



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

MODELOS FÍSICOS DE MIGRACIÓN EN CÉLULAS CON MORFOLOGÍA NO
POLARIZADAS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS, MENCIÓN FÍSICA

SUSANA BELÉN MÁRQUEZ ROSALES

PROFESOR GUÍA:
RODRIGO SOTO BERTRAN

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
ANDRÉS CONCHA SALDIAS
MARÍA LUISA CORDERO GARAYAR
EUGENIO HAMM HAHN

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por CONICYT e Iniciativa Científica Milenio.

SANTIAGO DE CHILE
2018

RESUMEN DE LA TESIS PARA OPTAR AL TITULO
DE MAGÍSTER EN CIENCIAS, MENCIÓN FÍSICA
POR: SUSANA BELÉN MÁRQUEZ ROSALES
FECHA: 17 de agosto de 2018
PROFESOR GUÍA: RODRIGO SOTO

En esta tesis se estudian migraciones celulares en dos sistemas diferentes cuyos agentes comparten la característica de estar no polarizados. Se proponen modelos físicos que en combinación con datos experimentales y simulaciones numéricas buscan reproducir los fenómenos observados con el fin de entenderlos con mayor profundidad y plantear nuevas preguntas de estudio.

En la primera parte, el sistema considerado es un pez anual en su etapa de epibolía donde se estudia la migración de las *Deep Cell Layer* (DCL) hacia los bordes de las *Enveloping Cell Layer* (EVL), guiadas por diferencias de dureza. Pese a que al llegar a los bordes las DCL están polarizadas, se desconoce la manera en que a larga distancia las células podrían sentir diferencias mecánicas. Para entender estas observaciones, se plantean tres modelos diferentes que permiten evaluar si los efectos de elasticidad de la EVL y sus bordes (representados por una franja más dura) son percibidos por un agente (DCL) que se encuentre encima generando fuerzas y protrusiones. El primero de ellos considera que las protrusiones generadas por las células se recogen arrugando el sustrato sin deslizar. Los resultados obtenidos demuestran que cuando el sustrato es homogéneo, la célula se comporta como un caminante aleatorio, mientras que en presencia de la franja más dura, el agente se aleja de la misma. El segundo estudio, se hace considerando que las protrusiones al contraerse deslizan y arrugan el sustrato. En este caso en una dimensión, se concluye que el centro de masa de la célula no se desplaza durante la contracción ni para sustratos homogéneos ni bajo la presencia de una franja más dura, lo que permite especular que en dos dimensiones los resultados tampoco mostrarán migración direccionada. Finalmente, se estudia un sustrato sometido a tensiones activas, y, por consiguiente, que considera al tensor de deformaciones no lineal. Para el caso particular de deformaciones lineales se observa un cambio en los coeficientes de difusión cuando el sustrato se contrae lo suficiente. Estos resultados, que permiten hipotetizar acerca del rol de las tensiones internas de los sustratos, que se pueden considerar como un cambio de dureza efectivo [Cerdeira and Mahadevan, 2003], y podría ser más relevante que sus diferencias de dureza, al menos a largas distancias.

Por otro lado, se estudia el fenómeno de migración celular colectiva de las *Lateral Organ Progenitors* (LOP) durante la epibolía de los peces cebra. En el proceso, estas células se desplazan asociadas a las *Enveloping Cell Layer* (EVL) desde un polo del huevo al otro. El enlace directo LOP-EVL está presente solo en algunas células y gradualmente se pierde en el proceso. A pesar de eso, y a que las LOPs no se polarizan en ningún momento, logran descender colectivamente y además formar un racimo. Se desarrolla un modelo físico para entender el rol que tiene la adhesión e interacción a larga distancia entre las LOPs. Para simular las protrusiones, se considera que las células se moverán como caminantes aleatorios, y el enlace con las EVL se modela como un resorte. Las dimensiones, condiciones iniciales, coeficientes de difusión, entre otros, se extraen de las observaciones experimentales, mientras que los coeficientes de los potenciales de interacción LOP-LOP se ajustan de modo que las simulaciones reproduzcan las observaciones experimentales de mejor manera. Los resultados obtenidos demuestran que existe un conjunto de parámetros que permiten reproducir tanto la migración colectiva como la formación del racimo, sugiriendo que las protrusiones no direccionadas tienen un rol importante en las migraciones colectivas.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Profe Rodrigo Soto B. por abrirme la puerta al mundo que intersecta la Física y la Biología. Por su apoyo y paciencia, tolerando incluso los peores errores, tanto en el trabajo de investigación de pregrado como en el desarrollo de esta tesis. Además, por impulsar mi inserción en el mundo de la biofísica por medio de escuelas y conferencias.

En el otro primer, lugar agradezco a mi papá, a mi mamá y a mi Chabueta. Gracias por sus anécdotas e historias, su constante preocupación, su cariño en el día a día y por despertar la curiosidad en mi, motivándome a la ciencia. Además debo agradecer al Tote y a la Gabi por su compañía, por los chistes, las rabias, tantas conversaciones y debates de la cotidianidad de la Universidad, la política, la religión, el país, el deporte, el clima, la música y los recuerdos. Agradezco al resto de mi familia, en particular, al apoyo a larga distancia de mis abuelos. Finalmente agradezco a la Cassie y a la Anti por todo su amor.

Muchas gracias a mis amigos! Al Nico y a la Pau, por siempre estar. A Lerko y Ariel por su compañía en pregrado. Al trío dinámico de la licenciatura, Pipe, Basti y Chelo por su ayuda. Y a todos los que le lleguen mis agradecimientos de alguna manera.

A la gente de Medicina por su biología y hermosos videos. En particular al Profe Miguel, Eduardo y Germán. A los y las demás del grupo de Materia Activa por sus importantes recomendaciones, pregunta y ayudas varias c:

A la Escuela de Verano tras tantos años de enseñanzas y de empleo. Gracias a la piscina y sus funcionarios/as por los buenos inicios de la jornada. Y a todos los demás habitantes de Beauchef que han hecho mi paso por la Facultad bastante bueno.

Finalmente, gracias Rodrigo por ayudarme a ser mejor persona, por tu paciencia, apoyo y compañía.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Materia Activa	1
1.2. Células y Migraciones Celulares	1
1.2.1. Células	2
1.2.2. Migración celular	2
1.2.3. Durotaxis	3
1.3. Modelo de embrión de pez anual, <i>Austrolebias</i> sp	6
1.4. Otro tipo de migración celular no polarizada	9
1.5. Elasticidad	12
1.5.1. Notación de Einstein	12
1.5.2. Vector y tensor de deformaciones	12
1.5.3. Fuerza y tensor de tensiones	13
1.6. Objetivos y organización de la tesis	14
2. Estudio de la deformación de un sustrato sometido a una fuerza puntual	15
2.1. Introducción	15
2.2. Función de Green	16
2.2.1. Función de Green: Caso homogéneo	16
2.2.2. Función de Green: Caso no homogéneos	17
2.3. Respuesta del sustrato	21
2.3.1. Respuesta para fuerzas aplicadas en el mismo punto	21
2.3.2. Respuesta para fuerzas aplicadas sobre otro punto	22
2.4. Resumen	25
3. Modelo: Célula de cuatro puntos de contactos	26
3.1. Ecuaciones y dinámica	26
3.1.1. Dinámica	27
3.2. Valores de la célula y constantes	29
3.2.1. Dimensiones de la célula	29
3.2.2. Valores de constantes	30
3.3. Célula que recoge protrusiones sin deslizar	30
3.3.1. Sustrato homogéneo	31
3.3.2. Sustrato no homogéneo	34
3.4. Célula que recoge protrusiones deslizando	37
3.4.1. Modificaciones al modelo	37
3.4.2. Dinámica de contracción para sustratos homogéneos	38

3.4.3.	Dinámica de contracción para sustratos no homogéneos	39
3.5.	Sustratos no homogéneos con espesor variable	40
4.	Modelo con elasticidad no lineal	42
4.1.	Introducción	42
4.2.	Estudio de las deformaciones de sustratos tensionados	43
4.2.1.	Sustratos no sometidos a fuerzas externas	43
4.2.2.	Sustratos sometidos a fuerzas puntuales	43
4.3.	Sustratos bajo deformaciones lineales	44
4.3.1.	Difusión	46
5.	Otro tipo de migración celular no polarizada	49
5.1.	Modelo	50
5.1.1.	Geometría	50
5.1.2.	Movimiento Aleatorio	50
5.1.3.	Enlace con células de capa superior	50
5.1.4.	División celular	51
5.1.5.	Interacción LOP-LOP	52
5.1.6.	Resumen	53
5.2.	Valores de la célula	54
5.3.	Indices de Calidad	55
5.3.1.	Migración de LOPs (Q_1)	55
5.3.2.	Formación del racimo (Q_2)	55
5.3.3.	Flexibilidad del racimo (Q_3)	56
5.3.4.	Conectividad entre células con y sin enlace (Q_4)	56
5.4.	Resultados del modelo	56
5.4.1.	Suficiencia de parámetros considerados	57
5.5.	Estudio de interacción entre vecinos	58
6.	Conclusiones y futuros trabajos	61
6.1.	Trabajos futuros	63
6.1.1.	Protrusiones con deslizamiento	63
6.1.2.	Sugerencias para modelo con tensor de deformaciones lineal	63
6.1.3.	Sugerencias para modelo con tensor de deformaciones no lineal	65
6.2.	Sugerencias Experimentales	66
Bibliografía		67

Índice de figuras

1.1.	Esquema de célula animal en suspensión (motivo por el que se ve redonda). En naranja la membrana celular que puede contener diferentes tipos de proteínas. En rojo se muestra la corteza de actina adyacente a la membrana. En el interior de la célula, en el citoplasma, se encuentran los organelos (aparato de Golgi, retículos endoplasmáticos, vacuolas, mitocondrias entre otros), y el núcleo celular marcado con bordes azules, que contiene el material genético. Finalmente, con líneas plomas, se representan las otras componentes del citoesqueleto [Schwarz and Safran, 2013].	2
1.2.	Modelo de migración celular. En rojo, se muestra la corteza de actina; en naranja, la membrana plasmática y en azul, el núcleo celular. En amarillo el sustrato. (a) Polarización de la célula. Las flechas señalan el flujo de actina no polarizada hacia uno de los extremos. (b) Protrusión de la célula. En verde, se muestran los sitios de adhesión y la flecha verde señala la dirección hacia la que la protrusión se extiende. (c) Contracción celular en la dirección de la protrusión [Alberts, 2017].	3
1.3.	Movimiento de células 3T3 sobre sustratos con un gradiente de rigidez. ‘Las imágenes se registraron con iluminación simultánea de fase y fluorescencia. Los cambios en la rigidez del sustrato se pueden visualizar como cambios en la densidad de las partículas fluorescentes incrustadas. (a) La célula se movió desde el lado blando del sustrato a través del gradiente. La célula giró 90° y se movió hacia el lado rígido del sustrato. Cabe mencionar que el área de propagación aumenta cuando la célula pasa el límite. (b) Una célula se movió desde el lado rígido del sustrato a través del gradiente. La célula cambió su dirección al ingresar al gradiente y moverse a lo largo del límite.’ [Lo et al., 2000]	4
1.4.	Fuerzas de tracción medidas de células 3T3 adosadas en sustratos de poliacrilamida rígidos(a) o blandos(b). Las fuerzas de tracción estadísticamente significativas dentro del límite de las células se muestran como vectores. (a) Módulo de Young, $3 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$; área de la célula, $1005 \mu\text{m}^2$; Esfuerzo de tracción RMS, $8.7 \times 10^{-2} \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$. (b) Módulo de Young, $1.4 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$, área de células, $833 \mu\text{m}^2$; Esfuerzo de tracción RMS, $5.6 \times 10^{-2} \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$ [Lo et al., 2000].	5
1.5.	Cambios en el comportamiento migratorio de la célula. Microscopía confocal, proyección en el eje z de un embrión. En rojo, se observa la trayectoria de una célula que inicialmente muestra el comportamiento de un caminante aleatorio (previo a la cruz) y repentinamente se dirige a una zona que sería más dura (posterior a la cruz) representada con líneas azules en la parte inferior [Reig et al., 2017].	6
1.6.	Al lado izquierdo, una foto de un pez <i>Austrolebias</i> sp. Al lado derecho, la visualización de su huevo en el microscopio, completamente transparente.	6

- 1.7. Esquema de estadios principales de desarrollo del pez anual. (a) En la parte superior un pronucleo y la esfera inferior corresponde a la yema (División mitóticas entre 0-24 horas post fertilización (hpf)). (b) Blástula temprana (24-36 hpf). (c) Blástula tardía. Inicio de migración celular. Las células pentagonales corresponden a las *Enveloping Cell Layer* (EVL) y las más pequeñas, a las *Deep Cell Layer* (DCL) (36-48 hpf). (d) Epibolía. Las EVL terminan de cubrir la yema. (48-96 hpf) (e) Dispersión (96-120 hpf) y posterior reagrupación de células (desde el día 7 en adelante). [Arezo et al., 2005, Reig, 2017]. 7
- 1.8. Al lado izquierdo se observa un huevo al término de la epibolía. Las células más pequeñas corresponden a las DCL, y se observa a simple vista que la mayoría de ellas se encuentran ubicadas en algún borde de alguna EVL (líneas rectas) [Reig, 2017]. La barra de escala corresponde a 250 μ m. Al lado derecho ‘la distribución de probabilidad de las posiciones de las células DCL en función de la distancia a los bordes de las EVL en un periodo entre el 30 y 60 % de epibolía (54 - 72 h.p.f.). La línea negra corresponde a la distribución aleatoria esperada para células EVL promedio con radio superficial de 120 μ m, como se indica en la parte superior derecha de la imagen [Reig et al., 2017]. 7
- 1.9. Cambio en la superficie de contacto DCL-EVL y el comportamiento migratorio de las DCLs hacia las EVL. (a) Microscopía confocal donde se observa la zona de contacto adhesivo entre la DCL y la EVL que se encuentra sobre ella, mientras que la yema esta bajo la DCL. (b) En rojo y verde, se observan DCL ubicadas en y fuera del borde respectivamente para un 60 % de epibolía. De izquierda a derecha proyección en z (microscopía confocal), secciones ópticas ortogonales (las líneas discontinuas corresponden a los centros) y proyecciones volumétricas 3D de la superficie de contacto DCL-EVL. (c) A la derecha, cuantificación del contacto superficial DCL-EVL. A la izquierda, proyecciones volumétricas en 3D del contacto superficial para algunas distancias al borde de la EVL. (d) A la izquierda y al centro, proyección en z (microscopía confocal) donde se ve al centro (verde) una EVL manipulada. RhoA limita la expansión de la superficie de la célula EVL y la hace más pequeña que las células EVL vecinas, aumentando la tensión cortical. MYPT1 aumenta la expansión de la superficie de la célula EVL haciéndola más grande y más cóncava, en comparación con las células EVL vecinas, disminuyendo la tensión cortical. A la derecha, efectos de la manipulación, cuantificación de proporción de densidad de DCLs entre EVL manipuladas (verde) y las EVL que la rodean. En negro, los resultados para una célula no manipulada. [Reig et al., 2017]. 8
- 1.10. Al lado izquierdo, una foto de un pez cebra. Al lado derecho, un esquema del huevo durante la epibolía. Los círculos verdes y naranjos corresponden a las LOPs y a las células de los epitelios superiores respectivamente. Además se señala la dirección lateral y los polos animal y vegetal [Pulgar et al., 2018]. 9
- 1.11. Desarrollo del pez cebra. (a) Cigoto (0.2 horas post fertilización (hpf)). (b) Tras múltiples divisiones celulares, 256 células (2.5 hpf). (c) Desde la etapa alta a transición oblonga (inicio migraciones celulares)(3.7 hpf). (d) Domo. Las células migran descendiendo por la yema dando forma a un domo (4.3 hpf) (e) 50 % de Epibolía (descenso de células cubriendo la yema). (5.3 hpf) (f) 90 % de Epibolía (9 hpf). (g) y (h) Periodo de segmentación, formación de distintas partes del pez (10.5 hpf y 15.5 hpf aproximadamente) [Kimmel et al., 1995]. 9

1.12. En la figura se observa el fenómeno a comprender mediante un modelo físico. En verde están marcadas las LOPs y en rojo los núcleos de las EVLs que migran desde el polo animal (parte superior) hacia el polo vegetal (parte inferior). (a) y (b) son las condiciones inicial y final respectivamente. En (c) se observa el proceso en el tiempo. [Pulgar, 2017].	10
1.13. Migración de LOPs no polarizadas y enlazadas a las EVL. (a) La contabilización de las protrusiones indica que no hay direcciones privilegiadas como se observa en las células polarizadas. El índice de protrusiones es mayor en la dirección lateral que en la de movimiento (dirección vegetal). (b) Células manipuladas con <i>Rac1-T17N</i> no generan protrusiones pero sí migran hacia el polo vegetal (lado izquierdo). El estudio de la persistencia demuestra que no es distinta si se compara con células no manipuladas (lado derecho). (c) Esquema del enlace entre las EVLs (en verde) y las LOPs (rojo) durante el proceso, desde la formación del domo, cuando es solo un epitelio, hasta el 90 % de epibolía. En celeste se observa el anillo de actomiosina, encargado del descenso de las EVL. (d) Comparación entre efecto de ablación en las LOPs y el anillo responsable del desplazamiento de las EVLs. Se observa que tanto los movimientos son coordinados (lado izquierdo), como la velocidad que llevan (lado derecho). [Pulgar et al., 2018]	11
1.14. Inicialmente un grupo de células aisladas de un racimo de tamaño mayor. Posteriormente, la interacción mediante protrusiones (flechas negras) permite que el grupo aislado se reúna con el resto del racimo evitando un posible escape. Las trayectorias están dibujadas en rojo y el cuadrado punteado mide $52,7 \pm 14.7 \mu\text{m}$. [Pulgar et al., 2018]	11
2.1. Célula como círculo, de radio R , con cuatro puntos de contacto sobre un sustrato delgado de espesor $h \ll R$ y módulo de Young E	15
2.2. Izquierda: Forma del sustrato por el cual migran las DCL, donde se estima que en las zonas más claras el módulo de Young es mayor. Derecha: Sustrato considerado de espesor h . La franja tiene un módulo de Young mayor ($E_0 + E_1$) que el resto de la superficie (E_0).	17
2.3. Disco de superficie A_1 sobre el sustrato, en este caso en torno al punto \mathbf{r}_1 parte de la célula, donde se calculará la deformación producida por una fuerza puntual en el centro del disco, \mathbf{F}_1 . O es el origen del sistema, \mathbf{r} es el punto que recorrerá el disco y $\rho = \mathbf{r} - \mathbf{r}_1$	21
2.4. Para el caso de una célula ubicada en P los otros puntos a considerar serán V_1 , V_2 y V_3 , es decir, aquellos donde se aplicará las otras fuerzas.	22
2.5. Disco de superficie A_1 centrado en \mathbf{r}_1 correspondiente a uno de los vértices de la célula. La deformación la produce una fuerza \mathbf{F}_2 en el punto \mathbf{r}_2 . O es el origen del sistema, \mathbf{r} el punto que recorrerá el disco y $\rho = \mathbf{r} - \mathbf{r}_1$	23
2.6. En el diagrama se da cuenta de los términos que contribuyen a la deformación del sustrato. (I) Representa la función de Green aplicada en el mismo punto donde se produce la fuerza. (II) Corresponde a la función de Green en presencia de una muralla, la cual es convolucionada una vez. (III) Da cuenta de la función de Green entre dos puntos ubicados en \mathbf{r} y \mathbf{r}_f . (IV) Corresponde al término en presencia de una pared convolucionado una vez que da cuenta de la función de Green entre dos puntos. Este término se ignora ya que los cambios al considerarlo solo serían cuantitativos.	24

3.1.	Vista superior de la célula depositada en el sustrato y la numeración de sus vértices que se usarán para describir dinámica de la misma. Δ denota la distancia de separación entre los vértices contiguos.	26
3.2.	(I) Se levanta uno de los vértices permitiendo que el sustrato de la misma zona relaje. (II) La célula se desplaza para que la suma de las fuerzas sobre el sustrato vuelva a ser nula. (III) La protrusión elonga, se apoya nuevamente en el sustrato y se contrae. (IV) Debido a que en el paso anterior el sustrato queda tenso, la célula vuelve a relajar.	28
3.3.	Imágen de DCL observada mediante microscopía. En la figura se muestra su radio R_c y las protrusiones del orden de δ . [Reig, 2017]	29
3.4.	Sistema con dimensiones. E_0 y E_1 dan cuenta del módulo de Young del sustrato completo y la franja. R_c y R_1 dan cuenta de los radios de la célula y de la vecindad de cada vértice respectivamente y δ del tamaño de la protrusión realizada.	30
3.5.	En la figura se muestra la trayectoria seguida por la célula en los primeros 200 ciclos de la simulación. El punto en rojo señala la condición inicial. Los datos usados corresponden a los de la sección 3.2 con $E = E_0$	31
3.6.	Para los mismos datos de la figura 3.5, pero tomando los primeros 1000 ciclos. Izquierda: Distancia recorrida en x en micrones. Derecha: Distancia recorrida en y en micrones.	31
3.7.	Izquierda: Desplazamientos cuadráticos medios en x , valor de $D_{0x} = 0 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$. Derecha: Desplazamientos cuadráticos medios en y , valor de $D_{0y} = 0 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$. Los resultados permiten apreciar la existencia de un punto estable para los casos en que todas las protrusiones tienen el mismo largo.	32
3.8.	La figura muestra las trayectorias para 200 ciclos con $\delta_1 = 0$, para cuatro condiciones iniciales diferentes y orden de pasos aleatorios. Para todos los casos se observa que tras los primeros ciclos la célula se estanca en un punto estable que dependerá de la dirección de los primeros movimientos.	32
3.9.	Desplazamientos cuadráticos medios en función del número de ciclos para cuatro valores diferentes de δ_1 . Izquierda: En x , los valores de los coeficientes de difusión son: $D_{1x} = 0.006 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$; $D_{2x} = 0.024 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$; $D_{3x} = 0.053 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$; $D_{4x} = 0.095 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$. Derecha: En y , los valores de los coeficientes de difusión son: $D_{1y} = 0.006 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$; $D_{2y} = 0.025 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$; $D_{3y} = 0.054 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$; $D_{4y} = 0.096 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$	33
3.10.	Valor de los coeficientes de difusión ($\langle D \rangle = (D_x + D_y)/2$) para los distintos valores de δ_1 . El ajuste en verde corresponde a $D = 0,006\delta_1^2/\text{ciclo}$	33
3.11.	Desplazamientos cuadráticos medios en x , color verde, valor de coeficiente de difusión asociado $D_{4x} = 0.051 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$; y desplazamientos cuadráticos medios en y , color azul, valor de $D_{4y} = 0.095 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$. Se observa que para esta semilla en particular la diferencia entre los coeficientes de difusión es significativa, lo que hace necesario usar un gran número de ellas para alcanzar la convergencia entre D_x y D_y	34
3.12.	En la figura un esquema de la condición inicial del sistema. Al lado izquierdo, en \mathbf{r}_0 , a una distancia x_{inicial} de la franja con módulo de Young $E_0 + E_1$, se ubica la célula a estudiar. Las trayectorias espejo consideran la célula ubicada a la misma distancia de la franja pero al lado derecho.	35

3.13.	Desplazamientos en x para la condición inicial $\mathbf{r}_0 = -100\hat{x}$, para distintos valores de aE_1 . I: $aE_1 = 0 \text{ kPa } \mu\text{m}$, II: $aE_1 = 50 \text{ kPa } \mu\text{m}$, III: $aE_1 = 100 \text{ kPa } \mu\text{m}$, IV: $aE_1 = 200 \text{ kPa } \mu\text{m}$, V: $aE_1 = 300 \text{ kPa } \mu\text{m}$, VI: $aE_1 = 400 \text{ kPa } \mu\text{m}$, VII: $aE_1 = 500 \text{ kPa } \mu\text{m}$	35
3.14.	Desplazamientos en x para las diferentes condiciones iniciales $\mathbf{r}_0 = -50\hat{x}, -100\hat{x}, -200\hat{x}$ y $-400\hat{x}$, con $aE_1 = 0 \text{ kPa } \mu\text{m}, 100 \text{ kPa } \mu\text{m}, 500 \text{ kPa } \mu\text{m}$	35
3.15.	El efecto de la franja genera los mismos desplazamientos en x si la célula parte a su izquierda o derecha. I: Para condiciones iniciales $\mathbf{r}_0 = -50\hat{x}$ (arriba) y $\mathbf{r}_0 = 50\hat{x}$ (abajo), y valor de $100 \text{ kPa } \mu\text{m}$. II: Para condiciones iniciales $\mathbf{r}_0 = -100\hat{x}$ (arriba) y $\mathbf{r}_0 = 100\hat{x}$ (abajo), y valor de $500 \text{ kPa } \mu\text{m}$. III: Para condiciones iniciales $\mathbf{r}_0 = -200\hat{x}$ (arriba) y $\mathbf{r}_0 = 200\hat{x}$ (abajo), y valor de $500 \text{ kPa } \mu\text{m}$. IV: Para condiciones iniciales $\mathbf{r}_0 = -400\hat{x}$ (arriba) y $\mathbf{r}_0 = 400\hat{x}$ (abajo), y valor de $100 \text{ kPa } \mu\text{m}$	36
3.16.	Modelo de célula en una dimensión. Δ la distancia entre los vértices y \dot{L} velocidad de contracción del citoesqueleto.	38
3.17.	Derivada parcial de la función convolución evaluada para distintos valores de r_i , con las dimensiones de la sección 3.2.1. En negro se muestran los resultados para $aE_1 = 50 \text{ kPa } \mu\text{m}$; en verde $aE_1 = 100 \text{ kPa } \mu\text{m}$; en azul $aE_1 = 200 \text{ kPa } \mu\text{m}$; y en rojo, $aE_1 = 500 \text{ kPa } \mu\text{m}$	39
3.18.	Esquema de la situación analizada comparada con el escenario real. Al lado izquierdo se observa lo concluido, es decir, que la célula migra hacia zonas con sustratos más gruesos. Al lado derecho, un esquema de la situación real; la célula se ubica en los bordes correspondientes a las zonas con menor espesor.	40
4.1.	Esquema de deformaciones del sustrato. Izquierda: Estiramiento del sustrato en la dirección horizontal (en x) debido a fuerzas del citoesqueleto. En este caso $\gamma > 0$. Derecha: Compresión del sustrato en la dirección horizontal (en x) debido a fuerzas del citoesqueleto. En este caso $\gamma < 0$	44
4.2.	Izquierda: Pendientes de desplazamientos cuadráticos medios en x en función del número de ciclos para diferentes valores de γ . Derecha: Lo mismo que a la izquierda pero para el eje y . En este caso son todos los valores iguales.	47
4.3.	Valores de los coeficientes de difusión en el eje x e y para distintos valores de γ	47
5.1.	Imagen inicial y final del proceso. En verde las LOPs y en rojo las <i>Enveloping Cell Layer</i> (EVL) cuyo rol es fundamental en el fenómeno. Las LOPs migran colectivamente desde el polo animal al vegetal.	49
5.2.	LOPs (mostradas en verde) se mueven en la superficie del huevo, modelado perfectamente esférico.	50
5.3.	Representación de enlace en el modelo. Al lado derecho un esquema de las observaciones experimentales donde la LOP es traccionada pero no de forma rígida ya que puede deformarse. Al lado izquierdo representación del enlace en el modelo mediante un resorte unido a un punto móvil.	51
5.4.	Mediciones del número de células enlazadas en función de la fracción de epibolía transcurrida. [Pulgar et al., 2018]	51
5.5.	Proceso de división celular. Una vez seleccionada una LOP se reemplaza por dos células de la mitad del radio original que crecen hasta alcanzar un tamaño regular.	52

5.6.	Potencial de Lennard Jones con histéresis. En rojo se muestra la zona de volumen excluido donde las LOPs se repelen. En azul el régimen de atracción y en verde el de adhesión. Si dos células que interactuaban mediante atracción se acercan un radio menor que r_1 pasan a un régimen de adhesión. De igual modo, si dos células adheridas se alejan un radio superior a r_2 vuelven a un régimen de atracción. La distancia r_c corresponde a la distancia de corte de interacción de las LOPs.	53
5.7.	Sistema con todos los valores detallados. Las LOPs (radio R_{LOP}) se desplazan sobre una esfera radio R_h . La célula es traccionada por un resorte de constante k unido a un punto que se mueve con velocidad constante V_{EVL} . D_x y D_y son los coeficientes de difusión en x e y respectivamente. La condición inicial se toma de los experimentos.	55
5.8.	Para cada combinación de ε_1 y $\Delta\varepsilon$ se usaron 50 secuencias de números aleatorios diferentes con las que se calcularon los cuatro índices de calidad. El proceso se realizó para tres condiciones iniciales diferentes.	57
5.9.	Izquierda: Trayectorias experimentales. Derecha: Trayectorias de simulación. Ambas para la condición inicial C.I.1. Cada color representa la trayectoria de una célula diferente.	57
5.10.	Mapas de densidades de las condiciones finales donde se combinan las tres condiciones iniciales usadas. En cada caso se resta una o más de las componentes del modelo. Todas las simulaciones consideraron el movimiento de caminantes aleatorio (difusión). I: Condición final de los casos experimentales. II: LOPs que solo muestran caminata aleatoria. III LOPs que interactúan atrayéndose y adhiriéndose, pero sin enlaces con las EVLs. IV: LOPs que no interactúan entre ellas, pero sí existe enlace con EVL. V: LOPs que solo interactúan a larga distancia (atracción), además de estar presente los enlaces con las EVL. VI: LOPs que solo interactúan a corta distancia (adhesión), además de estar presente los enlaces con las EVL. VII: Modelo completo con interacción entre LOPs a corta y larga distancia, además del enlace con las EVL.	58
5.11.	Esquema de pérdidas de células según enlaces a EVL y distancia que las separa. En el tiempo inicial t_0 del cuadro I, la célula central está enlazada por lo que tiene menos libertad de movimiento provocando que la célula libre escape en un tiempo posterior t_f , debido a la baja interacción entre la célula libre y las enlazadas. Por otro lado, el cuadro II muestra una célula central libre y por consiguiente, con más libertad para acercarse a la célula libre más lejana e intensificar la fuerza de interacción entre ellas, lo que en un tiempo posterior t_f es suficiente para evitar el escape.	59
5.12.	Arriba: configuraciones usadas para verificar la hipótesis. En rojo células enlazadas. En gris la célula puente que puede estar enlazada o no. En verde la célula no enlazada a la que se estudia su escape. Abajo: fracción de casos en las que la célula no enlazada es arrastrada en función de la distancia inicial d (S.E. sin escape). En azul, casos con la célula gris enlazada a una EVL y en rojo, casos en que está libre.	60

6.1.	En la figura se muestra el ciclo para una célula que protruye relajando el extremo opuesto al cual se produjo la protrusión. (I) Se levanta uno de los vértices permitiendo al sustrato de la misma zona relaje. (II) La célula se desplaza para que la suma de las fuerzas sobre el sustrato vuelva a ser nula. (III) La protrusión elonga y se apoya nuevamente en el sustrato. (IV) Se levanta el vértice opuesto al de la protrusión. (V) Debido al segundo levantamiento, la célula se desplaza para que la suma de las fuerzas sobre el sustrato vuelva a ser nula. (VI) Se contrae la protrusión. (VII) Nuevamente la célula vuelve a relajar debido a que en el paso anterior el sustrato queda tenso. (VIII) El extremo opuesto vuelve a depositarse sobre el sustrato.	64
6.2.	En la figura se muestra un posible escenario que considera más franjas de dureza diferente y un número mayor de DCLs.	64
6.3.	En la figura se repite el esquema de la figura 2.6, pero esta vez se considera la convolución en presencia de la franja, que se generan debido a las fuerzas en otros puntos (sumando IV).	65

Capítulo 1

Introducción

1.1. Materia Activa

En Física, se entiende por materia activa aquellos sistemas formados por un gran número de elementos biológicos o artificiales capaces de convertir energía almacenada o energía libre del ambiente que los rodea, en movimiento [Marchetti et al., 2013, Takatori and Brady, 2015, Takatori et al., 2014]. La importancia del estudio de la materia activa radica en su vínculo con otras ramas de la Física como la Biofísica y la Nanotecnología, de modo que su mayor entendimiento impactará en el desarrollo de nuevas investigaciones.

