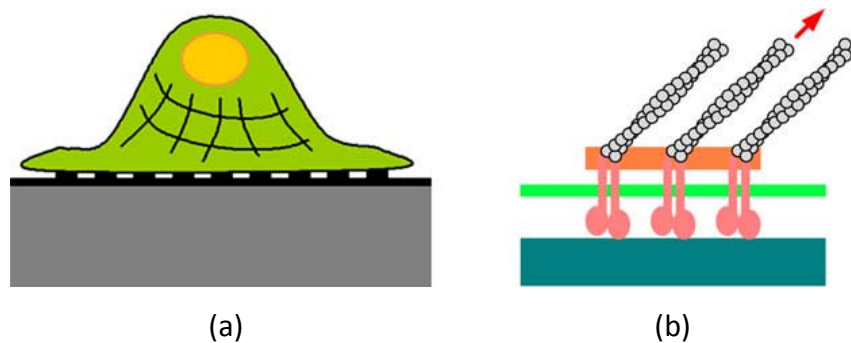


Figura 2.1: (a) Esquema de FA de forma discreta, (b) esquema interno de FA [30].

2.2.1. DESCRIPCIÓN MECÁNICA DEL MODELO Y DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTADO:

Como se ha comentado anteriormente, el estado mecánico de la interfaz va a depender del valor de la fuerza aplicada sobre nuestro conjunto célula-sustrato y de las propiedades mecánicas de ambos, de tal modo que cuando la tasa de energía asociada a la interfaz sea mayor que un valor crítico, se produzca la separación entre célula-sustrato o rotura del enlace, y cuando sea menor que este valor crítico, siempre bajo aplicación de una carga, se produzca unión entre la célula-sustrato.

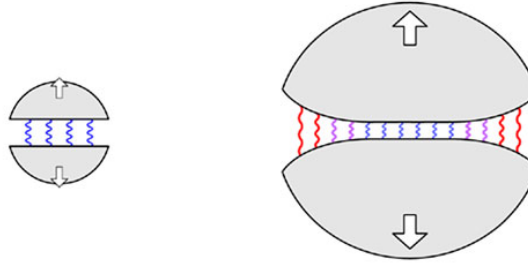


Figura 2.2: Esquema de aplicación de la carga sobre una célula [30].

La formulación matemática del Modelo de Daño de la interfaz, se basa en la Mecánica del Daño Continuo combinada con la Mecánica de la Fractura Lineal, véase Anexo B.

La gran experimentación en este campo, ha llevado a la formulación de diferentes modelos teóricos en los últimos años sobre dinámica celular. Los cuales nos han permitido aproximar el comportamiento adhesivo entre la célula y el sustrato, a un comportamiento mecánico inicial lineal seguido de un decaimiento también lineal (ver figura 2.3 y 2.4).

Se define la relación constitutiva entre los esfuerzos \mathbf{t}_i y los desplazamientos relativos δ_i en la interfaz como:

$$\begin{cases} \beta k_{0i} \delta_i & \text{si } \delta_i < \delta_{ci} \\ 0 & \text{si } \delta_i \geq \delta_{ci} \end{cases} \quad i=1, 2, 3 \quad (2.1)$$

donde K_{0i} representa la rigidez lineal inicial, δ_{ci} el desplazamiento máximo permitido a partir del cual rompe la interfaz, δ_i el desplazamiento en la dirección i para cada instante y β el grado de adhesión entre célula y sustrato. Donde β es la variable que cuantifica el grado de adhesión entre la célula y el sustrato, a través de un escalar que varía entre 0 y 1, el cual se explicará con mayor detalle más adelante. Todos ellos son evaluados para $i=1, 2, 3$; aunque se puede simplificar para $i=1, 2$; ya que en nuestro modelo se atribuyen propiedades idénticas para ambas direcciones tangenciales.

Este modelo se puede también formular en base a 3 propiedades mecánicas que podemos obtener fácilmente de ensayos experimentales para ambas direcciones: t_{0i} (máxima tensión soportada por la interfaz), K_{0i} (rigidez inicial de la interfaz) y δ_{ci} (máximo desplazamiento permitido). El resto de valores se pueden obtener conocidos los anteriores (ver figura 2.3 y figura 2.4).

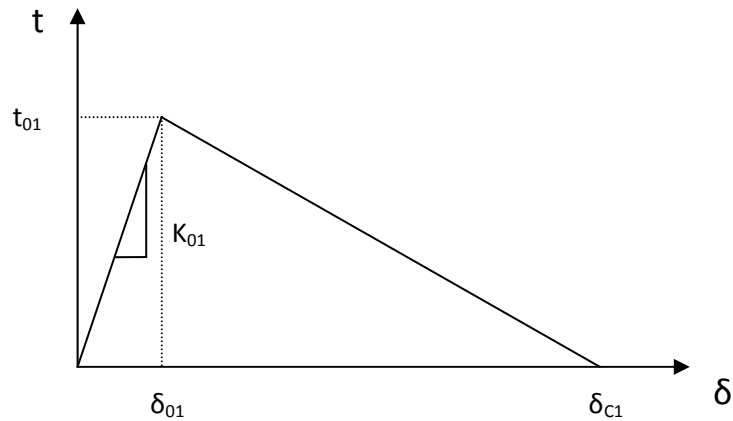


Figura 2.3: Representación del modelo constitutivo en la dirección normal.

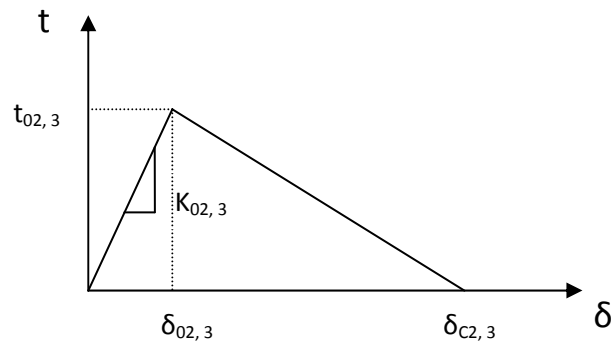


Figura 2.4: Representación del modelo constitutivo en la dirección tangencial 2 y 3.

Conocidos los valores anteriores, podemos determinar el desplazamiento máximo relativo de la zona lineal, δ_{0i} para ambas direcciones:

$$\delta_{0i} = \frac{t_{0i}}{k_{0i}} \quad (2.2)$$

El grado o tasa de adhesión en el que se encuentra la interfaz, dependerá de la variación de las propiedades elásticas en función de una cierta variable de estado, conocida como variable de daño d . Esta variable de estado se ha modificado según se muestra en la fórmula 2.3, para hablar de β , variable o grado de adhesión, con la que se representa el porcentaje de adhesión producida entre las moléculas de actina y las moléculas de la matriz extracelular (ECM).

$$\beta = 1 - d \quad (2.3)$$

Con la ley matemática 2.3, se obtienen valores del grado de adhesión β comprendidos entre $[0 -1]$, de tal modo que cuando se obtenga un valor de $\beta=0$, significará que nuestra interfaz célula-sustrato se encuentra totalmente separada o dañada; mientras que si obtenemos valores de $\beta=1$, significará que nuestra interfaz célula-sustrato se encuentra totalmente adherida. Cuando se obtengan valores contenidos en el rango de $\beta= [0 -1]$, serán los factores mecano-químicos los que marquen la evolución del grado de adhesión, los cuales se desarrollarán posteriormente.

Con esta variable de estado, se definirá el estado energético en el que se encuentra la interfaz, en función de los estados de carga y de sus propiedades mecano-químicas. Se evaluará la evolución de nuestra interfaz hacia un estado nuevo, cuyo valor depende del estado anterior. En función de la dirección que adopte nuestra variable de estado, es decir, si aumenta su valor entre $[0-1]$ significará que está adhiriendo nuestra interfaz, mientras que si disminuye su valor significará que se está soltando la célula del sustrato.

Con este modelo se puede evaluar la rigidez para cada una de las partes, en cada instante, para cada una de las direcciones, a través de la siguiente expresión:

$$K_i = \beta K_{0i} \quad (2.4)$$

siendo β el grado o tasa de adhesión en cada una de las direcciones, K_{0i} la rigidez lineal inicial en cada una de las direcciones y K_i la rigidez actual de la interfaz en cada dirección, la cual también puede ser expresada en términos de desplazamientos como:

$$K_i = \frac{t_i(\bar{\delta}_i)}{\bar{\delta}_i} \quad (2.5)$$

Este modelo presenta un grado de adhesión común para todas las direcciones, en el que se engloban las contribuciones a normal y a tangencial, y que es formulado en función de un potencial mecano-químico μ , en términos de desequilibrio termodinámico y cinético.

El modelo propuesto, se basa en el modelo de Olberding et al. [7] y en el marco de la Teoría del Estado de Transición, como fue planteado por Vineyard [32], se consideran dos estados distintos en los que se puede encontrar nuestra interfaz: unión o separación, como se muestra en la figura 2.5, en términos de energía libre de Gibbs y diferenciados por una barrera de transición de estado μ , que será el potencial mecano-químico.

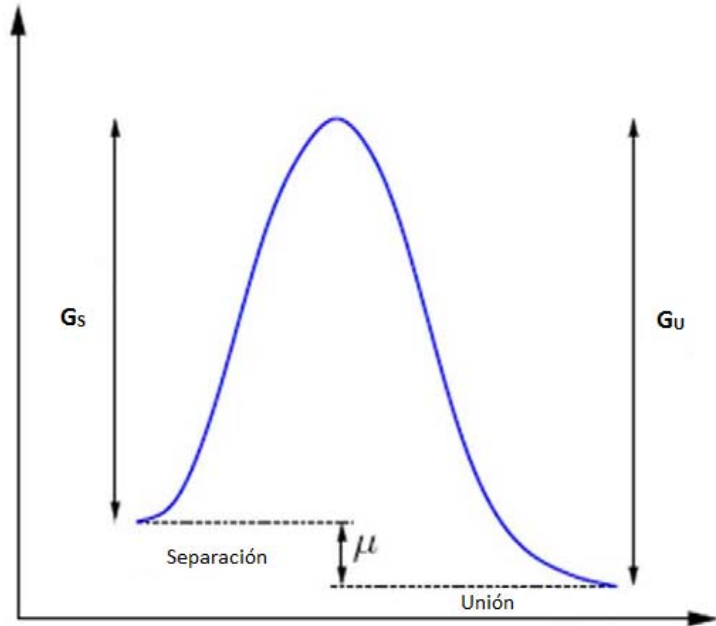


Figura 2.5: Esquema de los estados de unión, separación y de la barrera de transición en términos energéticos.

Este potencial mecano-químico que relaciona los diferentes estados de la interfaz, marcará el estado de transición entre ambos:

$$\mu = G_u - G_s \quad (2.6)$$

por tanto, si $\mu \geq 0$ se producirá adhesión, y si $\mu < 0$ se producirá separación.

Los procesos de unión-separación quedan definidos por una ley que depende de un coeficiente cinético k , y de un potencial mecano-químico μ , en términos del desequilibrio termodinámico y cinético.

2.2.2. EVOLUCIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTADO

La evolución de nuestra variable de adhesión β , se determinará en función de dos procesos claramente diferenciados. Uno debido al proceso mecano-químico que se formulará a continuación, y otro debido al fenómeno de rotura de la interfaz que será determinado por la sollicitación máxima que resiste ésta.

Con la ecuación 2.7 se define la ley evolución de la variable de estado β , bajo cargas estáticas en función de los parámetros que determinan el estado de adhesión de la interfaz, en términos de energía.

$$\dot{\beta} = w \cdot \exp[-G_s / k_B T] - w \cdot \exp[-G_u / k_B T] \quad (2.7)$$

donde w es la frecuencia efectiva asociada a la vibración atómica, K_B es la cte de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, G_s es la energía libre Gibbs necesaria para pasar del estado de adhesión al estado de transición y G_u la correspondiente barrera que determina el paso del estado de separación al de transición.

Se definen dos condiciones de beta distintas en función de cuál de los dos estados es termodinámicamente favorecido. Por tanto, se supondrá que la interfaz está completamente unida o adherida, si sustituyendo en las ecuaciones 2.3 y 2.4, evaluadas para $\mu \geq 0$, se obtiene:

$$\dot{\beta} = w \cdot \exp[-G_s / k_B T] (1 - \exp[-\mu / k_B T]) \quad \mu \geq 0 \quad (2.8)$$

Se supondrá que la interfaz está completamente separada, si sustituyendo en las ecuaciones 2.3 y 2.4, evaluadas para $\mu < 0$, obtenemos:

$$\dot{\beta} = w \cdot \exp[-G_u / k_B T] (\exp[-\mu / k_B T] - 1) \quad \mu < 0 \quad (2.9)$$

Por último, si se evalúan en las ecuaciones 2.4, 2.5, 2.6 el caso para el cual $\dot{\beta} = 0$, para todas se cumple con $\mu = 0$, esto quiere decir que los estados de adhesión-separación están en equilibrio termodinámico.

Del mismo modo que propuso Bell [33], la barrera que marca el paso del estado de adhesión al estado de daño o separación, puede ser determinada por una fuerza debidamente orientada, la cual se expresa en términos energéticos:

$$G_u = F_u - \mu_{\text{lim}} \quad (2.10)$$

donde F_u es la componente energética necesaria para que se produzca la unión independiente de la fuerza, G_u es la energía libre de Gibbs generada en la unión y μ_{lim} es la energía mínima que hay que aplicar para que se active el mecanismo de separación de la interfaz, que se explicará con mayor detenimiento en el siguiente subapartado.

Para una mayor simplificación del modelo se proponen dos coeficientes cinéticos para los procesos de unión k_u y separación k_s , los cuales son formulados como:

$$k_u = w \cdot \exp[-G_s / k_B T] \quad \mu \geq 0 \quad (2.11)$$

$$k_s = w \cdot \exp[-G_u / k_B T] \quad \mu < 0 \quad (2.12)$$

Sustituyendo las ecuaciones 2.8 y 2.9 en 2.5 y 2.6 se obtiene:

$$\dot{\beta} = \begin{cases} k_u \cdot (1 - \exp[-\mu / k_B T]) & \text{para } \mu > 0 \\ k_s \cdot (\exp[\mu / k_B T] - 1) & \text{para } \mu \leq 0 \end{cases} \quad (2.13)$$

Como se ha citado al comienzo, no sólo depende la evolución de la variable de estado de un proceso mecano-químico, sino también del fenómeno de rotura de la interfaz. La rigidez asociada a cada una de las direcciones marcará en cada instante el valor de tensión límite soportado por la interfaz. Si sólo se tuviera en cuenta la evolución marcada por la ecuación 2.13, para todo $\mu \geq 0$, nuestro grado de adhesión seguiría aumentando indefinidamente. Es por ello que se debe limitar mediante un límite de rotura, la tensión máxima que resiste la interfaz para cada una de las direcciones. De este modo, si se supera este valor límite, ésta comenzará a separarse, pudiendo llegar al punto denominado punto de rotura, en el cual no existe unión o adherencia alguna entre la célula y el sustrato.

2.2.4. CONTRIBUCIONES AL POTENCIAL MECANO - QUÍMICO

Como se ha referenciado a lo largo del capítulo, en este modelo se ha formulado el grado de adhesión en función de unos coeficientes cinéticos y de un potencial mecano-químico. El potencial mecano-químico se formula como:

$$\mu = \mu_c + \mu_{el} + \mu_{conf} - \mu_{lim} \quad (2.14)$$

A continuación se explican cuáles son las diferentes contribuciones que regulan el potencial mecano-químico.

2.2.4.1. Contribución química

Considerando las entalpías de las moléculas libres y unidas, H y F respectivamente, la concentración de los enlaces libres c y la entalpía mixta

$-k_B T \log\left(\frac{c}{c_{max}}\right)$, se obtiene la contribución química del potencial mecano-químico [7]:

$$\mu_c = F - H - k_B T \log\left(\frac{c}{c_{max}}\right) \quad (2.15)$$

Cuando los elementos de la interfaz no son libres de adoptar diferentes configuraciones, dejan de contribuir a la entropía de la energía libre, o lo que es lo mismo dejan de contribuir al potencial mecano-químico.

2.2.4.2. Contribución elástica

La energía libre elástica asociada con la deformación de las adhesiones focales, depende de la geometría, de las propiedades mecánicas de éstas y de cómo las cargas se transmiten a través de ellas. Para la formulación de la contribución elástica se tienen en cuenta dos fenómenos distintos que suceden al mismo tiempo dentro de la célula. Uno debido a la contribución elástica generada al aplicar una fuerza sobre ella, y otro debido a la contribución elástica generada por la curvatura de la membrana celular.

Con respecto a la primera contribución, al aplicar una carga sobre un sustrato elástico, obtenemos la siguiente energía libre elástica por elemento de nuestra interfaz:

$$G_{el}^f = \frac{1}{2} \frac{t^2}{k_0 \beta} - \frac{t^2}{k_0 \beta} = -\frac{1}{2} \frac{t^2}{k_0 \beta} \quad (2.16)$$

donde k_0 es la rigidez inicial de nuestra interfaz, t es la tensión de nuestra interfaz y β el grado de adhesión en ese instante.

Por tanto la contribución elástica al potencial mecano-químico debida a la aplicación de una fuerza de tracción sobre una célula, es:

$$\mu_{el}^f = \frac{\partial G_{el}^f}{\partial \beta} = \frac{1}{2} \frac{t^2}{k_0 \beta^2} \quad (2.17)$$

Con respecto a la segunda contribución, las membranas celulares adoptan una curvatura espontánea en función de gran variedad de factores. Para que se produzca la unión de la célula al sustrato, se requiere que la membrana celular sea estirada desde

su configuración preferida curvada, k , hasta una curvatura 0 [34]. Por tanto la energía libre elástica por elemento de nuestra interfaz:

$$G_{el}^c = \frac{1}{2} \frac{Bk^2 \beta}{\hat{c}_{\min}} \quad (2.18)$$

Por tanto la contribución elástica al potencial mecano-químico asociada a la curvatura celular, es:

$$\mu_{el}^c = \frac{\partial G_{el}^c}{\partial \beta} = \frac{1}{2} \frac{Bk^2}{\hat{c}_{\min}} \quad (2.19)$$

Finalmente la contribución elástica total al potencial mecano-químico queda:

$$\mu_{el} = \mu_{el}^f + \mu_{el}^c \quad (2.20)$$

2.2.4.3. Contribución debida a cambios conformacionales

Los cambios conformacionales favorecen el crecimiento de las adhesiones focales bajo tensión, como ha sido demostrado para las moléculas de Vinculina, Talina y Fibronectina, las cuales son proteínas citoplasmáticas [15, 35]. Guiados por estas afirmaciones, se supone una posible contribución energética al aplicar una tensión sobre la célula, la cual dependerá de U , que es el cambio en la energía interna de la molécula y de la fuerza aplicada sobre esta. Por tanto la contribución conformacional al potencial mecano-químico queda:

$$\mu_{conf} = U - P.d \quad (2.21)$$

donde P es el valor de la carga aplicada y d la longitud sobre la cual se produce dicho cambio conformacional.

Esta contribución será despreciada como posteriormente se indicará en el apartado de aproximaciones.

2.2.4.4. Potencial límite

Como ya se ha comentado en la formulación del modelo matemático de interfaz, se ha definido un potencial límite, que determinará la barrera energética a partir de la cual la interfaz pasa de un estado de separación a un estado en el que comienza a adherir. Este potencial límite representa la energía mínima que necesita la interfaz para que comiencen a generarse estas uniones o enlaces conocidos como adhesiones focales.

Para la determinación de este parámetro, se han trasladado los resultados obtenidos en los ensayos de Bell [33] y de los del modelo teórico de Olberding [7]. Basándose en la hipótesis, de que en la ausencia de cargas o aplicando cargas muy bajas la interfaz no se une, y que a partir de la aplicación de una carga de tracción en torno a: $P = 1^{-3}$ pN, la interfaz comienza a unirse. Se puede así determinar el valor del potencial límite como:

$$\mu_{\text{lim}} = -P\gamma \quad (2.22)$$

donde el parámetro γ vale 3.654nm, que es la proyección en la dirección del vector fuerza de la deformación sufrida por la unión antes de romperse, y P el valor de carga citado. Por tanto, el valor que adopta el potencial límite queda:

$$\mu_{\text{lim}} = -3,654 \cdot 10^{-6} \text{ pN} \cdot \mu\text{m}$$

2.2.4.5. Formulación general y aproximaciones

De la combinación de las ecuaciones 2.11, 2.16, 2.17, 2.18, se obtiene la contribución total del potencial mecano-químico, expresado en términos energéticos:

$$\mu = \mu_c + \mu_{el} + \mu_{conf} - \mu_{\text{lim}} \quad (2.14)$$

Una de las aproximaciones que se realiza sobre el potencial total, se obtiene del estudio de Olberding y Garikipati [6], basada en experimentos que demuestran que la adhesión focal no crece en ausencia de fuerza. Por tanto:

$$\mu_c + U = 0 \quad (2.23)$$

Por tanto, las contribuciones conformacional y química no se tendrán en cuenta inicialmente, quedando la formulación general del potencial mecano-químico como:

$$\mu = \mu_{el} - \mu_{lim} \quad (2.24)$$

De este modo, cuando la contribución elástica sea mayor que el potencial límite marcado, se obtendrá un potencial positivo y se producirá la unión o adhesión de nuestra célula al sustrato, y cuando este valor límite supere la contribución elástica, se obtendrá un potencial negativo y se producirá la separación de la célula al sustrato. Tal y como esta formulado, no pueden darse los dos fenómenos al mismo tiempo en cada elemento de la interfaz, pero si se pueden dar al mismo tiempo en diferentes puntos de nuestra célula, lo que permitirá observar cómo evoluciona el grado de adhesión en torno a su superficie.

2.3. ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS

Como se ha comentado en el apartado anterior, este modelo puede también formularse en base a 3 propiedades mecánicas que se pueden determinar fácilmente de ensayos experimentales para ambas direcciones (ver figura 2.6).

$$\left\{ \begin{array}{l} \mathbf{t}_{0i} \text{ (tensión máxima soportada por la interfaz)} \\ \mathbf{K}_{0i} \text{ (rigidez inicial de la interfaz)} \\ \delta_{ci} \text{ (máximo desplazamiento permitido)} \end{array} \right.$$

El resto de valores se obtienen una vez conocidos los anteriores.

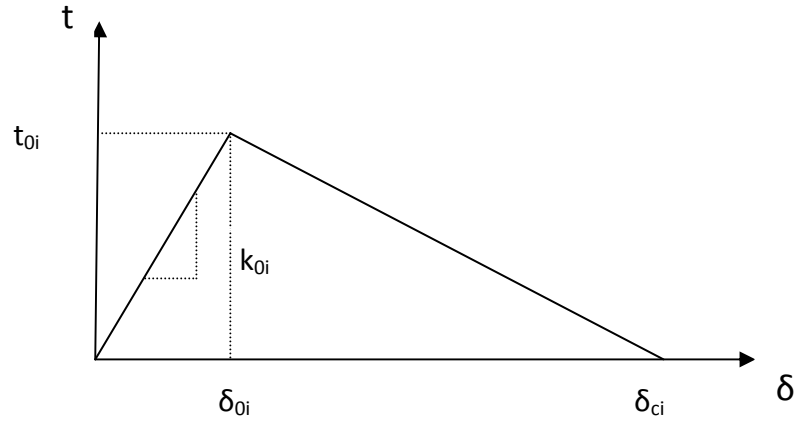


Figura 2.6: Esquema de los parámetros que definen la interfaz.

Cabe destacar que este modelo sirve para cualquier valor de rigidez y tensión de interfaz, así como de la célula y sustrato, pero se muestran a continuación los valores elegidos para realizar las simulaciones computacionales:

- La rigidez inicial en la dirección normal: $K_{01}=10\text{KPa}$
- La rigidez inicial en la dirección tangencial: $K_{02,3}=10\% K_{01}=1\text{KPa}$
- La tensión máxima soportada por la interfaz: $t_{0i}=100\text{pN}/\mu\text{m}^2$
- Desplazamiento máximo permitido en dirección normal: $\delta_{c1}=0.1 \mu\text{m}$
- Desplazamiento máximo permitido en dirección tangencial: $\delta_{c2,3}=1 \mu\text{m}$

Por tanto ya podemos calcular los desplazamientos iniciales:

- Desplazamiento inicial en la dirección normal: $\delta_{01}=0.01 \mu\text{m}$
- Desplazamiento inicial en la dirección tangencial: $\delta_{02,3}=0.1 \mu\text{m}$

En la siguiente tabla 2.1 se presentan un resumen de los parámetros utilizados para las diferentes simulaciones computacionales:

Parámetro	Descripción	Valor	Observaciones
K_{01}	Rigidez inicial en la dirección normal	10 KPa	[7]
K_{02}	Rigidez inicial en la dirección tangencial	1 KPa	Estimado
t_{0i}	Tensión máxima soportada por la interfaz	100 pN/ μm^2	[7]
δ_{c1}	Desplazamiento max permitido a normal	0.1 μm	Estimado
δ_{c2}	Desplazamiento max permitido a tang.	1 μm	Estimado
δ_{01}	Desplazamiento inicial en dirección normal	0.01 μm	Estimado
δ_{02}	Desplazamiento inicial en dirección tang.	0.1 μm	Estimado
μ_{lim}	Potencial límite	3.654^{-6} pN. μm	Estimado
K_B	Constante de Boltzmann	1.380648^{-5} pN. $\mu\text{m}/\text{K}$	[7]
T	Temperatura absoluta	310 K	[7]
B	Módulo de curvatura	10^{-4} pN. μm^2	[7]
K	Curvatura de la membrana celular	1 μm^{-1}	[7]
k_u	Coefficiente cinético de unión	0.002 s^{-1}	Estimado
k_s	Coefficiente cinético de separación	3.096^{-3} s^{-1}	Estimado
γ	Coefficiente de desplazamiento	1.48 nm	[7]

Tabla 2.1: Los *parámetros* usados en las simulaciones computacionales.

2.4. IMPLEMENTACIÓN NUMÉRICA DEL MODELO

2.4.1. INTRODUCCIÓN

Para poder simular el fenómeno de la adhesión focal se debe implementar el modelo matemático en un modelo numérico.

Con esta simulación numérica se pretende reproducir en 3D, las deformaciones sufridas por el sustrato con respecto al citoesqueleto al aplicar una carga de tracción sobre la célula, usando el Método de Elementos Finitos (MEF).

En primer lugar, se define un elemento interfaz, para posteriormente determinar el modelo 3D formado por el conjunto sustrato-interfaz-célula, sobre el que se realizarán las diferentes simulaciones computacionales y en las que se visualizará como varía nuestro grado de adhesión y el resto de variables de estado, aplicando diferentes estados de carga y variando las propiedades del material.

