

Trabajo Fin de Grado
Grado en Ingeniería de las Tecnologías Industriales

**SIMULACIÓN COMPUTACIONAL DE LA
DEFORMABILIDAD DEL NÚCLEO
CELULAR**

Autor: Adolfo Ballesterero de Juan

Tutor: José Antonio Sanz Herrera

**Dep. Mecánica de Medios Continuos y Teoría de Estructuras.
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla**

Sevilla, 2017



Trabajo Fin de Grado
Grado en Ingeniería de las Tecnologías Industriales

Simulación Computacional en Mecanobiología

Autor:

Adolfo Ballesteros de Juan

Tutor:

José Antonio Sanz Herrera

Dep. Mecánica de Medios Continuos y Teoría de Estructuras

Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2017

Trabajo Fin de Grado: Simulación Computacional en Mecanobiología

Autor: Adolfo Ballesteros de Juan
Tutor: José Antonio Sanz Herrera

El tribunal nombrado para juzgar el trabajo arriba indicado, compuesto por los siguientes miembros:

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

El Secretario del Tribunal

Fecha:

AGRADECIMIENTOS

A familia y amigos, que me han aguantado un año entero dando calor con el proyecto. Gracias por todo su apoyo. Mención especial a José Antonio Sanz por el valioso tiempo que me ha dedicado.

RESUMEN

En este proyecto se persigue desarrollar un modelo computacional del núcleo de una célula cancerosa extraída de un fibrosarcoma. La creación de este modelo tiene como fin principal ayudar en el estudio de la migración celular y de la extravasación del cáncer. Para definir sus características elásticas, se realizará sobre el mismo un ensayo numérico equivalente al ensayo llevado a cabo en un laboratorio con un microscopio de fuerza atómica. Se busca que los resultados obtenidos en ambos casos sean idénticos. Finalmente, se analizarán las tensiones que aparecen en el núcleo durante el ensayo y se definirá la rigidez del mismo a partir de las deformaciones observadas.

ABSTRACT

The main objective of this project is to develop a computational model of the nucleus of a cancerous cell extracted from a fibrosarcoma. The creation of this model has the aim of helping with the study of the cell migration and the cancer extravasation. A numerical trial model, equivalent with the test made in the laboratory with an Atomic Force Microscope, will be made in order to define its elastic characteristics. The objective is to obtain identical results on both cases. Finally, the strains that appear on the nucleus during the trial are going to be analyzed and the rigidity of the nucleus will be defined from the observed deformations.

Agradecimientos	I
Resumen	III
Abstract	V
Índice	VII
Índice de Figuras	IX
Índice de Gráficas	XI
1 Introducción	13
1.1. Motivación, importancia del trabajo y puesta en situación.	13
1.2. Biología celular	14
1.2.1. Atomic Force Microscope (AFM)	16
1.2.2. Micro Pipette Aspiration (MPA)	17
1.2.3. Aislamiento de un núcleo celular	19
1.3. Objetivos y organización	20
2 Modelado computacional del ensayo	21
2.1. El ensayo	21
2.2. Método de los Elementos Finitos	22
2.3. Características generales del modelo	22
2.4. Hiperelasticidad [10]	25
2.5. Condiciones de contorno	28
3 Simulación modelo 3D	29
3.1. Introducción	29
3.2. Caracterización del material Neo-Hookeano	29
3.3. Mallado	31
3.4. Tensiones	32
3.5. Desplazamientos	38
4 Simulación modelo Axisimétrico	39
4.1. Introducción	39
4.2. Mallado	39
4.3. Tensiones	40
5 Resultados	43
5.1. Introducción	43
5.2. Comparación entre ambos modelos	43

5.3.	Comparación con los resultados experimentales	44
5.4.	Análisis de las tensiones que aparecen en el modelo	45
5.5.	Estudio de la rigidez del núcleo	47
5.6.	Comprobaciones finales	49
6	Conclusiones y Desarrollo futuro	53
6.1.	Conclusiones	53
6.2.	Desarrollo futuro	54
7	Referencias	55

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.2.1 Envoltura nuclear [botanica.cnba.uba.ar].</i>	15
<i>Figura 1.2.1.1 AFM [pardell.es].</i>	16
<i>Figura 1.2.1.2 Medición de fuerzas de reacción con AFM [2].</i>	17
<i>Figura 1.2.2.1 Aspiración con micropipeta [3].</i>	18
<i>Figura 1.2.2.2 MPA en el núcleo de una célula [4].</i>	18
<i>Figura 1.2.3.1 Núcleo aislado.</i>	19
<i>Figura 2.1.1 Curvas Fuerza-Desplazamientos.</i>	21
<i>Figura 2.1.2 Célula HT1080.</i>	22
<i>Figura 2.3.1 Célula sobre el microscopio atómico. Se distinguen claramente tres zonas: núcleo (verde), citoplasma (rojo) y punta del AFM (blanco).</i>	23
<i>Figura 2.3.2 Dimensiones del núcleo (Solid Edge).</i>	23
<i>Figura 2.3.3 Modelos realizados, axisimétrico (a) y tridimensional (b).</i>	24
<i>Figura 2.5.1 Desplazamiento horizontal máximo para $F = 300 \text{ nN}$</i>	28
<i>Figura 3.3.1 Mallas para los distintos ensayos. Los radios de punta empleados son: $5 \mu\text{m}$, $2.5 \mu\text{m}$, $0.5 \mu\text{m}$, $0.25 \mu\text{m}$, $0.1 \mu\text{m}$ y $0.07 \mu\text{m}$. Están mostradas las mallas en este mismo orden (A-F). Para alguna de las puntas se ha ampliado la zona de contacto, de esta forma se observa mejor el mallado.</i>	32
<i>Figura 3.4.2 Tensiones Von-Misses para un radio de $2.5 \mu\text{m}$.</i>	33
<i>Figura 3.4.1 Tensiones Von-Misses para un ataque con radio de punta $5 \mu\text{m}$.</i>	33
<i>Figura 3.4.3 Tensiones Von-Misses para un radio de ataque de $0.5 \mu\text{m}$.</i>	34
<i>Figura 3.4.4 Tensiones Von-Misses para un radio de punta de $0.25 \mu\text{m}$.</i>	35
<i>Figura 3.4.5 Tensiones Von-Misses para un radio de ataque de $0.1 \mu\text{m}$.</i>	35
<i>Figura 3.4.6 Tensiones Von-Misses para un radio de ataque de 70 nm.</i>	36
<i>Figura 3.4.7 Ampliación de la zona de contacto entre la punta y el núcleo.</i>	37
<i>Figura 3.4.8 Ampliación de la malla deformada del núcleo al ser ensayado con un radio de 70 nm.</i>	37
<i>Figura 4.2.1 Mallado realizado para un radio de punta de 5 micrómetros.</i>	39
<i>Figura 4.3.1 Tensiones Von-Misses en el modelo axisimétrico del ensayo con la esfera de radio $5 \mu\text{m}$.</i>	40
<i>Figura 4.3.2 Tensiones Von-Misses en el modelo axisimétrico para un radio de punta de 70 nm.</i>	41
<i>Figura 4.3.3 Ampliación de la zona de contacto entre la punta y el núcleo en el modelo axisimétrico.</i>	41
<i>Figura 5.4.1 Tensión de ruptura en el ensayo de migración.</i>	46
<i>Figura 5.4.2 Variación del tamaño de los elementos de contacto.</i>	47
<i>Figura 5.6.2 Deformación del núcleo al aplicar una fuerza de 400 nN sobre la punta sin permitir el deslizamiento entre las superficies inferiores.</i>	50
<i>Figura 5.6.1 Deformación del núcleo al aplicar una fuerza de 400 nN sobre la punta permitiendo el deslizamiento entre las superficies inferiores.</i>	50

ÍNDICE DE GRÁFICAS

<i>Gráfica 3.2.1 Curvas F-D para un radio de punta 5 μm.</i>	30
<i>Gráfica 3.2.2 Curvas F-D para una fuerza puntual.</i>	30
<i>Gráfica 3.5.1 Curvas F-D para todos los radios.</i>	38
<i>Gráfica 5.2.1 Comparación de la curva F-D de los ensayos 3D y 2D.</i>	43
<i>Gráfica 5.3.1 Comparación de la penetración producida en cada uno de los ensayos y comparación con los resultados experimentales.</i>	44
<i>Gráfica 5.3.2 Penetración máxima de la punta del AFM en función de su radio.</i>	45
<i>Gráfica 5.5.1 Constante de rigidez en función de la fuerza aplicada.</i>	48
<i>Gráfica 5.5.2 Relación entre la Fuerza aplicada y la penetración de la punta en el núcleo para un radio de 5 μm.</i>	49
<i>Gráfica 5.6.1 Comparación entre los desplazamientos verticales y horizontales máximos.</i>	51

1 INTRODUCCIÓN

1.1. Motivación, importancia del trabajo y puesta en situación.

Hoy en día la relevancia de la mecánica en el comportamiento del cuerpo humano es conocida por todos. Con el paso de los años se ha ido indagando más y más en los diferentes papeles que esta pueda jugar en los procesos vitales, determinando como afectan las propiedades físicas de los distintos tejidos en el desenvolvimiento de sus funciones. A día de hoy incluso se presenta la oportunidad de modificar sus propiedades para mejor su comportamiento.

La biomecánica lleva estudiando estas cuestiones como disciplina desde el siglo pasado y son enormes los avances producidos desde entonces. Entre las distintas subdisciplinas en las que se divide, el estudio a nivel celular cuenta con una importancia capital. Pues, al fin y al cabo, los seres vivos están formados por células y será el estudio minucioso de estas el que aporte luz sobre su función.

Existen aproximadamente 200 tipos de células en el cuerpo humano con muy distintas, y a su vez, concretas propiedades y funciones. Por ello, son infinitos los estudios que se pueden realizar para ampliar la información sobre ellas. Algunos avances recientes destacan el comportamiento elástico celular como el factor límite y condicionante en una gran cantidad de procesos, entre ellos destaca la migración celular o el flujo de la corriente sanguínea.

Este último lleva siendo un quebradero de cabeza para los expertos desde hace varias décadas. A la hora de analizar el flujo sanguíneo, este se considera un fluido newtoniano e incompresible cuando circula por las “gruesas” venas y arterias. Sin embargo, su análisis se complica cuando hablamos de los capilares, pues estos llegan a ser de dimensiones menores a las de los glóbulos rojos. En estas situaciones la sangre deja de comportarse como un medio continuo. Para que el riego sanguíneo pueda llegar a todos los puntos de nuestro cuerpo, y así aportar los nutrientes necesarios, los glóbulos rojos se someten a grandes deformaciones. La capacidad de los mismos para adaptarse al medio físico que deben ocupar recae principalmente en sus propiedades elásticas. Propiedades muy manipulables y causa de capitales problemas de salud. Enfermedades tales como la malaria afectan a dicha capacidad elástica rigidizando el glóbulo rojo y dificultando, de esta forma, el transporte de oxígeno en nuestro organismo.

Por otro lado, la migración celular es un proceso sino más importante que el antes mencionado. La cicatrización, la respuesta del sistema inmunológico y la formación de tejido durante el desarrollo embrionario dependen fundamentalmente de ella. Es por lo tanto responsable de la formación, el crecimiento y la regeneración de los seres vivos. El conocimiento de los mecanismos que controlan la migración es una de las grandes motivaciones que impulsan su estudio, de esta forma se podría controlar su producción tanto para acelerarla como para frenarla.

Se han producido grandes hallazgos en este campo de la biomecánica contando ya con varios datos experimentales. Por ejemplo, se ha comprobado que la célula sufre dramáticos cambios de forma durante la migración a través de la matriz extracelular y el endotelio [7]. El endotelio es la capa que recubre la zona interna de todos los vasos sanguíneos.

Dentro de la célula el núcleo es el orgánulo más grande y rígido y, por lo tanto, supondrá una restricción límite en la migración. Se han obtenido pruebas experimentales que afirman que los grandes cambios morfológicos y posicionales a los que se somete el núcleo dentro del citoplasma durante el proceso de migración producen alteraciones en el ADN y comprometen el comportamiento celular. Durante el último año se han publicado diversos artículos intentando ampliar la información sobre estas alteraciones.

Por otro lado, algunos de los investigadores intentan obtener un modelo mecánico-químico que describa las tensiones y deformaciones que sufre el núcleo celular. A partir de estos modelos se podrían predecir futuros comportamientos, como podría ser la ruptura. Aunque esto aún se torna difícil teniendo en cuenta los escasos parámetros que se han podido obtener hasta ahora.

Otro de los puntos fuertes que motivan estos estudios es ampliar el conocimiento sobre la extravasación de las células tumorales, proceso que implica la metástasis del cáncer. Es por ello que la mayoría de los ensayos en los que se basa este trabajo están realizados con este tipo de células. Los avances que se están produciendo estos últimos meses podrían dar paso a métodos para reducir la movilidad y adaptabilidad de los tumores.

La metástasis del cáncer consiste en la diseminación del tumor desde la parte del cuerpo donde se originó a otros tejidos del cuerpo. Una parte del tumor inicial se desprende y viaja a través del sistema sanguíneo o linfático hasta que se aferra a otro tejido, formando un nuevo tumor. En este proceso es crucial el comportamiento elástico de las células cancerosas. Si fuese posible la modificación de las propiedades de la célula ya sea para dificultar la división del tumor, así como para impedir su movimiento por el sistema sanguíneo, muchas vidas podrían ser salvadas.

No solo las propiedades de las células afectan a la migración, la matriz extracelular también influye de manera crucial. Ampliar la información en este asunto dará facilidades para extrapolar los análisis in-vitro a casos reales [4].

Para comprender y poder analizar las tensiones que sufre la célula, en este trabajo se plantea la creación de un modelo numérico que se asemeje a la realidad experimental. En la actualidad no se disponen de datos suficientes para la creación de este modelo con una gran exactitud y a su vez este dependería de cada tipo de célula. La puesta en práctica de este modelo daría lugar a conocer mejor el comportamiento de la célula en distintos entornos y podría facilitar los complicados y costosos experimentos que se realizan en los laboratorios.

1.2. Biología celular

Según lo comentado previamente no cabe duda de que centraremos nuestro estudio en el núcleo como orgánulo clave en el comportamiento elástico de la célula. El núcleo está compuesto por dos partes principales y claramente diferenciadas, la envoltura nuclear y la cromatina. En las células eucariotas la envoltura nuclear separa la cromatina, sustancia de base de los cromosomas (entre ellos se encuentra el ADN), del citoplasma (región de la célula que se encuentra entre el núcleo y la membrana celular). Esta envoltura consiste en una doble capa de lípidos junto a una lámina cortical de proteínas.

La lámina cortical de proteínas, llamada simplemente lamina nuclear, está situada entre la envoltura nuclear y la cromatina y está compuesta tanto por una red entrecruzada de filamentos de tipo intermedio como por proteínas. La lamina nuclear cumple la función de aportar estabilidad y organización a los nucleosomas, unidad fundamental de la cromatina.

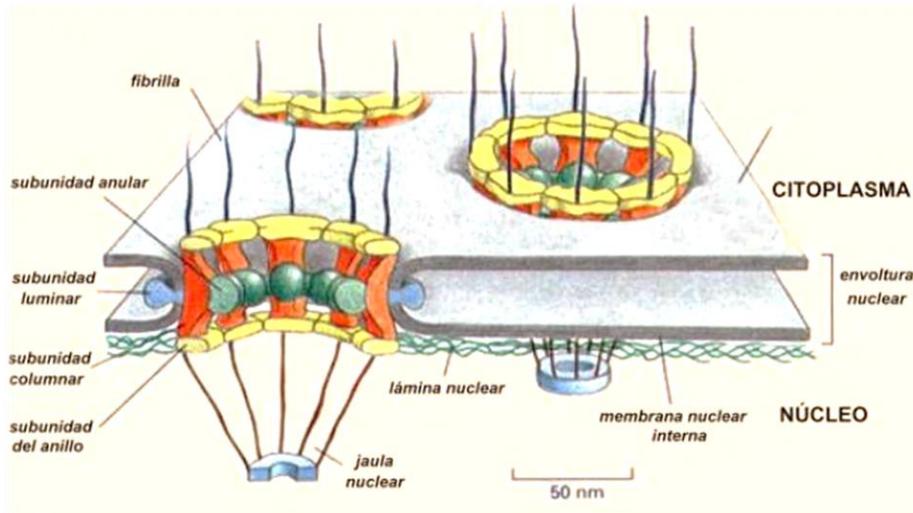


Figura 1.2.1 Envoltura nuclear [botanica.cnba.uba.ar].

La envoltura nuclear es una superficie porosa a través de la cual las moléculas pueden salir y entrar en el núcleo, principalmente son las proteínas las que realizan este movimiento. Es por tanto un complejo discontinuo. El paso de las proteínas a través de la membrana es un proceso de migración al que también afectan las propiedades mecánicas de ambos intervinientes. Se han encontrado al menos 10 enfermedades relacionadas con mutaciones en esta región del núcleo.

El comportamiento del núcleo como conjunto de todos los elementos que lo constituyen se considera viscoelástico, dependiendo así sus deformaciones tanto de las tensiones como de su derivada respecto al tiempo [1]. Es clave para caracterizar este comportamiento viscoelástico poder distinguir las aportaciones de cada una de sus partes, esto facilitaría y añadiría precisión en un posible modelado numérico.

Existen multitud de experimentos para caracterizar el comportamiento mecánico celular, entre ellos se quisiera destacar los resultados obtenidos mediante el uso del AFM (Atomic Force Microscope) y de MPA (Micro Pipette Aspiration). De su uso son varios los resultados obtenidos hasta ahora, entre ellos se ha formulado una ley potencial para la reología del núcleo de una célula tumoral, ley válida ya sean pequeñas o grandes las deformaciones. También se cuenta hoy en día con modelos numéricos 2D de un núcleo celular sometido a diversas condiciones de contorno.