La materia activa abarca una extensa gama de sistemas, desde bandadas de aves, cardúmenes de peces [Parrish and Hamner, 1997] hasta suspensiones bacterianas [Dombrowski et al., 2004], coloides activos [Paxton et al., 2004] y conjuntos celulares [Kemkemer et al., 2000]. Además, son de interés fenómenos como la migración colectiva o la reagrupación de elementos formando conjuntos o racimos. Éstos pueden encontrarse de distinta naturaleza (biológicos o artificiales), en múltiples escalas (macroescala y microescala) y ambientes (hídricos, secos, entre otros).

1.2. Células y Migraciones Celulares

En la naturaleza, todos los sistemas vivos que nos rodean, desde organismos unicelulares hasta nosotros mismos, estamos compuestos por la unidad básica de la vida: la célula. Todas ellas comparten una serie de características en común, entre ellas, tomar energía del medio ambiente para llevar a cabo diversas tareas como incrementar su tamaño, replicarse y migrar [Alberts, 2017]. En este contexto, los modelos que se desarrollan para entender su funcionamiento interno y su comportamiento, están dentro de los márgenes de la materia activa. De particular interés en esta tesis serán las migraciones en células eucariontes animales que pueden encontrarse en organismos multicelulares. Para comprender su migración, se hace necesario revisar la estructura interna básica de las células.

1.2.1. Células

Habitualmente, las células tienen un tamaño que puede variar entre decenas a centenas de micrómetros dependiendo del tipo de célula. En la figura 1.1 se observa un esquema de los principales componentes de las células animales. El interior se encuentra delimitado por una bicapa lipídica llamada membrana plasmática. En la matriz interna denominada citoplasma, se encuentran los llamados organelos encargados de distintas funciones celulares y el núcleo que almacena el material genético en forma de ADN. Adicionalmente para mantener la organización interna y la forma, la célula cuenta con una variada red de polímeros que se puede dividir en tres grupos: los *filamentos intermedios* proporcionan resistencia mecánica de la célula por lo que se encuentran distribuidos en todo el interior; los *microtúbulos*, por su parte, determinan la organización de los organelos y están a cargo del transporte intracelular; finalmente, los *filamentos de actina* o *microfilamentos* que determinan la forma de la superficie de la célula ya que forman la llamada *corteza de actina* bajo la membrana plasmática y dominan las respuestas elásticas reaccionando a las deformaciones a las que se someten las células. Los mencionados polímeros en conjunto se denominan citoesqueleto [Alberts, 2017, Schwarz and Safran, 2013].

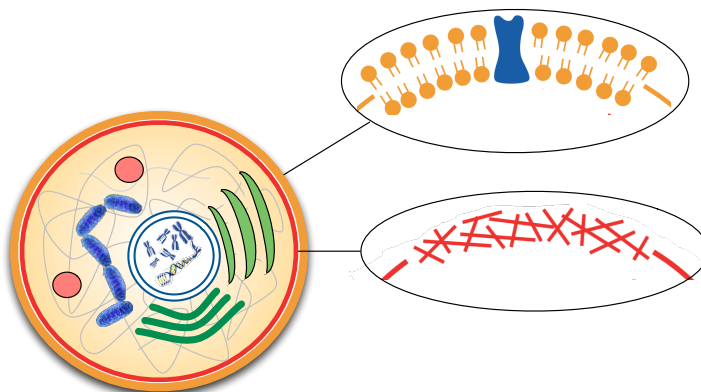


Figura 1.1: Esquema de célula animal en suspensión (motivo por el que se ve redonda). En naranja la membrana celular que puede contener diferentes tipos de proteínas. En rojo se muestra la corteza de actina adyacente a la membrana. En el interior de la célula, en el citoplasma, se encuentran los organelos (aparato de Golgi, retículos endoplasmáticos, vacuolas, mitocondrias entre otros), y el núcleo celular marcado con bordes azules, que contiene el material genético. Finalmente, con líneas plomas, se representan las otras componentes del citoesqueleto [Schwarz and Safran, 2013].

1.2.2. Migración celular

Una vez revisada la organización interna de la célula, procedemos a revisar el proceso de su migración. ‘Se considera la migración celular como un proceso altamente integrado que orquesta el desarrollo embrionario de los organismos multicelulares (morfogénesis), contribuye en la reparación y regeneración de tejidos, y es la responsable de la progresión de algunas enfermedades como el cáncer, el retardo mental, arterioesclerosis y artritis. Por consiguiente, es importante entender los mecanismos fundamentales de la migración celular para entender tanto la biología básica que hay detrás como la patología de las enfermedades relacionadas’ [Ridley et al., 2003].

En varios artículos se plantea la migración celular como un proceso cíclico [Ridley et al., 2003, Lauffenburger and Horwitz, 1996, Harland et al., 2011]. Al inicio de éste, se genera una polarización de la célula mediante una concentración extra de actina en la membrana plasmática que se traduce en un empuje de la misma como se observa en la figura 1.2(a). A dicho fenómeno se le conoce como protrusión y puede encontrarse de distintos tipos y largos. Cuando las protrusiones solo están orientadas en una dirección (la del movimiento), debido a algún estímulo externo físico o químico, se dice que la célula se encuentra polarizada y es una condición clave para muchos de los tipos de migración celular [Wouter-Jan Rappel, 2017]. En el segundo paso, la protrusión realizada debe adherirse al sustrato mediante sitios de adhesión (figura 1.2(b)). En este caso la calidad de la adhesión depende del tipo de protrusión, cantidad de actina y calidad del sustrato. Finalmente, se produce una contracción de la protrusión que puede tener dos efectos. Si se produjo adhesión, los sitios de adhesión servirán como anclas sobre el sustrato y con la contracción, permitirán que la célula se desplace hacia dicho punto debido a la generación de fuerzas de tracción activa (figura 1.2 (c)). En caso contrario, la protrusión se retraerá y la célula buscará adherirse en otros sitios. Posteriormente se repite el ciclo comenzando por la formación de una nueva protrusión. Cabe señalar que en la descripción el fenómeno se ha simplificado, pero que en realidad aún no está completamente comprendido y es materia de investigación para muchos grupos y laboratorios [Alberts, 2017].

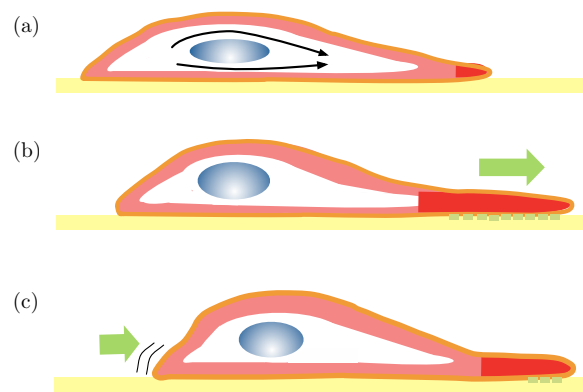


Figura 1.2: Modelo de migración celular. En rojo, se muestra la corteza de actina; en naranja, la membrana plasmática y en azul, el núcleo celular. En amarillo el sustrato. (a) Polarización de la célula. Las flechas señalan el flujo de actina no polarizada hacia uno de los extremos. (b) Protrusión de la célula. En verde, se muestran los sitios de adhesión y la flecha verde señala la dirección hacia la que la protrusión se extiende. (c) Contracción celular en la dirección de la protrusión [Alberts, 2017].

1.2.3. Durotaxis

En la mayoría de los casos, el desplazamiento de las células debe estar motivado por alguna señal química o física. El mecanismo más conocido es la quimiotaxis, donde las células sensan y responden a gradientes químicos [Devreotes and Zigmond, 1988]. Sin embargo, la célula puede responder a otros tipos de estímulos como potenciales eléctricos (galvanotaxis) [Brown and Loew, 1994], condiciones de adherencia del sustrato (haptotaxis) [McCarthy et al., 1983] o diferencia de durezas en el sustrato, migración conocida como durotaxis [Lo et al., 2000].

La durotaxis es un fenómeno inicialmente observado en experimentos *in vitro* [Lo et al., 2000, Gray et al., 2003, Isenberg et al., 2009] donde las células muestran una preferencia por desplazarse en sustratos con mayor módulo de Young como se observa en la figura 1.3. Para entender estas observaciones, los autores miden las fuerzas de tracción sobre los sustratos y determinan que son más grande cuando mayor es el módulo de Young, lo que provocaría una tracción hacia la zona donde la fuerza es superior, polarizando a la célula (figura 1.4). No obstante, la durotaxis no está del todo entendida; aún no hay claridad de lo que la célula sensa, los mecanismos internos para preferir una dureza por sobre otra, y si responde a la dureza del sustrato o a su tensión. Debido al vínculo natural entre la durotaxis y la física, numerosos trabajos se han enfocado en modelar el proceso con el fin de obtener más pistas que permitan elucidar el mecanismo [Stefanoni et al., 2011, Allena et al., 2016, Aubry et al., 2015, Harland et al., 2011]. De estos modelos se destacan algunos puntos importantes que se considerarán en el futuro.

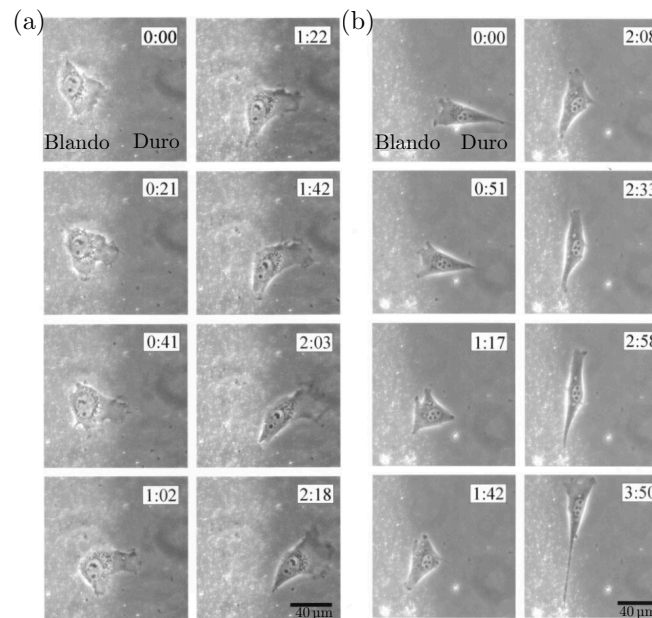


Figura 1.3: Movimiento de células 3T3 sobre sustratos con un gradiente de rigidez. ‘Las imágenes se registraron con iluminación simultánea de fase y fluorescencia. Los cambios en la rigidez del sustrato se pueden visualizar como cambios en la densidad de las partículas fluorescentes incrustadas. (a) La célula se movió desde el lado blando del sustrato a través del gradiente. La célula giró 90° y se movió hacia el lado rígido del sustrato. Cabe mencionar que el área de propagación aumenta cuando la célula pasa el límite. (b) Una célula se movió desde el lado rígido del sustrato a través del gradiente. La célula cambió su dirección al ingresar al gradiente y moverse a lo largo del límite.’ [Lo et al., 2000]

En primer lugar las adhesiones focales o puntos de adhesión, pese a ser un vínculo químico, se puede modelar como dos superficies que se desplazan relativamente una sobre otra formando enlaces cruzados tipo resortes (que representan unas proteínas llamadas integrinas), cuya rigidez asociada depende de la rigidez del sustrato. Luego, haciendo un análisis de la cinética molecular en los puntos de adhesión, se concluye una relación entre la velocidad de la protrusión y la fuerza que la misma aplica

$$F = bv, \quad (1.1)$$

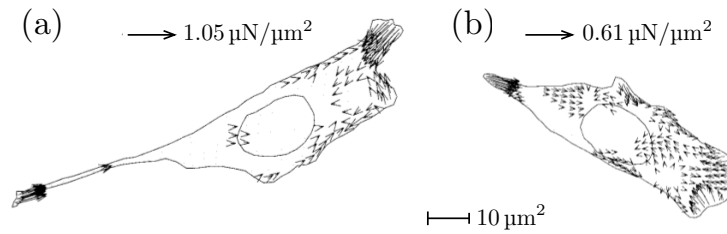


Figura 1.4: Fuerzas de tracción medidas de células 3T3 adosadas en sustratos de poliacrilamida rígidos(a) o blandos(b). Las fuerzas de tracción estadísticamente significativas dentro del límite de las células se muestran como vectores. (a) Módulo de Young, $3 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$; área de la célula, $1005 \mu\text{m}^2$; Esfuerzo de tracción RMS, $8.7 \times 10^{-2} \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$. (b) Módulo de Young, $1.4 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$, área de células, $833 \mu\text{m}^2$; Esfuerzo de tracción RMS, $5.6 \times 10^{-2} \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$ [Lo et al., 2000].

donde b es una constante que depende de las tasas de adhesión, de pérdida de adhesión de las proteínas y de la constante del resorte que puede relacionarse con la dureza del sustrato. Por consiguiente, se concluye que la fuerza es directamente proporcional al módulo de Young E (dureza del material). El resultado permite entender como funciona la durotaxis en células cuyos extremos se encuentran sobre sustratos con distintas durezas. En efecto, al traccionar las protrusiones de ambos extremos, la célula usa exactamente la misma fuerza, sin embargo, como los módulos de Young son distintos, las velocidades de contracción en cada lado serán diferentes permitiendo que el extremo que está sobre una zona más dura contribuya más en el desplazamiento neto de la célula, que el extremo sobre el sustrato más blando [Harland et al., 2011].

Por otro lado, la polarización de la célula, al igual que para otras migraciones celulares es una condición esencial para la durotaxis. Como se mencionó anteriormente, esto favorecería el quiebre de simetría y la reordenación del citoesqueleto de forma que se potencie la corteza de actina en el frente de avance, promoviendo así el desplazamiento de la célula [Lauffenburger and Horwitz, 1996]. Luego, los modelos estudiados asumen como estado inicial de la célula que se encuentra polarizada, lo cual es cierto, considerando que la mayoría de los experimentos son *in vitro* y al hacer contacto con los sustratos se polarizan instantáneamente, como se observa a partir de mediciones de la concentración de actina en la corteza. No obstante, un artículo recientemente publicado, muestra cómo células *in vivo* pasan desde un estado no polarizado con comportamiento de caminante aleatorio, a uno polarizado cuyo desplazamiento es aparentemente guiado por diferencias de dureza o tensiones de las células sustrato, es decir, durotaxis [Reig et al., 2017]. Por consiguiente, debe existir una señal externa que presuntamente corresponda al mismo estímulo que posteriormente guiará el movimiento, en este caso la diferencia de dureza, que estimula a la célula a cambiar su estado desde uno no polarizado a uno polarizado. En la figura 1.5 se observa cómo inicialmente la célula extiende protrusiones en todas las direcciones hasta que termina direccionando su movimiento hacia uno de los bordes de la célula sustrato y posteriormente, manteniéndose ahí. Los mecanismos de durotaxis planteados anteriormente en la ecuación (1.1), no permiten entender estas observaciones porque los extremos de la célula no están ubicado sobre sustratos con distinta dureza. Luego, la célula se polariza pese a que sus extremos no sienten distintas durezas, mostrando un efecto a larga distancia.

A continuación, se revisará el contexto biológico del experimento donde se ha observado el fenómeno en el cual se basan los modelos que se presentarán en la tesis.

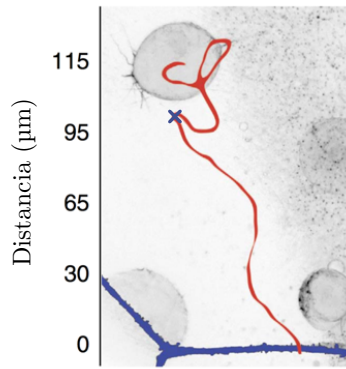


Figura 1.5: Cambios en el comportamiento migratorio de la célula. Microscopía confocal, proyección en el eje z de un embrión. En rojo, se observa la trayectoria de una célula que inicialmente muestra el comportamiento de un caminante aleatorio (previo a la cruz) y repentinamente se dirige a una zona que sería más dura (posterior a la cruz) representada con líneas azules en la parte inferior [Reig et al., 2017].

1.3. Modelo de embrión de pez anual, *Austrolebias* sp

El pez anual es un organismo modelo que al igual que otros peces se caracteriza por tener un huevo completamente transparente lo que permite el estudio *in vivo* de su desarrollo embrionario. Adicionalmente, este pez se caracteriza por tener todos sus procesos de formación más lentos que otros animales, como el pez cebra, lo que permite entender otro tipo de fenómenos [Reig, 2017].

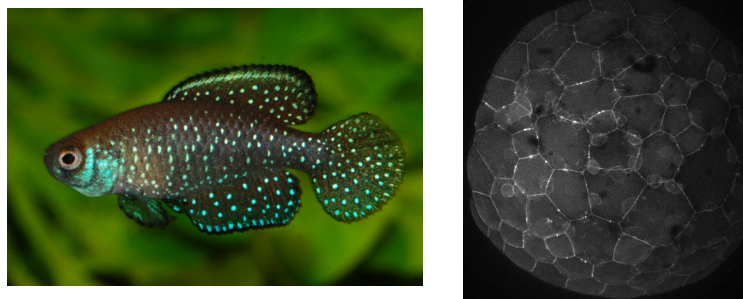


Figura 1.6: Al lado izquierdo, una foto de un pez *Austrolebias* sp. Al lado derecho, la visualización de su huevo en el microscopio, completamente transparente.

Las etapas principales del desarrollo embrionario de los peces anuales, y de cualquier pez en general, pueden resumirse en la figura 1.7. Todo comienza con una célula resultante de los gametos llamada cigoto sobre una yema (figura 1.7(a)). Con la división celular sucesiva del cigoto se forma la llamada blástula temprana (figura 1.7(b)), y con el comienzo de la migración celular sobre la yema la blastulación tardía (figura 1.7(c)). La migración celular cubriendo la yema es llamada epibolía (figura 1.7(d)). Finalmente las células siguen migrando y reagrupándose para dar origen al pez (figura 1.7(e)).

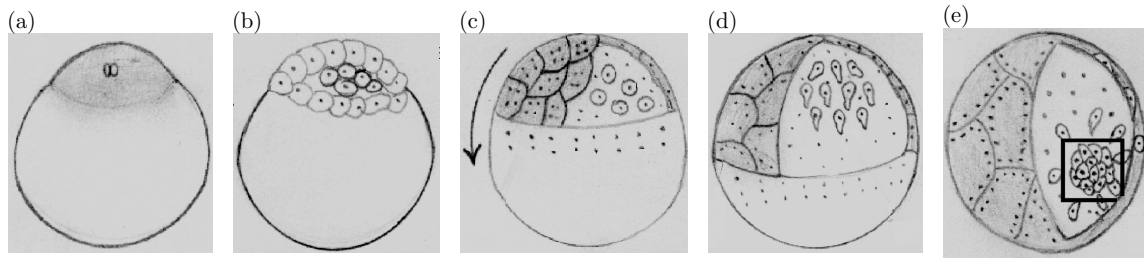


Figura 1.7: Esquema de estadios principales de desarrollo del pez anual. (a) En la parte superior un pronúcleo y la esfera inferior corresponde a la yema (División mitóticas entre 0-24 horas post fertilización (hpf)). (b) Blástula temprana (24-36 hpf). (c) Blástula tardía. Inicio de migración celular. Las células pentagonales corresponden a las *Enveloping Cell Layer* (EVL) y las más pequeñas, a las *Deep Cell Layer* (DCL) (36-48 hpf). (d) Epibolía. Las EVL terminan de cubrir la yema. (48-96 hpf) (e) Dispersión (96-120 hpf) y posterior reagrupación de células (desde el día 7 en adelante). [Arezo et al., 2005, Reig, 2017].

Las observaciones de lo que podría ser durotaxis *in vivo* se encuentran en la etapa de epibolía. En particular, las células a estudiar son las *Deep Cell Layer* (DCL), que se desplazan entre la yema y las células del epitelio superior llamadas *Enveloping Cell Layer* (EVL) (figura 1.9(a)). Una serie de observaciones demuestran que las DCLs son atraídas a los bordes de las EVL (figura 1.8).

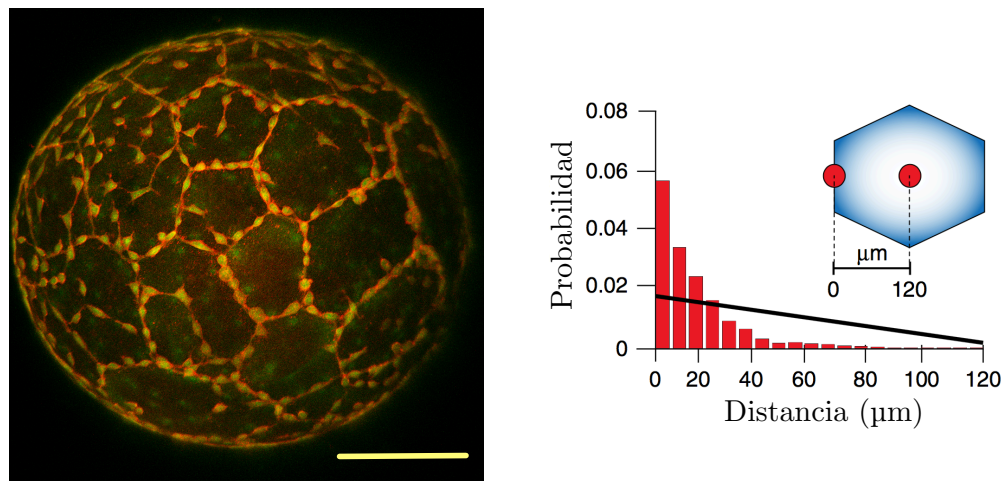


Figura 1.8: Al lado izquierdo se observa un huevo al término de la epibolía. Las células más pequeñas corresponden a las DCL, y se observa a simple vista que la mayoría de ellas se encuentran ubicadas en algún borde de alguna EVL (líneas rectas) [Reig, 2017]. La barra de escala corresponde a 250 μm. Al lado derecho 'la distribución de probabilidad de las posiciones de las células DCL en función de la distancia a los bordes de las EVL en un periodo entre el 30 y 60 % de epibolía (54 - 72 h.p.f.). La línea negra corresponde a la distribución aleatoria esperada para células EVL promedio con radio superficial de 120 μm, como se indica en la parte superior derecha de la imagen [Reig et al., 2017].

A estas observaciones se le suman otros experimentos que permiten confirmar lo visualizado en la figura 1.8. El primero de ellos demuestra que la resistencia a las deformaciones es mayor

en los bordes que en el centro de las EVL, lo que se aprecia observando una vista ortogonal de las deformaciones en ambos sectores cuando están en contacto con las DCL (figura 1.9(b)). En segundo lugar, a la polarización de las DCL que dirige su migración hacia el borde de la EVL, se le suma un aumento de la superficie de contacto (las DCL efectivamente estarían usando las EVL como sustrato) (figuras 1.5 y 1.9(c)). Finalmente, se observa que las DCL responden a los cambios de tensión de las EVL ajustando su forma y migración por ejemplo en fusiones o extrusiones. Para verificar la hipótesis se manipula localmente una EVL, observando que al aumentar su tensión, aumenta la densidad de DCLs, mientras que al disminuirla se reduce la densidad (1.9(d)) [Reig et al., 2017].

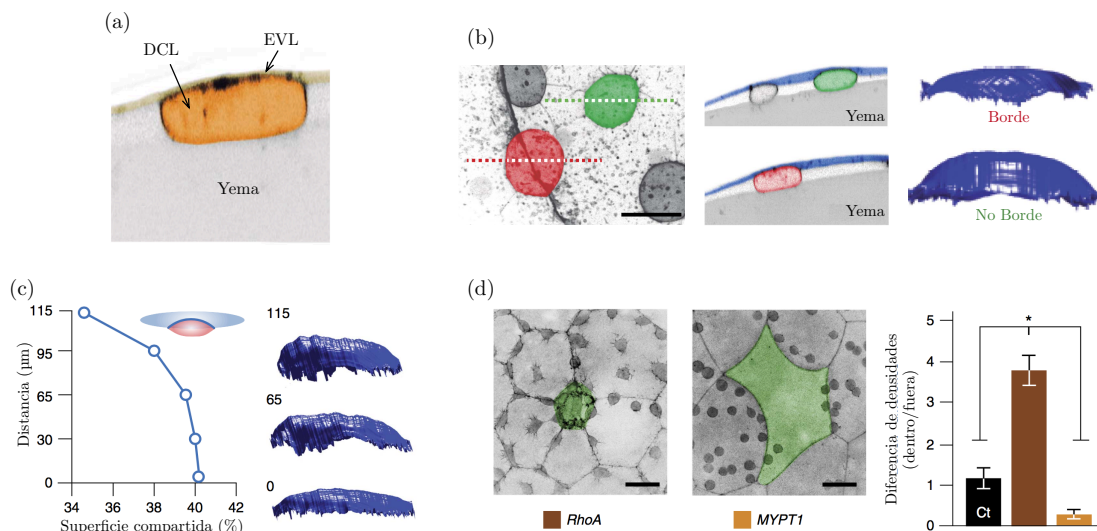


Figura 1.9: Cambio en la superficie de contacto DCL-EVL y el comportamiento migratorio de las DCLs hacia las EVL. (a) Microscopía confocal donde se observa la zona de contacto adhesivo entre la DCL y la EVL que se encuentra sobre ella, mientras que la yema esta bajo la DCL. (b) En rojo y verde, se observan DCL ubicadas en y fuera del borde respectivamente para un 60 % de epibolía. De izquierda a derecha proyección en z (microscopía confocal), secciones ópticas ortogonales (las líneas discontinuas corresponden a los centros) y proyecciones volumétricas 3D de la superficie de contacto DCL-EVL. (c) A la derecha, cuantificación del contacto superficial DCL-EVL. A la izquierda, proyecciones volumétricas en 3D del contacto superficial para algunas distancias al borde de la EVL. (d) A la izquierda y al centro, proyección en z (microscopía confocal) donde se ve al centro (verde) una EVL manipulada. RhoA limita la expansión de la superficie de la célula EVL y la hace más pequeña que las células EVL vecinas, aumentando la tensión cortical. MYPT1 aumenta la expansión de la superficie de la célula EVL haciéndola más grande y más cóncava, en comparación con las células EVL vecinas, disminuyendo la tensión cortical. A la derecha, efectos de la manipulación, cuantificación de proporción de densidad de DCLs entre EVL manipuladas (verde) y las EVL que la rodean. En negro, los resultados para una célula no manipulada. [Reig et al., 2017].

Con todas las observaciones mencionadas, queda la gran interrogante de qué es lo que las células realmente están sensando y si es la diferencia entre el borde de la EVL y su centro la responsable del cambio de polarización de las DCL. Considerando que las EVL tienen un rol de sustrato y por la naturaleza de las membranas plasmática tienen características de una membrana elástica, se usará teoría de la elasticidad para estudiar el fenómeno.

1.4. Otro tipo de migración celular no polarizada

Pese a que en las secciones anteriores se mencionó que en general la migración celular dirigida se observa en células polarizadas, existen excepciones. Una de ellas es el caso de las *Lateral Organ Progenitors* (LOP) observadas en la epibolía de los peces cebra.

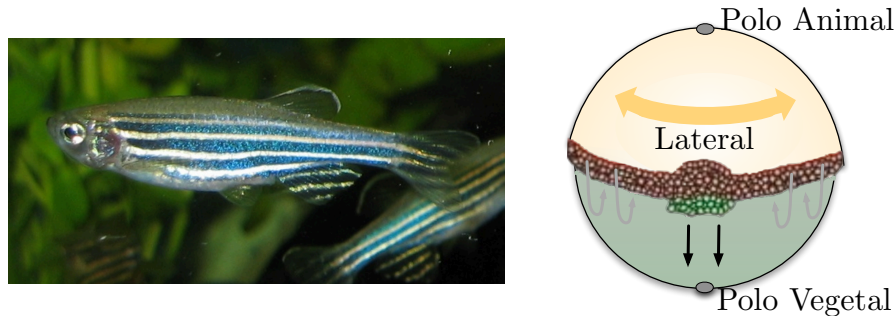


Figura 1.10: Al lado izquierdo, una foto de un pez cebra. Al lado derecho, un esquema del huevo durante la epibolía. Los círculos verdes y naranjos corresponden a las LOPs y a las células de los epitelios superiores respectivamente. Además se señala la dirección lateral y los polos animal y vegetal [Pulgar et al., 2018].

Estos animales, al igual que los peces anuales, son organismos modelos con huevo transparente, pero con un proceso de desarrollo (figura 1.11) mucho más rápido que los *Austrolebias* sp.

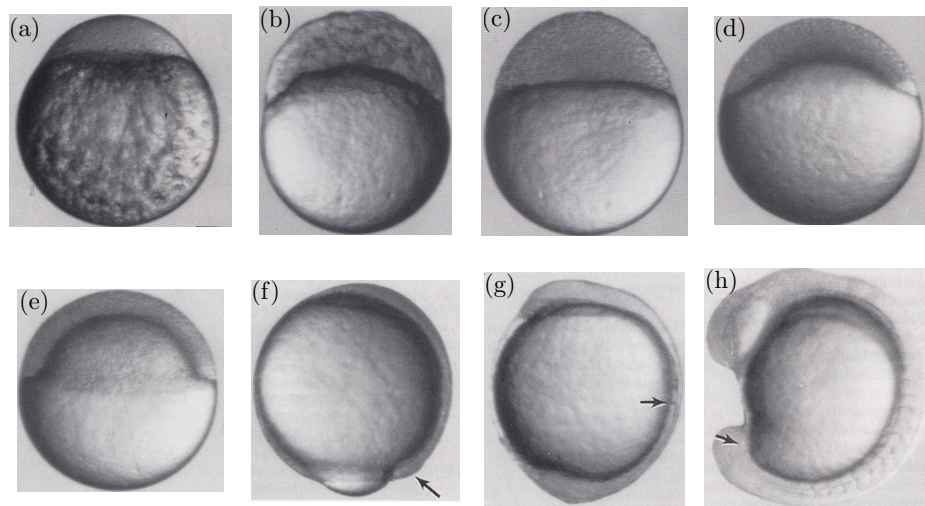


Figura 1.11: Desarrollo del pez cebra. (a) Cigoto (0.2 horas post fertilización (hpf)). (b) Tras múltiples divisiones celulares, 256 células (2.5 hpf). (c) Desde la etapa alta a transición oblonga (inicio migraciones celulares)(3.7 hpf). (d) Domo. Las células migran descendiendo por la yema dando forma a un domo (4.3 hpf) (e) 50 % de Epibolía (descenso de células cubriendo la yema). (5.3 hpf) (f) 90 % de Epibolía (9 hpf). (g) y (h) Periodo de segmentación, formación de distintas partes del pez (10.5 hpf y 15.5 hpf aproximadamente) [Kimmel et al., 1995].

De particular interés son las LOPs porque corresponden a las células que forman en estadios posteriores el órgano de la lateralidad, muy importante para la distinción izquierda-derecha del futuro organismo. Durante la epibolía, estas células y las del epitelio inmediatamente superior, las *Enveloping Cell Layer* (EVL), descienden migrando colectivamente hacia el polo vegetal y formando un racimo como se aprecia en la figura 1.12.