2.4.2. DEFINICIÓN DE GEOMETRÍAS 3D

La simulación de la interfaz con el MEF suele realizarse mediante la creación de una fina capa de elementos 'interfaz', definiendo así la unión entre ambos materiales, en este caso célula-sustrato, en la cual se implementará el comportamiento de la interfaz. El comportamiento y propiedades de estos elementos se establecen en función de los esfuerzos y desplazamientos relativos sufridos a ambos lados. En cada elemento se define un sistema de referencia local considerando el eje 1 como la dirección normal, y el eje 2 y 3 las direcciones tangenciales (ver figura 2.7).

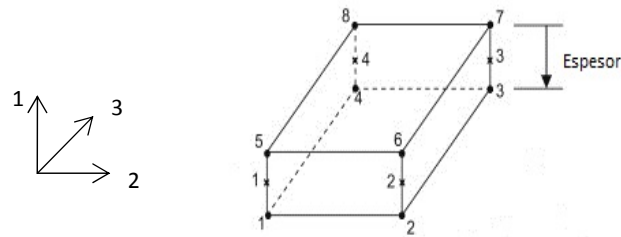


Figura 2.7: Definición del elemento interfaz.

Como se observa en la figura 2.7, el elemento interfaz es un elemento hexaédrico formado por 8 nodos y 4 puntos de integración. Los puntos de integración o puntos de Gauss, son aquellos en los que se calcularán las variables de estado.

En este modelo se asumirá para ambas direcciones tangenciales el mismo comportamiento, siendo esta una de las principales diferencias frente al modelo publicado por Olberding et al. [7], puesto que ellos sólo han tenido en cuenta las contribuciones en la dirección normal, despreciando la rigidez en la dirección

tangencial. Por tanto su modelo no sirve si se aplican cargas en la dirección tangencial, puesto que no sería capaz de soportar la carga mecánica.

Tanto el tipo de elemento como las dimensiones elegidas para los dos tipos de elementos, intentan representar de la manera más sencilla posible la geometría correspondiente a la actina (parte superior del modelo), membrana celular (interfaz), y sustrato (parte inferior del modelo), como se muestra esquemáticamente en la figura 2.8.

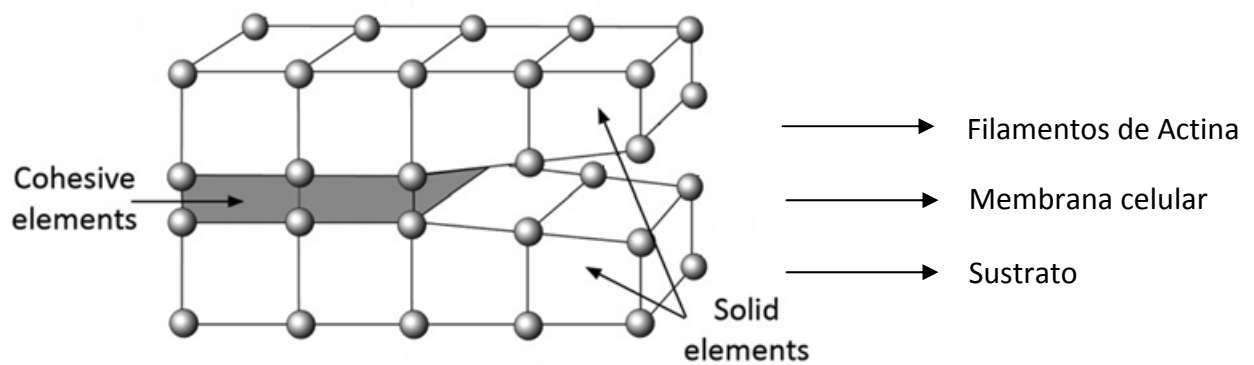


Figura 2.8: Representación esquemática del modelo de Elementos Finitos.

En la figura 2.8 se hace una representación esquemática del modelo numérico basado en el Método de los Elementos Finitos con el que se pretende simular el fenómeno de la adhesión focal.

Para los elementos cohesivos de la interfaz se ha elegido un elemento de dimensiones: $0.2 \times 1 \times 0.01 \mu\text{m}$ de largo, ancho y alto respectivamente. Para el resto de elementos sólidos se ha definido un elemento de dimensiones: $1 \times 1 \times 1 \mu\text{m}$ de largo, ancho y alto respectivamente.

Para evaluar el potencial del modelo expuesto, se plantea un modelo de elementos finitos que consta de 45 elementos hexaédricos en total, de los cuales 15 son elementos tipo interfaz (los situados en la zona media) y los otros 30 se distribuyen en 15 superiores que simulan la célula, y 15 inferiores que simulan el sustrato. Este sencillo modelo servirá para comprobar la validez o no de nuestro modelo matemático, y presenta una gran ventaja que es su versatilidad, pudiendo seleccionar cualquier tipo de material para cada una de las partes y pudiendo variar su

comportamiento variando sus propiedades mecánicas, como se explica en Anexo B. El modelo se muestra en la figura 2.9.

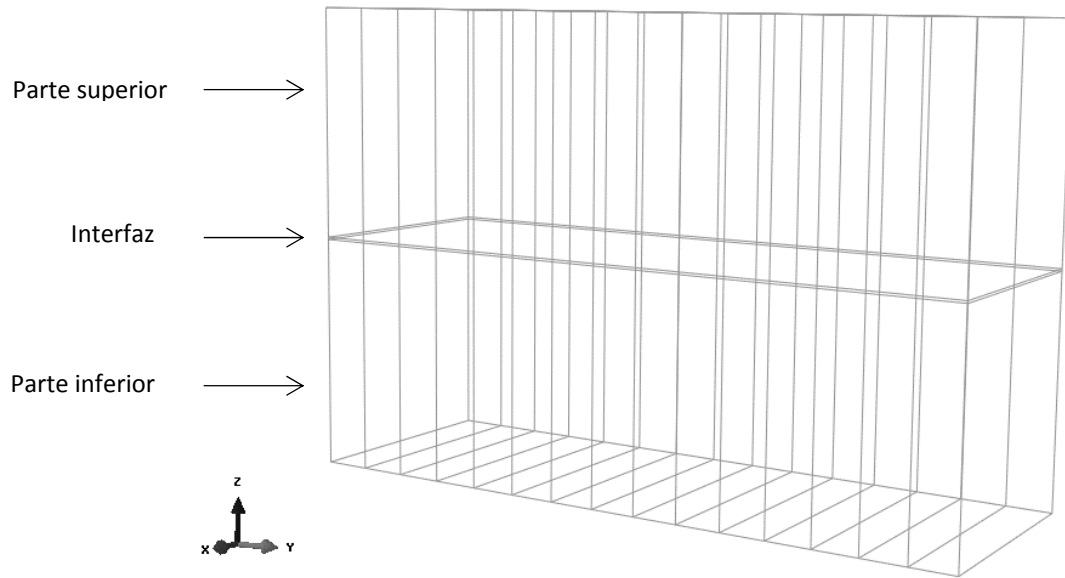


Figura 2.9: Representación gráfica del modelo numérico de Elementos Finitos.

2.4.3. MATERIALES Y UMAT

Para la determinación de las propiedades de los elementos pertenecientes a la parte superior e inferior del modelo, correspondientes a la célula y sustrato respectivamente, se han tomado los valores a partir de ensayos biológicos celulares [2, 3, 4]. Dependerá del tipo de célula y sustrato elegido para realizar las simulaciones, los valores de las variables de estado a estudiar, como el grado de adhesión, desplazamiento en cada dirección, etc.

Para las simulaciones se han definido 2 sustratos elásticos, tipo hidrogeles biológicos utilizados en estudios de migración celular [36]. El hidrogel elegido para las simulaciones es un PEG (polietilenglicol), tomando uno más rígido (PEG_1) con un módulo de Young de 1GPa y coeficiente de Poisson de 0.4, y otro más flexible (PEG_2) con un módulo de Young de 1kPa y coeficiente de Poisson de 0.4. Las propiedades elegidas para la célula son de un módulo de Young de 1GPa y coeficiente de Poisson de

0.4, determinado teóricamente para garantizar la correcta distribución de cargas a lo largo de la superficie.

La realización de las simulaciones con dos tipos distintos de sustrato resulta de gran interés, ya que las propiedades del material influyen notablemente en el comportamiento del modelo, pudiendo así visualizar cómo varía el grado de adhesión focal en función del tipo de sustrato seleccionado.

La interfaz, se ha implementado mediante una rutina de usuario UMAT (User Defined Material) programada con el lenguaje FORTRAN, con la que se puede definir cualquier tipo de material en función de las propiedades mecánicas deseadas, y mostrar todos los resultados que interesen para cada punto de la interfaz mediante la definición de las variables de estado.

Las ventajas de implementar la interfaz con un elemento de usuario UMAT, en vez de con los elementos predefinidos por ABAQUS, es que se puede aplicar al modelo estados de cargas complejos, aplicarle condiciones de contacto y fricción, o hacer un análisis estático o dinámico.

La rutina utilizada para definir el comportamiento de nuestra interfaz se muestra en el Anexo C.

2.4.4. MALLA DEL MODELO DE ELEMENTOS FINITOS

Para el mallado del modelo definido, se ha elegido un tipo de elemento diferente para la interfaz y para el resto de la geometría. Para la parte superior e inferior se ha escogido un elemento de los ofrecidos en la biblioteca de ABAQUS, el C3D8, que es un elemento hexaédrico lineal estándar de 8 nodos. El tamaño empleado para el mallado de estos elementos corresponderá con las dimensiones del mismo, debido a que es de dimensiones reducidas, del orden de micras.

Para la interfaz, se ha escogido un elemento cohesivo hexaédrico de 8 nodos de los ofrecidos en la biblioteca de ABAQUS, el COH3D8. El tamaño de la malla para elementos corresponderá también con el de su geometría.

Los elementos cohesivos se usan cuando se quiere definir una capa de fino espesor o incluso de espesor nulo, que establece el contacto entre otras dos

superficies de mayor espesor, como es en este caso. De este modo se puede así determinar el comportamiento de los puntos de unión de la superficie superior e inferior, obteniendo la deformación en términos de desplazamientos relativos entre ambas superficies, interpolados a los puntos de Gauss. La malla de la geometría correspondiente al modelo numérico se muestra en la figura 2.10.

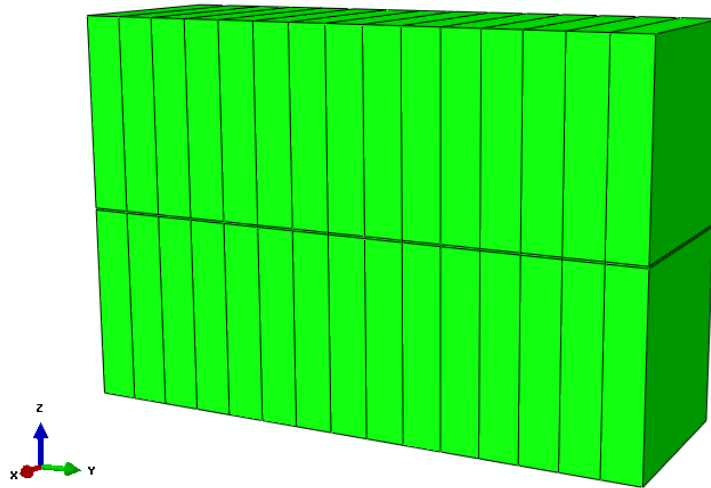


Figura 2.10: Malla del Modelo de Elementos Finitos.

2.4.5. CARGAS Y CONDICIONES DE APOYO

En cuanto a la aplicación de las cargas sobre el modelo, variará en cada una de las simulaciones computacionales. Las cargas se aplicarán sobre los nodos situados en la parte superior (célula), siempre de tracción, ya que en el modelo se pretende simular el fenómeno de contracción celular. Partiendo de los resultados obtenidos en los estudios de Olberding et al. [7], en los cuales aplican una carga \mathbf{P} a 45 grados, uniformemente distribuida sobre toda la superficie y constante en el tiempo, tal y como se muestra en la figura 2.11.

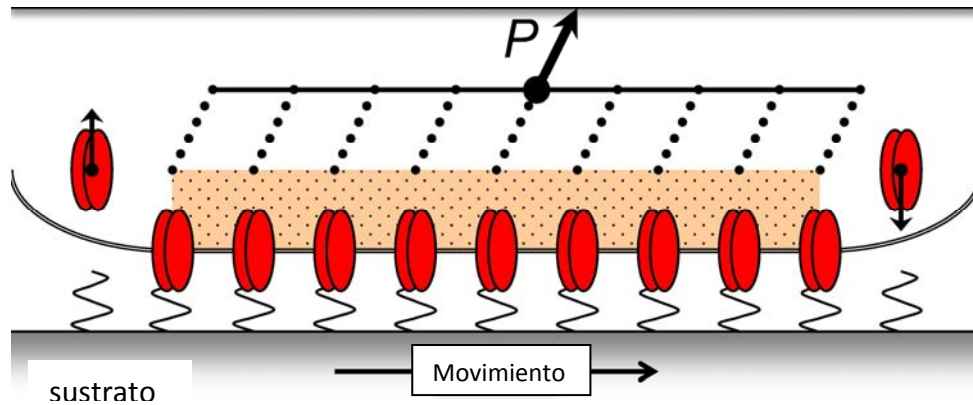


Figura 2.11: *Modelo de Olberding et al. [7].*

En este modelo, compuesto por 15 elementos, se realizarán diferentes simulaciones aplicando la carga P de diversas formas: aplicándola o sólo en los 5 elementos centrales o a lo largo de toda la superficie, aplicando la carga o uniformemente distribuida o lineal a lo largo de la superficie. En las simulaciones, independientemente de cómo se aplique la carga, se realizarán primeramente para un tiempo de 1000 segundos, pudiendo aplicarlas también constantes o lineales en el tiempo. Se ha escogido 1000 segundos para las simulaciones, porque es el tiempo correspondiente a una duración típica de ensayo fuerza según [2, 3, 5].

Se podrán modificar fácilmente las variables que definen el modelo, como las propiedades mecánicas, para así poder estudiar la sensibilidad de la célula a cada una de estas. Esto se verá con mayor profundidad en el siguiente capítulo.

En lo referente a las condiciones de contorno, se restringirán los desplazamientos en las tres direcciones de los nodos correspondientes a la parte inferior del modelo, para impedir su desplazamiento.

CAPÍTULO 3

SIMULACIÓN COMPUTACIONAL DE LA ADHESIÓN CELULAR BAJO DIFERENTES CONDICIONES

3.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presentan los resultados de las diferentes simulaciones computacionales realizadas sobre el modelo numérico de adhesión focal definido en el anterior capítulo, con el fin de entender el comportamiento de la adhesión focal, así como de establecer los parámetros que determinan el estado de la interfaz.

Para cada una de las simulaciones, se ha aplicado una carga de tracción en los nodos pertenecientes a la parte superior del modelo, con el fin de simular las contracciones celulares, que son la causa principal del fenómeno de adhesión focal.

Dicha carga se aplicará únicamente en los 5 elementos centrales, pudiendo de este modo apreciar cómo se comporta la interfaz no sólo en las zonas cargadas sino también en las zonas circundantes que no están sometidas a carga alguna, y así observar cómo se distribuyen las cargas en toda ella, cómo evoluciona el grado de adhesión β , y su distribución en función de la carga aplicada.

3.2. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este apartado se presentan los resultados de las simulaciones computacionales realizadas en el modelo teórico de adhesión focal, así como la representación gráfica de los resultados. Se representará para cada valor de tensión el número de elementos de la interfaz en los que el grado de adhesión β es máximo, con el fin de obtener una mejor comprensión del comportamiento de la misma.

El rango de tensión aplicada en las simulaciones oscilará entre $1 \cdot 10^{-5}$ a 1000 $\text{pN}/\mu\text{m}^2$, ya que se conoce de ensayos experimentales anteriores, como los de Olberding et al. [7], que el rango de tensiones en el que se mueve la adhesión focal se encuentra entre $1 \cdot 10^{-2}$ a 100 $\text{pN}/\mu\text{m}^2$ para una rigidez de la interfaz igual a 10KPa. De este modo, aumentando el rango de carga se podrá evaluar el comportamiento a lo largo de los diferentes estadios que atraviesa, desde que nace hasta que muere.

El sustrato utilizado para las primeras simulaciones ha sido el hidrogel PEG_1, el más rígido de los dos, y para la parte superior del modelo se ha seleccionado también un elemento rígido, definido en el capítulo anterior. Como primera aproximación se considera un elemento con elevada rigidez para la parte superior del modelo correspondiente a la célula, ya que se supone que se corresponde con las fibras de actina de elevada rigidez. De esta forma se garantiza una correcta distribución de la carga sobre todo el dominio de la adhesión focal.

Para la realización de las simulaciones se ha definido un límite inferior y superior de $\beta = [10^{-4} - 1]$, con el fin de evitar problemas de compilación como en divisiones por 0, siendo este el rango entre el que se podrá mover β .

Se ha definido un beta inicial $\beta_{\text{ini}}=0.01$, con el cual comenzarán las simulaciones, correspondiente prácticamente a un estado de no adhesión entre ambas superficies.

El tiempo asignado para cada una de las simulaciones es de 1000 segundos, siendo éste el tiempo también utilizado por Garikipati et al [7] en sus simulaciones, definido como el tiempo en el cual las fibras de actina de una adhesión focal permanecen fuertemente adheridas y son capaces de transmitir la fuerza.

La carga se aplicará linealmente en el tiempo en todas las simulaciones, con el fin de obtener resultados mucho más reales sobre el comportamiento de la interfaz.

Los valores numéricos obtenidos en las siguientes simulaciones de β_{\max} y β_{\min} , para los diferentes estados tensionales a lo largo de la interfaz, se encuentran todos ellos recogidos en el Anexo D.

Como se puede observar en las gráficas expuestas a continuación, se representa el número de elementos en los que β es máximo en la interfaz, para cada estado de carga; así como el valor obtenido de β_{\max} en cada punto, para los casos en los que tiene sentido mostrarlo; es decir, sólo cuando se produce el fenómeno de adhesión focal y no antes ni después, que se encuentra separada o rota la interfaz respectivamente.

3.2.1. SIMULACIONES A TRACCIÓN PURA

Para esta simulación se ha sometido al modelo a una fuerza de tracción constante, únicamente aplicada en la dirección normal (z), como se muestra en la figura 3.1.

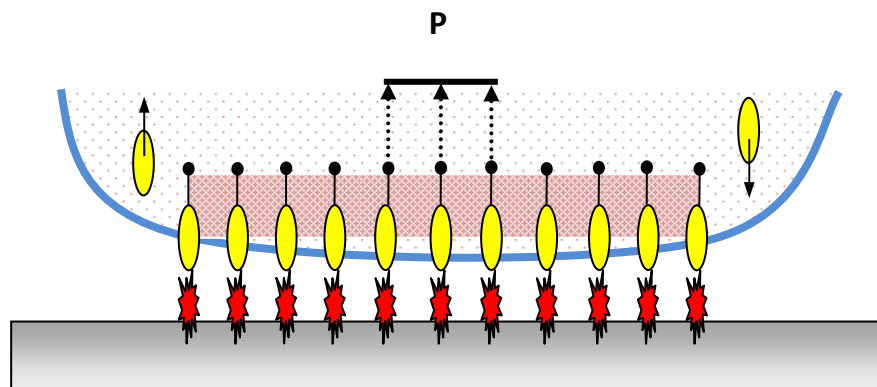


Figura 3.1: Esquema de la aplicación de la carga para el caso de tracción pura.

Como se muestra en la figura 3.2, se aprecian cuatro zonas de comportamiento de la interfaz claramente diferenciadas: neutra, nacimiento, crecimiento o evolución y rotura. Para la primera zona, la zona neutra, como su propio nombre indica, es una zona en la que no se aprecia ningún cambio en el grado de adhesión β . Esto es debido a que al aplicar cargas pequeñas sobre la interfaz, ésta no experimenta adhesión alguna. La segunda zona, es la zona de nacimiento de la adhesión focal, en la cual inicialmente se encuentra separada la interfaz y se observa como comienzan a adherirse unos pocos elementos de ésta, al sobrepasar un cierto estado de carga. La tercera zona, la correspondiente al estado de crecimiento o evolución de la adhesión focal (AF), se observa cómo evoluciona la interfaz hacia un estado en el que un mayor número de elementos se encuentran adheridos, llegando a un punto en el cual se genera el grado máximo de adhesión β_{\max} para dicho estado de carga. Por último, la zona de rotura, que es en la que rompe la interfaz al sobrepasar el estado de carga máximo soportado por ella.

Los resultados obtenidos de esta primera simulación se muestran en la figura 3.2, mostrando para los puntos en los que se produce adhesión, el valor obtenido de β_{\max} , según el estado de carga estudiado. De esta forma se puede evaluar cómo evoluciona el grado de adhesión y sobre que elementos de la interfaz.

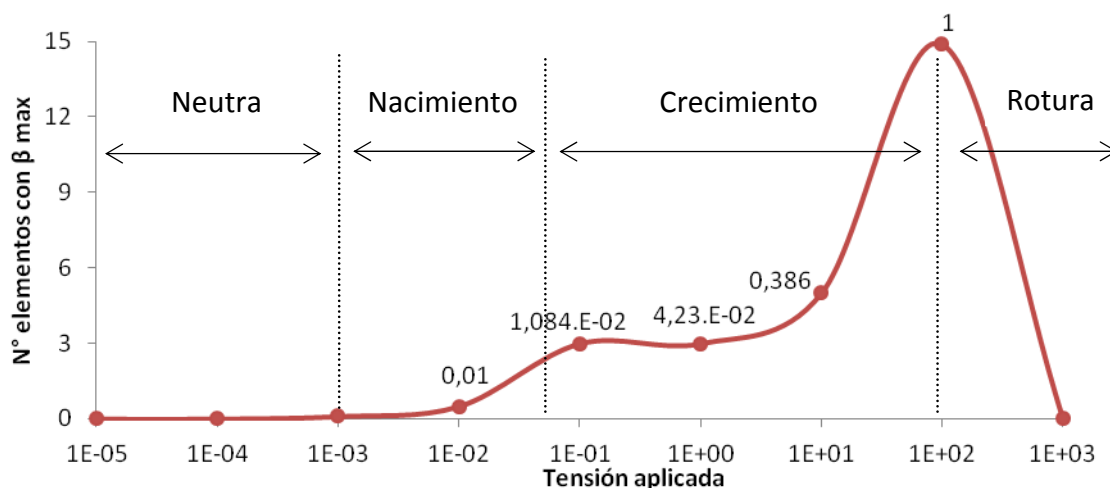


Figura 3.2: Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.1.

3.2.2. SIMULACIONES A TRACCIÓN LINEAL

Para esta simulación se ha sometido al modelo a una fuerza de tracción lineal, únicamente en la dirección normal (z). Esta se aplica en orden creciente, desde los nodos situados más a la izquierda hasta los nodos situados más a la derecha, tal y como se muestra en la figura 3.3.

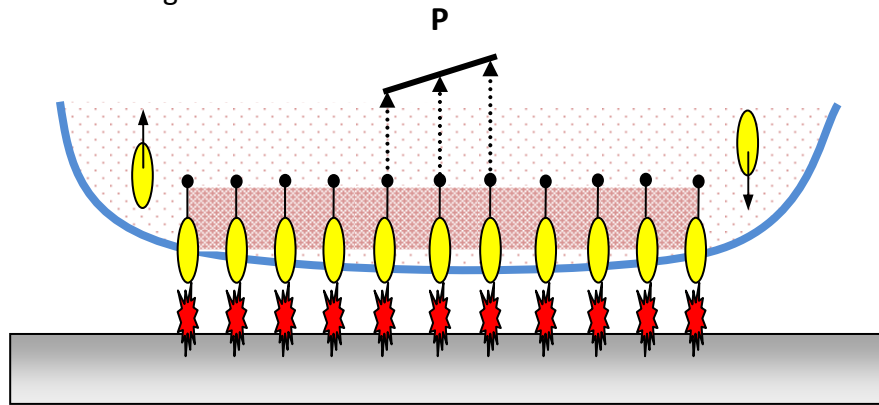


Figura 3.3: Esquema de la aplicación de la carga para el caso de tracción lineal.

Para este caso, los resultados obtenidos en las simulaciones, se adjuntan en la figura 3.4, mostrando para cada estado de carga el valor obtenido de β_{\max} en los puntos en los que se produce adhesión.

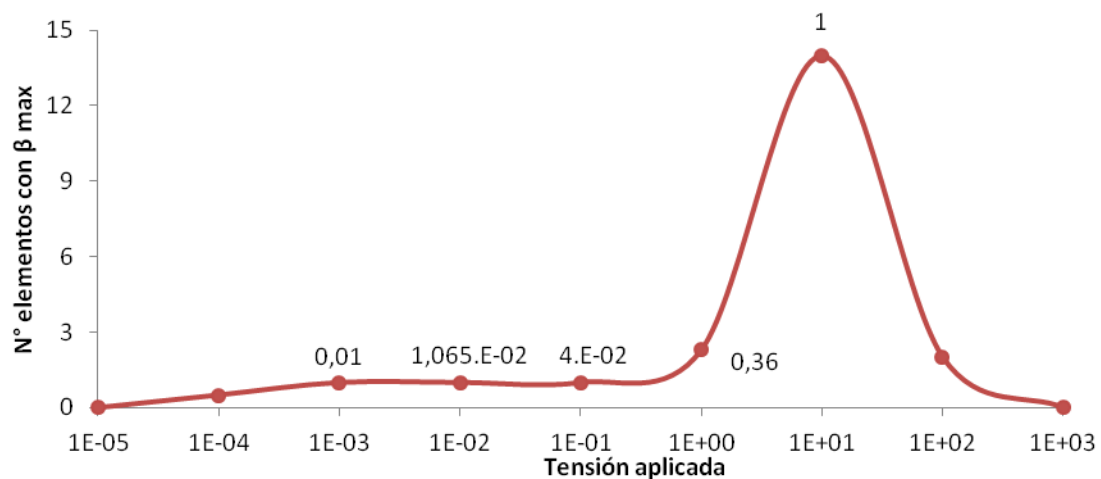


Figura 3.4: Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.3.

3.2.3. SIMULACIONES A TANGENCIAL PURA

Para esta simulación se ha sometido al modelo a una fuerza tangencial constante, únicamente en la dirección tangencial (y), como se muestra en la figura 3.5. Cabe destacar que se ha elegido la dirección (y), puesto que es la más fácil de visualizar sobre el modelo. Obtendríamos resultados idénticos de aplicarla en la otra dirección tangencial (x), puesto que hemos asumido un comportamiento idéntico para ambas direcciones tangenciales.

