



El rol del calcio en la polarización de las células migrantes

Máximo Xavier Ibañez

TESIS DE LICENCIATURA EN CIENCIAS FÍSICAS

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES - FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES - ARGENTINA

OCTUBRE DE 2023

- TEMA: El rol del calcio en la polarización de las células migrantes
- ALUMNO: Máximo Xavier Ibañez
- LUGAR DE TRABAJO: Departamento de Física, FCEN-UBA
- DIRECTORA DEL TRABAJO: Silvina Ponce Dawson
- FECHA DE INICIACIÓN: 20/03/2022
- FECHA DE FINALIZACIÓN: 31/10/2023
- FECHA DE EXAMEN: 7/12/2023
- INFORME FINAL APROBADO POR:

Autor: Máximo Xavier Ibañez

Jurado: Alejandra Ventura

Director: Silvina Ponce Dawson

Jurado: Hernán Grecco

Profesor de Tesis de Licenciatura:
Silvina Ponce Dawson

Jurado: Diego Shalom

A Rosario.

Resumen

La migración celular es un proceso fundamental para el mantenimiento de la vida. Controla la morfogénesis, está involucrada en la inflamación y en la reparación de tejidos y, si se desregula, es causa de numerosas enfermedades. Constituye, por otro lado, un proceso paradigmático donde estudiar el modo en que las células interactúan con el medio que las rodea. Para que una célula pueda migrar en una dirección debe estar “polarizada”. Esto significa que el frente (el lado hacia el que se desplaza) es distinto de la parte posterior. Se ha observado en distintos tipos de células migrantes que existe un gradiente de calcio intracelular creciente hacia la parte posterior. El presente trabajo busca contribuir a comprender cómo es posible mantener un gradiente basal de calcio, en particular, determinar la influencia relativa de la geometría de la célula y de la distribución espacialmente inhomogénea de los mecanismos de remoción del calcio en el “tamaño” del gradiente. Para tal fin, se hicieron simulaciones numéricas simplificadas, en dos dimensiones espaciales, de ecuaciones que modelan la dinámica del calcio citosólico usando distintas geometrías y distintas distribuciones espaciales de los mecanismos de remoción. Se concluyó que el modelo reproduce resultados experimentales. También muestra que la variación en la geometría de la región de integración modifica la magnitud del gradiente, tendiendo a cero a medida que la polarización desaparece. Por último, no fue posible dilucidar entre las dos distribuciones de mecanismos de remoción estudiados siendo necesario a futuro extender la región de integración a tres dimensiones.

Palabras clave: migración celular, polarización celular, calcio, modelado.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi mamá y a mi papá por haberme incentivado y apoyado a estudiar una carrera universitaria durante todos estos años, incluso cuando cambié de carrera para estudiar física tras varios años de estudiar bioquímica. Ellos con sus acciones, actitudes y ayuda me facilitaron enormemente la vida permitiéndome lograr mi sueño de ser físico. A mi pareja y compañera de vida, quien estuvo siempre a mi lado, desde mucho antes de adentrarme en el mundo de la física y espero que lo siga haciendo también en el futuro. A mis hermanos que me alentaron cuando se presentaban dificultades y frustraciones típicas de cualquier estudiante. A mi abuela que en infinidad de veces, más de las que puedo enumerar, me esperaba con la comida hecha para llegar a tiempo a la facultad al salir del trabajo. A mis tíos que siempre se preocuparon por mí. A mis amigos que siempre estuvieron presentes. A mis compañeros de la facultad con quienes compartimos horas de estudio, debates, laboratorios. A mis compañeros de trabajo que siempre me alentaron a estudiar desde que empecé la carrera. Al Estado argentino quien brinda educación universitaria gratuita y de calidad sin importar origen, etnia, religión, orientación sexual y condición socio-económica. A todos los profesores, jefes de trabajos prácticos y ayudantes de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, quienes se esfuerzan día a día para brindar una educación de excelencia. Al personal no docente. Y en particular a mi directora, la Prof. Dra. Silvina Ponce Dawson, quien en sus clases de Biofísica despertó fuertemente mi interés en las simulaciones numéricas, quien me aceptó como uno de sus tesisistas, quien me instruyó en cada paso, no solo con sus vastos conocimientos y capacidades sino que también con mucha paciencia y gran calidez humana, por lo cual le estoy profundamente agradecido.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Migración celular	1
1.2. Rol del calcio	2
1.3. Ecuaciones de reacción-difusión	5
1.3.1. Difusión	6
1.3.2. Cinética de acción de masas	8
2. Modelado matemático y relación con el sistema real	10
2.1. Variables y ecuaciones dinámicas	10
2.1.1. Condiciones iniciales, de contorno y cantidades conservadas	11
2.2. Geometría de las células polarizadas	13
2.2.1. Estimación de la relación área-volumen a partir de observaciones	14
2.2.2. El trapecio como modelo de dominio con distintas relaciones locales de “área-volumen”	15
2.3. Métodos numéricos	17
2.3.1. Método de volúmenes finitos	18
2.3.2. Aplicación del método	19
3. Resultados y discusión	26
3.1. Parámetros del modelo	26
3.2. El trapecio como representación de una célula polarizada	29
3.3. La región de la base mayor del trapecio como representación de la zona delantera de la célula polarizada	35

3.3.1. Simulaciones con perímetro y altura constantes	35
3.3.2. Perímetro y área constantes	61
3.4. La región de la base menor del trapecio como representación de la zona de- lantera de la célula polarizada	77
3.4.1. Igual cantidad de bombas sobre los lados del trapecio	77
3.4.2. Mayor cantidad de bombas sobre la base menor del trapecio	91
3.5. Comparación de los gradientes obtenidos dependiendo de las distintas geometrías	100
3.6. Comparación con observaciones experimentales	105
4. Conclusiones	108
Bibliografía	110
A. Código fuente para la simulación de trapecios	113