1.2.1. Atomic Force Microscope (AFM)

Un microscopio de fuerza atómica es un instrumento mecánico-óptico formado por una punta (sonda) y por un sistema de medición óptica. El sistema de medición está formado por un juego de láseres y de receptores fotosensibles (Figura 1.2.1.1). La punta es de un material piezoeléctrico y su radio es de dimensiones nanométricas

La sonda se fuerza a recorrer horizontalmente el área donde está situada la muestra. Mientras la punta rastrea la muestra, la placa que la sostiene sufre flexiones verticales que son medidas. Para medir esta deflexión se hace incidir un láser sobre la placa e inmediatamente después sobre un fotodetector. El fotodetector detecta las variaciones verticales de la placa y se encarga de representar el movimiento de la sonda.

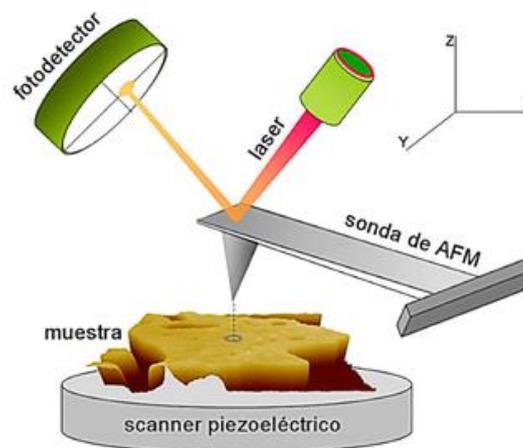


Figura 1.2.1.1 AFM [pardell.es].

Un microscopio de fuerza atómica es capaz de rastrear la totalidad de la topología de una superficie de dimensiones nanométricas creando una visión 3D de la superficie analizada. También ofrece la posibilidad de medir las fuerzas de reacción que recibe a su paso.

Hay multitud de formas de analizar la muestra, una de las más comunes consiste en deslizar la punta directamente sobre ella aplicando una fuerza constante y detectando las variaciones de posición en el eje Z de la sonda. Estas variaciones coinciden directamente con la topografía de la muestra. Sin embargo, este método puede resultar destructivo en muestras blandas, dañando tanto la muestra como la punta. Al ser un ensayo tan agresivo se deteriora el radio de la punta perdiendo precisión a lo largo de la medición.

Como alternativa, para determinadas muestras se opta por tomar medidas puntuales a lo largo de su superficie. En este método se hace oscilar la sonda a su frecuencia de resonancia y a amplitud constante. A medida que la sonda se mueve en el plano horizontal la punta contacta puntualmente con la muestra registrando su topología con una alta resolución.

En materiales conductores existe la posibilidad de medir la intensidad eléctrica que pasaría entre él y el AFM, dependiendo esta de la distancia entre ambos.

Los investigadores utilizan la gran precisión de medida característica de este equipo para obtener muy buenos resultados (nm). Este instrumento ha ayudado considerablemente en los grandes avances producidos en la nanotecnología.

Sin embargo, en el ámbito de estudio que nos concierne es muy distinto el uso que se le da al mismo. En este tipo de ensayos se aplica un desplazamiento vertical a la punta midiendo la deflexión que se produce en el listón superior del AFM. El objetivo que se plantea es obtener una curva fuerza-desplazamiento al hacer penetrar la sonda en la muestra. De esta curva se pueden extraer características elásticas que ayuden a conocer mejor el comportamiento mecánico de la muestra.

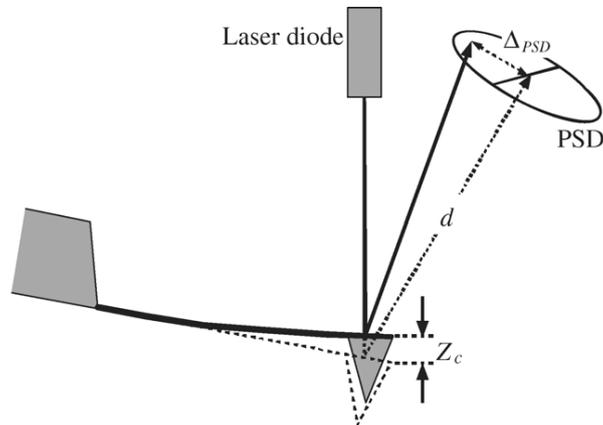


Figura 1.2.1.2 Medición de fuerzas de reacción con AFM [2].

En la Figura 1.2.1.2 se observa una representación simple de este ensayo, donde Z_c es la deflexión del listón en la punta. Esta deflexión será medida mediante el juego de láseres.

Usando la ley de Hooke se obtiene la fuerza de reacción que ejerce la muestra (Ecuación 1.2.1.1).

$$F = K * Z_c \quad (1.2.1.1)$$

Siendo K la rigidez del listón.

Este tipo de ensayos se empleó inicialmente en el campo de la Ciencia de los Materiales con el fin de conocer mejor el comportamiento de los nanomateriales. Dada su versatilidad y precisión rápidamente se comenzó a usar en el ámbito de la biología. El principal objetivo era el de caracterizar el comportamiento mecánico de diferentes tejidos del cuerpo.

Recientemente se ha empezado a trabajar con células aisladas. Sometiendo las mismas al contacto con la punta y analizando la respuesta se pueden obtener datos sobre su resistencia elástica.

1.2.2. Micro Pipette Aspiration (MPA)

En este ensayo se utiliza una micropipeta, es decir, una pipeta de diámetro del orden de un micrómetro. El diámetro de la pipeta será menor que el tamaño de la muestra a analizar, lógicamente. Para realizar el ensayo se ejerce una diferencia de presión negativa dentro de la pipeta succionando parte de la muestra. Mediante instrumentos de visualización 2D se observa la deformada dentro de la pipeta y se extraen los resultados.

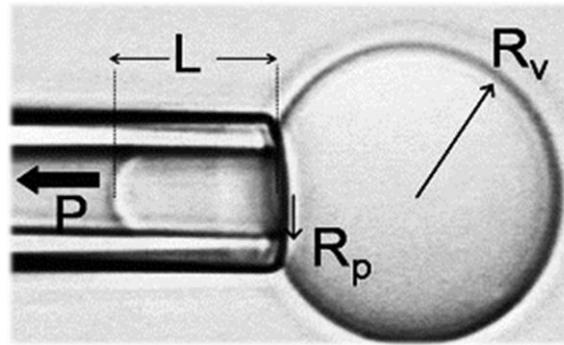


Figura 1.2.2.1 Aspiración con micropipeta [3].

Este ensayo suele realizarse sobre todo en el campo de la Mecanobiología, realizándose la mayoría de los ensayos sobre células eucariotas.

En la Figura 1.2.2.1 se ve una captura en 2D del proceso. Sobre esta imagen se mide directamente el desplazamiento de la célula en el interior de la pipeta (L). Dichos instrumentos tienen limitaciones, entre las que se encuentra la incapacidad de representar con exactitud la parte de la célula que queda fuera de la pipeta, por consiguiente, esta se toma como un espacio medio-infinito [7].

Aplicando una presión constante se puede analizar el comportamiento viscoelástico de la muestra, si lo tuviera. Como material viscoelástico, este se deformaría durante un tiempo sin aumentar las tensiones aplicadas sobre su superficie. Sería otro proceso por el que obtener una serie de coeficientes que definan sus características elásticas. Este ensayo es aplicable a multitud de materiales.

Mediante este experimento se pueden conocer los límites elásticos de la muestra sin más que realizar el ensayo en las condiciones más adversas. Estas condiciones se dan al disminuir el radio de la pipeta o al aumentar la presión drásticamente. De esta forma llegaría un punto en el que los daños en la célula tras la migración serían grandes e irreversibles, llegando incluso a la ruptura de la envoltura nuclear.

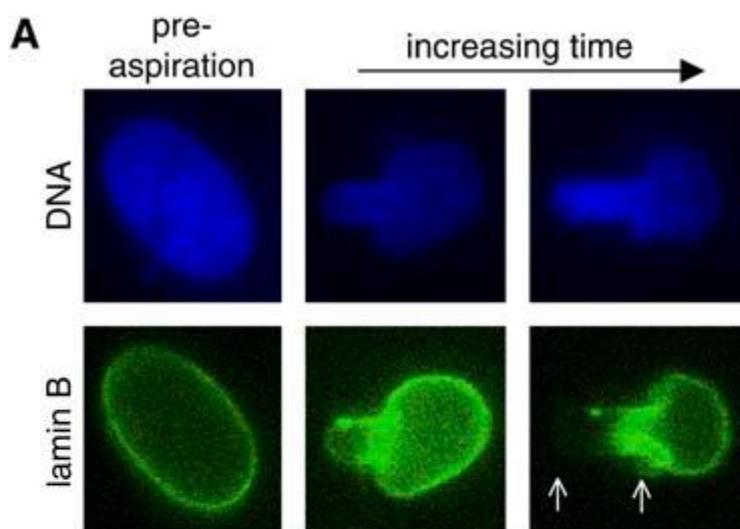


Figura 1.2.2.2 MPA en el núcleo de una célula [4].

Se cuenta con algunos modelos 2D del ensayo MPA [3,7]. Si se somete este modelo numérico a las condiciones extremas obtenidas experimentalmente, incluso forzando su ruptura, se podrán observar las tensiones que se producen durante el proceso.

En la Figura 1.2.2.2 se muestra un caso real de aspiración mediante una micropipeta. Este ensayo se ha realizado sobre dos núcleos diferentes aislados del resto de la célula [4].

Tanto durante el uso del AFM como en el ensayo MPA se tienen que seguir ciertas pautas que garanticen la exactitud de las mediciones. Estos ensayos se han realizado desde hace años con células completas, lo peculiar de algunos casos recientes es el aislamiento previo del núcleo (Figura 1.2.2.2).

1.2.3. Aislamiento de un núcleo celular

Este proceso no es trivial en absoluto pues se debe realizar con una repercusión mínima en las características del núcleo. El proceso mediante el cual se aísla el núcleo consta de varias fases [4]. En cada una de estas fases se introduce la célula en un medio líquido distinto, de forma que se va eliminando de forma paulatina el citoplasma y el resto de los orgánulos que alberga.

El núcleo aislado que se obtiene cuenta con pequeñas variaciones en su morfología. Quizás la más importante de ellas es que el núcleo sale del proceso ligeramente hinchado debido a la eliminación de la presión que ejercía sobre él el citoplasma [4]. Estas deformaciones se pueden corregir sometiendo al núcleo a nuevos procesos químicos.

En la Figura 1.2.3.1 aparece un núcleo, ligeramente hinchado después de haberlo extraído de la célula a la que pertenecía. Posteriormente será sometido a los procesos que le devolverán su tamaño y forma original.

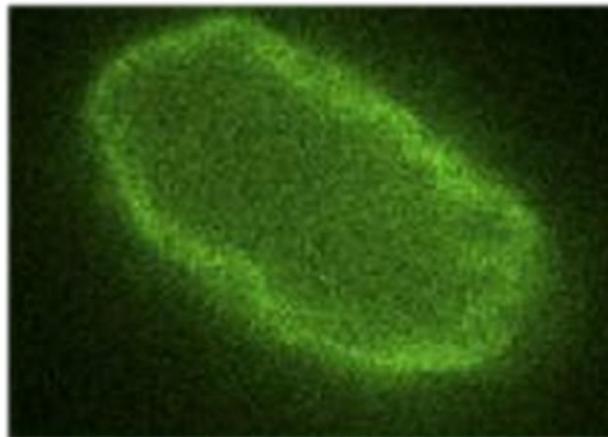


Figura 1.2.3.1 Núcleo aislado.

1.3. Objetivos y organización

Este trabajo se centrará en el modelado computacional del núcleo de una célula HT1080 a fin de obtener pautas sobre su comportamiento elástico. Para definir el material del modelo nos serviremos de los resultados obtenidos experimentalmente al ensayar la célula en un microscopio de fuerza atómica. Se reproducirá dicho ensayo en un modelo numérico tratando de que los resultados se asemejen a la realidad experimental lo máximo posible.

Los principales objetivos son caracterizar la rigidez del núcleo y analizar las tensiones que se producen al someterlo a ciertos estímulos exteriores. Se desea comprobar si estos estímulos serían dañinos y destructivos para la muestra. A su vez, se podrá analizar el cambio cualitativo que se produciría en los resultados variando las puntas del AFM.

Las constantes que definan el material se obtendrán por iteración comparando los resultados con los obtenidos por **Marina et al. [5]**. En sus investigaciones persiguen caracterizar la rigidez volumétrica del núcleo, para ello analizan la deformabilidad de una célula completa en función de la fuerza aplicada con el AFM. Como conclusión ofrecen varias gráficas y un valioso material digno de estudiar.

El ensayo computacional a realizar consiste en la modelización tanto de la punta del AFM como del núcleo en sí. Se aplicará un desplazamiento vertical a la punta que entrará en contacto con el núcleo. La fuerza de reacción y las tensiones que se producen como respuesta al contacto son los resultados que se analizarán.

Posteriormente, una vez que el modelo esté completamente definido y validado, se ensayará con distintas puntas. El objetivo es comprobar como varía la deformada y las tensiones que aparecen en función del radio de punta empleado. Así pues, el radio de esta ira decreciendo desde 5 μm a 70 nm.

A pesar de que en el ensayo experimental se utiliza una punta cónica piramidal, esta será simulada como una semiesfera. Esto no afectará a los resultados de forma apreciable.

En el documento se presentan cuatro bloques principales. En el primero de ellos se introducirá el modelo y todas sus características. Se definirá por completo el material empleado a falta de calibrar sus constantes.

En los dos capítulos siguientes se detallarán y analizarán los dos modelos numéricos creados. Se ha realizado tanto un modelo en tres dimensiones como un modelo con elementos axisimétricos.

Finalmente, se muestran y estudian los resultados obtenidos y se introducirá brevemente el trabajo futuro.

Como detalle final se analizarán los resultados a los que se ha llegado a lo largo del trabajo para obtener a partir de ellos la constante de rigidez volumétrica para el núcleo. Para la realización de este último paso se tomarán como ejemplo las ideas expuestas en el artículo [5].

2 MODELADO COMPUTACIONAL DEL ENSAYO

2.1. El ensayo

En este capítulo se definirá el modelo utilizado, explicando todas sus características y las hipótesis supuestas a lo largo de todo el desarrollo del proyecto con el fin de asemejar el modelo computacional a la realidad lo máximo posible.

Como referencia se ha elegido el ensayo realizado por Krause et al. [5] sobre una célula tumoral. Se ha elegido este por la calidad y claridad de los resultados obtenidos, así como por la multitud de información que proporcionan. Su objetivo principal es la obtención de un valor para la rigidez del núcleo. En el desarrollo previo a la obtención de la rigidez se utilizan las curvas Fuerza-Desplazamiento producidas al ensayar el AFM sobre la célula (Figura 2.1.1). Serán estas curvas las que se utilizarán para definir los parámetros que regulan el comportamiento del modelo.

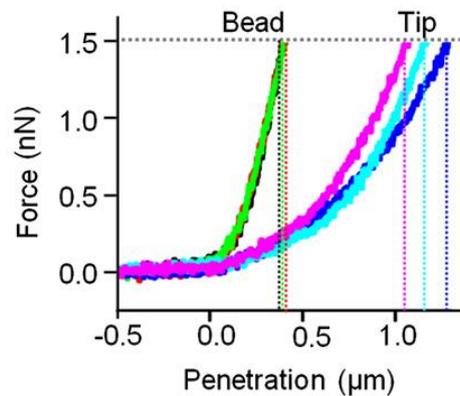


Figura 2.1.1 Curvas Fuerza-Desplazamientos.

Se trata de una célula humana HT1080 wild-type (wp) (Figura 2.1.2). Esta célula es muy usada en ensayos biológicos y proviene de una muestra de tejido cogida de un fibrosarcoma. El fibrosarcoma es un tipo de cáncer maligno que afecta usualmente a hombres de entre 30 y 40 años. Se genera en el tejido fibroso del hueso, extendiéndose posteriormente a lo largo del mismo. Conforme avanza daña a su vez el musculo que lo rodea.

Pra asegurarse de que no se produjeron daños en el núcleo durante el ensayo visualizaron la totalidad del proceso mediante un microscopio confocal. Este tipo de microscopio utiliza técnicas ópticas para eliminar la saturación de luz producida al iluminar la muestra, de forma que se obtiene una imagen mucho más nítida

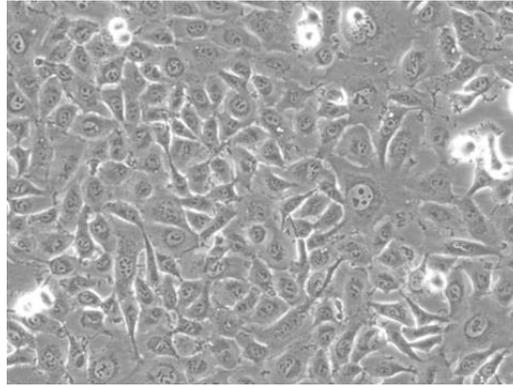


Figura 2.1.2 Célula HT1080.

2.2. Método de los Elementos Finitos

Existen multitud de formas de realizar un modelo computacional de un ensayo elástico. Entre ellos el Método de los Elementos Finitos es conocido por su versatilidad y la precisión que pueden alcanzar los resultados utilizándolo debidamente.

El método de los Elementos Finitos es uno de los métodos numéricos que surgió como una extensión del método de las Diferencias Finitas para la resolución de problemas con sólidos deformables. Hoy en día su aplicación se ha extendido hasta el campo de la Mecánica de Fluidos, Transmisión de Calor, Magnetismo...

El método de las Diferencias Finitas propone aproximar la derivada de una función en un punto por sus valores en puntos cercanos. Para ello se discretiza el problema, es decir, se divide el modelo en pequeños subdominios de geometría mucho más simple. El método de los Elementos Finitos por su parte se basa en encontrar funciones de pequeño soporte que aproximen el comportamiento del material en cada uno de los nodos en los que se ha discretizado el problema. Con estas funciones se genera una matriz de rigidez (K) que relaciona los desplazamientos con las condiciones de contorno en todo el dominio.

$$K U = F$$

La resolución de esta ecuación define los desplazamientos en todos los nodos de la malla. Por consiguiente, mediante las ecuaciones de compatibilidad y la ley de comportamiento se obtienen las tensiones y las deformaciones.