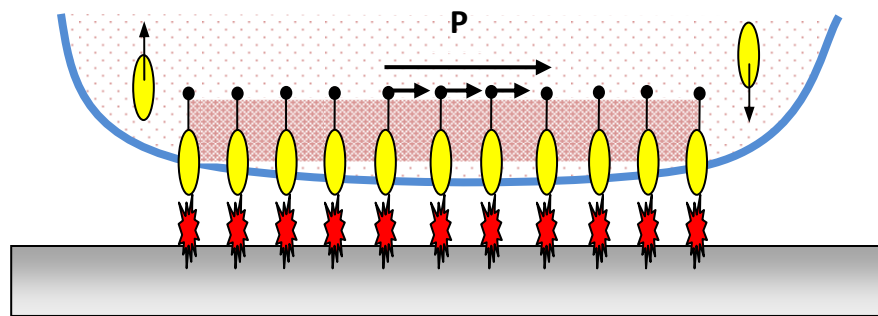


Figura 3.5: Esquema de la aplicación de la carga para el caso de tangencial pura.

Los resultados obtenidos de estas simulaciones se muestran en la figura 3.6, en los que se muestra para cada estado de carga estudiado el valor obtenido de β_{\max} , en aquellos casos en los que se produce adhesión.

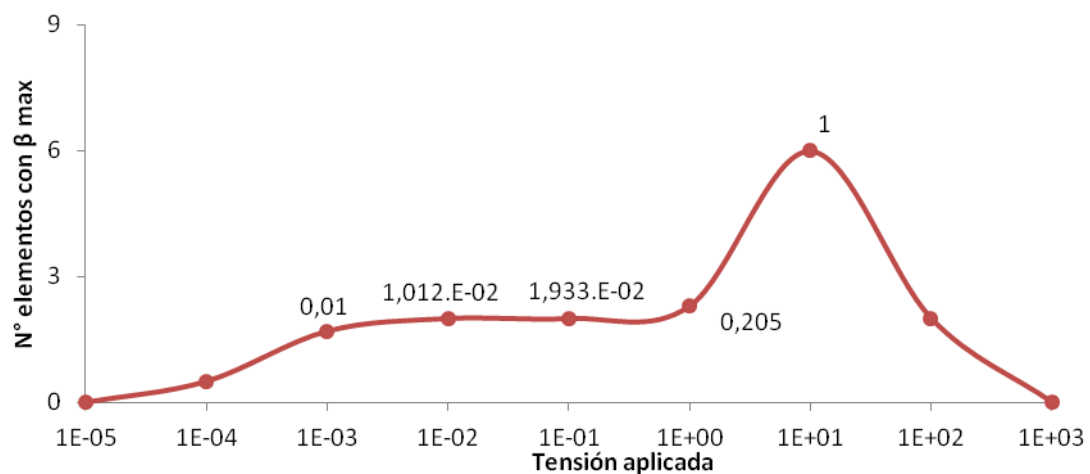


Figura 3.6: Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.5.

3.2.4. SIMULACIONES A TANGENCIAL LINEAL

Para esta simulación se ha sometido al modelo a una fuerza tangencial lineal, en la dirección tangencial (y). Esta se aplica en orden creciente, desde los nodos situados más a la izquierda hasta los nodos situados más a la derecha, tal y como se muestra en la figura 3.7.

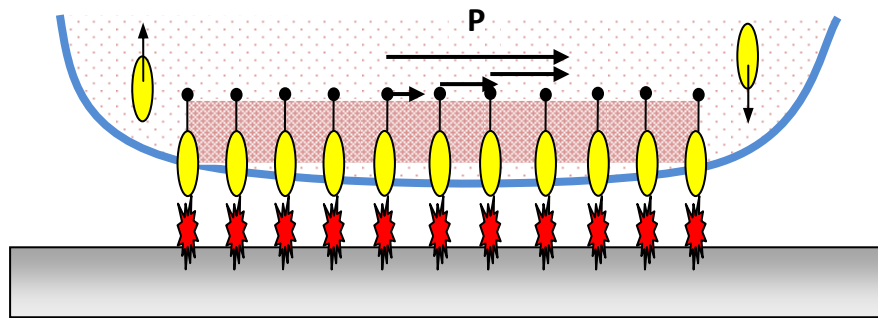


Figura 3.7: Esquema de la aplicación de la carga para el caso de tangencial lineal.

Nuevamente, se adjuntan en la figura 3.8 los valores obtenidos en estas simulaciones, mostrando para cada punto el valor obtenido de β_{\max} en los casos en los que se produce adhesión.

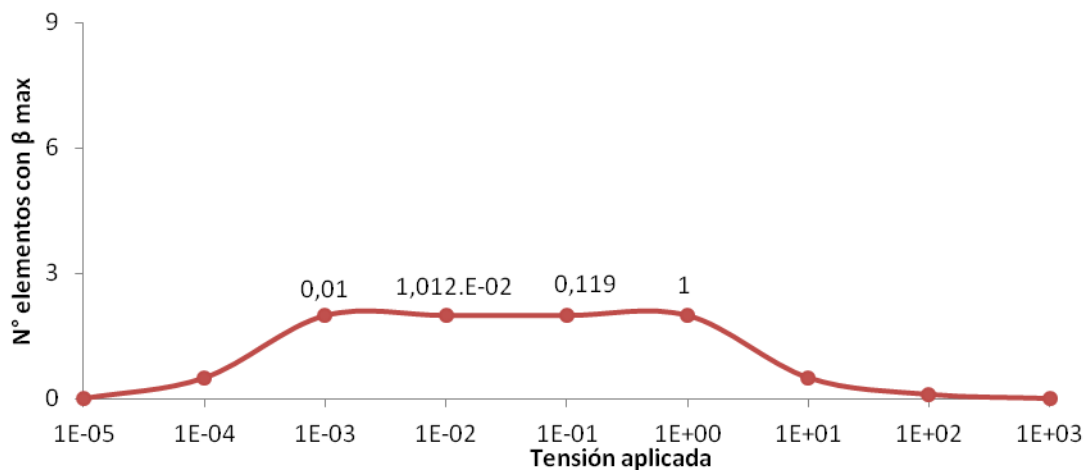


Figura 3.8: Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.7.

3.2.5. SIMULACIONES APLICANDO LA CARGA A 45 GRADOS

Para esta simulación se ha sometido al modelo a una fuerza constante aplicada a 45° sobre la dirección (z) e (y) sobre los 5 elementos centrales, como se muestra en la figura 3.9. Se ha elegido aplicarla en esta dirección puesto que así se podrá comparar los resultados de esta, con los obtenidos para cada una de las direcciones por separado.

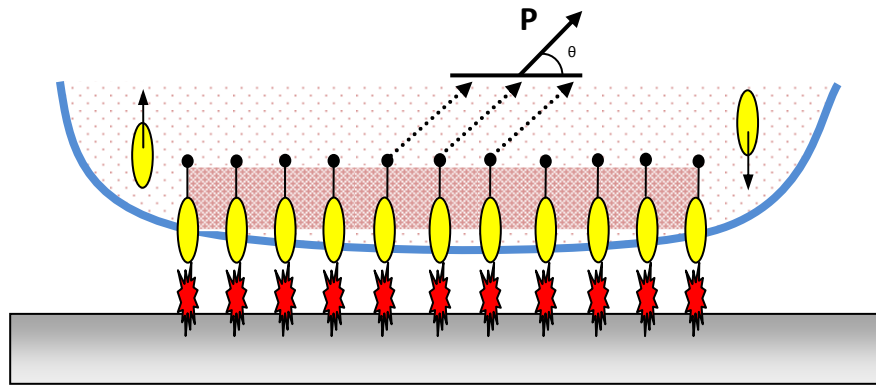


Figura 3.9: Esquema de la aplicación de la carga a 45° .

Los resultados obtenidos en estas simulaciones, se muestran en la figura 3.10, mostrando para cada estado de carga estudiado, el valor obtenido de β_{\max} , en aquellos puntos en los que se produce adhesión.

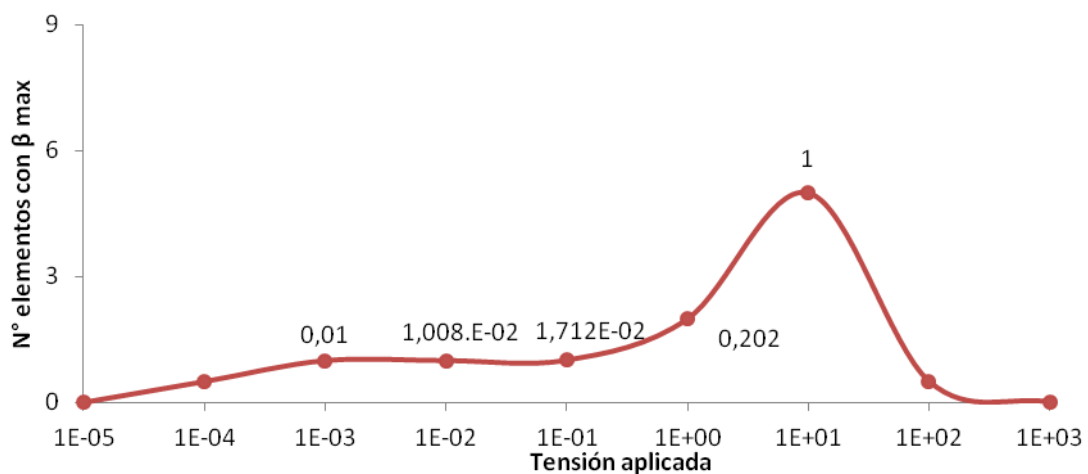


Figura 3.10: Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.9.

3.2.6. SIMULACIONES APLICANDO LA CARGA A 45 GRADOS, LINEAL

Para esta simulación se ha sometido al modelo a una fuerza constante aplicada a 45° sobre la dirección (z) e (y) sobre los 5 elementos centrales, tal y como se muestra en la figura 3.11. Se ha elegido aplicarla en esta dirección puesto que así se podrá comparar los resultados de esta, con los obtenidos para cada una de las direcciones por separado.

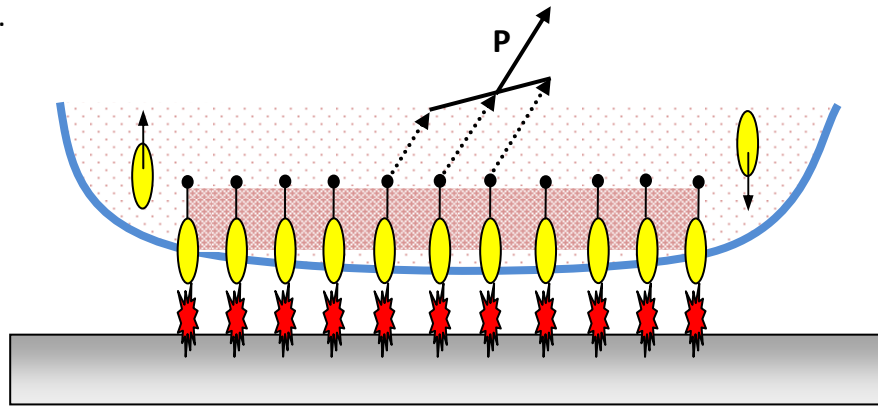


Figura 3.11: Esquema de la aplicación de la carga a 45° lineal.

De nuevo, en la figura 3.12 se adjuntan los resultados obtenidos de las diferentes simulaciones, mostrando el valor obtenido de β_{\max} , en aquellos casos en los que se ha producido adhesión.

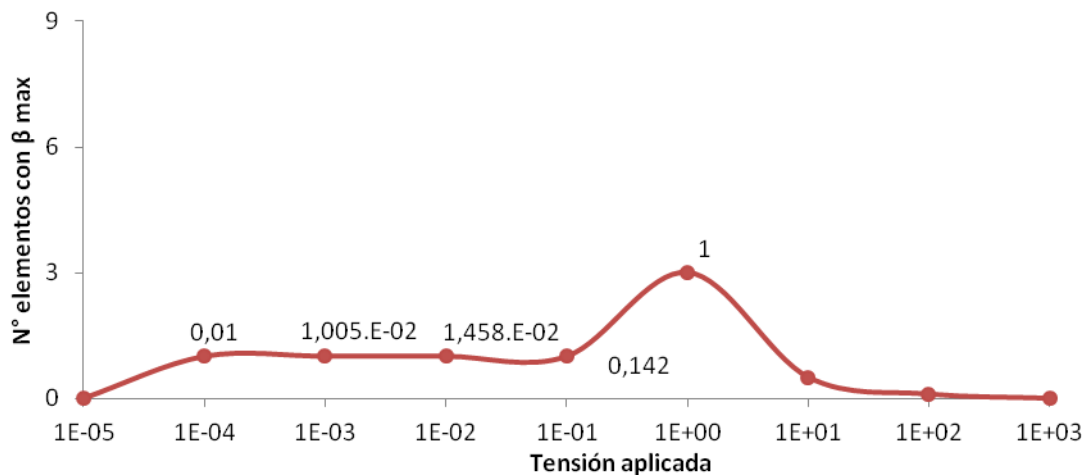


Figura 3.12: Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.11.

3.3. COMPARACIÓN DE RESULTADOS

Como se puede observar en las figuras 3.2 y 3.4 el grado de adhesión evoluciona de manera bastante similar cuando se aplican cargas de tracción sobre los 5 elementos centrales del modelo. Inicialmente para cargas pequeñas no adhiere, hasta que a partir de un cierto valor en torno a $1 \cdot 10^{-3}$ pN comienza adherir la célula al sustrato, debido a las tensiones generadas en la célula que simulan la contracción. Esto se observa debido que aumenta el valor del grado de adhesión β , para un cierto número de elementos, el cual sigue aumentando a medida que se aplica mayor carga. Para un cierto valor de carga la interfaz permanece completamente adherida, es decir $\beta=1$ para los 15 elementos, y posteriormente comienza a romper o separarse obteniendo $\beta=0$. Este valor límite de carga se sitúa en torno 100 pN en el caso de aplicación de la carga de forma constante, mientras que cuando se aplica de manera lineal comienza a separarse para cargas menores, en torno a 10 pN.

Para los casos de las figuras 3.6 y 3.8, en los cuales se aplica cargas únicamente en la dirección tangencial sobre los 5 elementos centrales del modelo. Igual que pasaba en los casos anteriores, inicialmente no adhiere hasta que supera un valor de carga en torno a $1 \cdot 10^{-4}$ pN. A partir de este valor comienza a adherir la célula al sustrato, aumentando el valor de β únicamente en los dos elementos exteriores de la interfaz. Esto es debido a que la mayor concentración de tensiones se produce en los extremos de la célula. El extremo derecho es claramente justificable, debido a que la dirección de la carga aplicada es hacia la derecha, por tanto se generan mayores tensiones en el extremo derecho. Y en el extremo izquierdo, ya que se generan momentos debidos a la distancia de aplicación de la carga, ya que el conjunto célula-interfaz-sustrato posee una cierta altura, no despreciable con respecto a las dimensiones del modelo (ver figura 3.13).

Esto coincide con las conclusiones obtenidas en el trabajo de Legant et al. [36], en el que al evaluar las fuerzas que ejercen las células sobre los sustratos mediante "Traction Force Microscopy", vieron que aparecen tensiones normales a la superficie del sustrato debido a la flexión local que se produce en esta zona.

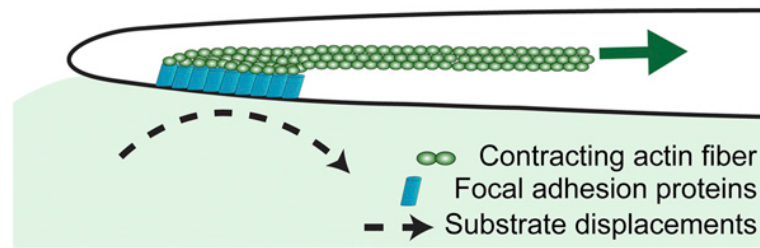


Figura 3.13: Representación gráfica del proceso de aplicación de carga tangencial [36].

A partir de este momento, al igual que en los otros casos, la unión alcanza un valor máximo de $\beta=1$, para valores de tensión en torno a $10 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$, en tan solo 6 elementos de la interfaz. Posteriormente comienza el proceso de rotura, en el que $\beta=0$, al aplicar cargas mayores al valor límite citado.

Como se puede observar en las gráficas, la unión aguanta menos esfuerzos a tangencial que a tracción, esto es debido a que las resistencias para ambas direcciones no son las mismas, siendo más resistente la unión a normal que a tangencial, lo cual genera en ocasiones deslizamientos relevantes en el contorno de la célula.

Por último, los casos representados en las figuras 3.10 y 3.12 son una mezcla de los cuatro casos anteriores, puesto que la aplicación de una carga a 45° se puede descomponer como dos cargas de igual módulo, una en dirección normal y otra en dirección tangencial. En ellos se observa a grandes rasgos, que la interfaz adhiere mucho menos que en los ensayos anteriores, lo cual es debido a que se aplica carga en 2 direcciones en vez de en una, generando por tanto mayores tensiones sobre ésta. La interfaz comienza a adherir para valores de carga en torno a $1 \cdot 10^{-4} \text{ pN}$, dándose el β máximo en tan sólo uno o dos elementos de la interfaz. Para el punto de mayor carga soportada por la interfaz, $\beta=1$ en tan sólo 5 y 3 elementos para el caso de carga constante y lineal respectivamente.

Los resultados de las simulaciones se pueden consultar junto con las imágenes obtenidas en ABAQUS CAE sobre el modelo en cuestión en el Anexo D, en los cuales se puede apreciar mejor la evolución del grado de adhesión para cada uno de los casos expuestos.

3.4. SENSIBILIDAD DE LAS PROPIEDADES DE LA CÉLULA

Con el fin de obtener resultados mucho más descriptivos del comportamiento de la adhesión celular, no basta sólo con estudiar cómo evoluciona el grado de adhesión en función del valor de tensión aplicada sobre el conjunto. Es cierto que es el factor principal que determina su comportamiento, pero no es el único, ya que este modelo no se ha basado sólo en factores mecánicos sino que se ha formulado un modelo de interfaz en el que influyen también factores mecano-químicos.

Para las diferentes simulaciones presentadas en este subapartado, se aplicará una carga lineal a 45°, en dirección creciente hacia la derecha, tal y como se muestra en la figura 3.14.

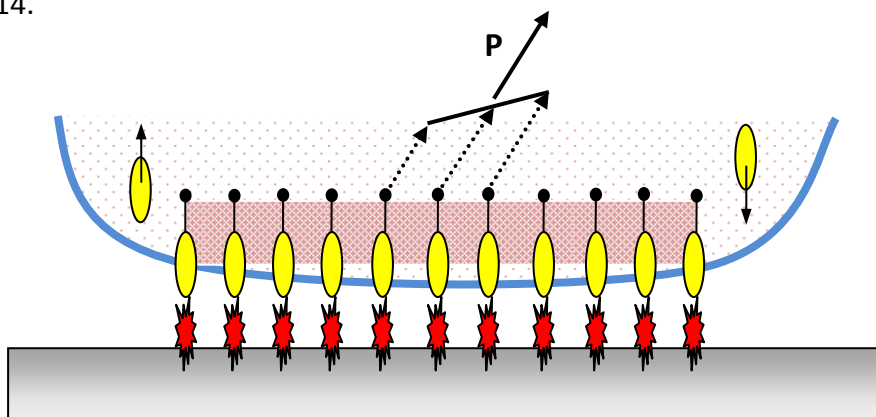


Figura 3.14: Esquema de la aplicación de la carga para las siguientes simulaciones.

Los valores numéricos obtenidos en las siguientes simulaciones de β_{\max} y β_{\min} , para los diferentes estados tensionales a lo largo de la interfaz, se encuentran todos ellos recogidos en el Anexo D. Como se ha comentado anteriormente, sólo se mostrará el valor obtenido de β_{\max} para aquellos puntos en los que se produzca adhesión focal, de lo contrario no tiene sentido hablar de grado de adhesión.

3.4.1. SIMULACIONES VARIANDO LA RIGIDEZ DEL SUSTRATO

Para esta simulación se ha aplicado una fuerza lineal a 45° sobre la dirección (z) e (y) sobre los 5 elementos centrales. Para estas simulaciones se ha utilizado el hidrogel PEG_2, definido en el capítulo anterior, el cual posee una rigidez menor al

usado para las simulaciones anteriores e igual a 1KPa. Los resultados obtenidos de esta simulación se muestran en la figura 3.15, junto con el valor obtenido de β_{\max} para aquellos casos en los que se produce adhesión.

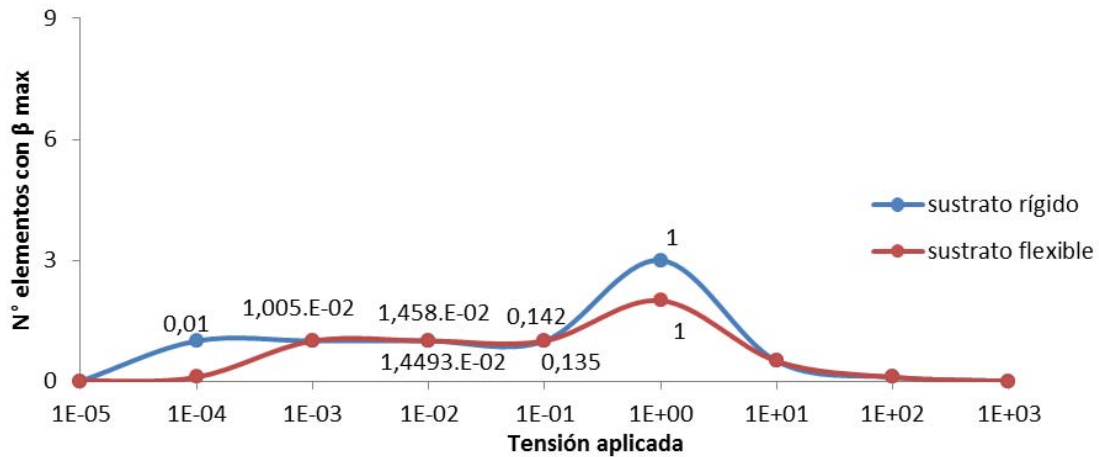


Figura 3.15: Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.14, variando la rigidez del sustrato.

De los resultados obtenidos al cambiar el modulo elástico del sustrato a uno menos rígido, la principal diferencia observada es en la deformada, ya que ahora se aplica la carga sobre elementos mucho más rígidos que los que están situados por debajo de la interfaz. Este hecho se puede visualizar en las figuras adjuntadas en el Anexo D. En las simulaciones con el sustrato flexible, la interfaz comienza a adherirse para valores de carga un poco mayores que para el sustrato rígido, evolucionando el grado de adhesión β sobre el mismo número de elementos, pero obteniendo valores de β_{\max} mayores en las simulaciones realizadas con el sustrato rígido. Para ambos casos se alcanza el máximo grado de adhesión $\beta=1$ para el mismo valor de carga, en el que se encuentra la interfaz completamente adherida. Como se puede observar, la evolución del β_{\max} es prácticamente idéntica para ambos sustratos, salvo con la diferencia que para el rango de cargas comprendido entre [0,1-1] pN, se adhiere más el sustrato rígido que el flexible. Se debería realizar mayor número de simulaciones en este rango de cargas citado y con mayor número de sustratos, para sacar conclusiones mucho más precisas sobre la influencia de la rigidez del sustrato en la adhesión célula-sustrato.

3.4.2. SIMULACIONES VARIANDO LA DISTRIBUCIÓN DE LA CARGA CONTRÁCTIL EN EL DOMINIO DE LA ADHESIÓN FOCAL

Para esta simulación se ha aplicado una fuerza lineal a 45° sobre la dirección (z) e (y) a lo largo de los 15 elementos que conforman la interfaz. La fuerza se ha aplicado en orden creciente hacia la derecha, comenzando por 0 en el extremo izquierdo del modelo y aumentando hasta el valor máximo, situado en el extremo derecho del modelo. Los resultados obtenidos de esta simulación se muestran en la figura 3.16, junto con el valor obtenido de β_{\max} para cada estado de carga estudiado.

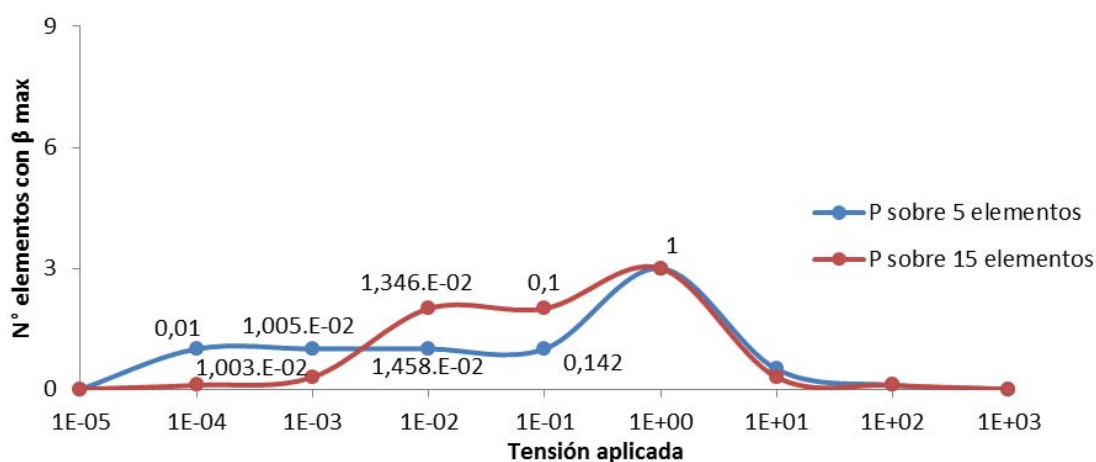


Figura 3.16: Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.14, variando la distribución de carga en el dominio de la adhesión focal.

En cuanto a las diferencias observadas de los resultados obtenidos al variar la distribución de la carga sobre el dominio de la adhesión focal, son los mínimos. Las gráficas representan una misma evolución del grado de adhesión β a lo largo de los mismos elementos de la interfaz, obteniendo un grado de adhesión máximo de $\beta=1$ para el mismo estado de carga; con la salvedad de que al aplicar cargas bajas, el caso en el que se aplica la carga sobre toda la interfaz, el grado de adhesión aumenta en mayor número de elementos que cuando se aplica en tan sólo 5 elementos.

Este hecho se debe a que no influye tanto el número de elementos sobre el que se aplica la carga sino la forma de aplicación de ésta. Es decir, la dirección, módulo y sentido; ya que ésta se distribuye sobre toda la superficie.

3.4.3. SIMULACIONES VARIANDO LA DISTRIBUCIÓN EN EL TIEMPO

Para esta simulación se ha aplicado una fuerza lineal a 45° sobre la dirección (z) e (y) sobre los 5 elementos centrales. La fuerza en este caso se ha aplicado por completo en un único instante, en vez de linealmente en el tiempo como en las simulaciones anteriores. Ahora se aplicará toda la fuerza en un instante igual a 1000 segundos. Los resultados obtenidos de esta simulación se muestran en la figura 3.17, junto con el valor obtenido de β_{\max} para los casos en los que se produce adhesión.