Índice de figuras

1.1. Esquema del ciclo de migración celular. (A) Formación del lamelipodio. (B) Adhesión de la protuberancia a la matriz celular. (C) Avance del cuerpo de la célula. (D) Liberación de celula. Fuente: Basado en Mousavi, S. J., & Doweidar, M. H. (2019) [16].	2
1.2. Imágenes pseudocoloreadas de $[Ca^{2+}]$ y del camino recorrido por un eosinófilo en respuesta a una solución de suero de tritón, medido con Fura-2 para el Ca^{2+} y microscopía de contraste de fases para la morfología de la célula. El gradiente de concentración decreciente de atrás hacia adelante en la dirección de movimiento de la célula fue consistentemente observado mientras ésta migraba en línea recta. Fuente: R.A. Brundage <i>et al.</i> (1991) [6].	5
1.3. Flujos a través de las caras normales al eje x de un ortoedro. Fuente: Howard C. Berg (1983) [4].	8
2.1. Imágenes de mioblastos polarizados. Fuente: G. Allsop & M. Peckham (2011) [1]	15
2.2. Mitad superior e inferior de un trapecio isósceles.	17
2.3. Malla del dominio trapezoidal. Distintos tipos de celdas son identificadas por colores.	20
2.4. Conjunto arbitrario de celdas vecinas rectangulares. Las flechas en rojo esquematizan los flujos de Ca^{2+} . Por simplicidad no se representan los flujos de CaB	22
2.5. Celda triangular arbitraria y sus celdas vecinas.	25
3.1. Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.	31

3.2. Mapa de color de la concentración del complejo CaB en la última iteración temporal.	32
3.3. Concentración de calcio libre en función de la posición en el eje paralelo al flujo.	32
3.4. Concentración del complejo CaB en función de la posición en el eje paralelo al flujo.	33
3.5. Concentración de calcio libre en función de la posición en el eje perpendicular al flujo.	33
3.6. Concentración del complejo móvil en función de la posición en el eje perpendicular al flujo.	34
3.7. Curva de $[Ca^{2+}] + [CaB]D_B/D_C$ en la última iteración temporal en función de la posición en la dirección de los flujos.	34
3.8. Simulación ángulo de 67.3 grados.	41
3.9. Simulación ángulo de 68.9 grados.	43
3.10. Simulación ángulo de 70.6 grados.	45
3.11. Simulación ángulo de 72.2 grados.	47
3.12. Simulación ángulo de 73.8 grados.	49
3.13. Simulación ángulo de 75.4 grados.	51
3.14. Simulación ángulo de 77.0 grados.	53
3.15. Simulación ángulo de 80.0 grados.	55
3.16. Simulación ángulo de 81.5 grados.	57
3.17. Simulación ángulo de 82.9 grados.	59
3.18. Para distintos ángulos se muestra el promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento. Dicha concentración fue normalizada por la concentración de calcio libre inicial.	60
3.19. Para distintos ángulos se muestra el gradiente calculado numéricamente a partir del promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento. Dicho gradiente fue normalizado por la concentración de calcio libre inicial.	60
3.20. Simulación ángulo de 70.1 grados.	65

3.21. Simulación ángulo de 71.6 grados.	67
3.22. Simulación ángulo de 73.6 grados.	69
3.23. Simulación ángulo de 76.1 grados.	71
3.24. Simulación ángulo de 78.9 grados.	73
3.25. Razón entre el valor de calcio libre máximo y la media para cada fila en función de su posición en la dirección de movimiento.	74
3.26. Flujo neto integrado sobre una cara lateral de los trapecios de ambas simulaciones en función del ángulo. Los flujos netos integrados laterales en todas las simulaciones son hacia el interior del recinto. Los valores de flujos neto integrados son idénticos para la otra cara lateral.	75
3.27. Razón entre la cara lateral del trapecio y el lado del cuadrado en azul. Análogo para el rectángulo en rojo.	75
3.28. Para distintos ángulos se muestra el promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento. Dicha concentración fue normalizada por la concentración de calcio libre inicial.	76
3.29. Para distintos ángulos se muestra el gradiente calculado numéricamente a partir del promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento. Dicho gradiente fue normalizado por la concentración de calcio libre inicial.	76
3.30. Simulación ángulo de 68.9 grados.	81
3.31. Simulación ángulo de 70.6 grados.	83
3.32. Simulación ángulo de 73.8 grados.	85
3.33. Simulación ángulo de 77.0 grados.	87
3.34. Simulación ángulo de 81.5 grados.	89
3.35. Para distintos ángulos se muestra el promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento. Dicha concentración fue normalizada por la concentración de calcio libre inicial.	90

3.36. Para distintos ángulos se muestra el gradiente calculado numéricamente a partir del promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento. Dicho gradiente fue normalizado por la concentración de calcio libre inicial.	90
3.37. Simulación con reducción del flujo hacia el exterior de la base mayor y catetos al 85 %.	94
3.38. Simulación con reducción del flujo hacia el exterior de la base mayor y catetos al 90 %.	96
3.39. Simulación con reducción del flujo hacia el exterior de la base mayor y catetos al 95 %.	98
3.40. Promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento para distintos porcentajes de bombas en la base mayor y en los catetos. Dicha concentración fue normalizada por la concentración de calcio libre inicial.	99
3.41. Gradiente calculado numéricamente a partir del promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento para distintos porcentajes de bombas en la base mayor y en los catetos. Dicho gradiente fue normalizado por la concentración de calcio libre inicial.	99
3.42. Simulaciones de la Sección 3.4.1.	102
3.43. Simulaciones de la Sección 3.3.2.	103
3.44. Simulaciones de la Sección 3.3.1.	104
3.45. Concentración experimental normalizada de calcio libre promediada sobre 14 células HUVEC en función de su ubicación a lo largo de la dirección de desplazamiento. Fuente: Feng-Chiao Tsai <i>et al.</i> (2014) [22]	106
3.46. Flujo integrado sobre el perímetro de la parte superior y de la parte inferior para distintos porcentajes de bombas en la base mayor y en los catetos. . . .	107

Índice de tablas

3.1. Parámetros utilizados en las simulaciones tomados de Shuai <i>et al.</i> (2008) [19].	27
3.2. Concentraciones iniciales (uniformes) usadas en las simulaciones y concentración total de Ca^{2+} derivada a partir de la Ec. (2.9) a tiempo 0.	27
3.3. Flujos salientes integrados sobre cada cara de los 10 trapecios de perímetro y altura constantes. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales. . . .	37
3.4. Flujos entrantes integrados sobre cada cara de los 10 trapecios de perímetro y altura constantes. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales. . .	37
3.5. Flujos salientes integrados sobre cara de los 5 trapecios de área y perímetro constantes. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales.	63
3.6. Flujos entrantes integrados sobre cada cara de los 5 trapecios de área y perímetro constantes. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales.	63
3.7. Flujos salientes integrados sobre cada cara de los 5 trapecios de perímetro y altura constantes. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales. . . .	78
3.8. Flujos entrantes integrados sobre cada cara de los 5 trapecios de perímetro y altura constantes. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales. . . .	79
3.9. Flujos salientes integrados sobre cada cara de los 3 trapecios. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales.	92
3.10. Flujos entrantes integrados sobre cada cara de los 3 trapecios. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales.	92

Capítulo 1

Introducción

El estudio de la forma en que los organismos vivos, en general, y las células, en particular, procesan la información del medio que los rodea y actúan en consecuencia es de gran interés. Este procesamiento involucra “sensar” las condiciones del ambiente e inducir cambios en las condiciones internas de la célula en base a la información sensada. Estos cambios típicamente se organizan en “cascadas de señalización” donde un cambio induce otro que induce otro y así hasta generar una “respuesta”. Los cambios se manifiestan en la activación de enzimas, modificaciones en la concentración y/o distribución espacial de sustancias mensajeras, cambios en la expresión génica y eventualmente cambios en la estructura y/o forma de la célula. En este contexto, un proceso de gran relevancia fisiológica es la migración celular y en particular el rol del calcio sobre ésta.