Será ABAQUS el programa que se utilizará para resolver el problema.

2.3. Características generales del modelo

Como se dijo previamente, se ha comprobado que el comportamiento de una célula se asemeja al de un material viscoelástico [1]. Dentro de la célula la corteza aporta el comportamiento elástico y la mayor parte de la rigidez mientras que la cromatina sigue un régimen viscoelástico mucho menos rígido [7]. Son muy distintas las propiedades de los distintos orgánulos que forman el núcleo, sin embargo, como conjunto su comportamiento se resume en un continuo viscoelástico.

Su tiempo de relajación es del orden de 1-300 s. Este experimento se desarrolló en un tiempo de mayor orden de magnitud y por lo tanto las características viscoelásticas del núcleo no afectan a los resultados [6,8]. Es decir, se considera que el material se ha relajado completamente cuando se realizan las mediciones. El material será considerado elástico a lo largo de todo el ensayo.

A pesar de las diferentes características elásticas que muestran cada uno de los componentes del núcleo, será simulado un modelo continuo del mismo. Es decir, no se harán distinciones entre sus componentes. Esto es debido a que de ser así se añadiría una gran cantidad de variables al problema, variables que no se pueden fijar debido a la falta de datos experimentales.

En el artículo se detalla que la altura del núcleo, una vez situado sobre la tablilla del microscopio atómico, es de $5\ \mu\text{m}$. Utilizando las diferentes instantáneas 2D tomadas durante el ensayo se ha extrapolado esta medida para obtener el resto de dimensiones.

La Figura 2.3.1 ha sido utilizada como referencia para establecer la geometría del núcleo, en ella se ven claramente diferenciadas las distintas partes de la célula, así como la punta del AFM.

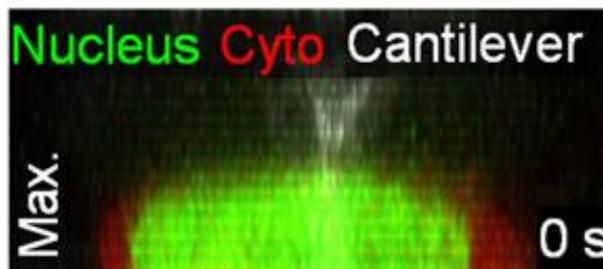


Figura 2.3.1 Célula sobre el microscopio atómico. Se distinguen claramente tres zonas: núcleo (verde), citoplasma (rojo) y punta del AFM (blanco).

A pesar de que el ensayo en cuestión se realice en el laboratorio con la célula completa, se modelará computacionalmente tan solo el núcleo, como se detalló previamente juega un papel determinante en el comportamiento elástico global. Esta suposición no implica que los resultados que se obtengan numéricamente difieran de forma apreciable de los obtenidos en el laboratorio.

La geometría del núcleo se introduce mediante la siguiente figura (Figura 2.3.2):

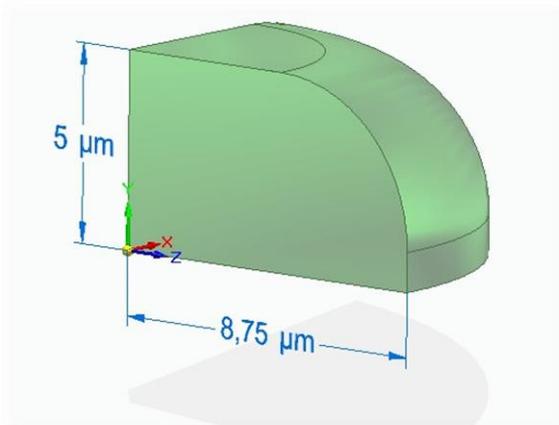


Figura 2.3.2 Dimensiones del núcleo (Solid Edge).

Las dimensiones de las puntas del AFM empleadas vienen dadas como datos en la información introductoria del artículo y serán tomadas directamente como estas. Se utilizan dos puntas distintas en el ensayo experimental, la mayor de ellas es una esfera de radio $5\ \mu\text{m}$ y la menor es una punta cónica piramidal de radio $70\ \text{nm}$. Ambas serán simuladas como semiesferas para simplificar el modelo.

A pesar de la forma irregular de una célula humana, y a fin de simplificar los cálculos, esta se ha asumido simétrica según el eje perpendicular al plano sobre el que se apoya. Por ello, para reducir el número de elementos, se ha modelado un cuarto del núcleo aplicando las correspondientes restricciones cinemáticas.

Los resultados y la convergencia del modelo muestran una gran dependencia del mallado. Así como para el ataque con la esfera de diámetro mayor no se producen grandes complicaciones, no ocurre lo mismo con la punta piramidal. Debido al gran incremento en las deformaciones que sufren los elementos próximos a la misma, el análisis con una punta de menor radio es mucho más delicado.

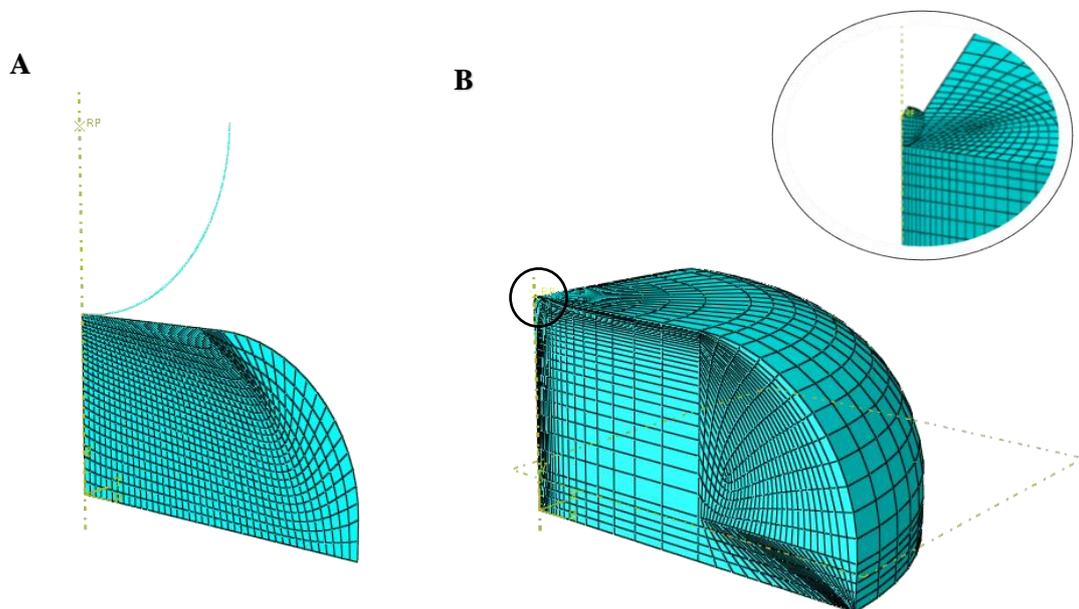


Figura 2.3.3 Modelos realizados, axisimétrico (a) y tridimensional (b).

Deberá realizarse un mallado especializado en determinadas zonas del modelo debido a que se prevén deformaciones poco uniformes en la muestra. Se hará menos fino en las zonas alejadas del contacto ya que esos elementos no sufren tensiones significativas. Con base en el principio de Saint-Venant esto no afectará a los resultados que se pretenden analizar.

Una vez descartadas las características viscoelásticas del núcleo y definida su geometría se va a elegir el tipo de material que mejor refleje su comportamiento. Se puede observar en las gráficas Fuerza-Penetración (Figura 2.4) que la relación Tensión-Deformación no sigue un régimen lineal. La energía de deformación no aumenta de forma proporcional con la deformación.

Por otro lado, la hipótesis de pequeños desplazamientos no podrá tenerse en cuenta en el ensayo ya que en algunos casos la penetración de la punta del AFM en el núcleo es del orden del 80% de

su tamaño inalterado. Las deformaciones que se producen en ciertas zonas del núcleo como consecuencia de estos desplazamientos son también grandes en comparación con las dimensiones de la muestra, por lo tanto, no se utilizará tampoco la hipótesis de pequeñas deformaciones.

Estas afirmaciones apuntan hacia la elección de un material hiperelástico (Subcapítulo 2.4).

El modelo incluye un contacto que aporta otra no linealidad al problema, esto dificulta los cálculos y la convergencia del mismo. Se explicará cómo ha sido simulado este contacto en las próximas páginas.

Con el fin de validar el modelo de una forma más amplia se ha realizado una parametrización en 3D y otra en 2D con elementos axisimétricos (Figura 2.3.3). Se indagará más profundamente en dichos modelos más adelante.

Todo ensayo se puede analizar desde un punto de vista estático o dinámico. Esta elección dependerá del orden de magnitud de las fuerzas que aparezcan en él. Si las fuerzas de inercia son dimensionalmente equiparables al resto, estas no se pueden despreciar. Cuando esto ocurre el análisis se debe realizar de forma dinámica. Se produce de esta forma un dilema a la hora de decidir si abordar el tema desde un punto dinámico o estático.

$$K = K(E) ; E \cong 1 \text{ kPa} \qquad K \gg M \therefore \overset{\cong 0}{\widehat{M}\ddot{x}} + Kx = F$$

$$M \cong 1 \text{ ng}$$

El valor que se da al módulo de Young es dependiente del tiempo y orientativo. Este valor se ha obtenido comparando los resultados experimentales con el modelo de contacto de Hertz [5]. De la ecuación previa se puede obtener una frecuencia natural del sistema. Si esta es mucho mayor que un Hercio se confirma que sería mínimo el error al considerar el análisis estático.

$$w_n = \sqrt{\frac{K}{M}} ; K = \frac{E * A}{L} = 2.5 * 10^{-2} \frac{N}{m}$$

$$w_n \cong 1500 \text{ Hz} \gg 1 \text{ Hz}$$

Como se acaba de demostrar, la frecuencia natural es mucho mayor que un Hercio y por lo tanto se podrá despreciar el efecto de las fuerzas de inercia.

En este ensayo se utilizan puntas de diamante en el AFM, un material mucho más rígido y resistente que el núcleo [5]. Por lo tanto, el elemento esférico que ejerce la función de punta es considerado un sólido rígido a la hora de realizar los cálculos, no serán analizadas las tensiones que en él aparezcan.

2.4. Hiperelasticidad [10]

Los materiales hiperelásticos son un ejemplo de modelo matemático en la mecánica no-lineal que sirve para describir una gran cantidad de fenómenos físicos en los que las deformaciones son “grandes”. La teoría hiperelástica plantea la existencia de una función escalar de la energía libre de Helmholtz (ψ) definida en función de la unidad de volumen. Para el caso de materiales **homogéneos** (caso que nos concierne) la función de energía libre depende solo del gradiente del tensor de deformaciones.

$$\psi = f(F)$$

Si el material fuese heterogéneo esta función dependería también de la posición del punto en el medio.

Se añade también la suposición de que el material es **perfectamente elástico**, esto implica que no se pierde energía durante la deformación. Es decir, que no existe una entropía. Del segundo principio de la termodinámica expresado según la forma de Clausius-Planck podemos derivar la ecuación constitutiva de la hiperelasticidad:

$$\mathcal{D}_{int} = \left(P - \frac{\partial \psi(F)}{\partial F} \right) : \dot{F} = 0$$

Siendo **P** el tensor de tensiones de segundo orden llamado primer tensor de Piola-Kirchhoff.

Como **F** (y por consiguiente \dot{F}) puede ser elegido aleatoriamente los términos dentro del paréntesis tienen que ser iguales a cero.

$$P = \frac{\partial \psi(F)}{\partial F}$$

Se define como isótropo aquel material que no tiene direcciones preferenciales, es decir, que cuando se estudia la curva tensión-deformación del material esta no depende de la dirección en la que se mida. La goma es un claro ejemplo de material isótropo y nuestro modelo será también considerado **isótropo**.

Se desarrollará en los próximos párrafos un breve resumen de lo que conlleva que el material sea definido isótropo.

Se comienza estableciendo un tensor que traslade un cuerpo cualquiera, definido por el vector posición **X**, de ocupar el volumen Ω_0 a ocupar una nueva región Ω_0^* :

$$X^* = c + QX$$

Y definiendo otro tensor, que aplicado al sólido este se desplaza desde el volumen Ω_0^* a la configuración final Ω tal que:

$$x = \mathcal{X}(X, t) = \mathcal{X}^*(X^*, t)$$

Siendo x la posición final del cuerpo.

Desarrollando el gradiente de deformaciones relativo a estas regiones se llega a que para que un material sea isótropo los valores de la energía de deformación $\psi(F)$ y $\psi(F^*)$ tiene que ser iguales para todos los vectores ortogonales **Q**. Siendo F^* el gradiente de deformación del movimiento \mathcal{X}^* .

Esta importante relación permite la representación de la energía libre de deformación en función de los invariantes del tensor de tensiones simétrico de Cauchy-Green.

$$\psi = \psi(I_1, I_2, I_3)$$

La principal consecuencia de que un material sea isótropo es la posibilidad de realizar esta simplificación.

Un material incompresible es aquel al que cuando se le aplican un rango finito de tensiones su volumen no varía. Esta afirmación se traduce en la restricción cinemática:

$$J = \det F = \lambda_1 \lambda_2 \lambda_3 = 1$$

Siendo J la relación superficie-volumen, constante para materiales incompresibles.

En el caso de un material isótropo e incompresible, teniendo en cuenta la antes citada dependencia de la energía de deformación de los tres invariantes y que el ratio de volumen (J) sería constante, se llega a la restricción final:

$$\psi = \psi(I_1, I_2); I_3 = 1$$

Por lo tanto, los dos invariantes principales I_1 e I_2 serían las únicas variables en la energía de deformación independientes.

Por otro lado, para materiales compresibles ψ también dependerá de J . La dependencia de la energía libre de deformación del ratio volumétrico J se expresa de la siguiente forma:

$$\psi = \psi(F) - p(J - 1)$$

Siendo p una constante a definir.

Estudios recientes destacan la **compresibilidad del núcleo** como un factor altamente influyente en su comportamiento mecánico. Es por ello que no se podrá despreciar dicha dependencia.

Para simplificar se representará la energía de deformación en función de las tres deformaciones principales. Expresarla de esta forma juega un papel crucial en la teoría de la elasticidad de grandes deformaciones ("Finite Elasticity").

Queda finalmente definida de la siguiente forma la energía libre de Helmholtz para materiales hiperelásticos con las características mencionadas:

$$\psi = \psi(\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3) = \sum_{p=1}^N \frac{\mu_p}{\alpha_p} (\lambda_1^{\alpha_p} + \lambda_2^{\alpha_p} + \lambda_3^{\alpha_p} - 3)$$

Y añadiendo la dependencia de J para materiales compresibles:

$$\psi = \psi(\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3) + \psi_{VOL}(J)$$

μ_p es el módulo de cizalladura de la elasticidad lineal y α_p constantes adimensionales que dependen del modelo hiperelástico empleado.

En función de los valores que se le den a N y a α se pueden definir distintos modelos para materiales tanto compresibles como incompresibles. Entre ellos son muy útiles y usados en la práctica los modelos de Mooney-Rivlin, Neo-Hookeano y el modelo de Varga. La principal diferencia entre ellos es que varía el número de términos de la energía de deformación.

Se va a utilizar para este problema la forma compresible del modelo **Neo-Hookeano**. En él $N=1$ y $\alpha_1=2$, esto junto con el término dependiente de J da la siguiente igualdad:

$$\psi(I_1, J) = \frac{c_1}{\beta} (J^{-2\beta} - 1) + c_1(I_1 - 3) \quad ; \quad \beta = \frac{\nu}{1 - 2\nu}$$

Siendo $c_1 = \frac{\mu}{2}$ y ν el coeficiente de Poisson's. Esta forma de la energía de deformación se deriva del modelo generalizado de Blatz and Ko [1962].

El programa de elementos finitos que se utilizará modifica la expresión previa mostrándola de la siguiente forma equivalente:

$$\psi = C_{10}(I_1 - 3) + \frac{1}{D_1}(J^{el} - 1)^2 \quad ; \quad C_{10} = \frac{\mu}{2} \quad ; \quad D_1 = \frac{2}{K}$$

El próximo paso a realizar es el de cuadrar las constantes C_{10} y D_1 para que el modelo se asemeje a la realidad en la mayor medida posible. Los datos experimentales del módulo elástico y del coeficiente de Poisson sirven solo como orientación, con ellos tan solo se puede hacer una idea dimensional de los coeficientes. Puesto que es un material hiperelástico y, por lo tanto, no lineal no se podrán relacionar los coeficientes entre ellos directamente siguiendo las leyes de la elasticidad lineal.

2.5. Condiciones de contorno

Definidos ya el material y la geometría de las partes, así como el tipo de ensayo que se va a realizar, es hora de afrontar como se van a establecer las condiciones de contorno.

Entre las superficies de ambas esferas se produce un contacto. Tras la realización de varios modelos se ha comprobado que la fricción entre ambas partes no afecta al resultado, es por ello que se considerará un contacto liso. A su vez, es obvio que existirá un desplazamiento relativo entre el núcleo de la célula y la tablilla donde se apoya en el microscopio. Se demostrará que, para el rango de fuerzas con las que se está trabajando, el desplazamiento horizontal conllevaría unas diferencias en las deformaciones y tensiones muy pequeñas frente a las que se producen si se considerase empotrada toda la cara inferior del núcleo.

Utilizando la punta de radio 5 micrómetros el máximo desplazamiento horizontal producido al aplicar 300 nN es de 1 μm , mientras que en el ensayo con la punta fina (70 nm) el desplazamiento horizontal es prácticamente nulo.