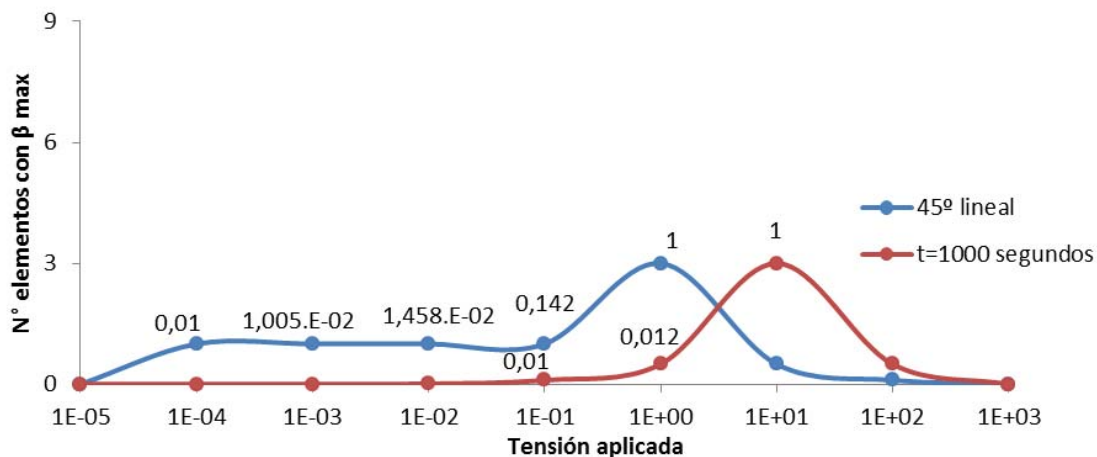


Figura 3.17: Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.14, variando la distribución temporal, para un $t=1000$ segundos.

Con el fin de obtener resultados mucho más representativos sobre como la afecta la velocidad de contracción al proceso de adhesión celular, se presentan resultados para dos tiempos distintos. Hasta ahora sólo se ha evaluado el grado de adhesión para dos velocidades de adhesión, la correspondiente a aplicar toda la carga en el instante inicial igual a 0 segundos, que es instantánea, o la correspondiente a aplicar toda la carga para un instante de tiempo igual al tiempo total, que son 1000

segundos, obteniendo una velocidad de $V_{1000}=1,697.10^{-2}\mu\text{m}/\text{sg}$. Por tanto, se ha decidido evaluar el comportamiento de la interfaz para un instante de tiempo intermedio e igual a 500 segundos, obteniendo una $V_{500}=2,12.10^{-4}\mu\text{m}/\text{sg}$. Los resultados obtenidos de esta simulación se muestran en la figura 3.18, junto con el valor obtenido de β_{max} para los casos en los que se produce adhesión.

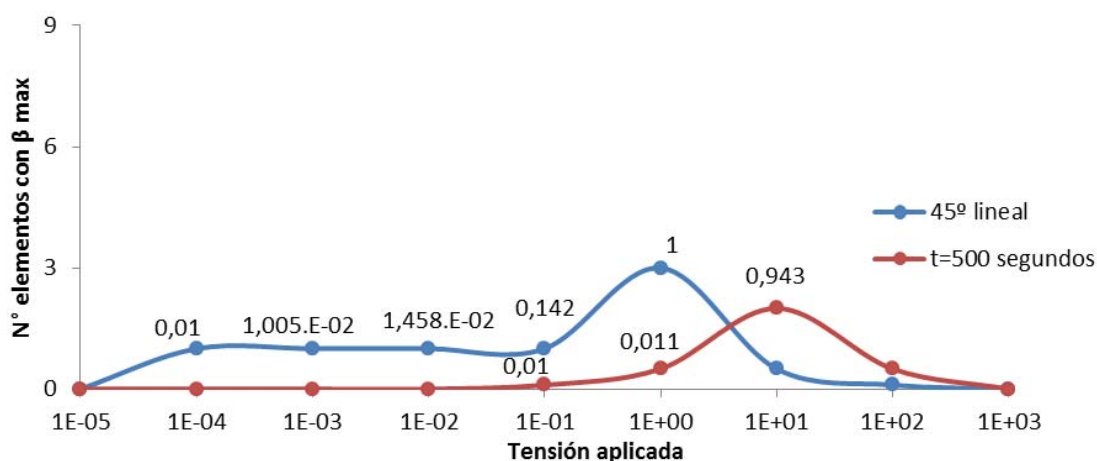


Figura 3.18: Evolución del grado de adhesión β , y su valor máximo, para el caso de carga representado en la figura 3.14, variando la distribución temporal, para un $t=500$ segundos.

En este caso, al variar la distribución temporal, los resultados obtenidos son bastante intuitivos puesto que la interfaz es sensible a la forma de aplicación de la carga. Al aplicar toda la carga en un único instante temporal igual a 1000 segundos, el caso correspondiente a la figura 3.17, sólo adhiere la interfaz al aplicar cargas más altas que para los casos anteriores, del orden de 10 pN. Por debajo de estos valores no adhiere ningún elemento de la interfaz, ya que posee una velocidad tan alta de contracción, que se puede asimilar a aplicar toda la carga de golpe al inicio y por tanto o rompe, o no adhiere. Al bajar la velocidad de contracción, caso correspondiente a la figura 3.18, se observa que adhiere menos la célula y en menor número de elementos, ya que el grado de adhesión β tiene una dependencia directa con la velocidad de adhesión, observando que para este caso no llega a adherir del todo en ninguno de los elementos. Habría que estudiar mayor número de intervalos temporales para poder observar diferencias notables en el comportamiento de la adhesión focal.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

4.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo, tras haber analizado los resultados obtenidos de las diferentes simulaciones computacionales, se resumirán las conclusiones más importantes obtenidas durante el desarrollo de este Proyecto Fin de Carrera.

Posteriormente se comentarán las líneas de desarrollo futuro del proyecto, como continuación al trabajo de investigación realizado, puesto que el tema abordado posee gran relevancia en la actualidad, debido a sus múltiples aplicaciones en campos biomédicos.

4.2. CONCLUSIONES

Cuando se analizan los resultados de cualquier modelo de elementos finitos no hay que perder de vista las sucesivas aproximaciones y simplificaciones realizadas sobre el mismo, analizando la influencia que puedan tener éstas sobre los resultados obtenidos y por tanto sobre las conclusiones finales.

Las principales aproximaciones adoptadas en este modelo son:

1. Los parámetros elegidos para estas simulaciones computacionales han sido obtenidos de artículos científicos de otros investigadores. Para una mayor profundidad del trabajo se podrían haber obtenido de ensayos experimentales propios, pero resulta difícil debido a la gran complejidad de realización de estos experimentos.
2. Los elementos elegidos para la interfaz de este modelo, los elementos cohesivos COH3D8, permiten poder simular la interacción entre dos materiales cualesquiera que están en contacto, para cualquier tipo de geometría. Esto hace que la implementación de este modelo tenga una gran aplicación.
3. En cuanto a la formulación del daño o rotura de la interfaz, estudios anteriores como en el de Olberding et al. [7], proponen un único nivel de daño global en la interfaz, que coincide con la contribución en la dirección normal, despreciando los efectos en la dirección tangencial. En este modelo sin embargo, se considera una aproximación bastante severa, despreciar las contribuciones tangenciales, pues los procesos de carga de una determinada dirección influyen en las propiedades mecánicas de la interfaz en ambas direcciones, como ha sido demostrado en los estudios de Legant et al. [36].

4. En cuanto al comportamiento lineal del Modelo de Daño de nuestra interfaz, podría haberse realizado otra aproximación no lineal, pero se ha escogido ésta por ser la de menor complejidad. Puesto que éste no es el objetivo más relevante del proyecto, sino el estudio del comportamiento dinámico del grado de adhesión/rotura en base a las contracciones celulares producidas.
5. Una de las más importantes, es la definición del comportamiento de la célula como un cuerpo elástico en el cálculo con Elementos Finitos, puesto que como bien sabemos, esta aproximación ha sido tomada en numerosos estudios, como los de Legant et al. [36]. De esta forma podemos realizar con mayor simplificación los cálculos de las simulaciones.
6. Los coeficientes cinéticos de unión y separación, k_u y k_s respectivamente, se han determinado en función de la concentración de los elementos que se encuentran adheridos y el número de elementos totales que hacen contacto entre la célula y el sustrato. Para la determinación de éstos, podría haberse escogido otro criterio en base también a la distancia entre las adhesiones nuevas generadas.

Tras las aproximaciones adoptadas en el proyecto, a continuación se detallan las conclusiones más importantes que se han extraído a partir de los resultados obtenidos.

- 1- Con este modelo de elementos finitos, se consigue predecir las zonas en las que se produce el fenómeno de adhesión mecánica entre una célula y un sustrato cualquiera.
- 2- El comportamiento de la interfaz es altamente dependiente del tiempo de aplicación de la carga, pues cuanto mayor es éste, mayor es la adhesión producida entre la célula y el sustrato.

- 3- No se puede despreciar el grado de adhesión obtenido en cada una de las direcciones, independientemente del sentido de aplicación de la carga, puesto que al evaluar las fuerzas que ejercen las células sobre los sustratos, se puede observar que aparecen tensiones normales a la superficie del sustrato debido a la flexión local que se produce en esta zona. Esto concuerda con los resultados experimentales obtenidos por Legant et al, [36].
- 4- La posibilidad de simular el comportamiento mecánico del sustrato, da una gran versatilidad al modelo. El grado de adhesión dependerá del tipo de sustrato, adhiriéndose más rápido y en mayor grado a los sustratos más rígidos.
- 5- De todas las contribuciones al potencial mecano-químico definidas en el modelo, la que más afecta al grado de adhesión es el grado de la contracción celular. Cuanto más intenso es éste, más se adhiere, sin sobrepasar nunca los 100pN, valor a partir del cual rompe la unión.
- 6- El comportamiento de la interfaz también es fuertemente dependiente de la velocidad de contracción celular, puesto que como se ha visto en los resultados, ésta marca el grado de adhesión generado sobre la interfaz y el número de elementos sobre el que se produce.
- 7- El rango sobre el cual la adhesión focal experimenta mayor evolución del grado de adhesión β en función del estímulo aplicado, se encuentra comprendido en el intervalo [0.1-1] pN; por tanto se debería realizar mayor número de simulaciones sobre este rango para así poder caracterizar mejor el fenómeno estudiado.

4.3. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

La investigación desarrollada en este proyecto supone una aportación significativa al trabajo que se viene realizando por numerosos grupos de investigación en Biomecánica, en concreto en la rama de la mecánica celular.

Entendiendo el comportamiento macroscópico continuo de las adhesiones focales, se podrán desentrañar muchas dificultades que plantean las células a la biología y a la química, como por ejemplo entender cómo avanzan las células cancerígenas cuando en un tumor se expanden y migran, entre otros.

Existen numerosas técnicas experimentales, que han sido desarrolladas con el fin de cuantificar la mecánica celular, imponiendo una fuerza o deformación, y observando las respuestas estáticas y dinámicas que adopta la célula [36].

La migración celular juega un papel esencial en no sólo numerosos procesos fisiológicos, tales como la embriogénesis, la curación de heridas o el sistema inmunológico; sino también patológicos como la invasión del cáncer o la metástasis.

Debido a la complejidad en los procesos de migración celular, resulta de gran interés generar un modelo matemático que describa como la célula se adhiere y se suelta del sustrato, en el que se encuentra embebida, para regular su movimiento y así entender los mecanismos reguladores.

La unión de las técnicas experimentales con las computacionales, dan lugar a nuevas teorías que describen la mecánica celular, que es la línea que ha seguido este Proyecto Fin de carrera, y la línea que deben seguir las futuras líneas de investigación dentro de este campo.

Tras las aportaciones computacionales de este Proyecto Fin de Carrera, debería ser continuado con las aportaciones experimentales del fenómeno de la Adhesión Focal (FA). Para ello mediante “Traction Force Microscopy” se deben medir y modelar los fenómenos de migración y cambio de forma experimentados en las células al inducir en ellas una fuerza. Pudiendo de este modo, determinar en qué regiones se producen los cambios configuracionales, el valor de éstos y que dirección siguen.

De este modo, se podrá comparar experimental y computacionalmente las deformaciones producidas en el sustrato con respecto a las estructuras del citoesqueleto, dando una visión más global del fenómeno estudiado y ayudando a comprender que es lo que sucede en los procesos de adhesión celular.

Parte II

Anexos

ANEXO A

BASE BIOLÓGICA DE LA ADHESIÓN FOCAL

A.1. LA BIOMECÁNICA

Hoy en día la Biomecánica es una de las ramas con mayor actividad investigadora dentro de la ingeniería, debido a que las aplicaciones tecnológicas derivadas de los conocimientos adquiridos en este campo, tienen una repercusión importante en el bienestar humano.

El aumento de la esperanza de vida ha traído consigo una demanda creciente de avanzado instrumental médico, nuevos implantes y fármacos, así como la aparición y desarrollo de tecnologías médicas de última generación. Todo ello ha dado lugar a

nuevas exigencias de formación e investigación dentro de la disciplina de la Ingeniería Biomédica o Bioingeniería.

La Bioingeniería aplica los principios y metodologías ingenieriles al estudio de problemas médicos y biológicos. Algunas de las líneas de investigación más importantes que pueden citarse son el diseño de órganos artificiales, de prótesis ortopédicas, de plataformas de cargas y de elementos de rehabilitación. También tienen cabida el diseño de biosensores e instrumentación médica, los sistemas de diagnóstico mediante captación de imágenes médicas (rayos X, RMN, PET, etc.) y el tratamiento digital de las mismas o mediante técnicas de análisis de señales médicas o la aplicación de las TICs en campos como la cirugía virtual y la telemedicina.

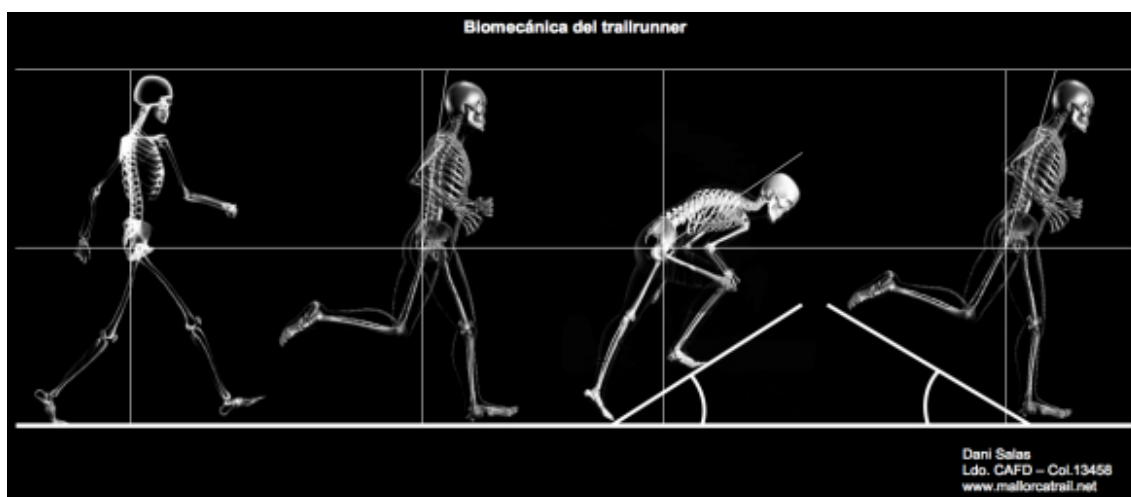


Figura A.1: Esquema de la Biomecánica del Trailrunner(www.mallorcatrail.net).

Dentro de la Ingeniería Biomédica, se conoce como Biomecánica la disciplina que trata de predecir la mecánica de los seres vivos. Ayuda, por tanto, a entender el funcionamiento motor de los organismos, a caracterizar el comportamiento de tejidos y órganos vivos desde el punto de vista estructural y a proponer métodos de intervención artificial. Por lo que, la rehabilitación y mejora de prestaciones motrices, el diseño de prótesis y órtesis y el estudio tensional de materiales biológicos y biocompatibles se encuentran directamente relacionados con ella.

Los campos de investigación de la Biomecánica se pueden dividir fundamentalmente en tres: teórico, experimental y computacional.

Alguno de los principales campos de aplicación son: problemas cardiovasculares, la ortopedia, reconstrucciones, la Biomecánica de impacto, ámbito deportivo, compatibilidad en materiales quirúrgicos, etc.

A.2. UNIONES CELULARES

A.2.1. INTRODUCCIÓN:

La célula es la unidad anatómica, funcional y genética de los seres vivos. Está constituida por tres elementos básicos: membrana plasmática, citoplasma y material genético (ADN). Sus funciones vitales son las de nutrición, relación y reproducción.

La mayoría de las células epiteliales y algunas células musculares y nerviosas están estrechamente asociadas en unidades funcionales. Las uniones celulares son puntos de contacto entre las membranas plasmáticas de las células. Éstas tienen muchas funciones, entre las cuales se da la adhesión mecánica, sin su existencia, el cuerpo se desintegraría. Existen tres tipos de uniones intercelulares importantes: uniones ocluyentes, uniones de adherencia o cinturones de adhesión y uniones comunicantes o denexo.

A.2.2. TIPOS DE UNIONES CELULARES:

Como se ha citado anteriormente, existen tres tipos de uniones celulares, los cuales se definirán a continuación.

A.2.2.1- Uniones ocluyentes o herméticas:

Este tipo de uniones forman una barrera selectiva a través de las hojas epiteliales. Las uniones herméticas entre células epiteliales funcionan como barreras de la difusión de algunas proteínas y lípidos de membrana entre los dominios, apical y basolateral.

También sellan células adyacentes, es decir, son impermeables a macromoléculas. Su permeabilidad a moléculas pequeñas varía mucho dependiendo del epitelio.

Las células parecen estar compuestas de una red de filamentos selladores, que rodean completamente el extremo apical de cada una de ellas. Cada filamento actúa como una barrera independiente al flujo iónico. Estos están compuestos de una fila de proteínas de adhesión transmembrana embebidas en cada una de las dos membranas plasmáticas en interacción.

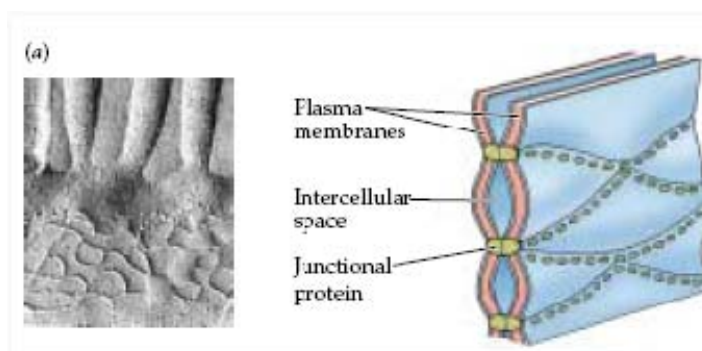


Figura A.2: Uniones *ocluyentes o herméticas*.

La proteína transmembrana de mayor importancia en las uniones herméticas es la Claudina. Una segunda proteína importante es la Ocludina. Las Claudinas y Ocludinas se asocian a proteínas periféricas de la membrana (en su cara intracelular) llamadas proteínas ZO, que anclan los filamentos al citoesqueleto de actina.

La función principal de las uniones herméticas, es que sirven como centros reguladores de la coordinación de procesos en múltiples células.

A.2.2.2- Uniones de adherencia o cinturones de unión:

Las uniones de anclaje conectan el citoesqueleto de una célula al citoesqueleto de las células vecinas o la matriz extracelular.

La membrana lipídica es débil y no puede por sí sola, transmitir grandes fuerzas. Las uniones de anclaje resuelven este problema formando una

estructura fuerte, que atraviesa la membrana atada dentro de la célula a filamentos del citoesqueleto que soportan la tensión.

Estas uniones son abundantes en tejidos que están sujetos a un estrés mecánico severo y hay dos clases de proteínas involucradas:

-*Proteínas de anclaje intracelular*: forman una placa en la cara citoplasmática de la membrana plasmática, y conectan el complejo de unión a filamentos de actina o a filamentos intermedios.

- *Proteínas de anclaje transmembrana*: tienen una cola citoplasmática que se une a una o más proteínas de anclaje intracelular, y a un dominio extracelular que interactúa con la matriz extracelular o con los dominios extracelulares de proteínas de anclaje transmembrana específicas en otra célula.

Muchas de estas uniones contienen proteínas señalizadoras intracelulares, que le dan la potestad a las uniones de dar señales al interior de la célula.

Las uniones adherentes propiamente dichas, unen a las células y están formadas por proteínas de adhesión transmembrana de la familia de las Cadherinas. En la cara intracelular de la membrana, estas uniones y las uniones focales, sirven como sitios de conexión para filamentos de actina, mientras que en Desmosomas y Hemidesmosomas sirven para filamentos intermedios.

Las uniones adherentes conectan paquetes de filamentos de actina de célula a célula, ocurren en varias formas o en tejidos no epiteliales. Estas toman la forma de adherencias punteadas o en línea, que indirectamente conectan los filamentos de actina corticales de las membranas plasmáticas de las dos células que interactúan.

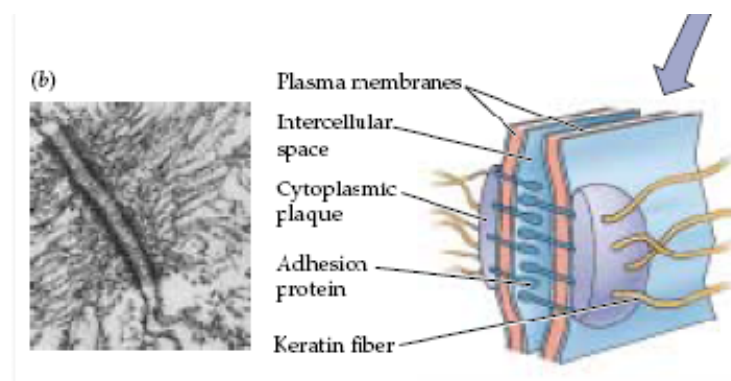


Figura A.3: Uniones de adherencia o cinturones de unión.

Cuando se producen en epitelios forman lo que se conoce como cinturón de adhesión, situado debajo de las uniones ocluyentes, el cual da la vuelta a las células que interactúan en cada lámina epitelial. Las membranas que interactúan, se unen por las Cadherinas, que sirven como proteínas de adhesión transmembrana. En cada célula, un paquete de filamentos de actina contráctil es adyacente al cinturón de adhesión, el cual es orientado de forma paralela a la membrana. La actina, está unida a la membrana por proteínas de anclaje intracelular, como las Cateninas, Vinculina, y alfa – Actinina. El ensamble de uniones adherentes en tejidos epiteliales requiere de la formación previa de uniones adherentes.

A.2.2.3- Uniones comunicantes o de nexo:

Las uniones comunicantes, como su propio nombre indican comunican a las células con sus vecinas. Estas uniones dejan pasar moléculas pequeñas de célula a célula. La abertura es atravesada por proteínas formadoras de canales, conocidas como Conexinas. Los canales que se forman, conexones, dejan pasar iones inorgánicos y otras moléculas solubles pequeñas, directamente desde el citoplasma de una célula, hasta el citoplasma de la otra, acoplando las células eléctrica y metabólicamente. Estas células comparten sus moléculas pequeñas, pero no sus macromoléculas.

El Conexón de las uniones de abertura está hecho por seis subunidades de Conexina transmembrana.

En humanos hay 14 diferentes Conexinas, cada una codificada por un gen separado, y cada una con una distribución de tejido diferente.

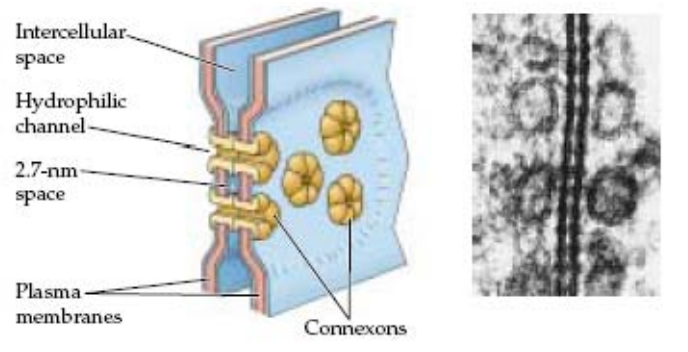


Figura A.4: Uniones comunicantes o de nexos.

Las células nerviosas, por ejemplo están eléctricamente acopladas, lo que permite a los potenciales de acción esparcirse de célula en célula, sin el retraso que ocurre en la sinapsis química. El apareamiento eléctrico a través de uniones de abertura sincroniza las contracciones de las células musculares del corazón y las células de músculo liso, responsables de los movimientos peristálticos del intestino. El compartir pequeños metabolitos e iones, provee de un mecanismo para coordinar las actividades de células individuales en estos tejidos, y disminuir fluctuaciones al azar en las concentraciones de pequeñas moléculas, en células diferentes.

Estas uniones son importantes en embriones, en los cuales las células están acopladas eléctricamente una a otra.

A.3. FENÓMENO DE ADHESIÓN FOCAL

A.3.1. DEFINICIÓN:

La unión entre célula-matriz depende del comportamiento colectivo del conjunto receptor-ligando, conocido como contactos focales entre una célula y su matriz extracelular (MEC) [30]. Esto ha llevado a numerosos científicos a interesarse en

crecimiento de las adhesiones focales, respuestas contradictorias a los experimentos anteriormente citados [1, 2, 24, 25].

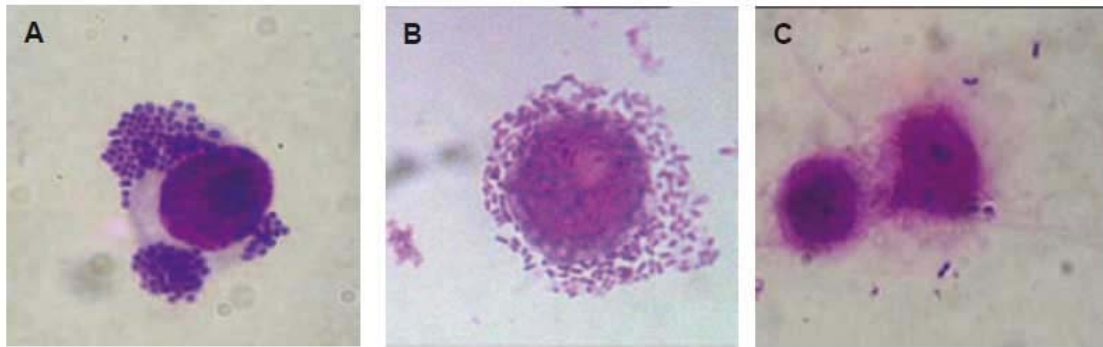


Figura A.6: *Diferentes patrones de adhesión: A) adherencia localizada, B) adherencia difusa, C) sin adherencia* (<http://www.scielosp.org>).

