



Universidad
Zaragoza

Trabajo de Fin de Grado

Caracterización y simulación de matrices de fibras con distintas distribuciones y concentraciones de colágeno mediante elementos finitos.

Fiber matrices characterization and simulation with different collagen distributions and concentrations by means of finite elements.

Autor

Benjamín Real Ruiz

Directores

María José Gómez Benito

Francisco Merino Casallo

RESUMEN

Caracterización y simulación de matrices de fibras con distintas distribuciones y concentraciones de colágeno mediante elementos finitos.

Entender el comportamiento mecánico de los hidrogeles de colágeno es un aspecto fundamental en muchos de los procesos celulares. Se sabe que las células se comportan de diferente forma en función de su microambiente mecánico.

Con el objetivo de caracterizar las propiedades mecánicas de los hidrogeles con distintas concentraciones de colágeno, se lleva a cabo un modelo computacional. Dicho modelo consiste en una distribución real de fibras de colágeno embebidas en un medio acuoso. Este modelo a su vez sirve como aproximación de la matriz extracelular de modo que podemos determinar las propiedades mecánicas del entorno celular.

Partiendo de datos experimentales que nos definen la arquitectura de distintas fibras según su concentración de colágeno (2.0 mg/ml , 2.5 mg/ml , 4.0 mg/ml) y ensayo realizado (para cada concentración de colágeno se realizan tres ensayos diferentes), se aplican una serie de algoritmos en Octave con el objetivo de modelar y reconstruir la estructura tridimensional de las fibras de colágeno. Para simular la distribución real de las fibras de colágeno, se definen de manera individual todas y cada una de las fibras en función de su arquitectura incluyendo además los entrecruzamientos (*cross-linkers*) entre fibras.

Para completar el modelo del hidrogel de colágeno, se modela además una matriz que simula un medio acuoso en el cual se embebe la distribución real de fibras de colágeno.

Las propiedades mecánicas de los distintos hidrogeles de colágeno se determinan a partir de un ensayo de cizalladura llevado a cabo mediante elementos finitos (ABAQUS), a partir del cual se mide la rigidez de los hidrogeles de colágeno, determinando cómo varía la rigidez en función de las distintas concentraciones de colágeno y en función de la deformación del conjunto de fibras.

Por último, la simulación computacional ha permitido ver la gran heterogeneidad que existe en las propiedades mecánicas de las matrices para una misma concentración de fibras de colágeno. También se ha visto el efecto de rigidización de los hidrogeles a medida que aumenta la deformación por el estiramiento de las fibras de colágeno. Efecto observado en tejidos biológicos blandos.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Motivación	1
1.2. Objetivos y alcance	6
1.3. Metodología general	7
2. Materiales y métodos	8
2.1. Objetivo	8
2.2. Metodología	8
2.3. Datos experimentales	9
2.4. Caracterización de las fibras de colágeno	11
2.5. Caracterización de la matriz	16
3. Ensayo de cizalladura	19
3.1. Objetivo	19
3.2. Metodología	19
3.3. Descripción del ensayo	19
3.4. Resultados	21
4. Conclusiones	26
4.1. Líneas futuras	27
5. Bibliografía	28
Anexos	30
A. Programación OCTAVE	31
A.1. Nodos	31
A.2. Elementos	31
A.3. Grupo de elementos	32
A.3.1. Grupo de elementos	32
A.3.2. Grupo de elementos Z	33

A.4. Sección de los elementos	34
A.4.1. Sección	34
A.4.2. Sección Z	35
A.5. Coordenadas más alejadas del conjunto de fibras	36
A.5.1. coordenada X máxima	36
A.5.2. coordenada Y máxima	37
A.5.3. coordenada Z máxima	37
A.5.4. coordenada X mínima	38
A.5.5. coordenada Y mínima	39
A.5.6. coordenada Z mínima	39

Lista de Figuras

1.1.	Matriz de fibras de colágeno [1].	1
1.2.	Representación de la migración celular en la ECM con fibras no alineadas y alineadas.	3
1.3.	Representación de la migración celular desde un ambiente menos rígido a uno más rígido [2]. (a) Ambiente celular menos rígido. (b) Ambiente celular más rígido.	3
1.4.	Representación de la descelularización y recelularización de un órgano [3]. (a) Descelularización de un órgano. (b) Recelularización de un órgano.	4
1.5.	Representación de los distintos modelos utilizados para caracterizar mecánicamente los hidrogeles de colágeno.	6
2.1.	Diagrama de flujo sobre la metodología.	9
2.2.	(a) Dispositivo microfluídico real. Imágenes que pertenecen al primer corte ($Z = 1$) de los <i>stacks</i> de imágenes asociadas a: (b) Ensayo 1 de los geles con 2.0 mg/ml de colágeno. (c) Ensayo 2 de los geles con 2.5 mg/ml de colágeno. (d) Ensayo 3 de los geles con 4.0 mg/ml de colágeno.	10
2.3.	Representación de un conjunto de vóxeles.	11
2.4.	Representación de una fibra de colágeno en ABAQUS. Los nodos se representan mediante puntos rojos y los elementos mediante líneas verdes.	11
2.5.	Definición de los ejes locales para los elementos tipo <i>beam</i>	12
2.6.	Elemento en el cual se define una dirección de ejes locales diferente a la predeterminada. El elemento representado de color rojo coincidía el eje n_2 con el eje Z	12
2.7.	Detalle de red de fibras extraídas del ensayo 2 del hidrogel con concentración de colágeno de 2.0 mg/ml . Los nodos se representan como puntos de color rojo y los elementos como líneas de color rojo.	14
2.8.	Modelo tridimensional de las fibras de colágeno del ensayo 2 del hidrogel con concentración de colágeno de 2.0 mg/ml	14
2.9.	Curva tensión deformación del conjunto de fibras de colágeno [4].	15

2.10. (a) Fibra inicialmente enrollada. (b) Fibra estirada tras imponerse un desplazamiento. (c) Curva fuerza (pN) frente a desplazamiento (μm).	15
2.11. Mallado de la matriz acuosa del ensayo 1 para el hidrogel con concentración de colágeno de 2.5 mg/ml	17
2.12. Modelo del ensayo 2 para el hidrogel con concentración de colágeno de 2.5 mg/ml . Donde la diferencia de colores representa las diferentes secciones de las fibras.	18
3.1. Condiciones de contorno.	20
3.2. Parámetros para el cálculo del módulo elástico de cizalladura.	21
3.3. Desplazamiento en μm para los hidrogeles con concentración de colágeno de 2.0 mg/ml	21
3.4. Desplazamiento en μm para los hidrogeles con concentración de colágeno de 2.5 mg/ml	22
3.5. Desplazamiento en μm para los hidrogeles con concentración de colágeno de 4.0 mg/ml	22
3.6. Evolución del módulo elástico de cizalladura para distintas concentraciones de fibras de colágeno. Módulo elástico de cizalladura frente a deformación (escala logarítmica) para: (a) Hidrogel con concentración de colágeno de 2.0 mg/ml (ensayo 2). (b) Hidrogel con concentración de colágeno de 2.5 mg/ml (ensayo 3). (c) Hidrogel con concentración de colágeno de 4.0 mg/ml (ensayo 2).	23
3.7. Módulo elástico de cizalladura para cada uno de los hidrogeles de colágeno.	24
3.8. Módulo elástico de cizalladura medio para las tres concentraciones de colágeno (2.0 mg/ml , 2.5 mg/ml y 4.0 mg/ml).	25

Lista de Tablas

2.1. Número de nodos, elementos y fibras de la red de fibras de colágeno. . .	16
2.2. Dimensiones de las matrices acuosas en la que se embeben las fibras de colágeno para las distintas concentraciones y ensayos.	17
2.3. Número de nodos y elementos de los hidrogeles de colágeno.	18

Capítulo 1

Introducción

1.1. Motivación

Los hidrogeles de colágeno se utilizan ampliamente para experimentos *in vitro* y aplicaciones de ingeniería de tejidos. Su uso se ha extendido debido a su biocompatibilidad con las células y su capacidad para imitar tejidos biológicos.

Los hidrogeles de colágeno están formados por una red de filamentos de polímero incrustados en un sustrato acuoso (Figura 1.1), y sus propiedades mecánicas se definen principalmente por la arquitectura de la red de fibras y las propiedades de las fibras individuales [5].

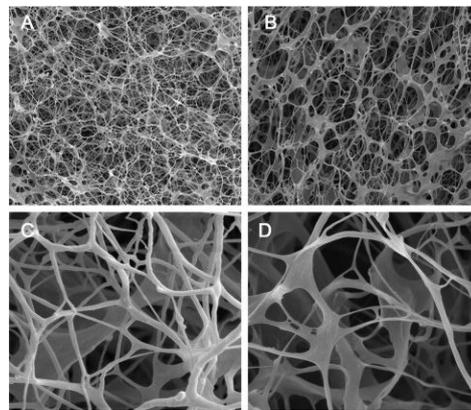


Figura 1.1: Matriz de fibras de colágeno [1].

Los hidrogeles de colágeno tienen especial interés debido a que su estructura de red tridimensional tiene la capacidad, entre otras, de retener grandes cantidades de agua y encapsular células. En particular, los materiales en base de colágeno son una alternativa en el diseño de sistemas para favorecer la curación de heridas cutáneas.

Un conocimiento detallado de las propiedades mecánicas de los hidrogeles de colágeno se considera indispensable para poder entender los cambios que éstos sufren ante distintas sollicitaciones mecánicas así como alteraciones externas.

El presente trabajo se centra en el estudio de las propiedades mecánicas de los hidrogeles con concentraciones variables de colágeno. Dichos hidrogeles están compuestos por una red de fibras de colágeno embebidas en un medio acuoso. El estudio de los hidrogeles de colágeno determina el comportamiento mecánico de la matriz extracelular (ECM), de modo que el modelo que se presenta en este trabajo sirve para determinar el comportamiento mecánico de la ECM. A continuación, se comentan varios entornos en los cuales las propiedades de la ECM juegan un papel crucial.

El colágeno es el componente más importante de la ECM y la proteína más abundante en el tejido humano. Cada fibra de colágeno está formada por varios subtipos de colágeno en función de su ubicación en el tejido, sin embargo, el tipo de colágeno más abundante es el colágeno tipo I y se puede encontrar en los tejidos conectivos que van desde la piel y el hueso hasta el tendón y la córnea. A su vez el colágeno tipo I está muy involucrado en procesos como la reparación de heridas y el desarrollo de órganos [6].

Si bien la ECM ha sido considerada durante muchos años como una plataforma inerte que solo proporciona un nicho para las células, su papel en la determinación de las funciones de las células ha sido descubierto a lo largo del tiempo. La ECM puede llegar a controlar la adhesión y el movimiento de las células. Se ha demostrado que la alineación de las fibras de la ECM dirige la migración y la proliferación celular (Figura 1.2). Se ha observado que las células migran de las regiones con una concentración de colágeno en la ECM más baja a aquellas con una concentración de colágeno en la ECM más alta debido a un gradiente de adhesión en un tipo de migración celular conocida como haptotaxis. La haptotaxis se define como la motilidad (facultad de moverse que tiene la materia viva como respuesta a ciertos estímulos) direccional. De modo que si la concentración de colágeno en la ECM es demasiado alta, la fuerza de adhesión experimentada por la célula es demasiado grande para continuar la migración. Por tanto, la velocidad de la migración también depende de la concentración de colágeno en la ECM. Se ha observado que la ECM no solo sirve como una pista para la migración, sino que también dicta la migración celular debido a sus propiedades mecánicas [6].



Figura 1.2: Representación de la migración celular en la ECM con fibras no alineadas y alineadas.

En la Figura 1.3 se observa el fenómeno de migración celular, donde la célula migra tras un determinado tiempo desde una zona con un ambiente menos rígido (menor densidad de fibras), hasta una zona con mayor rigidez (mayor densidad de fibras).

