



Universidad
Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

Título del trabajo

Modelado específico de una célula individual
mediante elementos finitos para la obtención
de las fuerzas de tracción

*Specific finite element modeling of an individual cell
in order to obtain traction forces*

Autor

Nicolás Laita Dieste

Directores

María del Mar Cóndor Salgado
José Manuel García Aznar

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
ESCUELA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

CURSO 2016/2017



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

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

D./D^a. Nicolás Laita Dieste

con nº de DNI 77215017S en aplicación de lo dispuesto en el art.

14 (Derechos de autor) del Acuerdo de 11 de septiembre de 2014, del Consejo

de Gobierno, por el que se aprueba el Reglamento de los TFG y TFM de la

Universidad de Zaragoza,

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

"Modelado específico de una célula individual mediante elementos finitos para
obtención de las fuerzas de tracción"

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

Zaragoza, 13 de Noviembre del 2017

Fdo: Nicolás Laita Dieste

Resumen

El estudio del entorno celular desde el punto de vista de la biomecánica es un área de investigación muy desarrollada hoy en día. Pese a que todavía hay un gran número de incógnitas, ha quedado demostrado en los últimos años que las propiedades mecánicas de las células y su entorno, así como las sollicitaciones mecánicas que han de soportar, tienen un papel primordial en muchos procesos celulares de diversos tipos como por ejemplo la contracción, migración, desarrollo, diferenciación o incluso la muerte celular. Por tanto, unas condiciones mecánicas inadecuadas pueden llegar a ser la causa de la aparición de numerosas consecuencias y patologías, de ahí la importancia de su estudio.

Por ello, en los últimos años, han ido apareciendo una gran cantidad de trabajos enfocados a utilizar recursos ingenieriles para generar modelos computacionales que simulen escenarios biológicos reales y así poder entender mejor estos procesos. Un claro ejemplo de ello es la aplicación de modelos de elementos finitos para simular interacciones mecánicas de ámbito biológico.

El objetivo de este trabajo es continuar esta línea de investigación para crear un modelo computacional, basado en geometrías y cargas reales, que sea capaz de simular de forma solvente diferentes escenarios mecánicos y que además continúe la tendencia de esta línea de investigación de generar modelos cada vez más realistas.

Para ello, se han utilizado diversos software para poder reconstruir un modelo tridimensional basado en datos obtenidos experimentalmente y realizar diferentes simulaciones mecánicas donde se han ido variando parámetros mecánicos para estudiar su influencia.

A la vista de los resultados obtenidos, se ha demostrado que la metodología utilizada es capaz de realizar de manera eficiente todos los cálculos exigidos y que podrá ser utilizada para crear modelos celulares aun más complejos y estudiarlos de forma solvente.

Índice

Índice	2
1. Introducción.....	3
1.1. Antecedentes.....	3
1.2. Objetivo y alcance.....	4
1.3. Contexto y motivación	4
1.4. Metodología general	4
1.4.1. Fases del trabajo.....	4
1.4.2. Herramientas utilizadas.....	5
1.4.3. Parámetros de estudio	5
1.4.4. Modelos de simulación.....	5
2. Materiales y Métodos.....	6
2.1. Estudios Previos.....	6
2.2. Modelo.....	10
2.2.1. Consideraciones e hipótesis	10
2.2.2. Implementación computacional.....	12
2.2.2.1. Reconstrucción geométrica tridimensional de una célula.....	12
2.2.2.2. Mallado de los diferentes modelos.....	17
2.2.2.3. Obtención del campo de desplazamientos.....	20
2.2.2.4. Definición del material e imposición de condiciones de apoyo y desplazamiento	21
3. Resultados.....	24
3.1. Caso I: Simulaciones para el modelo de célula relajada con tripsina	24
3.2. Caso II: Simulaciones para el modelo de célula relajada con citocalasina.....	29
3.3. Caso III: Introducción de las microesferas de poliestireno en el modelo de célula relajada con tripsina	32
4. Conclusiones	35
5. Líneas de trabajo futuro	35
6. Bibliografía	37

1. Introducción

La aplicación a las ciencias biológicas de conceptos de las ciencias técnicas como puede ser la ingeniería, se ha convertido en un campo de investigación muy extenso y con mucha proyección hoy en día. Dentro de este campo, la investigación a nivel celular podría considerarse como una de las temáticas más importantes debido a la gran cantidad de variables que todavía se desconocen.

Una de las líneas de investigación más importantes a nivel celular es la investigación biomecánica de las células y su entorno, esto es, el estudio de la influencia tanto de sus propiedades mecánicas como de las condiciones que han de soportar sobre diferentes procesos celulares y las consecuencias que esto puede conllevar.

Las propiedades mecánicas y las deformaciones sufridas por la propia célula o incluso tan solo las del núcleo pueden acarrear consecuencias de gran importancia. Por ejemplo, la deformación excesiva del núcleo puede conllevar la alteración del empaquetamiento del ADN y afectar a la regulación genética [1]. Además, las condiciones mecánicas a las que se encuentra sometida una célula también pueden tener un papel muy importante en la regulación de muchas otras funciones celulares (contracción, migración, desarrollo, diferenciación o incluso la muerte celular) [2]. La interacción mecánica entre la célula y su entorno puede llevar incluso a la variación de las propiedades mecánicas de todo un tejido dando lugar a diversos procesos de remodelación [3].

Incluso se pueden encontrar diferentes trabajos en los que se estudian aplicaciones mucho más indirectas como por ejemplo si la rigidez de un material para el vendaje de heridas puede llegar a influenciar el comportamiento de los fibroblastos de la piel [4].

Todo esto evidencia que la mecánica celular tiene un papel primordial a la hora de entender el origen y la evolución de muchos procesos biológicos o patologías.

Por ello, la creación de modelos computacionales que ayuden a la comprensión de estos procesos mediante la simulación de escenarios celulares puede resultar bastante útil. De hecho, en los últimos años ha habido varios estudios en los que se ha implementado este tipo de modelos. Este trabajo se centrará en continuar esta línea de investigación y obtener una metodología que permita analizar de manera solvente problemas biomecánicos del entorno celular.

1.1. Antecedentes

Diferentes experimentos han sido realizados previamente con el fin de obtener, mediante microscopía confocal, la geometría de fibroblastos NHDF-GFP (Lonza) relajados con citocalasina y tripsina. Además, se añadieron partículas fluorescentes (FluoSpheres® Carboxylate-Modified Microspheres, 1.0 μm , Red Fluorescent (580/605), 2% solids, REF F8821 (Invitrogen)) en el entorno celular

que permiten medir el campo de desplazamientos generado por la relajación celular sobre el sustrato.

1.2. Objetivo y alcance

El objetivo principal del presente Trabajo Fin de Grado es la creación de un modelo computacional que permita determinar la influencia de las propiedades mecánicas de una célula real y su entorno sobre su comportamiento, es decir, cuantificar hasta qué punto las células son sensibles a las variaciones de estas condiciones. Para el desarrollo de este estudio se utilizarán dos geometrías celulares y dos campos de desplazamientos diferentes los cuales han sido obtenidos experimentalmente. Además las geometrías de las células han sido también determinadas experimentalmente, mediante microscopia confocal.

1.3. Contexto y motivación

Este trabajo ha sido llevado a cabo dentro del departamento de Ingeniería Mecánica de la Universidad de Zaragoza, más concretamente de la sección de Medios Continuos y Teoría de Estructuras.

Con él, se espera conseguir una metodología que permita analizar mecánicamente cualquier contexto celular de manera precisa y eficiente independientemente del tipo de celular o de las condiciones mecánicas a las que esté sujeta. Además, este modelo está basado en datos reales (tanto su geometría como las condiciones de carga impuestas) diferenciándose de los trabajos realizados previamente en este campo. Por lo tanto, se espera que este método amplíe esta línea de investigación en su posible medida hacia un diseño más realista de manera competente.

1.4. Metodología general

A continuación se describen las distintas fases que ha tomado el proyecto, las herramientas utilizadas, las variables consideradas para su estudio y el modelo empleado.

1.4.1. Fases del trabajo

El estudio se divide en cuatro fases:

- La primera fase consistirá en la recopilación de datos sobre estudios previos relacionados con la temática seleccionada para poder realizar el trabajo a partir de una base teórica adecuada.
- Una segunda etapa enfocada en la creación de un modelo computacional 3D para cada uno de los casos de estudio. Se estudiarán un total de tres casos.
- A continuación, se realizarán varias simulaciones para cada caso en donde el objetivo es determinar cómo se comporta el modelo celular al variar las propiedades mecánicas de las diferentes partes del modelo y determinar qué sensibilidad tiene ante estas modificaciones.

- Por último, se analizarán los resultados obtenidos en las diferentes simulaciones y se extraerán las conclusiones pertinentes.

1.4.2. Herramientas utilizadas

Las principales herramientas que se han utilizado para el trabajo son los programas *Mimics 19.0* y *3-Matic 11.0* (Materialise, Bélgica) para la reconstrucción 3D y el mallado del modelo de la célula. En la fase de modelado también se ha utilizado *Matlab R2013b* (MathWorks, E.E.U.U.) para extrapolar los desplazamientos experimentales a la nueva malla. En la etapa de simulación se ha utilizado el software *Abaqus 6.11-3* (Simulia, E.E.U.U.). Además, también se ha utilizado algún otro software auxiliar para tareas puntuales como por ejemplo el programa *Fiji 1.0* (ImageJ, E.E.U.U.) para el post-procesado de las imágenes experimentales.

1.4.3. Parámetros de estudio

Los parámetros que se estudiarán serán la distribución de varias tensiones y deformaciones en la superficie del núcleo. Concretamente, se estudiarán las Tensiones Principales (Máxima y Mínima) para poder observar las tracciones y compresiones máximas y tanto la variación de volumen del núcleo como la de forma tras aplicar las condiciones de carga impuestas.

1.4.4. Modelos de simulación

Como se ha mencionado anteriormente, se han implementado dos geometrías distintas basadas en imágenes obtenidas experimentalmente (mediante microscopía confocal) de fibroblastos reales (NHDF) las cuales han sido relajadas una con tripsina y otra con citocalasina.

A partir de estos datos, se ha creado un modelo de elementos finitos en el que se incluye, a parte de la geometría celular ya mencionada, un núcleo situado en la parte central de la célula, el cual se ha supuesto esférico para el caso de la tripsina y con una geometría más ovalada para el caso de la citocalasina. Además, también se ha introducido un medio extracelular que contiene la estructura celular embebida en él. Por último, se ha impuesto, como caso de carga, el campo de desplazamientos generado como consecuencia de la relajación celular. Este campo es obtenido mediante las fluoroesferas comentadas anteriormente. Para ello se introducen las fluoroesferas en el gel de colágeno y, al relajarse la célula debido a la aplicación de o bien la tripsina o bien la citocalasina, la célula genera un movimiento en el gel que queda registrado observando el movimiento de las fluoroesferas.

Finalmente, se ha planteado un análisis de sensibilidad para cada caso en las que se cambian las propiedades mecánicas de las diferentes partes del modelo y un caso extra en el que se estudia la influencia de la introducción de elementos

más rígidos en el interior de la célula mediante el modelado de unas microesferas de poliestireno en la parte del citoplasma de la célula.

2. Materiales y Métodos

2.1. Estudios Previos

Como ya se ha comentado en la descripción de las fases del trabajo, el primer paso ha de ser buscar y contrastar trabajos anteriores relacionados con este tema para poder definir cuál será la metodología a seguir y, a partir de los resultados y conclusiones que hayan obtenido, tratar de optimizar el modelo final con los conocimientos adquiridos.

En cuanto al modelado tridimensional de un entorno celular para estudios mecánicos, el método de elementos finitos ha sido muy utilizado en los últimos años. Inicialmente se utilizaban geometrías y cargas simplificadas para obtener una idea más cualitativa del comportamiento celular (Figuras 1, 2).