Esta fuerza puede ser generada no sólo por agentes externos, sino también por la propia contracción producida al interactuar las proteínas actina y miosina y es transmitida por la adhesión focal a la matriz extracelular [5,6]. El crecimiento o no de las adhesiones focales, depende fuertemente del valor de la fuerza aplicada como se demuestra en numerosos estudios, entre otros factores [1, 2, 3, 4, 5, 6].

A.3.2. PARTES QUE INTERVIENEN:

En este subapartado se va a explicar cada una de las partes que intervienen en el proceso de la adhesión focal, para así facilitar su comprensión. Comprender la función de cada una de las partes, nos ayudará a comprender mejor la del conjunto, y así poder aplicarlo en la aproximación realizada mediante el modelo matemático.

La distribución de las principales proteínas que intervienen en la adhesión focal, se muestran en la siguiente figura A.7:

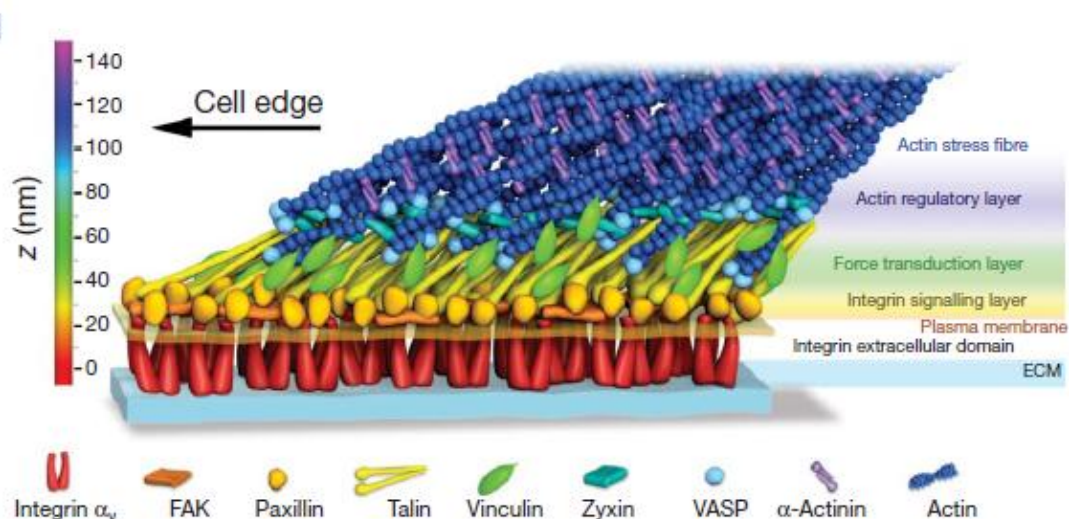


Figura A.7: *Modelo esquemático de la arquitectura molecular de la Adhesión Focal*
(<http://www.me.utexas.edu>).

INTEGRINAS

Las integrinas son los principales receptores utilizados por las células para unirse a la matriz extracelular. Son heterodímeros y funcionan como comunicadores transmembrana, entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina. La célula puede regular la actividad adhesiva de las integrinas desde dentro. Las integrinas también funcionan como transductores de señal, activando diversos mecanismos de señalamiento intracelular cuando son activados por la unión de la matriz. Las integrinas y los receptores convencionales muchas veces cooperan para promover el crecimiento celular y la proliferación celular.

LA FIBRONECTINA

La fibronectina es una proteína extracelular que ayuda a las células a adherirse a la matriz. Estas proteínas contribuyen a organizar la matriz y a que las células se le adhieran. La fibronectina es una glicoproteína grande, es un dímero compuesto de dos subunidades muy grandes unidas por puentes de sulfuro en un extremo.

La fibronectina no es sólo importante para la adhesión celular a la matriz, sino que también guía las migraciones celulares en los embriones.

LAS CADHERINAS

Las cadherinas son las principales CAM's responsables de las adhesiones célula-célula dependientes de calcio. Son las principales moléculas de adhesión que mantienen las células juntas en los tejidos embrionarios tempranos.

La mayoría de las cadherinas son glicoproteínas que atraviesan una vez la membrana. Son de más o menos 700-750 aminoácidos de largo.

La cadherina-E ayuda a conectar los citoesqueletos de actina corticales de las células que une, siendo también la primera cadherina que se expresa durante el desarrollo mamífero. También ayuda a la compactación, un cambio morfológico importante que ocurre en el desarrollo embrionario.

Las cadherinas también son cruciales en los estadios posteriores del desarrollo, ya que su apareamiento y desapareamiento se correlacionan con eventos morfogenéticos importantes, en los cuales los tejidos se segregan unos de otros. Cambios en la expresión de la cadherina, parecen estar relacionados con procesos de separación.

Las cadherinas median adhesiones célula-célula por medio de un mecanismo homofílico. En este, las moléculas de una célula, se unen a otras moléculas del mismo tipo en células adyacentes. Se unen al citoesqueleto de actina por medio de cateninas.

La mayoría de las cadherinas funcionan como proteínas de adhesión transmembrana, que unen indirectamente los citoesqueletos de las células que juntan. La cola altamente conservada de las cadherinas interactúa indirectamente con los filamentos de actina por medio de un grupo de proteínas de anclaje intracelular llamadas las cateninas. Esta interacción es esencial para la eficiencia de la adhesión célula-célula.

MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

Los tejidos no están hechos sólo de células. Una parte sustancial de su volumen es el espacio extracelular, que está lleno principalmente de una complicada red de macromoléculas que consisten en la matriz extracelular. La matriz se compone de una

variedad de proteínas y polisacáridos que se secretan localmente y se ensamblan en una mezcla organizada, en asociación con la superficie de la célula que los produjo.

La MEC es el tejido conjuntivo que más prevalece alrededor de las células y determina las propiedades físicas del tejido. Los tejidos conjuntivos forman el marco del cuerpo vertebrado, pero las cantidades encontradas en los diferentes órganos varía importantemente, en cartílago y hueso son el componente más importante, y en cerebro y médula con constituyentes minoritarios.

Cadenas de polisacárido de la clase conocida como glicosaminoglicanos (GAG's), que son encontrados unidos covalentemente a la proteína en forma de proteoglicanos y proteínas fibrosas, que incluyen el colágeno, elastina, fibronectina y laminina, los cuales tienen funciones estructurales y adhesivas.

Las moléculas de proteoglicano en el tejido conjuntivo forman un gel altamente hidratado en el cual las proteínas fibrosas están embebidas. Este resiste fuerzas compresivas en la matriz, mientras permiten la rápida difusión de nutrientes, metabolitos y hormonas entre la sangre, y las células de los tejidos. Las fibras de colágeno dan fuerza y ayudan a organizar la matriz, y las fibras de elastina le dan resistencia. Muchas proteínas de la matriz ayudan a las células a adherirse en los sitios apropiados.

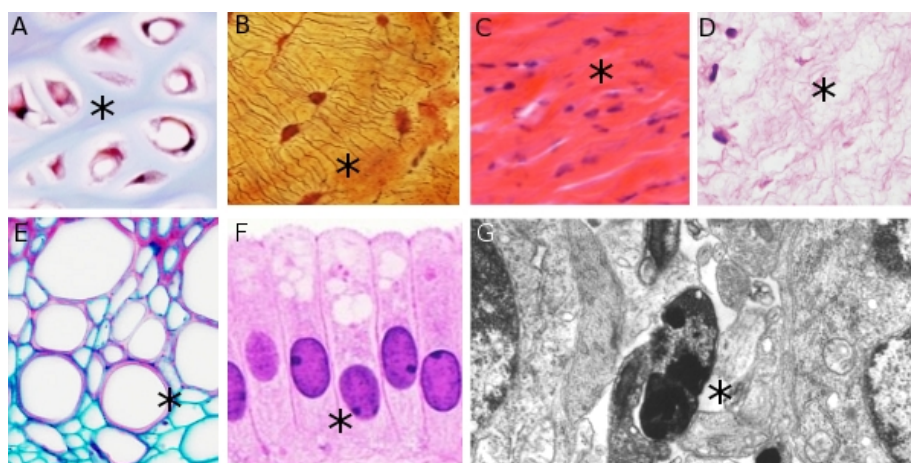


Figura A.8: *Diferentes tipos de matrices extracelulares: A) Cartílago hialino, B) Matriz ósea compacta, C) Tendón, D) Cordón umbilical, E) paredes celulares del tallo de una planta, F) Células epiteliales, G) Tejido nervioso (www.biologiacellular.com).*

Dos clases principales de macromoléculas extracelulares forman la matriz, puede calcificarse para formar estructuras muy rígidas del hueso o dientes, o puede formar la córnea transparente o adaptar conformación de cuerda y darle a los tendones su enorme fuerza tensil.

La MEC, tiene un rol complejo en la regulación del comportamiento de las células que hacen contacto con ella, influenciando su supervivencia, desarrollo, migración, proliferación, forma y función.

La matriz extracelular está hecha y orientada por las células en ella. La orientación del citoesqueleto dentro de una célula, puede controlar la orientación de la matriz producida fuera. En la mayoría de los tejidos conjuntivos, las macromoléculas de la matriz son secretadas por los fibroblastos.

A.4. BASE BIOLÓGICA DE LA MECÁNICA CELULAR

La mecánica celular abarca multitud de procesos, desde eventos macroscópicos como el mantenimiento de la forma celular, la motilidad celular, la adhesión y la deformación; a eventos microscópicos como por ejemplo, como las células detectan señales bioquímicas que conducen a una serie de respuestas biológicas.

Uno de los principales objetivos del estudio de la mecánica celular es describir y evaluar las propiedades mecánicas de las células, las estructuras celulares, las interacciones mecánicas entre ellas y el ambiente.

La mecánica celular, ha experimentado un desarrollo veloz en campos como la reología del citoesqueleto y reconstrucciones en geles de los principales componentes del citoesqueleto, como filamentos de actina, microtúbulos, proteínas, etc.; los cuales son responsables de las propiedades de la célula y su movimiento [29].

Otro campo de investigación es la iteración mecánica de la célula con su entorno, y como esta produce cambios en la morfología celular y en la señalización biológica, que conducen a una adaptación funcional.

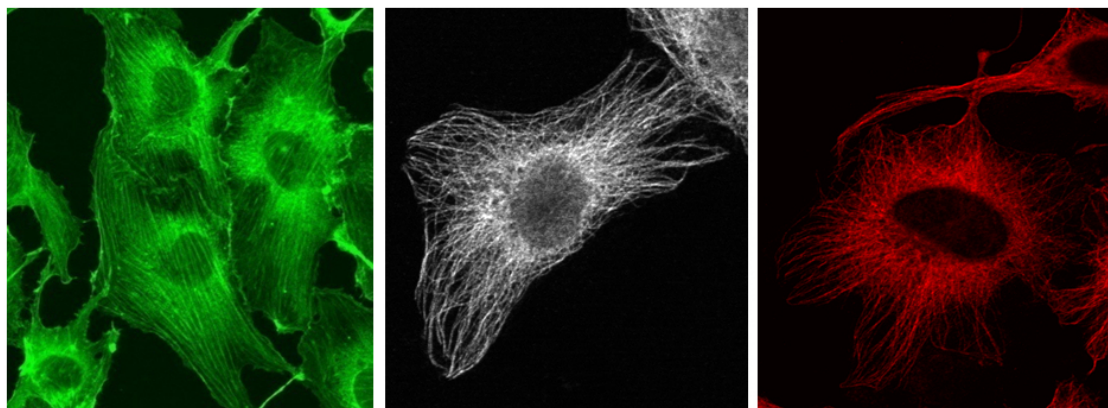


Figura A.9: *Visualización de filamentos de actina (verde), microtúbulos (blanco), filamentos intermedios del citoesqueleto(rojo), (www.wikipedia.es).*

Existe una amplia gama de modelos computacionales con modelos de Elementos Finitos para la mecánica del citoesqueleto, basados en modelos continuos de la deformación celular para filamentos de actina.

Existen también numerosas técnicas experimentales, que han sido desarrolladas con el fin de cuantificar la mecánica del citoesqueleto, imponiendo una fuerza o deformación, y observando las respuestas estáticas y dinámicas de la célula.

La unión de las técnicas experimentales con las computacionales, dan lugar a nuevos teorías que describen la mecánica celular, que es la línea que sigue este Proyecto Fin de carrera.

La migración celular juega un papel esencial en no sólo numerosos procesos fisiológicos, tales como la embriogénesis, la curación de heridas o el sistema inmunológico; sino también patológicos como la invasión del cáncer o la metástasis.

Debido a la complejidad en los procesos de migración celular, es necesario un modelo matemático que lo cuantifique.

ANEXO B

MODELOS TEÓRICOS

B.1. INTRODUCCIÓN

La formulación matemática del Modelo de Daño de la interfaz, está basada en la Mecánica del Daño Continuo combinada con la Mecánica de la Fractura Lineal. En el presente Anexo se aplicarán los modelos teóricos a nuestro modelo de interfaz con el fin de poder cuantificar el grado de adhesión β , entre nuestra célula y sustrato en función de la tensión aplicada sobre el conjunto.

Para ello haremos una breve reseña sobre la Mecánica del Daño Continuo y posteriormente su aplicación sobre nuestro modelo matemático.

B.2. MECÁNICA DEL DAÑO CONTINUO

B.2.1. CONCEPTOS FUNDAMENTALES DE LA MECÁNICA DEL DAÑO CONTINUO

La Mecánica del Daño Continuo es una herramienta para describir el deterioro progresivo de las propiedades mecánicas de los materiales que fue ampliamente desarrollada y aplicada a numerosas situaciones durante las últimas dos décadas. Desde la introducción del concepto de daño de Kachanov en 1958, los modelos que involucran la degradación elástica se han vuelto cada día más populares, alcanzando actualmente niveles que permiten su aplicación a problemas prácticos de ingeniería. En este apartado se presenta un modelo teórico general que permite analizar gran cantidad de modelos de daño continuo existentes, no sólo desde el punto de vista de su formulación sino también teniendo en cuenta su capacidad para reproducir las evidencias experimentales correspondientes a un amplio rango de materiales y su implementación numérica en códigos de elementos finitos. El modelo presentado para este Proyecto Fin de Carrera se centra en el criterio de daño para pequeñas deformaciones y dentro del marco de la Mecánica de sólidos Continuos.

La elasticidad de los materiales está fuertemente influenciada por el daño, ya que para todo material, una vez comienza a producirse el daño disminuye su elasticidad.

Hay tres niveles en los que se puede considerar el daño. A nivel *microscópico* el daño es la acumulación de microtensiones en los alrededores de los defectos o de las interfaces. A nivel *mesoscópico* se trabaja con un volumen representativo, que debe ser suficientemente pequeño para evitar elevados gradientes y a su vez suficientemente grande para representar una media de los microprocesos que tienen lugar, y que son representativos de lo que le ocurre al material. Y por último está el nivel *macroscópico* en el que se trabaja también con un volumen representativo en el que el daño indica una pérdida de rigidez del mismo.

Se suele distinguir entre distintos tipos de daño:

- *Daño frágil*, se llama así al daño cuando se inicia una grieta a nivel mesoscópico sin gran cantidad de deformaciones plásticas.
- *Daño dúctil*, se llama así cuando aparecen simultáneamente daño y deformaciones plásticas por encima de un cierto límite. Esto se produce por la nucleación de las cavidades debido a la decohesión entre inclusiones y la matriz.
- *Daño de creep o fluencia*, se produce sobre todo en metales cuando éstos son cargados a elevadas temperaturas y a una tensión constante.
- Daño a fatiga de bajo número de ciclos, se produce cuando el material está sujeto a elevados valores de tensión o de deformación, entonces el daño aparece junto con deformaciones plásticas cíclicas después de un periodo de incubación que precede a las fases de nucleación y propagación de las microgrietas. Este daño se caracteriza por el bajo número de ciclos hasta el fallo.
- Daño a fatiga de alto número de ciclos, se produce cuando el material está sujeto a valores bajos de tensiones, y las deformaciones plásticas son casi despreciables. El número de ciclos transcurridos hasta el fallo es alto.

El fenómeno de iniciación y crecimiento de microgrietas en materiales frágiles, de microcavidades en materiales dúctiles y de huecos en materiales porosos (Resende y Martin [1984]) ha sido ampliamente estudiado por medio de análisis microestructural (McClintock [1968]; Rice y Tracey [1969]). En contrapartida a éstos, los modelos basados en la Mecánica del Daño (Kachanov [1958]; Lemaitre [1985]; Simo y Ju [1987a]; Simo y Ju [1987b]; Neto et al. [1998]) estudian dicho problema desde un punto de vista macroscópico, típico de la Mecánica de Medios Continuos.

De todo lo anterior, el *daño* se puede interpretar a nivel microscópico como la creación de microsuperficies de discontinuidades, por la ruptura de las uniones atómicas y el agrandamiento plástico de las microcavidades. A nivel mesoscópico, el número de uniones rotas o el patrón de las microcavidades puede ser aproximado en

cualquier plano por el área de intersección de todos los defectos con dicho plano. Para trabajar a nivel macroscópico esta área se escala por el tamaño del volumen elemental representativo, definiendo una variable adimensional continua.

Para ello se toma un sólido con un cierto nivel de daño y se considera un volumen elemental representativo en un punto M orientado según un plano definido por su normal n (siendo x la abscisa a lo largo de n). En ese caso δS se puede definir como el área de intersección entre el plano y el volumen elemental representativo y ΔS_D como el área efectiva de todas las intersecciones de las microgrietas o microcavidades con dicho área δS (véase Figura B.1). Entonces, el valor del *daño* asociado a dicho punto M en la dirección n y en la abscisa x se puede definir como:

$$d(M, n, x) = \frac{\delta S_{dx}}{\delta S} \quad (B.1)$$

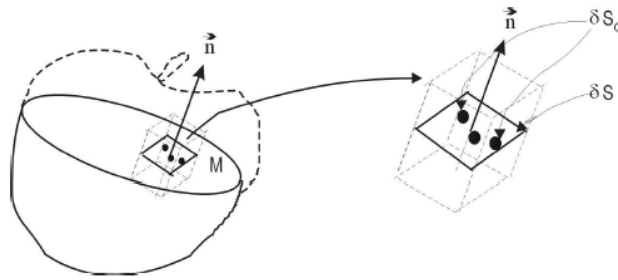


Figura B.1: Definición del daño a nivel micro-mesoscópico.

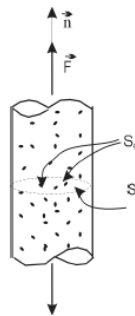


Figura B.2: Elemento dañado unidimensionalmente.

Para definir una variable continua sobre el volumen elemental representativo es necesario eliminar la dependencia de x , es decir en dicho volumen se van variando todos los planos, variando x y buscando el más dañado. Así el *daño* se puede definir como un escalar a través de la siguiente expresión:

$$d(M, n) = \frac{\delta S_d}{\delta S} \quad (B.2)$$

Donde éste puede variar entre 0 y 1, correspondiendo el valor $d = 0$ a un estado intacto o no dañado, mientras que el valor 1 corresponde al estado de ruptura local, y que depende del punto y la dirección consideradas. Por lo que esta variable de daño, d , permite cuantificar la densidad superficial efectiva de microdefectos en un volumen de referencia.

Si se considera un sólido unidimensional como el mostrado en la Figura B.2, se puede definir el daño como la densidad efectiva de defectos en el entorno de un punto:

$$d = \frac{\delta S_d}{\delta S} \quad (B.3)$$

En este caso unidimensional el daño es un escalar, generalizando el problema al caso tridimensional, el daño se puede definir como un tensor d si se considera que el daño se producir en múltiples direcciones.

$$d = \begin{bmatrix} d_{xx} & d_{xy} & d_{xz} \\ d_{xy} & d_{yy} & d_{yz} \\ d_{xz} & d_{yz} & d_{zz} \end{bmatrix} \quad (B.4)$$

O bien, si éste se considera que es uniforme en todo el material se puede seguir considerando como un escalar, d , o equivalentemente:

$$d = \begin{bmatrix} d & 0 & 0 \\ 0 & d & 0 \\ 0 & 0 & d \end{bmatrix} \quad (B.5)$$

Basado en el *principio de deformación equivalente* de Lemaitre [1985], se introduce el concepto de *tensión efectiva* como la tensión que daría lugar a las mismas deformaciones que aparecen el sólido dañado en el modelo sin daño (ver Figura B.3).

Si todos los defectos están abiertos de tal manera que no hay fuerzas actuando sobre la superficie de los mismos representados por S_d , la *tensión efectiva* $\bar{\sigma}$ relacionada con la superficie que realmente aguanta la carga se define como:

$$\bar{\sigma} = \frac{F}{S - S_d} \quad (\text{B.6})$$

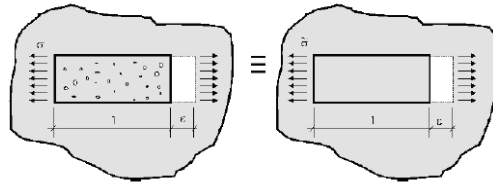


Figura B.3: Representación esquemática del concepto de tensión efectiva.

Habiendo definido el daño según (B.3) e incorporando la definición en (B.4) la tensión efectiva se puede expresar:

$$\bar{\sigma} = \frac{F}{S \left(1 - \frac{S_d}{S}\right)} = \frac{\sigma}{1 - d} \quad (\text{B.7})$$

De acuerdo con la descripción de la *mecánica del daño* realizada anteriormente y con la aplicación del *principio de deformación equivalente* se puede definir de forma completa la ley de comportamiento.

Para ello en un material elástico lineal homogéneo e isótropo, por ejemplo, es preciso determinar el modulo de Young, E , que relaciona directamente la tensión y la deformación, y el coeficiente de Poisson que relaciona las deformaciones en las distintas direcciones. Utilizando el principio de deformación equivalente:

$$\varepsilon = \frac{\sigma}{E} = \frac{\bar{\sigma}}{\bar{E}} = \frac{\sigma}{E(1 - d)} \quad (\text{B.8})$$

Por lo que el modulo de Young en un material dañado se define en función del daño como:

$$\bar{E} = E(1 - d) \quad (\text{B.9})$$

Donde si $d = 0$, el módulo de Young es el del material intacto, pero si $d = 1$ entonces es nulo.

B.2.2. TERMOMECAÁNICA DEL DAÑO CONTINUO

De un modo similar a la Mecánica del Sólido Deformable, donde se puede definir el modelo de comportamiento a través de la definición de densidad de energía libre, ψ , en función de variables termodinámicas independientes, de forma similar se puede definir el modelo de comportamiento correspondiente a un modelo de daño.

Para ello se establecen en primer lugar las variables termodinámicamente independientes del problema:

- ε tensor de deformación asociado con el tensor de deformaciones de Cauchy σ
- θ temperatura asociada con la densidad de entropía η
- d variable de daño

A continuación partiendo de la hipótesis de daño isótropo se va a representar la variable de daño a través del escalar d . Se supone la función de densidad de energía libre dependiente de las variables termodinámicas independientes como se muestra a continuación

$$\psi = \psi(\varepsilon, \theta, d) \quad (\text{B.10})$$

Si se cumple la hipótesis de conservación de la masa (densidad, ρ , constante), lo que es una aproximación para el caso de daño de tipo dúctil, y se define el segundo principio de la termodinámica escrito como la desigualdad de Clausius-Duhem a partir de la función densidad de energía libre:

$$\rho\eta\dot{\theta} + \rho \frac{\partial \psi}{\partial \varepsilon} : \dot{\varepsilon} + \rho \frac{\partial \psi}{\partial \theta} : \dot{\theta} - \sigma : \dot{\varepsilon} + \frac{1}{\theta} q \nabla \theta \leq 0 \quad (\text{B.11})$$

Se obtienen las leyes de estado:

$$\sigma = \rho \frac{\partial \psi}{\partial \varepsilon} \quad \eta = - \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \quad (\text{B.12})$$

Por lo tanto, de manera análoga se define la variable termodinámicamente asociada al daño, \bar{Y} , como:

$$\bar{Y} = \rho \frac{\partial \psi}{\partial d} \quad (\text{B.13})$$

Con lo que una manera de poder definir de forma completa el modelo de comportamiento de un material es a través de la expresión analítica de la función densidad de energía libre ψ , la cual se suele fijar en base a una serie de hipótesis que se resumen a continuación:

- Elasticidad isótropa lineal.
- Acoplamiento del daño con las deformaciones elásticas.
- El principio de deformación equivalente junto con el concepto de tensión efectiva descrito en la ecuación (B.5) del apartado anterior. Si el daño es isótropo, entonces tiene el mismo efecto sobre todas las componentes del tensor de tensiones de Cauchy.
- No se considera acoplamiento entre plasticidad y elasticidad ni tampoco entre daño y plasticidad.
- Proceso isoterma.

Por tanto, la función densidad de energía libre ψ se define:

$$\psi = \frac{1}{\rho} \left[\frac{1}{2} \varepsilon : C : \varepsilon (1-d) \right] \quad (B.14)$$

Donde C es el tensor de comportamiento general para un material elástico lineal y homogéneo que se corresponde con un tensor de cuarto orden, y $\bar{C} = C(1-d)$ es el tensor de comportamiento del material dañado.

A partir de dicha función y teniendo en cuenta la definición del tensor de tensiones se obtiene el tensor de tensiones de Cauchy:

$$\sigma = \rho \frac{\partial \psi}{\partial \varepsilon} = C \varepsilon (1-d) \quad (B.15)$$

Por lo que la variable termodinámicamente asociada al daño queda como:

$$\bar{Y} = \rho \frac{\partial \psi}{\partial d} = -\frac{1}{2} \varepsilon : C : \varepsilon \quad (B.16)$$

Para trabajar con un valor positivo, se define $Y = -\bar{Y}$

A continuación se va a establecer la relación entre Y , y la densidad de energía de deformación U , para obtener el significado físico de dicha variable. Por definición, la

densidad de energía de deformación U viene dada por la relación entre tensiones y deformaciones,

$$dU = \sigma d\varepsilon \quad (\text{B.17})$$

Integrando la expresión anterior e incorporando la definición de la tensión efectiva mostrada en (B.13) se obtiene la expresión para la densidad de energía de deformación:

$$U = \int C\varepsilon(1-d)d\varepsilon = \frac{1}{2}\varepsilon : C : \varepsilon(1-d) \quad (\text{B.18})$$

Esto hace que con la definición de la variable termodinámicamente asociada al daño presentada en (B.14) se obtenga la siguiente relación entre la densidad de energía de deformación y dicha variable

$$Y = \frac{U}{(1-d)} \quad (\text{B.19})$$

Esta expresión indica que la variable Y es la energía disipada por pérdida de rigidez debida al daño.