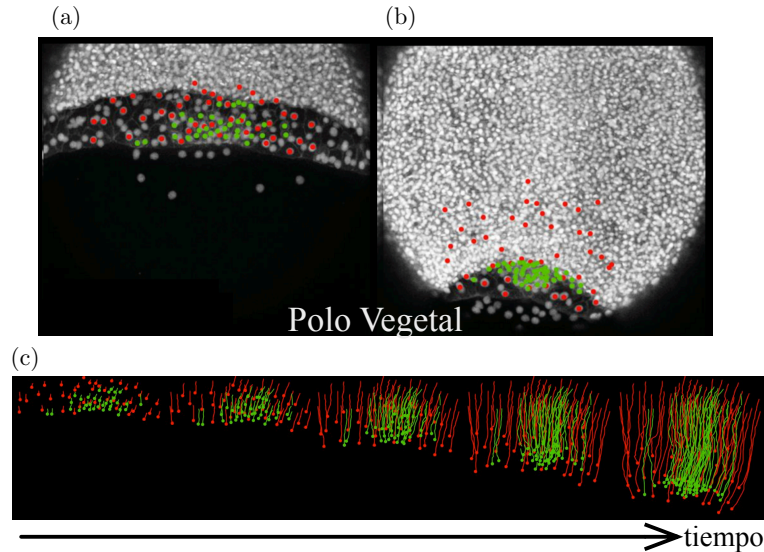


Figura 1.12: En la figura se observa el fenómeno a comprender mediante un modelo físico. En verde están marcadas las LOPs y en rojo los núcleos de las EVLs que migran desde el polo animal (parte superior) hacia el polo vegetal (parte inferior). (a) y (b) son las condiciones inicial y final respectivamente. En (c) se observa el proceso en el tiempo. [Pulgar, 2017].

Lo primero que llama la atención en la migración de las LOPs es que no se encuentran polarizadas. En efecto, las protrusiones que generan son principalmente (número y área) laterales (figura 1.13(a)), es decir transversales a la dirección de movimiento, oponiéndose a lo esperado en células que migran y protruyen en la misma dirección de movimiento debido a la polarización. Para probar esta hipótesis, se inhibió la formación de células polarizadas a base de actina, de modo que no forman protrusiones en ninguna dirección, por lo que no deberían migrar. Sin embargo, se observa que su movimiento hacia el polo vegetal sigue siendo persistente (figura 1.13(b)). Otras observaciones experimentales demuestran que inicialmente todas las células se encuentran en un mismo epitelio y que con el transcurso del tiempo las células que se convertirán en LOPs son extruídas hacia el epitelio inmediatamente inferior. No obstante algunas de estas LOPs queda enlazadas al epitelio de las EVL, mediante una pequeña porción de su membrana plasmática, pero con suficiente movilidad para interactuar con otras LOPs mediante protrusiones. Con el descenso de las células, los vínculos gradualmente se pierden quedando ambos epitelios completamente separados (figura 1.13(c)). El enlace mencionado juega un rol fundamental en el descenso de las LOPs. Para verificarlo se hizo una ablación con láser de modo de liberar la influencia de los tejidos que dirigen la epibolía. En los resultados se observó que tanto las LOPs como los vínculos se retraían sincronizadamente hacia el polo animal, indicando que se encontraban bajo tensión. Posteriormente se movieron nuevamente de forma sincronizada en la dirección opuesta. Ambas observaciones demuestran que los vínculos son los responsables de ejercer fuerza mecánica para el desplazamiento de las LOPs (figura 1.13(d)).

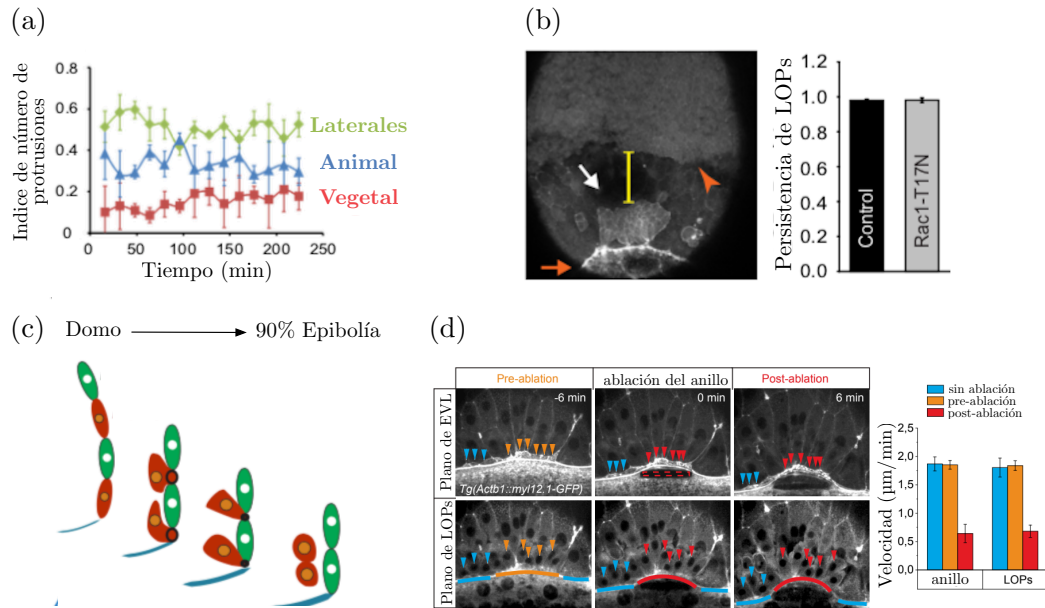


Figura 1.13: Migración de LOPs no polarizadas y enlazadas a las EVL. (a) La contabilización de las protrusiones indica que no hay direcciones privilegiadas como se observa en las células polarizadas. El índice de protrusiones es mayor en la dirección lateral que en la de movimiento (dirección vegetal). (b) Células manipuladas con *Rac1-T17N* no generan protrusiones pero sí migran hacia el polo vegetal (lado izquierdo). El estudio de la persistencia demuestra que no es distinta si se compara con células no manipuladas (lado derecho). (c) Esquema del enlace entre las EVLs (en verde) y las LOPs (rojo) durante el proceso, desde la formación del domo, cuando es solo un epitelio, hasta el 90 % de epibolia. En celeste se observa el anillo de actomiosina, encargado del descenso de las EVL. (d) Comparación entre efecto de ablación en las LOPs y el anillo responsable del desplazamiento de las EVLs. Se observa que tanto los movimientos son coordinados (lado izquierdo), como la velocidad que llevan (lado derecho). [Pulgar et al., 2018]

Tomando en cuenta las observaciones anteriores, no queda claro por qué las LOPs logran descender de manera colectiva, a pesar de que los enlaces con las EVL solo están presentes para algunas células y con el tiempo se pierden. Se hipotetiza que la relación LOP-LOP podría jugar un rol significativo basado en las protrusiones que, pese a no ser direccionadas, mantienen al racimo coligado como se observa en la figura 1.14. Luego, se busca estudiar el rol de éstas interacciones usando un modelo de elementos discretos.

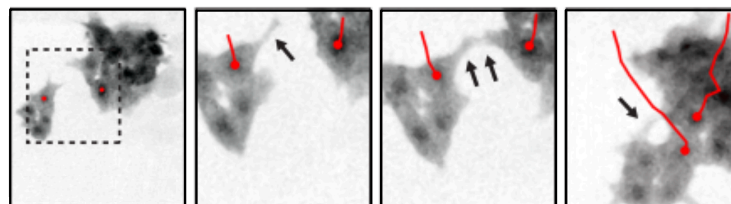


Figura 1.14: Inicialmente un grupo de células aisladas de un racimo de tamaño mayor. Posteriormente, la interacción mediante protrusiones (flechas negras) permite que el grupo aislado se reúna con el resto del racimo evitando un posible escape. Las trayectorias están dibujadas en rojo y el cuadrado punteado mide $52,7 \pm 14,7 \mu\text{m}$. [Pulgar et al., 2018]

1.5. Elasticidad

La elasticidad es una propiedad que tienen los materiales sólidos de sufrir deformaciones reversibles cuando se les somete a fuerzas u otros esfuerzos mecánicos. A continuación, se revisan algunas definiciones matemáticas y de elasticidad, que resultarán útiles para la comprensión del texto. Todos estos conceptos de elasticidad tienen como fuente el libro de teoría de elasticidad de Landau y Lifshitz [Landau et al., 1969].

1.5.1. Notación de Einstein

En los capítulos sucesivos se usará la denominada notación de Einstein que corresponde a una abreviación para las sumatorias suprimiendo el símbolo \sum , de modo que una suma habitual

$$ab_{\text{tot}} = a_1b_1 + a_2b_2 = \sum_i a_ib_i,$$

solo se escriba $ab_{\text{tot}} = a_ib_i$ donde $i = 1, 2$ o $i = 1, 2, 3$ que pueden corresponder a coordenadas en 2 o 3 dimensiones, respectivamente. Bajo esta indexación las operaciones tensoriales tienen su propia notación.

- **Gradiente** de un campo vectorial $\mathbf{u}(\mathbf{r})$

$$\nabla \mathbf{u} = \frac{\partial u_i}{\partial r_j}.$$

- **Divergencia** de un campo vectorial $\mathbf{u}(\mathbf{r})$

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = \frac{\partial u_i}{\partial r_i}.$$

- **Rotor** de un campo vectorial $\mathbf{u}(\mathbf{r})$

$$\nabla \times \mathbf{u} = \varepsilon_{ijk} \frac{\partial u_k}{\partial r_j}.$$

- **Laplaciano** de un campo vectorial $\mathbf{u}(\mathbf{r})$

$$\nabla^2 \mathbf{u} = \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_i \partial r_i}.$$

1.5.2. Vector y tensor de deformaciones

En elasticidad el vector de deformaciones u_i da cuenta del campo vectorial de desplazamientos de cada elemento de volumen de un cuerpo al someterlo a esfuerzos mecánicos. Dichos desplazamientos se pueden caracterizar mediante un tensor simétrico de deformaciones, u_{ik} , donde se

almacena toda la información relativa a los cambios de forma y volumen del cuerpo bajo esfuerzos mecánicos. La relación entre u_i y u_{ik} está dada por

$$u_{ik} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial r_k} + \frac{\partial u_k}{\partial r_i} + \frac{\partial u_l}{\partial r_i} \frac{\partial u_l}{\partial r_k} \right). \quad (1.2)$$

Generalmente, las deformaciones de los cuerpos son pequeñas comparadas con su tamaño. Bajo ese supuesto, el tercer término de la ecuación, el término no lineal, se puede ignorar y para el tensor de deformaciones solo se considera

$$u_{ik} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial r_k} + \frac{\partial u_k}{\partial r_i} \right). \quad (1.3)$$

1.5.3. Fuerza y tensor de tensiones

El tensor, σ_{ik} recibe el nombre de tensor de tensiones de modo que $\sigma_{ik} df_k$ es la i -ésima componente de la fuerza que actúa sobre el elemento de superficie $d\mathbf{f}$. Entonces, usando la ecuación de equilibrio mecánico, se puede concluir que sí hay una fuerza aplicada F_i

$$F_i = \frac{\partial \sigma_{ik}}{\partial r_k} = \sigma_{ik,k}, \quad (1.4)$$

donde $\sigma_{ik,k}$ denota la derivada de un tensor, como se expresa en la igualdad.

La relación entre σ_{ik} y u_{ik} se puede deducir a partir de la ley de Hooke para materiales isótropos y está dada por

$$\sigma_{ik} = \frac{E}{1 + \sigma} \left(u_{ik} + \frac{\sigma}{1 - 2\sigma} u_{ll} \delta_{ik} \right), \quad (1.5)$$

donde $i, k = 1, 2, 3$, E es el módulo de Young y σ el coeficiente de Poisson, constantes que varían dependiendo del tipo de material, y dan cuenta de la deformación del volumen. El primero, E , corresponde al módulo de extensión, es decir, da cuenta de las deformaciones en la misma dirección que se aplica la fuerza, mientras que σ da cuenta del cociente entre la contracción transversal y la extensión longitudinal. A lo largo de esta tesis se tomará $\sigma = 0,5$, que corresponde al valor usado para materiales perfectamente incompresibles; y que consideraremos que las células también toman.

Del mismo modo, la relación puede invertirse encontrando u_{ik} en función de σ_{ik} ,

$$u_{ik} = \frac{1}{E} [(1 + \sigma)\sigma_{ik} - \sigma\sigma_{ll}\delta_{ik}]. \quad (1.6)$$

Placa delgada

Las ecuaciones (1.5) y (1.6) son válidas para sistemas en tres dimensiones. No obstante, el sistema en el cual está inspirado el modelo de migración celular de las DCLs, tiene como sustratos células EVL, cuya extensión es del orden de los 300 μm , pero su espesor (membrana plasmática) es del orden de 1 μm . Luego, en los siguientes capítulos se considera al sustrato como una membrana

delgada. En este caso, es posible hacer algunas aproximaciones debido a que el eje z es cercano a nulo en una membrana, por lo que se modifica la ecuación (1.5) quedando para fuerzas F_i aplicadas en el origen,

$$(1 - \sigma) \frac{\partial^2 u_i}{\partial r_k^2} + (1 + \sigma) \frac{\partial^2 u_k}{\partial r_i \partial r_k} = \frac{-2(1 - \sigma^2)}{Eh} \delta(\mathbf{r}) F_i, \quad (1.7)$$

donde $i, k = 1, 2$, E es el módulo de Young y σ el coeficiente de Poisson.

1.6. Objetivos y organización de la tesis

Tomando en cuenta las interrogantes en torno a las migraciones celulares presentadas tanto en la epibolía de los peces anuales como de los peces cebra, el objetivo del trabajo es modelar ambos fenómenos usando herramientas físicas. Las metodologías a emplear son teóricas y numéricas. En particular para el modelo de los peces anuales, se usará teoría de la elasticidad.

La tesis se organiza en dos bloques: desde el capítulo 2 al 4 se presenta un modelo de juguete para la migración de DCL en peces anuales; y en el capítulo 5 se presenta el modelo para la migración de LOPs en peces cebra. En la primera parte, el capítulo 2 está destinado a estudiar las respuestas de los sustratos elásticos sometidos a fuerzas; en el capítulo 3, se usan dichas respuestas para estudiar el desplazamiento de una célula que hace protrusiones no direccionadas en distintos tipos de sustratos. Finalmente, en el capítulo 4, se plantea un modelo con elasticidad no lineal. En el capítulo 5 se estudia el modelo, sus consideraciones y resultados para el fenómeno de migración de células no polarizadas en la epibolía de los peces cebra. La parte final del texto, capítulo 6, está dedicada a las conclusiones y proyecciones del trabajo.

Capítulo 2

Estudio de la deformación de un sustrato sometido a una fuerza puntual

2.1. Introducción

Hasta ahora se han revisado evidencias donde las células se desplazan guiadas por la diferencia de dureza en el sustrato *in vitro* y la posibilidad de que lo hagan *in vivo*. En el capítulo que comienza, se estudiará el efecto que tiene una célula al estar en contacto con un sustrato. Cabe destacar que la membrana celular de las células, que actúan como sustrato, es muy delgada ($h \sim 1 \mu\text{m}$), lo que justifica el uso de un sustrato delgado elástico en el modelo. Además, se considerará a la célula como un círculo de cuatro contactos como muestra la figura 2.1. Además, se supondrá que en cada vértice se ejerce una fuerza puntual. Estudiar cómo dicha fuerza afecta al sustrato, ya sea homogéneo o no homogéneo, en su mismo punto de aplicación y en los puntos cercanos, permitirá entender posteriormente los efectos que tiene en la dinámica de la célula.

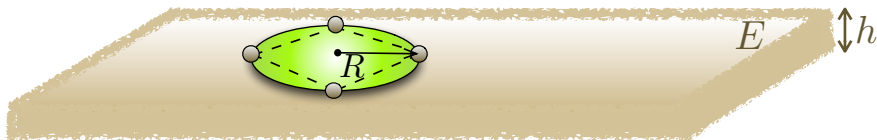


Figura 2.1: Célula como círculo, de radio R , con cuatro puntos de contacto sobre un sustrato delgado de espesor $h \ll R$ y módulo de Young E .

2.2. Función de Green

2.2.1. Función de Green: Caso homogéneo

Para estudiar cómo se deforma un sustrato al someterlo a una fuerza puntual F_i aplicada en $\mathbf{r} = 0$, se usará la ecuación de equilibrio para placas delgadas [Landau et al., 1969] deducida a partir de la ecuación (1.4) y ya presentada en la ecuación (1.7), donde h es el espesor del sustrato y E su módulo de Young constante,

$$(1 - \sigma) \frac{\partial^2 u_i}{\partial r_k^2} + (1 + \sigma) \frac{\partial^2 u_k}{\partial r_i \partial r_k} = \frac{-2(1 - \sigma^2)}{Eh} \delta(\mathbf{r}) F_i. \quad (2.1)$$

r_i es la coordenada espacial, u_i corresponde a la deformación del sustrato y σ al coeficiente de Poisson. El primer sumando del lado izquierdo corresponde al laplaciano de \mathbf{u} , y el segundo sumando al gradiente de la divergencia del mismo. La solución para la ecuación (2.1) está dada por una función de Green a encontrar, la cual se define por la relación,

$$u_i(\mathbf{r}) = G_{ij}(\mathbf{r}) F_j. \quad (2.2)$$

Para encontrar $G_{ij}(\mathbf{r})$ se propone una expresión algebraica y se reemplaza en la ecuación de equilibrio. De este modo se pueden encontrar los exponentes y los coeficientes correspondientes para obtener la expresión final de la función de Green buscada. En este caso G_{ij} por simetría, solo puede depender de δ_{ij} y $r_i r_j$. Por consiguiente, se propone

$$G_{ij}(\mathbf{r}) = A(r) \delta_{ij} + B(r) r_i r_j, \quad (2.3)$$

que se reemplaza en (2.2), y sustituyendo u_i en (2.1), se obtiene

$$(1 + \sigma) \left[\left(\frac{A'}{r} + B'r + 3B \right) F_i + \left(\frac{A''}{r^2} - \frac{A'}{r^3} + B'' + \frac{4B'}{r} \right) r_i r_j F_j \right] \\ + (1 - \sigma) \left[\left(A'' + \frac{2A}{r} + 2B \right) F_i + \left(B'' + \frac{5B'}{r} \right) r_i r_j F_j \right] = \frac{-2(1 - \sigma^2)}{Eh} \delta(\mathbf{r}) F_i. \quad (2.4)$$

En este punto se reagrupan los términos de la forma F_i y $r_i r_j F_j$ de modo que para $r \neq 0$

$$\frac{A''}{r^2} - \frac{A'}{r^3} + 2(1 - \sigma)B'' + (9 - 10\sigma) \frac{B'}{r} = 0, \\ (1 - 2\sigma)A'' + 2(1 - \sigma) \frac{A'}{r} + B'r + (5 - 4\sigma)B = 0, \quad (2.5)$$

y se proponen las expresiones polinomiales $A(r) = ar^n$ y $B(r) = br^{n-2}$ que al sustituirlas en las ecuación (2.5) permite determinar que $n = 0$ (por consiguiente la función asociada es un logaritmo) y con ellos los valores de $A(r)$ y $B(r)$. Con esto, la función de Green para placas delgadas es

$$G_{ij}(\mathbf{r}) = \frac{(1 + \sigma)}{4\pi Eh} \left[(\sigma - 3) \ln |\mathbf{r}| \delta_{ij} + \frac{(1 + \sigma)}{|\mathbf{r}|^2} r_i r_j \right]. \quad (2.6)$$

Y usando las expresiones (2.2) y (2.6) se concluye que la deformación del sustrato homogéneo (placa delgada) al aplicar una fuerza de la forma $F\delta(\mathbf{r})$ está dada por

$$u_i(\mathbf{r}) = \frac{C}{E} \left(k_1 \ln |\mathbf{r}| \delta_{ij} + \frac{k_2}{|\mathbf{r}|^2} r_i r_j \right) F_j, \quad (2.7)$$

donde, para simplificar la notación, se ha definido $C = \frac{(1+\sigma)}{4\pi h}$, $k_1 = (\sigma - 3)$ y $k_2 = (1 + \sigma)$.

Haciendo cálculos análogos se puede determinar la función de Green para dos dimensiones,

$$G_{ij}^{2D}(\mathbf{r}) = \frac{C}{E_{2D}} \left(k_1 \ln |\mathbf{r}| \delta_{ij} + \frac{k_2}{|\mathbf{r}|^2} r_i r_j \right), \quad (2.8)$$

donde $C = \frac{(1+\sigma)}{4\pi(1-\sigma)}$, $k_1 = -(3 - 4\sigma)$, $k_2 = 1$ y E_{2D} es el módulo de Young para sustratos bidimensionales. Y para tres dimensiones,

$$G_{ij}^{3D}(\mathbf{r}) = \frac{C}{E|\mathbf{r}|} \left(k_1 \delta_{ij} + \frac{k_2}{|\mathbf{r}|^2} r_i r_j \right), \quad (2.9)$$

con $C = \frac{(1+\sigma)}{8\pi(1-\sigma)}$, $k_1 = (3 - 4\sigma)$ y $k_2 = 1$, que correspondería a un caso donde la célula se desplaza al interior de un sustrato elástico.

Cabe mencionar que para los casos de placa delgada y dos dimensiones las deformaciones son proporcionales al logaritmo de $|\mathbf{r}|$ no definido para $r \rightarrow \infty$. No obstante, debido a que el sustrato se considera finito (células con fronteras bien definidas), el logaritmo queda bien definido en todo el sistema.

2.2.2. Función de Green: Caso no homogéneos

Antes de iniciar los cálculos para la función de Green, es necesario definir el tipo de sustrato no homogéneo a considerar. Tomando en cuenta el fenómeno que el modelo quiere reproducir, se usará una placa delgada que tiene una franja de módulo de Young mayor como muestra la figura 2.2.

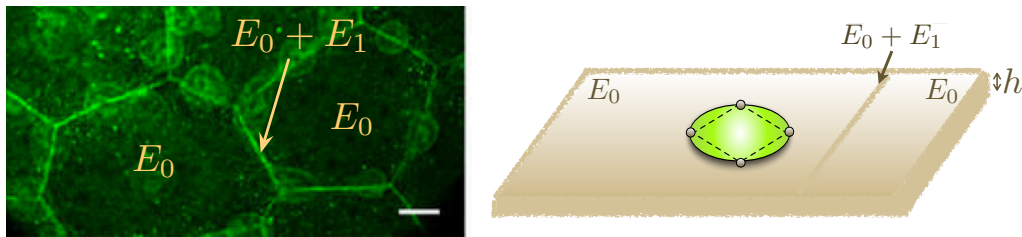


Figura 2.2: Izquierda: Forma del sustrato por el cual migran las DCL, donde se estima que en las zonas más claras el módulo de Young es mayor. Derecha: Sustrato considerado de espesor h . La franja tiene un módulo de Young mayor ($E_0 + E_1$) que el resto de la superficie (E_0).

El módulo de Young del sustrato a usar se describe como $E(\mathbf{r}) = E_0 + E_1(\mathbf{r})$ y

$$E_1(\mathbf{r}) = \begin{cases} E_1 & |x| < a, \\ 0 & |x| > a, \end{cases} \quad (2.10)$$

$\mathbf{r} = x\hat{x} + y\hat{y}$ y $2a$ el grosor de la franja. Cabe mencionar que se considerará esta última infinita en y como primera aproximación, a pesar de que los bordes de las EVL a reproducir no lo son. Esto último es con el objetivo de entender los efectos que tiene una zona más rígida del sustrato en el desplazamiento de la célula que está sobre él. Adicionalmente, la ecuación de equilibrio (2.1) se debe volver a deducir ya que E no es constante, lo que se hace a partir de la ecuación (1.4) con $E = E(\mathbf{r})$. En este caso la ecuación de equilibrio corresponde a

$$\begin{aligned} \frac{-F_i}{h} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_f) = \frac{\partial E(\mathbf{r})}{\partial r_k} & \left[\frac{1}{2(1+\sigma)} \left(\frac{\partial u_i}{\partial r_k} + \frac{\partial u_k}{\partial r_i} \right) + \frac{\sigma}{1-\sigma^2} \frac{\partial u_l}{\partial r_l} \delta_{ik} \right] \\ & + \frac{E(\mathbf{r})}{2(1-\sigma^2)} \left[(1-\sigma) \frac{\partial^2 u_i}{\partial r_k^2} + (1-\sigma) \frac{\partial^2 u_k}{\partial r_i \partial r_k} \right], \end{aligned} \quad (2.11)$$

con

$$\frac{\partial E}{\partial r_i} = aE_1 \delta_{ik} \left[\frac{\delta(x+a) - \delta(x-a)}{a} \right],$$

por la forma de $E(\mathbf{r})$ explicitada en la ecuación (2.10). Se tomará que $aE_1 \sim \theta(\varepsilon)$ con $\varepsilon \ll 1$. Por consiguiente, para encontrar las deformaciones del sustrato se hacen cálculos perturbativos, considerando que la deformación también tiene distintos ordenes, o sea $u_i(\mathbf{r}) = u_i^{(0)}(\mathbf{r}) + \varepsilon u_i^{(1)}(\mathbf{r}) + \dots$. Luego, se separa la ecuación (2.11) según el orden de ε ,

$\varepsilon^{(0)}$:

$$\kappa_1 \frac{\partial^2 u_i^{(0)}}{\partial r_k^2} + \kappa_2 \frac{\partial^2 u_k^{(0)}}{\partial r_i \partial r_k} = \frac{\zeta}{E_0} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_f) F_i, \quad (2.12)$$

$\varepsilon^{(1)}$:

$$\begin{aligned} & \kappa_1 \frac{\partial^2 u_i^{(1)}}{\partial r_k^2} + \kappa_2 \frac{\partial^2 u_k^{(1)}}{\partial r_i \partial r_k} \\ & = -\frac{E_1(\mathbf{r})}{E_0} \left[\kappa_1 \frac{\partial^2 u_i^{(0)}}{\partial r_k^2} + \kappa_2 \frac{\partial^2 u_k^{(0)}}{\partial r_i \partial r_k} \right] - \frac{aE_1 \delta_{ik}}{E_0} \left[\frac{\delta(x+a) - \delta(x-a)}{a} \right] \left[\frac{1}{\bar{\kappa}_1} \left(\frac{\partial u_i^{(0)}}{\partial r_k} + \frac{\partial u_k^{(0)}}{\partial r_i} \right) + \frac{1}{\bar{\kappa}_2} \frac{\partial u_l^{(0)}}{\partial r_l} \delta_{ik} \right], \end{aligned} \quad (2.13)$$

donde se han usado los siguientes valores para simplificar la notación:

$$\begin{aligned} (\kappa_1, \kappa_2) &= (1-\sigma, 1+\sigma), \\ (\bar{\kappa}_1, \bar{\kappa}_2) &= \left[\frac{1}{2(1+\sigma)}, \frac{\sigma}{1-\sigma^2} \right], \\ \zeta &= \frac{-2(1-\sigma^2)}{h}, \end{aligned} \quad (2.14)$$

y $\mathbf{r}_f = x_f \hat{x} + y_f \hat{y}$ es el punto donde se aplica la fuerza, que posteriormente se igualará a \mathbf{r} .

Para encontrar la función de Green se debe resolver la ecuación (2.12) y con los valores de $u_i^{(0)}(\mathbf{r})$ encontrados, resolver la ecuación (2.13). Para la primera es fácil notar que corresponde a exactamente la

misma expresión (2.1), por lo que la función de Green correspondiente está dada igualmente por (2.7),

$$\begin{aligned} u_i^{(0)}(\mathbf{r}) &= G_{ij}^{(0)}(\mathbf{r})F_j, \\ G_{ij}^{(0)}(\mathbf{r}) &= \frac{C}{E_0} \left[k_1 \ln |\mathbf{r} - \mathbf{r}_f| \delta_{ij} + \frac{k_2}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}_f|^2} (r - r_f)_i (r - r_f)_j \right]. \end{aligned} \quad (2.15)$$

Por otro lado, para encontrar la forma de $u_i^{(1)}(\mathbf{r})$ asociada con la ecuación (2.13), se usa la linealidad de la función de Green. Se separa el lado derecho en dos sumandos (f_1 y f_2), y se busca la función asociada a cada uno de ellos, es decir, $u_{f_1 i}^{(1)}(\mathbf{r}) = G_{f_1 ij}^{(1)}(\mathbf{r})F_j$ y $u_{f_2 i}^{(1)}(\mathbf{r}) = G_{f_2 ij}^{(1)}(\mathbf{r})F_j$. La forma final de $u_i^{(1)}(\mathbf{r})$ estará dada por la suma de ambas soluciones $u_i^{(1)}(\mathbf{r}) = u_{f_1 i}^{(1)}(\mathbf{r}) + u_{f_2 i}^{(1)}(\mathbf{r})$.

Para encontrar la expresión de $G_{f_1 ij}^{(1)}(\mathbf{r})$, el primer sumando del lado derecho de la ecuación (2.13), f_1 , se puede relacionar con $\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_f)F_i$ de la ecuación (2.12) de modo que

$$f_1 = -\frac{E_1(\mathbf{r})}{E_0} \left[\kappa_1 \frac{\partial^2 u_i^{(0)}}{\partial r_k^2} + \kappa_2 \frac{\partial^2 u_k^{(0)}}{\partial r_i \partial r_k} \right] = -\frac{E_1(\mathbf{r})}{E_0} \left(\frac{\zeta}{E_0} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_f) F_i \right), \quad (2.16)$$

por lo que para encontrar $G_{f_1 ij}^{(1)}(\mathbf{r})$ la ecuación a resolver es

$$\kappa_1 \frac{\partial^2 u_i^{(1)}}{\partial r_k^2} + \kappa_2 \frac{\partial^2 u_k^{(1)}}{\partial r_i \partial r_k} = \frac{\zeta E_1(\mathbf{r})}{E_0^2} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_f) F_i. \quad (2.17)$$

El resultado de la ecuación (2.17) dependerá del valor de $E_1(\mathbf{r})$ el cual es igual a 0 en todos los puntos del sustrato, menos en la franja delgada según su definición dada en la ecuación (2.10), y considerando que \mathbf{r}_f nunca está en la franja (debido a que la forma de las deformaciones encontrada deja de ser válida en esa zona), se concluye que el primer sumando no contribuye a la solución final.