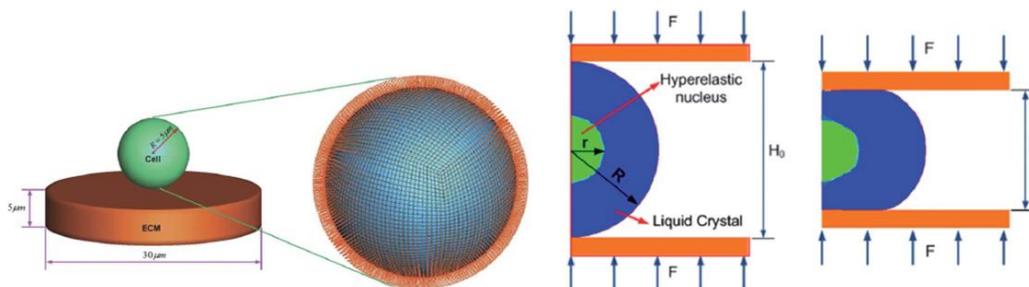


Figura 1. Simplificación esférica de la geometría celular. [5]

Por ejemplo, en este trabajo [5] se ha usado una simplificación esférica de la geometría celular con cargas de tracción o compresión uniaxial en las que la célula está solamente apoyada sobre un sustrato. O también se usan geometrías elípticas o semielípticas con cargas puntuales y apoyos simples [6]. Aunque de estos modelos se puedan extraer conclusiones válidas, es necesario generar un modelo más específico para poder entender el comportamiento mecánico celular con mayor profundidad.

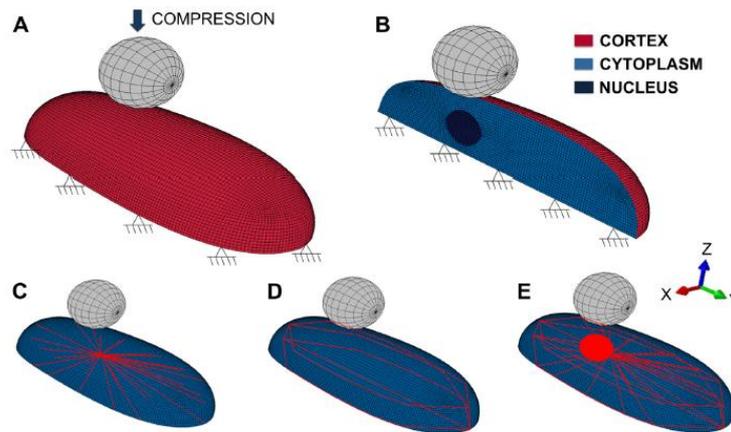


Figura 2. Simplificación semielíptica de la geometría celular [6]

Por tanto, el siguiente paso es utilizar geometría real celular a partir de imágenes puesto que las formas idealizadas anteriores no tienen por qué ser similares a la geometría celular. Para ello el método más utilizado para obtener imágenes de células reales es la microscopía confocal con la que se obtienen unos cortes en z (“ z -stacks”) conforme se va avanzando a lo largo del eje de manera muy similar a una resonancia magnética. Posteriormente se reconstruye la geometría 3D a partir de estos planos o z -stacks para obtener el modelo 3D de una célula.

Esta metodología ya ha sido aplicada en estudios anteriores (Figura 3) y, como resultado, se consiguió crear modelos más realistas y versátiles que aportan conclusiones más interesantes: desde modelos tridimensionales (a base de imágenes reales de mioblastos) que demostraron que es posible simular grandes deformaciones en células con esta metodología [7] o en la continuación del anterior trabajo donde también se demostró que el modelo implementado era suficientemente versátil como para trabajar con células con formas geométricas muy diferentes y que puede ser usado para analizar el comportamiento mecánico de células que incorporen estructuras intracelulares complejas bajo grandes deformaciones [8]. Incluso se ha llegado a probar que esta metodología puede servir para realizar un análisis inverso y obtener el módulo a cortante del citoplasma de células del músculo esquelético [9].

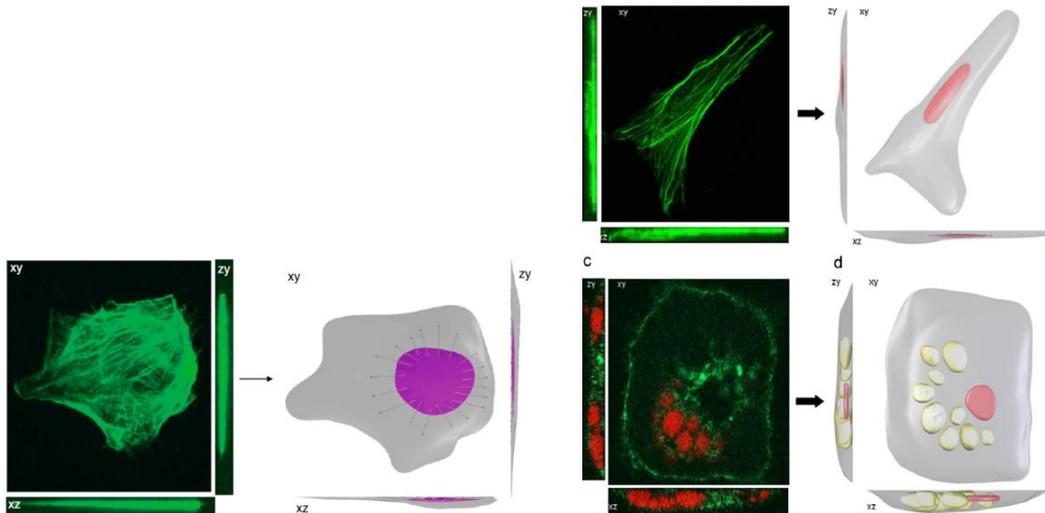


Figura 3. Ejemplo del modelado computacional en base a imágenes reales obtenidas mediante microscopía confocal. a) Modelo formado solamente por célula y núcleo [7, 9]. b) Modelo formado por célula, núcleo y algún orgánulo intracelular más [8].

Pese a que con esta mejora del método se consiguen geometrías reales incluso de elementos intracelulares, todos estos modelos siguen aplicando cargas teóricas idealizadas (Figura 4). Por esta razón, se considera que el siguiente paso debería ser la implementación de condiciones de carga o de desplazamiento reales obtenidas de los procesos celulares reales.

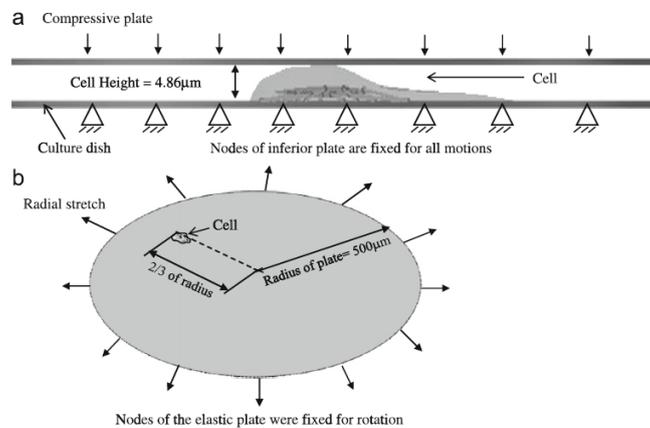


Figura 4. Ejemplo de condiciones de carga simplificadas como carga uniaxial [7-9].

Siguiendo esta línea de investigación, en varios estudios se ha utilizado una matriz extracelular (ECM) en la que se encuentra embebida la célula (Figura 5). De esta forma se consiguen unas condiciones más fieles a cómo se encuentran las células en su ambiente natural. Estos trabajos no suelen estar enfocados a un modelado computacional sino a obtener información sobre la interacción entre la célula y la ECM pero pueden resultar útiles a la hora de caracterizar el entorno celular desde el enfoque de la biomecánica.

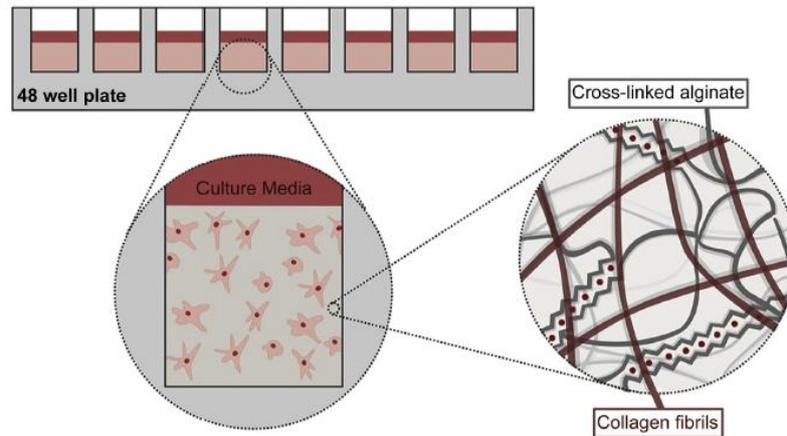


Figura 5. Ejemplo de células embebidas en matriz de colágeno y alginato [4].

El material más utilizado para simular las condiciones del entorno extracelular natural es el colágeno debido a que es una de las proteínas más abundantes en el humano [3]. También hay trabajos en los que se considera una composición de colágeno con otro material como puede ser el alginato [4] o la silicona [10].

En cuanto al diseño de los diferentes elementos del entorno celular, aparecen varias alternativas en la bibliografía consultada. Desde un punto de vista mecánico, basta con definir el material de cada elemento para representarlo pero, al no conocerse todavía una caracterización mecánica real de una célula, se han propuesto diferentes soluciones en este campo.

La célula y los diferentes elementos intracelulares pueden encontrarse definidos como materiales elásticos [6] o materiales hiperelásticos con funciones de energía del tipo Neo-Hooke [7-9].

El entorno extracelular suele plantearse también como un material con propiedades hiperelásticas [7-9] o como un material viscoelástico [5]. Asimismo, se pueden encontrar diferentes trabajos que materiales más sofisticados en los que, por ejemplo, se modela el núcleo como un material hiperelástico que sigue la función de energía de Mooney-Rivlin, el flujo de actina-miosina como un cristal líquido y la matriz extracelular como un bloque visco-hiperelástico [5].

Basándonos en toda esta información se pasará a la creación del modelo requerido para este proyecto.

2.2. Modelo

2.2.1. Consideraciones e hipótesis

A continuación, se pasará a la descripción específica del modelo creado y las hipótesis que lo sustentan.

Como se ha mencionado en la introducción, se ha considerado un total de tres casos distintos sobre los que se harán diversas simulaciones modificando los diferentes parámetros mecánicos que las caracterizan:

- Un primer caso, en el que se modela un fibroblasto (NHDF) relajado con tripsina
- Un segundo modelo de un fibroblasto (NHDF) pero esta vez relajado con citocalasina
- En último lugar se creará una variación del primer caso en el que se introducen dentro del citoplasma unas esferas de poliestireno para ver su influencia en el comportamiento celular. Este último caso está basado en experimentos previos.

Para todos los casos se ha creado un modelo de elementos finitos con tres partes claramente diferenciadas: la geometría celular, un bloque de gel (ambos obtenidos experimentalmente) donde se encuentra la célula y un núcleo situado en el interior de la célula. La geometría del núcleo no está basada en imágenes reales ya que en los experimentos realizados, no se obtuvieron datos sobre el núcleo. Este trabajo podría servir por lo tanto como referencia para determinar si es relevante o no la incorporación de un núcleo a este tipo de metodología. Se modelará el núcleo con una geometría simplificada como se explica más adelante.

Para los dos primeros casos, se han considerado dos versiones, una en la que todos los materiales implementados se consideran hiperelásticos y otra en la que se considera el gel como un material elástico y el resto materiales hiperelásticos. Con esto, se espera demostrar no solo las consecuencias de variar las propiedades mecánicas de los diferentes elementos sino cómo reacciona el modelo ante distintos tipos de materiales. En el último caso no se han estudiado dos versiones ya que la finalidad es determinar la influencia de las microesferas introducidas con respecto al primer caso con lo que solo se ha tenido en cuenta la versión hiperelástica.

Para caracterizar un material elástico, basta con definir su módulo elástico (E) y el coeficiente de Poisson (ν). Basándonos en la bibliografía, todos los materiales se van a considerar incompresibles por lo que el coeficiente de Poisson será 0,49.