Habiendo definido las variables termodinámicas independientes y las asociadas al daño, se particulariza a continuación la desigualdad de Clausius-Duhem definida con anterioridad (B.11) y partiendo de la función de densidad de energía libre definida en la ecuación (B.10) se puede escribir la variación de la energía libre en función de todas sus variables independientes como:

$$\dot{\psi} = \frac{\partial \psi}{\partial \varepsilon} \dot{\varepsilon} + \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \dot{\theta} + \frac{\partial \psi}{\partial d} \dot{d} \quad (\text{B.20})$$

Con lo que introduciendo esta expresión en la desigualdad de Clausius-Duhem se obtiene:

$$\rho \eta \dot{\theta} + \rho \frac{\partial \psi}{\partial \varepsilon} : \dot{\varepsilon} + \rho \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \dot{\theta} + \rho \frac{\partial \psi}{\partial d} \dot{d} - \sigma : \dot{\varepsilon} + \frac{1}{\theta} q \nabla \theta \leq 0 \quad (\text{B.21})$$

Si se aplican las leyes de estado obtenidas en (B.12) y particularmente para un proceso isoterma, se necesita que:

$$\bar{Y} \dot{d} \leq 0 \quad (\text{B.22})$$

Como $-\bar{Y}$ es una función cuadrática positiva, $\bar{Y} \leq 0$, entonces la variación de daño \dot{d} debe ser siempre positiva. Por lo tanto, la variable de daño siempre va a aumentar.

B.2.3. LEY DE EVOLUCIÓN DEL DAÑO

Una vez caracterizado el proceso de degradación de las propiedades mecánicas de un material se va a determinar la evolución del daño de forma general para la

Mecánica del Daño Continuo, por lo que, a continuación, se define el criterio de daño en función de la variable termodinámica asociada al daño como (Simo y Ju [1987]):

$$g(\bar{Y}) \leq 0 \quad (\text{B.23})$$

Considerando, por razones análogas a las que se siguen en Mecánica del Daño Continuo o plasticidad, se va a considerar una ley de flujo asociada:

$$\dot{d} = \mu \frac{\partial g}{\partial \bar{Y}} \quad (\text{B.24})$$

Donde $\mu \geq 0$ es el parámetro de consistencia del daño, que se obtiene a partir de las condiciones de carga y descarga de daño (condiciones de Kuhn-Tucker), teniéndose:

$$\mu \geq 0 ; \quad g(\bar{Y}) \leq 0 ; \quad \mu g(\bar{Y}) = 0 \quad (\text{B.25})$$

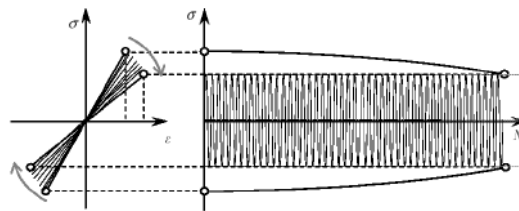


Figura B.4: Degradación estructural de un material sometido a fatiga.

Si $g(\bar{Y}) < 0$ entonces $\mu = 0$. Por otro lado, $\mu > 0$, por la condición (B.25) entonces se cumple que $g(\bar{Y}) = 0$.

Este es el proceso habitual de evaluar la evolución del daño ante cargas estáticas. Sin embargo, también se puede producir evolución del daño como consecuencia de la aplicación de cargas cíclicas, lo que se traduce en un proceso de acumulación de daño.

En el caso de daño a un número elevado de ciclos, si la amplitud de la carga es baja, la amplitud de las deformaciones plásticas puede llegar a ser muy pequeña, incluso despreciable a nivel mesoscópico en comparación con la amplitud de las deformaciones elásticas, por lo que los materiales pueden considerarse como cuasi-frágiles.

Un factor que dificulta el estudio del proceso de daño a elevado número de ciclos es el elevado grado de localización del mismo. Muy a menudo sólo un microelemento dañado en la superficie libre del sólido da lugar al deslizamiento de una microgrieta la cual se propaga perpendicularmente a la carga.

Otro aspecto a considerar dentro del daño a fatiga a un elevado número de ciclos es el proceso de acumulación de daño, que puede ser lineal o no lineal, y que además depende fuertemente de la amplitud de la tensión a la que se encuentra sometido el material. Esta acumulación de daño hace que se produzca una degradación progresiva del material que se traduce en la pérdida de la rigidez y por lo tanto supone una disminución del módulo elástico para cada nuevo ciclo de carga (véase Figura B.4).

Experimentalmente se suele determinar la relación entre la amplitud de las tensiones frente al número de ciclos hasta el fallo (Curvas S-N), lo que permite definir la evolución del daño de una manera muy sencilla.

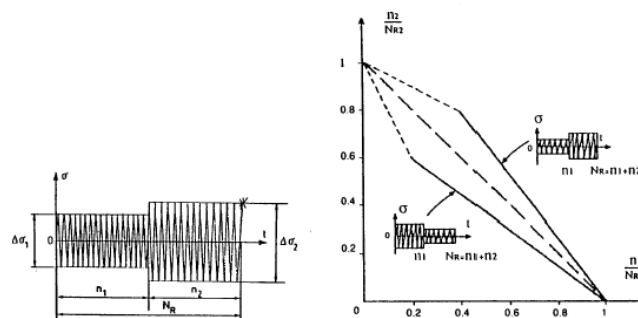


Figura B.5: *Diagrama de acumulación de daño no lineal para un preceso de fatiga con dos niveles de tensión.*

Si el daño se debe a secuencias de carga con distinta amplitud y que se pueden ir añadiendo independientemente del orden en el que se producen hasta el fallo (Figura B.5), se suele utilizar la *regla de Palmgreen-Miner*, que es una relación lineal.

Si n_i es el número de ciclos de cada una de las secuencias periódicas de carga definidas por su amplitud $\Delta\sigma_i$, N_R el número de ciclos hasta el fallo debido a esas secuencias de cargas; y N_{Ri} el número de ciclos hasta el fallo que tendrían lugar si el mismo material estuviese sometido a una carga cíclica de amplitud constante $\Delta\sigma_i$ hasta el fallo, entonces la regla de Palmgreen-Miner se define:

$$N_R = \sum n_i \qquad \sum \frac{n_i}{N_{Ri}} = 1 \qquad (B.26)$$

Pero para situaciones como la descrita en la Figura B.5 el orden de aplicación de las cargas es importante e influye en los resultados posteriores de evolución del daño. Por tanto, la regla de Palmgreen-Miner limita sus aplicaciones, aunque se puede modificar para tener en cuenta distintas amplitudes de carga, la no linealidad en el proceso de acumulación de daño, etc.

B.3. TEORÍA DE SUPERFICIES COHESIVAS

En el Capítulo 2 se ha visto la necesidad de simular el proceso de deterioro de la interfaz célula-sustrato para poder reproducir los deslizamientos relativos entre la célula y el sustrato. Por ello en el capítulo 2 se propone un modelo de daño de interfaz, basado en la teoría de las superficies cohesivas. El modelo se basa en una ley de comportamiento que incorpora la irreversibilidad del proceso de carga y descarga, teniendo en cuenta el proceso de acumulación de daño al que se encuentra sometida.

Aquí, se presenta la teoría de superficies cohesivas en que se basa el modelo, la cual plantea un marco general en el que distintos fenómenos de localización se pueden simular proporcionando ecuaciones específicas de su comportamiento. Se desarrolla también la termomecánica y mecánica de las superficies cohesivas cuasiestáticas, definiendo entre otros aspectos el desplazamiento efectivo de apertura.

B.3.1. REVISIÓN DE LOS MODELOS DE ADHESIÓN Y SUPERFICIES COHESIVAS

Un importante campo dentro de la Mecánica de Medios Continuos es la determinación y comprobación de la vida de cualquier componente estructural. El fallo puede estar relacionado con problemas de localización de deformaciones hasta con el crecimiento de grietas. Para la comprobación de cualquier elemento estructural se suelen aplicar los conceptos fundamentales de la Mecánica de Daño Continuo y de la Mecánica de la Fractura.

Se pueden distinguir dos formas en las que un componente se deteriora: de manera homogénea o con un deterioro localizado. Cuando la concentración de defectos, poros o grietas es suficientemente elevada, entonces se considera que el daño está distribuido de manera homogénea, y en ese caso el deterioro se puede evaluar aplicando los conceptos de la Mecánica del Daño Continuo que se han visto anteriormente. Pero si la concentración de daño evoluciona de tal manera que se concentra en una determinada zona llevando a la iniciación de una grieta o a la aparición de bandas con modos de deformación intensos entonces, se buscan otras aproximaciones que den una información más precisa del proceso de daño. Dentro de estas otras aproximaciones se puede considerar la Mecánica de la Fractura, las teorías de Discontinuidades Fuertes y Débiles y la Teoría de Superficies Cohesivas.

La teoría de la Mecánica de la Fractura trata el comportamiento de los sólidos con discontinuidades geométricas de desplazamientos a nivel macroscópico. Se utiliza para simular la evolución de una grieta hasta la ruptura o colapso del componente estructural. La discontinuidad en los desplazamientos elimina la hipótesis de continuidad homogénea y por lo tanto, las ecuaciones de campo han de tener en cuenta este efecto. En este campo el trabajo pionero fue el de Griffith [1921], que estableció las bases del análisis global. Desde el punto de vista de esta aproximación, el fallo de un sólido se produce cuando la energía libre asociada alcanza un valor crítico característico del sólido.

La aplicabilidad de la Mecánica de la Fractura tiende a ser bastante exacta en simulaciones de sólidos tridimensionales sometidos a cargas proporcionales, sólidos

bidimensionales con cargas periódicas, sólidos con grietas y pequeñas zonas de plastificación. Por el contrario, también presenta inconvenientes, como que no aproxima bien grietas cortas ya que con esta teoría no se pueden aproximar las tensiones microscópicas asociadas con las mismas. Y tampoco es un buen método si en el crecimiento de grieta hay una componente de plasticidad importante.

Por otro lado, las Teorías de Discontinuidades trabajan con fenómenos de localización, y más particularmente con localización de deformaciones. Según esta teoría la grieta puede considerarse como una banda localizada con una discontinuidad en los desplazamientos. En general, se consideran dos tipos de discontinuidades, en desplazamientos y en deformaciones. La primera da lugar a la aproximación de discontinuidad fuerte (Armero y Garikipati [1996]; Armero [1997]; Larsson et al. [1996]; Oliver [1996a]; Oliver [1996b]; Onsten y Carlsson [1994]; Simo et al. [1993]) y la de deformaciones se desarrolla mediante la aproximación de discontinuidad débil (Oliver et al. [1997]; Oliver et al. [1999]). Las ecuaciones constitutivas utilizadas para las discontinuidades fuertes son discretas y relacionan las fuerzas sobre la superficie discontinua con el salto de desplazamientos en ambas superficies.

Durante el análisis de la discontinuidad fuerte se obtienen, paralelamente a las ecuaciones constitutivas discretas, las denominadas condiciones de discontinuidad fuerte que pueden entenderse como restricciones sobre los posibles estados tensionales que son compatibles con las discontinuidades. Dichas restricciones sugieren la introducción de mecanismos complementarios, como son la consideración de discontinuidades débiles (Oliver et al. [1997]; Oliver et al. [1999]) como precursoras de la discontinuidad fuerte y que actúan, a su vez, como mecanismos inductores de dichas condiciones.

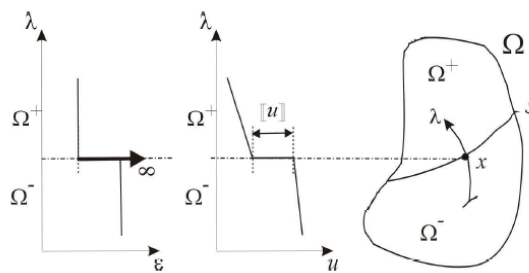


Figura B.6: *Discontinuidad fuerte.*

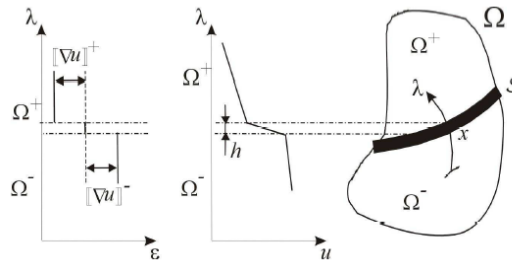


Figura B.7: *Discontinuidad débil.*

En las Figuras B.6 y B.7 se muestran dos ejemplos de discontinuidad fuerte y débil, respectivamente. En la Figura B.6 se muestra un sólido Ω con una discontinuidad fuerte, S , que divide el sólido en dos subconjuntos abiertos Ω^+ y Ω^- , y se utiliza por tanto la siguiente condición $\overline{\Omega} := \overline{\Omega^+ \cup \Omega^-}$. El campo de desplazamientos, u experimenta un salto, $[[u]]$, a través de la discontinuidad, donde $[[\bullet]]$ es el operador salto. En dicha Figura B.6 se ha representado la evolución del desplazamiento así como de la deformación a lo largo de la curva, λ . Mientras que en la Figura B.7, se muestra el sólido con una discontinuidad débil, en la que el campo de desplazamiento experimenta una variación lineal a través de la discontinuidad débil. La existencia de una discontinuidad débil implica la existencia de una longitud característica, h , en la cual tiene lugar la discontinuidad.

Por último, para tratar los fenómenos de localización de daño se puede utilizar la Teoría de Superficies Cohesivas, la cual está fuertemente relacionada con los conceptos más pioneros de la Mecánica de Fractura.

Camacho y Ortiz [1996b] desarrollaron un modelo cohesivo para la fractura de materiales frágiles pretendiendo simular la propagación de grietas múltiples a través de trayectorias arbitrarias. Otro aspecto importante de los modelos cohesivos que se introdujo en este trabajo fue la incorporación de una escala de tiempo permitiendo la distinción entre distintas velocidades de carga, lo que permitía simular un impacto en materiales frágiles (Camacho y Ortiz [1996]; Camacho y Ortiz [1996]).

Los últimos trabajos al respecto han sido los desarrollados por Andrés et al. [1999] y López et al. [1999], que plantearon un modelo tridimensional de análisis en deformaciones finitas del crecimiento de grietas utilizando elementos cohesivos. En estos trabajos se implementaron una serie de leyes cohesivas irreversibles que se

aplicaron a la simulación de frentes de grieta tridimensionales. También se utilizó una medida del daño para identificar el proceso de crecimiento de grietas, definida como la ratio entre la energía implicada en el proceso de fractura y la energía libre de Gibbs. El estado de un elemento cohesivo es irreversible por naturaleza y el área bajo la ecuación de comportamiento desde el origen hasta el estado actual, permiten determinar la energía utilizada durante el proceso de fractura. Esta teoría también se aplicó al estudio del crecimiento de grietas por fatiga en componentes estructurales (López et al. [1999]; García [2002]; Andrés et al. [1999]).

B.3.2. LA SUPERFICIE COHESIVA COMO UNA SUPERFICIE DISCONTINUA

En el apartado anterior se han definido las ecuaciones y principios de conservación cuando hay una discontinuidad. En este apartado se va a definir el concepto de superficie cohesiva, lo que obligaría a particularizar las expresiones anteriores para este caso.

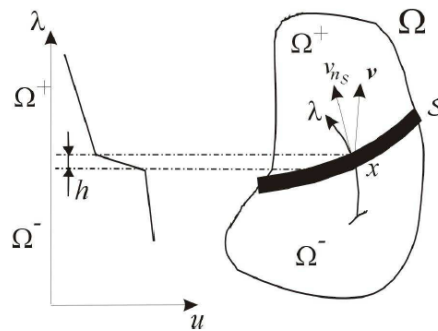


Figura B.8: *Superficie cohesiva.*

Una superficie cohesiva se define como una superficie en la que existe una discontinuidad en el campo de desplazamientos, mientras que las tensiones son continuas.

Una superficie cohesiva se puede considerar como un caso particular de superficie discontinua. Mientras que en general, una superficie discontinua presenta saltos en velocidades, tensiones, y temperatura en un límite infinitesimal, la superficie cohesiva presenta este salto en un espesor suficientemente amplio como para poder considerar las contribuciones volumétricas en la superficie cohesiva. De hecho, una

superficie cohesiva intenta simular el proceso que ocurre en una región de pequeño espesor.

En la Figura B.8 se ha representado un superficie cohesiva, pudiendo formularse la superficie discontinua como un caso límite de la superficie cohesiva cuando el espesor de la misma, h , tiende a tomar un valor muy pequeño, esto es, $h \rightarrow 0$ (Oliver et al. [2002]).

Desde un punto de vista práctico, una diferencia importante entre las ecuaciones de una superficie general discontinua y un superficie cohesiva se encuentra en la descomposición del término volumétrico en la asociada a la superficie cohesiva y la asociada al resto del material, es decir,

$$\int_{\Phi_t(U)} \rho \dot{f} dv = \int_{\Phi_t(U^\pm)} \rho \dot{f} dv + \int_S \dot{f}_S da \quad (\text{B.27})$$

Siendo la derivada material de la función por unidad de área, donde $\dot{f}_S = \rho_s \dot{f}$ es la densidad de masa por unidad de superficie asociada a S .

Antes de continuar es necesario considerar la siguiente hipótesis:

$$\lim_{h \rightarrow 0} \dot{f}_S = \rho_s \lim_{h \rightarrow 0} \dot{f} \rightarrow 0 (\rho_s) h \rightarrow 0 \quad (\text{B.28})$$

Con esta hipótesis de partida el teorema del transporte para una superficie discontinua, se define para una superficie cohesiva a continuación.

Sea $f(x, t)$ una función en un subconjunto abierto $U \subset \Omega$ que presenta un salto (discontinuidad) a través de la superficie cohesiva suave S , entonces para un subconjunto abierto suave $U \subset \Omega$, se cumple:

$$\frac{d}{dt} \int_{\Phi_t(U)} \rho f dv = \int_{\Phi_t(U^\pm)} \rho \dot{f} dv + \int_{S \cap \partial \Phi_t(U)} [\rho f] (v_n - v_{n_S}) da + \int_S \dot{f}_S da \quad (\text{B.29})$$

Donde v_{n_S} es la velocidad de S en la dirección normal a la superficie, y v_n es la velocidad normal de la superficie asociada a la deformación $\phi_t(X, t)$, y de nuevo, el operador $[[\bullet]]$ denota el salto de la variable del argumento a través de la superficie S .

ANEXO C

RUTINA INTERFAZ

C.1. INTRODUCCIÓN

En este Anexo se adjunta la rutina UMAT implementada para la realización de las diferentes simulaciones computacionales. Con esta se determinará el comportamiento de la interfaz en base al modelo matemático propuesto.

C.2. RUTINA INTERFAZ

```

C-----UMAT-----

      SUBROUTINE UMAT(STRESS,STATEV,DDSDDE,SSE,SPD,SCD,
      1RPL,DDSDDT,DRPLDE,DRPLDT,
      2STRAN,DSTRAN,TIME,DTIME,TEMP,DTEMP,PRED,DPRED,CMNAME,
      3NDI,NSHR,NTENS,NSTATV,PROPS,NPROPS,COORDS,DROT,PNEWDT,
      4CELENT,DFGRD0,DFGRD1,NOEL,NPT,LAYER,KSPT,KSTEP,KINC)

C
      INCLUDE 'ABA_PARAM.INC'

C
      PARAMETER (EPS=1E-7, T=310)
      CHARACTER*8 CMNAME
      DIMENSION STRESS(NTENS),STATEV(NSTATV),
      1DDSDDE(NTENS,NTENS),DDSDDT(NTENS),DRPLDE(NTENS),
      2STRAN(NTENS),DSTRAN(NTENS),TIME(2),PRED(1),DPRED(1),
      3PROPS(NPROPS),COORDS(3),DROT(3,3),DFGRD0(3,3),DFGRD1(3,3)

C
C DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES DEL PROGRAMA
C
      integer i,j
      real*8 kn0,ks0,kt0,delta0,deltac,delta,delta_max,beta_ini,time2
      real*8 delta0_t,deltac_t,delta_t,delta_max_t
      real*8 defelasxyz(NTENS),d(3,3),pend_fallo,pend_fallo_t
      real*8 beta,beta_n,beta_t,beta_punto
      real*8 a,dist,c,c_max,tn,tt,area_elem,omega_ini
      real*8 carga,carga_x,carga_y,carga_z,ten_x,ten_y,ten_z
      real*8 mu,mu_f,mu_chi,mu_elas_s,mu_elas_b,mu_elas,mu_conf
      real*8 omega,lamda,H,c_gorro,curvatura,max_beta
      real*8 mu_limite,min_beta
      real*16 K_BOL,B

C
C

```


C LEEMOS LAS PROPIEDADES DE LA INTERFAZ

C

```
kn0=PROPS(1)
ks0=PROPS(2)
kt0=PROPS(2)
delta0=PROPS(3)
deltac=PROPS(4)
delta_max=STATEV(1)
beta_ini=PROPS(5)
delta0_t=PROPS(6)
deltac_t=PROPS(7)
delta_max_t=STATEV(3)
dist=PROPS(8)
omega_ini=PROPS(9)
beta=STATEV(8)
max_beta=1
min_beta=0.00001
omega=STATEV(9)
mu_limite=-3.654E-06
mu=STATEV(10)
```

C

C INICIALIZACIÓN DEL MODELO NUMÉRICO

C

```
time2=TIME(2)
if (time2.lt.EPS) then
    print*,'pend fallo ini:',pend_fallo
    pend_fallo=(kn0*delta0)/(deltac-delta0)
    print*,'la pendiente de fallo es:',pend_fallo
    delta_max=(pend_fallo*delta0+kn0*delta0)/
*      (pend_fallo+beta_ini*kn0)
    print*,'el desplazamiento max es:',delta_max
    print*,''
    print*,'pend fallo t ini:',pend_fallo_t
    pend_fallo_t=(ks0*delta0_t)/(deltac_t-delta0_t)
    print*,'la pendiente de fallo tangencial es:',pend_fallo_t
    delta_max_t=(pend_fallo_t*delta0_t+ks0*delta0_t)/
*      (pend_fallo_t+beta_ini*ks0)
```

```

        print*, 'el desplazamiento max tangencial es:', delta_max_t
        beta=beta_ini
        print*, 'beta_ini:', beta
        omega=omega_ini
        print*, 'omega1:', omega
        print*, 'min beta lo coge:', min_beta
        print*, "
    endif
C
C  INICIALIZACIÓN DE LAS DEFORMACIONES
C
    do i=1, ntens
        defelasxyz(i)=stran(i)+dstran(i)
    enddo

        delta=defelasxyz(1)
        delta_t=sqrt(defelasxyz(2)**2+defelasxyz(3)**2)
C

        ten_x=STATEV(5)
        ten_y=STATEV(6)
        ten_z=STATEV(7)
        print*, 'stran1', stran(1), 'dstran1', dstran(1)
        print*, 'stran2', stran(2), 'dstran2', dstran(2)
        print*, 'stran3', stran(3), 'dstran3', dstran(3)
        print*, 'KINC', KINC
        print*, 'NOEL', NOEL
        print*, 'delta', delta
        print*, 'delta_t', delta_t
        print*, "
        print*, 'delta_max:', delta_max
        print*, 'delta_max_t:', delta_max_t
        print*, "
C
C
C
C
C

```

C CÁLCULO DE COEFICIENTES DEL TENSOR DE COMPORTAMIENTO

C

C 1- EVALÚO EL FALLO PARA AMBAS DIRECCIONES:

C

```
if (delta.ge.delta_max) then
```

C

C 1.1-FALLO A NORMAL

C

```
if (delta.gt.delta0) then
```

```
if (delta.le.deltac) then
```

```
d(1,1)=(kn0*delta0)*(delta-deltac)/
```

```
* (delta*(delta0-deltac))
```

```
beta=d(1,1)/kn0
```

```
print*, 'Cae por la curva de la derecha con:'
```

```
print*, 'delta FALLO:', delta, 'pendiente de FALLO:', d(1,1)
```

```
print*, 'beta fallo:', beta
```

```
else
```

```
d(1,1)=1e-9
```

```
beta=min_beta
```

```
print*, 'Rompe en la dirección normal!!'
```

```
print*, 'La k es:', d(1,1)
```

```
print*, 'beta es:', beta
```

```
print*, ''
```

```
endif
```

```
else
```

```
d(1,1)=kn0*beta
```

```
endif
```

```
delta_max=delta
```

```
elseif (delta_t.ge.delta_max_t) then
```

C

C 1.2-FALLO A TANGENCIAL:

C

```
if (delta_t.gt.delta0_t) then
```

```
if (delta_t.le.deltac_t) then
```

```
d(2,2)=(ks0*delta0_t)*(delta_t-deltac_t)/
```

```
* (delta_t*(delta0_t-deltac_t))
```

```

                                d(3,3)=(kt0*delta0_t)*(delta_t-deltac_t)/
*                                (delta_t*(delta0_t-deltac_t))
                                beta=d(2,2)/ks0
                                print*,'Cae por la curva de la derecha con:'
                                print*,'delta tang FALLO:',delta_t,'pendiente tang FALLO:',d(2,2)
                                print*,'beta fallo tg:',beta
                                else
                                    d(2,2)=1e-9
                                    d(3,3)=1e-9
                                    beta=min_beta
                                    print*,'Rompe en la dirección tangencial!!'
                                    print*,'La k tg es:',d(2,2)
                                    print*,'beta tg es:',beta
                                    print*,"
                                    endif
                                else
                                    d(2,2)=ks0*beta
                                    d(3,3)=kt0*beta
                                    endif
                                delta_max_t=delta_t
                                else
C
C 2- EVALÚO EL GRADO DE ADHESIÓN: THERMODYNAMIC DRIVING FORCES AND KINETICS CRITERIO
C
                                d(1,1)=kn0*beta
                                d(2,2)=ks0*beta
                                STATEV(9)=omega
                                pend_fallo=(kn0*delta0)/(deltac-delta0)
                                pend_fallo_t=(ks0*delta0_t)/(deltac_t-delta0_t)
                                print*,'beta antes:',beta
                                print*,'omega2:',omega
                                print*,'mu limite:',mu_limite
                                print*,"
                                if ((beta .lt. max_beta ) .and. (beta .gt .min_beta)) then

```

C **CONTRIBUCIÓN ELÁSTICA:**

C **1-TENSIÓN:**

```

    tn=kn0*beta*delta
    tt=ks0*beta*delta_t
    if (abs(ten_z).gt.EPS) then
        if (abs(ten_y).gt.EPS) then
            if (abs(ten_x).gt.EPS) then
                mu_elas_s=(0.5*delta*tn)+
*                2*(0.5*delta_t*tt)
            else
                mu_elas_s=(0.5*delta*tn)+
*                (0.5*delta_t*tt)
            endif
        else
            mu_elas_s=0.5*delta*tn
        endif
    else
        print*, 'No hay contribución elástica.'
    endif
    print*, 'el mu elastico stret es:', mu_elas_s

```

C **2-CURVATURA:**

```

    B=1E-04
    c_gorro=13.6986
    curvatura=1
    mu_elas_b=(B*0.5/c_gorro)*(curvatura**2)
    print*, 'el mu elastico bend es:', mu_elas_b