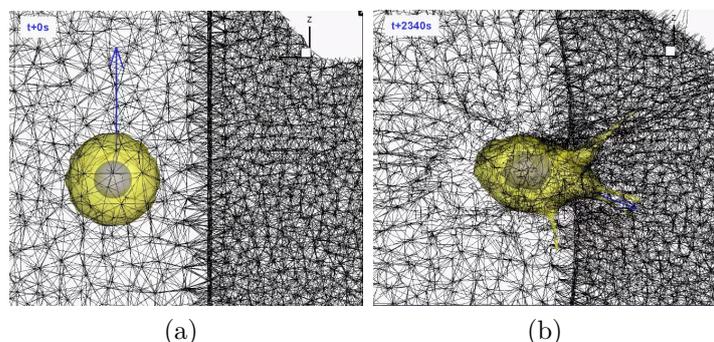


Figura 1.3: Representación de la migración celular desde un ambiente menos rígido a uno más rígido [2]. (a) Ambiente celular menos rígido. (b) Ambiente celular más rígido.

A nivel macroscópico, la disposición y orientación particulares de los componentes de la ECM forman un microambiente específico de tejido que desempeña un papel crítico en la progresión tumoral. Hoy en día, se entiende que la ECM no solo sufre una remodelación activa continua, sino que también provoca una serie de señales (bioquímicas y biofísicas) para influir en la adhesión y migración celular. El colágeno dicta las propiedades funcionales de la ECM. De hecho, los cambios en la composición o degradación del colágeno pueden conducir a la pérdida de la homeostasis (mecanismo que regula el equilibrio de nuestro cuerpo, mediante procesos de retroalimentación y control) de la ECM. Además, la degradación de las fibras de colágeno también puede promover o impulsar un comportamiento maligno, de manera que estas fibras pueden tener efectos tanto beneficiosos como perjudiciales en la progresión tumoral. Se ha observado que la invasión de células tumorales está orientada a lo largo de las fibras de colágeno alineadas lo que sugiere que la alineación de las fibras de colágeno facilita la invasión del tumor. Las células cancerosas han adoptado diversos métodos para atravesar la barrera del colágeno, como por ejemplo, el uso de la fuerza mecánica. A

medida que estas células proliferan, aumenta significativamente la tensión mecánica a lo largo de la membrana, lo que provoca la ruptura y permite que las células escapen de su microentorno celular [6].

Otro de los ámbitos de estudio de la ECM es la descelularización de órganos, en la cual la ECM se aísla de sus células nativas y material genético. Este estudio se debe al déficit entre donantes y pacientes que requieren un nuevo órgano y que ha aumentado sustancialmente en los últimos años.

El órgano descelularizado (Figura 1.4a) es capaz de repoblarse (Figura 1.4b) de células madre que identifican la ECM tanto en topología como en propiedades mecánicas, y de diferenciarse a células del órgano original.



Figura 1.4: Representación de la descelularización y recelularización de un órgano [3]. (a) Descelularización de un órgano. (b) Recelularización de un órgano.

Para evaluar la calidad de la ECM descelularizada, se miden cuatro aspectos de la ECM: eliminación de las células, eliminación de material genético, conservación del contenido de proteínas y retención de las propiedades mecánicas. Por lo tanto, debe evaluarse el contenido en proteína que permanece en la ECM, con especial énfasis en las proteínas estructurales como el colágeno. Además, las propiedades mecánicas, que incluyen el módulo elástico y la resistencia a la tracción, deben coincidir con el tejido original [7].

Los experimentos *in vitro* se han vuelto cada vez más sofisticados con el objetivo de reproducir con la mayor precisión posible el entorno biológico natural de los organismos. A medida que los estudios *in vitro* han aumentado su sofisticación, sus requisitos también han crecido en complejidad. Debido a la complejidad y al costoso trabajo de laboratorio, es necesario desarrollar modelos matemáticos que permitan simular una gran cantidad de escenarios y casos distintos de manera controlada y reproducible con unos costes asociados mucho menores. De hecho, estos modelos computacionales se pueden clasificar de acuerdo con varios factores, como el enfoque numérico de los procesos biológicos: continuos y discretos [8].

Para comprender a fondo los hidrogeles de colágeno, se han propuesto muchos modelos computacionales con el objetivo de simular y evaluar las propiedades mecánicas de los hidrogeles bajo distintas sollicitaciones mecánicas. En la actualidad son muchos los modelos computacionales que han estudiado la evaluación de las propiedades mecánicas de los hidrogeles:

- Modelo constitutivo hiperelástico fibrado que simula el comportamiento de una distribución estadística de fibras de colágeno sobre una geometría cúbica (Figura 1.5a) equivalente a una porción infinitesimal de la muestra en el reómetro, añadiendo a dicha geometría cúbica las propiedades del conjunto de fibras, siguiendo el enfoque numérico propuesto por Palmer y Boyce [5].
- Modelo constitutivo cuya geometría de la red de fibras se simula de manera aleatoria, cuya longitud y grosor de fibras son homogéneos (Figura 1.5b). Los entrecruzamientos entre fibras se simulan como resortes y cada una de las fibras y resortes que componen el hidrogel de colágeno se definen como materiales puramente elásticos. Dichas fibras se introducen (no se embeben) sobre un cubo de dimensiones definidas, para posteriormente realizar ensayos de tracción y cizalladura [9].
- Modelo discreto de una red de fibras con propiedades viscoelásticas y enlaces cruzados (Figura 1.5c) cuyas fibras tienen un radio y longitud homogéneo y una distribución aleatoria, a partir de las cuales se incluyen células y se simula su comportamiento ante distintas concentraciones de fibras, analizando las sollicitaciones mecánicas que experimentan las células [2].

Sin embargo, por lo que nosotros sabemos, ningún autor ha estudiado el comportamiento de una distribución real de fibras de colágeno, definiendo las fibras con propiedades individuales según su arquitectura de red, incorporando un elevado número variable de entrecruzamientos entre las fibras (*cross-linkers*) que dota de mayor rigidez al conjunto de fibras, e incluyendo las propiedades de anisotropía y grandes deformaciones. Por ello el esfuerzo para determinar las propiedades mecánicas del hidrogel de colágeno es mayor y se obtiene unos resultados más realistas. Además, en este trabajo se ha embebido la distribución real de fibras en el interior de una matriz acuosa.

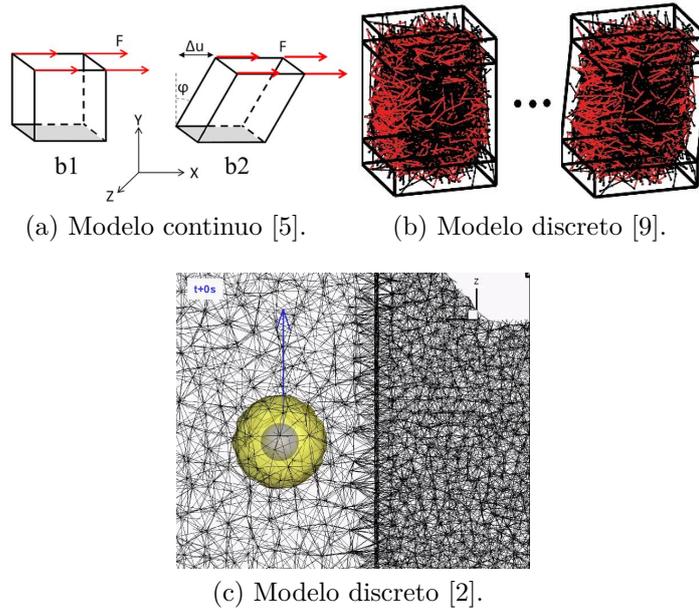


Figura 1.5: Representación de los distintos modelos utilizados para caracterizar mecánicamente los hidrogeles de colágeno.

Por todo esto, es importante hacer un esfuerzo en el desarrollo de modelos complejos para simular de la forma más realista posible el comportamiento de dichos hidrogeles ante estímulos mecánicos con el objetivo de caracterizarlos mecánicamente.

1.2. Objetivos y alcance

Uno de los mayores problemas que se presentan a la hora de evaluar la caracterización de los diferentes hidrogeles de colágeno es que estos presentan diferentes propiedades según su arquitectura y las propiedades mecánicas de las fibras. Los objetivos principales del trabajo son los siguientes:

- Arquitectura de las fibras de colágeno: partiendo de datos experimentales, en concreto, de *stacks* de imágenes de microscopía confocal, realizar un post-procesado de dicha información con el objetivo de construir la arquitectura de la ECM computacionalmente.
- Arquitectura de la matriz acuosa: partiendo de la posición geométrica de la red de fibras de colágeno, realizar el modelo de la matriz acuosa en la cual se embeben las fibras de colágeno.
- Caracterización de las propiedades mecánicas: por medio de simulación por elementos finitos reproducir un ensayo de cizalladura mediante el cual caracterizar las propiedades mecánicas de los hidrogeles de colágeno.

- Análisis comparativo: llevar a cabo un análisis comparativo de los resultados numéricos asociados a las diversas geometrías/arquitecturas modeladas con los resultados experimentales obtenidos en otros trabajos.

1.3. Metodología general

Se parte de datos experimentales, más concretamente de *stacks* de imágenes de microscopía confocal, que han sido post-procesados mediante el algoritmo FIRE (Fiber Extraction) [10]. Este algoritmo permite extraer la arquitectura de red tridimensional de las fibras de colágeno a partir de los datos experimentales.

Posteriormente, se aplican una serie de algoritmos desarrollados en Octave con el objetivo de obtener, a partir de los resultados de FIRE, los modelos 3D de las fibras de colágeno. Los modelos de los que se disponen son hidrogeles con concentraciones variables de colágeno (2.0 mg/ml , 2.5 mg/ml y 4.0 mg/ml) sobre los cuales se han realizado distintos ensayos.

Tras ello, se genera una geometría conocida la estructura tridimensional de las fibras de colágeno en la cual se embeben dichas fibras. A continuación, se introducen dichos modelos en el programa de elementos finitos ABAQUS con el objetivo de reproducir un ensayo de cizalladura. A partir de los ensayos de cizalladura, cuya solución numérica es conocida, se determinan las propiedades mecánicas de los hidrogeles.

Todas las simulaciones se han realizado en el clúster de computación de alto rendimiento del grupo de investigación M2BE.

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1. Objetivo

En este capítulo se presentan los datos de partida, así como el proceso empleado para reconstruir la estructura tridimensional de la distribución real de fibras de colágeno y las propiedades mecánicas que definen cada una de las fibras de colágeno. Por otro lado, se presenta el modelo computacional empleado para determinar la geometría y propiedades mecánicas de la matriz acuosa en la cual irá embebida la distribución real de fibras de colágeno.

2.2. Metodología

Se parte de datos experimentales para posteriormente realizar el modelo tridimensional de la distribución real de fibras de colágeno. Dicho modelo se realiza mediante el lenguaje de programación Octave.

Una vez obtenidos los modelos tridimensionales de las fibras de colágeno, y con el objetivo de poder reproducir el ensayo de cizalladura sobre ellos para poder caracterizar mecánicamente los hidrogeles de colágeno, se realiza el modelado de la matriz acuosa que contiene dichas fibras. Este modelo se realiza usando el programa de elementos finitos ABAQUS, partiendo de unos *scripts* de Octave que permiten obtener su geometría.

Todas las simulaciones se ejecutan en el clúster computacional de alto rendimiento del grupo de investigación M2BE, debido al elevado coste computacional que supone ejecutar cada uno de los modelos.

Finalmente, se incluye un diagrama de flujo (Figura 2.1) donde se muestra el proceso seguido a lo largo del presente trabajo.