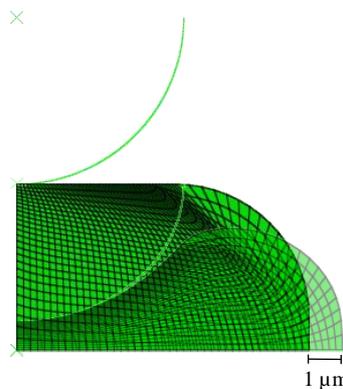


Figura 2.5.1 Desplazamiento horizontal máximo para $F = 300 \text{ nN}$.

A fin de simplificar el modelo reduciendo los casos de no convergencia este contacto se elimina imponiendo un desplazamiento nulo a los nodos de la cara inferior.

Finalmente comentar que se trata de un modelo complejo y en el que los resultados tendrán que ser validados siempre aplicando un filtro lógico. Serán analizadas las deformaciones y las tensiones que aparecen como resultado y se demostrará su falta de sentido en ciertos casos en los que las deformaciones toman valores importantes.

3 SIMULACIÓN MODELO 3D

3.1. Introducción

Se empieza este capítulo diseñando en elementos finitos el modelo introducido en el capítulo anterior. Para ello hay que definir las dos constantes que caracterizan al material Neo-Hookeano. Estos valores se tendrán que calibrar para reproducir con precisión los ensayos experimentales.

Como se van a realizar muchas simulaciones antes de obtener las constantes finales será primordial cuidar la malla a fin de reducir el tiempo de trabajo computacional.

3.2. Caracterización del material Neo-Hookeano

El ensayo consiste en aplicar una fuerza puntual en el punto de referencia del sólido rígido (punta) para que este se desplace verticalmente. A este movimiento se opondrán las fuerzas elásticas del núcleo hasta que se alcance el punto en el que ambas se igualen.

Mediante el uso del modelo 3D del núcleo y de la punta esférica de radio 5 micrómetros, el objetivo es comparar la relación Fuerza-Deformación resultante con la curva experimental. Se variarán los coeficientes del material hasta que estas curvas sean idénticas (Figura 2.4).

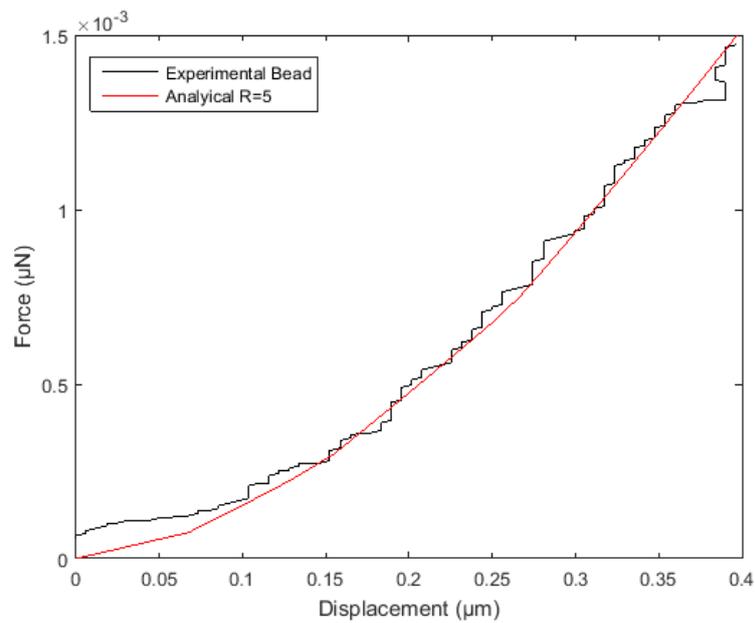
Se comenzará trabajando con unos valores aproximados para dichas constantes. Estos valores se obtienen a partir de datos experimentales [5] de la siguiente forma:

Suponiendo un comportamiento lineal, se aproxima el módulo de Young a partir de la penetración máxima que produce una fuerza dada en la punta. El coeficiente Poisson's se ha demostrado igual a 0,5 en diversos ensayos [4,5,7], aunque este valor es imposible de implementar en elementos finitos pues se trataría de un material incompresible.

De estos dos valores, mediante transformaciones conocidas para materiales elástico lineales, obtenemos el valor del módulo de cizalladura (G) y del módulo de compresibilidad (K).

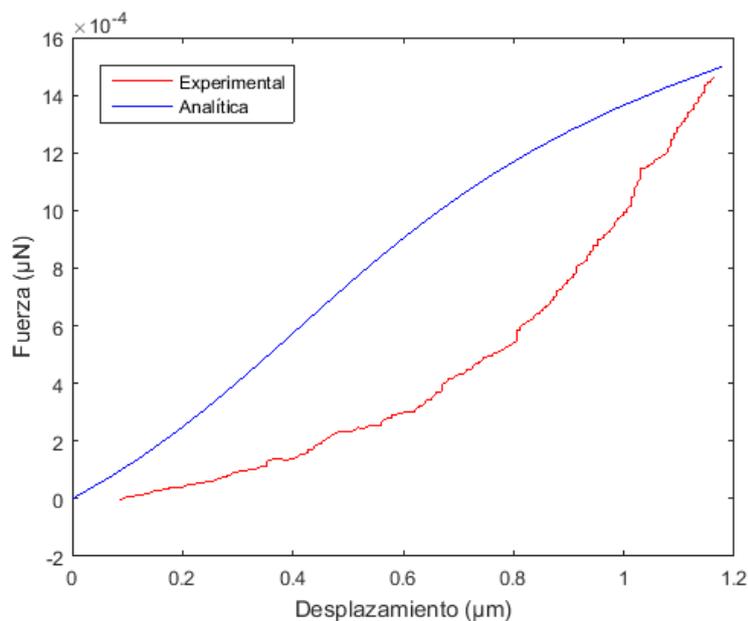
A raíz de la curva obtenida con estas constantes iniciales y teniendo en cuenta su definición se aumentan o disminuyen C_{10} y D_1 hasta alcanzar los valores que se indicarán a continuación.

El modelo final alcanzado tras la iteración se asemeja con gran precisión a la realidad. En la Figura 3.2.1 se presentan las curvas de desplazamiento vertical obtenidas experimentalmente y numéricamente para un radio de esfera de 5 μm . En los próximos subcapítulos se mostrarán la malla, cómo queda el núcleo deformado y las tensiones que aparecen.



Gráfica 3.2.1 Curvas F-D para un radio de punta $5 \mu\text{m}$.

Utilizando las mismas constantes C_{10} y D_1 se procede ahora a ensayar el núcleo con la punta cónica para comprobar su validez. Los desplazamientos producidos alcanzan dimensiones del orden de las del propio núcleo, es por ello que surgen grandes complicaciones en el cálculo computacional, todas relacionadas con problemas de convergencia y un enorme tiempo de trabajo. Como solución a este problema se decide aplicar una fuerza vertical puntual directamente sobre el vértice del modelo para aligerar los resultados (Figura 3.2.2).



Gráfica 3.2.2 Curvas F-D para una fuerza puntual.

Se puede observar como la forma de la trayectoria resultante no coincide con la de los experimentos, aunque sí que lo hacen los puntos de fuerza y desplazamiento máximos. A pesar de que este resultado no sea muy preciso resulta de gran ayuda. Dicha curva se desechará en los resultados finales sustituyéndola por la obtenida con una punta de radio igual a la que se usa en el experimento (70 nm).

Tras dicho proceso iterativo los valores que se obtienen son los siguientes:

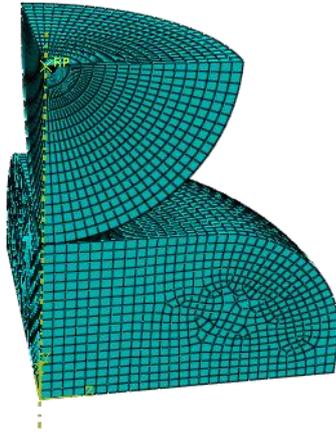
$$C_{10} = 650 \text{ Pa} \quad D_1 = 25 \text{ GPa}$$

Estos valores se mantienen constantes en todo lo que queda de documento. Disponemos en este momento pues del modelo definido en su totalidad.

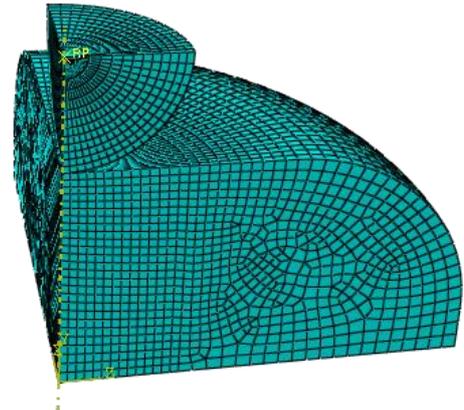
3.3. Mallado

En este subcapítulo se van a mostrar las distintas mallas realizadas en función del radio de punta.

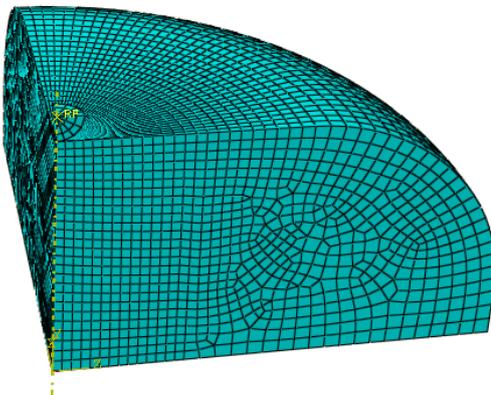
A



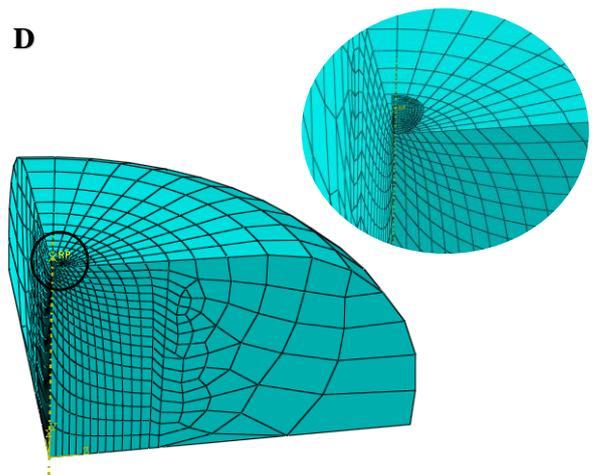
B



C



D



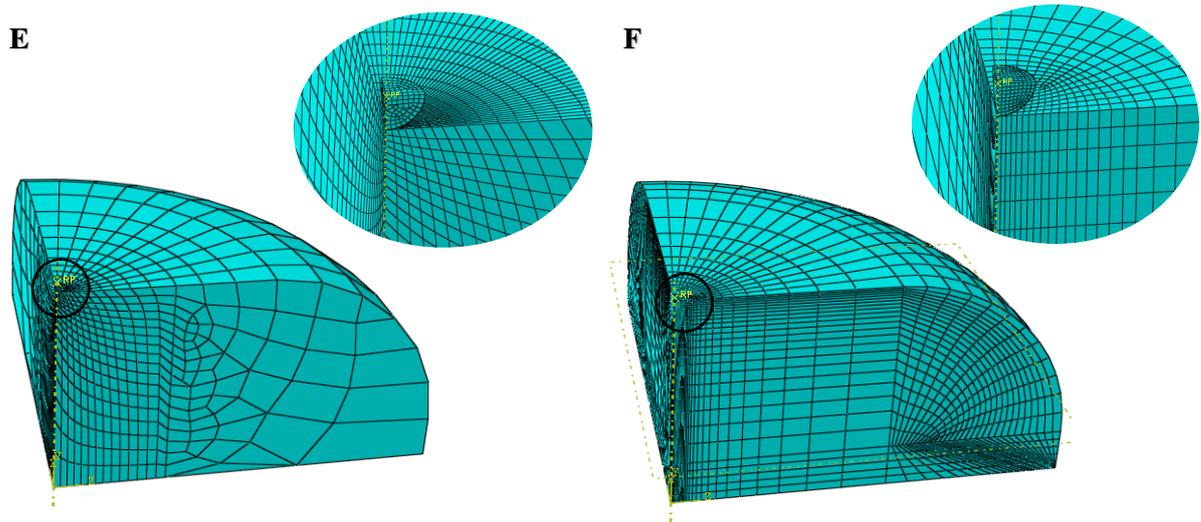


Figura 3.3.1 Mallas para los distintos ensayos. Los radios de punta empleados son: $5\ \mu\text{m}$, $2.5\ \mu\text{m}$, $0.5\ \mu\text{m}$, $0.25\ \mu\text{m}$, $0.1\ \mu\text{m}$ y $0.07\ \mu\text{m}$. Están mostradas las mallas en este mismo orden (A-F). Para alguna de las puntas se ha ampliado la zona de contacto, de esta forma se observa mejor el mallado.

3.4. Tensiones

Se va a analizar ahora como varía la deformada del modelo en función del radio de ataque. De esta forma se podrán ver tanto las tensiones como los desplazamientos máximos que se producen con el uso de distintas puntas. El próximo paso será por lo tanto disminuir paulatinamente el tamaño de la esfera de ataque del AFM hasta alcanzar el radio mínimo empleado en el experimento. Todas las deformaciones están mostradas con un factor de escala unidad.

Inicialmente se muestra el ensayo explicado en el subcapítulo anterior para calibrar las constantes. En él se usa una esfera de tamaño similar al del núcleo ($5\ \mu\text{m}$). Como se ha dicho previamente, para este caso contamos además con datos experimentales con los que comparar.

En la Figura 3.2.1 se muestra la deformada y las tensiones Von-Misses. Suprimimos de ahora en adelante la malla en la deformada para visualizar mejor los resultados. Las tensiones son pequeñas ($693\ \text{Pa}$ máximo) comparadas con las que podría aguantar el núcleo [7]. Vemos como la superficie de la esfera que entra en contacto con el núcleo es reducida y que se precisaría de una fuerza mucho mayor para alcanzar grandes deformaciones.

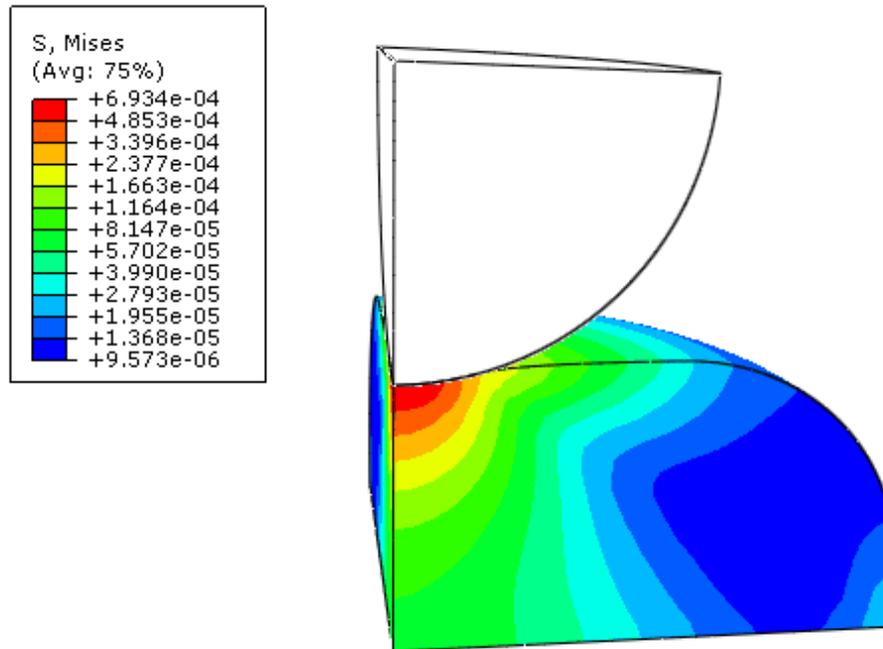


Figura 3.4.1 Tensiones Von-Misses para un ataque con radio de punta 5 μm .

En la Figura 3.2.2 se puede observar la deformada producida al utilizar una punta de radio 2,5 micrómetros. La deformada es lógica e intuitiva y se encuentra dentro de los parámetros esperados. A menor radio, mayor desplazamiento vertical. A su vez se obtiene el ratio en el que varían las tensiones Von-Misses en el modelo. Se comprueba cómo se acentúan las diferencias entre las tensiones entre la zona de contacto y el otro extremo del modelo.

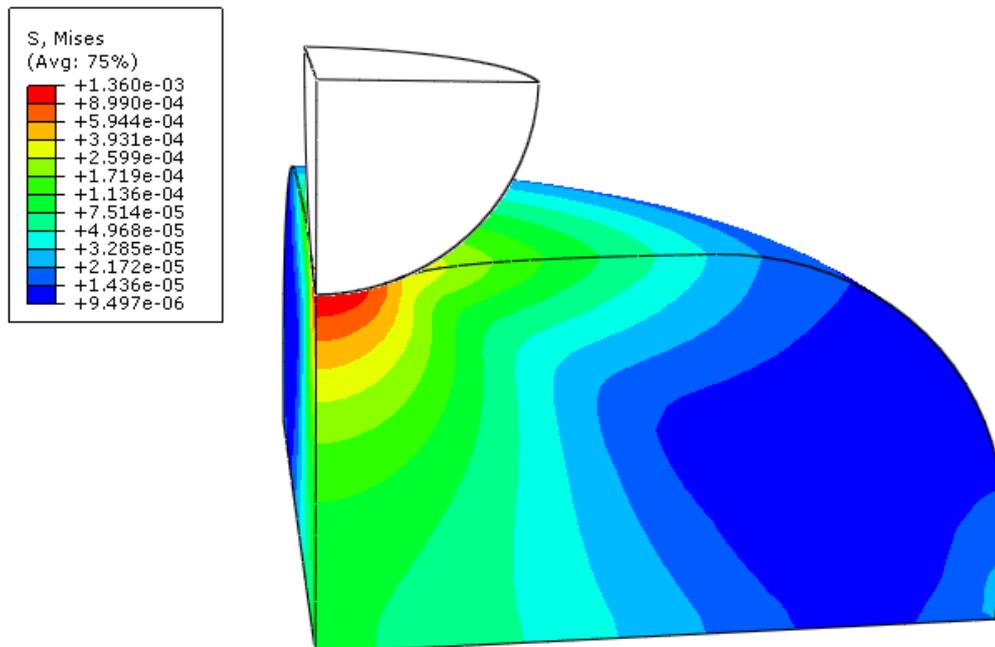


Figura 3.4.2 Tensiones Von-Misses para un radio de 2.5 μm .