Para el segundo sumando se debe utilizar el valor ya encontrado de $u_i^{(0)}$, y tras calcular las derivadas de las deformaciones correspondientes, la ecuación a resolver con f_2 es

$$\begin{aligned} \kappa_1 \frac{\partial^2 u_i^{(1)}}{\partial r_k^2} + \kappa_2 \frac{\partial^2 u_k^{(1)}}{\partial r_i \partial r_k} &= \frac{-a E_1 \delta_{xk} C}{E_0^2 (\mathbf{r} - \mathbf{r}_f)^2} \left(\frac{\delta(x+a) - \delta(x-a)}{a} \right) \times \\ &\quad \left\{ \overline{\kappa_1} [(k_1 + k_2) ((r - r_f)_i F_k + (r - r_f)_k F_i)] \right. \\ &\quad \left. + \left([\overline{\kappa_1} k_2 + \overline{\kappa_2} (k_1 + k_2)] \delta_{ik} - \overline{\kappa_1} k_2 \frac{(r - r_f)_i (r - r_f)_k}{(\mathbf{r} - \mathbf{r}_f)^2} \right) (r - r_f)_j F_j \right\}, \end{aligned} \quad (2.18)$$

la cual no corresponde a ninguna expresión previa, por lo que se debe convolucionar f_2 con la solución conocida de la función de Green para la delta de Dirac para encontrar $u_{f_2 i}^{(1)}(\mathbf{r})$. Luego, su solución es

$$\begin{aligned}
u_{f_2i}^{(1)}(\mathbf{r}) = & -\frac{C^2 a E_1}{\zeta E_0^2} \delta_{xj} \left\{ k_1 \bar{\kappa}_1 (k_1 + k_2) \delta_{ik} \left[F_k \int \frac{\log |\rho|(r' - r_f)_j}{a |\mathbf{r}' - \mathbf{r}_f|^2} [\delta(x' + a) - \delta(x' - a)] d^2 r' \right. \right. \\
& \left. \left. + F_j \int \frac{\log |\rho|(r' - r_f)_k}{a |\mathbf{r}' - \mathbf{r}_f|^2} [\delta(x' + a) - \delta(x' - a)] d^2 r' \right] \right. \\
& + k_1 (2\bar{\kappa}_1 k_2 + \bar{\kappa}_2 (k_1 + k_2)) \delta_{ik} \delta_{jk} \int \frac{\log |\rho|(r' - r_f)_\ell F_\ell}{a |\mathbf{r}' - \mathbf{r}_f|^2} [\delta(x' + a) - \delta(x' - a)] d^2 r' \\
& - 4k_1 \bar{\kappa}_1 k_2 \delta_{ik} \int \frac{\log |\rho|(r' - r_f)_j (r' - r_f)_i (r' - r_f)_\ell F_\ell}{a |\mathbf{r}' - \mathbf{r}_f|^4} [\delta(x' + a) - \delta(x' - a)] d^2 r' \\
& + k_2 \bar{\kappa}_1 (k_1 + k_2) \left[F_k \int \frac{\hat{\rho}_i \hat{\rho}_k (r' - r_f)_j}{a (r' - r_f)^2} [\delta(x' + a) - \delta(x' - a)] d^2 r' \right. \\
& \left. + F_j \int \frac{\hat{\rho}_i \hat{\rho}_k (r' - r_f)_k}{a |\mathbf{r}' - \mathbf{r}_f|^2} [\delta(x' + a) - \delta(x' - a)] d^2 r' \right] \\
& + k_2 (2\bar{\kappa}_1 k_2 + \bar{\kappa}_2 (k_1 + k_2)) \delta_{jk} \int \frac{\hat{\rho}_i \hat{\rho}_k (r' - r_f)_\ell F_\ell}{a |\mathbf{r}' - \mathbf{r}_f|^2} [\delta(x' + a) - \delta(x' - a)] d^2 r' \\
& \left. - 4k_2 \bar{\kappa}_1 k_2 \int \frac{\hat{\rho}_i \hat{\rho}_k (r' - r_f)_j (r' - r_f)_k (r' - r_f)_\ell F_\ell}{a |\mathbf{r}' - \mathbf{r}_f|^4} [\delta(x' + a) - \delta(x' - a)] d^2 r' \right\}, \quad (2.19)
\end{aligned}$$

donde $\rho = \mathbf{r} - \mathbf{r}'$. Para calcular las integrales se considera que al desarrollar las expresiones, muchas de ellas son pares y al estar multiplicadas por la diferencia de deltas su integral se anula. Por otro lado, se tomará el ancho de la franja $a \rightarrow 0$, pero como todos los términos son proporcionales a a^{-1} por la forma en que se definió la derivada parcial de $E_1(\mathbf{r})$, los numeradores proporcionales a a convergen y los proporcionales a un orden mayor se anulan. De esta manera el número de integrales a calcular y su dificultad se reduce, además todas ellas convergen.

Finalmente juntando $u_{f_1i}^{(1)}(\mathbf{r})$ y $u_{f_2i}^{(1)}(\mathbf{r})$ se concluye el valor de $u_i^{(1)}(\mathbf{r})$ como se detalló anteriormente. Dicho resultado al sumarlo con $u_i^{(0)}(\mathbf{r})$ permite concluir el valor de $u_i(\mathbf{r})$ cuando el sustrato tiene una franja más rígida,

$$\begin{aligned}
u_i(\mathbf{r}) = & \frac{C}{E_0} \left[k_1 \ln |\mathbf{r} - \mathbf{r}_f| \delta_{ij} + \frac{k_2}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}_f|^2} (r - r_f)_i (r - r_f)_j \right] F_j \\
& + \frac{C^2 a E_1 \pi}{\zeta E_0^2 |x|} \left\{ k_1 \bar{\kappa}_1 (k_1 + k_2) (-F_y \hat{y} - 2F_x \hat{x}) \log |4x^2| - k_1 [2\bar{\kappa}_1 k_2 + \bar{\kappa}_2 (k_1 + k_2)] F_x \hat{x} \log(4x^2) \right. \\
& - 2k_1 \bar{\kappa}_1 k_2 [3F_x \hat{x} (\log |4x^2| - 1) + F_y \hat{y} (\log |4x^2| + 1)] + \frac{k_2}{2} \bar{\kappa}_1 (k_1 + k_2) (-5F_x \hat{x} + F_y \hat{y}) \\
& \left. + \frac{k_2}{2} [2\bar{\kappa}_1 k_2 + \bar{\kappa}_2 (k_1 + k_2)] (-F_x \hat{x} + F_y \hat{y}) + 9 \frac{k_2}{2} \bar{\kappa}_1 k_2 F_x \hat{x} \right\}. \quad (2.20)
\end{aligned}$$

2.3. Respuesta del sustrato

2.3.1. Respuesta para fuerzas aplicadas en el mismo punto

En la sección anterior, se estudió la deformación de un sustrato cuando la fuerza se aplicaba en el punto \mathbf{r} . No obstante, si consideramos que la célula tendrá cuatro puntos de contacto, los que no estarán necesariamente en el origen, y tomando en cuenta la forma de la función de Green para placas delgadas, ecuación (2.6), que diverge para $r = 0$, es preciso hacer un cálculo más general para entender cómo se deforma el sustrato. Para ello se considera que se aplica una fuerza \mathbf{F}_1 en \mathbf{r}_1 como se observa en la figura 2.3 y se estudia la deformación promedio (u_{1i}) en un disco de superficie $A_1 = \pi R_1^2$ en torno al punto \mathbf{r}_1 , donde R_1 se escoge de modo que sea del orden del largo de las protrusiones de la célula,

$$u_{1 \rightarrow 1i}(\mathbf{r}) = \frac{1}{A_1} \int_{A_1} G_{ij}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_1) F_{1j} d^2\mathbf{r}. \quad (2.21)$$

donde $G_{ij}(\mathbf{r})$ es la función de Green para placas delgadas.

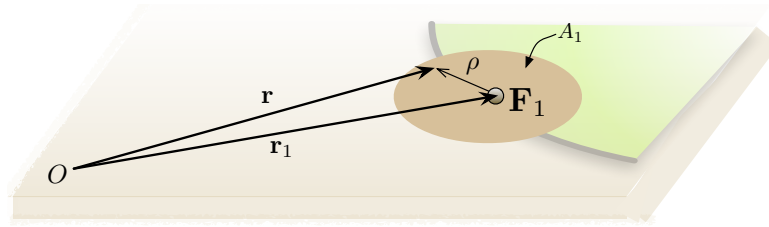


Figura 2.3: Disco de superficie A_1 sobre el sustrato, en este caso en torno al punto \mathbf{r}_1 parte de la célula, donde se calculará la deformación producida por una fuerza puntual en el centro del disco, \mathbf{F}_1 . O es el origen del sistema, \mathbf{r} es el punto que recorrerá el disco y $\rho = \mathbf{r} - \mathbf{r}_1$.

Sustratos homogéneos

Para completar el cálculo se usa el cambio de variables $\rho = \mathbf{r} - \mathbf{r}_1$ de modo que al integrar se consideren los puntos dentro del disco $\rho \in (0, R_1)$, y el resultado es

$$u_{1 \rightarrow 1i}(\mathbf{r}) = \frac{C}{E} \left[k_1 \log \left(\frac{R_1}{\sqrt{e}} \right) + \frac{k_2}{2} \right] F_{1i}, \quad (2.22)$$

donde C , E , k_1 y k_2 son las mismas constantes de la ecuación (2.7) y e es el número de Euler.

Sustratos no homogéneos

Cuando los sustratos no son homogéneos se considera la ecuación (2.20) la cual tiene como primer sumando la componente homogénea ya estudiada en un disco en la sección anterior, y otra serie de sumandos que dependen de la fuerza \mathbf{F} en el punto y de la posición de la extremidad (x, y) , expresión que define

funciones del tipo $f_{\text{conv}_{ij}}(\mathbf{r})$ correspondientes a la fuerza F_i ejercida en la dirección \hat{j} para el punto \mathbf{r} .

$$f_{\text{conv}_{xx}}(\mathbf{r}) = \frac{C^2 a E_1 \pi}{\zeta E_0 |x|} \left\{ -2k_1 \bar{\kappa}_1 (k_1 + k_2) \log(4x^2) - k_1 [2\bar{\kappa}_1 k_2 + \bar{\kappa}_2 (k_1 + k_2)] \log(4x^2) \right. \\ \left. - 6k_1 \bar{\kappa}_1 k_2 [\log(4x^2) - 1] - 5 \frac{k_2}{2} \bar{\kappa}_1 (k_1 + k_2) - \frac{k_2}{2} [2\bar{\kappa}_1 k_2 + \bar{\kappa}_2 (k_1 + k_2)] + 9 \frac{k_2}{2} \bar{\kappa}_1 k_2 \right\},$$

$$f_{\text{conv}_{yy}}(\mathbf{r}) = \frac{C^2 a E_1 \pi}{\zeta E_0 |x|} \left\{ -k_1 \bar{\kappa}_1 (k_1 + k_2) \log(4x^2) - 2k_1 \bar{\kappa}_1 k_2 [\log(4x^2) + 1] + \frac{k_2}{2} \bar{\kappa}_1 (k_1 + k_2) \right. \\ \left. + \frac{k_2}{2} [2\bar{\kappa}_1 k_2 + \bar{\kappa}_2 (k_1 + k_2)] \right\},$$

$$f_{\text{conv}_{xy}}(\mathbf{r}) = f_{\text{conv}_{yx}}(\mathbf{r}) = 0. \quad (2.23)$$

2.3.2. Respuesta para fuerzas aplicadas sobre otro punto

En la sección anterior, se estudió cómo se deforma el sustrato cuando se aplica la fuerza en un mismo punto donde se quiere estudiar su deformación. A continuación se entenderá cómo se deforma el sustrato, pero ya no en el mismo punto donde se aplicó la fuerza, si no en aquellos que se encuentran cerca. En particular, los puntos de interés cercanos son los que se encuentran en los demás vértices. En otras palabras, se estudia cómo la fuerza aplicada en uno de los vértices deforma al sustrato bajo los otros tres restantes.

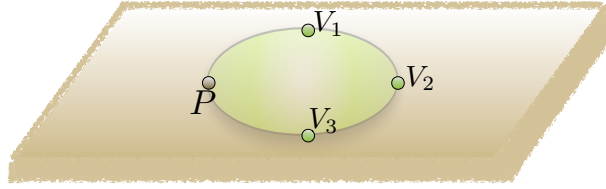


Figura 2.4: Para el caso de una célula ubicada en P los otros puntos a considerar serán V_1 , V_2 y V_3 , es decir, aquellos donde se aplicará las otras fuerzas.

Se procede de forma similar a la sección 2.3.1. Se debe promediar sobre el disco de interés centrado en \mathbf{r}_1 y superficie $A_1 = \pi R_1^2$ la fuerza \mathbf{F}_2 aplicada en \mathbf{r}_2 , que corresponde a uno de los puntos cercanos, como se muestra en la figura 2.5. Es decir

$$u_{2 \rightarrow 1i}(\mathbf{r}) = \frac{1}{A_1} \int_{A_1} G_{ij}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_2) F_{2j} d^2 \mathbf{r}, \quad (2.24)$$

donde $G_{ij}(\mathbf{r})$ es la función de Green de la ecuación (2.7).

Para calcular la integral de la ecuación (2.24) se usa el mismo cambio de variables señalado en la sección 2.3.1, $\rho = \mathbf{r} - \mathbf{r}_1$, además de $\Delta = \mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2$ con $|\rho| \ll |\Delta|$. Esta última aproximación se usará para simplificar el cálculo, y está bien justificada, ya que los discos de sustrato a estudiar deben ser considerablemente más

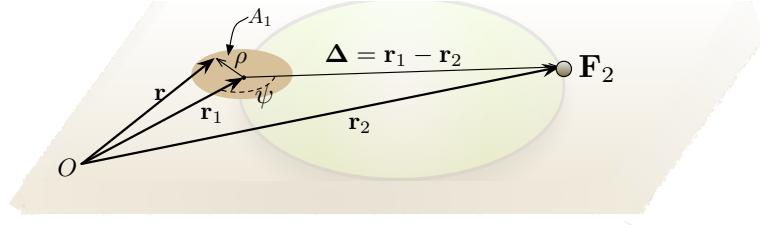


Figura 2.5: Disco de superficie A_1 centrado en \mathbf{r}_1 correspondiente a uno de los vértices de la célula. La deformación la produce una fuerza \mathbf{F}_2 en el punto \mathbf{r}_2 . O es el origen del sistema, \mathbf{r} el punto que recorrerá el disco y $\rho = \mathbf{r} - \mathbf{r}_1$.

pequeños que la distancia entre los puntos vecinos. Luego, la integral a calcular es

$$\begin{aligned}
 u_{2 \rightarrow 1i}(\mathbf{r}) &= \frac{1}{A_1} \int_{A_1} G_{ij}(\rho + \Delta) F_{2j} d^2\mathbf{r} \\
 &= \frac{1}{A_1} \int_0^{R_1} \int_0^{2\pi} \frac{C}{E} \left[k_1 \ln |\rho + \Delta| \delta_{ij} + \frac{k_2}{|\rho + \Delta|^2} (\rho + \Delta)_i (\rho + \Delta)_j \right] F_{2j} \rho d\theta d\rho, \quad (2.25)
 \end{aligned}$$

donde

$$\begin{aligned}
 |\rho + \Delta| &= |(\rho \cos(\theta) + \Delta \cos(\psi))\hat{x} + (\rho \sin(\theta) + \Delta \sin(\psi))\hat{y}| \\
 &= \sqrt{\rho^2 + \Delta^2 + 2\rho\Delta \cos(\theta - \psi)} \\
 &\approx \Delta \left(1 + \frac{\rho}{\Delta} \cos(\theta - \psi) + \frac{\rho^2}{\Delta^2} \right), \quad (2.26)
 \end{aligned}$$

si se usa $|\rho| \ll |\Delta|$, y

$$(\rho + \Delta)_i (\rho + \Delta)_j = \Delta_i \Delta_j + \Delta_i \rho_j + \Delta_j \rho_i + \rho_i \rho_j, \quad (2.27)$$

donde Δ_i y Δ_j pueden tomar los valores de $\Delta \sin \psi$ o $\Delta \cos \psi$ y ρ_i y ρ_j los de $\rho \sin \theta$ o $\rho \cos \theta$ dependiendo si i y j toman los valores de x o y . Analizando cada uno de los casos y calculando todas las integrales correspondientes se encuentra una matriz que relaciona las deformaciones de \mathbf{u}_1 con la fuerza aplicada \mathbf{F}_2

$$\mathbf{u}_{2 \rightarrow 1}(\mathbf{r}) = \begin{pmatrix} u_{1x}(\mathbf{r}) \\ u_{1y}(\mathbf{r}) \end{pmatrix} = \frac{C}{E} \begin{pmatrix} k_1 \ln |\Delta| + k_2 \left(\frac{1}{2} + \frac{x^2 - y^2}{2\Delta^2} \right) & k_2 \frac{xy}{2\Delta^2} \\ k_2 \frac{xy}{2\Delta^2} & k_1 \ln |\Delta| + k_2 \left(\frac{1}{2} - \frac{x^2 - y^2}{2\Delta^2} \right) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} F_{2x} \\ F_{2y} \end{pmatrix}, \quad (2.28)$$

donde $x = \Delta \cos \psi$ e $y = \Delta \sin \psi$.

Sustratos no homogéneos

Para estudiar cómo una franja deforma al sustrato cuando se aplica una fuerza en un punto cercano, es necesario hacer las convoluciones, pero tomando las fuerzas puntuales en los otros vértices. Dicho término se despreciará considerando que el cambio que podría hacer en el resultado final es solo cuantitativo, ya

que cualitativamente las deformaciones del sustrato debido a los puntos cercanos, quedan bien descritas por la sección previa. Adicionalmente, dado que el producto $aE_1 \sim \mathcal{O}(\varepsilon)$ el término extra será de un orden menor al calculado para un sustrato homogéneo. En la figura 2.6 se observa un diagrama que da cuenta de las funciones de Green entre puntos. El término que se desprecia es el (IV) que corresponde a la interacción entre puntos distintos en presencia de una franja.

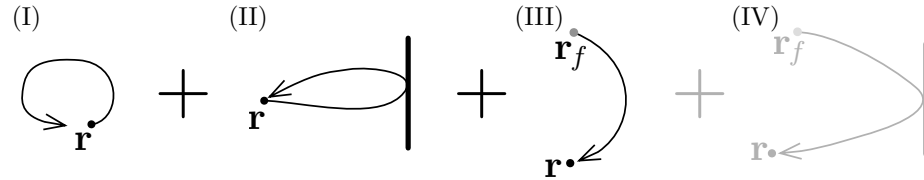


Figura 2.6: En el diagrama se da cuenta de los términos que contribuyen a la deformación del sustrato. (I) Representa la función de Green aplicada en el mismo punto donde se produce la fuerza. (II) Corresponde a la función de Green en presencia de una muralla, la cual es convolucionada una vez. (III) Da cuenta de la función de Green entre dos puntos ubicados en \mathbf{r} y \mathbf{r}_f . (IV) Corresponde al término en presencia de una pared convolucionado una vez que da cuenta de la función de Green entre dos puntos. Este término se ignora ya que los cambios al considerarlo solo serían cuantitativos.

2.4. Resumen

Con los resultados obtenidos en este capítulo se concluye que cuando hay una franja más rígida en el sustrato, la deformación $\mathbf{u}_n(\mathbf{r}_n)$ bajo cada vértice \mathbf{r}_n es

$$\mathbf{u}_n(\mathbf{r}_n) = \begin{pmatrix} u_{nx} \\ u_{ny} \end{pmatrix} = \frac{C}{E_0} \begin{pmatrix} \left[k_1 \ln \left(\frac{R_n}{\sqrt{e}} \right) + \frac{k_2}{2} \right] + f_{\text{conv}_{xx}}(r_n) & f_{\text{conv}_{xy}}(r_n) \\ f_{\text{conv}_{yx}}(r_n) & \left[k_1 \ln \left(\frac{R_1}{\sqrt{e}} \right) + \frac{k_2}{2} \right] + f_{\text{conv}_{yy}}(r_n) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} F_{nx} \\ F_{ny} \end{pmatrix} \\ + \sum_{p \neq n} \frac{C}{E_0} \begin{pmatrix} k_1 \ln |\Delta| + k_2 \left(\frac{1}{2} + \frac{\Delta_x^2 - \Delta_y^2}{2\Delta^2} \right) & k_2 \frac{\Delta_x \Delta_y}{2\Delta^2} \\ k_2 \frac{\Delta_x \Delta_y}{2\Delta^2} & k_1 \ln |\Delta| + k_2 \left(\frac{1}{2} + \frac{\Delta_y^2 - \Delta_x^2}{2\Delta^2} \right) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} F_{px} \\ F_{py} \end{pmatrix}. \quad (2.29)$$

donde $\mathbf{r}_n = x_n \hat{x} + y_n \hat{y}$, $\Delta_x = x_n - x_p$, $\Delta_y = y_n - y_p$ y $\Delta = |\mathbf{r}_n - \mathbf{r}_p|$.

Los valores de las constantes:

- $\mathbf{u}_n = (u_{nx}, u_{ny})$: Deformación del sustrato en el punto \mathbf{r}_n .
- (F_{nx}, F_{ny}) : Fuerza aplicada sobre el sustrato en el vértice n .
- E_0 : Módulo de Young para sustratos homogéneos
- $(C, k_1, k_2) = \left(\frac{1+\sigma}{4\pi h}, \sigma - 3, \sigma + 1 \right)$: Constantes asociadas a la función de Green para sustratos homogéneos con σ coeficiente de Poisson y h espesor de la placa.
- $R_1 = \sqrt{\frac{A_1}{\pi}}$: Radio del parche de área A_1 para calcular la deformación promedio debido a una fuerza puntual aplicada en su centro.
- $f_{\text{conv}_{ij}}(\mathbf{r})$: Términos de la ecuación (2.20) que dan cuenta de la deformación del sustrato debido a una franja de módulo de Young mayor. Las funciones completas están definidas en la ecuación (2.23).

En el siguiente capítulo se usarán los resultados calculados para entender cómo interactúan las deformaciones del sustrato con una célula y si ésta pueda desplazarse.

Capítulo 3

Modelo: Célula de cuatro puntos de contactos

Al inicio del capítulo anterior se dieron algunos detalles del modelo a considerar. En este capítulo se propondrá la forma en que ocurre el desplazamiento de la célula.

3.1. Ecuaciones y dinámica

La ecuación (2.29) del capítulo anterior muestra el caso más general de deformación del sustrato en el punto n debido a las fuerzas aplicadas en el mismo punto y en los otros cercanos. En lo sucesivo, se usará esa expresión para la deformación de los sustratos que guiará el movimiento de la célula.

A continuación se presenta la dinámica de la célula. Ésta será descrita mediante un ciclo de cuatro pasos. Como condición inicial la célula comienza con los cuatro vértices apoyados en el sustrato, el cual no se encuentra bajo ninguna deformación.

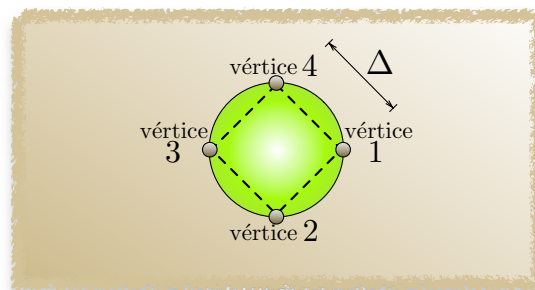


Figura 3.1: Vista superior de la célula depositada en el sustrato y la numeración de sus vértices que se usarán para describir dinámica de la misma. Δ denota la distancia de separación entre los vértices contiguos.

3.1.1. Dinámica

I Levantamiento de vértice

El ciclo comienza escogiendo aleatoriamente alguno de los vértices $p \in \{1, 2, 3, 4\}$. Éste se levanta anulando la fuerza que antes se estaba ejerciendo sobre el sustrato. Puesto de otro modo,

$$\mathbf{u}_{n \neq p}^I = \mathbf{u}_{n \neq p}^{IV}, \quad \mathbf{F}_{n \neq p}^I = \mathbf{F}_{n \neq p}^{IV}, \quad \mathbf{F}_p^I = 0, \quad (3.1)$$

donde $\mathbf{F}_{n \neq p}^{IV}$ y $\mathbf{u}_{n \neq p}^{IV}$ corresponden a la fuerzas y las deformaciones después del último paso del ciclo anterior. Cabe mencionar que cuando se inicia el proceso, como la célula es ubicada sin deformar el sustrato, todos los valores $\mathbf{F}_{n \neq p}^I$ y $\mathbf{u}_{n \neq p}^I$ son nulos. En este paso no hay desplazamiento del centro de masa (centro geométrico del disco).

II Primera relajación

Debido al levantamiento de uno de los vértices, la suma de las fuerzas que la célula ejerce sobre el sustrato deja de ser nula, por lo que el sistema se desequilibra. Como consecuencia, el centro de masa debe desplazarse para que la suma de las fuerzas vuelva a ser cero. Para ello se busca un vector \mathbf{a} que se suma a $\mathbf{u}_{n \neq p}$. Con los desplazamientos resultantes se calculan las fuerzas usando la ecuación (2.29) y se impone que su suma sobre todos los vértices $n \neq p$ sea nula para despejar \mathbf{a} . Luego,

$$\begin{aligned} \mathbf{u}_{n \neq p}^{II} &= \mathbf{u}_{n \neq p}^I + \mathbf{a}, \quad \mathbf{F}_{n \neq p}^{II} \propto \mathbf{u}_{n \neq p}^I + \mathbf{a}, \quad \mathbf{F}_p^{II} = 0, \\ \sum \mathbf{F}_{n \neq p}^{II} &= 0. \end{aligned} \quad (3.2)$$

El vector \mathbf{a} dará cuenta del desplazamiento del centro de masa. Notar que tras ese movimiento el sustrato bajo p quedará deformado debido a las fuerzas en los otros puntos. Una vez más cabe mencionar que al inicio del proceso, debido a que las fuerzas en todos los vértices son nulas, al levantarse uno de ellos en el paso (I) la fuerza seguirá siendo nula, por lo que en ese caso no existe el proceso de relajación ni desplazamiento del centro de masa.

III Estiramiento de la protrusión, apoyo y contracción

El vértice escogido en el paso (I) se extiende y apoya a una distancia δ de su posición original lo que simula la protrusión de la célula en la dirección de ese vértice. Dichos movimientos no modifican ni los valores de \mathbf{u} ni de \mathbf{F} ya que no se ejerce ninguna fuerza nueva en el sustrato.

Posteriormente, se produce la contracción de la protrusión de manera que la célula recupere su forma original. Durante el capítulo se estudiarán dos formas de contracción, una de ellas sin deslizamiento sobre el sustrato y la otra con deslizamiento. Para el caso con deslizamiento se debe hacer un procedimiento distinto que se detallará más adelante. Para el primer caso, la protrusión ejerce una fuerza, que depende del campo de deformaciones resultante según la ecuación (2.29), por lo que la suma de las fuerzas nuevamente es distinta de 0. Luego, para el caso sin deslizamiento se cumple

$$\begin{aligned} \mathbf{u}_p^{III} &= \mathbf{u}_p^{II} - \delta \hat{\delta}, \quad \mathbf{F}_p^{III} \neq 0, \quad \mathbf{u}_{n \neq p}^{III} = \mathbf{u}_{n \neq p}^{II}, \quad \mathbf{F}_{n \neq p}^{III} = \mathbf{F}_{n \neq p}^{II}, \\ \sum \mathbf{F}_n^{III} &\neq 0. \end{aligned} \quad (3.3)$$

IV Segunda relajación

Al igual que en el paso (II), para volver al equilibrio se debe recuperar la suma nula de las fuerzas. Nuevamente se procede sumando un vector, \mathbf{b} , a los vectores \mathbf{u} e imponiendo que la suma de las fuerzas sea cero.

$$\mathbf{u}_n^{\text{IV}} = \mathbf{u}_n^{\text{III}} + \mathbf{b}, \quad \mathbf{F}_n^{\text{IV}} \propto \mathbf{u}_n^{\text{III}} + \mathbf{b},$$
$$\sum \mathbf{F}_n^{\text{IV}} = 0. \quad (3.4)$$

Este proceso también genera un desplazamiento del centro de masa.

Al terminar esta segunda relajación el ciclo vuelve al paso (I), y se repite un número de veces determinada. En la figura 3.2 se presenta un resumen gráfico de los cuatro pasos de la dinámica recién descrita.

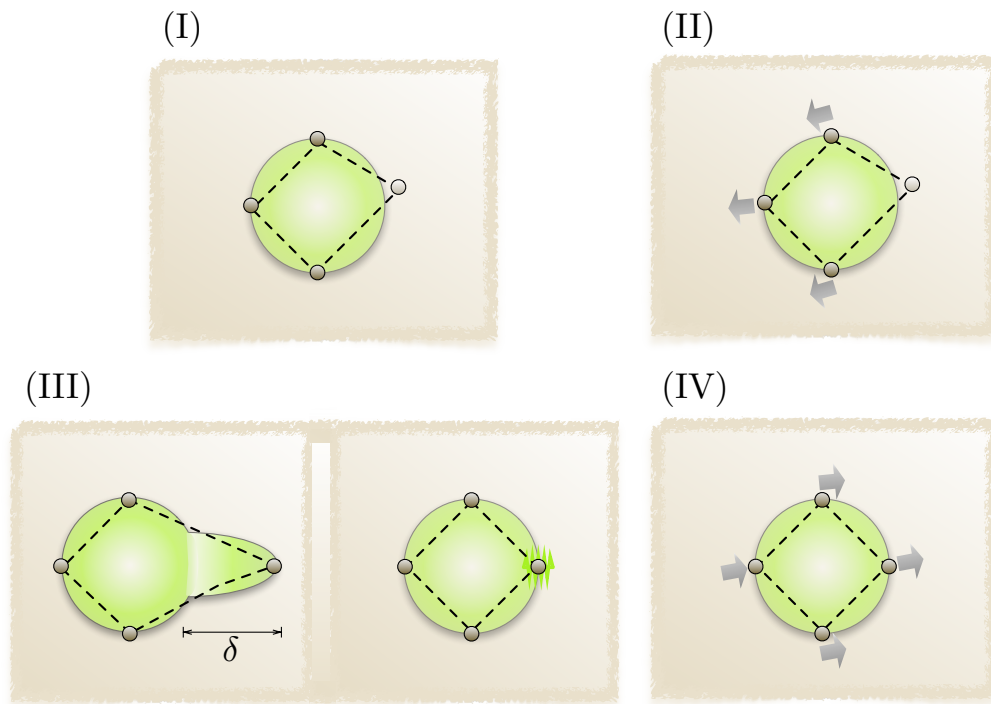


Figura 3.2: (I) Se levanta uno de los vértices permitiendo que el sustrato de la misma zona relaje. (II) La célula se desplaza para que la suma de las fuerzas sobre el sustrato vuelva a ser nula. (III) La protrusión elonga, se apoya nuevamente en el sustrato y se contrae. (IV) Debido a que en el paso anterior el sustrato queda tenso, la célula vuelve a relajar.

Cabe destacar que al término de cada ciclo el centro de masa de la célula se ha desplazado $\mathbf{a} + \mathbf{b}$. Además, el proceso usa números aleatorios en dos momentos; cuando se escoge el vértice que dará origen a la protrusión, y cuando se asigna la distancia δ a extenderse, que como se explicará más adelante, no tiene un valor fijo.

3.2. Valores de la célula y constantes

Tomando en cuenta que las simulaciones se hacen con el objetivo de entender mejor el fenómeno a reproducir, es importante considerar las dimensiones presentes en el experimento. A continuación se detallan los valores a usar.

3.2.1. Dimensiones de la célula

- **Tamaño células (R_c):** $30 \mu\text{m}$
El tamaño de la célula en el modelo corresponderá al de las *Deep Cell Layer* (DCL), células que se busca reproducir. Éstas están presente durante los primeros estadios del pez anual. [Reig, 2017]
- **Tamaño de protrusión (δ):** $10 \pm 4 \mu\text{m}$
El desplazamiento de las células está caracterizado por protrusiones en diferentes direcciones cuyas extensiones son del orden de $10 \mu\text{m}$. Pese a que el modelo simplificado solo considerará las extensiones en cuatro direcciones, se usará que sean del orden de las observadas experimentalmente y tendrán una dispersión de $\pm 4 \mu\text{m}$. (Análisis propio de videos proporcionados por [Reig, 2017])

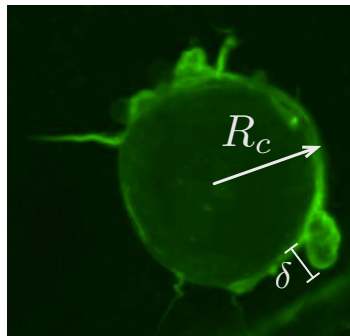


Figura 3.3: Imágen de DCL observada mediante microscopía. En la figura se muestra su radio R_c y las protrusiones del orden de δ . [Reig, 2017]

- **Tamaño del parche (R_1):** $5 \mu\text{m}$
Como se observó en el capítulo anterior, para calcular la deformación promedio ejercida por una fuerza puntual, se usa un parche en la vecindad del punto de interés. Se considerará que su tamaño esté entre el 10 % y 20 % del de la célula. (Aproximado a partir de análisis propio de videos proporcionados por [Reig, 2017])
- **Espesor del sustrato (h):** $1 \mu\text{m}$
Tomando en cuenta que el espesor es mucho menor que el resto de las dimensiones, se usará un sustrato tipo placa delgada. [Reig, 2017]
- **Módulo de Young (E_0):** 20 kPa
Pese a que en biología la dureza de los tejidos abarca un amplio espectro de valores, se tomará en cuenta un valor intermedio que corresponde al que usualmente tienen las células sustrato. [Reig, 2017]
- **Módulo de Young (en la franja) (aE_1):** $50 - 500 \text{ kPa } \mu\text{m}$
Con el objetivo de estudiar la presencia de una franja más dura, se considerarán valores que varíen entre 2.5 y 25 veces más dura para una franja de ancho $1 \mu\text{m}$. Si la franja fuese de $5 \mu\text{m}$ correspondería a una fuerza hasta 5 veces mayor.