1.1. Migración celular

La migración celular es un proceso esencial no solo para el desarrollo embrionario sino también para el resto de la vida de los organismos pluricelulares. La correcta migración de células es fundamental en procesos tales como el desarrollo del sistema nervioso durante la embriogénesis, la generación de la respuesta inmune, la reparación de heridas y la homeostasis tisular[20]. Es por ello que la desregulación de la migración celular puede llevar a distintas afecciones y patologías incluyendo el cáncer y las metástasis [20, 18, 10].

Las células migrantes deben adquirir una asimetría espacial que les permita convertir

las fuerzas generadas intracelularmente en movimiento de traslación. Esta polarización morfológica presenta una clara distinción entre las partes trasera y delantera de la célula en la dirección de movimiento [12]. La migración celular puede considerarse un proceso cíclico [18, 10]. Brevemente, una señal promueve la polarización y la extensión de protuberancias en la dirección de movimiento. Estas protuberancias suelen ser lamelipodios, con forma de láminas grandes y anchas, o filopodios, con forma de espigas, las cuales se estabilizan adhiriéndose a la matriz extracelular o a células adyacentes. Estas adherencias sirven como sitios de tracción que permiten a la célula avanzar sobre ellos y generan señales que regulan la dinámica de la adhesión y la protrusión. Por último, el desarme de las adhesiones en la parte trasera de la célula permiten que ésta se libere y el ciclo se reinicie para un siguiente paso. Este ciclo se esquematiza en la figura 1.1.

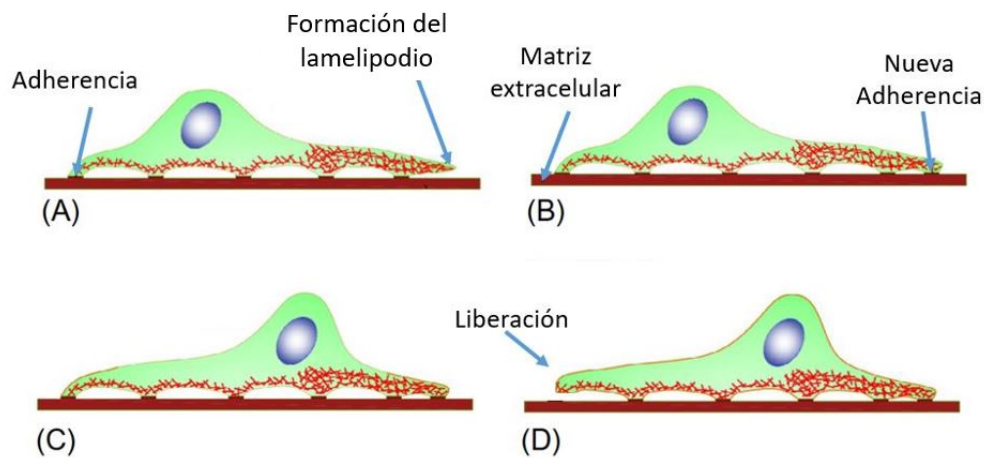


Figura 1.1: Esquema del ciclo de migración celular. (A) Formación del lamelipodio. (B) Adhesión de la protuberancia a la matriz celular. (C) Avance del cuerpo de la célula. (D) Liberación de la célula. Fuente: Basado en Mousavi, S. J., & Doweidar, M. H. (2019) [16].

1.2. Rol del calcio

Evolutivamente el calcio (Ca^{2+}) se convirtió en un transmisor universal de señales, muy probablemente debido a sus propiedades químicas únicas de coordinación que le permiten unirse en forma reversible a proteínas muy específicas, incluso en presencia de otros cationes [7]. Las señales de Ca^{2+} regulan actividades fundamentales para la vida como la

expresión de genes, la contracción de músculos, procesos de motilidad varios y numerosas vías metabólicas [5]. Altas concentraciones prolongadas de Ca^{2+} libre en el citosol son tóxicas. En particular, pueden desencadenar la muerte celular por apoptosis o necrosis [11]. Por otro lado, en general, los transmisores de señales dentro de la célula deben encontrarse en niveles basales muy bajos a fin de evitar gastos energéticos prohibitivos para modular su concentración, lo cual es absolutamente necesario para poder cumplir correctamente con su función de señalización [7].

En los vertebrados, la mayor parte del Ca^{2+} se almacena en los huesos desde donde es liberado, en respuesta a señales hormonales, al espacio extracelular mientras que bombas e intercambiadores activos mantienen la concentración citosólica baja, permitiendo a la célula elevar su concentración rápidamente a través de la apertura de canales de Ca^{2+} durante los procesos de señalización [11]. Dentro de las células, el Ca^{2+} forma complejos con dos grandes clases de proteínas, las solubles en el citoplasma y las que no, por ejemplo las organizadas en estructuras como el citoesqueleto. Estas proteínas llamadas genéricamente *buffers* modifican la concentración de Ca^{2+} libre sin alterar la concentración total de Ca^{2+} dentro del citosol y además varias de ellas participan en procesos de señalización [7].

Tsai *et al.* (2015) [21] realizaron un exhaustivo trabajo de revisión sobre la reorganización del citoesqueleto durante la migración celular. En dicho trabajo se destaca que, para llevarse correctamente a cabo el ciclo descrito en 1.1 es necesario que las proteínas de actina y miosina, los componentes estructurales de la célula, sean reguladas en forma cíclica. La actividad de la actina está gobernada por pequeñas GTPasas y la quinasa A, las cuales permiten la correcta formación de las protrusiones en el frente de la célula. En el caso de la miosina, pequeñas señales locales de Ca^{2+} en la parte delantera de la célula activan la quinasa MLCK (quinasa de la miosina de cadena ligera) que fosforila la miosina II permitiendo el desplazamiento relativo de la actina dando lugar así a la correcta retracción y adhesión de la célula.