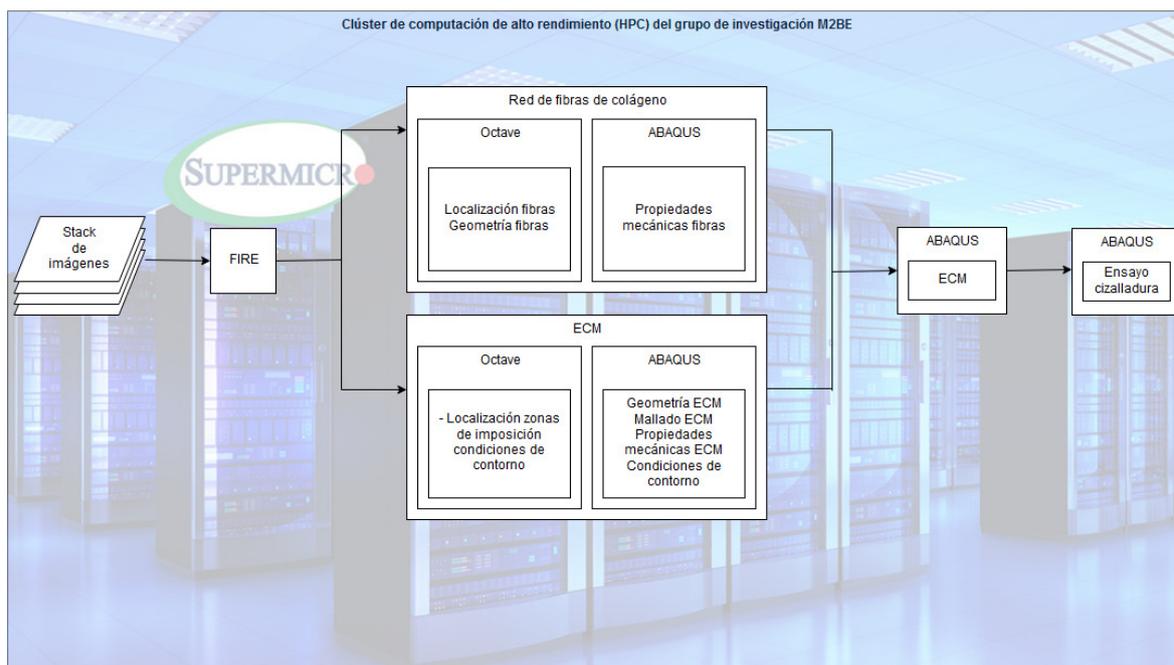


Figura 2.1: Diagrama de flujo sobre la metodología.

2.3. Datos experimentales

La obtención de los datos experimentales (*stacks* de imágenes de microscopía confocal) así como el primer post-procesado de las mismas mediante el algoritmo FIRE forman parte de un trabajo anterior realizado en el grupo de investigación M2BE [10].

A continuación se incluye una breve explicación de cómo se obtienen los datos de partida de este trabajo de fin de grado a partir de los datos experimentales previamente mencionados.

En primer lugar se utiliza un hidrogel de colágeno tipo I con concentraciones de 2.0 *mg/ml*, 2.5 *mg/ml* y 4.0 *mg/ml*. Sobre cada una de las concentraciones de colágeno se efectúan tres ensayos distintos con el objetivo de obtener distintas distribuciones de fibras.

Un chip de microfluídica se rellena con estos hidrogeles (Figura 2.2a). Se utiliza microscopía confocal para obtener imágenes de corte transversal secuencial en el eje *Z* de diferentes puntos de los chips llenos con el hidrogel de colágeno. Este conjunto de imágenes de sección transversal forma lo que se denomina *stacks* de imágenes (Figura 2.2b-2.2d)(la dirección *Z* se considera la dirección perpendicular al plano focal). El tamaño del píxel es de 0.31 x 0.31 μm /píxel y los pasos de *Z* son de 0.5 μm , obteniendo un vóxel de 0.31 x 0.31 x 0.5 μm .

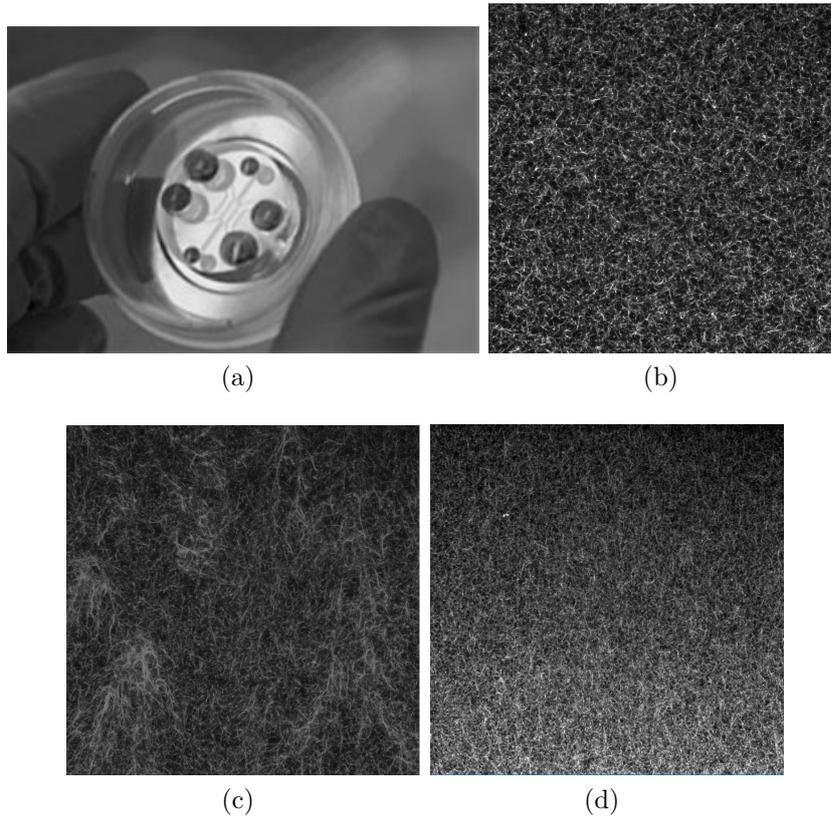


Figura 2.2: (a) Dispositivo microfluídico real. Imágenes que pertenecen al primer corte ($Z = 1$) de los *stacks* de imágenes asociadas a: (b) Ensayo 1 de los geles con 2.0 mg/ml de colágeno. (c) Ensayo 2 de los geles con 2.5 mg/ml de colágeno. (d) Ensayo 3 de los geles con 4.0 mg/ml de colágeno.

Posteriormente, los *stacks* de imágenes son post-procesados mediante el algoritmo FIRE. Este algoritmo tiene como salida una lista de vértices (V), un vector de coordenadas (X) y una lista de fibras (F). Cada vértice tiene asociado un vector 3D cuyas coordenadas se almacenan en X , y cada fibra es una lista de vértices a través de los cuales pasa. En resumen, lo que se obtiene es una lista de puntos desconectados para cada fibra. Obteniéndose así la arquitectura de red tridimensional de las fibras captadas en los *stacks*. Dichas coordenadas indican por qué vóxels pasa el esqueleto de las fibras. Además, es importante comentar que dicha arquitectura de red tridimensional incluye los *cross-linkers* entre las fibras de manera que se dota a la red de fibras de colágeno de una mayor rigidez. El hecho de trabajar con una distribución real de fibras no permite una distribución homogénea de fibras debido a que la arquitectura de red de fibras se define a partir de los *stacks* de imágenes.

2.4. Caracterización de las fibras de colágeno

A partir de los datos experimentales se aplican una serie de algoritmos desarrollados en Octave (Anexo A), con el objetivo de modelar y reconstruir los modelos 3D de los hidrogeles de colágeno, y poder introducirlos posteriormente en el programa de elementos finitos.

En primer lugar se ubica la posición tridimensional de las coordenadas de cada una de las fibras de colágeno en el espacio (nodos) mediante un *script* de Octave (Anexo A.1). El tamaño del vóxel (Figura 2.3) nos permite calcular las coordenadas de cada punto de la fibra en base a su posición en la matriz de vóxels.

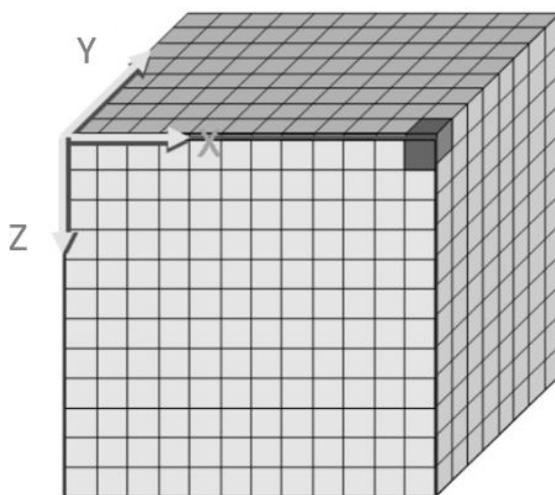


Figura 2.3: Representación de un conjunto de vóxels.

Una vez ubicadas las coordenadas tridimensionales de todas y cada una de las fibras de colágeno, se unen los nodos dos a dos de manera que se definen los elementos que conforman cada fibra (Anexo A.2). No hay que asociar un único elemento a una fibra ya que como se muestra en la Figura 2.4, una única fibra puede estar formada por varios nodos y elementos.

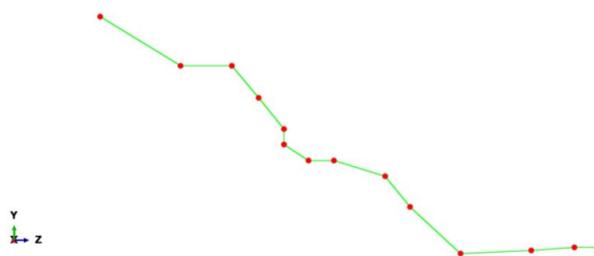


Figura 2.4: Representación de una fibra de colágeno en ABAQUS. Los nodos se representan mediante puntos rojos y los elementos mediante líneas verdes.

Por tanto, para definir cada una de las fibras de colágeno, se definen diversos grupos de elementos mediante *scripts* de Octave (Anexo A.3). De esta manera, cada grupo de elementos representan una fibra.

Los elementos se definen dentro del programa de elementos finitos como elementos *beam* debido a que estos elementos se representan a partir de la unión de dos nodos definiendo una línea. Sin embargo, una línea no tiene una orientación propia para representar la sección transversal. La orientación de la sección transversal de un elemento *beam* se define en ABAQUS en términos de un sistema de ejes local ($t, n1, n2$), donde t es la tangente al eje del elemento, positiva en la dirección del primer al segundo nodo del elemento, y $n1$ y $n2$ son vectores que definen las direcciones 1 y 2 locales de la sección transversal. Este sistema se ilustra en la Figura 2.5.

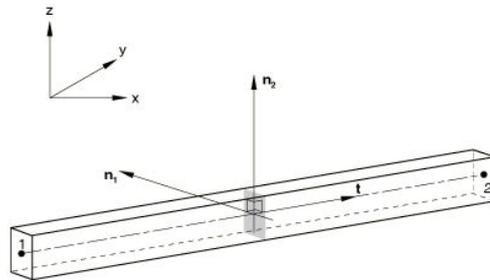


Figura 2.5: Definición de los ejes locales para los elementos tipo *beam*.

Por tanto, para definir de manera automática el sistema de ejes locales de estos elementos, se mantienen los valores predeterminados por ABAQUS que corresponden con la dirección $(0.0,0.0,1.0)$. Sin embargo, para aquellos elementos en los cuales la dirección del eje $n2$ coincide con el eje Z se modifica dicho valor por $(0.0,1.0,1.0)$ para obtener un sistema de ejes ortonormal (Figura 2.6). Por ello, se establece un grupo de elementos para aquellos en los cuales la dirección del eje local $n2$ coincidía con la dirección del eje Z .