Para los hiperelásticos, se ha optado por una función densidad de energía de deformación del tipo Neo-Hooke. En este caso, para poder introducir el material en el software elegido para la simulación y el cálculo final (*Abaqus 6.11-3* (Simulia,

E.E.U.U)), hay que definir dos coeficientes (C_{10} y D_1) para cada caso. Estos parámetros se pueden formular en función de las propiedades elásticas de cada material como:

$$C_{10} = \frac{G}{2}; \quad D_1 = \frac{2}{k_o}; \quad k_o = \frac{2G(1+\nu)}{3(1-2\nu)}$$

Siendo G el módulo de cizalladura del material en cuestión. Dado que en muchos artículos el parámetro ofrecido es el módulo elástico, se utilizará la siguiente ecuación para relacionarlo con el módulo de cizalladura.

$$G = \frac{E}{2(1 + \nu)}$$

El rectángulo de gel es de colágeno debido a que los experimentos previos realizados para la obtención de los datos iniciales utilizaban un gel de colágeno tipo I con una concentración de 2 mg/ml. Se ha implementado como un material hiperelástico neo-hookeano para la primera versión con coeficientes $C_{10}=32,095$ Pa y $D_1=6,273 \times 10^{-4}$ Pa⁻¹ [10] y, para la segunda versión, como un material elástico lineal con módulo elástico $E=190$ Pa y un coeficiente de Poisson $\nu=0,49$ [10]. Pese a que, para un material incompresible, el coeficiente de Poisson debería ser $\nu=0,5$ se impone que sea 0,49 ya que si no se obtienen problemas de convergencia en el modelo computacional. Este criterio se utilizará para todos los materiales restantes.

En cuanto al citoplasma celular, se considera para ambas versiones como un material hiperelástico Neo-Hookeano con coeficientes $C_{10}=42,23$ Pa y $D_1=4,768 \times 10^{-4}$ Pa⁻¹ [6]. De la misma manera, el material del núcleo también ha sido generado como un material hiperelástico neo-hookeano con coeficientes $C_{10}=192,308$ Pa y $D_1=0,0024$ Pa⁻¹ [6].

Las microesferas de poliestireno del tercer caso se han modelado como un material elástico con módulo elástico $E=2,4$ GPa y coeficiente de Poisson $\nu=0,405$ [11] para ambas versiones.

Se considera que el hecho de relajar la célula con tripsina o con citocalasina no afecta a las propiedades mecánicas, es decir, esta caracterización definida para cada elemento se mantiene en los tres casos.

Además, se ha implementado como condición de carga el campo de desplazamientos generado por la célula al relajarse medido mediante la colocación de unas fluoroesferas en el gel para que el problema esté completamente basado en datos reales.

Con todos estas consideraciones, estudiaremos en cada caso las tensiones y deformaciones generadas en la superficie del núcleo.

2.2.2. Implementación computacional

A la hora de implementar el modelo computacional de elementos finitos, ha habido cuatro procesos diferenciados. La reconstrucción tridimensional de la célula, es decir, pasar de las imágenes planas de la microscopía confocal a un modelo tridimensional computacional, el mallado, la implementación del campo de desplazamientos y la definición del material e imposición de condiciones de apoyo y desplazamiento para su estudio.

2.2.2.1. Reconstrucción geométrica tridimensional de una célula

Para reconstruir la geometría 3D, ha sido necesario utilizar varias herramientas. Las imágenes que se obtienen experimentalmente son imágenes RGB en las que aparece en el canal verde la geometría celular y en el canal rojo las fluoroesferas. Para poder obtener la geometría correctamente, hay que separar los diferentes canales (Figura 6). Para ello se ha utilizado el software *Fiji 1.0* (ImageJ, E.E.U.U.).

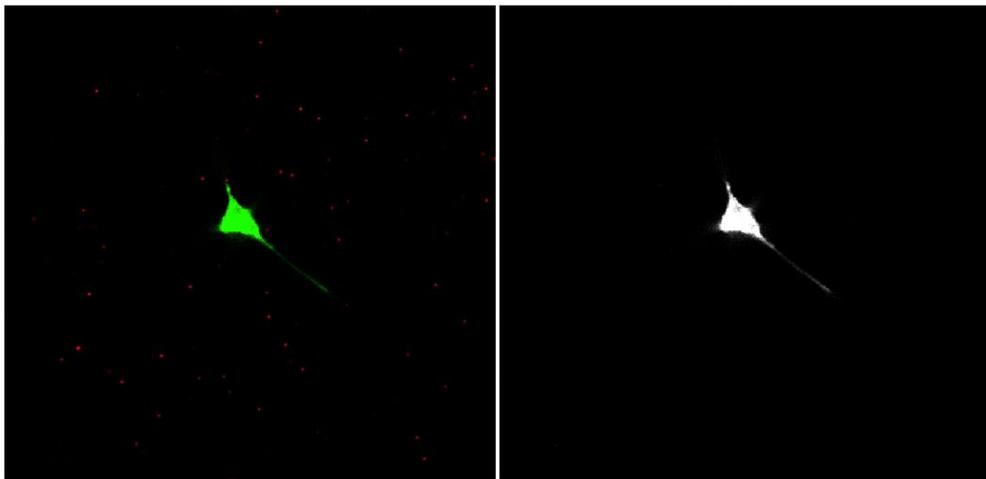


Figura 6. Separación por canales para eliminar las fluoroesferas.

Una vez aisladas las imágenes correspondientes únicamente a la geometría de la célula, se ha utilizado el software *Mimics 19.0* (Materialise, Bélgica) para reconstruir tridimensionalmente las diferentes células a partir de las imágenes planas. Se ha elegido este software ya que está enfocado a tratamiento de imágenes médicas y ofrece una gran cantidad de opciones para editar y suavizar los objetos creados. De cara a obtener una segmentación y por tanto una malla de gran precisión y continua, es importante generar una superficie uniforme y lisa que se ajuste lo máximo posible a la geometría medida experimentalmente. Este software ofrece la posibilidad de editar capa a capa cada una de los “z-stacks” importados y también diferentes opciones de suavizado sobre el volumen final (Figuras 7, 8). Puesto que las imágenes importadas no generan superficies muy homogéneas, estas opciones han resultado muy útiles en la reconstrucción tridimensional de las células.

Dado que el campo de desplazamientos y la geometría celular se han trabajado por separado en dos programas distintos (la geometría en Mimics y los desplazamientos en Matlab), ha habido que prestar especial atención a la orientación elegida al importar los datos a los respectivos programas. En el caso de Mimics, el programa ofrece la opción de definir la orientación espacial de las imágenes importadas. Es decir, no basta solo con importarlas sino que, una vez introducido el conjunto de imágenes, ha de especificarse dónde se encuentra la parte superior, la inferior, la izquierda, la derecha, la anterior y la posterior.

Puesto que los desplazamientos se han trabajado en Matlab (que tiene un sistema de coordenadas fijo), si no se han orientado los datos adecuadamente en Mimics con respecto a las imágenes iniciales, se estará modificando el modelo global cuando se integre todo en uno solo, ya que no se habrá utilizado el mismo sistema de coordenadas para todas las partes.

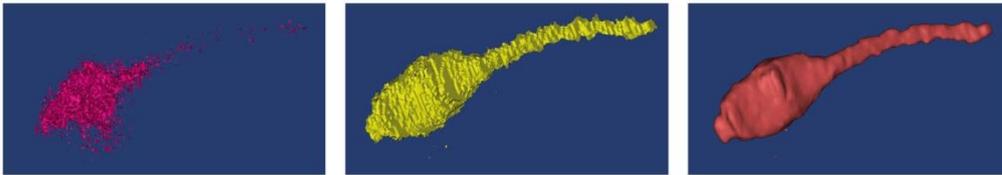


Figura 7. Procesado de imagen de la célula relajada con citocalasina.

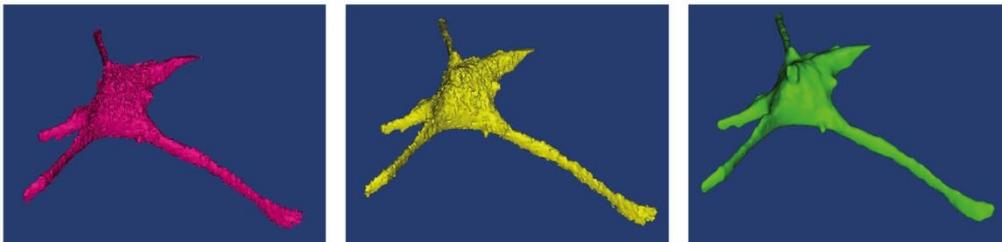


Figura 8. Procesado de imagen de la célula relajada con tripsina.

Además, también se ha utilizado este software para crear la geometría del núcleo y del gel. El núcleo se ha supuesto esférico para la célula relajada con tripsina (primer y tercer caso) y con una geometría más ovalada para el caso de la citocalasina. El núcleo esférico tiene un radio aproximado de 10 micras mientras que el ovalado mide 13 micras en su dirección más larga y 8,4 micras en la más corta aproximadamente (Figura 9).

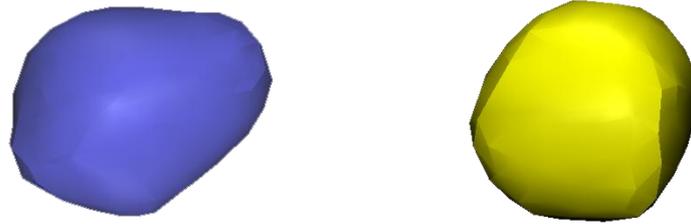


Figura 9. Modelo 3D de los núcleos para cada modelo. a) Núcleo del modelo de citocalasina.
b) Núcleo del modelo de tripsina.

El gel tiene una geometría de prisma rectangular que abarca todo el volumen captado en las “z-stacks”. Cada imagen tiene un tamaño de 512x512 micras, para el caso de la tripsina, se han utilizado 92 “stacks” separadas entre sí a 0,63 micras lo que nos genera un prisma de 512x512x58 micras. Sin embargo debido a las ampliaciones del microscopio, hay que tener en cuenta el tamaño de pixel que es de 0,62 $\eta\text{m}/\text{px}$ en los ejes X e Y, por lo tanto, el volumen real del prisma será 322x322x58 micras. De esta misma manera, para el caso de la citocalasina se han utilizado 49 “stacks” separadas entre sí también a 0,63 micras. Por lo que el volumen final del gel (tras aplicar la escala) será 317x317x30 micras.

Por otro lado, se observó que la célula quedaba demasiado próxima al extremo superior del gel en el caso de la tripsina y demasiado próxima a ambos extremos en el caso de la citocalasina (Figuras 10, 11).

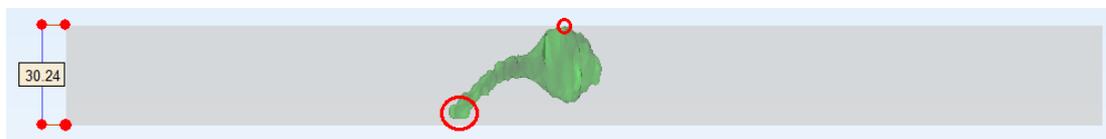


Figura 10. Detalle de la proximidad de la célula al extremo del gel. Caso de célula relajada con citocalasina.

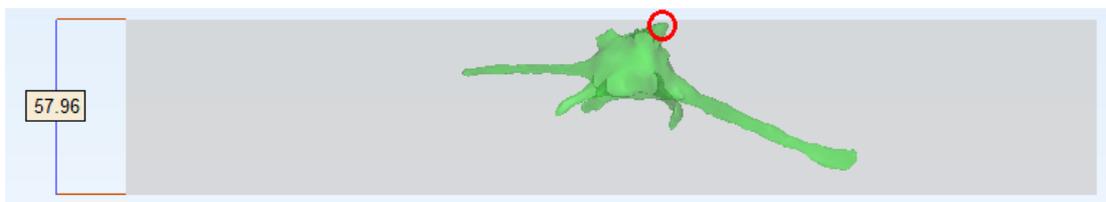


Figura 11. Detalle de la proximidad de la célula al extremo del gel. Caso de célula relajada con tripsina.

Es por ello que se ha decidido aumentar las dimensiones en el eje Z del gel para que los resultados no se vean afectados por las condiciones de contorno (Figuras 12, 13). Concretamente se ha aumentado el tamaño del gel en el eje Z en un 25% para el caso de la célula relajada con tripsina y un 50% para la de citocalasina ya que, como la célula de citocalasina está cerca de los dos extremos, se ha añadido un 25% por cada lado.

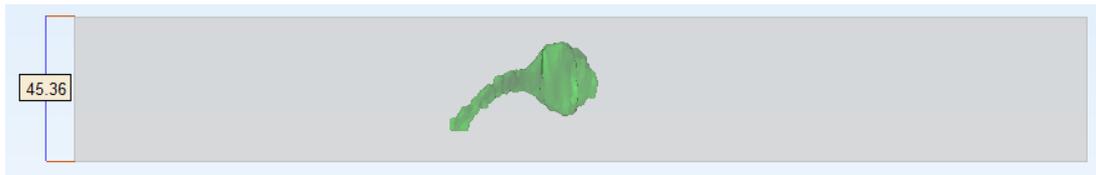


Figura 12. Geometría final tras aumentar la altura del gel en el eje Z. Caso de célula relajada con citocalasina.