Si se continúa disminuyendo el radio de la punta resulta la deformada mostrada en la Figura 3.2.3, esta vez para una esfera de 0.5 micrómetros de radio.

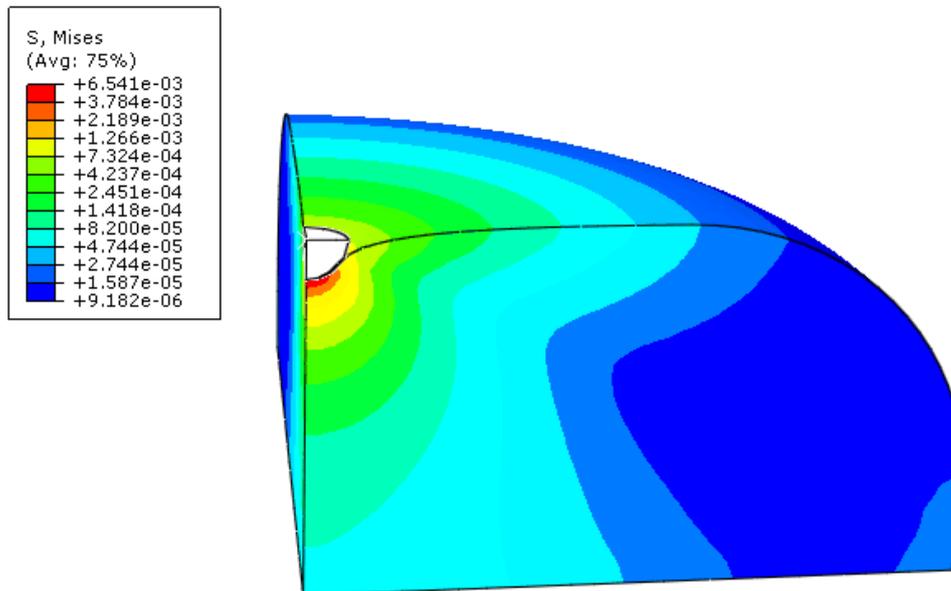


Figura 3.4.3 Tensiones Von-Mises para un radio de ataque de 0.5 μm .

Aquí se puede apreciar que el desplazamiento vertical aumenta hasta alcanzar los 0.723 μm frente a los 0,4 μm máximos alcanzados entre los dos casos anteriores. Esto se debe a que el área de contacto es menor y, por consiguiente, las tensiones (como reacción a la compresión) que produce la muestra para equiparar la fuerza de 1,5 nN ejercida sobre ella deberán ser mayores. Estas tensiones aumentan al aumentar la compresión del material. Las tensiones que sufren los elementos próximos a la punta aumentan también marcando aún más la diferencia con las que se producen en elementos algo más alejados de la zona.

Se puede seguir disminuyendo aún mucho más el radio de la esfera de ataque. Estos serían los resultados dándole un valor al radio igual a $0.25\ \mu\text{m}$.

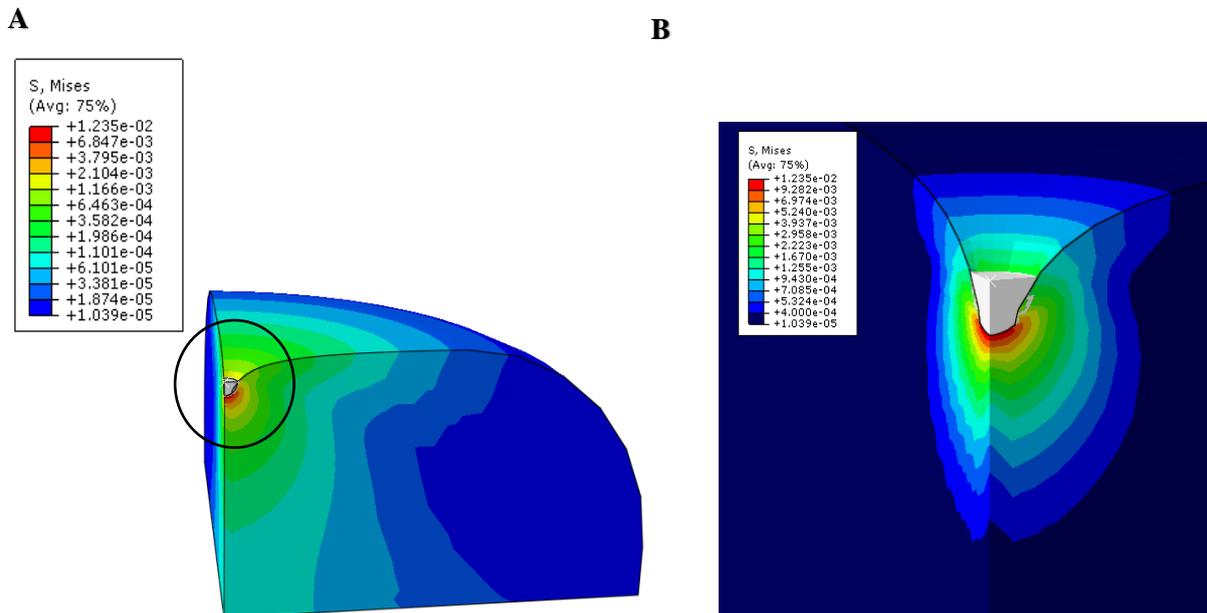


Figura 3.4.4 Tensiones Von-Misses para un radio de punta de $0.25\ \mu\text{m}$.

Como era de esperar la penetración será mayor al haber disminuido el radio. Se puede a su vez apreciar como las tensiones aumentan concentrándose aún más.

Acercándose más el caso puntual, se obtienen los siguientes resultados para un radio de $0.1\ \mu\text{m}$.

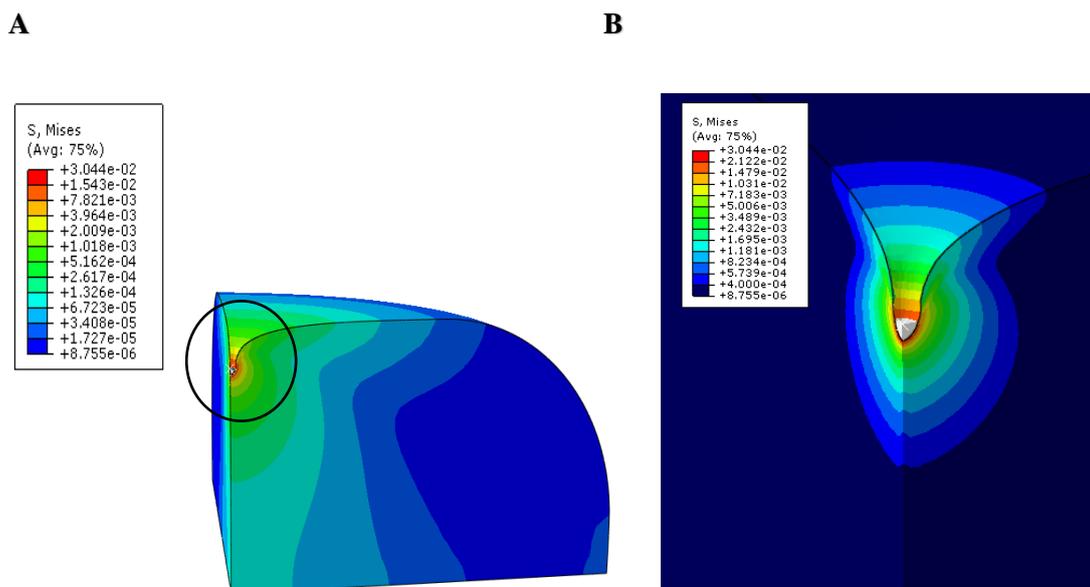


Figura 3.4.5 Tensiones Von-Misses para un radio de ataque de $0.1\ \mu\text{m}$.

El desplazamiento de la punta cuando se alcanza el equilibrio sería de $0.99 \mu\text{m}$, aproximándose cada vez más a los $1,17 \mu\text{m}$ que se obtuvieron experimentalmente con la punta cónica del microscopio atómico. Las tensiones máximas por su parte siguen aumentando mientras que la media total disminuye.

Finalmente, se usa una esfera de radio 70 nm para simular el ataque con la punta cónica piramidal empleada en el experimento. Es un radio de punta suficientemente fino y los resultados que aparezcan con él serán preciosos. Es el radio mínimo antes de que se produzca una deformación extrema en la muestra. En este caso, al depender la convergencia altamente de la malla esta juega un papel crucial. Por ser la malla especialmente delicada deberá ser diseñada con alta precisión (Figura 3.2.1 F).

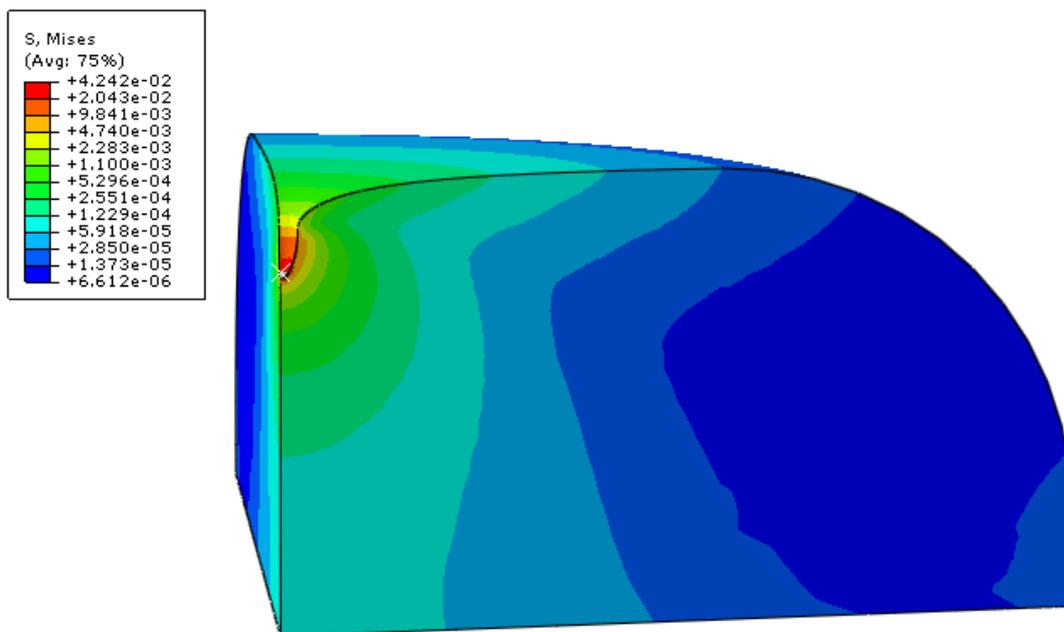


Figura 3.4.6 Tensiones Von-Mises para un radio de ataque de 70 nm .

Respecto a las tensiones que se producen, determinar su validez es complicado y deben analizarse con delicadeza. Este estudio se realizará en el capítulo 5.

Se muestra una ampliación de la zona en cuestión (Figura 3.3.8) para facilitar una mejor visualización. Se observa cómo aproximadamente el total de la deformación se produce en un radio de $0.6 \mu\text{m}$ alrededor del centro del núcleo quedando el resto inalterado. Esto es debido a la alta compresibilidad del material y al pequeño radio de ataque empleado.

En este caso es cuando el modelo alcanza las mayores tensiones. Las tensiones Von-Mises máximas alcanzadas son 4242 Pa en la zona de contacto entre ambas partes.

Se mostrará a continuación la deformada de la muestra con la malla para así observar las variaciones de volumen y forma en los elementos próximos al contacto (Figura 3.3.9).

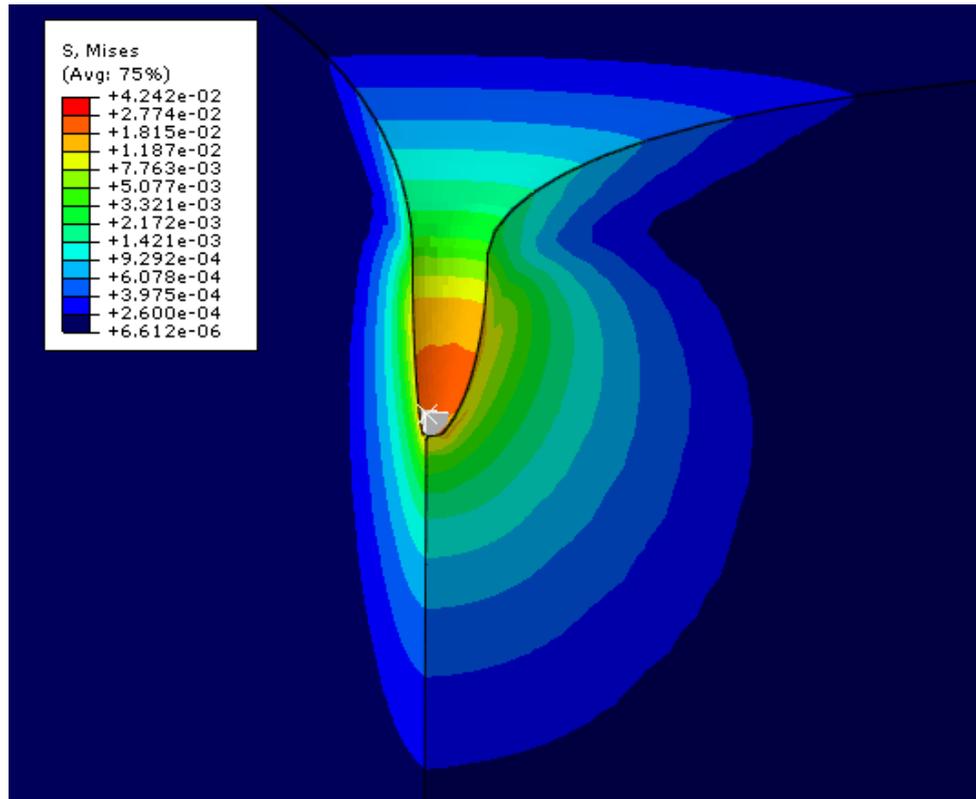


Figura 3.4.7 Ampliación de la zona de contacto entre la punta y el núcleo.

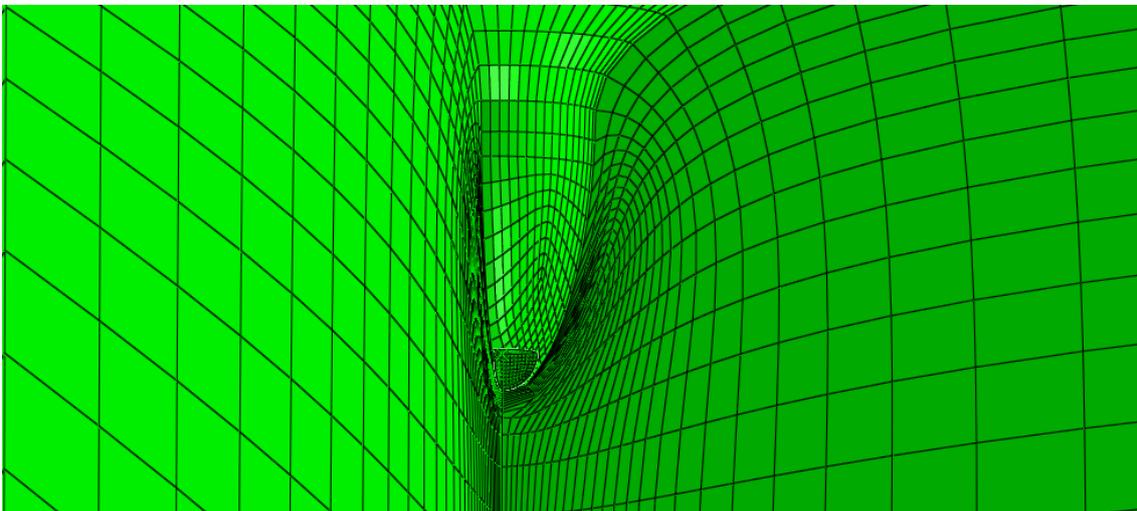
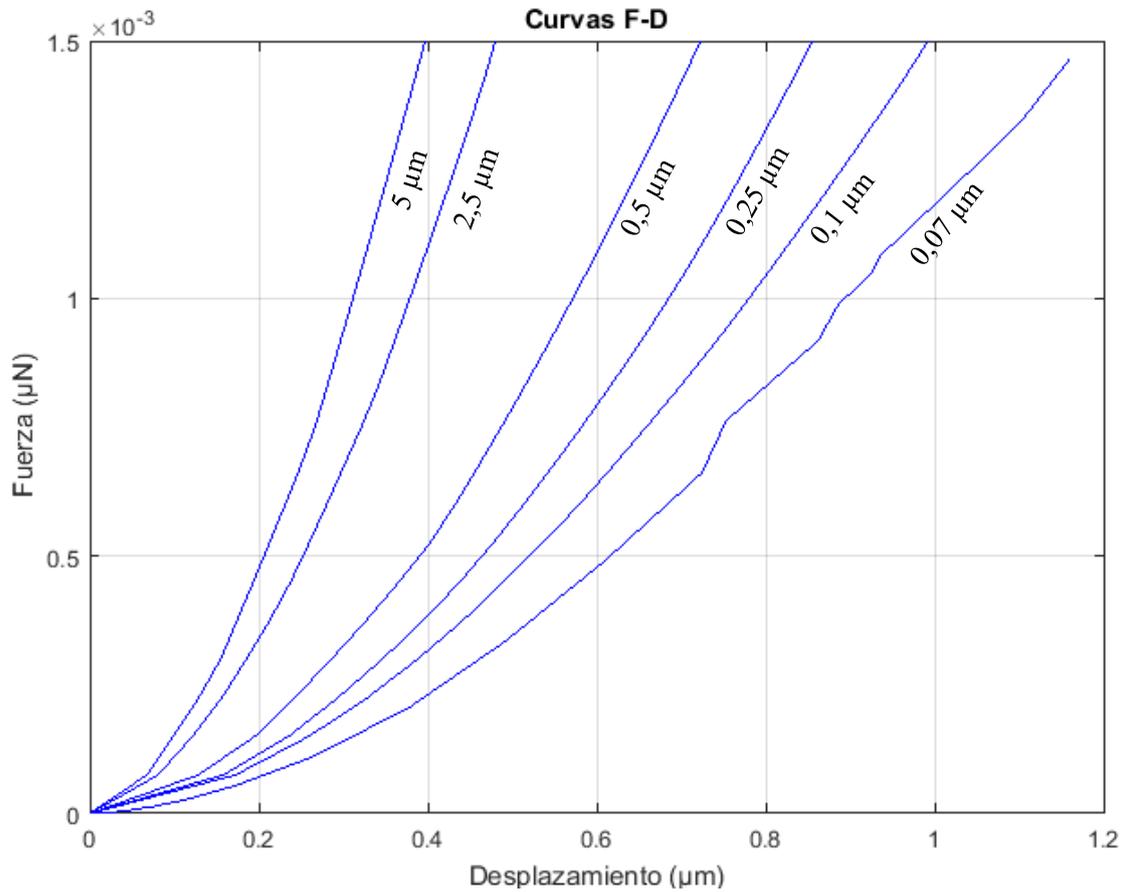


Figura 3.4.8 Ampliación de la malla deformada del núcleo al ser ensayado con un radio de 70 nm.