El trabajo de Tsai *et al.* (2015) analiza también los mecanismos que permiten mantener un nivel basal bajo de la concentración libre de Ca^{2+} intracelular. En particular, destacan la presencia de dos tipos de bombas (ATPasas) de Ca^{2+} : la bomba de retículo sarcoplasmático (SERCA), la cual bombea Ca^{2+} del citosol al retículo endoplasmático, y la bomba

de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) la cual bombea Ca^{2+} hacia el espacio extracelular, en ambos casos usando la energía contenida en el ATP para hacerlo. Ahora bien, en experimentos donde se estudió el desplazamiento de eosinófilos se observó la existencia de un pequeño gradiente de Ca^{2+} citosólico basal con una concentración menor en la parte delantera de las células (ver figura 1.2) [6]. La existencia de este tipo de gradientes ha sido observada también en otros tipos celulares [23, 9]. Estudios con inhibidores de SERCA muestran que ésta no contribuye al gradiente de Ca^{2+} basal en células migrantes, mientras que inhibidores de PMCA reducen tanto el gradiente como la movilidad de la célula [21]. La evidencia experimental indica también que la tasa de bombeo es significativamente mayor en la zona delantera respecto de la trasera. Esto podría deberse a diferencias en la relación área/volumen entre las partes delantera y trasera de la célula, relación que incide sobre la dinámica del Ca^{2+} intracelular [13] o a la presencia de una mayor cantidad de bombas en el frente [22]. En esta Tesis se propuso estudiar el efecto de ambos procesos sobre la formación del gradiente utilizando un modelo sencillo de la dinámica del Ca^{2+} citosólico en distintas geometrías.

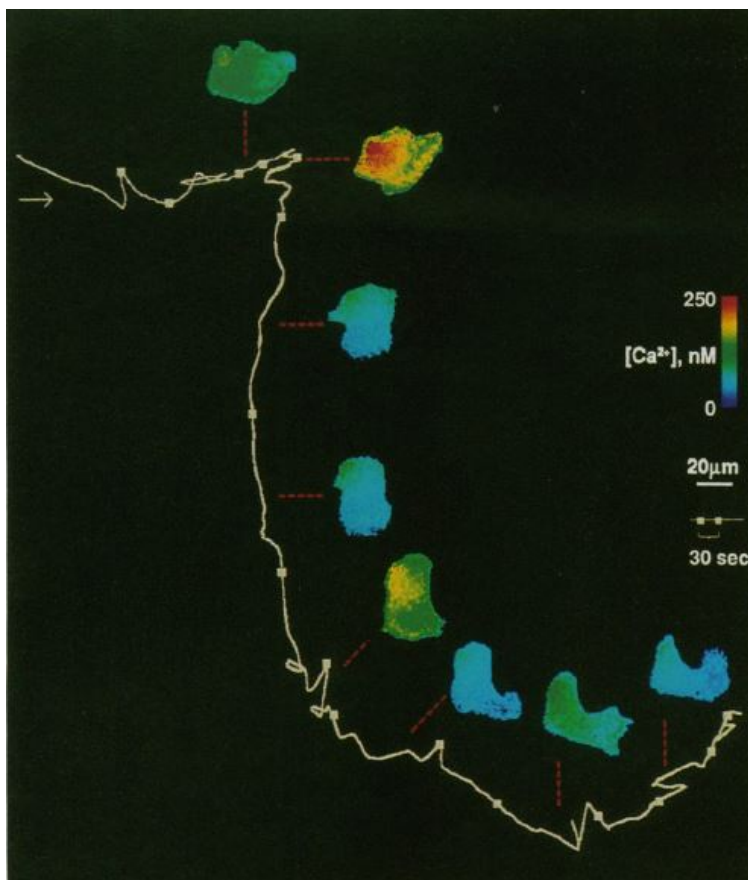


Figura 1.2: Imágenes pseudocoloreadas de $[Ca^{2+}]$ y del camino recorrido por un eosinófilo en respuesta a una solución de suero de tritón, medido con Fura-2 para el Ca^{2+} y microscopía de contraste de fases para la morfología de la célula. El gradiente de concentración decreciente de atrás hacia adelante en la dirección de movimiento de la célula fue consistentemente observado mientras ésta migraba en línea recta. Fuente: R.A. Brundage *et al.* (1991) [6].

1.3. Ecuaciones de reacción-difusión

Para abordar el problema de la formación del gradiente de calcio basal expuesto en la Sección 1.2 es necesario modelar la dinámica de la distribución de Ca^{2+} y sus proteínas *buffers*. Es ampliamente conocido que las moléculas e iones en una solución pueden reaccionar químicamente entre sí para formar otros compuestos y, por lo general, tanto los reactivos como los productos pueden difundir. Las ecuaciones que describen la dinámica de la concentración de estas sustancias debido a ambos procesos son las denominadas ecuaciones de reacción-difusión.

1.3.1. Difusión

La difusión se manifiesta macroscópicamente en un flujo neto de partículas desde regiones donde se encuentran con mayor concentración hacia otras de menor concentración. Las leyes que describen el proceso difusivo pueden derivarse del modelo de caminatas al azar [4]. El movimiento difusivo es característico de las partículas de soluto diluidas en un medio donde las caminatas al azar pueden asociarse a las colisiones que sufren con las moléculas del solvente. Presentamos brevemente esta descripción en lo que sigue y de qué modo se conecta con la ecuación de difusión para la concentración de las partículas de soluto.

Para describir la caminata al azar tenemos en cuenta que la energía cinética asociada a cada dimensión espacial de una partículas de soluto es $k_b T/2$ siendo k_b la constante de Boltzmann y T la temperatura. Por simplicidad, hacemos la descripción suponiendo que las partículas de soluto solo pueden desplazarse a lo largo de un eje (x), tienen masa m y cumplen los siguientes supuestos:

- No se encuentran sometidas a ninguna fuerza externa.
- No interactúan entre sí, es decir, la solución está lo suficientemente diluida.
- En cada paso temporal, de duración τ , cada una de ellas se mueve a la izquierda o la derecha con velocidad constante $\pm v_x$ desplazándose una distancia $\delta = \pm v_x \tau$.
- v_x está dada por la velocidad térmica media, $\langle V_x^2 \rangle^{1/2} = (k_b T/m)^{1/2}$ donde $\langle \rangle$ es el valor medio y V_x es la velocidad instantánea de una partícula.
- La probabilidad de ir a izquierda o derecha en un paso es la misma, $1/2$, y cada paso es independiente del anterior.