- **Coefficiente de Poisson (σ):** 0.5

Para esta constante se consideró un valor referencial detallado en [Walcott and Sun, 2010], que corresponde al de materiales perfectamente incompresibles.

- **Tiempo de ciclo (t):** 18 min

Se usan datos experimentales para aproximar cuánto tarda una protrusión real de las DCL en extenderse y contraerse [Cerdea, 2017]. Cabe mencionar que este dato es útil si se quiere comparar los resultados obtenidos con los medidos experimentalmente.

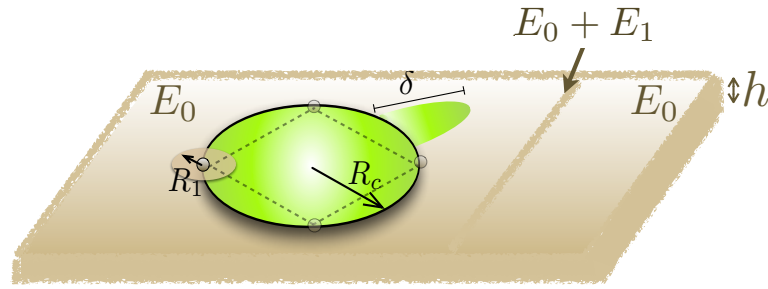


Figura 3.4: Sistema con dimensiones. E_0 y E_1 dan cuenta del módulo de Young del sustrato completo y la franja. R_c y R_1 dan cuenta de los radios de la célula y de la vecindad de cada vértice respectivamente y δ del tamaño de la protrusión realizada.

3.2.2. Valores de constantes

Tomando en cuenta las constantes que aparecen en la ecuación (2.29) y que guiarán la dinámica de la célula, se detallan a continuación sus valores.

- $C = \frac{1+\sigma}{8\pi(1-\sigma)} \approx 0,12$
- $(k_1, k_2) = (\sigma - 3, \sigma + 1) \approx (-2,5, 1,5)$
- $\zeta = \frac{-2(1-\sigma^2)}{h} \approx -1.5 \mu\text{m}^{-1}$
- $(\bar{k}_1, \bar{k}_2) = \left(\frac{1}{2(1+\sigma)}, \frac{\sigma}{1-\sigma^2} \right) \approx (0,34, 1,34)$

3.3. Célula que recoge protrusiones sin deslizar

A continuación se revisa el escenario donde las protrusiones se recogen sin deslizar sobre el sustrato, es decir, solo lo generando un campo de deformación sobre éste. En este caso, el ciclo que siguen las células para movilizarse es exactamente el de cuatro pasos detallado al inicio del capítulo. Se comenzará con el caso de un sustrato homogéneo y se proseguirá revisando como cambian los resultados en presencia de una franja delgada. Cabe mencionar que para las simulaciones se usó un código en Mathematica.

3.3.1. Sustrato homogéneo

En un sustrato homogéneo la matriz de interacción está formada por los términos de la ecuación (2.29) con los términos debido a la convolución f_{convij} nulos. Para estudiar el movimiento de una célula en un sustrato homogéneo se usaron inicialmente 1000 ciclos. Los resultados muestran que no hay direcciones privilegiadas de movimiento, es decir se observa una caminata aleatoria, lo que se aprecia en las figuras 3.5 y 3.6

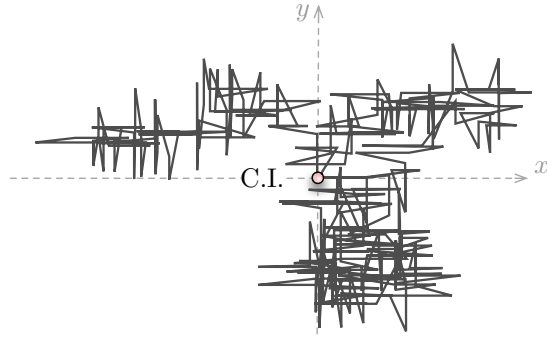


Figura 3.5: En la figura se muestra la trayectoria seguida por la célula en los primeros 200 ciclos de la simulación. El punto en rojo señala la condición inicial. Los datos usados corresponden a los de la sección 3.2 con $E = E_0$.

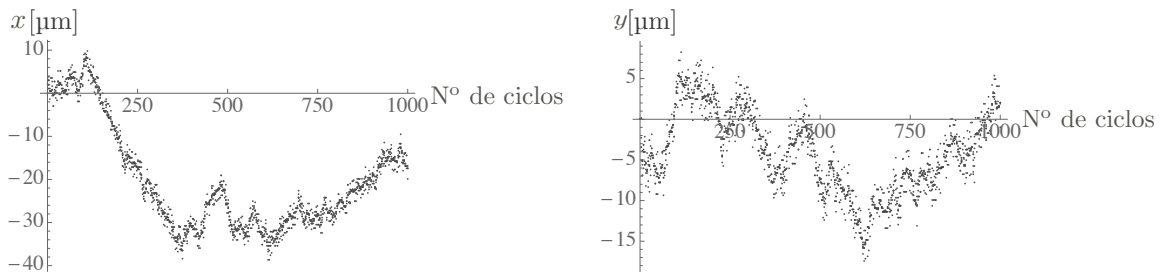


Figura 3.6: Para los mismos datos de la figura 3.5, pero tomando los primeros 1000 ciclos. Izquierda: Distancia recorrida en x en micrones. Derecha: Distancia recorrida en y en micrones.

Es importante mencionar que a pesar de que los resultados mostrados son para una sola secuencia de números aleatorios, para otros valores los resultados muestran el mismo comportamiento de un caminante aleatorio.

Estudio del coeficiente de difusión

Considerando los datos obtenidos, se estudió si la célula se movía de forma difusiva. Para lo anterior se examinó como variaban los resultados si los largos de las protrusiones eran más o menos dispersos, es decir, $\delta = \delta_0 + \delta_1 \mathbf{U}(-1, +1)$, donde $\delta_0 = 10 \mu\text{m}$, δ_1 entre $0 - 4 \mu\text{m}$ y \mathbf{U} la distribución uniforme entre -1 y $+1$. Para estas simulaciones se incrementó la estadística corriendo cincuenta mil ciclos con catorce secuencias de números aleatorios diferentes. Debido a que el cálculo de desplazamientos cuadráticos medios requiere mayor estadística, solo se promediaron los datos entre mil y cuatro mil ciclos, permitiendo que en los primeros

el sistema relajara. El coeficiente de difusión D_i se calculó del ajuste lineal del gráfico de desplazamiento cuadrático medio $\langle r_i^2 \rangle$ para $i = x, y$ en el tiempo, de modo que la pendiente fuese igual a $2D_i$.

$$\delta_1 = 0$$

Para el caso $\delta_1 = 0$, es decir, todas las protrusiones de igual largo, la célula se desplaza durante los primeros pasos y luego se queda estancada en un punto estable. Este resultado llama la atención puesto que el orden de los pasos es completamente aleatorio.

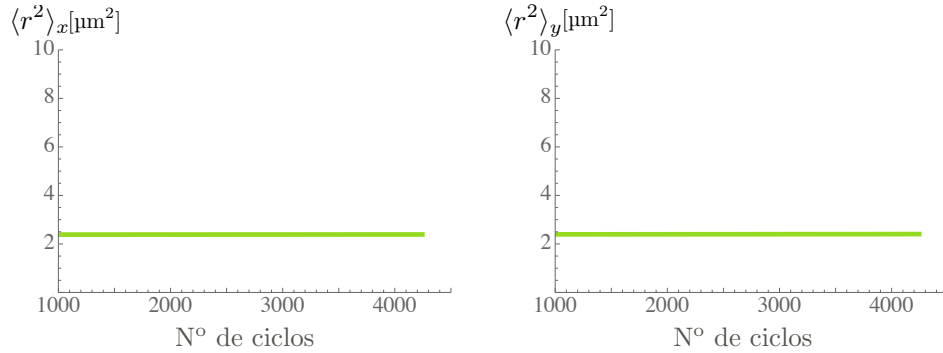


Figura 3.7: Izquierda: Desplazamientos cuadráticos medios en x , valor de $D_{0x} = 0 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$. Derecha: Desplazamientos cuadráticos medios en y , valor de $D_{0y} = 0 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$. Los resultados permiten apreciar la existencia de un punto estable para los casos en que todas las protrusiones tienen el mismo largo.

Dado los resultados obtenidos para el valor de $\delta_1 = 0 \mu\text{m}$, en la figura 3.8 se grafican las trayectorias que permiten visualizar la existencia de dicho punto estable. Esto se produce porque al hacer todas las protrusiones del mismo largo, la célula deforma una misma porción del sustrato en cada ciclo, que al relajarse retorna al mismo punto haciéndola oscilar en torno a éste. En cambio, cuando los largos de δ son diferentes, la célula deforma el sustrato de manera distinta cada vez, provocando el desplazamiento de la misma.

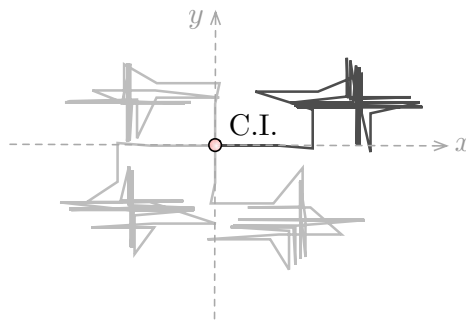


Figura 3.8: La figura muestra las trayectorias para 200 ciclos con $\delta_1 = 0$, para cuatro condiciones iniciales diferentes y orden de pasos aleatorios. Para todos los casos se observa que tras los primeros ciclos la célula se estanca en un punto estable que dependerá de la dirección de los primeros movimientos.

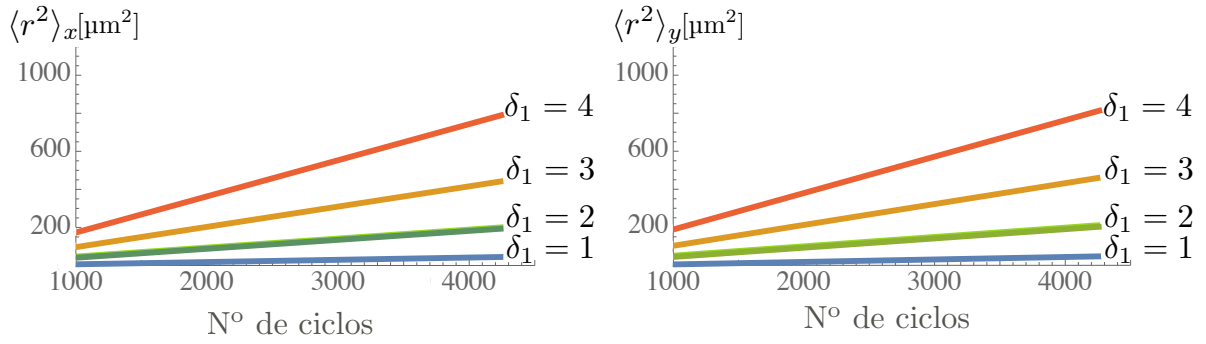


Figura 3.9: Desplazamientos cuadráticos medios en función del número de ciclos para cuatro valores diferentes de δ_1 . Izquierda: En x , los valores de los coeficientes de difusión son: $D_{1x} = 0.006 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$; $D_{2x} = 0.024 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$; $D_{3x} = 0.053 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$; $D_{4x} = 0.095 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$. Derecha: En y , los valores de los coeficientes de difusión son: $D_{1y} = 0.006 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$; $D_{2y} = 0.025 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$; $D_{3y} = 0.054 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$; $D_{4y} = 0.096 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$.

Los resultados obtenidos se pueden resumir en la figura 3.10.

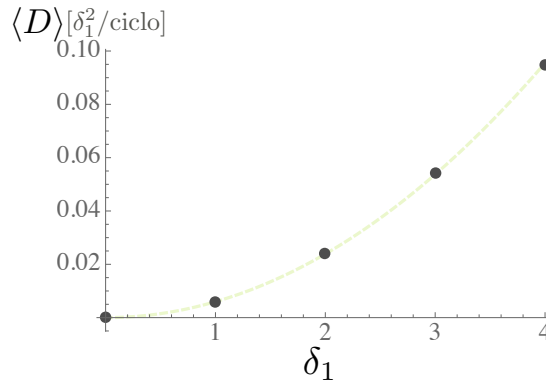


Figura 3.10: Valor de los coeficientes de difusión ($\langle D \rangle = (D_x + D_y)/2$) para los distintos valores de δ_1 . El ajuste en verde corresponde a $D = 0,006\delta_1^2/\text{ciclo}$.

La figura 3.9 en conjunto con el resumen (figura 3.10) demuestra que las protrusiones son más eficientes cuando la dispersión de sus largos es mayor, es decir, entre más distintos son los largos de las protrusiones más difunde la célula, lo cuál se condice con lo descrito en la literatura [Raposo et al., 1991]. El número de semillas considerado fue tal que los coeficientes de difusión en D_x y D_y coincidieran como se espera debido a la isotropía del sistema. No obstante, para algunas de esas secuencias de números aleatorios las diferencias entre ambos coeficientes era significativa como se puede ver en la figura 3.11. El hecho de tener que tomar 14 semillas diferentes da cuenta de que la coincidencia entre D_x y D_y no se alcanza tan rápidamente, lo que demuestra que a pesar de la aleatoriedad del proceso, en cada semilla de valores, la célula podía difundir más en una dirección que en la otra.

Los resultados obtenidos se pueden contrastar con el coeficiente de difusión experimental calculado para la zona de caminante aleatorio de la trayectoria de la figura 1.5. Para dicho seguimiento se obtiene $D_{\text{exp}} = 0.065 \mu\text{m}^2/\text{min}$. Por otro lado, considerando que cada ciclo es del orden de 18 min, el coeficiente de difusión

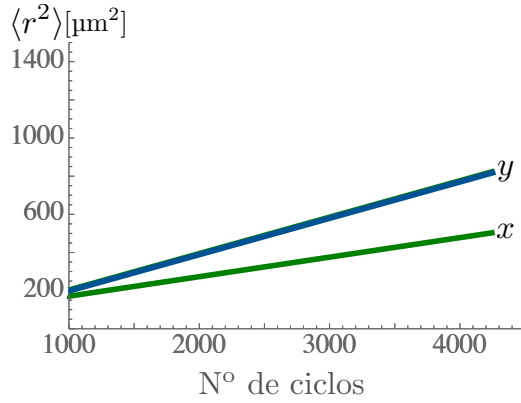


Figura 3.11: Desplazamientos cuadráticos medios en x , color verde, valor de coeficiente de difusión asociado $D_{4x} = 0.051 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$; y desplazamientos cuadráticos medios en y , color azul, valor de $D_{4y} = 0.095 \mu\text{m}^2/\text{ciclo}$. Se observa que para esta semilla en particular la diferencia entre los coeficientes de difusión es significativa, lo que hace necesario usar un gran número de ellas para alcanzar la convergencia entre D_x y D_y

numérico obtenido es $D_{\text{sim}} = 0.011 \mu\text{m}^2/\text{min}$. Es decir, son del mismo orden e incrementando la estadística del coeficiente de difusión experimental, los valores podrían acercarse más. Adicionalmente, se puede usar el valor de D_{exp} para calcular de que orden deberían ser los δ_1 para reproducir el mismo coeficiente de difusión, y se concluye que el $\delta_{1\text{exp}} = 13.96 \mu\text{m}$, lo que demuestra que es necesario contar con más datos experimentales para hacer observaciones y comparaciones más precisas.

Cabe mencionar también que, en nuestro modelo, al modificar el módulo de Young E los resultados no cambian, ya que solo se modifica la fuerza aplicada sobre el sustrato pero no las extensiones de las protrusiones ni las deformaciones del sustrato.

Hasta el momento se ha descrito el modelo de un sistema que se comporta como un caminante aleatorio cuando hace protrusiones sobre un sustrato homogéneo. Además, su difusión depende de la dispersión del largo de pasos, siendo nula si son todos de la misma extensión, y aumentando entre más distintos sean los largos entre ellos. A continuación se procede a hacer un estudio del modelo en sustratos no homogéneos.

3.3.2. Sustrato no homogéneo

Para estas simulaciones se usó la presencia de una franja delgada en $x = 0$. En este caso, los términos $f_{\text{conv}ij}$ de la ecuación (2.29) no se anulan. Para dichas expresiones, las constantes que acompañan a los resultados de las integrales (ecuación 2.20) son combinaciones de los términos cuyos valores fueron enlistados en la sección 3.2.2. Se estudiaron los desplazamientos en x donde se espera que la franja tenga un efecto. Para ello se evaluaron distintos valores de aE_1 que da cuenta de la dureza de la franja y de x_{inicial} correspondiente a la distancia inicial de la célula en el eje x como se observa en la figura 3.12.

En las figuras 3.13 y 3.14 se muestran los resultados obtenidos.

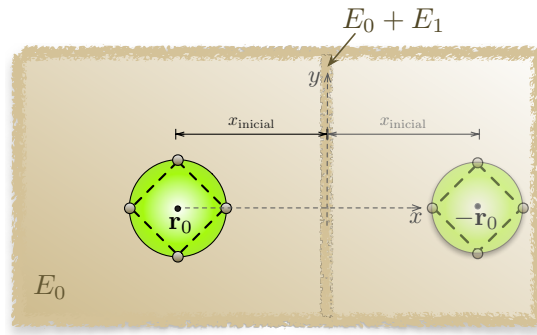


Figura 3.12: En la figura un esquema de la condición inicial del sistema. Al lado izquierdo, en \mathbf{r}_0 , a una distancia x_{inicial} de la franja con módulo de Young $E_0 + E_1$, se ubica la célula a estudiar. Las trayectorias espejo consideran la célula ubicada a la misma distancia de la franja pero al lado derecho.

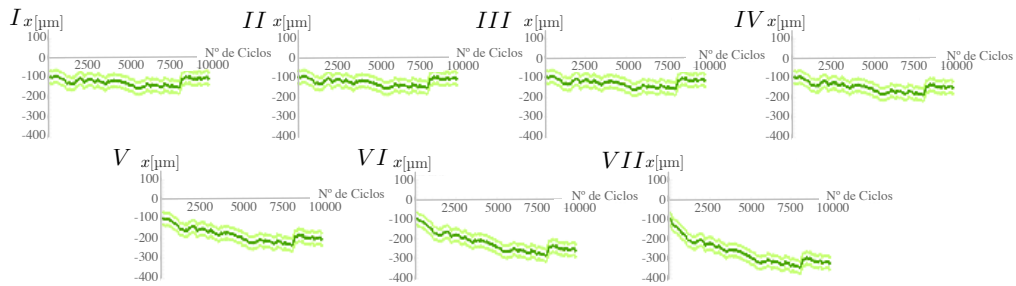


Figura 3.13: Desplazamientos en x para la condición inicial $\mathbf{r}_0 = -100\hat{x}$, para distintos valores de aE_1 . I: $aE_1 = 0 \text{ kPa } \mu\text{m}$, II: $aE_1 = 50 \text{ kPa } \mu\text{m}$, III: $aE_1 = 100 \text{ kPa } \mu\text{m}$, IV: $aE_1 = 200 \text{ kPa } \mu\text{m}$, V: $aE_1 = 300 \text{ kPa } \mu\text{m}$, VI: $aE_1 = 400 \text{ kPa } \mu\text{m}$, VII: $aE_1 = 500 \text{ kPa } \mu\text{m}$.

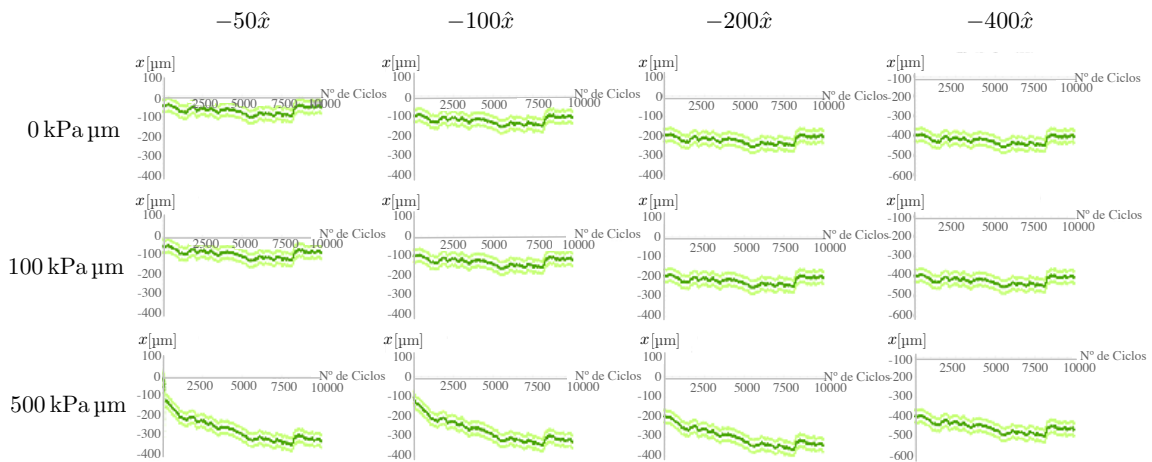


Figura 3.14: Desplazamientos en x para las diferentes condiciones iniciales $\mathbf{r}_0 = -50\hat{x}, -100\hat{x}, -200\hat{x}$ y $-400\hat{x}$, con $aE_1 = 0 \text{ kPa } \mu\text{m}, 100 \text{ kPa } \mu\text{m}, 500 \text{ kPa } \mu\text{m}$.

A partir de la figura 3.14 se concluye que la franja no tiene el efecto esperado sobre la célula. Para los valores de aE_1 menores que $200 \text{ kPa } \mu\text{m}$, las trayectorias en x no son significativamente distintas si se

compara con el caso homogéneo ($aE_1 = 0 \text{ kPa}\mu\text{m}$). En cambio, los valores entre $aE_1 = 300 \text{ kPa}\mu\text{m}$ y $aE_1 = 500 \text{ kPa}\mu\text{m}$ se observa que la célula se aleja de la franja, es decir, existe una repulsión. Lo anterior es más notorio para las condiciones iniciales $\mathbf{r}_0 = -50\hat{x}$ y $\mathbf{r}_0 = -100\hat{x}$, por lo que se especula un efecto más intenso, cuando la célula se encuentra más cerca de la zona más dura.

Se han considerado solamente casos donde la célula se encuentra al lado izquierdo de la franja porque al ubicar a la célula al lado derecho las trayectorias seguidas, para las mismas sucesiones de pasos, son espejo de las encontradas, como se observa en los resultados de la figura 3.15

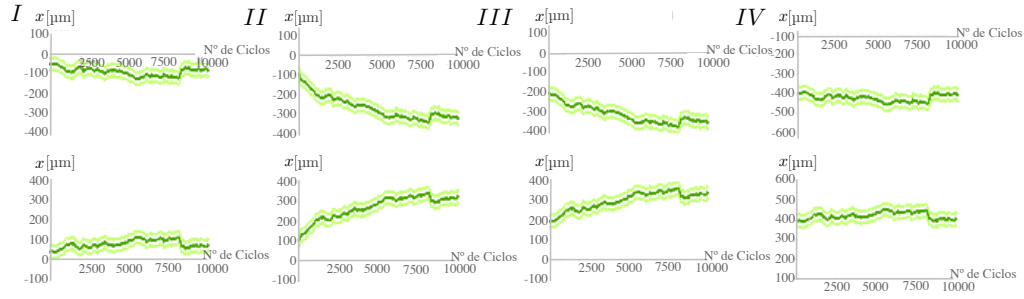


Figura 3.15: El efecto de la franja genera los mismos desplazamientos en x si la célula parte a su izquierda o derecha. I: Para condiciones iniciales $\mathbf{r}_0 = -50\hat{x}$ (arriba) y $\mathbf{r}_0 = 50\hat{x}$ (abajo), y valor de $100 \text{ kPa}\mu\text{m}$. II: Para condiciones iniciales $\mathbf{r}_0 = -100\hat{x}$ (arriba) y $\mathbf{r}_0 = 100\hat{x}$ (abajo), y valor de $500 \text{ kPa}\mu\text{m}$. III: Para condiciones iniciales $\mathbf{r}_0 = -200\hat{x}$ (arriba) y $\mathbf{r}_0 = 200\hat{x}$ (abajo), y valor de $500 \text{ kPa}\mu\text{m}$. IV: Para condiciones iniciales $\mathbf{r}_0 = -400\hat{x}$ (arriba) y $\mathbf{r}_0 = 400\hat{x}$ (abajo), y valor de $100 \text{ kPa}\mu\text{m}$.

Se debe destacar que los resultados mostrados fueron obtenidos con una misma secuencia de números aleatorios, lo que explica que alrededor del ciclo 7500, en todos los casos, se observa un acercamiento a la franja. De todas formas, se hicieron pruebas con otras secuencias de números aleatorios, obteniendo resultados que confirman lo concluido y donde no se observa el acercamiento a la franja alrededor del ciclo 7500.

Los resultados obtenidos en esta sección, muestran que el modelo no es adecuado para describir el fenómeno de durotaxis, ya que para distintos valores de aE_1 de la franja y distintas condiciones iniciales, la célula no muestra una atracción hacia la zona más dura. Sin embargo, cabe destacar que la célula sí es capaz de percibir un efecto a largo alcance (distancias mayores a $50 \mu\text{m}$), a pesar de no estar exactamente sobre la franja se aleja de ésta, como se observa en el gráfico para una condición inicial $50 \mu\text{m}$ con un valor de $aE_1 = 500 \text{ kPa}\mu\text{m}$ de la figura 3.14. Por consiguiente, el modelo no reproduce lo experimentalmente esperado como durotaxis, pero sí es capaz de demostrar que la célula sensa efectos a largo alcance.

Bajo estas circunstancias se proponen otros modelos que podrían reproducir la durotaxis. El primero de ellos, considera la contracción de las protrusiones con deslizamiento. Es decir, que a la vez de que se deforma el sustrato, mientras se contrae el vértice, va 'resbalando' sobre la superficie. Otra alternativa es considerar que el sustrato no es más duro en una zona, pero que está sometido a tensiones activas, de modo que cambia la dureza aparente. También pueden discutirse cambios geométricos del sistema, como que el espesor h del sustrato cambie en el espacio; o variar los pasos considerados en la dinámica del modelo, donde se pueden agregar movimientos extras al ciclo como levantar el vértice opuesto al seleccionado, antes de que el primero que se levantó se contraiga. Algunas de estas ideas se exploraran en los siguientes capítulos y otras serán detalladas dentro del capítulo de futuros trabajos.

3.4. Célula que recoge protrusiones deslizando

En esta sección se estudia una alternativa al modelo propuesto antes para la dinámica de la célula. En este caso al contraer las protrusiones (paso III de la dinámica presentada en la sección 3.1.1.) desliza y arruga el sustrato. Para ello, se comienza replanteando el proceso, y posteriormente, revisando si los resultados cambian con respecto al caso sin deslizamiento.

3.4.1. Modificaciones al modelo

En el paso III de la dinámica estudiada, la célula extiende, apoya la protrusión e inicia la contracción. En este caso el último proceso se hará bajo una serie de nuevos supuestos.

El primero de ellos es que la célula estará constantemente en equilibrio. En efecto, para el caso con deslizamiento en lugar de hacer una sola gran contracción, se completará el proceso mediante ‘minicontracciones’ hasta recuperar su forma original. Cada ‘minicontracción’ se lleva a cabo en un tiempo dt , tras el cual se recupera el equilibrio del sistema. Lo anterior se justifica porque el tiempo total de contracción es del orden de minutos, mientras que el tiempo de relajación del sustrato es del orden de los microsegundos. Por consiguiente, en este caso, la contracción estará discretizada en el tiempo y el sistema volverá constantemente al equilibrio. Ésta es una diferencia con el paso III sin deslizar, donde la célula completaba el proceso de contracción en un solo movimiento, y posteriormente relajaba recuperando el equilibrio.

El segundo supuesto es que la fuerza aplicada al sustrato será proporcional a la velocidad de contracción. Esta consideración se hace a partir del razonamiento planteado en [Walcott and Sun, 2010] donde se usa una interacción molecular para relacionar la adhesión focal y el sustrato como ya se detalló en la ecuación (1.1). Es decir,

$$\mathbf{F} = \kappa_m \mathbf{v}_{\text{cont}}, \quad (3.5)$$

donde la fuerza aplicada al sustrato \mathbf{F} es proporcional a la velocidad de contracción \mathbf{v}_{cont} con constante de proporcionalidad κ_m que depende de factores moleculares y la elasticidad del medio.

Con respecto a la velocidad de contracción mencionada, corresponde a una velocidad relativa de desplazamiento de la extremidad. Es decir, a cuánto se desplaza el punto de protrusión con respecto al sustrato que a la vez se va arrugando. Dicha velocidad se calcula como la diferencia entre la velocidad de contracción con la que la célula que tracciona la protrusión $\dot{\mathbf{r}}$, y la velocidad de deformación del sustrato $\dot{\mathbf{u}}$.

$$\mathbf{v}_{\text{cont}} = \dot{\mathbf{r}} - \dot{\mathbf{u}}. \quad (3.6)$$

La velocidad de deformación del sustrato corresponde a la derivada convectiva de \mathbf{u} debido a que es conveniente usar el término que da cuenta de su deformación en cada punto, ya que en cada intervalo de tiempo el sistema vuelve al equilibrio. Por otro lado, la velocidad con la que internamente la célula contrae las porciones del citoesqueleto involucradas en las protrusiones se supondrán conocidas. Además, como un primer acercamiento se considerarán constantes.

Finalmente, a modo de primera aproximación, se estudiará el sistema en una dimensión. Es decir, una célula de dos extremidades que se desplaza en el eje x .

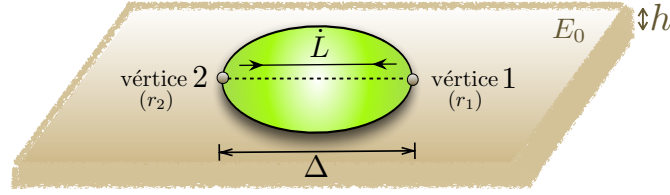


Figura 3.16: Modelo de célula en una dimensión. Δ la distancia entre los vértices y \dot{L} velocidad de contracción del citoesqueleto.

3.4.2. Dinámica de contracción para sustratos homogéneos

A continuación se revisan las ecuaciones que gobiernan el proceso de contracción de la extremidad. Tras su extensión y posterior apoyo, se inicia la contracción donde se cumple que en cada paso temporal

$$\sum_i F_i = 0, \quad (3.7)$$

con cada fuerza a calcular usando el supuesto que la relaciona con la velocidad de contracción

$$F_i = \kappa_m v_{\text{conti}} = \kappa_m (\dot{r}_i - \dot{u}_i). \quad (3.8)$$

El valor de \dot{u}_i correspondiente a la derivada convectiva se puede calcular directamente a partir de la ecuación para las deformación en x de sustratos homogéneos (2.29), que puede escribirse convenientemente como

$$u_i = U_1 F_i + (U_2 \log(r_i - r_j) + U_2') F_j, \quad (3.9)$$

donde $U_1 = \frac{C}{E} \left(k_1 \log \left(\frac{R_1}{\sqrt{e}} \right) + \frac{k_2}{2} \right)$, $U_2 = \frac{Ck_1}{E_0}$ y $U_2' = \frac{Ck_2}{E_0}$, F_i la fuerza ejercida en el mismo punto y F_j la fuerza aplicada en el extremo opuesto. Los valores de las constantes se deducen ignorando los términos en y y suponiendo que $\Delta = x$. La derivada convectiva en este caso vendrá dada por

$$\dot{u}_i = \frac{\partial u_i}{\partial t} + \dot{r}_j \frac{\partial u_i}{\partial r_j}, \quad (3.10)$$

y si se desprecian las derivadas temporales de las fuerzas debido a que serían valores muy pequeños, solo el segundo sumando de la ecuación (3.9) da cuenta del resultado de ésta

$$\dot{u}_i = 2U_2 \dot{L} \frac{\log(r_i - r_j)}{|r_i - r_j|^2} F_j, \quad (3.11)$$

donde \dot{L} es la velocidad de contracción interna del citoesqueleto mencionada,

$$\dot{L} = \dot{r}_1 - \dot{r}_2. \quad (3.12)$$

y los subíndices 1 y 2 dan cuenta de las extremidades del sistema como se observa en la figura 3.16.