3.5. Desplazamientos

Después de haber introducido los distintos modelos para cada radio de punta, se generan las curvas que relacionan la fuerza ejercida con la penetración correspondiente.



Gráfica 3.5.1 Curvas F-D para todos los radios.

Se observa como existe un patrón en la trayectoria de cada una de las curvas producidas. Con la disminución del radio de la punta aumenta la penetración total en la muestra, pero no de manera proporcional sino aproximándose a un régimen exponencial.

4 SIMULACIÓN MODELO AXISIMÉTRICO

4.1. Introducción

Se ha realizado un modelo axisimétrico a fin de consolidar los resultados previamente representados. Teóricamente este paso no sería necesario pues si se han elegido correctamente las condiciones de contorno los resultados deberían ser idénticos. Sin embargo, debido al carácter no lineal causado por la alta compresibilidad del modelo y las grandes deformaciones los resultados podrían variar ligeramente.

Para el modelo en 2D se utilizarán elementos con simetría radial alrededor del eje Y (eje perpendicular a la base del AFM). Se van a comprobar tan solo las curvas de los ensayos extremos, es decir, las producidas por la punta de radio 5 y 0.07 μm . Todo el desarrollo y las condiciones aplicadas son equivalente a las explicadas en el capítulo previo.

4.2. Mallado

En las Figuras 4.2.1 y 4.2.2 se muestra el mallado que se ha realizado para cada uno de los ensayos. La malla del núcleo que se ataca con la esfera de radio 70 nm (Figura 4.2.2) tiene que ser muy fina y delicada. Al ser un modelo en 2D el número de elementos que se emplea es mucho menor al que se ha utilizado en 3D, esto permite mallar de manera mucho más precisa sin implicar un coste computacional mayor. Este es otro de los motivos por el que se ha decidido emplear un modelo axisimétrico para valorar los resultados.

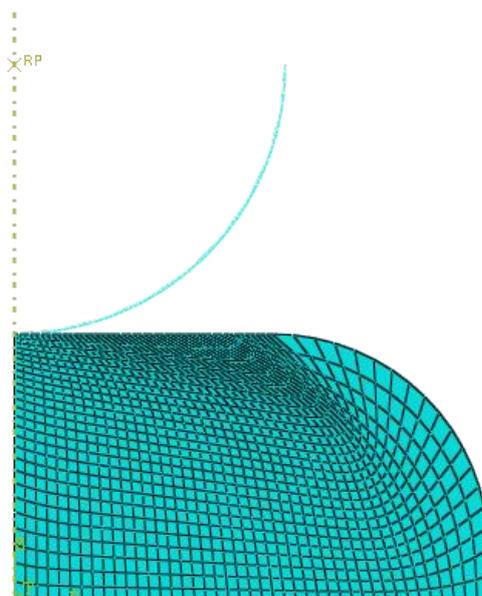


Figura 4.2.1 Mallado realizado para un radio de punta de 5 micrómetros.

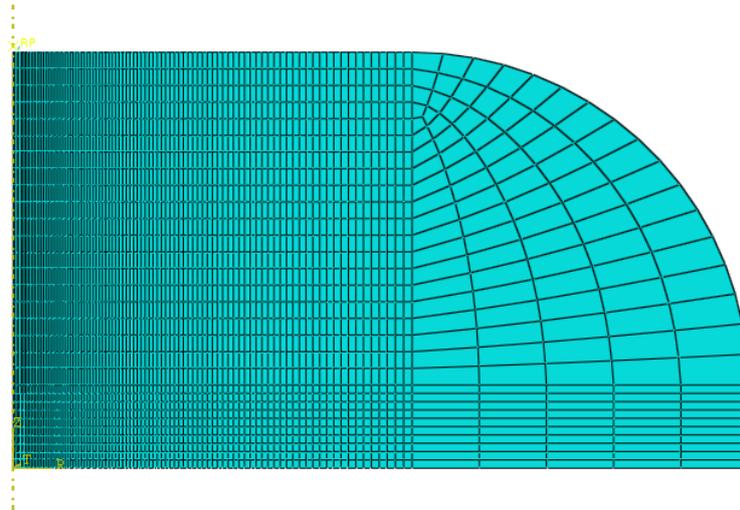


Figura 4.2.2 Malla para un radio de punta de 70 nm.

4.3. Tensiones

Se aplica sobre la punta la misma fuerza vertical que en el caso 3D, 1.5 nN. Esta sería la deformada y las tensiones Von-Misses que aparecen empleando la esfera de radio 5 μm .

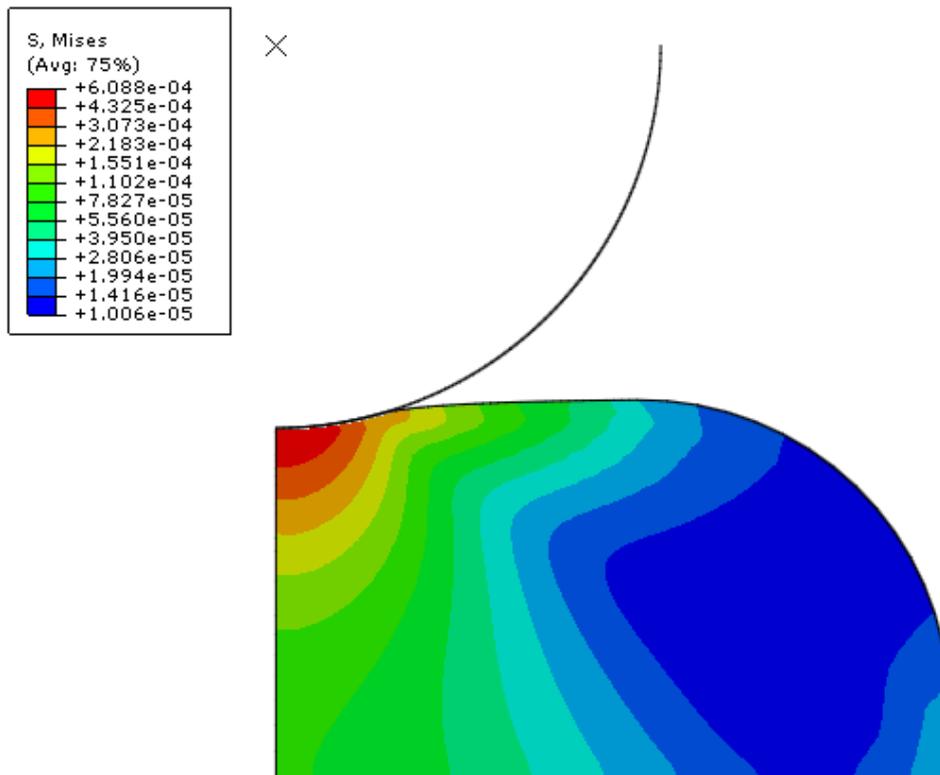


Figura 4.3.1 Tensiones Von-Misses en el modelo axisimétrico del ensayo con la esfera de radio 5 μm .

Se observa una deformada idéntica a la obtenida para el caso 3D, aunque las tensiones Von-Mises medias disminuyen un poco.

Este es el resultado en 2D que se obtiene al aplicar la fuerza a una esfera de radio $0.07\ \mu\text{m}$:

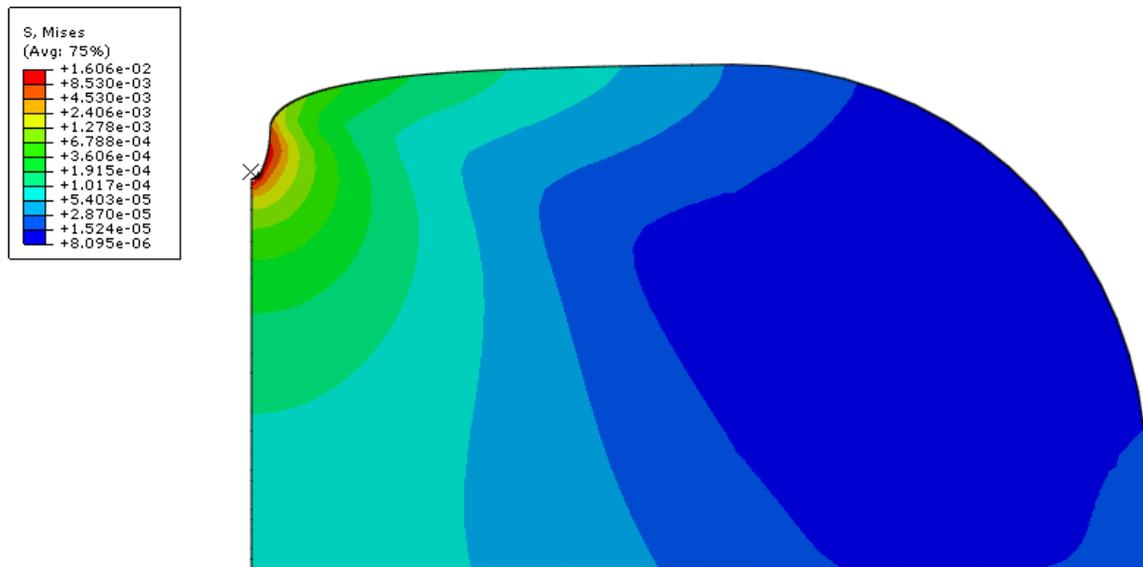


Figura 4.3.2 Tensiones Von-Mises en el modelo axisimétrico para un radio de punta de 70 nm.

Y ampliando de nuevo la zona crucial y más delicada se verifica que las tensiones son prácticamente las mismas que en el caso 3D, al igual que la deformada:

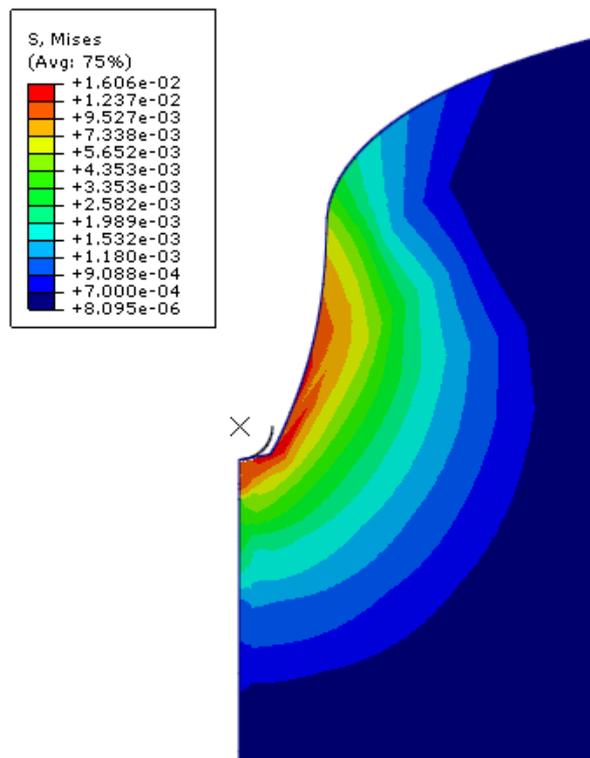


Figura 4.3.3 Ampliación de la zona de contacto entre la punta y el núcleo en el modelo axisimétrico.

5 RESULTADOS

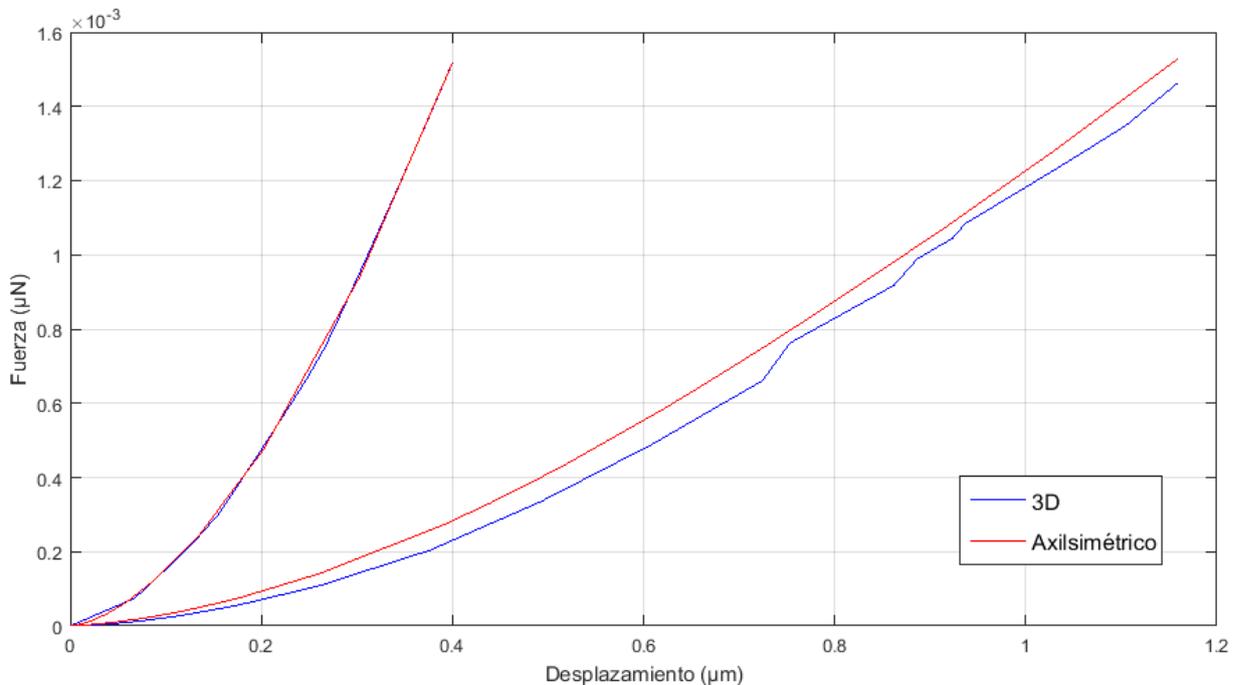
5.1. Introducción

La relación Fuerza-Penetración se asemeja bastante bien a aquella obtenida en el laboratorio, salvando claras diferencias debidas a las hipótesis consideradas para realizar el diseño. Entre ellas la eliminación del comportamiento viscoelástico, considerar el núcleo como un todo (no distinguir cada uno de sus componentes por separado) o eliminar el contacto con la tablilla del microscopio afectan a los resultados, aunque de forma muy leve.

5.2. Comparación entre ambos modelos

Se compararán inicialmente los resultados del modelo 3D y del axisimétrico, demostrando la equidad entre ambos.

Esta sería la gráfica Fuerza-Penetración para ambos casos:



Gráfica 5.2.1 Comparación de la curva F-D de los ensayos 3D y 2D.

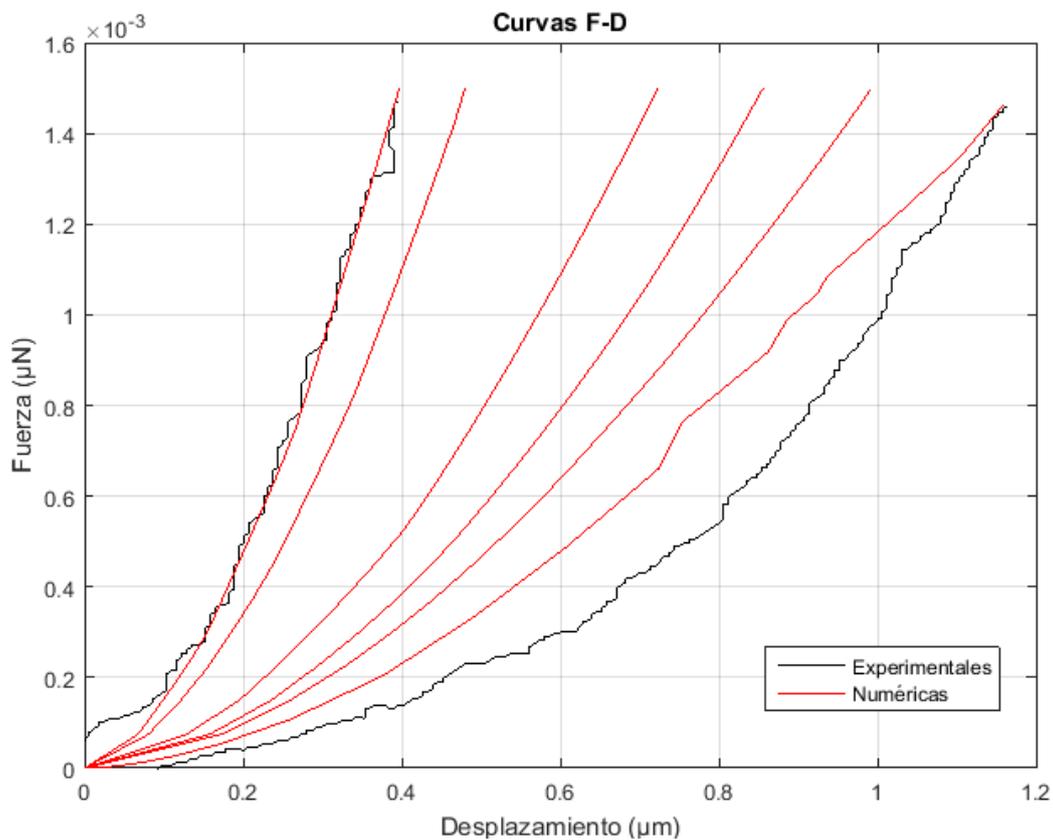
La máxima diferencia en desplazamiento para una misma fuerza es de $6 \times 10^{-5} \mu\text{N}$. Se irá viendo que a medida que disminuye el radio de ataque, y por lo tanto el área de contacto, los resultados

difieren más. Esto ocurre tanto entre estos dos modelos como comparándolos con el caso experimental.