```

C **3-TOTAL:**

```

    mu_elas=mu_elas_s+mu_elas_b
    print*, 'el mu elastico total es:', mu_elas

```

C

C **CONTRIBUCIÓN CONFIGURACIONAL:**

C

C EVALUO LA FUERZA HACIENDO EL MODULO DE LAS TRES DIRECCIONES

C

```

    print*, 'ten x:', ten_x
    print*, 'ten y:', ten_y
    print*, 'ten z:', ten_z

```

```

area_elem=0.2
carga_x=ten_x*area_elem
carga_y=ten_y*area_elem
carga_z=ten_z*area_elem
carga=sqrt((carga_x**2)+(carga_y**2)+(carga_z**2))
print*, 'la carga total es:', carga
mu_conf=(-carga)*dist
print*, 'el mu configuracional es:', mu_conf

```

C

C

CONTRIBUCIÓN TOTAL:

C

C

```
mu=mu_f+mu_elas+mu_conf (1 aproximación)
```

C

```
mu=mu_elas+mu_conf (2 aproximación)
```

```
mu=mu_elas+mu_limite
```

```
print*, 'el mu total es:', mu
```

C

C

EVALÚO EL DAÑO:

C

C

1) MU MAYOR QUE CERO --> SE PRODUCE UNIÓN:

C

```
SE PRODUCE UNIÓN SIEMPRE QUE MU SEA POSITIVO
```

C

```

if (mu.gt.0) then
  a=0.002
  K_BOL=1.3806504E-05
  print*, 'mu creciente:', mu
  print*, 'beta antes incremento:', beta
  beta_punto=a*(1-exp(-mu/(K_BOL*T)))
  print*, 'beta punto es:', beta_punto
  beta=beta+(beta_punto*DTIME)
  print*, 'beta despues:', beta
  d(1,1)=beta*kn0
  print*, 'd(1,1)=', d(1,1)
  d(2,2)=beta*ks0
  d(3,3)=beta*kt0
  print*, 'pend fallo:', pend_fallo
  print*, 'pend fallo tan:', pend_fallo_t
  delta_max=((pend_fallo*delta0)+(kn0*delta0))/

```

```

*          ((pend_fallo+d(1,1)))
delta_max_t=((pend_fallo_t*delta0_t)+
*          (ks0*delta0_t))/((pend_fallo_t+d(2,2)))
print*,'delta_max ADHESION:',delta_max,'beta ADHESION',beta
print*,'Kn nueva:',d(1,1)
print*,'delta_max tang ADHESION',delta_max_t,
*          'beta tang ADHESION',beta
print*,'Ks nueva:',d(2,2)

C
C      2) MU MENOR QUE CERO --> SE PRODUCE SEPARACIÓN:
C      SE PRODUCE SEPRACIÓN SIEMPRE QUE MU SEA NEGATIVO
C
      else
          a=3.096E-03
          K_BOL=1.3806504E-05
          print*,'mu decreciente:',mu
          print*,'beta antes incremento:',beta
          beta_punto=a*(exp(mu/(K_BOL*T))-1)
          print*,'beta punto es:',beta_punto
          beta=beta+(beta_punto*DTIME)
          print*,'beta despues:',beta
          d(1,1)=beta*kn0
          print*,'d(1,1)=' ,d(1,1)
          d(2,2)=beta*ks0
          d(3,3)=beta*kt0
          print*,'pend fallo:',pend_fallo
          print*,'pend fallo tan:',pend_fallo_t
          delta_max=((pend_fallo*delta0)+(kn0*delta0))/
*          ((pend_fallo+d(1,1)))
          delta_max_t=((pend_fallo_t*delta0_t)+
*          (ks0*delta0_t))/((pend_fallo_t+d(2,2)))
          print*,'delta_max ADHESION:',delta_max,'beta ADHESION',beta
          print*,'Kn nueva:',d(1,1)
          print*,'delta_max tang ADHESION',delta_max_t,
*          'beta tang ADHESION',beta
          print*,'Ks nueva:',d(2,2)
      endif

```

C PERO SI BETA=1, SIGNIFICARÁ QUE HA LLEGADO AL NIVEL MÁXIMO Y NO PUEDE SEGUIR ADHIRIENDO MÁS

C

```
elseif (beta.ge.max_beta) then
    print*, ' Está completamente adherida la célula al sustrato!!'
    print*, ''
    beta=max_beta
    print*, 'delta max:', delta_max
    print*, 'delta max t:', delta_max_t
    print*, 'delta ADHESION:', delta, 'beta ADHESION:', beta
    print*, 'delta tang ADHESION', delta_t,
    *      'beta tang ADHESION:', beta
```

C

C PERO SI BETA=0, SIGNIFICARÁ QUE HA LLEGADO AL NIVEL MÍNIMO Y SE ENCUENTRA COMPLETAMENTE SEPARADA

C

```
elseif (beta.eq.min_beta) then
    print*, ' Está separada la célula al sustrato!!'
    print*, ''
    beta=min_beta
    print*, 'delta max:', delta_max
    print*, 'delta max t:', delta_max_t
    print*, 'delta ADHESION:', delta, 'beta ADHESION:', beta
    print*, 'delta tang ADHESION', delta_t,
    *      'beta tang ADHESION:', beta
    else
    endif
```

C

```
endif
```

C

C **JACOBIAN MATRIX OF THE CONSTITUTIVE MODEL ($\sigma = D \epsilon$)**

C

```
do i=1,ntens
    do j=1,ntens
        ddsdde(i,j)=d(i,j)
    enddo
enddo
```


C CALCULAMOS LAS TENSIONES

C

```

do i=1,ntens
    stress(i)=0.0
    do j=1,ntens
        stress(i)=stress(i)+ddsdde(i,j)*(defelasxyz(j))
        print*,"
    enddo
enddo

```

C

C ASOCIACIÓN DE LAS TENSIONES GENERADAS

C

```

ten_x=stress(2)
ten_y=stress(3)
ten_z=stress(1)
print*,'tensión x:',ten_x
print*,'tensión y:',ten_y
print*,'tensión z:',ten_z
print*,'beta final:',beta
print*,'omega final:',omega
print*,"

```

C

C ACTUALIZACIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTADO

C

```

STATEV(1)=delta_max
STATEV(2)=d(1,1)
STATEV(3)=delta_max_t
STATEV(4)=d(2,2)
STATEV(5)=ten_x
STATEV(6)=ten_y
STATEV(7)=ten_z
STATEV(8)=beta
STATEV(9)=omega
STATEV(10)=mu
print*,"

```

RETURN

END.

ANEXO D

RESULTADOS NUMÉRICOS DE LAS SIMULACIONES

D.1. INTRODUCCIÓN

En este Anexo se presentan los resultados numéricos obtenidos de las diferentes simulaciones realizadas en el modelo teórico de adhesión celular. En primer lugar se muestran una serie de imágenes recogidas del estado final en el que se encuentra la interfaz para cada una de las simulaciones y posteriormente se muestran mediante tablas los resultados obtenidos de β_{\max} y β_{\min} , para los diferentes estados tensionales a lo largo de la interfaz.

D.2. RESULTADOS GRÁFICOS

En este apartado se presentan gráficamente con la ayuda de ABAQUS CAE los diferentes resultados gráficos obtenidos en la simulación computacional del modelo teórico de interfaz. Con estas imágenes correspondientes al estado final del grado de adhesión de la interfaz, junto con los ficheros de salida programados para pintar las variables de estado, se han obtenido los diagramas de estado presentados en el capítulo 3. El ABAQUS CAE sólo ha sido utilizado en este Proyecto Fin de Carrera para visualización de resultados, puesto que tanto la geometría, como el modelo matemático han sido programados manualmente mediante el código FORTRAN y ficheros de texto .INP.

Las imágenes obtenidas para los distintos casos son las siguientes:

D.2.1. SIMULACIONES A TRACCIÓN PURA

Estas imágenes corresponden a la distribución del grado de adhesión para el instante final, a los 1000 segundos, en el caso en el que se ha aplicado una tensión constante e igual a $0,1\text{pN}/\mu\text{m}^2$ en los 5 elementos centrales del modelo. Como se puede observar en la leyenda de la figura D.1, β se distribuye uniformemente a lo largo de esta, a pesar de la degradación en la escala.

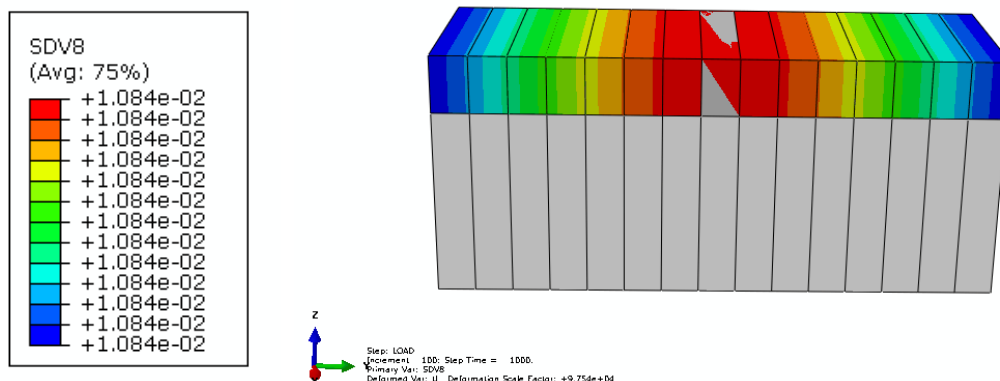


Figura D.1: Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar tracción pura.

D.2.2. SIMULACIONES A TRACCIÓN LINEAL

Estas imágenes corresponden a la distribución del grado de adhesión para el instante final, a los 1000 segundos, en el caso en el que se ha aplicado una tensión lineal en orden creciente hacia la derecha e igual a $0,01\text{pN}/\mu\text{m}^2$ en los 5 elementos centrales del modelo. Como se puede observar en la leyenda de la figura D.2, β se distribuye linealmente hacia la derecha, siendo el elemento 15, el situado a la derecha del todo el que presenta mayor grado de adherencia.

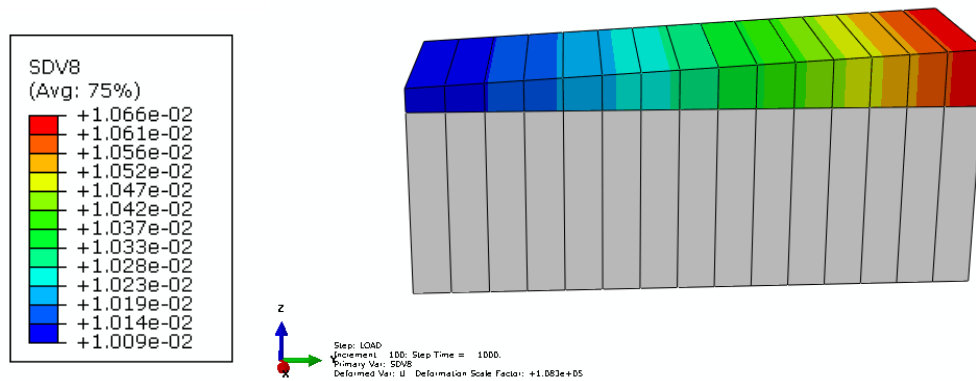


Figura D.2: Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar tracción lineal.

Como se puede observar en la figura D.3, la distribución de tensiones normales para las mismas condiciones que el de la figura D.2, coincide con la distribución del grado de adhesión a lo largo de la interfaz, lo cual nos indica la gran dependencia de β con las tensiones normales aplicadas sobre el modelo.

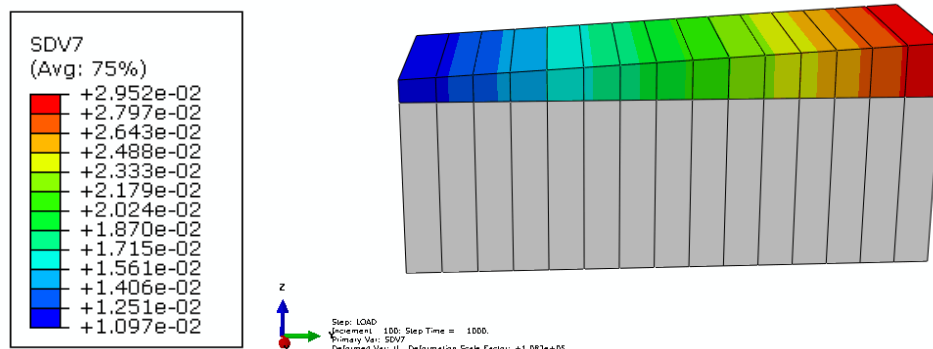


Figura D.3: Distribución de tensiones normales en la interfaz al aplicar tracción lineal.

D.2.3. SIMULACIONES A TANGENCIAL PURA

Estas imágenes corresponden a la distribución del grado de adhesión para el instante final, a los 1000 sg, en el caso en el que se ha aplicado una tensión constante e igual a $0,1\text{pN}/\mu\text{m}^2$ en los 5 elementos centrales del modelo. Como se puede observar en la leyenda de la figura D.4, β no se distribuye uniformemente en la interfaz como en los casos anteriores, obteniendo los máximos en los extremos de esta.

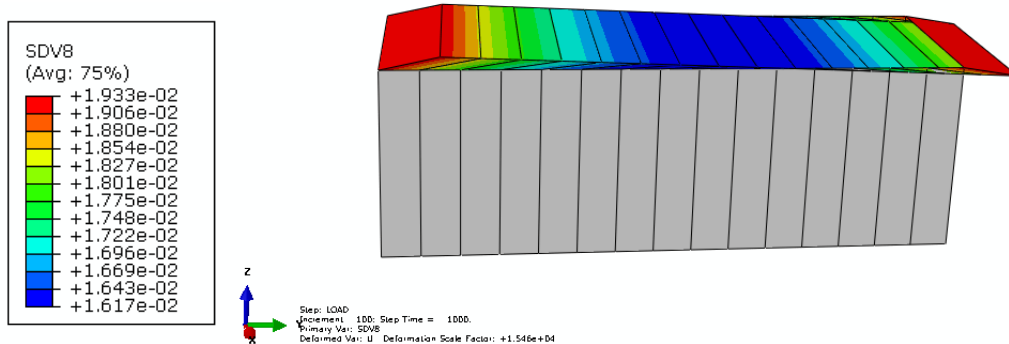


Figura D.4: Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar tangencial pura.

A diferencia del caso a tracción, cuando se aplica una carga en dirección tangencial, esta no sólo genera tensiones en la dirección de aplicación sino que también genera tensiones en la dirección normal, como se ha explicado en el capítulo 3, debido a que se crean momentos sobre la interfaz.

En la figura D.5 se muestran las tensiones generadas en la dirección tangencial (Y), y en la figura D.6 se muestran las generadas en la dirección normal. Ambas imágenes corresponden a las mismas condiciones de carga que las de la figura D.4.

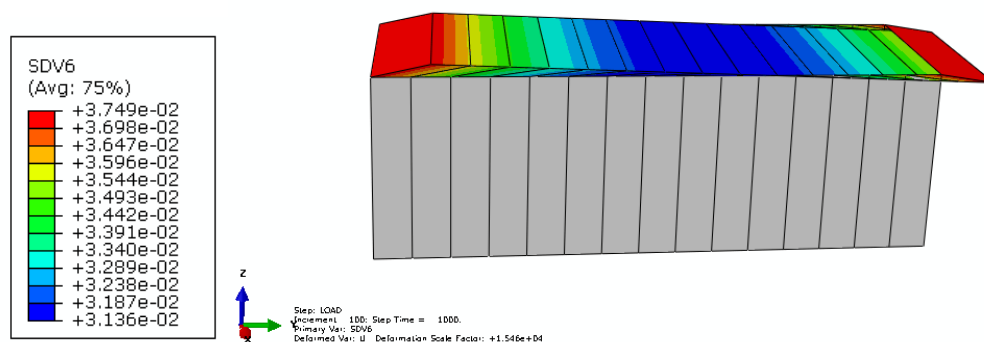


Figura D.5: Distribución de tensiones tangenciales en la interfaz al aplicar tracción lineal.

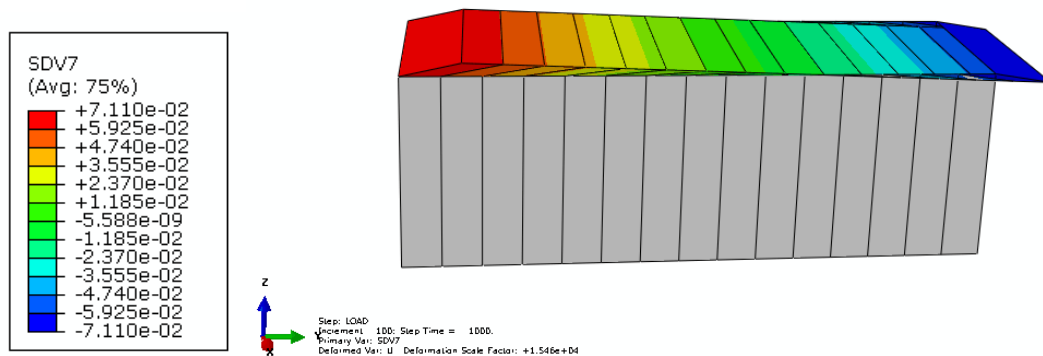


Figura D.6: *Distribución de tensiones normales en la interfaz al aplicar tracción lineal.*

D.2.4. SIMULACIONES A TANGENCIAL LINEAL

Estas imágenes corresponden a la distribución del grado de adhesión para el instante final, a los 1000 segundos, en el caso en el que se ha aplicado una tensión lineal en orden creciente hacia la derecha e igual a $0,01\text{pN}/\mu\text{m}^2$ en los 5 elementos centrales del modelo. Como se puede observar en la leyenda de la figura D.7, β no se distribuye uniformemente a lo largo de la interfaz, obteniendo los máximos en los extremos de esta, exactamente del mismo modo que en el caso en el que aplicábamos la carga tangencial pura. Cabe destacar que para este caso β alcanza valores un poco menores que para el caso anterior.

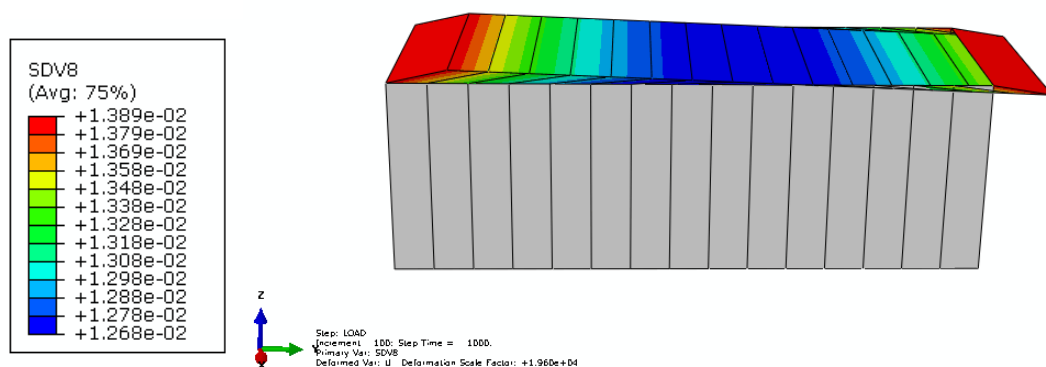


Figura D.7: *Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar tangencial lineal.*

La distribución de tensiones en ambas direcciones se comporta del mismo modo que en el caso anterior.

D.2.5. SIMULACIONES APLICANDO LA CARGA A 45 GRADOS

Estas imágenes corresponden a la distribución del grado de adhesión para el instante final, a los 1000 segundos, en el caso en el que se ha aplicado una tensión constante a 45° e igual a $1\text{pN}/\mu\text{m}^2$ en los 5 elementos centrales del modelo. Como se puede observar en la leyenda de la figura D.8, β no se distribuye uniformemente en la interfaz, obteniendo el máximo en el extremo izquierdo de esta.

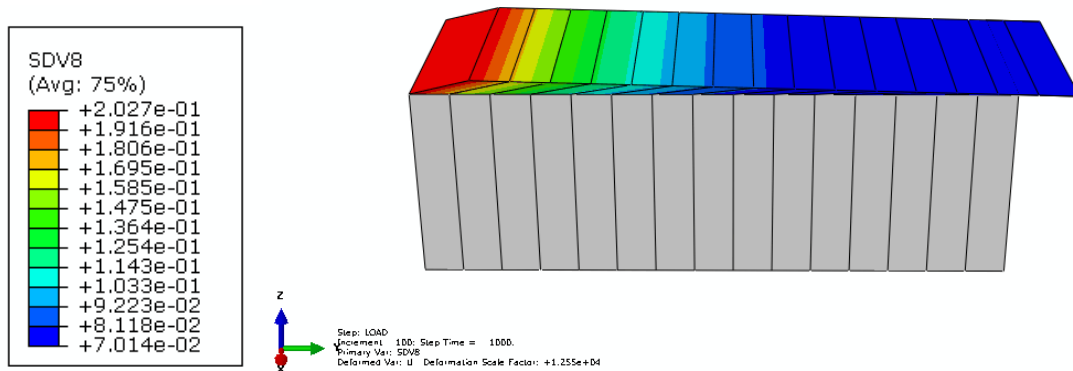


Figura D.8: Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar la carga a 45°.

En la figura D.9 se muestran las tensiones generadas en la dirección tangencial (Y), y en la figura D.10 se muestran las generadas en la dirección normal. Ambas imágenes corresponden a las mismas condiciones de carga que las de la figura D.8. Como se puede observar en ambas, la distribución de tensiones en ambas direcciones coincide con la distribución de β a lo largo de la interfaz.

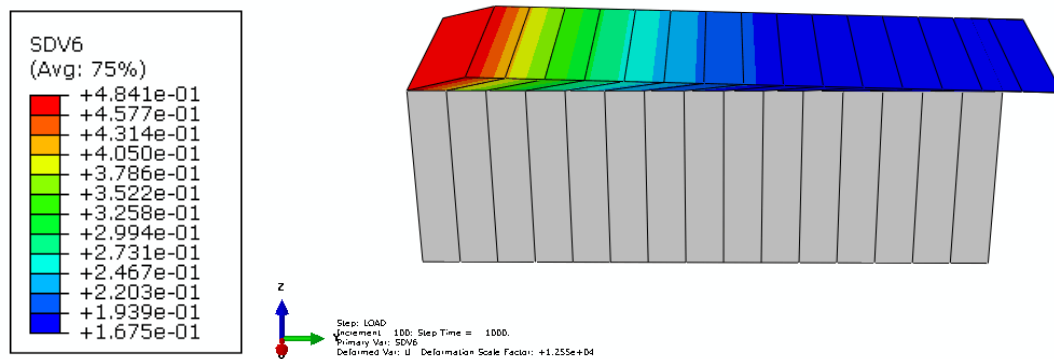


Figura D.9: Distribución de tensiones tangenciales en la interfaz al aplicar carga a 45°.

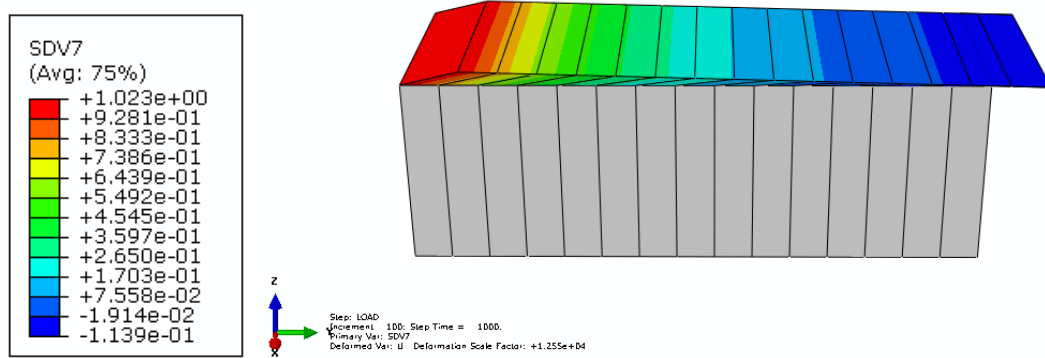


Figura D.10: Distribución de tensiones normales en la interfaz al aplicar la carga a 45°.

D.2.6. SIMULACIONES APLICANDO LA CARGA A 45 GRADOS, LINEAL

Estas imágenes corresponden a la distribución del grado de adhesión para el instante final, a los 1000 segundos, en el caso en el que se ha aplicado una tensión lineal a 45° en orden creciente hacia la derecha, e igual a $0,1\text{pN}/\mu\text{m}^2$ en los 5 elementos centrales del modelo. Como se puede observar en la leyenda de la figura D.11, β no se distribuye uniformemente a lo largo de la interfaz, obteniendo el máximo en el extremo izquierdo de esta.

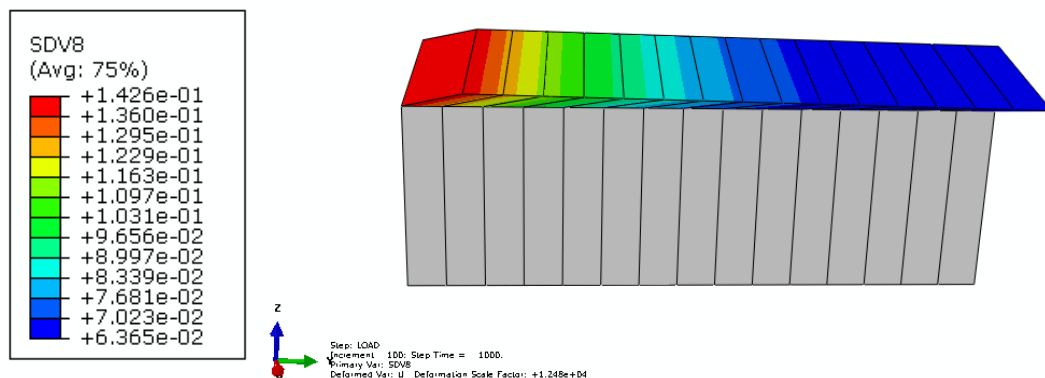


Figura D.11: Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar carga lineal a 45°.

La distribución de tensiones en ambas direcciones se comporta del mismo modo que en el caso anterior.

D.2.7. SIMULACIONES VARIANDO LA RIGIDEZ DEL SUSTRATO

Las siguientes imágenes corresponden a la distribución del grado de adhesión para el instante final, a los 1000 segundos, en el que se ha aplicado una tensión lineal a 45° en orden creciente hacia la derecha, e igual a $0,01\text{pN}/\mu\text{m}^2$ en los 5 elementos centrales del modelo. Para estas simulaciones, como se ha explicado en el capítulo 3, se ha escogido un sustrato con menor rigidez que el sustrato utilizado para las anteriores simulaciones, con el fin de establecer cómo afecta este en la evolución del grado de adhesión de la interfaz. Como se puede observar en la figura D.12 la distribución del grado de adhesión ha cambiado con respecto a los casos en los que se aplicaba el mismo estado de carga pero con un sustrato igual de rígido que la célula.