Luego, con los datos de las posiciones de las extremidades y la ecuación (3.11) se calculan las derivadas convectivas de las deformaciones bajo cada extremidad. Con ellas, y la ecuación (3.8), se obtienen las fuerzas en función de \dot{r}_1 y \dot{r}_2 , y exigiendo que su suma sea nula, se encuentra una relación entre \dot{r}_1 y \dot{r}_2 que corresponde a

$$\dot{r}_1 = -\dot{r}_2, \quad (3.13)$$

es decir, el centro de masa durante la contracción, no se desplaza.

Por consiguiente, para un modelo unidimensional sobre sustrato homogéneo, con células cuyas extremidades se contraen con deslizamiento, su centro de masa solo se moverá durante la expansión de las extremidades (paso II sección 3.1.1), lo que permite concluir que la dinámica del sistema será la de un caminante aleatorio.

3.4.3. Dinámica de contracción para sustratos no homogéneos

Una vez comprendida la dinámica de contracción para una célula unidimensional en un sustrato homogéneo, se procede a estudiar el efecto de una franja con mayor módulo de Young. Para este caso, se modifica la ecuación (3.9) de modo que la deformación del sustrato considere el término relacionado con la convolución que da cuenta de la no homogeneidad

$$u_i = 2U_2 \dot{L} \frac{\log(r_i - r_j)}{|r_i - r_j|^2} F_j + f_{\text{conv}_{xx}}(r_i) F_i, \quad (3.14)$$

y su derivada convectiva

$$\dot{u}_i = 2U_2 \dot{L} \frac{\log(r_i - r_j)}{|r_i - r_j|^2} F_j + 2\dot{r}_i \frac{\partial f_{\text{conv}_{xx}}(r_i)}{\partial r_i} F_i. \quad (3.15)$$

Haciendo el mismo procedimiento descrito para sustratos homogéneos, se encuentra la relación entre \dot{r}_1 y \dot{r}_2

$$\dot{r}_1 = \frac{\dot{r}_2 (\kappa_m U_2^* - 1)}{1 - \kappa_m U_2^* + 2\kappa_m \dot{r}_2 (\partial_{r_1} f_{\text{conv}_{xx}}(r_1) + \partial_{r_2} f_{\text{conv}_{xx}}(r_2))}, \quad (3.16)$$

donde $U_2^* = 2U_2 \dot{L} \frac{r_i - r_j}{|r_i - r_j|^2} F_j$ y $\partial_{r_i} f_{\text{conv}_{xx}}(r_i) = \frac{\partial f_{\text{conv}_{xx}}(r_i)}{\partial r_i}$.

Con respecto a lo obtenido antes, la única diferencia la hacen los términos de convolución. Para entender este cambio y la diferencia entre la ecuación (3.13) y (3.16) se estudian las derivadas $\partial_{r_i} f_{\text{conv}_{xx}}(r_i)$, como se muestra en la figura 3.17.

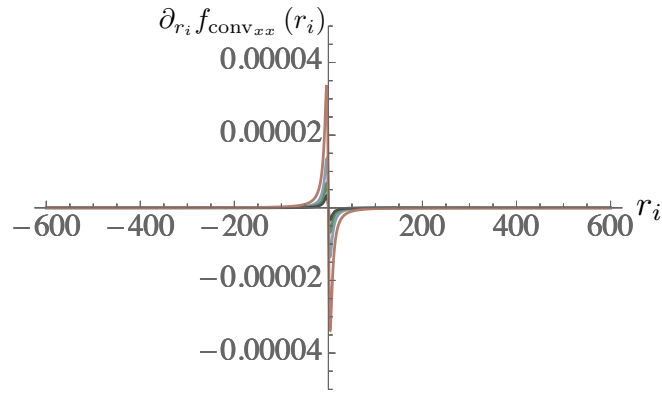


Figura 3.17: Derivada parcial de la función convolución evaluada para distintos valores de r_i , con las dimensiones de la sección 3.2.1. En negro se muestran los resultados para $aE_1 = 50 \text{ kPa } \mu\text{m}$; en verde $aE_1 = 100 \text{ kPa } \mu\text{m}$; en azul $aE_1 = 200 \text{ kPa } \mu\text{m}$; y en rojo, $aE_1 = 500 \text{ kPa } \mu\text{m}$.

De la figura 3.17 se concluye que para valores admitidos que pueden tomar tanto r_1 como r_2 , el valor de $\partial_{r_i} f_{\text{conv}_{xx}}(r_i)$ siempre será cercano a cero y despreciable, debido a que el término $1 - \kappa_m U_2^*$ es siempre mayor que uno. Tomando en cuenta este resultado la ecuación (3.16) queda reducida a la misma expresión de (3.13).

Si se extendiesen los cálculos recién expuestos a dos dimensiones, los valores de la derivada de la función $f_{\text{conv}_{xx}}(r_i)$ no se verían incrementados lo suficiente como para poder apreciar un efecto real, con lo que se concluye que una célula con deslizamiento, en un modelo de elasticidad lineal, no es capaz de sentir el efecto de una franja con mayor módulo de Young.

3.5. Sustratos no homogéneos con espesor variable

Otro modelo corresponde al de un sustrato que varía su espesor en el espacio, es decir, $h = h(x)$. Para este caso, se hace un análisis considerando que h aumenta continuamente y por consiguiente los extremos de la célula se encuentran sobre sustratos con espesor diferente. Luego, se puede hacer un análisis convencional de durotaxis considerando la ecuación (1.1) que relaciona la fuerza y la velocidad con un coeficiente b . En este caso, éste último se puede calcular a partir de las deformaciones promedio en el interior de un parche, lo que permite concluir

$$b(h) = C_{\text{mol}} \frac{16\pi h E \kappa_p \kappa_f}{3[2 \log(R_1/\sqrt{e}) + 1] \kappa_p \kappa_f + 16\pi h E (\kappa_p + \kappa_f)}, \quad (3.17)$$

donde C_{mol} , κ_p y κ_f son constantes moleculares. En decir, la relación entre la dirección preferencial de movimiento y el espesor h es la misma que para E . Por consiguiente, si uno de los vértices de la célula se ubica sobre h_M y el opuesto sobre h_m con $h_M > h_m$ la velocidad en el primer extremo, v_M , será menor que v_m y la célula migrará hacia el sustrato de mayor h . Este análisis pierde significación si se toman en cuenta que las observaciones experimentales sugieren que en las intersecciones de EVLs, hacia donde las DCLs migran, los espesores son menores que en el resto de la célula sustrato. Por lo tanto se descarta el cambio de espesor de la placa como el posible responsable de la durotaxis en este caso.



Figura 3.18: Esquema de la situación analizada comparada con el escenario real. Al lado izquierdo se observa lo concluido, es decir, que la célula migra hacia zonas con sustratos más gruesos. Al lado derecho, un esquema de la situación real; la célula se ubica en los bordes correspondientes a las zonas con menor espesor.

Hasta aquí, se propuso un modelo compuesto por una célula de cuatro vértices que se desplaza mediante protrusiones aleatorias. Se estudia con dos casos para la contracción de dichas protrusiones. El primero es cuando no hay deslizamiento. Los resultados muestran que en sustratos homogéneos la célula se comporta como un caminante aleatorio, al cual se le puede asociar un coeficiente de difusión. Éste aumenta entre más distintos sean los largos de las protrusiones, y en el extremo inferior, cuando son todas de igual largo, la célula se estanca oscilando en torno a un punto fijo. En un sustrato no homogéneo, donde hay una franja más dura, la célula exhibe un comportamiento similar al observado en medios homogéneos. Esto se hace más evidente cuando la dureza de la franja no es significativamente más alta que el resto del sustrato ($aE_1 < 300 \text{ kPa } \mu\text{m}$), o cuando la distancia a la misma, es grande ($|x| > 100 \mu\text{m}$). En caso contrario, si la dureza de la franja aumenta o si los vértices se acercan a ella, se aprecia un efecto repulsivo sobre la célula. Se concluye que para dicho caso que, pese a producirse efectos de largo alcance, el modelo no reproduce el fenómeno de durotaxis.

El segundo caso revisado es con deslizamiento durante la contracción de las protrusiones. Cuando el sustrato es homogéneo, se reproduce el comportamiento de un caminante aleatorio, pero que probablemente difunde menos que el caso anterior, ya que el desplazamiento del centro de masa ocurre solo una vez por

ciclo y no dos. Por otro lado, en un sustrato no homogéneo la célula al deslizar muestra los mismo resultados que para el caso homogéneo, confirmando que el modelo no reproduce durotaxis.

Por último se estudió el efecto de un sustrato con espesor variable y se deduce que si la diferencia de h fuese la responsable de la migración, las zonas donde las EVLs se intersectan tendrían que tener mayor espesor, lo que se opone a lo experimentalmente observado.

Finalmente, se concluye que una franja más dura y considerando solo los efectos lineales de la elasticidad, no se reproduce lo observado como durotaxis para la dinámica considerada en el modelo. Por lo que, o es necesario incorporar nuevos elementos que resulten importantes en la dinámica de la célula considerada, o bien una franja más dura, no sometida a ningún esfuerzo mecánico y con las otras características mencionadas, es incapaz de guiar desplazamientos.

Capítulo 4

Modelo con elasticidad no lineal

4.1. Introducción

En este capítulo se toma en cuenta que los sustratos de las células podrían estar sometidos a tensiones activas. En efecto, en el interior de las células, el citoesqueleto es el encargado no solo de mantener la forma y orden interno, sino que además es el responsable de reorganizar sus componentes para el desplazamiento. Por lo tanto, el citoesqueleto y sus componentes se encuentran constantemente generando tensiones activas cuyo origen energético se encuentra en la síntesis de ATP. Sin embargo, cuando estas tensiones activas caracterizadas por un tensor de tensiones σ_{ik}^A , actúan, existe una respuesta por parte de otras componentes dentro de la célula que se traduce en una tensión elástica caracterizadas por un tensor de tensiones σ_{ik}^E . Por consiguiente, el tensor de tensiones total que caracteriza los sustratos está dado por la suma de los tensores de tensiones activo y elástico, y se puede relacionar con la fuerza externa sobre el sustrato F_i [Landau et al., 1969], de modo que

$$\begin{aligned}\sigma_{ik,k}^{\text{Tot}} &= F_i \delta(\mathbf{r}), \\ \sigma_{ik}^{\text{Tot}} &= \sigma_{ik}^A + \sigma_{ik}^E.\end{aligned}\tag{4.1}$$

La evidencia de que las células se encuentran bajo tensiones se puede corroborar experimentalmente mediante ablaciones con láser por ejemplo, donde se observa la contracción de las membranas al relajar tensiones activas. Adicionalmente, estudios apuntan a que la magnitud de las tensiones activas son importantes considerando las deformaciones que provocan, ya que son del mismo orden de magnitud que las provocadas por agentes externos [Barriga et al., 2018]. Luego, los términos no lineales del tensor de deformaciones son no despreciables a diferencia de lo que se consideró previamente, porque de otra forma, el efecto provocado por los sustratos activos no se acopla a la ecuación de equilibrio, obteniendo los mismos resultados de los capítulos anteriores. Se plantea entonces un nuevo modelo que los toma en cuenta,

$$u_{ik} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial r_k} + \frac{\partial u_k}{\partial r_i} + \frac{\partial u_j}{\partial r_i} \frac{\partial u_j}{\partial r_k} \right).\tag{4.2}$$

Para entender cómo se deforma el sustrato bajo una fuerza puntual $\mathbf{F}\delta(\mathbf{r})$, es necesario entender antes cómo se deforma solo producto de la tensiones activas. Por ello, se comenzará estudiando la relación entre σ_{ik}^A , y las deformaciones, \mathbf{u} , que produce.

4.2. Estudio de las deformaciones de sustratos tensionados

4.2.1. Sustratos no sometidos a fuerzas externas

Se comenzará estudiando sustratos no sometidos adicionalmente a fuerzas externas producidas, por ejemplo, por la célula de cuatro contactos estudiada en los capítulos previos. En este caso, tomando en cuenta la relación entre el tensor de tensiones y las fuerzas externas se tiene

$$\begin{aligned}\sigma_{ik,k}^{\text{Tot}} &= 0, \\ \sigma_{ik,k}^A + \sigma_{ik,k}^E &= 0.\end{aligned}\quad (4.3)$$

El tensor de tensiones elástico σ_{ik}^E se puede relacionar con el tensor de deformaciones u_{ik} mediante [Landau et al., 1969],

$$\sigma_{ik}^E = \frac{E\sigma}{1-\sigma^2}\delta_{ik}u_{ll} + \frac{E}{1+\sigma}u_{ik}, \quad (4.4)$$

con E el módulo de Young y σ el coeficiente de Poisson. Se usan la ecuaciones (4.2) y (4.4) para calcular $\sigma_{ik,k}^E$ en función de las deformaciones u_i , y usando la relación entre $\sigma_{ik,k}^A$ y $\sigma_{ik,k}^E$ de la ecuación (4.3) se concluye

$$\begin{aligned}-\sigma_{ik,k}^A &= \frac{E\sigma}{1-\sigma^2}\delta_{ik}\left(\frac{\partial^2 u_l}{\partial r_k \partial r_l} + \frac{\partial u_j}{\partial r_l} \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_k \partial r_l}\right) \\ &\quad + \frac{E}{2(1+\sigma)}\left(\frac{\partial^2 u_i}{\partial r_k^2} + \frac{\partial^2 u_k}{\partial r_k \partial r_i} + \frac{\partial u_j}{\partial r_k} \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_k \partial r_i} + \frac{\partial u_j}{\partial r_i} \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_k^2}\right),\end{aligned}\quad (4.5)$$

que corresponde a la relación entre el tensor activo de un sustrato y el vector de deformaciones, incluyendo los términos no lineales.

4.2.2. Sustratos sometidos a fuerzas puntuales

A continuación se estudiará el caso en que el sustrato está sometido a una fuerza $F_0\delta(\mathbf{r}_0)$, que corresponde a la ejercida por una de las extremidades (\mathbf{r}_0) del modelo de célula usado en los capítulos previos. Se hace el supuesto de que las deformaciones que estas fuerzas pueden hacer sobre el sustrato son pequeñas comparadas a las deformaciones producto de las tensiones activas como se observa en experimentos de ablación con láser o de traction force microscopy [Barriga et al., 2018]. Esto último es para tener una primera aproximación a la variación de las deformaciones del sustrato. Luego, las deformaciones están dadas por $u'_i = u_i + v_i$ con $v_i \ll u_i$, donde u_i es la deformación debido a tensiones activas antes de aplicar las fuerzas de las extremidades, y u'_i luego de aplicarlas.

Se procede reemplazando u'_i en la ecuación de deformaciones no lineales (4.2), a modo de relacionar u_{ik} con σ_{ik}^E , $\sigma_{ik,k}^A$ y $F_0\delta(\mathbf{r}_0)$,

$$\begin{aligned}\frac{E\sigma}{1-\sigma^2}\delta_{ik}\left(\frac{\partial^2 u_l}{\partial r_k \partial r_l} + \frac{\partial^2 v_l}{\partial r_k \partial r_l} + \frac{\partial u_j}{\partial r_l} \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_k \partial r_l} + \frac{\partial u_j}{\partial r_l} \frac{\partial^2 v_j}{\partial r_k \partial r_l} + \frac{\partial v_j}{\partial r_l} \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_k \partial r_l} + \frac{\partial v_j}{\partial r_l} \frac{\partial^2 v_j}{\partial r_k \partial r_l}\right) \\ + \frac{E}{2(1+\sigma)}\left(\frac{\partial^2 u_i}{\partial r_k^2} + \frac{\partial^2 v_i}{\partial r_k^2} + \frac{\partial^2 u_k}{\partial r_k \partial r_i} + \frac{\partial^2 v_k}{\partial r_k \partial r_i} + \frac{\partial u_j}{\partial r_k} \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_k \partial r_i} + \frac{\partial u_j}{\partial r_k} \frac{\partial^2 v_j}{\partial r_k \partial r_i} + \frac{\partial v_j}{\partial r_k} \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_k \partial r_i} + \frac{\partial v_j}{\partial r_k} \frac{\partial^2 v_j}{\partial r_k \partial r_i}\right) \\ + \frac{\partial u_j}{\partial r_i} \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_k^2} + \frac{\partial u_j}{\partial r_i} \frac{\partial^2 v_j}{\partial r_k^2} + \frac{\partial v_j}{\partial r_i} \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_k^2} + \frac{\partial v_j}{\partial r_i} \frac{\partial^2 v_j}{\partial r_k^2}\bigg) = \sigma_{ik,k}^E = -\sigma_{ik,k}^A - \frac{F_0\delta(\mathbf{r}_0)}{h}.\end{aligned}\quad (4.6)$$

Tomando en consideración la ecuación (4.5), hay términos en (4.6) que se anulan; los que dependen solo de u_i con la deformación activa $\sigma_{ik,k}^A$. Además, los que tienen productos de derivadas de v se considerarán de un orden menor, por lo que se despreciarán. Por consiguiente la ecuación (4.6) se reduce,

$$\begin{aligned} & \frac{E\sigma}{1-\sigma^2}\delta_{ik}\left(\frac{\partial^2 v_l}{\partial r_k \partial r_l} + \frac{\partial u_j}{\partial r_l} \frac{\partial^2 v_j}{\partial r_k \partial r_l} + \frac{\partial v_j}{\partial r_l} \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_k \partial r_l}\right) \\ & + \frac{E}{2(1+\sigma)}\left(\frac{\partial^2 v_i}{\partial r_k^2} + \frac{\partial^2 v_k}{\partial r_k \partial r_i} + \frac{\partial u_j}{\partial r_k} \frac{\partial^2 v_j}{\partial r_k \partial r_i} + \frac{\partial v_j}{\partial r_k} \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_k \partial r_i} + \frac{\partial u_j}{\partial r_i} \frac{\partial^2 v_j}{\partial r_k^2} + \frac{\partial v_j}{\partial r_i} \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_k^2}\right) = -\frac{F_{0i}\delta(\mathbf{r}_0)}{h}. \end{aligned} \quad (4.7)$$

Notar que si $u = 0$ se recupera para v_i la ecuación (2.1) del capítulo 2. Con la ecuación (4.7) se puede encontrar el vector de deformaciones del sustrato v_i cuando está sometido a fuerzas externas. Para ello es necesario tener una expresión de u_i que corresponde a la deformación cuando no está sometida a las fuerzas de las células. Ésta última se puede deducir mediante la ecuación (4.5) cuando σ_{ik}^A es conocida. Sin embargo, se usará como dato directamente la deformación u_i , debido a la factibilidad de diseñar experimentos que permitan estudiar y medir las deformaciones a las cuales las células y tejidos se encuentran sometidos [Barriga et al., 2018].

4.3. Sustratos bajo deformaciones lineales

A continuación se considera un sustrato que, sin fuerzas externas, está deformado linealmente en la dirección horizontal, es decir

$$\mathbf{u}(\mathbf{r}) = \gamma x \hat{x}, \quad (4.8)$$

y por consiguiente,

$$u_{ik} = \begin{pmatrix} \gamma & 0 \\ 0 & 0 \end{pmatrix}, \quad (4.9)$$

con $\gamma \sim O(1)$. Gráficamente la deformación se puede visualizar en la figura 4.1.

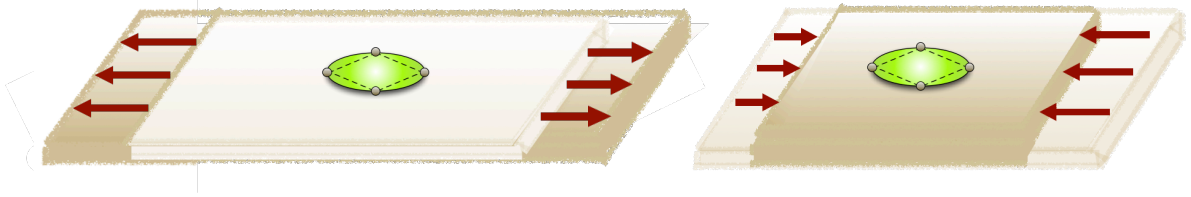


Figura 4.1: Esquema de deformaciones del sustrato. Izquierda: Estiramiento del sustrato en la dirección horizontal (en x) debido a fuerzas del citoesqueleto. En este caso $\gamma > 0$. Derecha: Compresión del sustrato en la dirección horizontal (en x) debido a fuerzas del citoesqueleto. En este caso $\gamma < 0$.

Para resolver esta ecuación se usa una solución iterativa, comenzando por la resolución de v_i para el caso lineal. Para ello se procede agrupando los términos lineales de la ecuación (4.7)

$$(1-\sigma)\frac{\partial^2 v_i}{\partial r_k^2} + (\sigma+1)\frac{\partial^2 v_k}{\partial r_k \partial r_i} = \frac{-2(1-\sigma^2)}{Eh}F_{0i}\delta(\mathbf{r}_0) - F_i^*(u_i, v_i), \quad (4.10)$$

con

$$F_i^*(u_i, v_i) = 2\sigma\delta_{ik} \left(\frac{\partial u_j}{\partial r_l} \frac{\partial^2 v_j}{\partial r_k \partial r_l} + \frac{\partial v_j}{\partial r_l} \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_k \partial r_l} \right) + (1 - \sigma) \left(\frac{\partial u_j}{\partial r_k} \frac{\partial^2 v_j}{\partial r_k \partial r_i} + \frac{\partial v_j}{\partial r_k} \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_k \partial r_i} + \frac{\partial u_j}{\partial r_i} \frac{\partial^2 v_j}{\partial r_k^2} + \frac{\partial v_j}{\partial r_i} \frac{\partial^2 u_j}{\partial r_k^2} \right), \quad (4.11)$$

que inicialmente se considera 0. En ese caso, la ecuación (4.10), es exactamente la misma resuelta en el capítulo 2, y su solución es la misma ecuación (2.7). Luego,

$$v_i^{(0)}(\mathbf{r}) = G_{ij}(\mathbf{r})F_j, \\ G_{ij}(\mathbf{r}) = \frac{C}{E} \left(k_1 \ln |\mathbf{r}| \delta_{ij} + \frac{k_2}{|\mathbf{r}|^2} r_i r_j \right), \quad (4.12)$$

con $C = \frac{1+\sigma}{4\pi h}$, $k_1 = (\sigma - 3)$ y $k_2 = (\sigma + 1)$.

A continuación se repite el cálculo pero esta vez considerando los términos no lineales. Para ello se usa el valor de u_i supuesto en la ecuación (4.8). Como u_i es lineal todas sus segundas derivadas se anulan, quedando solo su divergencia que se reemplaza en el primer múltiplo de F_i^* , y usando la ecuación (4.10) en el segundo, la parte no lineal corresponde a

$$F_i^*(u_i, v_i^{(0)}) = \frac{\partial u_j}{\partial r_k} \left((1 - \sigma) \frac{\partial^2 v_j^{(0)}}{\partial r_i^2} + (1 + \sigma) \frac{\partial^2 v_j^{(0)}}{\partial r_k \partial r_i} \right) = \gamma \delta_{xi} \frac{-2(1 - \sigma^2)}{Eh} F_{0i} \delta(\mathbf{r}_0). \quad (4.13)$$

Se reemplaza dicha expresión en la ecuación (4.10)

$$(1 - \sigma) \frac{\partial^2 v_i^{(1)}}{\partial r_k^2} + (\sigma + 1) \frac{\partial^2 v_k^{(1)}}{\partial r_k \partial r_i} = \frac{-2(1 - \sigma^2)}{Eh} F_{0i} \delta(\mathbf{r}_0) - \gamma \delta_{xi} \frac{-2(1 - \sigma^2)}{Eh} F_{0i} \delta(\mathbf{r}_0) \\ = \frac{-2(1 - \sigma^2)}{Eh} F_{0i} \delta(\mathbf{r}_0) (1 - \gamma \delta_{xi}), \quad (4.14)$$

y como difiere de la ecuación lineal solo en una constante, el valor para las deformaciones en un sustrato tensionado y sometido a fuerzas externas es

$$v_i^{(1)}(\mathbf{r}) = G_{ij}(\mathbf{r})(1 - \gamma \delta_{xi}) F_{0i}, \\ v_i^{(1)}(\mathbf{r}) = G_{ij}^{(1)}(\mathbf{r}) F_{0j}, \quad (4.15)$$

con la función de Green asociada,

$$G_{ij}^{(1)}(\mathbf{r}) = \frac{C}{E} \left(k_1 \ln |\mathbf{r}| \delta_{ij} + \frac{k_2}{|\mathbf{r}|^2} r_i r_j \right) (1 - \gamma \delta_{xj}), \quad (4.16)$$

y las constantes las mismas detalladas antes.

Iteraciones para ordenes mayores.

Del mismo modo que se calculó $v_i^{(1)}$ se puede seguir iterando y encontrar la función de Green para $v_i^{(2)}$ cuando $F_i^*(u_i, v_i^{(1)})$. En ese caso la ecuación (4.13) se modifica debido al término extra de $v_i^{(1)}$ y es,

$$F_i^*(u_i, v_i^{(1)}) = \gamma \delta_{xi} \frac{-2(1 - \sigma^2)}{Eh} F_{0i} \delta(\mathbf{r}_0) (1 - \gamma) = \delta_{xi} \frac{-2(1 - \sigma^2)}{Eh} F_{0i} \delta(\mathbf{r}_0) (\gamma - \gamma^2), \quad (4.17)$$

y reemplazando en la ecuación (4.10) se concluye que

$$\begin{aligned} v_i^{(2)}(\mathbf{r}) &= G_{ij}(\mathbf{r})(1 + (-\gamma + \gamma^2)\delta_{xj})F_{0j}, \\ v_i^{(2)}(\mathbf{r}) &= G_{ij}^{(2)}(\mathbf{r})F_{0j}, \end{aligned} \quad (4.18)$$

con la función de Green asociada,

$$G_{ij}^{(2)}(\mathbf{r}) = \frac{C}{E} \left(k_1 \ln |\mathbf{r}| \delta_{ij} + \frac{k_2}{|\mathbf{r}|^2} r_i r_j \right) [1 + (-\gamma + \gamma^2)\delta_{xj}]. \quad (4.19)$$

De igual modo se puede seguir iterando hasta concluir que el término extra al de la expresión lineal que acompañará la solución es de la forma $(-\gamma + \gamma^2 - \gamma^3 + \dots)\delta_{xj}$, suma que converge a $-\gamma/(1 + \gamma)$. Finalmente, se puede concluir una forma general para v_i y G^{NL} ,

$$\begin{aligned} v_i(\mathbf{r}) &= G_{ij}F_{0j} \left(1 - \frac{\gamma\delta_{xj}}{1 + \gamma} \right) = G_{ij}^{NL}F_{0j}, \\ G_{ij}^{NL}(\mathbf{r}) &= \frac{C}{E} \left(k_1 \ln |\mathbf{r}| \delta_{ij} + \frac{k_2}{|\mathbf{r}|^2} r_i r_j \right) \left(1 - \frac{\gamma\delta_{xj}}{1 + \gamma} \right). \end{aligned} \quad (4.20)$$

Los resultados de la ecuación (4.20) demuestran que la deformación del sustrato sometido a tensiones externas y bajo fuerzas puntuales, depende de las características elásticas del sustrato E , la tensión activa representada por γ , el espesor del sustrato h , y la distancia \mathbf{r} . Es decir, la deformación no lineal

$$\mathbf{v}(\mathbf{r}) = \kappa_{\text{aparente}} \mathbf{F}_0, \quad (4.21)$$

con $\kappa_{\text{aparente}} = \kappa_{\text{aparente}}(E, \gamma, h, \mathbf{r})$. Así mismo, la función de Green depende de los mismos parámetros mencionados. Este último resultado generaliza los encontrados en los capítulos previos, donde $G_{ij}(\mathbf{r})$ dependía de E , h y \mathbf{r} . En este caso aparece la dependencia de γ , la tensión a la cual está sometida el sustrato.

Experimentalmente, este resultado es muy relevante debido a que la tensión activa mediante la presencia de γ , modifica la dureza aparente de los sustratos y los vuelve anisótropos. Luego, la observación de durtaxis podría depender de las tensiones a las cuales las células usualmente están sometidas, y podría explicar los resultados negativos obtenidos en los capítulos anteriores.

4.3.1. Difusión

Se estudia el caso de una célula (DCL) sobre un sustrato deformado linealmente un factor γ en la dirección x (ecuación (4.8)) cuyas deformaciones debido a las fuerzas aplicadas por la DCL se relacionan mediante la función de Green de la ecuación (4.20). A continuación se muestra un resumen de las pendientes de los desplazamientos cuadráticos medios para distintos valores de γ para los ejes x e y .

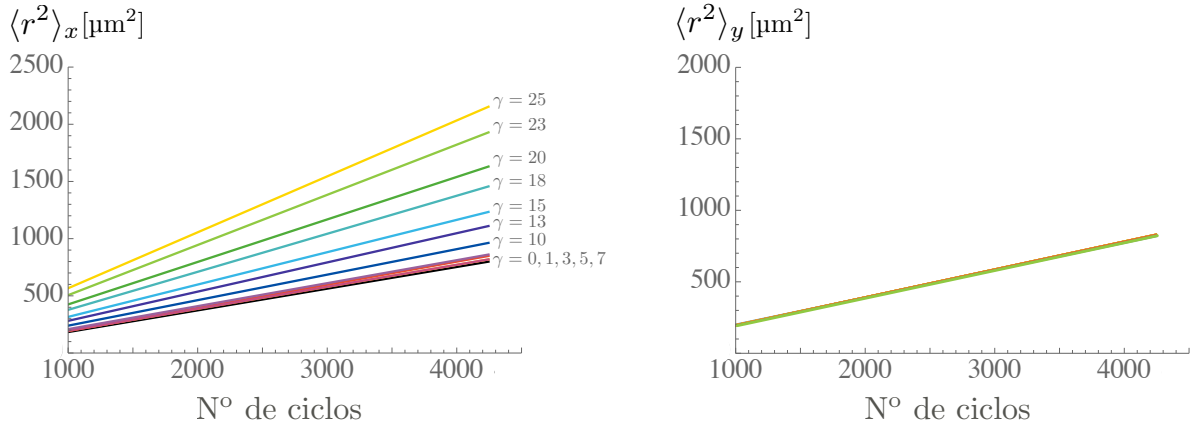


Figura 4.2: Izquierda: Pendientes de desplazamientos cuadráticos medios en x en función del número de ciclos para diferentes valores de γ . Derecha: Lo mismo que a la izquierda pero para el eje y . En este caso son todos los valores iguales.

Los valores de los coeficientes de difusión están resumidos en la figura (4.3).

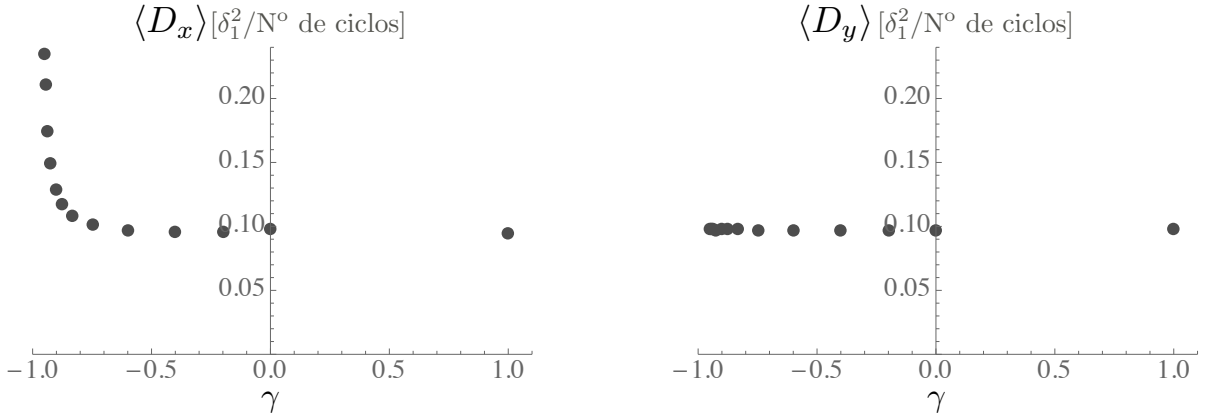


Figura 4.3: Valores de los coeficientes de difusión en el eje x e y para distintos valores de γ .