Esto determina que el desplazamiento cuadrático medio de una partícula luego de un tiempo t , $\langle \Delta x^2 \rangle(t)$, satisface $\langle \Delta x^2 \rangle(t) = 2Dt$ con $D \equiv \delta^2/2\tau$, el coeficiente de difusión.

Para derivar la ecuación que satisface la concentración de las partículas que realizan la caminata al azar consideramos que, dado el número de partículas, $N(x, t)$, con posición entre x y $x + \delta$ al tiempo t , entonces, al tiempo $t + \tau$, la mitad de estas partículas habrán pasado a la posición $x + \delta$ y la otra mitad a la posición $x - \delta$. Esto sucede para todas las posiciones,

por lo que la variación entre los tiempos t y $t + \tau$ del número de partículas con posición entre x y $x + \delta$ está dada por:

$$N(x, t + \tau) - N(x, t) = \frac{1}{2} (N(x + \delta, t) - N(x, t)) - \frac{1}{2} (N(x, t) - N(x - \delta, t)).$$

Considerando que las partículas se mueven en un medio de área, A , perpendicular a x vemos que esta variación es debida a las partículas entrantes/salientes a través del área A en los bordes de la región de interés (x y $x + \delta$). Podemos entonces definir el flujo de partículas como (ver figura 1.3):

$$J_x = -\frac{1}{2} \frac{N(x) - N(x - \delta)}{A\tau} = -\frac{\delta^2}{2\tau} \left(\frac{N(x)}{A\delta} - \frac{N(x - \delta)}{A\delta} \right) / \delta.$$

Yendo al límite $\delta \rightarrow 0$, esta expresión se reduce a:

$$J_x = -D \frac{\partial C}{\partial x}, \quad (1.1)$$

donde $C(x) = N(x)/(A\delta)$ es la concentración de las partículas y D su coeficiente de difusión (definido anteriormente). Teniendo en cuenta que la variación local en el número de partículas es solo debida a este flujo, la conservación del número de partículas determina que la variación temporal de la concentración está dada por:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\frac{\partial J_x}{\partial x}. \quad (1.2)$$

Reemplazando (1.1) en (1.2) se obtiene la ecuación de difusión en una dimensión espacial:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}. \quad (1.3)$$

Generalizando a más dimensiones, J_x es la componente x del vector \mathbf{J} entonces 1.1 y 1.3 se escriben como

$$\mathbf{J} = -D \nabla C \quad (1.4)$$

donde ∇ es el operador gradiente y

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C \quad (1.5)$$

donde ∇^2 es el operador laplaciano. Las ecuaciones (1.4) y (1.5) son las llamadas leyes de Fick, derivadas por primera vez por el médico y fisiólogo alemán Adolf Eugen Fick a mediados de siglo XIX.

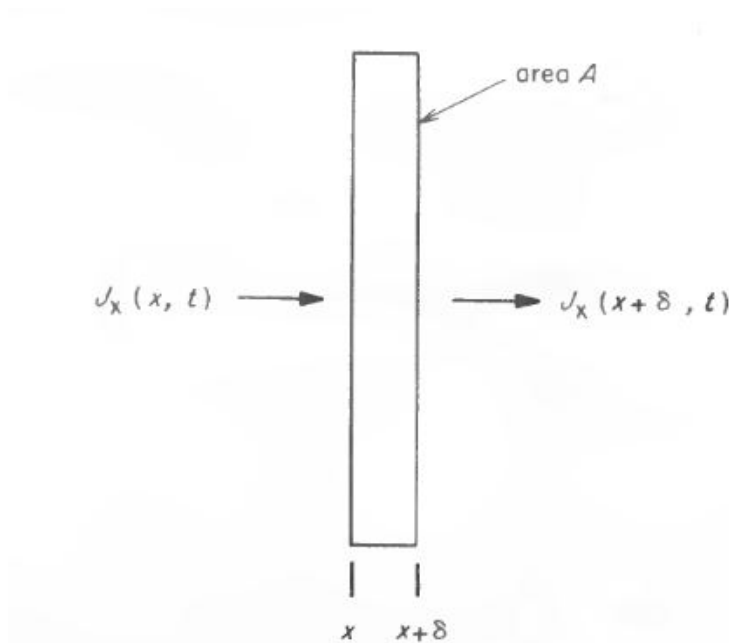


Figura 1.3: Flujos a través de las caras normales al eje x de un ortoedro. Fuente: Howard C. Berg (1983) [4].

1.3.2. Cinética de acción de masas

La velocidad a la que ocurren las reacciones químicas está descrita por la cinética de acción de masas [11]. Supónganse dos reactivos A y B que reaccionan para formar C, dicha reacción se suele denotar como

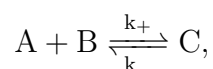


donde la velocidad de esa reacción, es decir la tasa de acumulación de C, $\frac{d[C]}{dt}$ (donde con los corchetes identificamos la concentración), es proporcional al número de colisiones por unidad de tiempo entre los dos reactivos y a la probabilidad de que una colisión sea lo

suficientemente energética como para superar la energía libre de Gibbs de activación de la reacción. Considerando que el número de colisiones por unidad de tiempo es proporcional a las concentraciones de los reactivos e introduciendo una constante de proporcionalidad k , llamada constante de velocidad de la reacción, que depende de la temperatura de la solución y la geometría de los reactivos, se obtiene

$$\frac{d[C]}{dt} = k[A][B].$$

Dado que termodinámicamente la reacción descrita por la ecuación química (1.6) puede darse en ambas direcciones tenemos que



donde A se consume para formar C pero también, en la reacción inversa, se produce al degradarse C, notar que k_- y k_+ poseen distintas unidades. Por lo tanto, la tasa de cambio de la concentración de A resulta

$$\frac{d[A]}{dt} = k_-[C] - k_+[A][B]. \quad (1.7)$$

Esta ecuación debe resolverse en forma acoplada a ecuaciones análogas para $[C]$ y $[B]$. En el caso de que participen más sustancias distintas, la extensión a un mayor número de reactivos es inmediata. En el caso en que las sustancias intervinientes no estén uniformemente distribuidas en el espacio, las concentraciones, $[A]$, $[B]$ y $[C]$ no solo dependerán del tiempo sino también de la coordenada espacial. Si A, por ejemplo, puede difundir, entonces la ecuación que rige la dinámica espacio-temporal de su concentración deriva de la combinación de las ecuaciones (1.5) y (1.7):

$$\frac{\partial[A]}{\partial t} = D_A \nabla^2[A] + k_-[C] - k_+[A][B]. \quad (1.8)$$

la cual es una ecuación de reacción-difusión que debe ser resuelta de forma acoplada a ecuaciones análogas para las concentraciones de B y C.