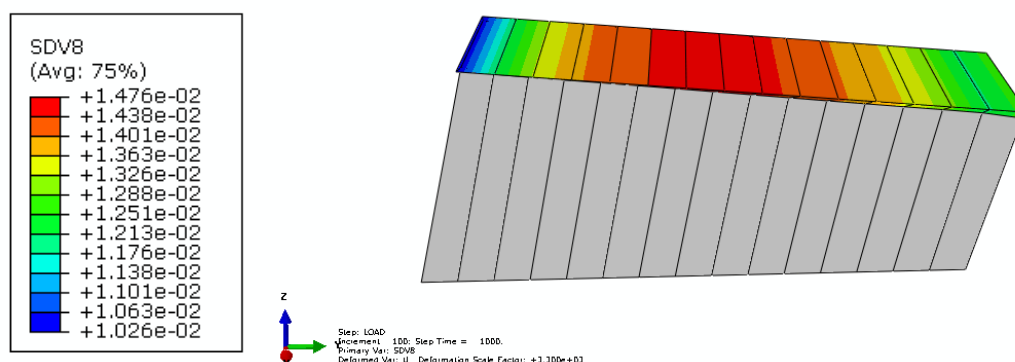


Figura D.12: Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar la carga lineal a 45° , variando la rigidez del sustrato.

Cabe destacar la variación en la deformada, puesto que al ser el sustrato menos rígido que lo que tiene encima, la interfaz y la célula, este se deforma mucho más en la dirección de la carga aplicada y además se adhiere mucho mejor y a lo largo de mayor número de elementos.

En la figura D.13 se muestran las tensiones generadas en la dirección tangencial (Y), y en la figura D.14 se muestran las generadas en la dirección normal. Ambas imágenes corresponden a las mismas condiciones de carga que las de la figura D.8. Como se puede observar en ambas, la distribución de tensiones en ambas direcciones coincide con la distribución de β a lo largo de la interfaz.

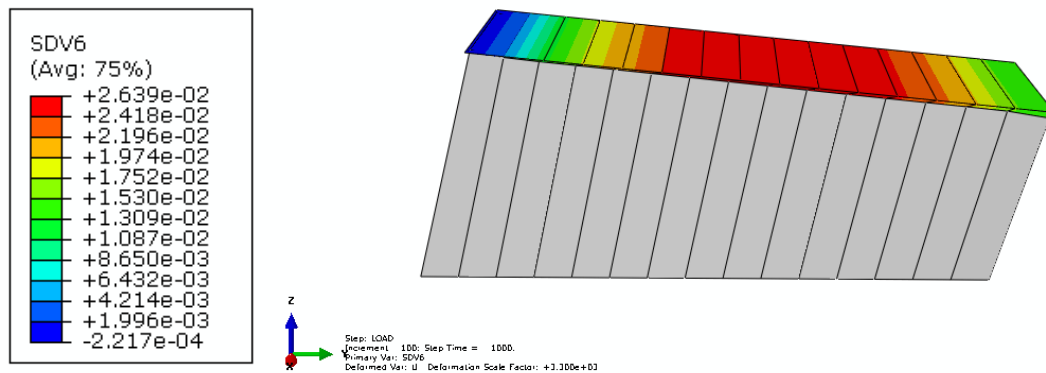


Figura D.13: *Distribución de tensiones tangenciales en la interfaz al aplicar carga a 45°, variando la rigidez del sustrato.*

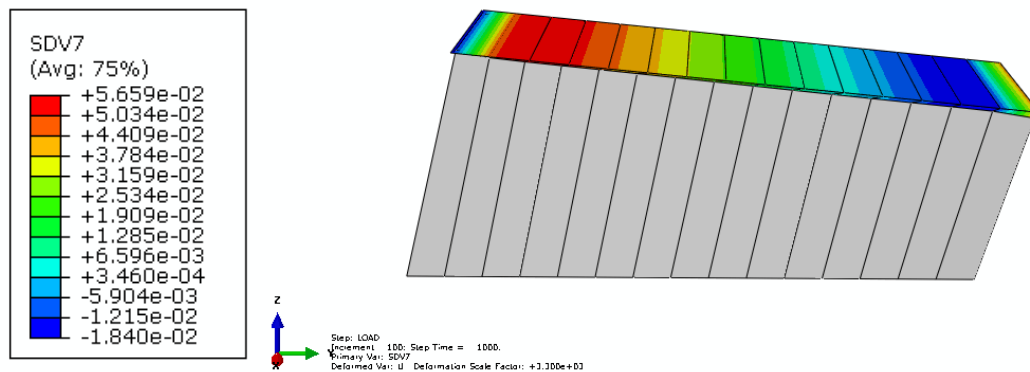


Figura D.14: *Distribución de tensiones tangenciales en la interfaz al aplicar carga a 45°, variando la rigidez del sustrato.*

D.2.8. SIMULACIONES VARIANDO LA DISTRIBUCIÓN DE LA CARGA CONTRÁCTIL EN EL DOMINIO DE LA ADHESIÓN FOCAL

Las siguientes imágenes corresponden a la distribución del grado de adhesión para el instante final, a los 1000 segundos, en el que se ha aplicado una tensión lineal a 45° en orden creciente hacia la derecha, e igual a $0,01\text{pN}/\mu\text{m}^2$. Para estas simulaciones se ha aplicado la carga a lo largo de toda la interfaz, en vez de en los 5 elementos centrales de esta, con el fin de establecer cómo afecta a la evolución del grado de adhesión de la interfaz. Como se puede observar en la figura D.15 la distribución del grado de adhesión no ha cambiado con respecto a las imágenes

obtenidas para el caso de aplicación en los 5 elementos centrales, se adhieren exactamente el mismo número de elementos de la interfaz, pero con la salvedad de que alcanza un grado menor de adhesión, es decir se adhiere más lentamente.

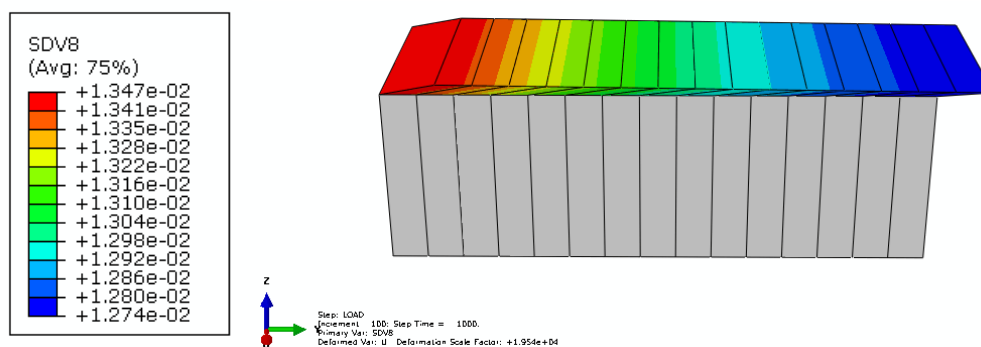


Figura D.15: *Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar la carga lineal a 45°, variando la distribución de carga en el dominio de la adhesión focal.*

La distribución de tensiones en ambas direcciones se comporta del mismo modo que en el caso en el que se aplicaban las mismas condiciones de carga para los 5 elementos centrales.

D.2.9. SIMULACIONES VARIANDO LA DISTRIBUCIÓN EN EL TIEMPO

Las siguientes imágenes corresponden a la distribución del grado de adhesión para el instante final, a los 1000 segundos, en el que se ha aplicado una tensión lineal a 45° en orden creciente hacia la derecha, e igual a $10\text{pN}/\mu\text{m}^2$ en los 5 elementos centrales del modelo. Para estas simulaciones, se ha aplicado la carga de golpe en un instante de tiempo igual al tiempo total, en vez de linealmente como hacíamos en las anteriores simulaciones, con el fin de establecer cómo afecta la velocidad de contracción celular en la evolución del grado de adhesión de la interfaz. Como se puede observar en la figura D.16 la distribución del grado de adhesión es bastante similar al caso genérico de aplicación de la carga a 45° lineal.

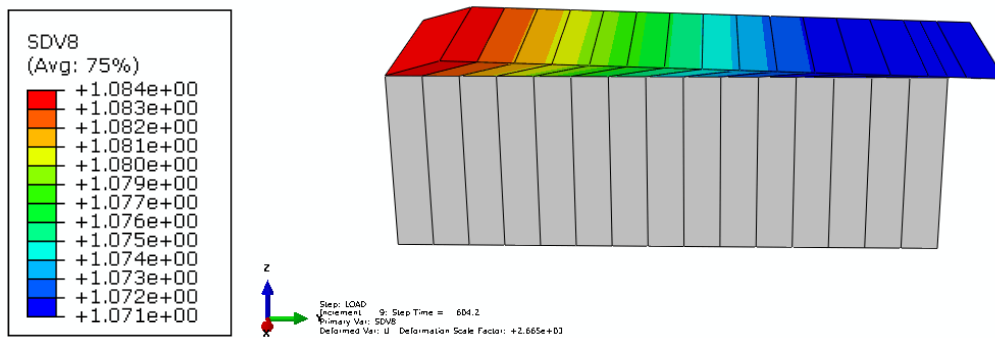


Figura D.16: *Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar la carga lineal a 45°, variando la distribución en el tiempo, para un $t=1000$ segundos.*

Cabe destacar que este es un caso especial de aplicación puesto que al aplicar la carga en un único instante de tiempo igual al tiempo total, 1000 segundos, nuestra interfaz sólo experimenta cambios en el grado de adhesión para este caso de carga igual a $10\text{pN}/\mu\text{m}^2$. Para las simulaciones lanzadas con estados de carga mayores y menores a este valor no ha experimentado ningún cambio el grado de adhesión.

Con el fin de obtener resultados mucho más representativos sobre como la afecta la velocidad de contracción al proceso de adhesión celular, presentamos resultados para dos tiempos distintos. Hasta ahora sólo hemos evaluado para dos velocidades de adhesión, o aplicando todo en el instante inicial igual a 0 segundos, o aplicando toda la carga para un instante de tiempo igual a 1000 segundos. Por tanto hemos decidido evaluar que pasa en nuestra interfaz para un instante de tiempo intermedio igual a 500 segundos. Como se puede observar en la figura D.17, al disminuir la velocidad de contracción, esta adhiere mucho menos y en menor número de elementos.

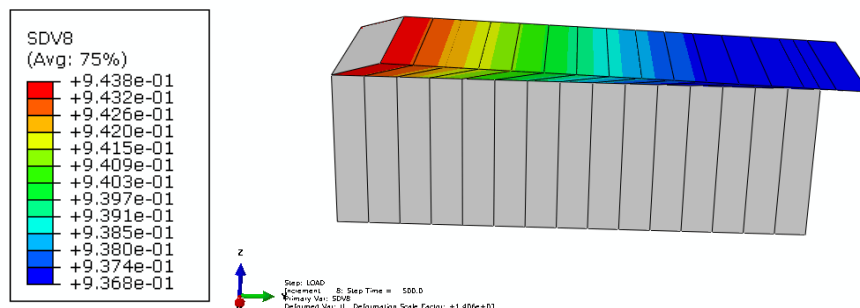


Figura D.17: *Evolución del grado de adhesión en la interfaz al aplicar la carga lineal a 45°, variando la distribución en el tiempo, para un $t=500$ segundos.*

D.3. TABLAS DE RESULTADOS

En este apartado se muestran en tablas los resultados numéricos obtenidos en cada una de las simulaciones realizadas sobre el modelo teórico de adhesión focal.

D.3.1. SIMULACIONES A TRACCIÓN PURA

Nº de Simulación	Tensión aplicada	B max	B min	Nº elementos con β_{\max}
1	10^{-5}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
2	10^{-4}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
3	10^{-3}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
4	10^{-2}	1,0007E-02	1,0007E-02	0.5
5	10^{-1}	1,0839E-02	1,0839E-02	3,5
6	10^0	4,2346E-02	4,2308E-02	3,5
7	10^1	3,8600E-01	3,8270E-01	3,5
8	10^2	1	1	15
9	10^3	1	1	0

Tabla D.1: Resultados de las simulaciones de aplicar tracción pura.

D.3.2. SIMULACIONES A TRACCIÓN LINEAL

Nº de Simulación	Tensión aplicada	B max	B min	Nº elementos con β_{\max}
1	10^{-5}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
2	10^{-4}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
3	10^{-3}	1,0000E-02	9,9985E-03	1
4	10^{-2}	1,0658E-02	1,0091E-02	1
5	10^{-1}	3,9909E-02	1,8313E-02	1
6	10^0	3,6010E-01	1,4830E-01	1
7	10^1	1	9,9500E-01	14
8	10^2	rompe	rompe	0
9	10^3	rompe	rompe	0

Tabla D.2: Resultados de las simulaciones de aplicar tracción lineal.

D.3.3. SIMULACIONES A TANGENCIAL PURA

Nº de Simulación	Tensión aplicada	B max	B min	Nº elementos con β_{\max}
1	10^{-5}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
2	10^{-4}	9,9971E-03	9,9971E-03	0.5
3	10^{-3}	9,9989E-03	9,9985E-03	2
4	10^{-2}	1,0120E-02	1,0089E-02	2
5	10^{-1}	1,9327E-02	1,6479E-02	2
6	10^0	2,0560E-01	1,1310E-01	2
7	10^1	1	1	6
8	10^2	rompe	rompe	0
9	10^3	rompe	rompe	0

Tabla D.3: Resultados de las simulaciones de aplicar tangencial pura.

D.3.4. SIMULACIONES A TANGENCIAL LINEAL

Nº de Simulación	Tensión aplicada	B max	B min	Nº elementos con β_{\max}
1	10^{-5}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
2	10^{-4}	9,9978E-03	9,9976E-03	0.5
3	10^{-3}	1,0090E-02	1,0060E-02	2
4	10^{-2}	1,3886E-02	1,2804E-02	2
5	10^{-1}	1,1940E-01	7,0803E-02	2
6	10^0	1,0070E+00	6,0610E-01	2
7	10^1	rompe	rompe	0
8	10^2	rompe	rompe	0
9	10^3	rompe	rompe	0

Tabla D.4: Resultados de las simulaciones de aplicar tracción pura.

D.3.5. SIMULACIONES APLICANDO LA CARGA A 45 GRADOS

Nº de Simulación	Tensión aplicada	B max	B min	Nº elementos con β_{max}
1	10^{-5}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
2	10^{-4}	9,9971E-03	9,9971E-03	0.5
3	10^{-3}	9,9984E-03	9,9978E-03	1
4	10^{-2}	1,0081E-02	1,0042E-02	1
5	10^{-1}	1,7126E-02	1,3442E-02	1
6	10^0	2,0270E-01	7,0138E-02	1
7	10^1	1,0130E+00	6,6490E-01	5
8	10^2	rompe	rompe	0
9	10^3	rompe	rompe	0

Tabla D.5: Resultados de las simulaciones de aplicar la carga a 45 grados.

D.3.6. SIMULACIONES APLICANDO LA CARGA A 45 GRADOS LINEAL

Nº de Simulación	Tensión aplicada	B max	B min	Nº elementos con β_{max}
1	10^{-5}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
2	10^{-4}	9,9971E-03	9,9971E-03	1
3	10^{-3}	1,0050E-02	1,0030E-02	1
4	10^{-2}	1,4582E-02	1,2651E-02	1
5	10^{-1}	1,4260E-01	6,3647E-02	1
6	10^0	1	5,4370E-01	3
7	10^1	rompe	rompe	0
8	10^2	rompe	rompe	0
9	10^3	rompe	rompe	0

Tabla D.6: Resultados de las simulaciones de aplicar la carga lineal a 45 grados.

D.3.7. SIMULACIONES VARIANDO LA RIGIDEZ DEL SUSTRATO

Nº de Simulación	Tensión aplicada	B max	B min	Nº elementos con β_{\max}
1	10^{-5}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
2	10^{-4}	9,9971E-03	9,9971E-03	1
3	10^{-3}	1,0052E-02	1,0010E-02	7,5
4	10^{-2}	1,4660E-02	1,0256E-02	8
5	10^{-1}	1,3550E-01	2,3556E-02	8,5
6	10^0	1,0000E+00	1,3830E-01	14
7	10^1	rompe	rompe	3
8	10^2	rompe	rompe	0,5
9	10^3	rompe	rompe	0

Tabla D.7: Resultados de las simulaciones de aplicar la carga lineal a 45 grados, variando la rigidez del sustrato.

D.3.8. SIMULACIONES VARIANDO LA DISTRIBUCIÓN DE LA CARGA CONTRÁCTIL EN EL DOMINIO DE LA ADHESIÓN FOCAL

Nº de Simulación	Tensión aplicada	B max	B min	Nº elementos con β_{\max}
1	10^{-5}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
2	10^{-4}	9,9971E-03	9,9971E-03	0,1
3	10^{-3}	1,0038E-02	1,0030E-02	0,3
4	10^{-2}	1,3467E-02	1,2737E-02	2
5	10^{-1}	1,0030E-01	7,0284E-02	2
6	10^0	8,6670E-01	5,9880E-01	3
7	10^1	rompe	rompe	0,3
8	10^2	rompe	rompe	0,1
9	10^3	rompe	rompe	0

Tabla D.8: Resultados de las simulaciones de aplicar la carga lineal a 45 grados, variando la distribución de carga en el dominio de la adhesión focal.

D.3.9. SIMULACIONES VARIANDO LA DISTRIBUCIÓN EN EL TIEMPO

Nº de Simulación	Tensión aplicada	B max	B min	Nº elementos con β_{\max}
1	10^{-5}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
2	10^{-4}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
3	10^{-3}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
4	10^{-2}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
5	10^{-1}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
6	10^0	9,9971E-03	9,9971E-03	0
7	10^1	1,0840E+00	1,0710E+00	3
8	10^2	rompe	rompe	0
9	10^3	rompe	rompe	0

Tabla D.9: Resultados de las simulaciones de aplicar la carga lineal a 45 grados, variando la distribución en el tiempo, para un $t=1000$ segundos.

Nº de Simulación	Tensión aplicada	B max	B min	Nº elementos con β_{\max}
10	10^{-5}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
11	10^{-4}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
12	10^{-3}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
13	10^{-2}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
14	10^{-1}	9,9971E-03	9,9971E-03	0
15	10^0	9,9971E-03	9,9971E-03	0
16	10^1	9,4380E-01	9,3680E-01	2
17	10^2	rompe	rompe	0
18	10^3	rompe	rompe	0

Tabla D.10: Resultados de las simulaciones de aplicar la carga lineal a 45 grados, variando la distribución en el tiempo, para un $t=500$ segundos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Harjanto, D. and M.H. Zaman, *Matrix mechanics and receptor-ligand interactions in cell adhesion*. Org Biomol Chem, 2010. **8**(2): p. 299-304.
2. Riveline, D., et al., *Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism*. J Cell Biol, 2001. **153**(6): p. 1175-86.
3. Balaban, N.Q., et al., *Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(5): p. 466-72.
4. Nicolas, A., B. Geiger, and S.A. Safran, *Cell mechanosensitivity controls the anisotropy of focal adhesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12520-5.
5. Aroush, D.R.B., et al., *Temporal evolution of cell focal adhesions: experimental observations and shear stress profiles*. Soft Matter, 2008. **4**(12): p. 2410-2417.
6. Olberding, J.E., et al., *The non-equilibrium thermodynamics and kinetics of focal adhesion dynamics*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12043.

7. Katz, B.Z., et al., *Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions*. Molecular Biology of the Cell, 2000. **11**(3): p. 1047-1060.
8. Moreo, P., et al., *Modelling the mechanical behaviour of living bony interfaces*. Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering, 2007. **196**(35-36): p. 3300-3314.
9. Schwarz, U.S., T. Erdmann, and I.B. Bischofs, *Focal adhesions as mechanosensors: The two-spring model*. Biosystems, 2006. **83**(2-3): p. 225-232.
10. Zhong, Y. and B. Ji, *Impact of cell shape on cell migration behavior on elastic substrate*. Biofabrication, 2013. **5**(1): p. 015011.
11. Kong, D., B. Ji, and L. Dai, *Stabilizing to disruptive transition of focal adhesion response to mechanical forces*. J Biomech, 2010. **43**(13): p. 2524-9.
12. Alon, U., *Biological networks: The tinkerer as an engineer*. Science, 2003. **301**(5641): p. 1866-1867.
13. Kitano, H., *Systems biology: A brief overview*. Science, 2002. **295**(5560): p. 1662-1664.
14. Galbraith, C.G. and M.P. Sheetz, *Forces on adhesive contacts affect cell function*. Current Opinion in Cell Biology, 1998. **10**(5): p. 566-571.
15. Geiger, B., et al., *Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. **2**(11): p. 793-805.
16. Janmey, P.A. and C.A. McCulloch, *Cell mechanics: Integrating cell responses to mechanical stimuli*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2007. **9**: p. 1-34.
17. Katsumi, A., et al., *Integrins in mechanotransduction*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(13): p. 12001-12004.
18. Buck, R.C., *Reorientation Response of Cells to Repeated Stretch and Recoil of the Substratum*. Experimental Cell Research, 1980. **127**(2): p. 470-474.
19. Dartsch, P.C. and H. Hammerle, *Orientation Response of Arterial Smooth-Muscle Cells to Mechanical Stimulation*. European Journal of Cell Biology, 1986. **41**(2): p. 339-346.
20. Jungbauer, S., et al., *Two characteristic regimes in frequency-dependent dynamic reorientation of fibroblasts on cyclically stretched substrates*. Biophys J, 2008. **95**(7): p. 3470-8.

21. Kaunas, R., et al., *Cooperative effects of Rho and mechanical stretch on stress fiber organization*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(44): p. 15895-15900.
22. Moretti, M., et al., *Endothelial cell alignment on cyclically-stretched silicone surfaces*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2004. **15**(10): p. 1159-1164.
23. Neidlinger-Wilke, C., et al., *Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: studies of cells grown in cyclically stretched substrates*. Journal of Orthopaedic Research, 2001. **19**(2): p. 286-293.
24. Wang, H., et al., *Cell orientation response to cyclically deformed substrates: experimental validation of a cell model*. J Biomech, 1995. **28**(12): p. 1543-52.
25. Bershadsky, A.D., N.Q. Balaban, and B. Geiger, *Adhesion-dependent cell mechanosensitivity*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003. **19**: p. 677-95.
26. Tan, J.L., et al., *Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1484-9.
27. Nicolas, A., A. Besser, and S.A. Safran, *Dynamics of cellular focal adhesions on deformable substrates: consequences for cell force microscopy*. Biophys J, 2008. **95**(2): p. 527-39.
28. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
29. Tee, S.Y., et al., *Cell shape and substrate rigidity both regulate cell stiffness*. Biophys J, 2011. **100**(5): p. L25-7.
30. Mofrad, M.R.K. and R.D. Kamm, *Cytoskeletal mechanics : models and measurements*. 2006, Cambridge ; New York: Cambridge University Press. x, 244 p.
31. Gao, H., J. Qian, and B. Chen, *Probing mechanical principles of focal contacts in cell-matrix adhesion with a coupled stochastic-elastic modelling framework*. J R Soc Interface, 2011. **8**(62): p. 1217-32.
32. Vineyard, G.H., *Frequency Factors and Isotope Effects in Solid State Rate Processes*. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 1957. **3**(1-2): p. 121-127.
33. Bell, G.I., *Theoretical-Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells or to Surfaces*. Advances in Applied Probability, 1980. **12**(3): p. 566-567.

34. Helfrich, W., *Elastic Properties of Lipid Bilayers - Theory and Possible Experiments*. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences, 1973. **C 28**(11-1): p. 693-703.
35. Zamir, E. and B. Geiger, *Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 20): p. 3583-90.
36. Legant, W.R., et al., *Multidimensional traction force microscopy reveals out-of-plane rotational moments about focal adhesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(3): p. 881-6.
37. Vicente-Manzanares, M. and A.R. Horwitz, *Adhesion dynamics at a glance*. Journal of Cell Science, 2011. **124**(23): p. 3923-3927.
38. Garcia-Aznar, J.M., M.A. Perez, and P. Moreo, *Modelling of Interfaces in Biomechanics and Mechanobiology*. Cmes-Computer Modeling in Engineering & Sciences, 2009. **48**(3): p. 271-302.
39. Crow, A., et al., *Contractile equilibration of single cells to step changes in extracellular stiffness*. Biophys J, 2012. **102**(3): p. 443-51.
40. Polacheck, W.J., I.K. Zervantonakis, and R.D. Kamm, *Tumor cell migration in complex microenvironments*. Cell Mol Life Sci, 2012.
41. Johnson, R.P. and S.W. Craig, *F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains*. Nature, 1995. **373**(6511): p. 261-4.
42. Lele, T.P., et al., *Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells*. J Cell Physiol, 2006. **207**(1): p. 187-94.
43. Smilenov, L.B., et al., *Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts*. Science, 1999. **286**(5442): p. 1172-4.
44. Evans, E.A., *Detailed mechanics of membrane-membrane adhesion and separation. I. Continuum of molecular cross-bridges*. Biophys J, 1985. **48**(1): p. 175-83.
45. Dembo, M., et al., *The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1988. **234**(1274): p. 55-83.
46. Shemesh, T., et al., *Focal adhesions as mechanosensors: A physical mechanism*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(35): p. 12383-12388.

47. Deshpande, V.S., et al., *A bio-mechanical model for coupling cell contractility with focal adhesion formation*. Journal of the Mechanics and Physics of Solids, 2008. **56**(4): p. 1484-1510.
48. Freund, L.B. and Y. Lin, *The role of binder mobility in spontaneous adhesive contact and implications for cell adhesion*. Journal of the Mechanics and Physics of Solids, 2004. **52**(11): p. 2455-2472.
49. Lin, Y., M. Inamdar, and L.B. Freund, *The competition between Brownian motion and adhesion in soft materials*. Journal of the Mechanics and Physics of Solids, 2008. **56**(1): p. 241-250.
50. Groot, S.R.D., *On Development of Nonequilibrium Thermodynamics*. Journal of Mathematical Physics, 1963. **4**(2): p. 147-&.
51. Erb, E.M., et al., *Integrin alpha IIb beta 3 reconstituted into lipid bilayers is nonclustered in its activated state but clusters after fibrinogen binding*. Biochemistry, 1997. **36**(24): p. 7395-7402.
52. Qian, J., J. Wang, and H. Gao, *Lifetime and strength of adhesive molecular bond clusters between elastic media*. Langmuir, 2008. **24**(4): p. 1262-1270.
53. Cukierman, E., et al., *Taking cell-matrix adhesions to the third dimension*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1708-1712.
54. Beningo, K.A., M. Dembo, and Y.I. Wang, *Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(52): p. 18024-18029.