Los resultados demuestran que el coeficiente de difusión en x aumenta para grandes contracciones del sustrato, es decir, cuando γ se acerca a -1 , mientras que para valores cercanos a 0 y positivos el coeficiente de difusión se mantiene constante e igual al valor en y , por lo que la célula se desplaza isotrópicamente. Además, cuando γ tiende a $+\infty$, los efectos de la célula desaparecerán por completo en el eje x , ya que el sustrato se encuentra tan tensionado en esa dirección que una fuerza extra no hace la diferencia, lo que se observa estudiando el límite

$$\lim_{\gamma \rightarrow \infty} \frac{-\gamma \delta_{xj}}{1 + \gamma} = -\delta_{xj}, \quad (4.22)$$

de modo que la diferencia $1 - \delta_{xj}$ descarta los efectos en x .

Lo anterior implica que si los sustratos están sometidos a tensiones internas, la célula que se desplaza sobre éste percibe esa diferencia con respecto al caso de sustratos sin tensiones activas, aumentando su difusión en el eje bajo tensiones con una magnitud que varía según la deformación del sustrato. Es importante mencionar que debido a que la deformación es lineal, no existe una dirección privilegiada por lo que la

célula solo difunde. No obstante, si el tensor de deformaciones tuviese dependencia espacial, las derivadas de segundo orden de u_i en la ecuación (4.11) no se anulan, apareciendo nuevos efectos donde la célula podría mostrar una dirección privilegiada. Luego, estos resultados se pueden extender a otro tipo de tensiones activas.

Finalmente, cabe mencionar que al modificar el módulo de Young E_0 para el modelo sin deslizamiento utilizado en este capítulo, los resultados no se verían modificados, ya que solo se modifica la fuerza aplicada sobre el sustrato pero no las extensiones de las protrusiones ni las deformaciones del sustrato.

Capítulo 5

Otro tipo de migración celular no polarizada

El pez anual no es el único sistema que exhibe células no polarizadas que migran. Otro organismo que muestra también un fenómeno de esas características es el pez cebra. Durante su gastrulación un grupo de células no polarizadas se desplazan colectivamente desde el polo animal hacia el polo vegetal para dar paso a la formación del órgano de la lateralidad (también conocida como vesícula de Kupffer), el cual tiene un rol importante en la determinación de la asimetría derecha-izquierda del pez [Essner et al., 2005]. El objetivo es dilucidar cómo estas células, *Laterality Organ Progenitors* (LOPs), son capaces de migrar colectivamente si no están polarizadas. Para ello se propone un modelo que considera las observaciones y valores experimentales que permiten entender la interacción entre ellas.

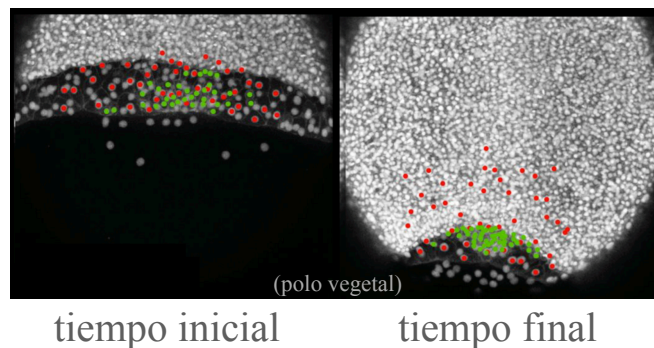


Figura 5.1: Imagen inicial y final del proceso. En verde las LOPs y en rojo las *Enveloping Cell Layer* (EVL) cuyo rol es fundamental en el fenómeno. Las LOPs migran colectivamente desde el polo animal al vegetal.

5.1. Modelo

5.1.1. Geometría

Debido a las características observadas, se considera que las LOPs son discos de radio fijo que se desplazan en una monocapa sobre una superficie perfectamente esférica correspondiente al huevo, como se observa en la figura 5.2. Durante este capítulo x será la dirección horizontal (latitud del huevo) e y la dirección vertical (longitud meridional). Además, las LOPs estarán caracterizadas por su posición \mathbf{r}_i y su radio R_i correspondiente a la suma entre el radio promedio de las células y una dispersión asociada.

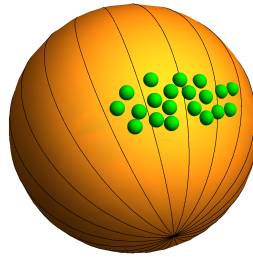


Figura 5.2: LOPs (mostradas en verde) se mueven en la superficie del huevo, modelado perfectamente esférico.

5.1.2. Movimiento Aleatorio

Las células constantemente generan protrusiones en todas las direcciones, lo que se observa experimentalmente como el movimiento de un caminante aleatorio. Haciendo un seguimiento de células aisladas se calcula un coeficiente de difusión en x e y . Luego, en el modelo, se incorpora el movimiento aleatorio usando los coeficientes calculados.

5.1.3. Enlace con células de capa superior

Estudios demuestran que las LOPs interactúan con las células del epitelio inmediatamente superior, *Enveloping Cell Layer* (EVL), de modo que si a éstas últimas se les suprime la capacidad de desplazarse, las LOPs no migran [Pulgar et al., 2018]. Esto es porque las EVL descienden mediante otro mecanismo [Behrndt et al., 2012] y debido al enlace con las LOPs pueden arrastrarlas hasta el polo vegetal. Cabe mencionar que el enlace es flexible lo que permite a las LOPs deformarse mientras son traccionadas. Es por ello que se modela mediante un resorte que conecta el centro de las LOPs con un punto móvil que representa las EVL, como se observa en la figura 5.3. Dicho punto se mueve con velocidad fija hacia el polo vegetal.

Experimentalmente, al inicio del proceso no todas las LOPs cuenta con el enlace a las EVL. En efecto, las células más cercanas al polo vegetal tienen mayor probabilidad de estar enlazadas, lo cual se ajustó experimentalmente mediante la distribución de probabilidades $P_{\text{enlace}} = Ae^{\lambda y}$ con $\lambda = 0.04 \mu\text{m}^{-1}$ y A constante de normalización. Luego, al inicio de las simulaciones, se asignan los enlaces solo a un porcentaje de las células, con método de Monte Carlo, y de forma aleatoria pero respetando la fracción experimental observada.

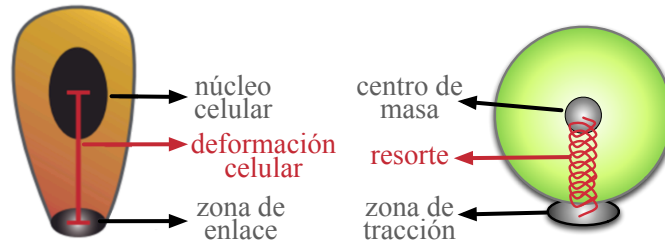


Figura 5.3: Representación de enlace en el modelo. Al lado derecho un esquema de las observaciones experimentales donde la LOP es traccionada pero no de forma rígida ya que puede deformarse. Al lado izquierdo representación del enlace en el modelo mediante un resorte unido a un punto móvil.

Por otro lado, se observa que los enlaces con las EVL se pierden gradualmente en el proceso con tasas temporales estudiadas. Por consiguiente, en el programa éstos también se pierden, respetando las tasas observadas (ver figura 5.4) [Pulgar et al., 2018] y usando una lista de tiempos de pérdida elaborada al inicio de la simulación. Además, las observaciones experimentales indican que las células más cerca del polo animal tienen mayor probabilidad de perder su enlace, lo cual se ajusta según $P_{\text{pérdida}} = Ae^{-\lambda y}$ con $\lambda = 0.04 \mu\text{m}^{-1}$ y A constante de normalización. Este último punto se reprodujo en el modelo de modo que cuando la simulación llega a alguno de los tiempos de pérdida de la lista, se escoge una célula mediante el método de Monte Carlo con probabilidad $P_{\text{pérdida}}$ para que deje de estar enlazada con el resorte.

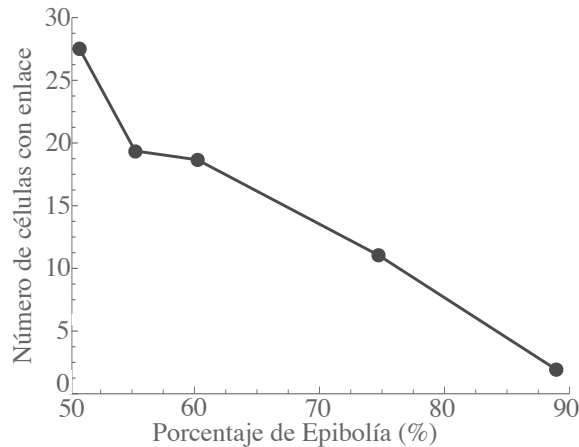


Figura 5.4: Mediciones del número de células enlazadas en función de la fracción de epibolía transcurrida. [Pulgar et al., 2018]

5.1.4. División celular

Como en muchos de los fenómenos biológicos, durante la migración de las LOPs existe la posibilidad de que éstas se dividan. En el modelo este proceso se incorpora de la siguiente manera: se escoge una célula que tenga tamaño regular, es decir, que no se haya dividido recientemente, y se reemplaza por dos células más pequeñas con la mitad de los radios de la progenitora para evitar solapamientos y respetar la estructura de monocapa. Posteriormente, las LOPs crecen con una tasa de $\nu_{\text{crecer}} = 18.5 \mu\text{m}/\text{min}$ hasta que alcanzan un

radio regular, con una velocidad de crecimiento que es lo suficientemente rápido como para que la célula no se demore el proceso completo en alcanzar el tamaño normal, y suficientemente lento como para no provocar solapamientos con células vecinas. El resumen del proceso se esquematiza en la figura 5.5

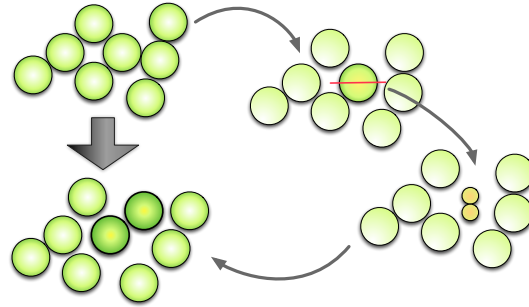


Figura 5.5: Proceso de división celular. Una vez seleccionada una LOP se reemplaza por dos células de la mitad del radio original que crecen hasta alcanzar un tamaño regular.

Los tiempos exactos de división celular se extrajeron a partir de datos experimentales [Pulgar et al., 2018] de modo que la simulación reprodujese de forma más fehaciente los experimentos.

5.1.5. Interacción LOP-LOP

Como se explicó previamente, se espera que las LOPs desciendan debido al enlace que algunas tienen con las EVL. No obstante, dichos enlaces se van perdiendo a lo largo del tiempo, por lo que no puede ser el único mecanismo que explique cómo las LOPs llegan al polo vegetal. Además, existen evidencias experimentales de que las células interactúan entre ellas a corto y largo alcance [Pulgar et al., 2018]. Luego, en el modelo se consideró atracción entre las LOPs debido a las protrusiones que ellas generan, y repulsión debido al volumen excluido para evitar solapamientos. Ambos efectos quedan bien descritos por un potencial tipo Lennard Jones U , el cual es bien conocido en física atómica por describir de forma simple la atracción a largas distancias y a la vez, repulsión a cortas distancias. En términos del potencial, la fuerza entre LOPs quedaría descrita por $\mathbf{F}_{LOP} = -\nabla U$, con U

$$U = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^n \right] \quad (5.1)$$

donde $\sigma = R_1 + R_2$ la suma de los radios del par que está interactuando, ε la intensidad de la fuerza y r las distancias relativas entre los centros de masa. El valor de n se determinó de modo que las simulaciones se ajustaran de mejor manera a las observaciones experimentales, y su valor concluido fue de $n = 2$, deducido a partir de los videos que muestran interacciones de largo alcance entre células. Adicionalmente, el modelo admite que cuando dos LOPs se acercan cierta distancia pasen a un estado de adhesión entre ellas, lo que se traduce en un pozo de potencial mayor (ε mayor). Luego, se usan dos valores que dan cuenta de la fuerza con la que las LOPs interactúan: ε_1 para interacciones a largas distancias y ε_2 ($\varepsilon_2 > \varepsilon_1$) para el rango de adhesión. En el modelo, una vez formadas una adhesión, ésta puede persistir en el tiempo, por lo que el potencial de interacción presenta histéresis

$$\varepsilon = \begin{cases} \varepsilon_2 & r < r_1 \\ \varepsilon_1 & r > r_2 \end{cases}, \quad (5.2)$$

donde se tomó $r_1 = 1,12\sigma$ que corresponde a la distancia de equilibrio, donde se encuentra el mínimo del pozo de potencial, y $r_2 = 1,5\sigma$. La figura 5.6 muestra la forma del potencial de interacción cuyo límite esta en $r_c = 2,5\sigma$.

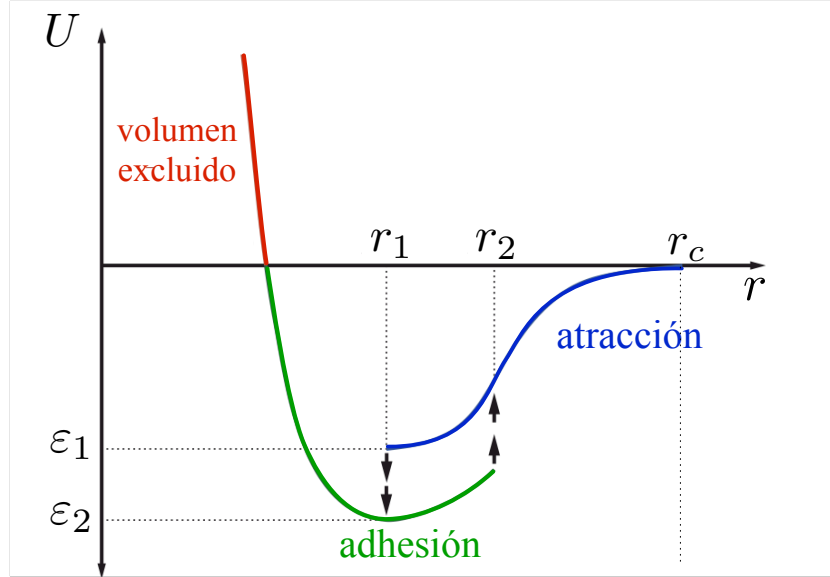


Figura 5.6: Potencial de Lennard Jonnes con histéresis. En rojo se muestra la zona de volumen excluido donde las LOPs se repelen. En azul el régimen de atracción y en verde el de adhesión. Si dos células que interactuaban mediante atracción se acercan un radio menor que r_1 pasan a un régimen de adhesión. De igual modo, si dos células adheridas se alejan un radio superior a r_2 vuelven a un régimen de atracción. La distancia r_c corresponde a la distancia de corte de interacción de las LOPs.

5.1.6. Resumen

Tomando en cuenta todas las componentes que el modelo considera se procede a describir la dinámica que siguen las LOPs en la simulación. Por su tamaño microscópico y la alta viscosidad del ambiente, la inercia es irrelevante. Por consiguiente una célula sometida a una fuerza \mathbf{F} se moverá con velocidad $\mathbf{v} = \mu\mathbf{F}$ donde μ es la movilidad que depende del coeficiente de fricción. Este último factor puede ser absorbido por la fuerza, de modo que ésta tenga las mismas unidades que la velocidad en $\mu\text{m}/\text{min}$.

Luego, considerando la difusión de las células, los enlaces y las interacciones LOP-LOP, en un intervalo de tiempo Δt el desplazamiento de la i -ésima LOP se obtiene usando el método de Euler para ecuaciones diferenciales estocásticas y proyectándolo en la esfera en cada paso de tiempo, y está dado por

$$\Delta\mathbf{r}_i = \left[\sum_j \mathbf{F}_{\text{LOP}}(\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j) - k(\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_i^A) \right] \Delta t + \sqrt{2D_x^f \Delta t} \eta_x \hat{x} + \sqrt{2D_y^f \Delta t} \eta_y \hat{y}, \quad (5.3)$$

si tienen enlace con alguna EVL y

$$\Delta\mathbf{r}_i = \left[\sum_j \mathbf{F}_{\text{LOP}}(\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j) \right] \Delta t + \sqrt{2D_x^a \Delta t} \eta_x \hat{x} + \sqrt{2D_y^a \Delta t} \eta_y \hat{y} \quad (5.4)$$

si no están enlazadas. \mathbf{r}_i^A corresponde a la posición del punto de enlace (EVL) y η son números aleatorios con distribución Gaussiana de varianza uno y promedio nulo que se generan en cada paso de tiempo. Cuando una célula pierde el enlace, desaparece el término elástico en la ecuación (5.3) dando paso a que la célula se desplace según la dinámica descrita por (5.4).

Cabe mencionar que al inicio del programa un tiempo del orden de un minuto donde las células solo se desplazaban como caminantes aleatorios permitía al sistema relajarse. La razón de esta consideración es que en los embriones reales, las LOPs no necesariamente se encuentran en una monocapa, y al considerar las posiciones de sus núcleos como condición inicial, se producían solapamientos causando fuerzas muy grandes entre las células. Al dar un tiempo de relajación, las LOPs se desplazaban evitando efectos no deseados.

5.2. Valores de la célula

Con el objetivo de simular el fenómeno de la forma más realista posible, varios de los valores usados fueron tomados de los experimentos. El resumen de todos ellos se encuentra en la figura 5.7.

- **Tamaño LOPs (R_{LOP}):** $7 \mu\text{m}$
Los radios de las células se asignan aleatoriamente con promedio $7 \mu\text{m}$ y distribución uniforme entre $0,7R_{LOP}$ y $1,3R_{LOP}$ con el objetivo de emular la distribución de radios experimental y evitar cristalización durante el proceso. [Pulgar, 2017]
- **Tamaño del huevo (R_h):** $350 \mu\text{m}$
Pese a que los distintos huevos pueden tener tamaños diferentes, se considera un tamaño promedio para el modelo. [Pulgar, 2017]
- **Coefficientes de Difusión (D_x, D_y):** $(2.8 \mu\text{m}^2/\text{min}, 1.9 \mu\text{m}^2/\text{min})$
Para el coeficiente de difusión en x , se calculan los desplazamientos cuadráticos medios en x , $\langle \Delta X^2 \rangle$ para los intervalos de tiempo dt , de modo que $D_x = \langle \Delta X^2 \rangle / (2dt)$. Análogamente se calcula $D_y = \langle \Delta Y^2 \rangle / (2dt)$. (Análisis propio a partir de los datos proporcionados por [Pulgar, 2017])
- **Velocidad de EVL (V_{EVL}):** $2 \mu\text{m}/\text{min}$
El extremo del resorte no conectado a la LOP se desplaza simulando a la EVL y desciende con velocidad que se asumirá constante. (Análisis propio a partir de los datos proporcionados por [Pulgar, 2017])
- **Constante elástica del resorte (k):** 2min^{-1}
La constante elástica se ha ajustado para describir de mejor manera los experimentos. Valores más pequeños (resortes más blandos) no son lo suficientemente fuertes para arrastrar a las LOPs. Valores más altos (resortes más rígidos) no permiten a las células interactuar con las LOPs vecinas. (Análisis propio a partir de los datos proporcionados por [Pulgar, 2017])
- **Condición inicial y tiempos de división celular:** Las posiciones iniciales de las LOPs se toman directamente de los experimentos. Para las simulaciones se han considerado tres huevos diferentes. Por otro lado, como ya se detalló anteriormente, los tiempos de división celular también se extraen directamente de los experimentos [Pulgar, 2017].

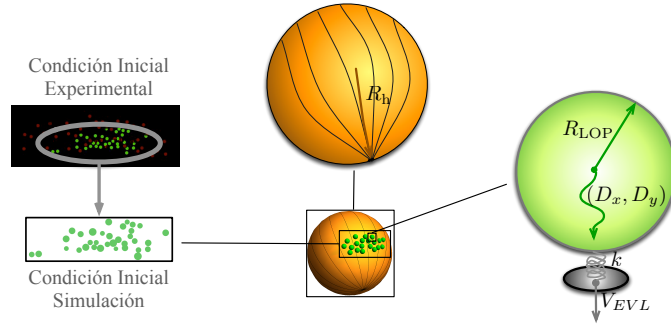


Figura 5.7: Sistema con todos los valores detallados. Las LOPs (radio R_{LOP}) se desplazan sobre una esfera radio R_h . La célula es traccionada por un resorte de constante k unido a un punto que se mueve con velocidad constante V_{EVL} . D_x y D_y son los coeficientes de difusión en x e y respectivamente. La condición inicial se toma de los experimentos.

5.3. Índices de Calidad

Mediante simulaciones computacionales se buscan los parámetros ε_1 y ε_2 capaces de reproducir de mejor manera el experimento. Se usan 50 secuencias de números aleatorios diferentes para cada combinación $(\varepsilon_1, \Delta\varepsilon)$ con $\Delta\varepsilon = \varepsilon_2 - \varepsilon_1$. Se definen cuatro índices de calidad que permiten evaluar los resultados arrojados para cada combinación comparándolos con el experimento.

5.3.1. Migración de LOPs (Q_1)

La primera observación del fenómeno que se espera que la simulación reproduzca, es que las células se desplazan hacia el polo vegetal. Para ello se mide la distancia vertical recorrida por el centro de masa de las LOPs (Δy) en un tiempo $t = 100$ min. El valor calculado se compara con el valor experimental observado, $\Delta y^{exp} = 187 \mu m$. Cabe mencionar que solo se consideran los primeros 100 minutos puesto que posteriormente el modelo pierde validez debido al bajo número de células que conservan el enlace. Se define

$$Q_1 = \left\langle \frac{\Delta y^{sim}}{\Delta y^{exp}} \right\rangle, \quad (5.5)$$

correspondiente al promedio de los cuocientes sobre las 50 secuencias de números aleatorios diferentes.

5.3.2. Formación del racimo (Q_2)

Al final del proceso se observa que las LOPs inicialmente dispersas, se organizaban en un grupo más condensado, tipo racimo, cuyas células vecinas se encuentran a distancias iguales o menores que $1,5\sigma$. Una simulación que fuese capaz de reproducir esta característica al final del proceso debería mostrar un solo gran racimo que contuviese al menos el 75 % de las células. Para las 50 secuencias de números aleatorios diferentes de cada combinación, se define

$$Q_2 = \frac{N_{exitosas}}{50}, \quad (5.6)$$

donde $N_{exitosas}$ da cuenta del número de simulaciones donde se reprodujo la formación del racimo.

5.3.3. Flexibilidad del racimo (Q_3)

Variando los valores de ε cambia la intensidad con la que las LOPs se atraen, lo que se traduce en un racimo más rígido o uno más flexible. Luego, se mide el cambio promedio de las distancias relativas entre vecinos, $\langle \Delta r_{\text{vecinos}}^{\text{sim}} \rangle$, para cuadros temporales separados por 4 min (al igual que los datos experimentales) y se compara con el valor medido experimentalmente mediante seguimientos $\langle \Delta r_{\text{vecinos}}^{\text{exp}} \rangle = 0.24 \mu\text{m}$. El valor de

$$Q_3 = \exp \left[- \left(\frac{\langle \Delta r_{\text{vecinos}}^{\text{sim}} \rangle - \langle \Delta r_{\text{vecinos}}^{\text{exp}} \rangle}{0.5 \mu\text{m}} \right)^2 \right], \quad (5.7)$$

es igual a 1 cuando se reproduce el valor medido experimentalmente, mientras que la constante 0.5 ayuda a discriminar entre buenos y malos resultados.

5.3.4. Conectividad entre células con y sin enlace (Q_4)

Debido a la importancia que tiene el enlace entre las LOPs enlazadas y las EVL, se espera que la distribución dentro del grupo de células con y sin enlace sea tal que la interacción LOP-LOP permita el arrastre del conjunto completo. Para evaluar esta característica relacionada con la conectividad entre células, se calcula en cada simulación el número promedio de LOPs enlazadas que se encuentran a una distancia inferior a $4R_{\text{LOP}}$ de LOPs no enlazadas, Λ , que en el tiempo decrece debido a la pérdida de enlaces. El valor del coeficiente de calidad es

$$Q_4 = \exp \left[- (\bar{\Lambda} - \Lambda_{\text{exp}})^2 \right], \quad (5.8)$$

donde $\bar{\Lambda}$ es el promedio temporal de Λ en las simulaciones, y se compara con el valor obtenido experimentalmente considerando 10 huevos diferentes, $\Lambda_{\text{exp}} = 2,6$. Al igual que en Q_3 cuando se reproducen resultados de forma satisfactoria, $Q_4 = 1$.

5.4. Resultados del modelo

En la figura 5.8 se muestran los resultados obtenidos para distintas combinaciones (ε , $\Delta\varepsilon$) para diferentes índices de calidad considerando las distintas condiciones iniciales.

A partir de los resultados se concluye que para $\varepsilon_1 > 20 \mu\text{m}^2/\text{min}$ se satisfacen los índices de calidad Q_1 y Q_2 , reproduciendo la migración colectiva de las células y la formación de un racimo al final del proceso. Por otro lado, para el índice Q_3 relacionado con la flexibilidad de formación del racimo, se observa que en la región $\varepsilon_1 < 30 \mu\text{m}^2/\text{min}$ y $\Delta\varepsilon < 40 \mu\text{m}^2/\text{min}$ los resultados simulados reproducen lo experimentalmente observado. Finalmente para Q_4 se obtienen buenos resultados para valores intermedios de ε_1 . Con lo anterior, la primera conclusión es que existe una combinación de parámetros, ε_1 y $\Delta\varepsilon$, y por consiguiente ε_1 y ε_2 que satisfacen a la vez los cuatro índices de calidad definidos. Dicha combinación de parámetros está dada por $\varepsilon_1 = 20 \mu\text{m}^2/\text{min}$ y $\varepsilon_2 = 40 \mu\text{m}^2/\text{min}$ con una tolerancia para cada uno de $\pm 5 \mu\text{m}^2/\text{min}$. Estos números validan la capacidad del modelo de modo que se puede hacer uso de éste para reestudiar el fenómeno.

Otra forma de visualizar los resultados es comparando las trayectorias experimentales con las de las simulaciones. En la figura 5.9 se observa que en el proceso real pueden haber solapamientos debido a que el epitelio no es exactamente una monocapa y algunas células podrían extruirse a capas superiores, mientras

que en la simulación no hay solapamiento, pero a pesar de ello las trayectorias se logran reproducir de forma satisfactoria.

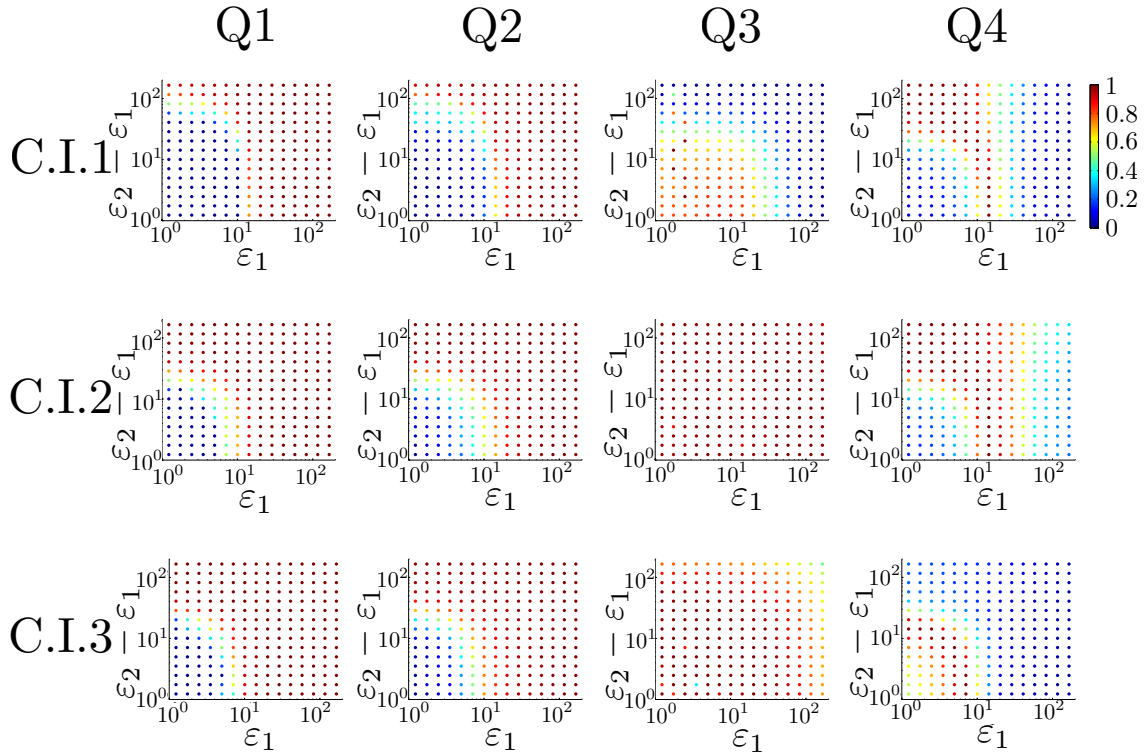


Figura 5.8: Para cada combinación de ε_1 y $\Delta\varepsilon$ se usaron 50 secuencias de números aleatorios diferentes con las que se calcularon los cuatro índices de calidad. El proceso se realizó para tres condiciones iniciales diferentes.

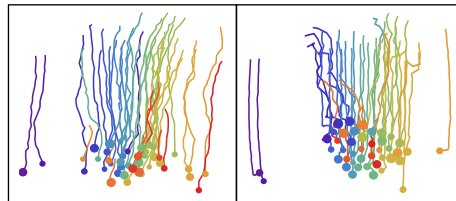


Figura 5.9: Izquierda: Trayectorias experimentales. Derecha: Trayectorias de simulación. Ambas para la condición inicial C.I.1. Cada color representa la trayectoria de una célula diferente.

5.4.1. Suficiencia de parámetros considerados

Con el objetivo de verificar la suficiencia de los parámetros considerados, se corren simulaciones suprimiendo distintas características. En cada escenario se corren 50 simulaciones con semillas distintas suprimiendo una o algunas de las características relevantes. Observando la densidad de células de las condiciones finales, se comparan con el caso experimental. Los resultados, en la figura 5.10, muestran que todas las componentes consideradas son requeridas para que el modelo reproduzca el fenómeno.

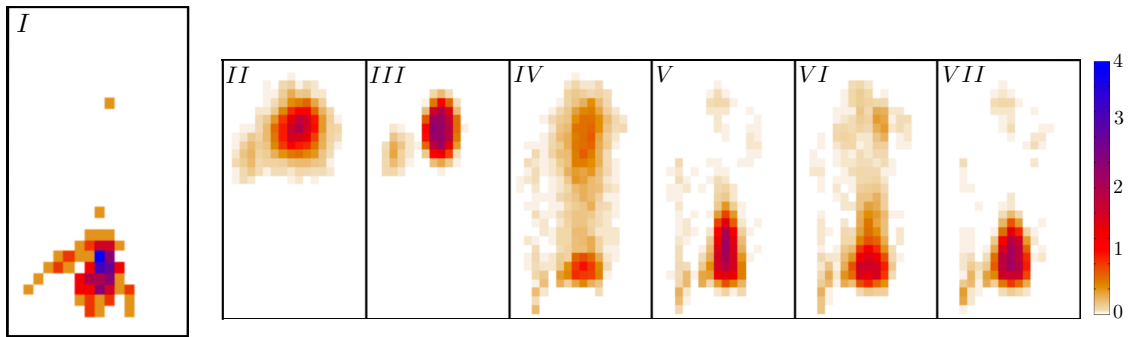


Figura 5.10: Mapas de densidades de las condiciones finales donde se combinan las tres condiciones iniciales usadas. En cada caso se resta una o más de las componentes del modelo. Todas las simulaciones consideraron el movimiento de caminantes aleatorio (difusión). I: Condición final de los casos experimentales. II: LOPs que solo muestran caminata aleatoria. III LOPs que interactúan atrayéndose y adhiriéndose, pero sin enlaces con las EVLs. IV: LOPs que no interactúan entre ellas, pero sí existe enlace con EVL. V: LOPs que solo interactúan a larga distancia (atracción), además de estar presente los enlaces con las EVL. VI: LOPs que solo interactúan a corta distancia (adhesión), además de estar presente los enlaces con las EVL. VII: Modelo completo con interacción entre LOPs a corta y larga distancia, además del enlace con las EVL.