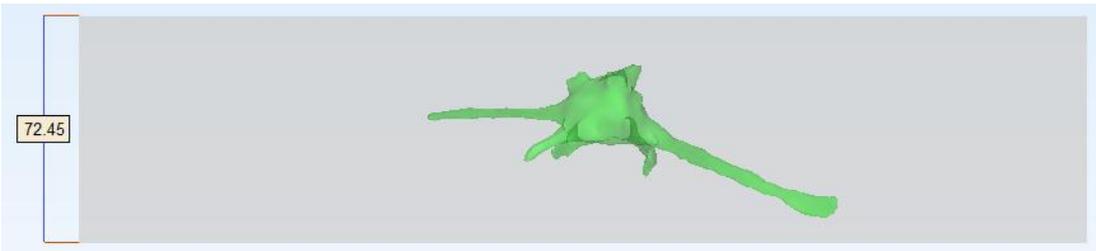


Figura 13. Geometría final tras aumentar la altura del gel en el eje Z. Caso de célula relajada con tripsina.

Por último, se han creado unas microesferas de poliestireno para el tercer caso propuesto. Se han modelado como esferas de cinco micras de acuerdo con el tamaño de las esferas utilizadas experimentalmente. Dentro de este caso, se simularán dos versiones en las que se modificará la distancia entre la esfera y el núcleo celular, siguiendo la dirección del filopodio más ancho (Figuras 14, 15). Para el primer caso la distancia entre la esfera y el núcleo es de tan solo dos micras mientras que en el segundo caso se encontraban separados a una distancia de once micras.

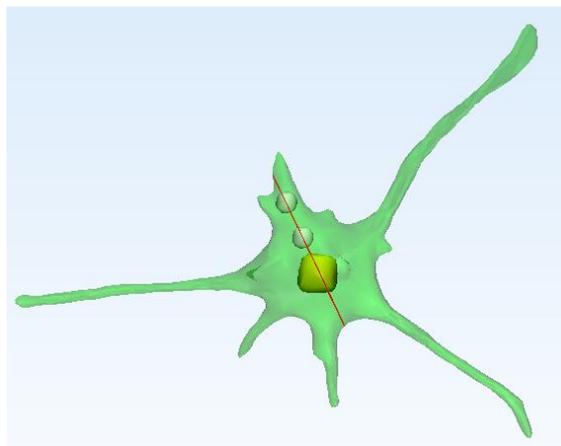


Figura 14. Dirección tomada para introducir las microesferas

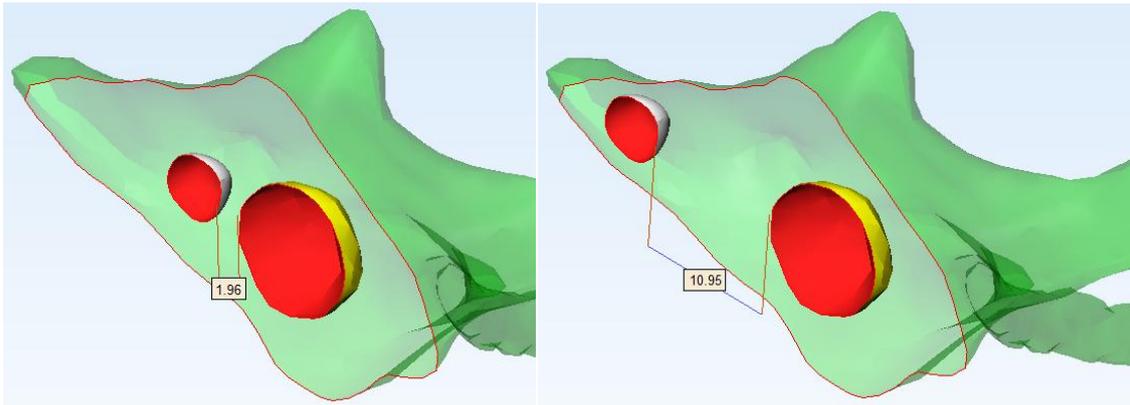


Figura 15. Detalle de la distribución de las microsferas. a) Posición más cercana. b) Posición más lejana

Tras crear los diferentes elementos, como se puede apreciar en las Figuras 16-18, el modelo tridimensional generado para cada caso resulta de la siguiente manera:

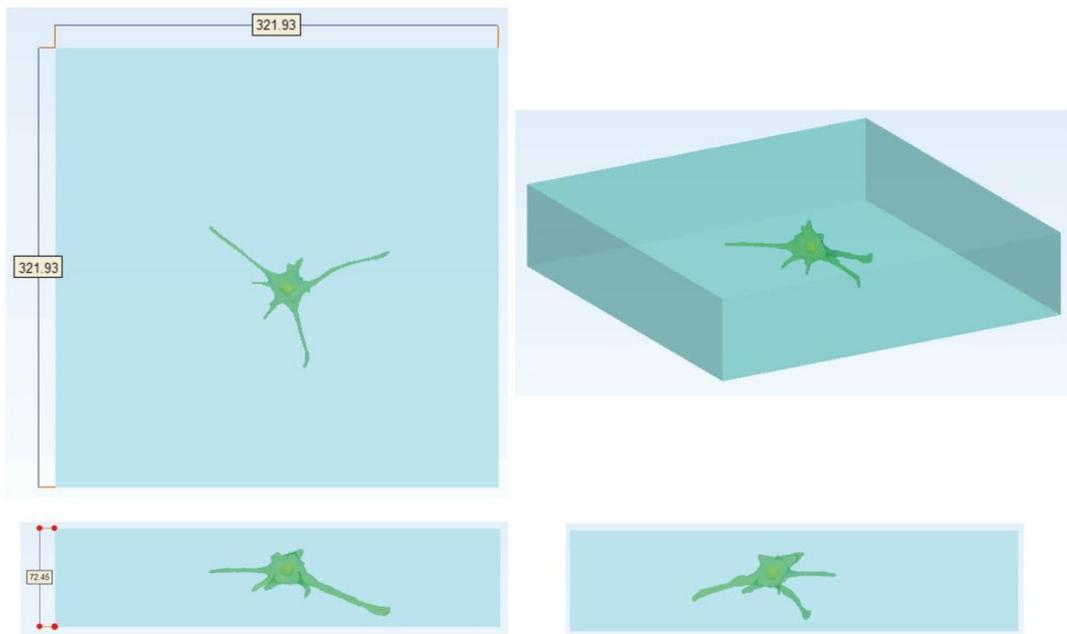


Figura 16. Vistas del modelo global para el Caso 1.

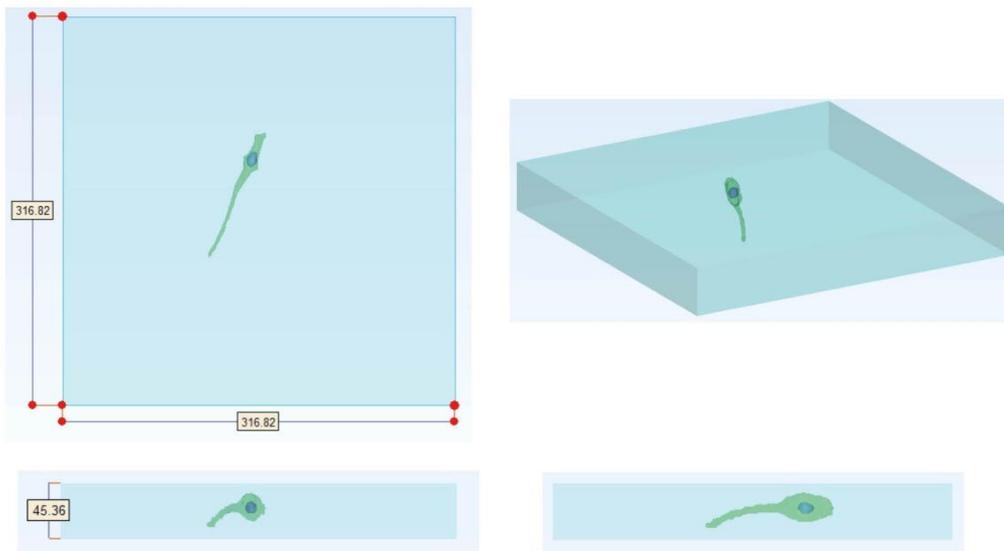


Figura 17. Vistas del modelo global para el Caso 2.

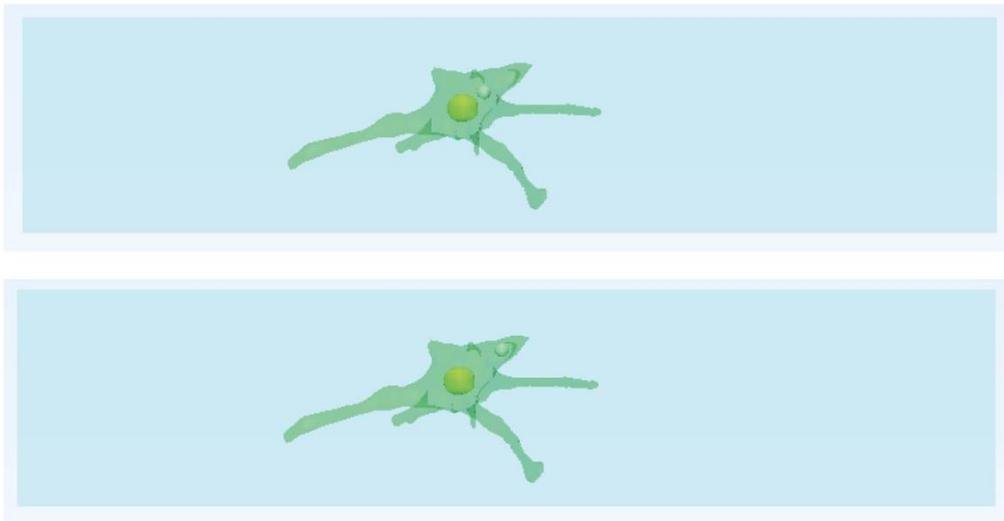


Figura 18. Vistas del modelo global para el Caso 3.

En este último caso, se ha decidido representar solo la vista lateral del modelo global debido a que es idéntico al primer modelo excepto por la incorporación de las microesferas de poliestireno.

2.2.2.2. Mallado de los diferentes modelos

Tras haber generado las geometrías de los diferentes casos, se pasará a generar la malla para el método de elementos finitos. Para ello, se ha utilizado el software *3-Matic 11.0* (Materialise, Bélgica). Este software ofrece además una gran variedad de opciones para editar el mallado y, debido a la complicada geometría de las células, se ha decidido que era más apropiado que utilizar el módulo de mallado de Abaqus.

Sin embargo, este software solo ofrece la opción de mallado con elementos tetraédricos. Al mallar con este tipo de elementos, se corre el riesgo de rigidizar las soluciones del problema, por lo que habrá que seleccionar un tamaño de malla suficientemente pequeño como para que esto no suceda. Para evitar este problema, se ha realizado un análisis de sensibilidad de la malla.

Para este paso, primero ha de mallarse la superficie de cada cuerpo y luego generar la malla de volumen. Para las superficies, se ha editado la malla de tal forma que todos elementos tengan un tamaño homogéneo y que no aparezca ninguna irregularidad en la superficie para cada uno de los cuerpos, corrigiendo todos aquellos elementos que no cumplan las características deseadas (Figuras 19 y 20). Pese a que solo se ha mostrado la geometría celular, es necesario proceder de esta manera con todos los cuerpos creados (núcleo, gel, microesferas y célula).

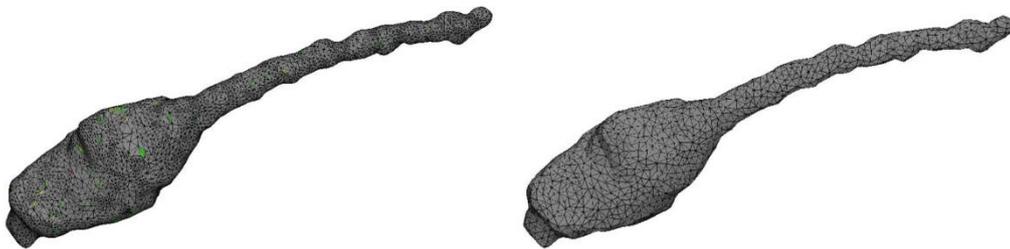


Figura 19. Procesado del mallado superficial de la célula relajada con citocalasina.