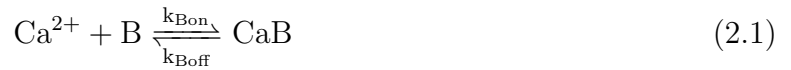
Capítulo 2

Modelado matemático y relación con el sistema real

2.1. Variables y ecuaciones dinámicas

En este trabajo se planteó un modelo para la dinámica del Ca^{2+} citosólico basal en términos de ecuaciones en derivadas parciales que tienen en cuenta la difusión del ion Ca^{2+} , la de un *buffer* difusible (B) y la interacción del Ca^{2+} tanto con este *buffer* como con otro no difusible (Bst) basándose en Piegari *et al.* (2018)[17].

Considerando que los *buffers* poseen un solo sitio de ligadura por molécula para el Ca^{2+} , análogamente a lo expuesto en el apartado 1.3.2, las fórmulas de las reacciones químicas para la formación de los complejos son



y por lo tanto las ecuaciones de reacción difusión resultan

$$\begin{aligned} \frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} = & D_C \nabla^2[\text{Ca}^{2+}] + k_{\text{Boff}}[\text{CaB}] - k_{\text{Bon}}[\text{B}][\text{Ca}^{2+}] \\ & + k_{\text{Bstoff}}[\text{CaBst}] - k_{\text{Bston}}[\text{Bst}][\text{Ca}^{2+}], \end{aligned}$$

$$\frac{\partial[B]}{\partial t} = D_B \nabla^2[B] + k_{Boff}[CaB] - k_{Bon}[B][Ca^{2+}], \quad (2.3)$$

$$\frac{\partial[Bst]}{\partial t} = k_{Bstoff}[CaBst] - k_{Bston}[Bst][Ca^{2+}], \quad (2.4)$$

$$\frac{\partial[CaB]}{\partial t} = D_B \nabla^2[CaB] - k_{Boff}[CaB] + k_{Bon}[B][Ca^{2+}] \quad y \quad (2.5)$$

$$\frac{\partial[CaBst]}{\partial t} = -k_{Bstoff}[CaBst] + k_{Bston}[Bst][Ca^{2+}]. \quad (2.6)$$

donde D_C es el coeficiente de difusión del Ca^{2+} libre y se supone que el coeficiente de difusión del *buffer* difusible, D_B , es igual en su forma libre que en su forma acomplejada, debido a que los *buffers* son moléculas mucho más grandes y masivas que el catión Ca^{2+} [11].

2.1.1. Condiciones iniciales, de contorno y cantidades conservadas

Como es sabido, la solución de las ecuaciones de reacción-difusión depende tanto de las condiciones iniciales como de las condiciones contorno. Por simplicidad, en esta Tesis se consideró un dominio bidimensional. Discutiremos más adelante cómo interpretar los resultados obtenidos en relación a una célula real tridimensional. Debido a que el Ca^{2+} puede ingresar y salir del citosol a través de bombas y canales, como ya se ha comentado en la introducción, en el presente estudio dicho fenómeno fue modelado a partir de las condiciones de frontera. Teniendo en cuenta la evidencia experimental (ver Sec. 1.2), se usó un modelo donde el único intercambio ocurría con el medio extracelular y donde, si bien el flujo local de Ca^{2+} podía variar a lo largo de la frontera, se supuso que el flujo neto a través de todo el contorno era nulo

$$-D_C \nabla[Ca^{2+}](\mathbf{r}, t) \cdot \hat{\mathbf{n}}|_{borde} = J_{out}(\mathbf{r}) - J_{in}(\mathbf{r}), \quad (2.7)$$

$$\int_{borde} d\ell (J_{out}(\mathbf{r}) - J_{in}(\mathbf{r})) = 0, \quad (2.8)$$

donde J_{out} y J_{in} son los flujos saliente y entrante, respectivamente, a lo largo de la dirección normal externa, $\hat{\mathbf{n}}$, al dominio de integración en la posición, \mathbf{r} , del borde y la integral se hace sobre dicho borde que, por tratarse de un dominio bidimensional, corresponde a una

curva cerrada. Como se describió en la Introducción, el Ca^{2+} es removido hacia el medio extracelular por la PMCA, una Ca^{2+} -ATPasa que utiliza la hidrólisis de ATP sacando un ion de Ca^{2+} por ciclo. Esto implica que la tasa de remoción, representada en el modelo por J_{out} , depende de la concentración de Ca^{2+} citosólico libre. En este trabajo, sin embargo, suponemos que J_{out} toma un valor constante independiente de $[\text{Ca}^{2+}]$. Por su parte, el flujo entrante, J_{in} , representa el ingreso de Ca^{2+} a través de varios mecanismos. En condiciones basales se lo suele modelar como un flujo constante y así es como lo hacemos en esta Tesis también.

La Ec. (2.8) implica que la cantidad de Ca^{2+} total en el dominio, tanto libre como ligada a *buffers*, se conserva. Teniendo en cuenta los coeficientes estequiométricos de las reacciones (2.1) y (2.2), la cantidad total de Ca^{2+} en el dominio es proporcional a la que llamaremos concentración total, Ca_{tot} , que por lo antedicho, se mantiene constante en el tiempo y está dada por

$$Ca_{tot} = \frac{1}{A} \int d^2\mathbf{r} ([\text{Ca}^{2+}](\mathbf{r}, t) + [CaB](\mathbf{r}, t) + [CaBst](\mathbf{r}, t)), \quad (2.9)$$

donde A es el área total del dominio de integración. Para los *buffers*, al estar confinados al interior de la célula, las condiciones de contorno son de Neumann (*no flux*),

$$\nabla[CaB](\mathbf{r}, t) \cdot \hat{\mathbf{n}}|_{borde} = 0 = \nabla[CaBst](\mathbf{r}, t) \cdot \hat{\mathbf{n}}|_{borde}, \quad (2.10)$$

lo que implica que la concentración total de cada *buffer* permanece espacialmente uniforme. Esto permite introducir simplificaciones como se describe a continuación.