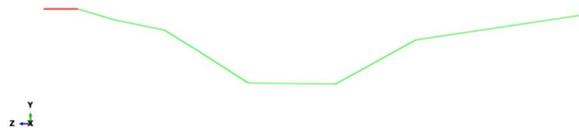


Figura 2.6: Elemento en el cual se define una dirección de ejes locales diferente a la predeterminada. El elemento representado de color rojo coincidía el eje $n2$ con el eje Z .

La posición de los ejes locales en este trabajo no tiene mucha importancia, ya que las fibras tienen secciones circulares. Sin embargo, a nivel de cálculo en el programa de elementos finitos es necesario incorporar la orientación de los ejes.

Dentro de los elementos *beam*, existen diferentes tipos en función de su interpolación y formulación. El tipo de elemento *beam* que más se ajusta a nuestro modelo es el B31. Se elige este tipo de elemento debido a que su método de cálculo sigue la formulación de Timoshenko, cuya formulación permite la deformación por cizalladura. Además, otro de los factores que se consideran a la hora de elegir el tipo de elemento es la configuración de los nodos.

El elemento *beam* B31 además de usar la formulación de Timoshenko para realizar los cálculos, utiliza un tipo de interpolación lineal. Este tipo de elemento cuenta con seis grados de libertad en cada nodo: tres grados de libertad de translación y tres grados de libertad de rotación.

Otra de las consideraciones que se tienen en cuenta en este trabajo es la presencia de los *cross-linkers* ya que están contenidos en la arquitectura de red de fibras de la que se parte y, por lo tanto, es posible que a la hora de definir los elementos, coincidan en varios elementos un mismo nodo.

Hasta ahora solamente se ha definido el tipo de elemento utilizado así como las coordenadas nodales que definen la longitud del elemento. Sin embargo, es necesario caracterizar la sección del elemento (Anexo A.4). Para ello, se define el radio de cada una de las fibras independientemente, debido a que el radio de cada fibra se define en función de su arquitectura tridimensional. De esta manera, se consigue obtener una distribución realista de fibras de colágeno.

El hecho de que cada fibra tenga un radio distinto supone que no todas las fibras se comportan igual ante un mismo esfuerzo, debido a que la inercia que se define a partir del radio es distinta para cada una de las fibras. Por otro lado, el incorporar los *cross-linkers* hace que la red de fibras de colágeno tenga una mayor rigidez. Esto, sumado al elevado número de fibras de las que se dispone, supone un elevado coste computacional, además de una gran complejidad a la hora de realizar el cálculo mediante elementos finitos, a diferencia de otros modelos que definen únicamente una geometría cúbica que simula una distribución estadística de las fibras a través de modelos constitutivos fibrados [5] o una distribución de fibras homogénea [9].

En la Figura 2.7 se muestra una red de fibras en la cual se representa los distintos radios para cada una de las fibras.

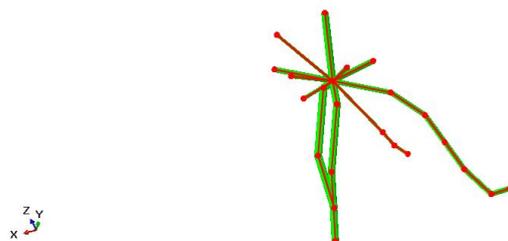


Figura 2.7: Detalle de red de fibras extraídas del ensayo 2 del hidrogel con concentración de colágeno de 2.0 mg/ml . Los nodos se representan como puntos de color rojo y los elementos como líneas de color rojo.

Tras aplicar los distintos *scripts* de Octave desarrollados, se obtiene la geometría real de la red de fibras de colágeno (Figura 2.8) que se utiliza para simular el ensayo de cizalladura con ABAQUS.

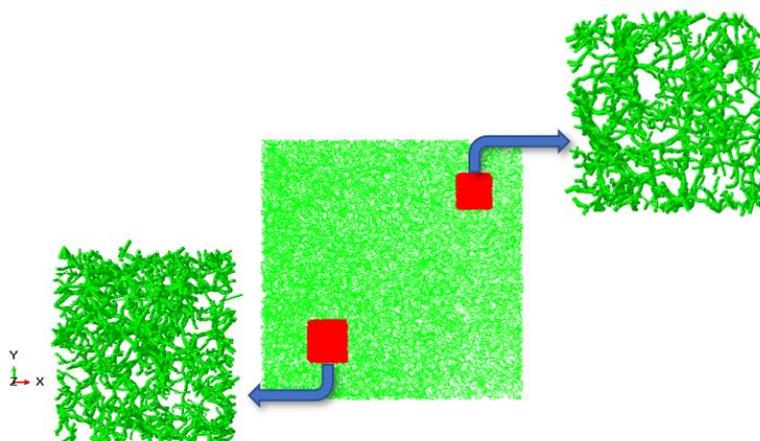


Figura 2.8: Modelo tridimensional de las fibras de colágeno del ensayo 2 del hidrogel con concentración de colágeno de 2.0 mg/ml .

Finalmente, es necesario definir el material que caracteriza cada una de las fibras de manera que se caracteriza por completo el modelo 3D de las fibras de colágeno.

Se sabe que el hidrogel de colágeno es un material viscoelástico. Sin embargo, en una primera aproximación se pueden ignorar los aspectos viscosos de las redes de fibra de colágeno [9]. Por tanto, un modelo puramente elástico es una aproximación bastante razonable para caracterizar dichos hidrogeles.

Se ha determinado el valor del módulo elástico en distinto trabajos experimentales obteniéndose un amplio intervalo de valores que va desde el orden de KPa [11] a MPa [9], en función de la hidratación del colágeno, el radio de la sección de las fibras y el número de *cross-linkers* de las fibras. Por ello, en este trabajo en particular al tener el colágeno hidratado, con una elevada cantidad de *cross-linkers* y fibras con distintas secciones, se define el material de las fibras mediante un valor de módulo elástico de 800 KPa [11] para todas y cada una de las fibras. El coeficiente de Poisson de las fibras

se establece en 0.4.

Una vez definido el modelo que se realiza para caracterizar las fibras de colágeno, es importante comentar el comportamiento mecánico de las fibras de colágeno (Figura 2.9). Las fibras tienen un comportamiento mecánico distinto según si están enrolladas o estiradas. Se distinguen dos regiones, la *toe region*, región en la cual las fibras no incrementan su tensión frente a deformaciones (las fibras están enrolladas) y una segunda región denominada región elástica en la cual las fibras tardan más en deformarse al aplicarse la fuerza (las fibras están estiradas). La última región en la que se produce la rotura de las fibras no se considera en este trabajo.

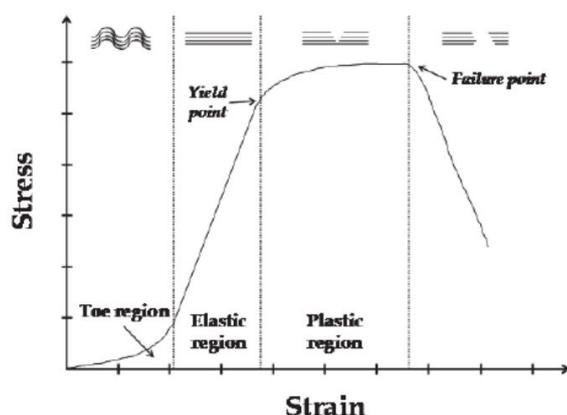


Figura 2.9: Curva tensión deformación del conjunto de fibras de colágeno [4].

Se ha realizado un ensayo de cizalladura sobre una única fibra con el objetivo de observar cómo a medida que la fibra se deforma y se estira, la fuerza aumenta considerablemente (Figura 2.10). Se representa la reacción en el apoyo y el desplazamiento en el extremo contrario.

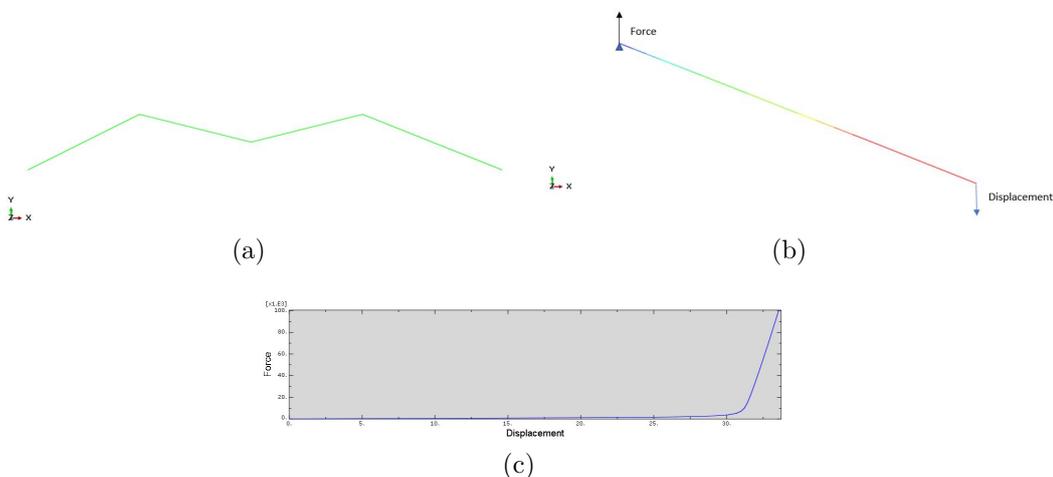


Figura 2.10: (a) Fibra inicialmente enrollada. (b) Fibra estirada tras imponerse un desplazamiento. (c) Curva fuerza (pN) frente a desplazamiento (μm).

Por todo ello, el modelo descrito para la caracterización de las fibras de colágeno es distinto a los estudiados hasta ahora, presentándose un modelo realista según su arquitectura descrita en los *stacks* de imágenes obtenidos en el laboratorio.

Finalmente en la Tabla 2.1 se muestra el número de nodos, elementos y el número de fibras que definen cada uno de los hidrogeles de colágeno.

Geles 2.0 <i>mg/ml</i>	Nodos	Elementos	Fibras
Ensayo 1	172219	179990	23809
Ensayo 2	194976	205110	27043
Ensayo 3	113715	117090	16732
Geles 2.5 <i>mg/ml</i>	Nodos	Elementos	Fibras
Ensayo 1	117838	122455	14915
Ensayo 2	137460	142117	19074
Ensayo 3	228634	244303	30568
Geles 4.0 <i>mg/ml</i>	Nodos	Elementos	Fibras
Ensayo 1	195437	207890	27050
Ensayo 2	215660	231925	29187
Ensayo 3	169537	182330	23427

Tabla 2.1: Número de nodos, elementos y fibras de la red de fibras de colágeno.

2.5. Caracterización de la matriz

Una vez descrito el modelo tridimensional de las fibras de colágeno, se presenta el modelo de la matriz acuosa en la cual irán embebidas las fibras de colágeno, con el objetivo de reproducir el ensayo de cizalladura.

En primer lugar se determinan las dimensiones de las distintas matrices acuosas. Partiendo de los modelos tridimensionales de las fibras de colágeno, se desarrollan una serie de *scripts* de Octave (Anexo A.5) mediante los cuales se determinan las coordenadas X, Y, Z de las fibras más alejadas. Para ello, se generan unas matrices en las cuales se almacenan los valores de las coordenadas X, Y, Z de todas y cada una de las fibras, para después determinar cuáles son las coordenadas máximas y mínimas en los tres ejes. Dichas coordenadas máximas y mínimas determinan la geometría de la matriz acuosa. De este modo, se conoce las dimensiones de las distintas matrices acuosas que deben envolver todas y cada una de las fibras.

Las dimensiones de cada una de las matrices acuosas para los distintos ensayos de los hidrogeles con concentraciones variables de colágeno se muestran en la Tabla 2.2.