Como se ha comentado antes, las diferencias en tensiones Von-Misses, así como la deformada, son prácticamente equivalentes.

5.3. Comparación con los resultados experimentales

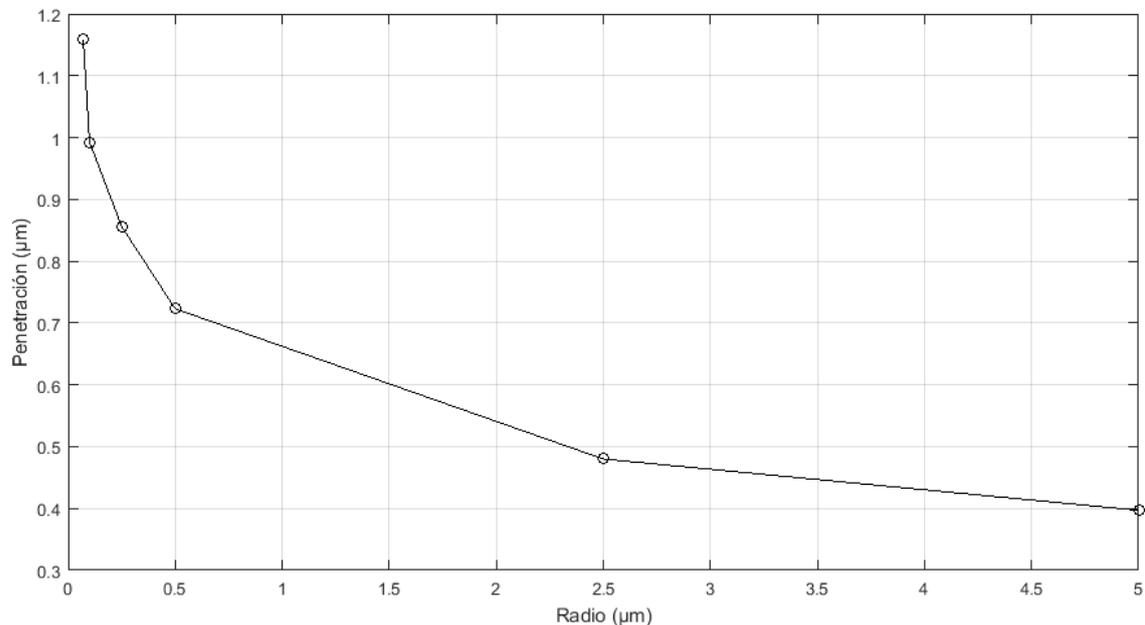
Se muestran ahora superpuestos los resultados experimentales que se han obtenido de ensayar la célula HT1080 y los numéricos obtenidos mediante el método de los elementos finitos con el modelo 3D (Gráfica 5.3.1). Estos resultados experimentales son el resultado de aplicar una fuerza aproximada de 1.5 nN con el AFM, de esta forma se garantiza que el resultado no será destructivo en la muestra y que se puede repetir varias veces [5]. Concretamente cada ensayo se ha repetido 10 veces tomando una media de 40 segundos cada proceso.



Gráfica 5.3.1 Comparación de la penetración producida en cada uno de los ensayos y comparación con los resultados experimentales.

En la gráfica 5.3.1 se reproducen de nuevo las curvas que se utilizaron inicialmente para definir las características del material. Los resultados son exactamente iguales a los experimentales al utilizar la esfera. Sin embargo, para el caso de la punta fina coinciden el principio y el final. Sin llegar a ser muy grandes las diferencias, el desplazamiento obtenido numéricamente sigue un patrón o trayectoria muy similar a aquel del laboratorio.

Las curvas obtenidas para los radios de punta intermedios se encuentran, como era de esperar, entre estos dos casos extremos. Los desplazamientos máximos en cada caso van aumentando a



Gráfica 5.3.2 Penetración máxima de la punta del AFM en función de su radio.

medida que disminuye el radio de forma no lineal. Si se comparan las penetraciones con los radios empleados obtenemos algo parecido a una exponencial (gráfica 5.3.2).

5.4. Análisis de las tensiones que aparecen en el modelo

Argumentar que las tensiones que sufre el núcleo cuando se usan radios de punta muy pequeños están muy concentradas y alcanzan valores importantes. Esto causa una heterogeneidad y un pequeño daño en el núcleo. Si se aplicase una fuerza más elevada induciría un daño irreversible y posiblemente la ruptura de la envoltura nuclear, dañando el genoma [5]. La ruptura del núcleo tiene diferentes consecuencias en función del tipo de célula de que se trate.

Son varios los estudios sobre la ruptura de la envoltura nuclear y su repercusión. En un reciente estudio se ha analizado la ruptura de una célula HT1080 haciéndola pasar por una restricción sólida [7]. En dicho ensayo simulaban la migración celular de una célula cancerígena a través de un endotelio sólido.

En resumen, una de las conclusiones a las que llegan fija en 0,1 la deformación volumétrica a compresión máxima que puede sufrir la envoltura nuclear antes de su ruptura para orificios de radio igual a $\frac{1}{4}$ del radio del núcleo (Figura 5.4.1). Esta ruptura se produce en la parte frontal de la célula (aquella que pasa primero por el orificio) en un 70% de los casos, liberando el genoma dentro del citoplasma.

A pesar de que este experimento es completamente distinto al que se ha analizado en este texto, el valor límite obtenido para la deformación antes de la ruptura se podría tomar como un valor de referencia.

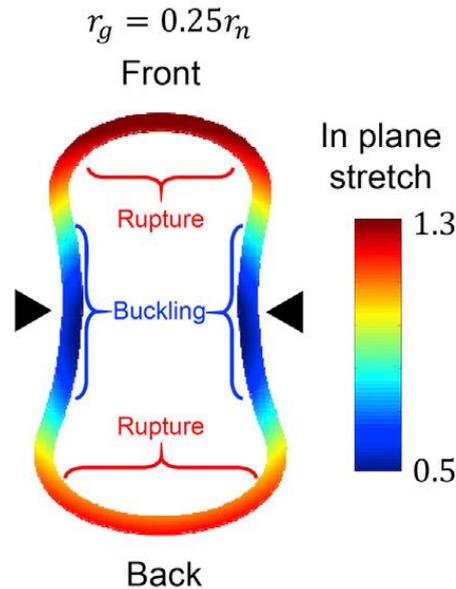


Figura 5.4.1 Tensión de ruptura en el ensayo de migración.

Durante el desarrollo del ensayo con la punta de radio $0,07 \mu\text{m}$ se observan unas deformaciones muy grandes en los elementos de la zona de contacto (Figuras 3.4.8 y 4.3.3). Las grandes deformaciones se concentran en un radio de aproximadamente $0,35 \mu\text{m}$ alrededor del centro del contacto. La distancia inicial entre el nodo central del núcleo y aquel que se encuentre en la superficie sobre dicho radio se ve aumentada en un 90% tras la aplicación de la fuerza.

Los elementos con los que entra en contacto primero la punta son los que sufren una deformación mayor. Estos alcanzan una deformación según el eje Y de -0.9 y de 4 según el eje X. Su volumen/área se reduce en un 60% (Figura 5.3.2).

Existen grandes diferencias entre los dos ensayos que se están comparando, la forma del modelo deformado no se asemeja en nada y las tensiones están repartidas de manera mucho más uniforme en el ensayo de migración. A pesar de ello se puede deducir que las tensiones producidas con el AFM son críticas. Un aumento en la fuerza que se le aplica sobre la punta fina conllevaría la ruptura de la envoltura nuclear.

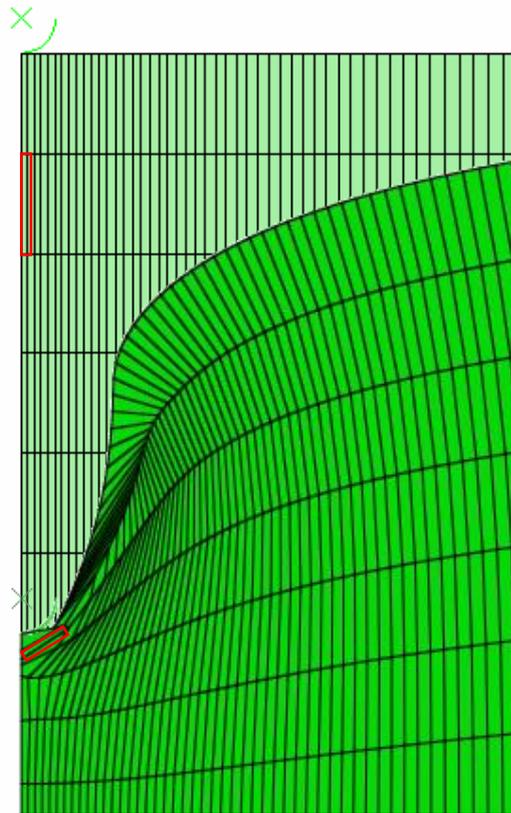


Figura 5.4.2 Variación del tamaño de los elementos de contacto.

5.5. Estudio de la rigidez del núcleo

El objetivo final de este trabajo era dar unas características a la rigidez volumétrica que defina el comportamiento elástico del núcleo. Asemajando las curvas obtenidas a un modelo de contacto de Hertz se puede obtener una constante de rigidez (equiparable al módulo elástico en elasticidad lineal). Si bien es cierto que deberán aplicarse correcciones a este modelo para salvar las claras diferencias entre ambos [11].

El modelo de contacto de Hertz fue propuesto por Hertz en 1881 procurando resolver el problema de contacto entre dos esferas. El problema surge cuando ambas esferas entran inicialmente en contacto. En este punto las tensiones serían infinitas, al producirse el contacto en un solo punto y, por lo tanto, cederían ambas esferas inmediatamente. En el caso elástico real existe un área, por pequeña que sea al iniciarse el contacto, limitando así las tensiones. Hertz estudió las tensiones que se producían cerca de la superficie de contacto en este tipo de situaciones.

La comparación de nuestro contacto con el modelo de Hertz es válida tan solo para pequeñas deformaciones en materiales elásticos. Cuando se trata de tejidos biológicos estos modelos no se asemejan demasiado bien por sí solos. Es por esto que deberá aplicarse una corrección a la hora de calcular la rigidez de nuestra muestra [11].

Utilizando la ecuación que rige el contacto entre una esfera y una superficie plana del modelo de Hertz se puede obtener un valor para la rigidez (E):

$$F = \frac{4E\sqrt{R_c}}{3(1-\nu^2)} * \delta^{\frac{3}{2}} \quad (5.4.1)$$

Donde: R_c es el radio de la esfera de ataque, δ el desplazamiento vertical de la punta y F la fuerza aplicada sobre ella.

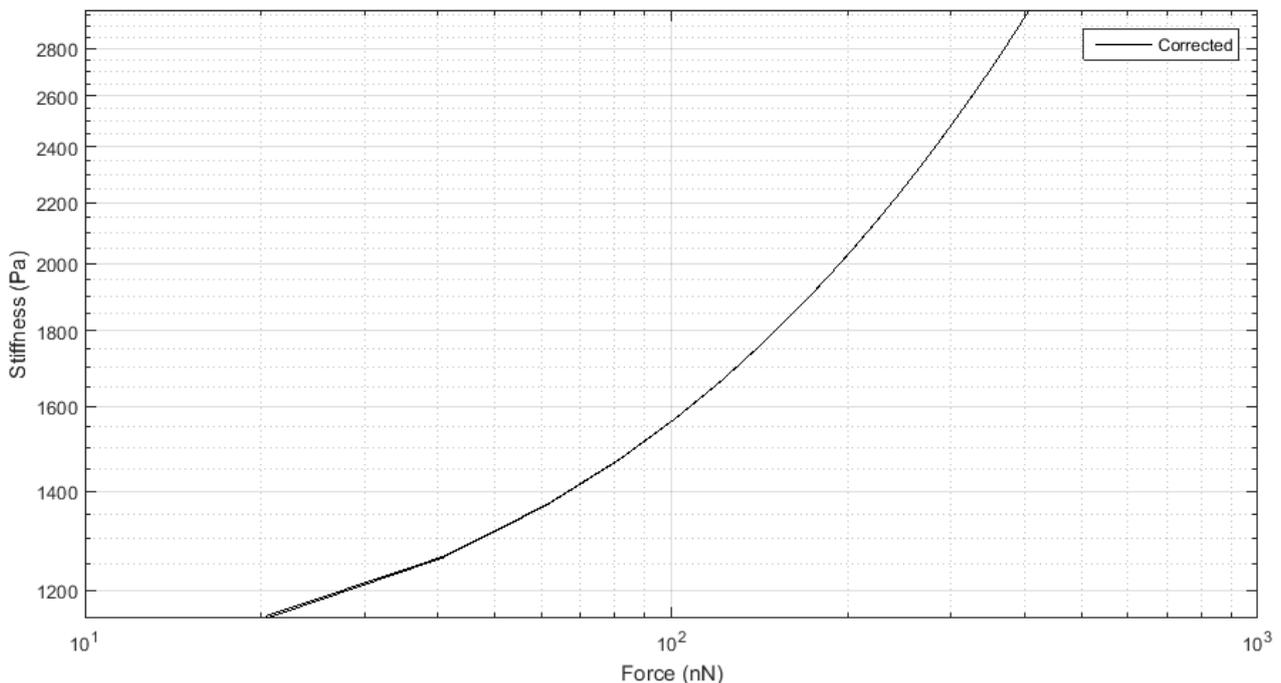
La ecuación 5.4.1 será corregida multiplicando el término de la derecha por:

$$1 + 1.33\mathcal{X} + 1.283\mathcal{X}^2 + 0.769\mathcal{X}^3 + 0.0975\mathcal{X}^4 \quad (5.4.2)$$

Donde: $\mathcal{X} = \frac{\sqrt{\delta R_c}}{h}$, h es la altura inicial del núcleo con respecto a la base del AFM.

Se ha comprobado que esta formulación del modelo de contacto da muy buenos resultados en modelos hiperelásticos. También ha sido usada en repetidas ocasiones para modelar experimentos realizados con un AFM sobre tejidos biológicos [5,11,12].

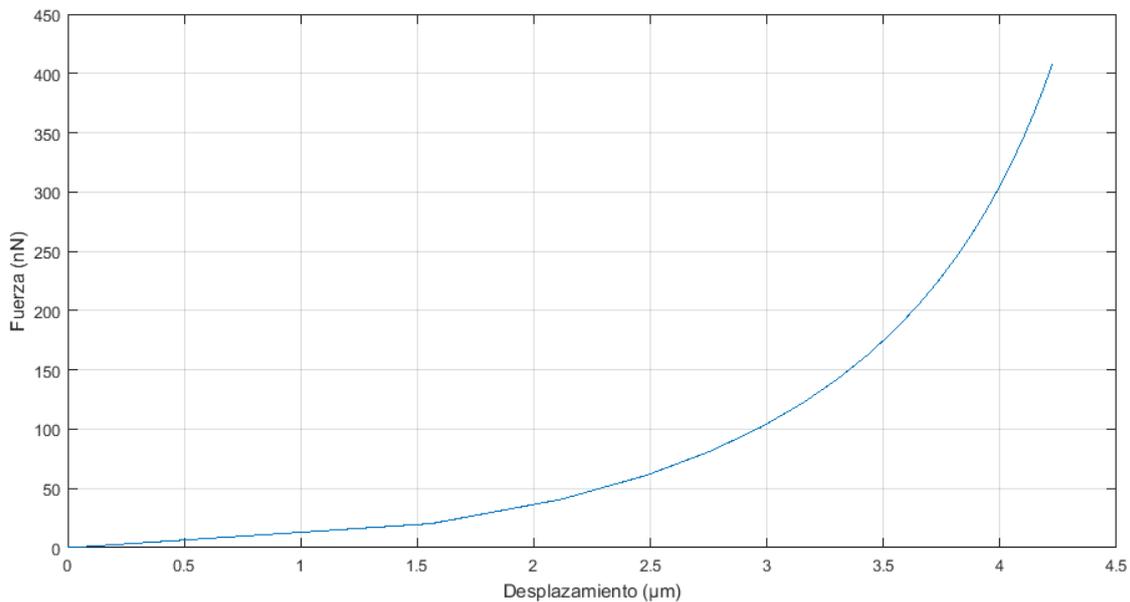
Despejando E de la combinación de las ecuaciones 5.4.1 y 5.4.2 y sustituyendo los valores obtenidos analíticamente por el resto de coeficientes se presenta la siguiente gráfica en escala logarítmica:



Gráfica 5.5.1 Constante de rigidez en función de la fuerza aplicada.