Si bien el sistema está dado por cinco ecuaciones diferenciales y cinco incógnitas, las cantidades conservadas permiten simplificarlo llevándolo a un sistema de tres ecuaciones diferenciales y tres incógnitas. Sumando (2.4) y (2.6) se obtiene

$$\frac{\partial([Bst] + [CaBst])}{\partial t} = 0,$$

es decir

$$[Bst] + [CaBst] = [Bst_{tot}]$$

donde $[Bst_{tot}]$ es la concentración total (libre más en su forma de complejo) del *buffer* estático, la cual es constante. Sumando las ecuaciones (2.3) y (2.5) resulta que

$$\frac{\partial([B] + [CaB])}{\partial t} = D_B \nabla^2([B] + [CaB]).$$

Por lo tanto, suponiendo que la concentración total de *buffer* móvil, $[B_{tot}] \equiv [B] + [CaB]$, es espacialmente uniforme a tiempo inicial, la solución de esta ecuación, para condiciones de contorno de Neumann, implica que $[B_{tot}]$ permanece uniforme e igual a su valor inicial para todo tiempo [17], es decir

$$[B] + [CaB] = [B_{tot}] = const.$$

Las concentraciones de los *buffers* libres se calculan simplemente restando de la concentración total de cada *buffer*, la concentración de *buffer* ligada a Ca^{2+} en cada punto del espacio.

Finalmente, la dinámica del calcio citosólico queda determinada por el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales en derivadas parciales acopladas entre sí

$$\begin{aligned} \frac{\partial[Ca^{2+}]}{\partial t} &= D_C \nabla^2[Ca^{2+}] + k_{Boff}[CaB] - k_{Bon}([B_{tot}] - [CaB])[Ca^{2+}] \\ &\quad + k_{Bstoff}[CaBst] - k_{Bston}([Bst_{tot}] - [CaBst])[Ca^{2+}], \\ \frac{\partial[CaB]}{\partial t} &= D_B \nabla^2[CaB] - k_{Boff}[CaB] + k_{Bon}([B_{tot}] - [CaB])[Ca^{2+}] \quad y \\ \frac{\partial[CaBst]}{\partial t} &= -k_{Bstoff}[CaBst] + k_{Bston}([Bst_{tot}] - [CaBst])[Ca^{2+}]. \end{aligned} \quad (2.11)$$

2.2. Geometría de las células polarizadas

Las células migrantes tienen una parte delantera de pequeño espesor y relativamente gran superficie y una parte trasera más parecida a una semiesfera. Evidentemente, la relación área-volumen es distinta en ambas regiones. Se observó en otros tipos celulares que distintas relaciones entre el volumen (citosólico) donde se propagan las señales de Ca^{2+} intracelular y la superficie de intercambio con reservorios con alto contenido de Ca^{2+} (*e.g.*, el retículo endoplasmático) dan lugar a dinámicas cualitativamente distintas [13]. La principal

motivación del presente trabajo de Tesis es analizar de qué modo incide la geometría polarizada de las células migrantes en la determinación del gradiente de Ca^{2+} basal observado en las mismas. Más específicamente, nos interesa estudiar cómo influye la distinta relación área-volumen de la parte delantera y trasera de dichas células. Ahora bien, como mencionamos en la Sec. 2.1, en esta Tesis realizamos simulaciones numéricas en dos dimensiones espaciales y las células son tridimensionales. En esta Sección vamos a estimar en cuánto difiere la relación área-volumen entre las zonas delantera y trasera de las células polarizadas y luego discutir cómo podemos interpretar los resultados de simulaciones en dos dimensiones para inferir conclusiones sobre las células reales. Teniendo en cuenta que en situaciones con concentraciones y flujos uniformes la variación de la concentración dentro de un volumen es proporcional al cociente entre el área y el volumen (ver *e.g.* Ec. (3.1) más adelante) esperamos que variaciones “locales” de este cociente tengan incidencia sobre la distribución espacial de la concentración.

2.2.1. Estimación de la relación área-volumen a partir de observaciones

La estimación de la relación volumen-área de la parte trasera y delantera de las células migrantes se realizó a partir de las dimensiones celulares publicadas por G. Allsop & M. Peckham (2011) [1]. En la figura 2.1 se pueden ver imágenes de células de mioblasto, célula precursora de las fibras musculares, donde se aprecia la diferencias en la geometría de la célula comentadas en los apartados 1.1 y 2.2. En esta Tesis aproximamos la parte delantera por un semicilindro de altura $h = 0,2\mu m$ y radio $r = 30\mu m$ y a la trasera por una semiesfera de radio $\rho = 10\mu m$. Dado que,

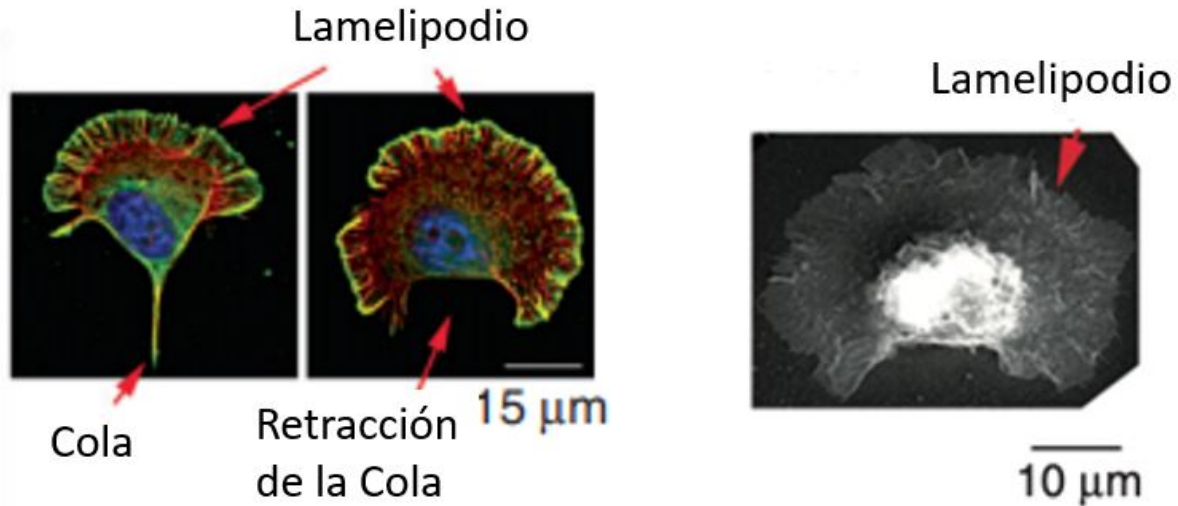
$$\text{Área del semicilindro} = \pi r^2 + \pi hr + 2hr \sim 2858\mu m^2,$$

$$\text{Volumen del semicilindro} = \pi r^2 h/2 \sim 283\mu m^3,$$

$$\text{Área de la semiesfera} = 2\pi\rho^2 + \pi\rho^2 \sim 942\mu m^2 \text{ y}$$

$$\text{Volumen de la semiesfera} = 2\pi\rho^3/3 \sim 2094\mu m^3.$$

Por lo tanto, la relación volumen-área de la parte delantera resulta ser $\sim 0.1 \mu m$ y la relación volumen-área de la parte trasera $\sim 2.2 \mu m$. Luego el cociente entre la relación volumen-área de parte delantera sobre la trasera es de aproximadamente 0,05. Por su parte la relación entre superficies es alrededor de 0,33; es decir que el área total de intercambio con el medio extracelular de la parte delantera resulta mayor que la de la parte trasera.