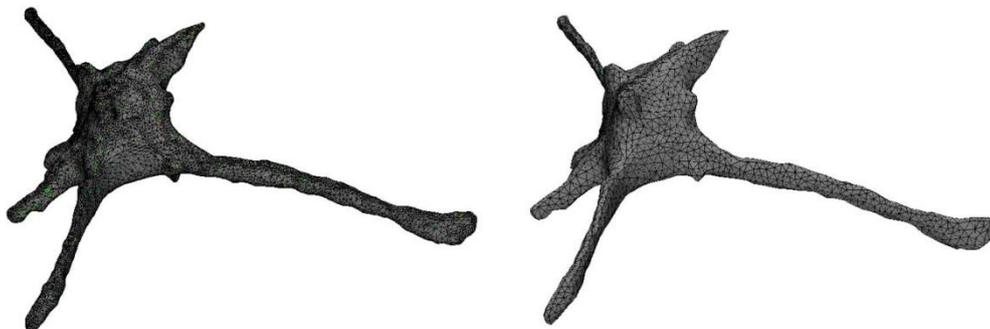


Figura 20. Procesado del mallado superficial de la célula relajada con tripsina.

Dado que el modelo final está formado por varios cuerpos, es necesario asegurarse de que se mallen todos ellos con nodos coincidentes de forma que no haya discontinuidades en las intersecciones de los cuerpos. Para ello, el programa ofrece la opción “*Create Non-Manifold Assembly*” donde genera un ensamblaje con todos los cuerpos para poder mallarlos todos como uno solo y asegurarse de que se aplique el método de nodos coincidentes.

Como la geometría celular tiene una forma muy compleja con zonas muy estrechas, es necesario aplicar un tamaño de elemento muy pequeño para asegurar que no se cometa ningún error geométrico. Sin embargo, el gel no es más que un prisma con un volumen muy superior a la célula sin ninguna exigencia geométrica.

Por estas razones, se ha creado una malla no uniforme, es decir, la malla será más fina en las regiones cercanas a la célula que en el resto del gel. Para la célula se impondrá un tamaño máximo de elemento de tres micras mientras que para el gel se crearán varias mallas con un tamaño máximo de elementos de ocho, diez y doce micras respectivamente y se realizará un análisis de sensibilidad. Para ello, se realizará un caso de desplazamientos impuestos para así seleccionar el tamaño óptimo.

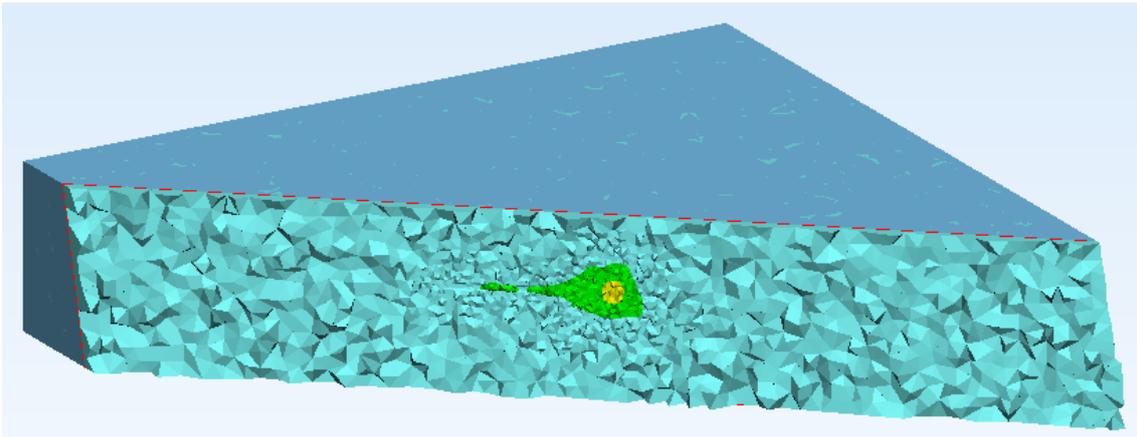


Figura 21. Detalle del mallado progresivo.

Para que no se pierda la condición de que los nodos sean coincidentes en las intersecciones, el programa genera una progresión en la que va variando el tamaño para hacer una transición suave entre los dos tamaños de malla. Si esto no sucediese, en la intersección entre los dos cuerpos tendríamos elementos de tres micras por un lado y elementos más grandes por el otro por lo que sería imposible que los nodos fuesen coincidentes. En la Figura 21 se puede apreciar cómo, aunque hemos impuesto que el mallado a tres micras solo se efectúe en la geometría celular, hay parte del gel con un mallado de ese tamaño y va aumentando gradualmente hasta alcanzar el tamaño exterior del gel. Al realizar el mallado con esta metodología se consigue asegurar:

- Una malla homogénea.
- El mallado de las intersecciones entre cuerpos con nodos coincidentes, sin que se genere ninguna discontinuidad en el mallado.
- Adaptabilidad del tamaño de malla a la complejidad de la geometría de cada cuerpo.
- Reducir el coste computacional ya que, al generar una malla más gruesa en el gel, se consigue reducir el coste computacional significativamente sin perder precisión en las zonas más exigentes.

En las Tablas 1 y 2 aparece un resumen de las propiedades geométricas de cada uno de los cuerpos creados en estas dos etapas.

Elemento	Área (μm^2)	Volumen (μm^3)	Núm. de Elementos
Célula	4.883,46	9.731,03	14.117
Núcleo	288,98	443,05	657
Gel	$3,0057 \times 10^5$	$7,4985 \times 10^6$	327.264
Microesferas	72,65	57	598

Tabla 1. Resumen de las propiedades geométricas para el caso de célula relajada con tripsina (Casos 1 y 3)

Elemento	Área (μm^2)	Volumen (μm^3)	Núm. De Elementos
Célula	3.138,75	6.045,52	8.968
Núcleo	338,55	551,79	836
Gel	$2,5823 \times 10^5$	$4,5464 \times 10^6$	189.380

Tabla 2. Resumen de las propiedades geométricas para el caso de célula relajada con citocalasina (Caso 2)

2.2.2.3. Obtención del campo de desplazamientos

El campo de desplazamientos obtenido experimentalmente no puede ser introducido directamente a nuestro modelo. Esto es porque, con el método de fluoroesferas, los desplazamientos de este campo aparecen en los puntos donde se encuentran estas partículas y no en los nodos que definen nuestro modelo de EF.

En el método de elementos finitos, tan solo podemos introducir información en los nodos de la malla y, obviamente, las partículas fluorescentes no han sido dispuestas de forma que coincidan con las coordenadas nodales de la malla seleccionada.

Por lo tanto, es necesario efectuar una interpolación/extrapolación que obtenga los desplazamientos en las coordenadas requeridas de los nodos. También se ha realizado un análisis de sensibilidad para varios tamaños de malla para obtener una malla que tenga un equilibrio entre precisión y coste computacional. Para ello se ha utilizado el software *Matlab R2013b* (MathWorks, E.E.U.U.). Debido a su gran extensión, la explicación detallada del proceso de extrapolación se encuentra recogida en el Anexo A (Obtención del campo de desplazamientos: Comparación de los diferentes métodos de extrapolación de Matlab).

Tras realizar las operaciones pertinentes, se obtienen los campos de desplazamientos para cada uno de los casos mostrados en las Figuras 22 y 23:

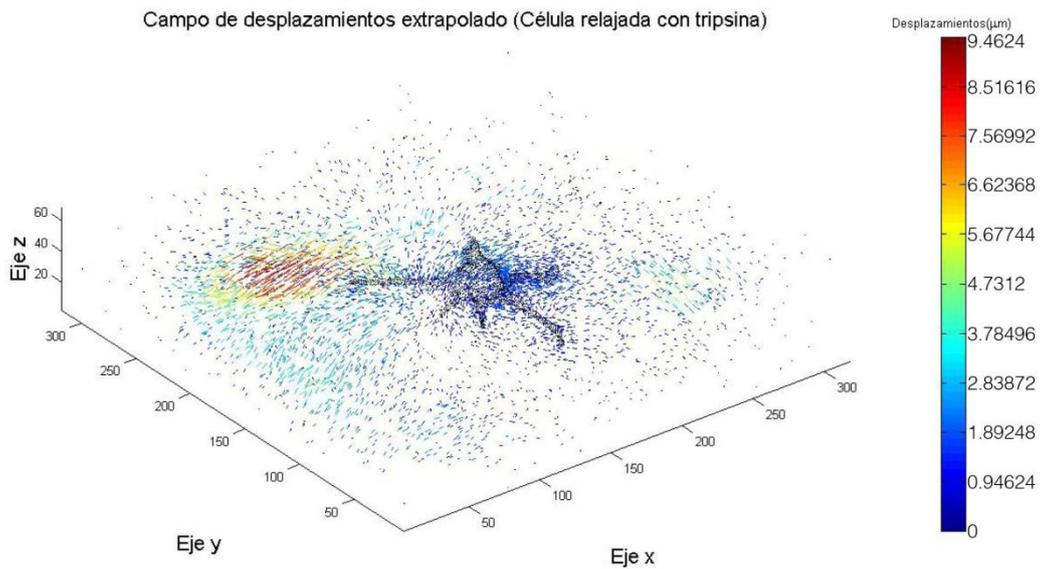


Figura 22. Campo de desplazamientos para la célula relajada con tripsina (casos 1 y 3).

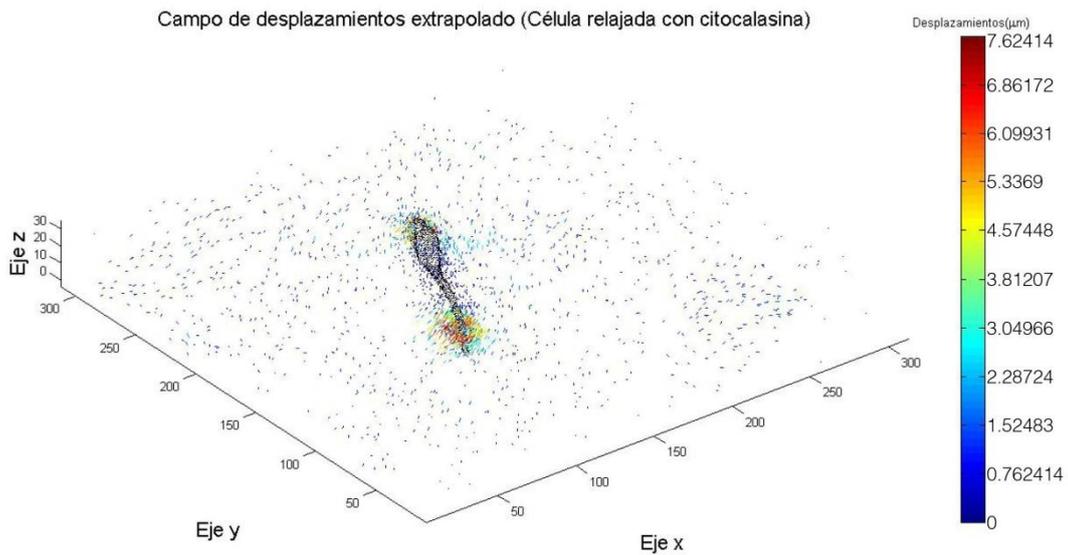


Figura 23. Campo de desplazamientos para la célula relajada con citocalasina (caso 2).

El campo de desplazamientos para el primer y tercer caso es el mismo ya que solo se han introducido las microesferas en el interior de la célula y, como el campo se extrapola a las coordenadas del gel, las coordenadas de este no se ven modificadas.

2.2.2.4. Definición del material e imposición de condiciones de apoyo y desplazamiento

Una vez acabados el modelo celular y el campo de desplazamientos, el último paso será juntar todo en un solo modelo y empezar las simulaciones que permitan extraer las conclusiones del trabajo. Para la unificación de todos estos

datos y el posterior cálculo final, se ha elegido el software *Abaqus 6.11-3* (Simulia, E.E.U.U).

Al haber realizado el diseño geométrico y el mallado con otros programas, en esta fase no habrá que realizar prácticamente ningún procedimiento o imponer casi ninguna condición, básicamente lo que se hará es introducir todos los datos ya obtenidos en Abaqus. Únicamente, se impondrá un empotramiento en los nodos de la superficie exterior del gel como condición de apoyo inicial y los desplazamientos nodales extrapolados previamente en los nodos del gel como condición de carga.