Geles 2.0 <i>mg/ml</i>	$X[\mu\text{m}]$	$Y[\mu\text{m}]$	$Z[\mu\text{m}]$
Ensayo 1	319.44	319.44	32.5
Ensayo 2	319.44	319.44	32.5
Ensayo 3	319.44	319.44	32.5
Geles 2.5 <i>mg/ml</i>	$X[\mu\text{m}]$	$Y[\mu\text{m}]$	$Z[\mu\text{m}]$
Ensayo 1	319.44	319.44	32.5
Ensayo 2	319.44	319.44	32.5
Ensayo 3	319.44	319.44	32.5
Geles 4.0 <i>mg/ml</i>	$X[\mu\text{m}]$	$Y[\mu\text{m}]$	$Z[\mu\text{m}]$
Ensayo 1	319.44	319.44	32.5
Ensayo 2	319.44	319.44	26.5
Ensayo 3	319.44	319.44	28.5

Tabla 2.2: Dimensiones de las matrices acuosas en la que se embeben las fibras de colágeno para las distintas concentraciones y ensayos.

Una vez obtenida la geometría de las matrices acuosas, se determina el tipo de elemento que define el mallado de las matrices mediante el programa de elementos finitos. Los elementos que se definen para el mallado de las matrices acuosas son hexaedros lineales (C3D8). Estos elementos realizan su cálculo mediante un tipo de interpolación lineal y cada uno de sus elementos está definido por ocho nodos en las esquinas.

En la Figura 2.11 se representa la matriz acuosa del ensayo 1 que se realiza sobre el hidrogel con una concentración de colágeno de 2.5 *mg/ml*.

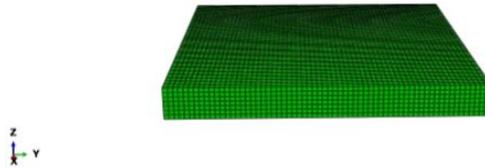


Figura 2.11: Mallado de la matriz acuosa del ensayo 1 para el hidrogel con concentración de colágeno de 2.5 *mg/ml*.

En cuanto a las propiedades mecánicas que definen todas y cada una de las matrices acuosas se adapta un modelo de comportamiento elástico lineal. En este trabajo se considera que el valor del módulo elástico asociado a la matriz es de 0.5 Pa. El módulo elástico se define con este valor debido a que la matriz es un medio acuoso el cual no tiene apenas rigidez. Por ello la matriz realmente no opone resistencia ante fuerzas externas. Sin embargo, es necesario simularla porque al deformarse o moverse arrastra a las fibras embebidas en ella. El coeficiente de Poisson se define con un valor de 0.4.

Finalmente, tras caracterizar todas las matrices acuosas, se utiliza la técnica de elementos embebidos de ABAQUS mediante la cual se incrustan todas las fibras de

colágeno en su correspondiente matriz según su concentración y ensayo realizado, con el objetivo de que todas las fibras se desplacen y deformen. Por tanto, es posible reproducir el ensayo de cizalladura y caracterizar las matrices de fibras, tal y como se comenta en el Capítulo 3.

En la Figura 2.12 se observa el resultado de incrustar las fibras en la matriz acuosa.

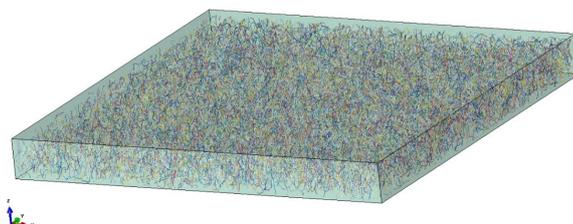


Figura 2.12: Modelo del ensayo 2 para el hidrogel con concentración de colágeno de 2.5 mg/ml . Donde la diferencia de colores representa las diferentes secciones de las fibras.

Por último, una vez descritos ambos modelos y embebidas las fibras de colágeno en el interior de la matriz acuosa, se ilustra en la Tabla 2.3 el número de nodos y elementos totales que definen el modelo por completo.

Geles 2.0 mg/ml	Nodos	Elementos
Ensayo 1	206018	208661
Ensayo 2	228775	233781
Ensayo 3	147514	145761
Geles 2.5 mg/ml	Nodos	Elementos
Ensayo 1	151637	151126
Ensayo 2	171259	170788
Ensayo 3	262433	272974
Geles 4.0 mg/ml	Nodos	Elementos
Ensayo 1	229236	236561
Ensayo 2	241009	252404
Ensayo 3	199111	206905

Tabla 2.3: Número de nodos y elementos de los hidrogeles de colágeno.

Capítulo 3

Ensayo de cizalladura

3.1. Objetivo

El principal objetivo de este capítulo consiste en reproducir el ensayo de cizalladura mediante el cual se caracterizan las matrices de fibras con distintas distribuciones y concentraciones de colágeno. Se presentan además los resultados numéricos obtenidos.

3.2. Metodología

Partiendo de los modelos tridimensionales de las fibras de colágeno incrustadas en su correspondiente matriz acuosa según su concentración de colágeno y ensayo realizado, se reproduce un ensayo de cizalladura que consiste en anclar la parte inferior de la matriz acuosa y desplazar la parte superior, de manera que todas y cada una de las fibras presentan una deformación y desplazamiento. El ensayo se realiza en control en desplazamiento. Este ensayo se lleva a cabo mediante el programa de elementos finitos ABAQUS, y se ejecuta en el clúster computacional de alto rendimiento del grupo de investigación M2BE.

3.3. Descripción del ensayo

Con el objetivo de evaluar la evolución de la rigidez en los hidrogeles de colágeno, se reproduce un ensayo de cizalladura mediante el cual se caracteriza la deformación que experimentan las fibras cuando se aplican esfuerzos cortantes.

Las condiciones de contorno (Figura 3.1) que se aplican para reproducir el ensayo de cizalladura en este trabajo son las siguientes:

- Desplazamiento impuesto en la cara superior: se impone un desplazamiento en el eje Y , en la cara superior de la matriz acuosa. Esta condición se realiza sobre las

dos líneas de elementos superiores, con el objetivo de que las fibras se deformen correctamente.

- Desplazamiento impedido en la cara superior: se impide el desplazamiento en el eje Z , en las dos líneas de elementos superiores de la matriz acuosa, de manera que se reproduzca de manera correcta el ensayo de cizalladura dado que la muestra se encuentra entre dos placas en el ensayo experimental.
- Desplazamiento impedido en la cara inferior: se impide el desplazamiento en los ejes X, Y, Z de la cara inferior en la matriz acuosa.

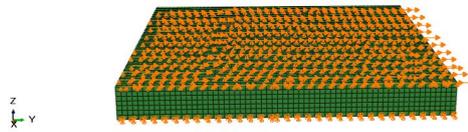


Figura 3.1: Condiciones de contorno.

Estas condiciones de contorno se transmiten a cada una de las fibras incrustadas gracias a la técnica de elementos embebidos de ABAQUS. Con ello se consigue la deformación y desplazamiento de cada una de las fibras, incluso aquellas que están completamente aisladas del resto.

Este ensayo nos sirve para determinar la rigidez de los hidrogeles según las distintas concentraciones de colágeno. El módulo elástico de cizalladura se calcula de la siguiente forma:

$$G = \frac{Fl}{\Delta y A}$$

Donde la fuerza (F) se calcula como la fuerza que se ejerce en la parte superior de la matriz consecuencia del desplazamiento impuesto, la longitud (l) representa la altura de la matriz menos las dos líneas de elementos sobre las cuales se aplica la fuerza, Δy representa el incremento de desplazamiento que sufre la matriz en la dirección Y y el área (A) representa la proyección de la cara superior de la matriz. Todo ello se calcula para los diferentes incrementos de desplazamiento que se definen en el programa de elementos finitos a la hora de imponer el desplazamiento en la cara superior de la matriz acuosa.

Posteriormente se realiza un promedio para cada uno de los incrementos de desplazamiento obteniéndose el módulo elástico de cizalladura para los hidrogeles de colágeno.

En la Figura 3.2 se representan cada uno de los parámetros utilizados para el cálculo del módulo elástico de cizalladura sobre la matriz acuosa.

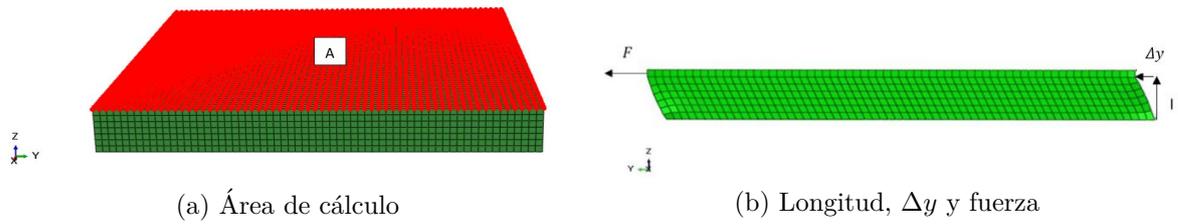


Figura 3.2: Parámetros para el cálculo del módulo elástico de cizalladura.

3.4. Resultados

A continuación, tras reproducir el ensayo de cizalladura para cada uno de los hidrogeles de colágeno, se presentan los resultados obtenidos.

En primer lugar se muestran las configuraciones deformadas junto con los valores de desplazamiento de todos los hidrogeles de colágeno. En las Figuras 3.3, 3.4 y 3.5 se muestra como varía el desplazamiento en las diferentes partes de las fibras de colágeno. Se observa que las fibras de colágeno se desplazan más en la capa superior (donde se impone el desplazamiento) y a medida que nos acercamos a la parte inferior el desplazamiento disminuye consecuencia de impedir el desplazamiento en el medio acuoso.

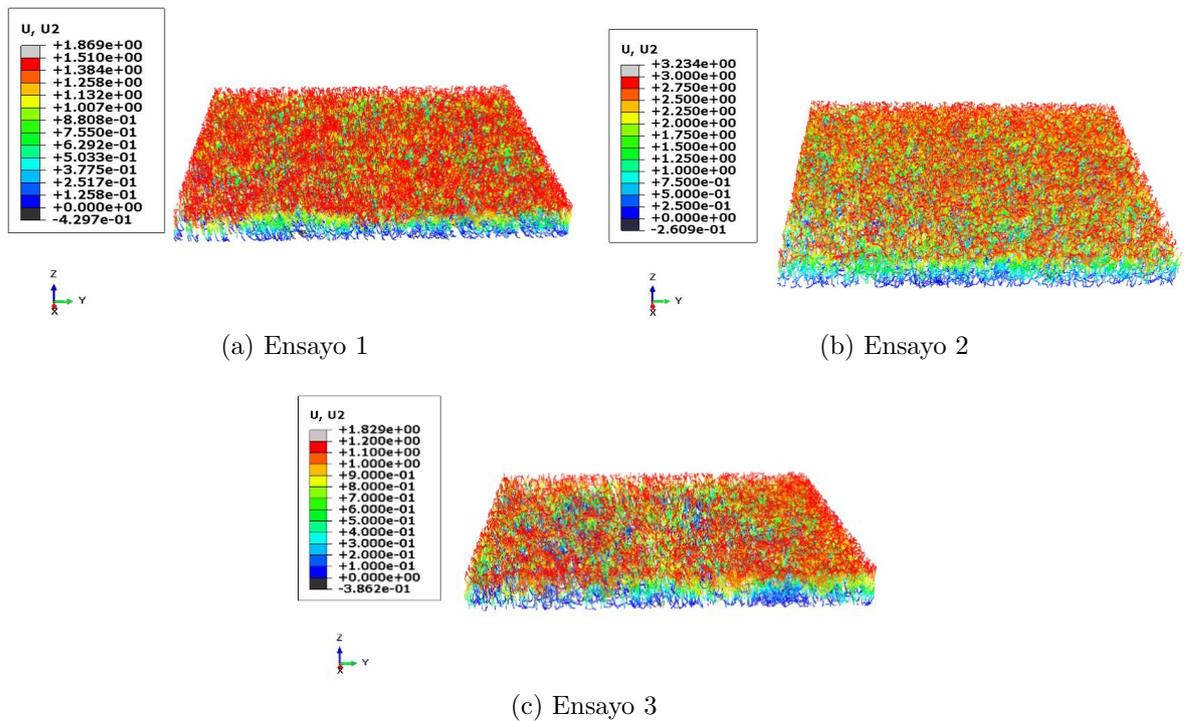


Figura 3.3: Desplazamiento en μm para los hidrogeles con concentración de colágeno de 2.0 mg/ml .