En particular, la interacción entre LOPs permite que se reagrupen las células independiente de si descienden o no como se observa en la figura 5.10 III. Por otra parte, se observa que en ausencia total de interacción entre células, solo un grupo muy pequeño, correspondiente al enlazado a EVLs, logra descender, por lo que se pierde completamente la forma de racimo esperada (figura 5.10 IV). Además, en presencia de los enlaces a las EVL, la atracción tiene un rol más relevante que la adhesión en la formación del racimo final, puesto que el número de escapes es mayor cuando solo hay adhesión (5.10 VI) a que cuando solo hay atracción (5.10V). Esto se entiende porque mientras descienden las células la única forma de reagrupar a las LOPs que se encuentran más distanciadas del racimo principal es mediante interacciones de largo alcance.

5.5. Estudio de interacción entre vecinos

Tomando en cuenta que el número de LOPs con enlace decrece en el tiempo, surgen dudas acerca del rol que las células no enlazadas tienen en el proceso, es decir, si solo son carga a arrastrar por las enlazadas o si tienen un rol más activo en el transporte del grupo completo. Al contrario de lo que se podría suponer intuitivamente, estudiando casos con menor número de células se concluye que al aumentar el número de LOPs enlazadas no necesariamente se aumenta la eficiencia del transporte. Cabe recordar la importancia de conservar el número de células en el proceso, ya que el conjunto forma el órgano de la lateralidad, importante en la determinación de la asimetría derecha-izquierda en el pez [Essner et al., 2005], por lo que una pérdida importante de LOPs podría tener repercusiones graves en el desarrollo posterior del animal.

Las observaciones minuciosas de los videos de las simulaciones llevan a suponer que una célula enlazada y otra libre solo favorecen la migración colectiva si están a una distancia muy reducida. En efecto, si la separación entre esas células es muy amplia, la célula enlazada sigue avanzando de forma autónoma dando menos flexibilidad a la formación del racimo como se esquematiza en el cuadro I de la figura 5.11. La presencia de una célula libre entre una enlazada y otra libre (t_0 del cuadro II de la figura 5.11) permite a la célula tener un rol de puente interactuando con la más lejana con mucha más libertad de lo que lo haría

si estuviese con un enlace (tiempo inicial t_0 del cuadro I de la figura 5.11). Dicha libertad se traduce en un retraso de su migración logrando el arrastre de la célula más lejana que en otro caso se habría perdido como se ve en el tiempo final t_f del cuadro I de la figura 5.11. Mientras que la presencia de una célula libre, entre una enlazada y otra libre, permite una interacción más fuerte entre las no enlazadas, lo que se traduce en una fuerza para contrarrestar la tracción de la EVL sobre la enlazada, de modo que se atrase su migración permitiendo la agrupación del racimo, como se observa en el cuadro II de la figura 5.11.

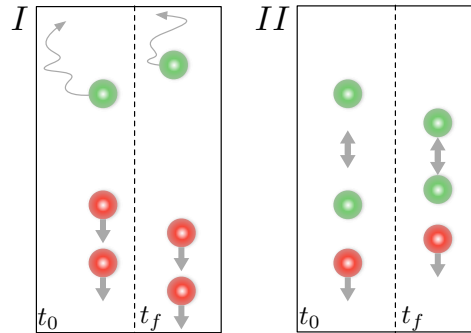


Figura 5.11: Esquema de pérdidas de células según enlaces a EVL y distancia que las separa. En el tiempo inicial t_0 del cuadro I, la célula central está enlazada por lo que tiene menos libertad de movimiento provocando que la célula libre escape en un tiempo posterior t_f , debido a la baja interacción entre la célula libre y las enlazadas. Por otro lado, el cuadro II muestra una célula central libre y por consiguiente, con más libertad para acercarse a la célula libre más lejana e intensificar la fuerza de interacción entre ellas, lo que en un tiempo posterior t_f es suficiente para evitar el escape.

Lo anterior permite plantear la hipótesis de que los pares de células enlazadas-no enlazadas son significativos para la evolución positiva del racimo siempre y cuando éstos sean entre células vecinas, entendiéndose por vecinas dos células cuya distancia entre ellas es lo suficientemente pequeña para que no pueda ubicarse una tercera célula. Si hay dos células enlazadas y una libre separadas por espacios significativos, las dos primeras mostrarán un comportamiento menos flexible y seguirán avanzando, dejando atrás a la célula sin enlace. Mientras que habiendo dos células libres, éstas pueden interactuar más y juntas tienen más fuerza para ‘retrasar’ a la célula enlazada permitiendo que el racimo se agrupe.

Debido al gran número de células que tienen los experimentos, se hace complejo analizar los distintos casos y todas las posibles geometrías. Es por ello que se estudian configuraciones simples de cuatro células que permitan entender mejor el rol de las células no enlazadas en el proceso de arrastre. De las cuatro células consideradas, dos de ellas están siempre enlazadas y descienden con el mecanismo estudiado. Hay una tercera célula que puede estar o no enlazada, y se estudia el efecto puente de ésta en el arrastre de una cuarta célula no enlazada. Se usaron cuatro configuraciones, representadas en la parte superior de la figura 5.12. Específicamente, se varió la distancia inicial d entre la tercera y la cuarta célula comparando la probabilidad de que la última escapara cuando la tercera célula estaba o no enlazada para simulaciones de 50 minutos. Los resultados se muestran en la figura 5.12.

Como era de esperar, mientras mayor es el valor de d , menor es la probabilidad de casos sin escape. Respecto al efecto de la célula puente, se obtiene que los resultados son más complejos que los planteados inicialmente en la hipótesis. Si las células están ordenadas en línea, orientadas en la dirección de movimiento (condición inicial I de la figura 5.12), se producen más pérdidas cuando la célula puente no está enlazada. Es decir, la célula puente es arrastrada por la no enlazada y tanto la tercera como la cuarta célula se pierden. En esta configuración, el arrastre de las dos enlazadas no es suficiente para que todo el conjunto sea arrastrado.

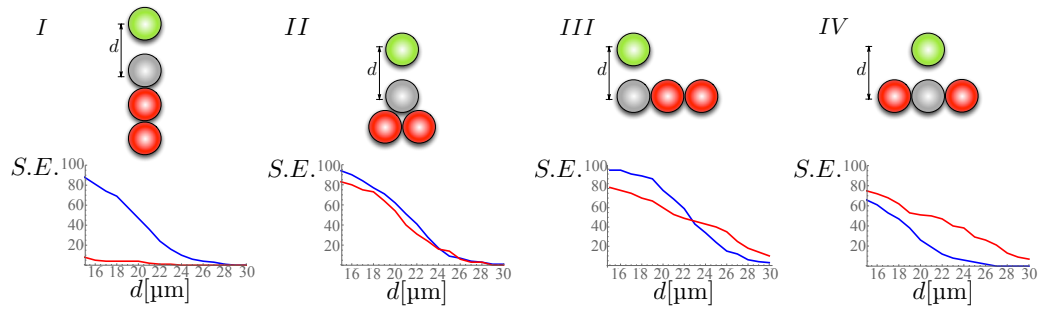


Figura 5.12: Arriba: configuraciones usadas para verificar la hipótesis. En rojo células enlazadas. En gris la célula puente que puede estar enlazada o no. En verde la célula no enlazada a la que se estudia su escape. Abajo: fracción de casos en las que la célula no enlazada es arrastrada en función de la distancia inicial d (S.E. sin escape). En azul, casos con la célula gris enlazada a una EVL y en rojo, casos en que está libre.

Si ahora la célula puente está unida más directamente a las dos células enlazadas (condición inicial II, figura 5.12), los resultados muestran que la efectividad de arrastrar a la célula no enlazadas es prácticamente independiente del estado de la célula puente.

Para la condición inicial III, donde las células están arregladas formando una L , los resultados son más complicados, pues para pequeñas distancias es eficiente que la célula puente esté enlazada, mostrando que es capaz de arrastrar de manera eficaz a la célula no enlazada. Pero para mayores distancias ($d > 23 \mu\text{m}$) se torna más eficiente que la célula puente no esté enlazada. Bajo estas condiciones, sin perder la interacción con las células enlazadas, la célula puente puede atrasarse de modo de atrapar a la célula no enlazada y arrastrarla de vuelta al grupo.

Finalmente, se consideró una situación análoga a la condición inicial III, pero esta vez, tanto la célula puente como la no enlazada se encontraban al medio, como se observa en la figura IV 5.12. En este caso, se observa que los resultados para la célula puente no enlazada son siempre mejores que los de la célula puente enlazada. Esto se explica porque cuando la célula está libre, le es más fácil desplazarse permitiendo que el sistema adopte una configuración más estable evitando los escapes.

En conclusión las configuraciones III y IV muestran que algunas células no enlazadas actúan como puentes ayudando a capturar y arrastrar a las células no enlazadas. Luego, la combinación de células enlazadas-no enlazadas le da flexibilidad al racimo permitiendo que se deforme mientras es arrastrado por las EVL. La flexibilidad le permite al grupo trasladar más células sin enlaces, evitando los escapes, lo que es muy importante para preservar el número de células y con ello la efectividad en la formación del órgano de la lateralidad.

Capítulo 6

Conclusiones y futuros trabajos

En esta tesis se propusieron modelos para dos sistemas diferentes donde se observa migración celular de agentes no polarizados. En el primer modelo, las migraciones observadas aparentemente eran dirigidas por diferencias de dureza en el sustrato, por lo que los estudios se hicieron usando teoría de elasticidad. En el segundo, se usó un modelo de elementos discretos, con el fin de entender el rol de la interacción entre células vecinas y con las del epitelio superior. Ambos modelos fueron estudiados teóricamente y analizados con herramientas numéricas.

En el tercer capítulo se propuso un modelo donde la célula era representada por un disco con cuatro contactos que se movilizaba sobre una placa delgada, mediante protrusiones que hacía con sus extremos de forma aleatoria, las cuales arrugaban el sustrato. El borde de las EVL era representado por una franja delgada más dura. En este modelo que considera que la interacción entre la célula y el sustrato está dada solo por la fuerza que se ejerce en los puntos de contacto cuando la primera protruye, los resultados demuestran que la célula no es capaz de sentir una atracción hacia la zona más rígida. En efecto, para franjas con módulo de Young más bajos (más cercanos al de la zona homogénea), la célula se comporta como un caminante aleatorio, igual que cuando está sobre un sustrato homogéneo. No obstante, para durezas mayores las DCLs sí percibían la presencia de la franja a largas distancias lo que se reflejaba en una repulsión de la misma. Otro resultado interesante, concluido a partir de los coeficientes de difusión estudiados cuando el sustrato es homogéneo, se relaciona con la dispersión de los largos de las protrusiones. Cuando son todas del mismo largo, la célula oscila en torno a un punto fijo, mientras que entre mayor es la diferencia de los largos que dichas extensiones pueden tener, mayor es el coeficiente de difusión que las células muestran.

Adicionalmente, en el mismo capítulo se estudió el efecto de protrusiones que se recogían no solo arrugando el sustrato, sino que también deslizando sobre el mismo. Se analizó el caso unidimensional, a partir del cual se concluyó que en sustratos homogéneos el centro de masa no se desplazaba con la contracción de protrusiones, mientras que para sustratos con una franja más dura, las diferencias con respecto al sustrato homogéneo eran imperceptibles. Los resultados sugieren que en dos dimensiones la diferencia que podría hacer una contracción con deslizamiento no es significativa de modo que la célula no sentiría efectos por parte de la franja más dura.

Por otro lado, se estudiaron los efectos que tenía en la migración de las células un sustrato con espesor variable. Los resultados demuestran que la célula debería desplazarse hacia zonas con mayor espesor, lo que se contradice con lo experimentalmente observado. En efecto, las DCLs migran hacia los bordes más delgados, lo que descarta la diferencia de espesor como causa de la migración.

Las conclusiones globales del capítulo sugieren que la presencia de una franja más dura no modifica las deformaciones del sustrato durante las protrusiones de modo que genere un efecto de atracción hacia dicha zona. Por consiguiente, se hace necesario estudiar otros mecanismos o tomar otras consideraciones que permitan entender el fenómeno que se está observando. En la sección de ‘Futuros trabajos’ se proponen modificaciones que acerquen el modelo a uno más realista.

En el capítulo cuatro, se exploran los efectos que tendría para la motilidad de la célula, el desplazarse sobre un sustrato con tensiones activas. Es decir, que se encuentra sometido a deformaciones producto de fuerzas internas. Luego, en este capítulo se estudiaron los efectos en el desplazamiento de una célula sobre un sustrato deformado debido a las tensiones activas y a las protrusiones que la misma célula hacía. El estudio se llevó a cabo tomando deformaciones lineales del sustrato. Los resultados obtenidos demuestran que pese a que no se observa migración celular, debido a que el tensor de deformaciones es uniforme, existe un cambio en el coeficiente de difusión para ciertos valores de deformación. Estas diferencias hacen suponer que para deformaciones no lineales, la célula sí sería capaz de sentir una diferencia entre un sustrato con tensiones activas y uno relajado. Lo anterior sugiere que la migración celular dirigida dependería no solo del módulo de Young y el espesor de la membrana como en el capítulo tres, sino que además de las deformaciones, sugiriendo que los fenómenos de durotaxis a larga distancia solo son compatibles cuando el sustrato está tenso.

En el quinto capítulo, se estudió otro sistema donde se observa migración celular, en este caso de las células LOPs durante la epibolia de los peces cebras. El modelo planteado consideraba las interacciones entre LOPs, modeladas mediante un potencial de Lennard-Jones, en conjunto con los enlaces a las EVL, modelados mediante un resorte, como los responsables de la migración colectiva y la formación de un racimo al final del proceso. Se tomaron parámetros experimentales como la caminata aleatoria, que emulaba las protrusiones de las células, las tasas de pérdidas de enlaces y divisiones celulares, condiciones iniciales y dimensiones experimentalmente observada. Los resultados encontrados demuestran que existe una combinación de parámetros que permite reproducir lo experimentalmente observado de forma satisfactoria, solo cuando todas las componentes son consideradas (adhesión entre LOPs, atracción entre LOPs y vínculo con EVLs). Finalmente, mediante un estudio más localizado, usando solo cuatro células, se estudia el rol de las células no enlazadas como agentes flexibles que evitan el escape masivo de LOPs no enlazadas. En su conjunto, los resultados dan cuenta de la importancia que tiene la interacción LOP-LOP para asegurar que llegue un número suficiente y el conjunto pueda dar forma al órgano de la lateralidad contribuyendo con la formación normal del pez.

6.1. Trabajos futuros

Al estudio de durotaxis presentado, considerando la versatilidad del modelo de juguete, se le pueden hacer diversas modificaciones con el objetivo de reproducir de forma más realista el fenómeno y considerar algunas observaciones no tomadas en cuenta hasta ahora.

6.1.1. Protrusiones con deslizamiento

Todas las modificaciones que se sugieren a continuación se pueden trabajar considerando que las contracciones no solo arrugan el sustrato, sino que también deslizan sobre el mismo. Pese a que en la tesis se estudió solo para el caso de una célula que se desplazaba en una dimensión, es conveniente extenderlo a dos dimensiones y considerarlo en otros de los puntos sugeridos abajo para terminar de entender los efectos que tendría en el desplazamiento de las células.

6.1.2. Sugerencias para modelo con tensor de deformaciones lineal

Número de protrusiones

Con el fin de simplificar el modelo, se consideró que las células solo tenían cuatro puntos de apoyo donde se generaban las protrusiones. Sin embargo, en los videos se observa que las DCLs generan protrusiones en todas las direcciones. Por consiguiente, una forma de hacer el modelo más realista, es considerar un número mayor de puntos de apoyo, o al borde de la DCL como un continuo de puntos que protruyen.

Puntos de apoyo opuestos durante la contracción

En los modelos estudiados se consideró que en el proceso de contracción de la protrusiones, los vértices restantes se mantenían sujetos al sustrato. No obstante, algunas observaciones experimentales sugieren que antes de la contracción los puntos opuestos a la zona que protruye, en este caso el vértice opuesto, se levanta permitiendo a la célula tener más movilidad para desplazarse. Esta observación se puede incorporar al modelo haciendo un cambio en el ciclo descrito por la figura 3.2, de modo que antes de contraer, se levante el vértice opuesto como se ilustra en la figura 6.1.

Efecto de más de una franja

Para simplificar el estudio, en la tesis se consideró el borde de una EVL como una franja delgada en medio del sustrato. No obstante, las EVL tienen del orden de cinco lados (forma pentagonal), por lo que sería interesante estudiar el efecto en la migración de dos franjas ubicadas paralelamente o perpendicularmente, hasta combinar las franjas de mayor dureza formando cuadrados y pentágonos (ver figura 6.2).

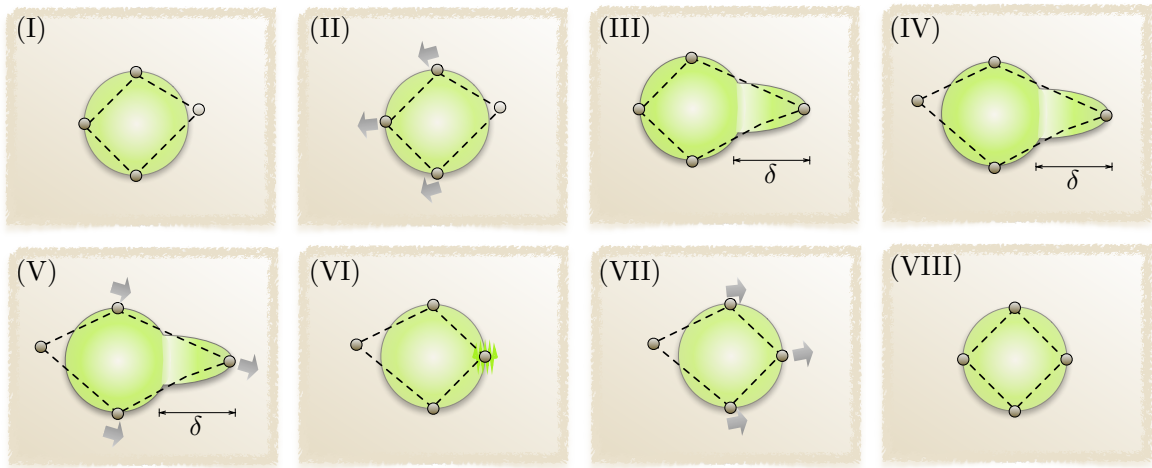


Figura 6.1: En la figura se muestra el ciclo para una célula que protruye relajando el extremo opuesto al cual se produjo la protrusión. (I) Se levanta uno de los vértices permitiendo al sustrato de la misma zona relaje. (II) La célula se desplaza para que la suma de las fuerzas sobre el sustrato vuelva a ser nula. (III) La protrusión elonga y se apoya nuevamente en el sustrato. (IV) Se levanta el vértice opuesto al de la protrusión. (V) Debido al segundo levantamiento, la célula se desplaza para que la suma de las fuerzas sobre el sustrato vuelva a ser nula. (VI) Se contrae la protrusión. (VII) Nuevamente la célula vuelve a relajar debido a que en el paso anterior el sustrato queda tenso. (VIII) El extremo opuesto vuelve a depositarse sobre el sustrato.

Número de DCLs

En la tesis se estudió solo una célula sobre una placa delgada. Sin embargo, se desconocen los efectos que podrían tener más DCLs compartiendo el mismo sustrato. En efecto, como se observa experimentalmente, el número de células profundas es lo suficientemente grande como para suponer que podrían alterar la deformación neta del sustrato y con ello la forma en que las mismas DCLs se desplazan. Para entender los efectos colectivos de las células estudiadas sobre el sustrato y las vecinas, sería conveniente acoplar las deformaciones ya consideradas en los vértices con las deformaciones debido a los vértices de otras células ubicadas en el mismo sustrato (ver figura 6.2).

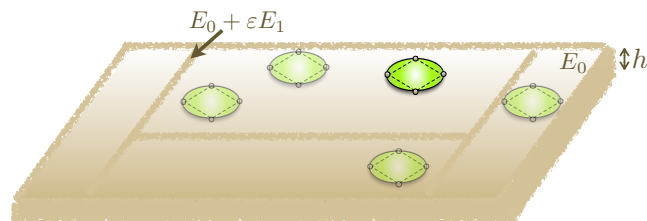


Figura 6.2: En la figura se muestra un posible escenario que considera más franjas de dureza diferente y un número mayor de DCLs.

Convoluciones no consideradas

En el modelo presentado, solo se consideraron las componentes de la convolución para el mismo punto donde se aplicó la fuerza para el caso de una franja más dura, pero no los términos de la convolución para los otros vértices (sección 2.3.2), por lo que se podría encontrar una deformación más precisa calculando dichos términos.

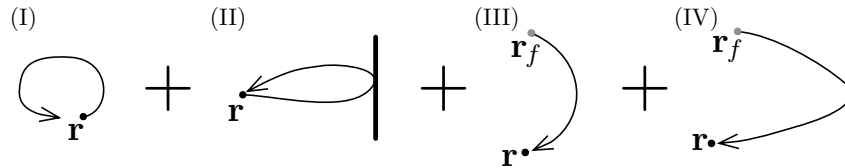


Figura 6.3: En la figura se repite el esquema de la figura 2.6, pero esta vez se considera la convolución en presencia de la franja, que se generan debido a las fuerzas en otros puntos (sumando IV).

6.1.3. Sugerencias para modelo con tensor de deformaciones no lineal

Deformaciones no lineales

Como se mencionó en el capítulo cuatro, para descubrir si las células migran en sustratos sometidos a tensiones activas es necesario considerar deformaciones no lineales de modo que el tensor de deformaciones sea dependiente espacialmente. Además de revisar en el sistema cartesiano casos como el de deformaciones cuadráticas en x o dependiente de y , sería conveniente también explorar otras geometrías. Por ejemplo, tomando en cuenta la forma de las EVL, considerar un sistema polar, donde las deformaciones del sustrato varían con el radio.

6.2. Sugerencias Experimentales

A partir de lo estudiado en la tesis, se generan una serie de interrogantes con respecto al fenómeno observado que no se pueden responder con los datos obtenidos y experimentos realizados hasta el momento. A continuación, se detallan algunas sugerencias experimentales que permitirían mejorar los modelos propuestos.

Estadísticas de seguimientos de DCL

Una de las preguntas que en la tesis se exploró, pero que no se pudo ahondar demasiado, está relacionada con la zona de las EVLs donde las DCLs se polarizan. Solo se contaba con un video que mostraba la trayectoria de una DCL hacia los bordes, que no es suficiente para concluir una distancia a la cuál las células se polarizan. Por consiguiente, se sugiere grabar un mayor número de DCLs para estudiar sus trayectorias como en la figura 1.5, de modo de establecer un rango de las zonas de caminata aleatoria y de migración polarizada dentro de las EVLs.

En la misma línea, sería interesante estudiar el comportamiento del citoesqueleto espacial y temporalmente mientras la célula se dirige a los bordes de las EVLs. Estos experimentos permitirían reforzar las observaciones de las trayectorias con el fin de entender la relación entre la polarización del citoesqueleto, la formación de protrusiones direccionadas y la observación de un movimiento direccional o el de un caminante aleatorio.

Finalmente, se sugiere también hacer los experimentos recién mencionados en EVLs cuyas tensiones corticales han sido manipuladas, como las de la figura 1.9. Estos experimentos permitirían entender los efectos del cambio de tensión en el sustrato sobre la migración de las células profundas.

Por otro lado, experimentalmente es posible marcar el citoesqueleto de modo de identificar exactamente los largos de las protrusiones de las DCLs. De este modo, se podría hacer una estadística de la dispersión de estos e insertar al modelo como una componente experimental más.

Medición de tensor de deformaciones

Como se mencionó en la sección de trabajos futuros del modelo con tensiones activas, se deben estudiar los efectos que tienen tensores de deformación activa no lineales. Para ello sería conveniente tener el dato experimental de la forma de dicho tensor. Lo anterior se puede obtener mediante ablaciones con láser, haciendo cortes en la dirección radial y tangencial de las EVLs, y midiendo el efecto que tiene en las células vecinas.

Bibliografía

- [Alberts, 2017] Alberts, B. (2017). *Molecular biology of the cell*. Garland science.
- [Allena et al., 2016] Allena, R., Scianna, M., and Preziosi, L. (2016). A cellular potts model of single cell migration in presence of durotaxis. *Mathematical biosciences*, 275:57–70.
- [Arezo et al., 2005] Arezo, M., Pereiro, L., and Berois, N. (2005). Early development in the annual fish *cynolebias viarius*. *Journal of Fish Biology*, 66(5):1357–1370.
- [Aubry et al., 2015] Aubry, D., Gupta, M., Ladoux, B., and Allena, R. (2015). Mechanical link between durotaxis, cell polarity and anisotropy during cell migration. *Physical biology*, 12(2):026008.
- [Barriga et al., 2018] Barriga, E. H., Franze, K., Charras, G., and Mayor, R. (2018). Tissue stiffening coordinates morphogenesis by triggering collective cell migration in vivo. *Nature*, 554(7693):523.
- [Behrndt et al., 2012] Behrndt, M., Salbreux, G., Campinho, P., Hauschild, R., Oswald, F., Roensch, J., Grill, S. W., and Heisenberg, C.-P. (2012). Forces driving epithelial spreading in zebrafish gastrulation. *Science*, 338(6104):257–260.
- [Brown and Loew, 1994] Brown, M. J. and Loew, L. M. (1994). Electric field-directed fibroblast locomotion involves cell surface molecular reorganization and is calcium independent. *The Journal of cell biology*, 127(1):117–128.
- [Cerdeja and Mahadevan, 2003] Cerdeja, E. and Mahadevan, L. (2003). Geometry and physics of wrinkling. *Physical review letters*, 90(7):074302.
- [Cerdeja, 2017] Cerdeja, M. (2017). Comunicación privada.
- [Devreotes and Zigmond, 1988] Devreotes, P. N. and Zigmond, S. H. (1988). Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and dictyostelium. *Annual review of cell biology*, 4(1):649–686.
- [Dombrowski et al., 2004] Dombrowski, C., Cisneros, L., Chatkaew, S., Goldstein, R. E., and Kessler, J. O. (2004). Self-concentration and large-scale coherence in bacterial dynamics. *Physical review letters*, 93(9):098103.
- [Essner et al., 2005] Essner, J. J., Amack, J. D., Nyholm, M. K., Harris, E. B., and Yost, H. J. (2005). Kupfer’s vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development*, 132(6):1247–1260.
- [Gray et al., 2003] Gray, D. S., Tien, J., and Chen, C. S. (2003). Repositioning of cells by mechanotaxis on surfaces with micropatterned young’s modulus. *Journal of biomedical materials research Part A*, 66(3):605–614.

- [Harland et al., 2011] Harland, B., Walcott, S., and Sun, S. X. (2011). Adhesion dynamics and durotaxis in migrating cells. *Physical biology*, 8(1):015011.
- [Isenberg et al., 2009] Isenberg, B. C., DiMilla, P. A., Walker, M., Kim, S., and Wong, J. Y. (2009). Vascular smooth muscle cell durotaxis depends on substrate stiffness gradient strength. *Biophysical journal*, 97(5):1313–1322.
- [Kemkemer et al., 2000] Kemkemer, R., Kling, D., Kaufmann, D., and Gruler, H. (2000). Elastic properties of nematoid arrangements formed by amoeboid cells. *The European Physical Journal E*, 1(2-3):215–225.
- [Kimmel et al., 1995] Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., and Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3):253–310.
- [Landau et al., 1969] Landau, L. D., Landau, L. D., and Lifshits, E. (1969). *Teoría de la elasticidad*, volume 7. Reverté.
- [Lauffenburger and Horwitz, 1996] Lauffenburger, D. A. and Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84(3):359–369.
- [Lo et al., 2000] Lo, C.-M., Wang, H.-B., Dembo, M., and Wang, Y.-I. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical journal*, 79(1):144–152.
- [Marchetti et al., 2013] Marchetti, M. C., Joanny, J.-F., Ramaswamy, S., Liverpool, T. B., Prost, J., Rao, M., and Simha, R. A. (2013). Hydrodynamics of soft active matter. *Reviews of Modern Physics*, 85(3):1143.
- [McCarthy et al., 1983] McCarthy, J. B., Palm, S. L., and Furcht, L. T. (1983). Migration by haptotaxis of a schwann cell tumor line to the basement membrane glycoprotein laminin. *The Journal of cell biology*, 97(3):772–777.
- [Parrish and Hamner, 1997] Parrish, J. K. and Hamner, W. M. (1997). *Animal groups in three dimensions: how species aggregate*. Cambridge University Press.
- [Paxton et al., 2004] Paxton, W. F., Kistler, K. C., Olmeda, C. C., Sen, A., St. Angelo, S. K., Cao, Y., Mallouk, T. E., Lammert, P. E., and Crespi, V. H. (2004). Catalytic nanomotors: autonomous movement of striped nanorods. *Journal of the American Chemical Society*, 126(41):13424–13431.
- [Pulgar, 2017] Pulgar, E. (2017). Comunicación privada.
- [Pulgar et al., 2018] Pulgar, E., Márquez, S., Guerrero, N., Schwayer, C., Hartel, S., Heisenberg, C., Soto, R., and Concha, M. (2018). Traction and adhesive forces integrate the movement and fate specification of organ progenitors in zebrafish. En preparación.
- [Raposo et al., 1991] Raposo, E., De Oliveira, S., Nemirovsky, A., and Coutinho-Filho, M. (1991). Random walks: A pedestrian approach to polymers, critical phenomena, and field theory. *American Journal of Physics*, 59(7):633–645.
- [Reig, 2017] Reig, G. (2017). Comunicación privada.
- [Reig et al., 2017] Reig, G., Cerda, M., Sepúlveda, N., Flores, D., Castaneda, V., Tada, M., Härtel, S., and Concha, M. L. (2017). Extra-embryonic tissue spreading directs early embryo morphogenesis in killifish. *Nature communications*, 8:15431.
- [Ridley et al., 2003] Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., and Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302(5651):1704–1709.

- [Schwarz and Safran, 2013] Schwarz, U. S. and Safran, S. A. (2013). Physics of adherent cells. *Reviews of Modern Physics*, 85(3):1327.
- [Stefanoni et al., 2011] Stefanoni, F., Ventre, M., Mollica, F., and Netti, P. A. (2011). A numerical model for durotaxis. *Journal of theoretical biology*, 280(1):150–158.
- [Takatori and Brady, 2015] Takatori, S. C. and Brady, J. F. (2015). Towards a thermodynamics of active matter. *Physical Review E*, 91(3):032117.
- [Takatori et al., 2014] Takatori, S. C., Yan, W., and Brady, J. F. (2014). Swim pressure: stress generation in active matter. *Physical review letters*, 113(2):028103.
- [Walcott and Sun, 2010] Walcott, S. and Sun, S. X. (2010). A mechanical model of actin stress fiber formation and substrate elasticity sensing in adherent cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17):7757–7762.
- [Wouter-Jan Rappel, 2017] Wouter-Jan Rappel, L. E.-K. (2017). Mechanisms of cell polarization. *Current Opinion in Systems Biology*.