Estos desplazamientos, han de ser introducidos manualmente en el archivo “*.inp” con un formato específico. La obtención de los datos en este formato ha sido explicada en el Anexo A.

Una vez introducidas las condiciones de contorno, carga así como los materiales para cada una de las partes del modelo, se procederá a la simulación variando los materiales de cada una de las partes. A continuación, se recoge en las Tablas 3 y 4 las propiedades de cada material en el modelo base de cada caso. Como se ha mencionado en el apartado 2.2.1. *Consideraciones e Hipótesis*, se han implementado dos versiones distintas para todas las simulaciones. En ellas, se variará el tipo de material del gel y se estudiará cómo influye al modelo. En la primera versión se consideran todos los materiales, excepto las microesferas de poliestireno que se modelan como elástico lineal, como hiperelásticos Neo-Hookeanos y en la segunda se ha modelado también el gel como un material elástico lineal.

Versión 1					
Elemento	Tipo de Material	Módulo Elástico, E (Pa)	Coefficiente de Poisson (ν)	Coefficientes para definir el material Neo-Hookeano	Ref.
Gel	Hiperelástico	190	0,49	C10=32,095 Pa; D1=6,273x10 ⁻⁴ Pa ⁻¹	[10]
Citoplasma	Hiperelástico	250	0,49	C10=42,23 Pa; D1=4,768x10 ⁻⁴ Pa ⁻¹	[6]
Núcleo	Hiperelástico	1000	0,3	C10=192,308 Pa; D1=0,0024 Pa ⁻¹	[6]
Microesferas	Elástico	2,4x10 ⁹	0,405	-	[11]

Tabla 3. Resumen de las propiedades mecánicas para cada caso (Versión 1).

Versión 2					
Elemento	Tipo de Material	Módulo Elástico E (Pa)	Coefficiente de Poisson (ν)	Coefficientes para definir el material Neo-Hookeano	Ref.
Gel	Elástico	190	0,49	-	[10]
Citoplasma	Hiperelástico	250	0,49	C10=42,23 Pa ; D1=4,768x10 ⁻⁴ Pa ⁻¹	[6]
Núcleo	Hiperelástico	1000	0,3	C10=192,308 Pa ; D1=0,0024 Pa ⁻¹	[6]
Microesferas	Elástico	2,4x10 ⁹	0,405	-	[11]

Tabla 4. Resumen de las propiedades mecánicas para cada caso (Versión 2).

Las diferentes simulaciones que se van a realizar consistirán en ir variando las propiedades mecánicas de cada una de las partes de la célula, en un orden de magnitud, para ver cómo influye en las tensiones y deformaciones sufridas por el núcleo. Para el tercer caso, en vez de variar las propiedades mecánicas, se estudiará cómo influye la distancia de las microesferas al núcleo sobre su comportamiento mecánico.

De esta forma se plantearán (para ambas versiones) un total de siete simulaciones para los dos primeros casos y dos simulaciones para el tercero de los casos. En la Tabla 5 se observa una breve descripción de cada una de estas simulaciones.

Simulaciones planteadas				
Casos 1 y 2				Caso 3
Caso inicial con las propiedades base	Aumento de un orden de magnitud en el módulo elástico del citoplasma	Aumento de un orden de magnitud en el módulo elástico del núcleo	Aumento de un orden de magnitud en el módulo elástico del citoplasma y del núcleo	Un primer caso con una microesfera cerca del núcleo (aproximadamente 2 micras)
	Reducción de un orden de magnitud en el módulo elástico del citoplasma	Reducción de un orden de magnitud en el módulo elástico del núcleo	Reducción de un orden de magnitud en el módulo elástico del citoplasma y del núcleo	Un segundo caso con la microesfera más alejada del núcleo (11 micras aprox.)

Tabla 5. Resumen de las simulaciones planteadas para cada caso

Como se ha comentado previamente, se van a estudiar para cada caso la Tensión Máxima Principal, la Tensión Mínima Principal, la variación volumétrica y la variación de forma del núcleo.

La variación volumétrica estudiada se ha definido como la suma de la traza de la matriz de deformación, mientras que la variación de forma se ha definido como la raíz cuadrada del segundo invariante.

Dado que nuestro problema es hiperelástico, no se trata de un problema lineal. Ante este tipo de problemas Abaqus no permite obtener la deformación estándar sino que solo calcula la deformación logarítmica (LE). Por lo tanto:

$$\frac{\Delta V}{V} = LE_{11} + LE_{22} + LE_{33}; \quad LE_F = \sqrt{\frac{(LE_I - LE_{II})^2 + (LE_I - LE_{III})^2 + (LE_{II} - LE_{III})^2}{2}}$$

Además, se ha obtenido también el valor de estas deformaciones para cada uno de los elementos del núcleo y se ha calculado la media aritmética con todos ellos. De esta forma, es posible hacerse una idea de la deformación global sufrida por el núcleo, ya que, para estudiar los cambios de forma y volumen, los valores puntuales no son tan significativos.

3. Resultados

Tras realizar todas las simulaciones mencionadas en la Tabla 5, se expondrán los resultados obtenidos en ellas. Se ha adjuntado para cada caso una tabla con un resumen de los resultados obtenidos para cada variable. En cada casilla aparecen los resultados para las dos versiones de la misma simulación (V1/V2).

Debido a su extensión, toda la documentación gráfica de las distribuciones de las diferentes variables estudiadas para cada caso se encuentra en el Anexo B (Documentación gráfica de la distribución de las variables estudiadas en el apartado de resultados).

3.1. Caso I: Simulaciones para el modelo de célula relajada con tripsina

El primero de los casos planteados es el de la célula relajada con tripsina. A continuación, en las Tablas 6-11, se recoge un resumen de los resultados obtenidos en todas las simulaciones para cada una de las variables estudiadas. En cada columna aparecen los resultados de las dos versiones.

Variación del módulo elástico del citoplasma				
		Disminución de un orden de magnitud (V1/V2)	Caso base (V1/V2)	Aumento de un orden de magnitud (V1/V2)
Tensión Máxima Principal (Pa)	Máx.	20,21/16,99	-20,48/-15,82	-3,64/1,16
	Mín.	-21,60/-18,33	-65,46/-50,8	-43,80/-26,90
Tensión Mínima Principal (Pa)	Máx.	-13,06/-11,42	-55,12/-44,67	-35,59/-24,54
	Mín.	-92,01/-76,24	-147,83/-112,81	-108,08/-71,33
Variación de Volumen (Adim.)	Máx.	-0,0045/-0,0049	-0,0469/-0,0370	-0,0289/-0,0172
	Mín.	-0,0637/-0,538	-0,1370/-0,1050	-0,103/-0,0662
Variación de Forma (Adim.)	Máx.	0,0871/0,0710	0,0941/0,0678	0,0639/0,0424
	Mín.	0,0061/0,0055	0,0169/0,0147	0,0159/0,0125

Tabla 6. Valores alcanzados en cada simulación para las distintas variables estudiadas en ambas versiones.

Variación del módulo elástico del citoplasma			
	Disminución de un orden de magnitud (V1/V2)	Caso base (V1/V2)	Aumento de un orden de magnitud (V1/V2)
Variación de Volumen Media (Adim.)	-0,0198/-0,0185	-0,0822/-0,0629	-0,0619/-0,0387
Variación de Forma Media (Adim.)	0,0128/0,0115	0,0351/0,0304	0,0402/0,0323

Tabla 7. Deformación media de todos los elementos del núcleo.

Pese a que sí que se puede apreciar una variación en los resultados al modificar el módulo elástico del citoplasma, ésta no es muy significativa ya que, en general, no se producen grandes cambios. Como se verá a continuación, en comparación con la variación del módulo elástico del núcleo, los cambios obtenidos en estas simulaciones son bastante más estables, en torno al mismo orden de magnitud en casi todos los casos. Además, estos resultados no parecen guardar una relación de proporcionalidad con la variación del módulo elástico ya que ambas tensiones alcanzan su valor máximo para el caso base y disminuyen su valor en mayor o menor medida tanto al aumentar como al reducir el valor del módulo elástico.

Pese a esto, sí que hay un cambio significativo en la Tensión Principal Máxima, que alcanza valores positivos en su valor más alto para el caso menos rígido y negativos para el caso base. Esto supone que el núcleo pasará de trabajar solamente a compresión a trabajar a tracción al reducir la rigidez del citoplasma.

El hecho de variar el tipo de material del gel tampoco supone cambios bruscos en los resultados aunque, se puede observar en todas las variaciones que,

las tensiones que aparecen en el núcleo se ven reducidas al introducir el material elástico. Si observamos las Figuras adjuntadas en el Anexo B se observa que la distribución espacial de las tensiones y deformaciones sobre la superficie también es muy similar entre la versión 1 y la versión 2.

Sin embargo, las deformaciones medias (Tabla 7) sí que tienen una evolución dependiente del módulo elástico. Se puede observar que, conforme aumentamos la rigidez del citoplasma, aumenta la variación de forma y disminuye la variación absoluta de volumen. El efecto de cambiar el tipo de material es el mismo que para las tensiones.

Variación del módulo elástico del núcleo				
		Disminución de un orden de magnitud (V1/V2)	Caso base (V1/V2)	Aumento de un orden de magnitud (V1/V2)
Tensión Máxima Principal (Pa)	Máx.	-2,20/-1,96	-20,48/-15,82	102,28/80,94
	Mín.	-17,40/-14,92	-65,46/-50,80	-104,75/-70,96
Tensión Mínima Principal (Pa)	Máx.	-11,16/-9,03	-55,12/-44,67	-78,61/-60,41
	Mín.	-31,32/-25,75	-147,83/-112,81	-423,92/-310,34
Variación de Volumen (Adim.)	Máx.	-0,0960/-0,0787	-0,0469/-0,0370	-0,0034/-0,0018
	Mín.	-0,3189/-0,2595	-0,1370/-0,1050	-0,0300/-0,0209
Variación de Forma (Adim.)	Máx.	0,1590/0,1320	0,0941/0,0678	0,0401/0,0305
	Mín.	0,0225/0,0172	0,0169/0,0147	0,0045/0,0039

Tabla 8. Valores alcanzados en cada simulación para las distintas variables estudiadas en ambas versiones.

Variación del módulo elástico del núcleo			
	Disminución de un orden de magnitud (V1/V2)	Caso base (V1/V2)	Aumento de un orden de magnitud (V1/V2)
Variación de Volumen Media (Adim.)	-0,2001/-0,1629	-0,0822/-0,0629	-0,0121/-0,0090
Variación de Forma Media (Adim.)	0,0795/0,0678	0,0351/0,0304	0,0082/0,0068

Tabla 9. Deformación media de todos los elementos del núcleo

Al plantear la variación del módulo elástico del núcleo, los resultados cambian considerable con respecto al caso anterior. La variación de este parámetro sí que es determinante puesto que las tensiones y deformaciones varían prácticamente en un orden de magnitud en cada caso.

Este comportamiento tiene bastante lógica ya que el núcleo es la parte más rígida de la célula y, por lo tanto, la parte que más contribuye a su comportamiento

mecánico. Es por ello que una variación en sus propiedades mecánicas es mucho más significativa que la variación de las propiedades del citoplasma.

Se puede apreciar que las tensiones aumentan de manera directamente proporcional con el módulo elástico. Además, no solo aumentan su valor máximo si no que también aumenta la amplitud de tensiones. Por ejemplo, la Tensión Mínima Principal pasa de ir de -45 Pa a -113 Pa para el caso base a ir de -60 Pa a -310 Pa aproximadamente para el caso más rígido, evidenciando este aumento de amplitud. Esta diferencia es tal que para la Tensión Máxima Principal se llegan a alcanzar valores muy negativos en el mínimo y valores positivos en el máximo que sugieren la aparición de tracción sobre el núcleo, generándose así un gran contraste de tensiones. Las deformaciones puntuales y las deformaciones medias siguen la evolución contraria a las tensiones ya que disminuyen conforme aumentamos la rigidez del núcleo.

El efecto de variar el tipo de material del gel es el mismo que el comentado en el caso del citoplasma.

En la Figura 24, se muestra un ejemplo de la distribución de tensiones obtenida. Concretamente, se muestra la distribución de la Tensión Máxima Principal. El resto de distribuciones para las variables calculadas se encuentran recogidas en el Anexo B.