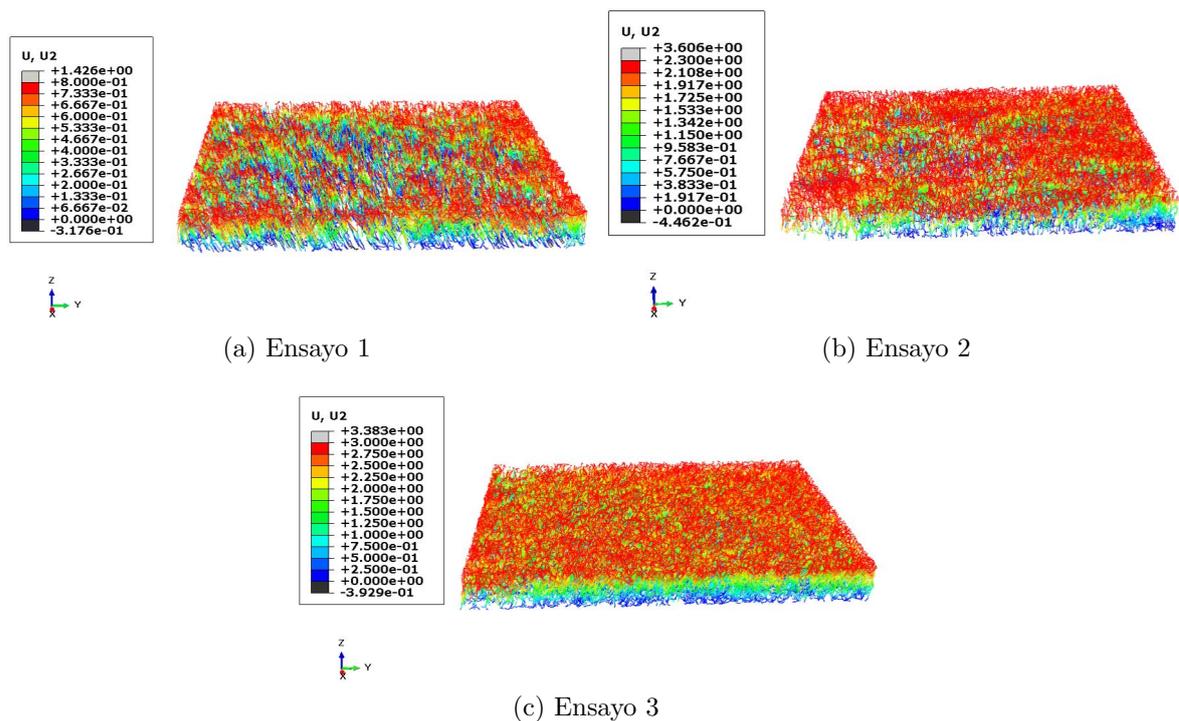


Figura 3.4: Desplazamiento en μm para los hidrogeles con concentración de colágeno de 2.5 mg/ml .

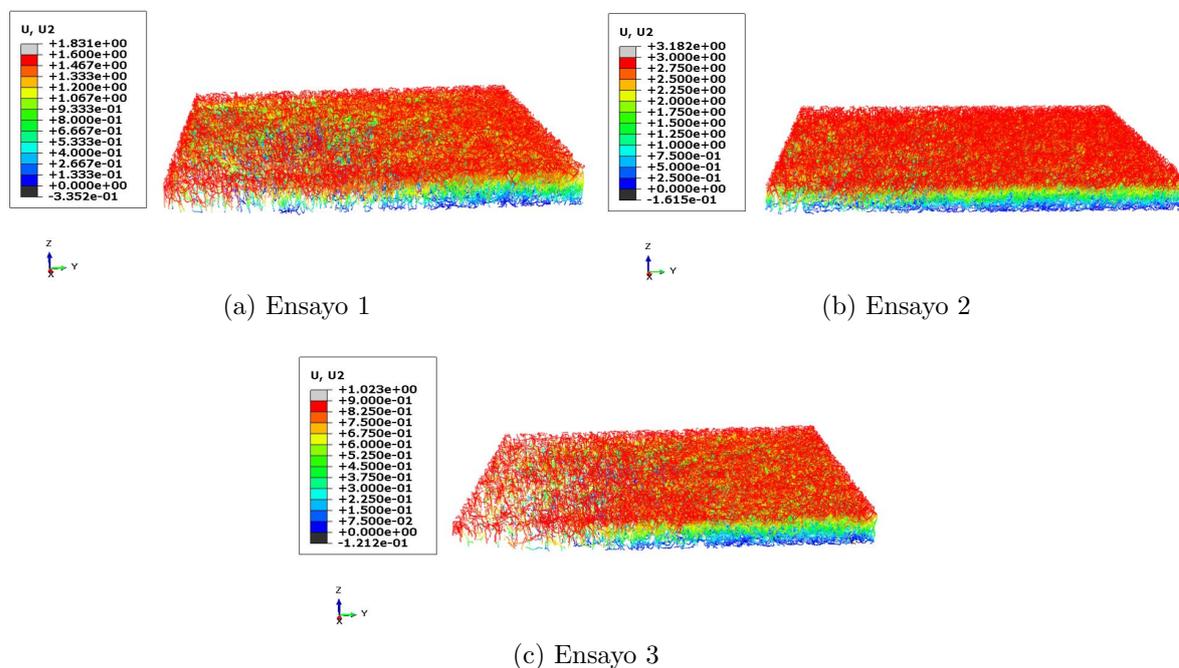


Figura 3.5: Desplazamiento en μm para los hidrogeles con concentración de colágeno de 4.0 mg/ml .

Esto sirve para valorar que el ensayo de cizalladura se ha llevado a cabo de forma correcta y que a partir de aquí se puede determinar el cálculo del módulo elástico de

cizalladura para compararlo con los resultados experimentales.

El módulo elástico de cizalladura que caracteriza a cada uno de los hidrogeles de colágeno se calcula siguiendo la fórmula comentada anteriormente. Para cada incremento de desplazamiento que se establece en el programa de elementos finitos se calcula un módulo elástico de cizalladura a partir de la fuerza y desplazamiento correspondiente, y a continuación se establece una media entre todos los valores.

En la Figura 3.6 se muestra el resultado de alguno de los ensayos realizados sobre los hidrogeles de colágeno.

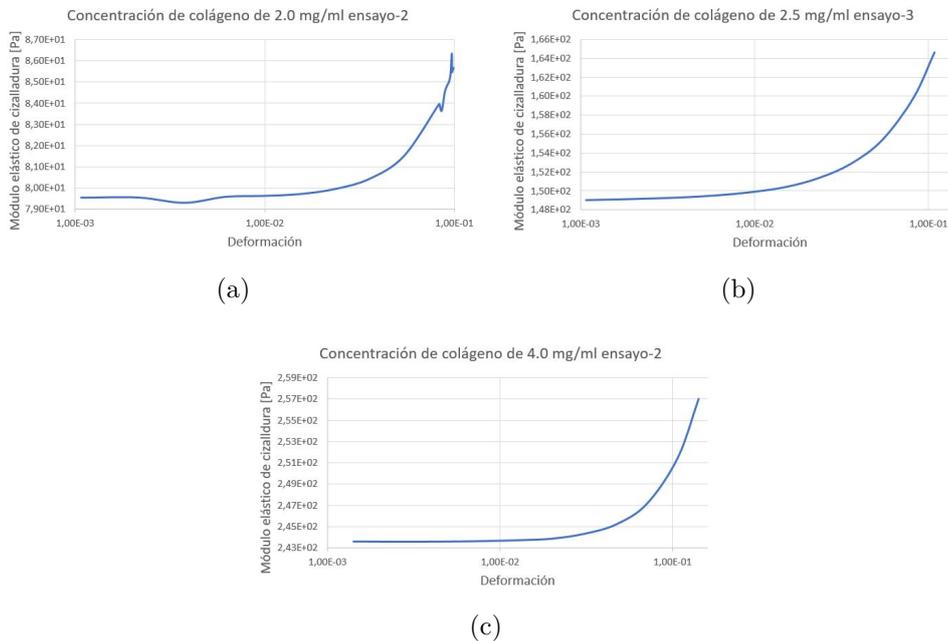


Figura 3.6: Evolución del módulo elástico de cizalladura para distintas concentraciones de fibras de colágeno. Módulo elástico de cizalladura frente a deformación (escala logarítmica) para: (a) Hidrogel con concentración de colágeno de 2.0 mg/ml (ensayo 2). (b) Hidrogel con concentración de colágeno de 2.5 mg/ml (ensayo 3). (c) Hidrogel con concentración de colágeno de 4.0 mg/ml (ensayo 2).

Se observa cómo el módulo elástico de cizalladura se mantiene constante hasta una deformación aproximada del 0.05. A partir de esta deformación el módulo elástico de cizalladura empieza a aumentar. Esto se debe a que las fibras de colágeno que inicialmente están enrolladas o no alineadas empiezan a estirarse entrando en la región elástica comentada anteriormente. Como consecuencia, para deformar las fibras es necesario aplicar una fuerza mayor. En resumen, las fibras para deformaciones mayores a 0.05 empiezan a rigidizar el hidrogel aumentándose así el módulo elástico de cizalladura.

En las Figuras 3.7 y 3.8 se presentan los valores obtenidos a partir de los modelos explicados en la anterior sección (Capítulo 2), además se incluye el valor del módulo

elástico de cizalladura calculado en el trabajo experimental [5] con el objetivo de observar la similitud entre ambos resultados.

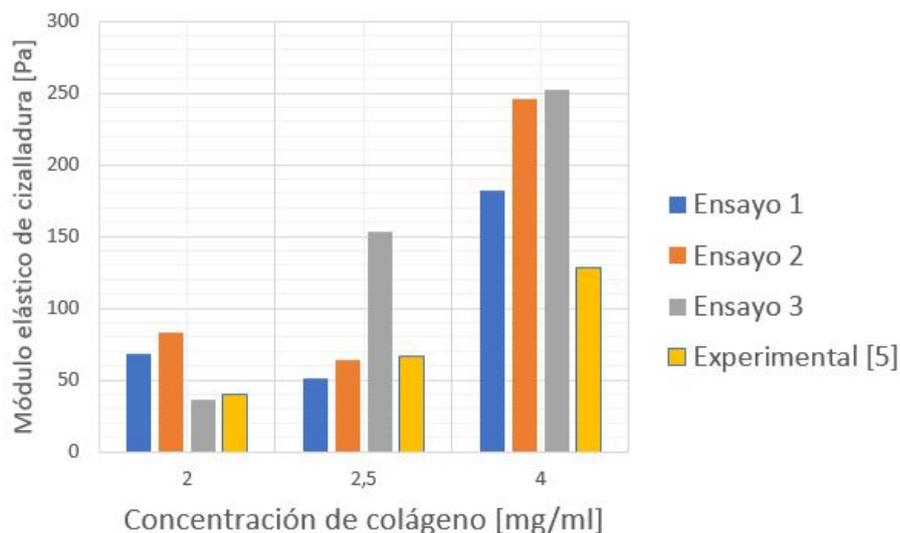


Figura 3.7: Módulo elástico de cizalladura para cada uno de los hidrogeles de colágeno.