Se aprecia como el valor corregido de la rigidez varía entre 1 y 3 kPa para fuerzas menores a 400 nN. Que varíe con la fuerza aplicada es equivalente a decir que varía con la deformación de la muestra. Los datos tomados para elaborar esta gráfica se han obtenido para un valor de radio de la esfera igual a 5 micrómetro.

En la gráfica 5.5.2 se muestra la curva fuerza desplazamiento de esta punta al penetrar en el núcleo.



Gráfica 5.5.2 Relación entre la Fuerza aplicada y la penetración de la punta en el núcleo para un radio de $5 \mu\text{m}$.

5.6. Comprobaciones finales

Finalmente queda comprobar alguna de las hipótesis propuestas al comienzo del escrito. Se verá como no afectan sustancialmente a los resultados aquí expuestos.

Se analizará la eliminación del contacto núcleo-base. Inicialmente se supuso que el desplazamiento de los nodos inferiores del núcleo era mínimo y por lo tanto despreciable. Se aplicó pues una restricción que los encastraba a fin de facilitar la convergencia del modelo. Resulta obvio que si se eliminase esta restricción el máximo desplazamiento horizontal se produciría al emplear como punta la esfera de mayor radio. Dicho esto, se presenta a continuación la deformada producida al aplicar una fuerza de 400 nN sobre la punta del microscopio atómico para ambos casos, con y sin desplazamiento en la superficie inferior.

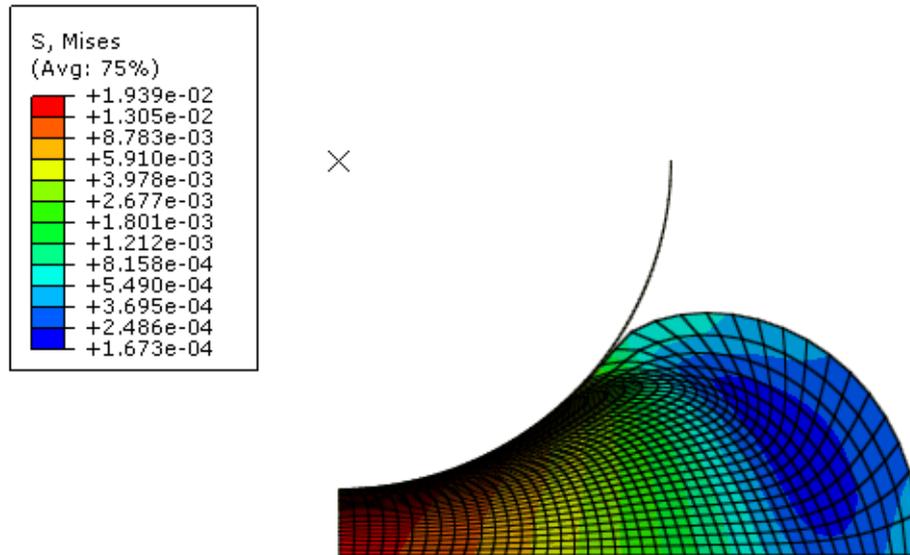


Figura 5.6.1 Deformación del núcleo al aplicar una fuerza de 400 nN sobre la punta permitiendo el deslizamiento entre las superficies inferiores.

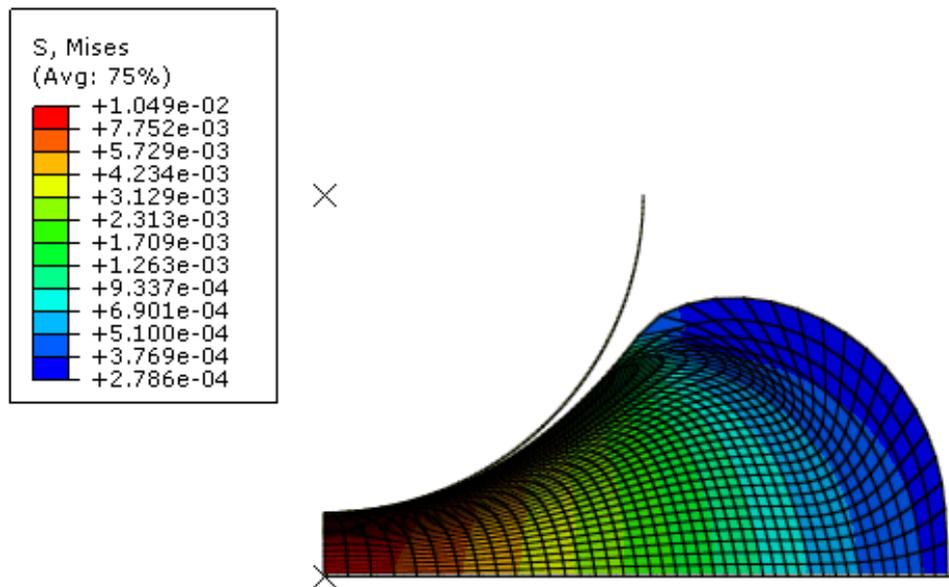


Figura 5.6.2 Deformación del núcleo al aplicar una fuerza de 400 nN sobre la punta sin permitir el deslizamiento entre las superficies inferiores.

En las Figuras 5.6.1 y 5.6.2 se muestran las tensiones Von-Misses que sufre el núcleo celular junto con la deformada. Para la magnitud de fuerza aplicada la diferencia entre las tensiones es notable, más o menos el doble. Y, como se dijo en el subcapítulo 2.5, el desplazamiento máximo horizontal es de 1 μm frente a los 4 μm que desciende la punta (Figura 2.5.1).

En este trabajo se han aplicado fuerzas mucho menores a 400 nN, todos los resultados se han obtenido aplicando fuerzas de 1,5 nN. Para este rango de fuerzas la diferencia en tensiones y desplazamientos que se producen al permitir, o no, el desplazamiento de los nodos de la cara inferior es menor. La diferencia en tensiones Von-Misses que se produce al liberar los nodos inferiores es de aproximadamente un 35%. Esta diferencia sigue siendo apreciable y manifiesta que los resultados difieren levemente de la realidad. Con respecto al desplazamiento vertical de la punta al aplicar la fuerza de 1,5 nN, este varía de 0,4 a 0,3731 cuando se permite el desplazamiento de los nodos inferiores.

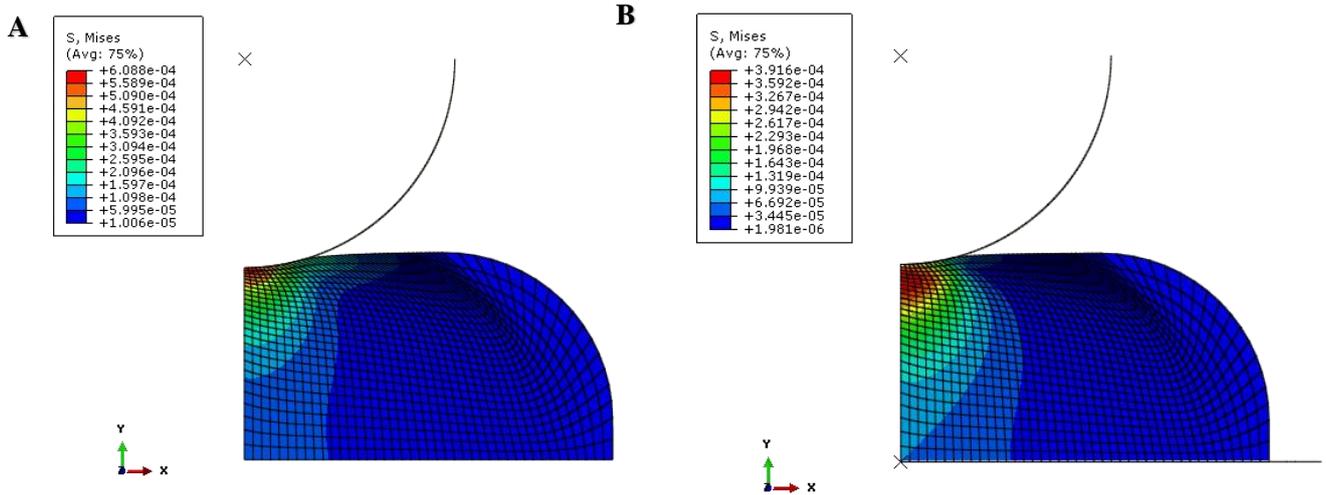
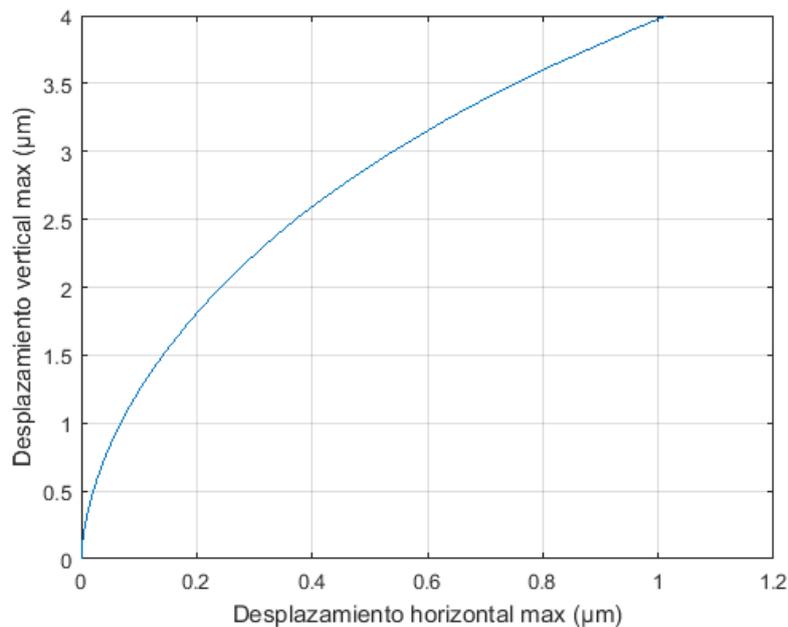


Figura 5.6.3 Tensiones Von-Misses al aplicar una fuerza de 1,5 nN sobre la punta. Fijando los nodos inferiores (A) y permitiendo el desplazamiento de los mismos (B).

En la siguiente gráfica se muestra como varía el desplazamiento horizontal máximo de los nodos inferiores según el desplazamiento vertical de la punta de 5 μm (Gráfica 5.6.1).



Gráfica 5.6.1 Comparación entre los desplazamientos verticales y horizontales máximos.

Se puede apreciar como el error cometido al fijar los nodos de la cara inferior aumenta conforme desciende la punta del AFM.

6 CONCLUSIONES Y DESARROLLO FUTURO

6.1. Conclusiones

En este proyecto se ha modelado el núcleo de una célula cancerosa utilizando como referencia los resultados obtenidos con un microscopio de fuerza atómica. El objetivo era que al simular el AFM y la célula en elementos finitos las curvas resultantes que se produjesen fuesen equivalentes a las que se obtuvieron en el laboratorio.

Se ha utilizado tanto un modelo en dos dimensiones como uno en tres dimensiones. El motivo es que al ser un modelo con elementos axisimétricos se puede aumentar la precisión en el mallado sin incurrir en un mayor peso computacional. Esto permite comparar el modelo 3D con uno más preciso, aunque en 2D, y a su vez realizar ciertas comprobaciones independientes. Resultaba imposible comprobar cómo afecta la eliminación del contacto en los nodos inferiores en un modelo en 3D.

Se han empleado elementos 3D a lo largo del trabajo por motivos prácticos. La idea era mejorar la habilidad del alumno en el manejo de elementos finitos.

Se ha mostrado en el capítulo de resultados que las curvas obtenidas en ambos modelos son prácticamente equivalentes (Figura 5.2.1). Por otro lado, la eliminación del contacto con la base supone un error que aumenta según la fuerza aplicada sobre la punta del microscopio.

Respecto a la similitud con la realidad, se puede comprobar según las gráficas mostradas en el capítulo previo que las curvas Fuerza-Deformación producidas en elementos finitos no difieren sustancialmente de la realidad. Se dispone tan solo de resultados experimentales para los dos radios límites empleados. Para un radio 5 micrómetros las curvas son idénticas, mientras que cuando el radio disminuye hasta los 70 nm estas difieren ligeramente. El motivo es que conforme el radio disminuye la superficie de contacto también lo hace y por lo tanto aumenta la profundidad de la penetración. Esto provoca un mayor número de errores numéricos y de casos de no convergencia.

El radio de la punta de diamante empleada en los laboratorios para ensayar el núcleo es de 20 nm. El motivo de que en este proyecto se haya empleado una de 70 nm es corregir los errores de convergencia antes mencionados sin incurrir en una modificación considerable del tamaño de la punta. Adaptar una punta de diamante real a un modelo numérico ha sido el principal problema que se ha planteado a lo largo del trabajo.

La principal ventaja de haber realizado este proyecto es poder observar las tensiones que aparecen en todo el núcleo celular cuando se lo somete a este tipo de ensayo. De estas tensiones se puede obtener información acerca del comportamiento mecánico del núcleo y de su límite elástico. Además de esto, este proyecto da la posibilidad de observar como varía la resistencia elástica del núcleo en función de la superficie de contacto sobre la que se aplique la fuerza.

Finalmente, se ha comparado el contacto producido en el ensayo con la teoría de Hertz. Introduciendo los valores de la gráfica que relaciona la fuerza aplicada con la penetración en las ecuaciones del contacto se ha obtenido un valor para la rigidez del núcleo [11]. El uso del método de contacto de Hertz es muy común a la hora de analizar tejidos biológicos y geles. En determinados casos el uso de este método induce a errores debido a las grandes deformaciones y a las no-linealidades.

6.2. Desarrollo futuro

Como comentario final se proponen los diferentes caminos que se podrían seguir para ampliar la información obtenida en este proyecto. El objetivo principal sigue siendo caracterizar el comportamiento elástico de la célula y ver cómo reacciona ante los diversos estímulos a los que se ve sometida en el cuerpo humano.

Para continuar con este trabajo se propone elaborar un modelo más exacto, en el que no se tengan en cuenta alguna de las suposiciones hechas en este proyecto. La eliminación de dichas suposiciones dotaría al modelo de una mayor correspondencia con la realidad.

La hipótesis más importante que se realizó inicialmente fue la de considerar al núcleo como un conjunto homogéneo. Como se detalló en el primer capítulo, el núcleo está compuesto por unos elementos con propiedades muy distintas, por ejemplo, la corteza aporta una rigidez mucho mayor que la cromatina. Dentro del núcleo se encuentra el nucléolo, componente de tamaño considerable que debe ser tenido en cuenta a la hora de examinar el comportamiento elástico del núcleo. Será así clave la elaboración de un modelo diferente para cada una de las partes del núcleo a fin de reducir las diferencias entre el modelo y la realidad. Realizar cada elemento por separado implica grandes complicaciones computacionales, sin embargo, el principal inconveniente es la falta de referencias experimentales con que las validar el modelo. Se requeriría de un profundo trabajo de investigación para encontrar más datos.

Por otro lado, queda pendiente ratificar el modelo de una forma más amplia. Hasta ahora no se ha analizado en un laboratorio con un AFM el núcleo independiente de una célula HT1080. Si se realizase el ensayo se podría obtener más información con la que contrastar este modelo. A parte de la curva Fuerza-Penetración empleada en este proyecto son muchas las variaciones que se pueden realizar en el ensayo para obtener otros resultados. Por ejemplo, sería interesante modificar la velocidad de penetración de la punta para analizar cómo afecta el carácter viscoelástico del núcleo a la curva.

Una vez se cuente con un modelo más completo y preciso, sería de gran utilidad modificar las propiedades de la célula y comprobar cómo se ve afectado su comportamiento elástico. Se podría analizar con un AFM la misma célula tumoral con una variedad de patologías distintas o sometida a distintos tratamientos. Esto daría indicaciones de cómo tratar una célula para favorecer o dificultar la migración celular y, por consiguiente, la metástasis del cáncer. Como en este caso se trata de una célula cancerosa sería primordial rigidizarla para dificultar su paso a través de los tejidos corporales.

7 REFERENCIAS

- [1]. **Guilak, F., J. R. Tedrow, and R. Burgkart.** Viscoelastic properties of the cell nucleus. 269:781–786. 2000.
- [2]. **Hans-Juergen Butt a, Brunero Cappella b, Michael Kappl. Force.** Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications.
- [3]. **Hochmuth., Robert M.** Micropipette aspiration of living cells.
- [4]. **K. N. Dahl, A. J. Engler, J. D. Pajerowski and D. E. Discher.** Power-Law Rheology of Isolated Nuclei with deformation mapping of nuclear substructures. 2005.
- [5]. **Marina Krause, Joost te Riet and Katarina Wolf.** Probing the compressibility of tumor cell nuclei by combined atomic force-confocal microscopy. 2013.
- [6]. **Pajerowski, J. D., K. N. Dahl, D. E. Discher.** Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. 2007.
- [7]. **Cao X, Moendarbary E, Isermann P, Davidson PM, Wang X, Chen MB, Burkart AK, Lammerding J, Kamm RD, Shenoy VB.** A chemomechanical model for nuclear morphology and stresses during cell transendothelial migration. 2016.
- [8]. **Gernot Guigas, Claudia Kalla, and Matthias Weiss.** Probing the Nanoscale Viscoelasticity of Intracellular Fluids in Living Cells.
- [9]. **Charras G, Sahai E.** Physical influences of the extracellular environment on cell migration.
- [10]. **Holzappel, Gerhard A.** Nonlinear solid mechanics: A continuum approach for engineering.
- [11]. **David C. Lin, David I. Shreiber, Emiliós K. Dimitriadis, Ferenc Horkay.** Spherical indentation of soft matter beyond the Hertzian regime: numerical and experimental validation of hyperelastic models.
- [12]. **Dimitriadis EK1, Horkay F, Maresca J, Kachar B, Chadwick RS.** Determination of Elastic Moduli of Thin Layers of Soft Material Using the Atomic Force Microscope.
- [13]. **ABAQUS/CAE.** User's Guide (6.14).
- [14]. **Paris Carballo, Federico.** Teoría de la elasticidad.