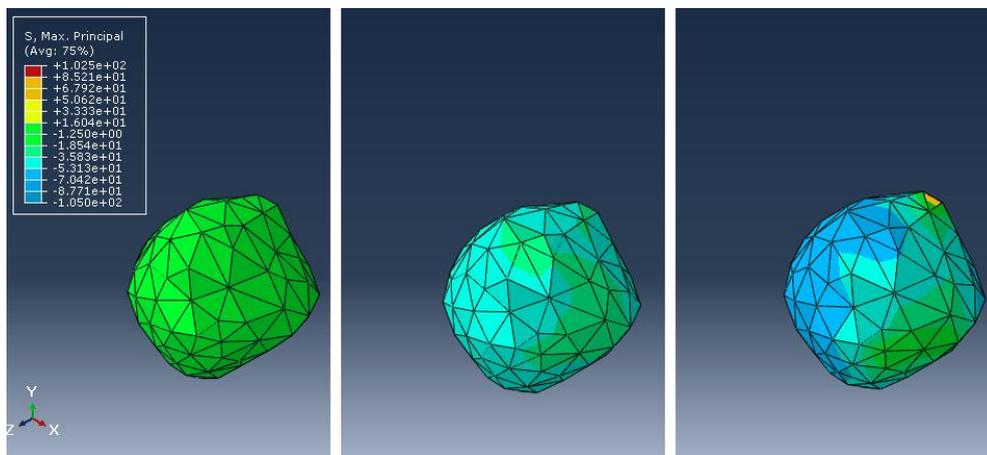


Figura 24. Ejemplo de la distribución de tensiones en el caso 1 (tripsina). Tensión Máxima Principal con respecto a la variación del módulo elástico del núcleo.

Se puede apreciar cómo, conforme aumenta el módulo elástico, la amplitud de tensiones comentada previamente va haciéndose más grande, obteniendo un mayor contraste de tensiones. En el caso de la izquierda, toda la célula aparece del mismo color, evidenciando así que sus tensiones tienen una amplitud de valores muy reducida. Sin embargo, conforme va incrementando el módulo elástico, se obtiene una distribución más amplia, alcanzando unos valores máximos y mínimos más distanciados entre sí.

Variación del módulo elástico tanto del citoplasma como del núcleo				
		Disminución de un orden de magnitud (V1/V2)	Caso base (V1/V2)	Aumento de un orden de magnitud (V1/V2)
Tensión Máxima Principal (Pa)	Máx.	-1,69/-2,10	-20,48/-15,82	-4,50/18,78
	Mín.	-9,37/-8,96	-65,46/-50,80	-140,78/-82,09
Tensión Mínima Principal (Pa)	Máx.	-7,48/-7,32	-55,12/-44,67	-185,06/-124,64
	Mín.	-25,05/-22,12	-147,83/-112,81	-417,99/-297,24
Variación de Volumen (Adim.)	Máx.	-0,0590/-0,0787	-0,0469/-0,0370	-0,0109/-0,0056
	Mín.	-0,2200/-0,2595	-0,1370/-0,1050	-0,0350/-0,023
Variación de Forma (Adim.)	Máx.	0,1760/0,1320	0,0941/0,0678	0,027/0,0208
	Mín.	0,0236/0,0172	0,0169/0,0147	0,0096/0,0079

Tabla 10. Valores alcanzados en cada simulación para las distintas variables estudiadas en ambas versiones

Variación del módulo elástico tanto del citoplasma como del núcleo			
	Disminución de un orden de magnitud (V1/V2)	Caso base (V1/V2)	Aumento de un orden de magnitud (V1/V2)
Variación de Volumen Media (Adim.)	-0,1253/-0,119	-0,0822/-0,0629	-0,0202/-0,0122
Variación de Forma Media (Adim.)	0,0468/0,0435	0,0351/0,0304	0,0187/0,0149

Tabla 11. Deformación media de todos los elementos del núcleo

Por último, se ha planteado un caso que es una combinación de los dos anteriores en el que se varía a la vez el módulo elástico tanto del núcleo como del citoplasma.

En él se pueden ver que los resultados son muy similares a los obtenidos en el caso de variación del módulo elástico del núcleo lo cual tiene sentido ya que, como se ha comentado en el caso anterior, la variación de las propiedades del núcleo resulta ser crucial en la distribución de tensiones y deformaciones mientras que la variación en el citoplasma no parece ser tan influyente.

La única diferencia significativa entre este caso y el anterior es la distribución de las tensiones principales para el aumento de un orden de magnitud en el módulo elástico en cuestión. Se puede apreciar que, en el caso de la variación del citoplasma y el núcleo a la vez, el valor máximo alcanzado en la Tensión Principal Máxima es notablemente menor que en el caso anterior. Pese a esta diferencia, no se observa una gran diferencia en las deformaciones sufridas en este caso.

3.2. Caso II: Simulaciones para el modelo de célula relajada con citocalasina

Los resultados de este caso se recogen en las Tablas 12-17.

Variación del módulo elástico del citoplasma				
		Disminución de un orden de magnitud (V1/V2)	Caso base (V1/V2)	Aumento de un orden de magnitud (V1/V2)
Tensión Máxima Principal (Pa)	Máx.	55,93/46,63	113,40/84,68	93,45/70,15
	Mín.	-1,99/-1,34	-5,45/-6,15	-1,93/0,09
Tensión Mínima Principal (Pa)	Máx.	2,73/2,31	19,42/10,06	27,83/18,32
	Mín.	-82,18/-68,37	-156,84/-117,08	-100,04/-68,28
Variación de Volumen (Adim.)	Máx.	0,0327/0,0270	0,0644/0,0467	0,0760/0,0379
	Mín.	-0,0321/-0,0278	-0,0611/-0,0479	-0,0210/-0,0162
Variación de Forma (Adim.)	Máx.	0,1257/0,1032	0,2316/0,1735	0,1840/0,1306
	Mín.	0,0123/0,0105	0,0280/0,0241	0,0235/0,0173

Tabla 12. Valores alcanzados en cada simulación para las distintas variables estudiadas en ambas versiones

Variación del módulo elástico del citoplasma			
	Disminución de un orden de magnitud (V1/V2)	Caso base (V1/V2)	Aumento de un orden de magnitud (V1/V2)
Variación de Volumen Media (Adim.)	0,0021/0,0017	0,0064/0,0046	0,0043/0,0022
Variación de Forma Media (Adim.)	0,0332/0,0292	0,0675/0,0572	0,0663/0,0533

Tabla 13. Deformación media de todos los elementos del núcleo

Si se comparan los resultados con el caso de la tripsina, se aprecia que la variación relativa de las tensiones y deformaciones con respecto al módulo elástico es muy similar al caso anterior. Esto parece lógico ya que al haber seleccionado los mismos materiales y haber cambiado tan solo la geometría, no tiene porqué ser muy diferente al caso anterior.

La mayor diferencia aparece otra vez en la Tensión Principal Máxima, que en este caso es mucho mayor que en el modelo de tripsina. Esto es debido a que el campo de desplazamientos introducido en este caso consta principalmente de una tracción al rededor de la célula. Por lo tanto, la tracción soportada en este caso es mucho mayor y la Tensión Principal Máxima también lo será. Sin embargo, la Tensión Principal Mínima obtiene unos resultados similares al caso de la tripsina.

Otra consecuencia de este hecho es que, para este caso, la variación de volumen (tanto los valores puntuales como los medios) es positiva indicando así un aumento de volumen en vez de una disminución.

Variación del módulo elástico del núcleo				
		Disminución de un orden de magnitud (V1/V2)	Caso base (V1/V2)	Aumento de un orden de magnitud (V1/V2)
Tensión Máxima Principal (Pa)	Máx.	18,98/16,44	113,40/84,68	222,81/170,83
	Mín.	-0,90/-0,66	-5,45/-6,15	12,32/13,69
Tensión Mínima Principal (Pa)	Máx.	6,19/5,01	19,42/10,06	86,14/57,27
	Mín.	-26,35/-21,53	-156,84/-117,08	-341,39/-242,66
Variación de Volumen (Adim.)	Máx.	0,1682/0,1185	0,0644/0,0467	0,0166/0,0123
	Mín.	-0,1060/-0,0847	-0,0611/-0,0479	-0,0177/-0,0129
Variación de Forma (Adim.)	Máx.	0,3675/0,3068	0,2316/0,1735	0,0550/0,0370
	Mín.	0,0339/0,0343	0,0280/0,0241	0,0068/0,0036

Tabla 14. Valores alcanzados en cada simulación para las distintas variables estudiadas en ambas versiones

Variación del módulo elástico del núcleo			
	Disminución de un orden de magnitud (V1/V2)	Caso base (V1/V2)	Aumento de un orden de magnitud (V1/V2)
Variación de Volumen Media (Adim.)	0,0129/0,0098	0,0064/0,0046	0,0010/0,0007
Variación de Forma Media (Adim.)	0,1032/0,0923	0,0675/0,0572	0,0186/0,0144

Tabla 15. Deformación media de todos los elementos del núcleo

Variación del módulo elástico tanto del citoplasma como del núcleo				
		Disminución de un orden de magnitud (V1/V2)	Caso base (V1/V2)	Aumento de un orden de magnitud (V1/V2)
Tensión Máxima Principal (Pa)	Máx.	16,82/14,50	113,40/84,68	352,88/266,37
	Mín.	-1,01/-0,78	-5,45/-6,15	19,50/-26,18
Tensión Mínima Principal (Pa)	Máx.	4,74/4,16	19,42/10,06	86,85/45,32
	Mín.	-26,14/-23,60	-156,84/-117,08	-414,16/-258,62
Variación de Volumen (Adim.)	Máx.	0,1035/0,0936	0,0644/0,0467	0,0204/0,0163
	Mín.	-0,1035/-0,0985	-0,0611/-0,0479	-0,0272/-0,0160
Variación de Forma (Adim.)	Máx.	0,3707/0,3275	0,2316/0,1735	0,0740/0,0390
	Mín.	0,0314/0,0310	0,0280/0,0241	0,0120/0,0085

Tabla 16. Valores alcanzados en cada simulación para las distintas variables estudiadas en ambas versiones

Variación del módulo elástico tanto del citoplasma como del núcleo			
	Disminución de un orden de magnitud (V1/V2)	Caso base (V1/V2)	Aumento de un orden de magnitud (V1/V2)
Variación de Volumen Media (Adim.)	0,0120/0,0101	0,0064/0,0046	0,0020/0,0011
Variación de Forma Media (Adim.)	0,0915/0,0842	0,0675/0,0572	0,0320/0,0231

Tabla 17. Deformación media de todos los elementos del núcleo

La evolución de estos dos últimos ejemplos vuelve a ser muy similar a la comentada a lo largo de todo este capítulo. Además, también vuelve a aparecer una diferencia significativa en la Tensión Principal Máxima con respecto al caso de la tripsina.

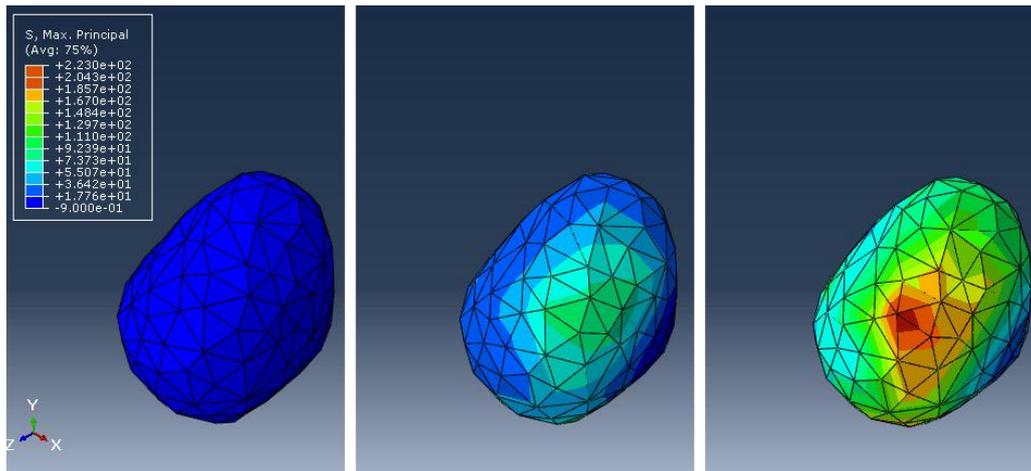


Figura 25. Ejemplo de la distribución de tensiones en el caso 2 (citocalasina). Tensión Máxima Principal con respecto a la variación del módulo elástico del núcleo.