En este trabajo, para el hidrogel con una concentración de colágeno de 2.0 mg/ml se obtienen valores de 36.4 Pa a 82.89 Pa en el ensayo computacional frente a $40.12 \pm 3.29 \text{ Pa}$ en el ensayo experimental; para el hidrogel con una concentración de colágeno de 2.5 mg/ml se obtienen valores de 50.92 Pa a 152.88 Pa en el ensayo computacional frente a $66.46 \pm 6.29 \text{ Pa}$ en el ensayo experimental; y por último para el hidrogel con una concentración de colágeno de 4.0 mg/ml se obtienen valores de 181.88 Pa a 251.99 Pa en el ensayo computacional frente a 127.90 ± 14.43 . Por tanto, se observa una diferencia entre el módulo elástico de cizalladura obtenido en el ensayo computacional y en el ensayo experimental. Esta diferencia puede deberse a diversos factores, como por ejemplo la preparación del hidrogel. La preparación del hidrogel es uno de los parámetros que determina la arquitectura de la distribución de fibras de colágeno. Por ejemplo, en la preparación del colágeno se puede añadir al hidrogel la enzima transglutaminasa de manera que se aumenta el número de *cross-linkers* entre fibras. Aumentándose la rigidez en función del porcentaje de transglutaminasa añadida (se obtienen más *cross-linkers* a medida que se aumenta la adición de transglutaminasa).

En este trabajo se realizan tres ensayos para cada concentración de colágeno y se observa que para cada ensayo se obtiene un módulo elástico de cizalladura diferente. Esto se debe a que cada uno de los ensayos muestra una distribución diferente de fibras y al estar trabajando con una distribución real de fibras de colágeno, cuya arquitectura de red se da a partir de los *stacks* de imágenes, el hidrogel tiene unas propiedades diferentes. Esto no sucedería si estuviéramos simulando una distribución

de fibras homogénea.

Finalmente, analizando globalmente los resultados, se observa que el principal efecto del aumento de la concentración de colágeno en el hidrogel corresponde con el aumento de la rigidez del hidrogel, tal y como se ha estudiado en otros modelos [9]. Cuando la concentración de colágeno es mayor, se forma un ambiente más poblado y como consecuencia la rigidez aumenta, lo que da como resultado un hidrogel más rígido. Por otro lado, en la Figura 3.8 se representa la media del módulo de cizalladura de los tres ensayos de cada hidrogel.

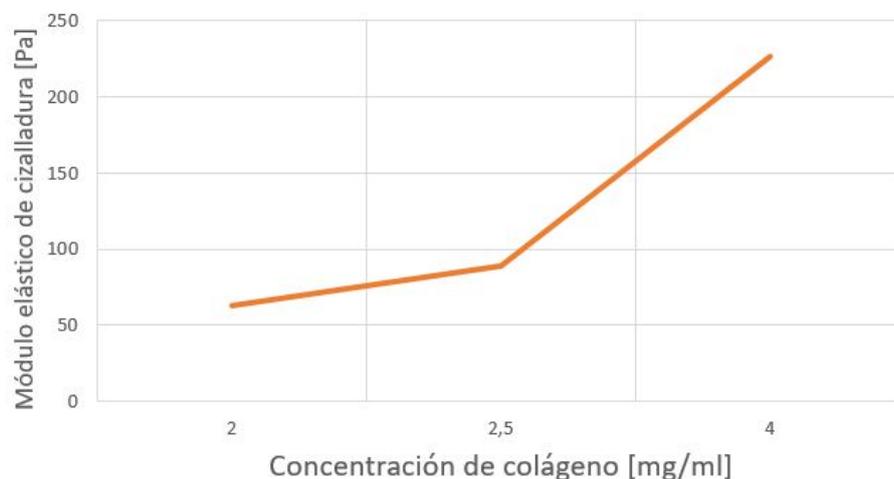


Figura 3.8: Módulo elástico de cizalladura medio para las tres concentraciones de colágeno (2.0 mg/ml, 2.5 mg/ml y 4.0 mg/ml).

Capítulo 4

Conclusiones

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles de colágeno dependen de muchos factores, como por ejemplo, la composición de colágeno del hidrogel y la preparación del hidrogel. En este trabajo nos hemos centrado en entender y determinar el papel mecánico de la concentración de fibras de colágeno y su distribución en la rigidez del hidrogel.

Los resultados mostrados corroboran que las propiedades mecánicas de los hidrogeles de colágeno varían conforme aumenta la concentración de colágeno. Esto permite crear hidrogeles de colágeno con propiedades mecánicas similares a las deseadas.

Este hecho es muy útil para una gran cantidad de aplicaciones. En concreto los hidrogeles de colágeno son utilizados ampliamente en el entorno celular, ya que se sabe que las células se comportan de manera diferente en función de su microambiente mecánico, y los hidrogeles de colágeno ofrecen la posibilidad de seleccionar las propiedades mecánicas deseadas y observar su efecto en la respuesta celular.

Por otro lado, los resultados muestran que una producción elevada de colágeno puede causar una rigidez excesiva en los tejidos que puede alterar el comportamiento celular habitual.

En este trabajo por primera vez se ha realizado un modelo que incorpora la distribución real de fibras por lo que será posible hacer modelos *in silico* más reales, además de conocer las propiedades de cada matriz de fibras de colágeno. Por otro lado, hemos visto que con estos modelos más realistas el módulo elástico de cizalladura varía en cada ensayo realizado sobre las concentraciones de colágeno. Se observa como para la misma concentración de fibras de colágeno se obtienen propiedades mecánicas distintas dada la distribución no homogénea de fibras.

4.1. Líneas futuras

Tras la realización del presente proyecto, los resultados sobre las propiedades mecánicas de las fibras de colágeno pueden ser utilizadas para definir ambientes celulares específicos, y da lugar a posibles líneas futuras para proyectos de investigación como los siguientes:

- Diseño y mejora de las propiedades de las fibras de colágeno individuales.
- Un estudio más detallado de la matriz acuosa en la cual se embeben las fibras, analizando como se alteran los resultados al variar distintos parámetros de esta.

Capítulo 5

Bibliografía

- [1] N.Movilla, Borau C., Valero C, and García-Aznar J.M. Degradation of extracellular matrix regulates osteoblast migration: A microfluidic-based study. *Bone*, 2018.
- [2] Min-Cheol Kim, Yaron R. Silberberg, Rohan Abeyaratne, Roger D. Kamm, and H. Harry Asada. Computational modeling of three-dimensional ecm-rigidity sensing to guide directed cell migration. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*, 2018.
- [3] Harald C Ott, Thomas S Matthiesen, Saik-Kia Goh, Lauren D Black, Stefan M Kren, Theoden I Netoff, and Doris A Taylor. Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart. *Nature medicine*, 2008.
- [4] Simo Saarakkala. Biomechanics and modeling of skeletal soft tissues. *Theoretical biomechanics*, 2011.
- [5] Clara Valero, Hippolyte Amaveda, Mario Mora, and Jose Manuel García-Aznar. Combined experimental and computational characterization of crosslinked collagen-based hydrogels. *PloS one*, 2018.
- [6] Cameron Walker, Elijah Mojares, and Armando del Río Hernández. Role of extracellular matrix in development and cancer progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018.
- [7] Anna Gilpin and Yong Yang. Decellularization strategies for regenerative medicine: From processing techniques to applications. *BioMed research international*, 2017.
- [8] Francisco Merino-Casallo, Maria J. Gomez-Benito, Yago Juste-Lanas, Ruben Martinez-Cantin, and Jose M. Garcia-Aznar. Integration of in vitro and in silico

- models using bayesian optimization with an application to stochastic modeling of mesenchymal 3d cell migration. *Front Physiol*, 2018.
- [9] Byoungkoo Lee, Xin Zhou, Kristin Ricking, Kevin W. Eliceiri, Patricia J. Keely, Scott A. Guelcher, Alissa M. Weaver, and Yi Jiang. A three-dimensional computational model of collagen network mechanics. *PloS one*, 2014.
- [10] Vanesa Olivares Velencoso. Reconstrucción 3d y caracterización de geles de colágeno a partir de imágenes de microscopía confocal. Trabajo fin de máster, Universidad de Zaragoza, 2017.
- [11] Benjamin E. Sherlock, Jenna N. Harvestine, Debika Mitra, Anne Haudenschild, Jerry Hu, Kyriacos A. Athanasiou, J. Kent Leach, and Laura Marcu. Nondestructive assessment of collagen hydrogel cross-linking using time-resolved autofluorescence imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 2018.

Anexos

Anexos A

Programación OCTAVE

En este Anexo se muestra cada una de las partes del programa informático utilizado para la caracterización de las fibras. Se divide en las siguientes partes: nodos, elementos, grupos de elementos (diferenciando entre los dos grupos de elementos explicados anteriormente) y sección para cada grupo de elementos.

A.1. Nodos

```
1 n=size(data.Xa,1);
2 p=1;
3 m=1;
4 X=0.31;
5 Y=0.31;
6 Z=0.5;
7 %Lectura de los datos hacia un archivo de entrada de ABAQUS.
8 file = fopen('NODOS.inp','wt');
9 fprintf(file,'*Node, □Nset=ntodos\n');
10 for f=1:n
11     fprintf(file,'%d,%f,%f,%f\n',f,(data.Xa((f),1))*X,
12             ↪(data.Xa((f),2))*Y,(data.Xa((f),3))*Z);
13 end
14 fclose(file);
```

A.2. Elementos

```
1 n=size(data.Fa,2);
2 cont=1;
3 %Lectura de los datos hacia un archivo de entrada de ABAQUS.
4 file = fopen('ELEMENTOS.inp','wt');
5 fprintf(file,'*Element, □type=B31, □elset=etodos\n');
6 for f=1:n
7     for q = 1:size(data.Fa(f).v,2)
8         if q ~= size(data.Fa(f).v,2)
9             l=q+1;
10            fprintf(file,'%d,%d,%d\n',cont,data.Fa(f).v(1,q),
11                    ↪data.Fa(f).v(1,l));
```

```
11         cont=cont+1;
12     else
13         break
14     end
15 end
16 end
17 fclose(file);
```

A.3. Grupo de elementos

Aquí se diferencian dos grupos diferentes de elementos, aquellos en los cuales la dirección del eje n_2 no coincide con el eje Z (sección A.3) y los que sí (sección A.3.2).