En la Figura 25, se ha adjuntado la distribución de la Tensión Principal Máxima para el caso de la variación del módulo elástico del núcleo para así estudiar la misma variable que en el Caso I con la Figura 24.

Se puede observar que la distribución de tensiones es más homogénea y regular que en el primer caso. Esto es debido a que, tanto la geometría como el campo de desplazamientos impuesto son mucho más sencillos en este segundo caso que en el primero. El aumento de amplitud de tensiones comentado en el primer caso también es apreciable en este. Sin embargo, así como en el primer caso las tensiones inicialmente tomaban un valor medio y conforme aumentaba el módulo elástico iban aumentando los valores máximos y mínimos obtenidos, en este segundo caso, las tensiones para el caso menos rígido aparecen en torno al valor mínimo absoluto y conforme aumentamos el módulo elástico tan solo aumenta el valor máximo alcanzado.

3.3. Caso III: Introducción de las microesferas de poliestireno en el modelo de célula relajada con tripsina

Para este último caso, solo se han analizado dos modelos distintos ya que, como se ha comentado previamente, tan solo nos interesa ver la influencia de la distancia entre las microesferas y el núcleo por lo que, en este caso, no se harán variaciones en el material.

En las Tablas 12 y 13, aparecen los resultados de este caso. Además, en la primera columna de cada una de ellas, se ha añadido el caso base antes de introducir las esferas para poder estudiar mejor su influencia.

Efecto de la distancia entre el núcleo y la microesfera				
		Caso base sin introducir ninguna microesfera	Microesfera cercana al núcleo (2 micras)	Microesfera lejana al núcleo (11 micras)
Tensión Máxima Principal (Pa)	Máx.	-20,48	96,31	-16,99
	Mín.	-65,46	-61,68	-67,87
Tensión Mínima Principal (Pa)	Máx.	-55,12	-10,60	-67,17
	Mín.	-147,83	-102,79	-132,59
Variación de Volumen (Adim.)	Máx.	-0,0469	0,0381	-0,0646
	Mín.	-0,1370	-0,0987	-0,1350
Variación de Forma (Adim.)	Máx.	0,0941	0,127	0,0646
	Mín.	0,0169	0,0198	0,0176

Tabla 18. Valores alcanzados en cada simulación para las distintas variables estudiadas en ambas versiones.

Efecto de la distancia entre el núcleo y la microesfera			
	Caso base sin introducir ninguna microesfera	Microesfera cercana al núcleo (2 micras)	Microesfera lejana al núcleo (11 micras)
Variación de Volumen Media (Adim.)	-0,0822	-0,0774	-0,0918
Variación de Forma Media (Adim.)	0,0351	0,0362	0,0407

Tabla 19. Deformación media de todos los elementos del núcleo

Tras analizar los resultados obtenidos en las simulaciones, podemos observar como el caso en el que la esfera se encuentra lejos del núcleo es bastante similar al caso original, evidenciando así que a tanta distancia, el efecto de este cuerpo sobre el núcleo es casi inapreciable (a pesar de las propiedades mecánicas del cuerpo). Sin embargo, en el caso en el que se encuentra la microesfera más cercana al núcleo, se puede observar como las distribuciones de las tensiones y las deformaciones cambian notablemente.

Se puede apreciar que la Tensión Principal Máxima es mucho mayor en este caso. De hecho es el único caso en el que llega a ser positiva y en el que, por lo tanto, aparecerán zonas sometidas a tracción. Además, la Tensión Principal Mínima es un poco menor que en el resto de casos.

En cuanto a las deformaciones puntuales, se aprecia que la variación volumétrica pasa a ser positiva, indicando otra vez que el núcleo aumentará su volumen. Esto está relacionado con el cambio en la Tensión Máxima Principal al igual que en el Caso II. Además, la variación de forma también es mayor en este caso por lo que, además de aumentar su volumen, el núcleo quedará más

deformado con respecto a su geometría original. Las deformaciones medias permanecen más o menos estables en todas las simulaciones.

Como se puede observar en la Figura 26, pese a esta variación en los resultados obtenidos para cada caso, las distribuciones de las tensiones son más o menos uniformes. Sin embargo, si se observan desde otro ángulo (Figura 27) sí que se aprecia la diferencia comentada en los resultados anteriores. De esta manera, queda en evidencia que las distribuciones para el caso en el que la microesfera está más alejada del núcleo es muy similar al original y las del caso más cercano presentan una distribución más distinta. De todas formas, las diferencias obtenidas en estas distribuciones tienen un carácter más puntual.

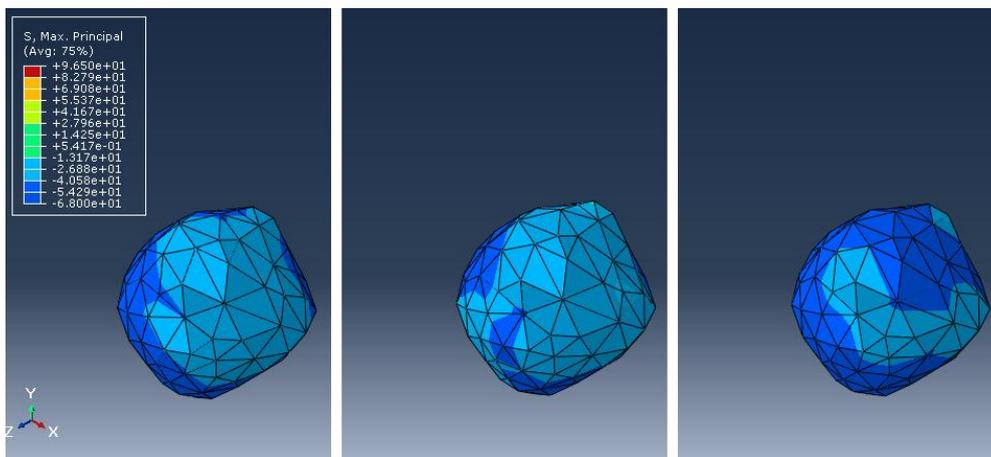


Figura 26. Distribución de la Tensión Máxima Principal. Modelo original sin microesferas (izquierda), modelo con la microesfera cercana (centro), modelo con la microesfera lejana (derecha).

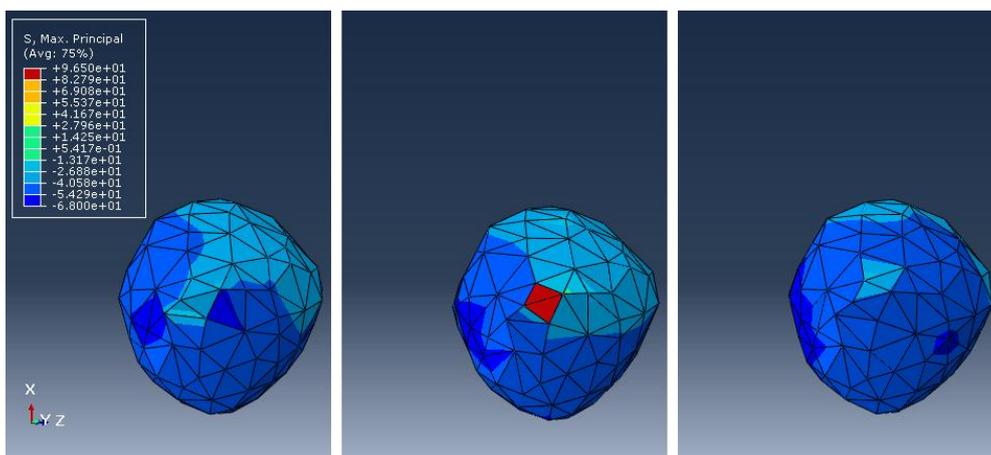


Figura 27. Vista de la distribución anterior desde otra perspectiva.

4. Conclusiones

Tras haber realizado todas las simulaciones pertinentes, se ha demostrado que el modelo creado es suficientemente versátil como para ser sensible a la variación de casi cualquier parámetro mecánico ante una misma condición de carga, la cual está basada en datos reales. Desde la variación de las propiedades mecánicas de un determinado material a la variación del tipo de material como puede ser un material elástico o uno hiperelástico. También se ha probado que es sensible a la aparición de nuevos componentes en el entorno intracelular con propiedades mecánicas distintas como son las microesferas de poliestireno. Igualmente, ha demostrado la capacidad de reaccionar ante geometrías y condiciones de carga distintas como se ha evidenciado creando dos modelos celulares distintos (uno con tripsina y otro con citocalasina).

Todo esto sugiere que esta metodología puede servir para modelar diversos tipos de células con características completamente distintas.

De esta forma, se confirma que esta metodología basada en datos reales es tan válida como todas las desarrolladas previamente que han sido comentadas en la bibliografía.

Asimismo, este modelo incluye la utilización de condiciones de carga reales, continuando así la tendencia de la investigación en este área de generar modelos computacionales cada vez más fieles a escenarios celulares reales. Por lo tanto, se considera que el uso de esta metodología puede ser de gran relevancia en los próximos años.

Por último, la sensibilidad mostrada por el modelo a la incorporación del núcleo o las microesferas a la geometría celular y las variaciones realizadas con ellos, demuestra que esta metodología puede ser utilizada para crear estructuras celulares aun más complejas que incorporen diferentes componentes intracelulares basados también en datos geométricos reales.

5. Líneas de trabajo futuro

Debido a la gran versatilidad de esta metodología, pueden desarrollarse una gran cantidad de investigaciones que completen los resultados obtenidos en este trabajo. Por ejemplo, la aplicación de distintos tipos de materiales (como pueden ser los materiales viscoelásticos o distintos tipos de materiales hiperelásticos) o de diferentes condiciones de carga basadas en datos reales, podrían seguir sacándole partido a este modelo sin variar su metodología.

Pese a que el modelo planteado incorpora una geometría y unas condiciones de carga reales, el siguiente paso ha de ser la introducción de una geometría real para el núcleo para conseguir así un problema completamente basado en datos experimentales. Se pretende seguir investigando en este campo para poder introducirlo en el modelo.

También sería interesante la obtención de datos geométricos e información sobre las propiedades mecánicas de otros componentes intracelulares para poder implementarlos también en el modelo.

6. Bibliografía

1. Caille, N., et al., *Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells*. Journal of biomechanics, 2002. **35**(2): p. 177-187.
2. Buxboim, A., I.L. Ivanovska, and D.E. Discher, *Matrix elasticity, cytoskeletal forces and physics of the nucleus: how deeply do cells 'feel' outside and in?* J Cell Sci, 2010. **123**(3): p. 297-308.
3. Feng, Z., et al., *Investigation on the mechanical properties of contracted collagen gels as a scaffold for tissue engineering*. Artificial organs, 2003. **27**(1): p. 84-91.
4. da Cunha, C.B., et al., *Influence of the stiffness of three-dimensional alginate/collagen-I interpenetrating networks on fibroblast biology*. Biomaterials, 2014. **35**(32): p. 8927-8936.
5. Zeng, X. and S. Li, *A three dimensional soft matter cell model for mechanotransduction*. Soft Matter, 2012. **8**(21): p. 5765-5776.
6. Barreto, S., et al., *A multi-structural single cell model of force-induced interactions of cytoskeletal components*. Biomaterials, 2013. **34**(26): p. 6119-6126.
7. Slomka, N. and A. Gefen, *Confocal microscopy-based three-dimensional cell-specific modeling for large deformation analyses in cellular mechanics*. Journal of biomechanics, 2010. **43**(9): p. 1806-1816.
8. Or-Tzadikario, S. and A. Gefen, *Confocal-based cell-specific finite element modeling extended to study variable cell shapes and intracellular structures: the example of the adipocyte*. Journal of biomechanics, 2011. **44**(3): p. 567-573.
9. Slomka, N., C.W. Oomens, and A. Gefen, *Evaluating the effective shear modulus of the cytoplasm in cultured myoblasts subjected to compression using an inverse finite element method*. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2011. **4**(7): p. 1559-1566.
10. Achterberg, V.F., et al., *The nano-scale mechanical properties of the extracellular matrix regulate dermal fibroblast function*. Journal of Investigative Dermatology, 2014. **134**(7): p. 1862-1872.
11. **Propiedades mecánicas del poliestireno**. Available from: <https://www.makeitfrom.com/material-properties/Polystyrene-PS>.
12. Koch TM, Munster S, Bonakdar N, Butler JP, Fabry B. *3D Traction Forces in Cancer Cell Invasion*. Plos One. 2012 Mar 30;7(3).