A.3.1. Grupo de elementos

```
1 n=size(data.Fa,2);
2 p=1;
3 t=1;
4 cont = 0;
5 %Lectura de los datos hacia un archivo de entrada de ABAQUS.
6 file = fopen('Elset.inp','wt');
7 for f=1:n
8     p=1;
9     if(cont ~= 0)
10        fprintf(file,'\n');
11        cont=0;
12    end
13    if p ~= size(data.Fa(f).v,2)
14        q = size(data.Fa(f).v,2)-1;
15        for c=1:q
16            e=p+1;
17            if(p ~= q)
18                if ((data.Xa(data.Fa(f).v(1,p),1) ==
19                    ⇨data.Xa(data.Fa(f).v(1,e),1)) &&
20                    ⇨(data.Xa(data.Fa(f).v(1,p),2) ==
21                    ⇨data.Xa(data.Fa(f).v(1,e),2)))
19                    p=p+1;
20                    t=t+1;
21            else
22                cont=cont+1;
23                if(cont==1)
24                    fprintf(file,'*Elset,elset=E%d\n',f);
25                end
26                if(cont > 16)
27                    fprintf(file,'\n');
28                    cont=1;
29                end
30                fprintf(file,'%d,□',t);
31                p=p+1;
32                t=t+1;
```

```
33     end
34     else if (p == q)
35         if ((data.Xa(data.Fa(f).v(1,p),1) ==
36             ⇨data.Xa(data.Fa(f).v(1,e),1)) &&
37             ⇨(data.Xa(data.Fa(f).v(1,p),2) ==
38                 ⇨data.Xa(data.Fa(f).v(1,e),2)))
39             t=t+1;
40         else
41             cont=cont+1;
42             if(cont==1)
43                 fprintf(file,'*Elset,elset=E%d\n',f);
44             end
45             if(cont > 16)
46                 fprintf(file,'\n');
47             end
48             fprintf(file,'%d,□',t);
49             t=t+1;
50         end
51     break;
52 end
53 end
54 fclose(file);
```

A.3.2. Grupo de elementos Z

```
1 n=size(data.Fa,2);
2 p=1;
3 t=1;
4 %Lectura de los datos hacia un archivo de entrada de ABAQUS.
5 file = fopen('Elset-Z.inp','wt');
6 cont=0;
7 for f=1:n
8     p=1;
9     if(cont ~= 0)
10        fprintf(file,'\n');
11        cont=0;
12    end
13    if p ~= size(data.Fa(f).v,2)
14        q = size(data.Fa(f).v,2)-1;
15        for c=1:q
16            e=p+1;
17            if ((data.Xa(data.Fa(f).v(1,p),1) ==
18                ⇨data.Xa(data.Fa(f).v(1,e),1)) &&
19                ⇨(data.Xa(data.Fa(f).v(1,p),2) ==
20                    ⇨data.Xa(data.Fa(f).v(1,e),2)))
21                if(cont==0)
22                    fprintf(file,'*Elset,elset=E%d-Z\n',f);
23                end
24                cont=cont+1;
```

```
22     if(cont > 16)
23         fprintf(file, '\n');
24         cont=1;
25     end
26     fprintf(file, '%d,□', t);
27     p=p+1;
28     t=t+1;
29     else if (p ~= q)
30         p=p+1;
31         t=t+1;
32     else if (p == q)
33         t=t+1;
34         break;
35     end
36 end
37 end
38 end
39 end
40 end
41 fclose(file);
```

A.4. Sección de los elementos

Aquí igual que antes, se diferencia entre la sección de los elementos en los cuales a dirección del eje n_2 no coincide con el eje Z (sección A.4.1) y aquellos que sí (sección A.4.2).

A.4.1. Sección

```
1 n=size(data.Fa,2);
2 p=1;
3 t=1;
4 cont = 0;
5 %Lectura de los datos hacia un archivo de entrada de ABAQUS.
6 file = fopen('BeamSection.inp','wt');
7 for f=1:n
8     p=1;
9     if(cont ~= 0)
10        fprintf(file, '\n');
11        cont=0;
12    end
13    if p ~= size(data.Fa(f).v,2)
14        q = size(data.Fa(f).v,2)-1;
15        for c=1:q
16            e=p+1;
17            if(p ~= q)
18                if ((data.Xa(data.Fa(f).v(1,p),1) ==
19                    ⇨data.Xa(data.Fa(f).v(1,e),1)) &&
20                    ⇨(data.Xa(data.Fa(f).v(1,p),2) ==
21                    ⇨data.Xa(data.Fa(f).v(1,e),2)))
```

```

19         p=p+1;
20         t=t+1;
21     else
22         cont=cont+1;
23         if(cont==1)
24             fprintf(file, '*Beam□Section, elset=E%d, material=
                ↪Colageno, section=CIRC\n %d', f,
                ↪data.M.rad_fibras(f)*0.031);
25         end
26     end
27     else if (p == q)
28         if ((data.Xa(data.Fa(f).v(1,p),1) ==
                ↪data.Xa(data.Fa(f).v(1,e),1)) &&
                ↪(data.Xa(data.Fa(f).v(1,p),2) ==
                ↪data.Xa(data.Fa(f).v(1,e),2)))
29             t=t+1;
30         else
31             cont=cont+1;
32             if(cont==1)
33                 fprintf(file, '*Beam□Section, elset=E%d, material=
                        ↪Colageno, section=CIRC\n %d', f,
                        ↪data.M.rad_fibras(f)*0.031);
34             end
35         end
36     break;
37     end
38 end
39 end
40 end
41 end
42 fclose(file);

```

A.4.2. Sección Z

```

1  n=size(data.Fa,2);
2  p=1;
3  t=1;
4  cont=0;
5  %Lectura de los datos hacia un archivo de entrada de ABAQUS.
6  file = fopen('BeamSection-Z.inp','wt');
7  for f=1:n
8      p=1;
9      if(cont ~= 0)
10         fprintf(file, '\n');
11         cont=0;
12     end
13     if p ~= size(data.Fa(f).v,2)
14         q = size(data.Fa(f).v,2)-1;
15         for c=1:q
16             e=p+1;
17             if ((data.Xa(data.Fa(f).v(1,p),1) ==
                ↪data.Xa(data.Fa(f).v(1,e),1)) &&

```

```
        ↪(data.Xa(data.Fa(f).v(1,p),2) ==
        ↪data.Xa(data.Fa(f).v(1,e),2)))
18     if(cont==0)
19         fprintf(file,'*Beam□Section,elset=E%d-Z,material=
        ↪Colageno,section=CIRC\n %d \n 0.,1.,1.',f,
        ↪data.M.rad_fibras(f)*0.031);
20     end
21     cont=cont+1;
22     if(cont > 16)
23         fprintf(file,'\n');
24     end
25     p=p+1;
26     t=t+1;
27     else if (p ~= q)
28     p=p+1;
29     t=t+1;
30     else if (p == q)
31     t=t+1;
32     break;
33     end
34     end
35     end
36     end
37     end
38     end
39     fclose(file);
```

A.5. Coordenadas más alejadas del conjunto de fibras

A.5.1. coordenada X máxima

```
1  n=size(data.Xa)(1);
2  p=1;
3  m=1;
4  X=0.31;
5  Y=0.31;
6  Z=0.5;
7  Vector_X = [];
8  Vector_Y = [];
9  Vector_Z = [];
10 %Lectura de los datos hacia un archivo de entrada de ABAQUS.
11 file = fopen('NsetXMAX.inp','wt');
12 for f=1:n
13     Vector_X(end+1)=data.Xa(f,1)*X;
14     Vector_Y(end+1)=data.Xa(f,2)*Y;
15     Vector_Z(end+1)=data.Xa(f,3)*Z;
16 end
17 fprintf(file,'*NSET,NSET=XMAX\n')
18 cont=0;
```

```
19  cont1=0;
20  for q=1:size(data.Xa)(1)
21      ++cont;
22      if((data.Xa(q,1)*X)==max(Vector_X))
23          fprintf(file,'%d,',cont)
24          ++cont1;
25          if(cont1>16)
26              fprintf(file,'\n')
27              cont1=1;
28          end
29      end
30  end
31  fclose(file)
```

A.5.2. coordenada Y máxima

```
1  n=size(data.Xa)(1);
2  p=1;
3  m=1;
4  X=0.31;
5  Y=0.31;
6  Z=0.5;
7  Vector_X = [];
8  Vector_Y = [];
9  Vector_Z = [];
10 %Lectura de los datos hacia un archivo de entrada de ABAQUS.
11 file = fopen('NsetYMAX.inp','wt');
12 for f=1:n
13     Vector_X(end+1)=data.Xa(f,1)*X;
14     Vector_Y(end+1)=data.Xa(f,2)*Y;
15     Vector_Z(end+1)=data.Xa(f,3)*Z;
16 end
17 fprintf(file,'*NSET,NSET=YMAX\n')
18 cont=0;
19 cont1=0;
20 for q=1:size(data.Xa)(1)
21     ++cont;
22     if((data.Xa(q,2)*Y)==max(Vector_Y))
23         ++cont1;
24         if(cont1>16)
25             fprintf(file,'\n')
26             cont1=1;
27         end
28         fprintf(file,'%d,',cont)
29     end
30 end
31 fclose(file)
```

A.5.3. coordenada Z máxima

```
1  n=size(data.Xa)(1);
2  p=1;
```

```
3 m=1;
4 X=0.31;
5 Y=0.31;
6 Z=0.5;
7 Vector_X = [];
8 Vector_Y = [];
9 Vector_Z = [];
10 %Lectura de los datos hacia un archivo de entrada de ABAQUS.
11 file = fopen('NsetZMAX.inp','wt');
12 for f=1:n
13     Vector_X(end+1)=data.Xa(f,1)*X;
14     Vector_Y(end+1)=data.Xa(f,2)*Y;
15     Vector_Z(end+1)=data.Xa(f,3)*Z;
16 end
17 fprintf(file,'*NSET,NSET=ZMAX\n')
18 cont=0;
19 cont1=0;
20 for q=1:size(data.Xa)(1)
21     ++cont;
22     if((data.Xa(q,3)*Z)==max(Vector_Z))
23         ++cont1;
24         if(cont1>16)
25             fprintf(file,'\n')
26             cont1=1;
27         end
28         fprintf(file,'%d,',cont)
29     end
30 end
31 fclose(file)
```

A.5.4. coordenada X mínima

```
1 n=size(data.Xa)(1);
2 p=1;
3 m=1;
4 X=0.31;
5 Y=0.31;
6 Z=0.5;
7 Vector_X = [];
8 Vector_Y = [];
9 Vector_Z = [];
10 %Lectura de los datos hacia un archivo de entrada de ABAQUS.
11 file = fopen('NsetXMIN.inp','wt');
12 for f=1:n
13     Vector_X(end+1)=data.Xa(f,1)*X;
14     Vector_Y(end+1)=data.Xa(f,2)*Y;
15     Vector_Z(end+1)=data.Xa(f,3)*Z;
16 end
17 fprintf(file,'*NSET,NSET=XMIN\n')
18 cont=0;
19 cont1=0;
20 for q=1:size(data.Xa)(1)
```

```
21     ++cont;
22     if((data.Xa(q,1)*Y)==min(Vector_X))
23         fprintf(file, '%d, ', cont)
24         ++cont1;
25         if(cont1>16)
26             fprintf(file, '\n')
27             cont1=1;
28         end
29     end
30 end
31 fclose(file)
```

A.5.5. coordenada Y mínima

```
1 X=0.31;
2 Y=0.31;
3 Z=0.5;
4 Vector_X = [];
5 Vector_Y = [];
6 Vector_Z = [];
7 %Lectura de los datos hacia un archivo de entrada de ABAQUS.
8 file = fopen('NsetYMIN.inp', 'wt');
9 for f=1:n
10     Vector_X(end+1)=data.Xa(f,1)*X;
11     Vector_Y(end+1)=data.Xa(f,2)*Y;
12     Vector_Z(end+1)=data.Xa(f,3)*Z;
13 end
14 fprintf(file, '*NSET, NSET=YMIN\n')
15 cont=0;
16 cont1=0;
17 for q=1:size(data.Xa)(1)
18     ++cont;
19     if((data.Xa(q,2)*Y)==min(Vector_Y))
20         ++cont1;
21         if(cont1>16)
22             fprintf(file, '\n')
23             cont1=1;
24         end
25         fprintf(file, '%d, ', cont)
26     end
27 end
28 fclose(file)
```

A.5.6. coordenada Z mínima

```
1 n=size(data.Xa)(1);
2 p=1;
3 m=1;
4 X=0.31;
5 Y=0.31;
6 Z=0.5;
7 Vector_X = [];
```

```
8 Vector_Y = [];  
9 Vector_Z = [];  
10 %Lectura de los datos hacia un archivo de entrada de ABAQUS.  
11 file = fopen('NsetZMIN.inp','wt');  
12 for f=1:n  
13     Vector_X(end+1)=data.Xa(f,1)*X;  
14     Vector_Y(end+1)=data.Xa(f,2)*Y;  
15     Vector_Z(end+1)=data.Xa(f,3)*Z;  
16 end  
17 fprintf(file,'*NSET,NSET=ZMIN\n')  
18 cont=0;  
19 cont1=0;  
20 for q=1:size(data.Xa)(1)  
21     ++cont;  
22     if((data.Xa(q,3)*Z)==min(Vector_Z))  
23         ++cont1;  
24         if(cont1>16)  
25             fprintf(file,'\n')  
26             cont1=1;  
27         end  
28         fprintf(file,'%d,',cont)  
29     end  
30 end  
31 fclose(file)
```