(a) Células migrantes polarizadas inmunoteñidas para filamentos de actina (rojo) y beta actina (verde). El núcleo se visualiza con tinte fluorescente DAPI (azul).

(b) Imagen obtenida mediante microscopía electrónica.

Figura 2.1: Imágenes de mioblastos polarizados. Fuente: G. Allsop & M. Peckham (2011) [1]

2.2.2. El trapecio como modelo de dominio con distintas relaciones locales de “área-volumen”

En una simulación en dos dimensiones espaciales, el área del dominio corresponde al volumen citosólico de la célula real tridimensional. Por otro lado, la superficie de intercambio con el medio extracelular pasa a ser el perímetro del dominio. Consideremos un trapecio como se muestra en la figura 2.2.2. Partiendo al trapecio por la mitad de su altura obtenemos dos trapecios los cuales etiquetamos como 1 al superior y 2 al inferior. Por lo tanto, en función de la altura h , el ángulo α y la base menor b , las áreas A_i y perímetros P_i de estos trapecios resultan

$$\begin{aligned}
A_1 &= \frac{h^2}{\tan(\alpha)} + bh, \\
P_1 &= 2 \left(b + \frac{h}{\sin(\alpha)} + \frac{h}{\tan(\alpha)} \right), \\
A_2 &= \frac{3h^2}{\tan(\alpha)} + bh \quad \text{y} \\
P_2 &= 2 \left(b + \frac{h}{\sin(\alpha)} + \frac{3h}{\tan(\alpha)} \right).
\end{aligned}$$

Luego

$$\frac{A_1}{P_1} = \frac{h}{2} \frac{1}{1 + \frac{h}{\sin(\alpha)(b + \frac{h}{\tan(\alpha)})}} \quad \text{y} \quad (2.12)$$

$$\frac{A_2}{P_2} = \frac{h}{2} \frac{1}{1 + \frac{h}{\sin(\alpha)(b + \frac{3h}{\tan(\alpha)})}}. \quad (2.13)$$

De estos cálculos concluimos que el cociente entre el área de la mitad “superior” del trapecio de la figura y su correspondiente perímetro es menor que el cociente que se obtiene para la mitad inferior. En este sentido, si asumimos que la relación área/perímetro cumple el rol de la relación volumen/área de la célula, entonces la mitad superior “corresponde” al lamelipodio y la inferior a la parte trasera de la célula. Por otro lado, el perímetro de la mitad superior es menor que el de la inferior. Si hacemos la analogía entre la situación bidimensional y la tridimensional en términos del cociente entre los perímetros (en 2D) o áreas (en 3D) de ambas regiones, la superior correspondería a la parte trasera. En la Sección 3 discutiremos qué tipo de flujos entrante y saliente consideramos en las simulaciones a la luz de estas dos posibles analogías.

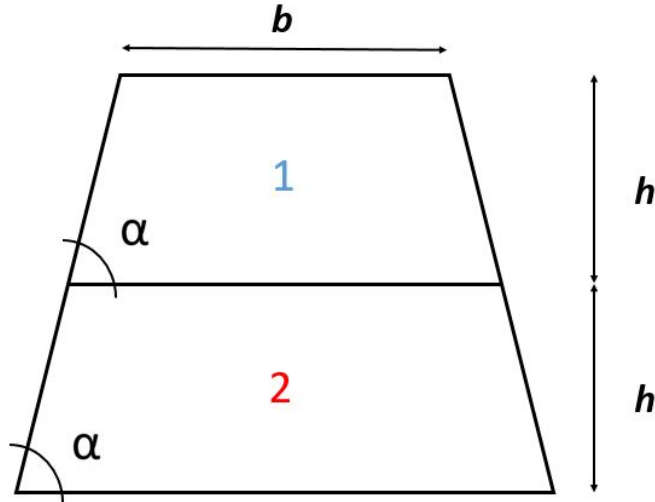


Figura 2.2: Mitad superior e inferior de un trapecio isósceles.

2.3. Métodos numéricos

En infinidad de problemas matemáticos no se conocen o no existen soluciones analíticas cerradas. En particular, el número de métodos para hallar soluciones analíticas de ecuaciones diferenciales en derivadas parciales son limitados, entre los que se pueden mencionar el método de separación de variables, el uso de transformadas de Fourier, de transformadas de Laplace, entre otros. No obstante, estos métodos están restringidos por la geometría del dominio, la linealidad de la ecuación, la necesidad de coeficientes constantes, entre otras restricciones, haciéndolos inaplicables para un gran número de problemas de interés práctico [15]. En estos casos se debe recurrir a técnicas de resolución numérica.

La idea general de los métodos numéricos para resolver ecuaciones diferenciales en derivadas parciales se basa en la reducción de variables continuas a variables discretas y finitas. En general la discretización consiste en la sustitución de un dominio continuo por un patrón, red o malla de puntos discretos, donde en lugar de obtener una solución definida en todas partes del dominio, sólo se obtienen aproximaciones en dichos puntos [2]. Los métodos más usuales son los llamados de diferencias finitas, donde las derivadas parciales de los distintos órdenes de las ecuaciones son aproximadas por cocientes de diferencias finitas que suelen ser derivadas mediante series de Taylor [15]. En esta Tesis inicialmente se resolvió el sistema

(2.11) en un recinto de geometría rectangular y en una corona circular mediante métodos de diferencias finitas. Luego, para poder encontrar las soluciones en un dominio de geometría trapezoidal que permitiera analizar el efecto de tener distintas relaciones área-volumen en distintas regiones del dominio como ocurre en las células polarizadas (ver Sec. 1.1), se optó por utilizar el método de volúmenes finitos. Éste permitió escribir las condiciones de contorno de Neumann sobre los catetos de una forma más sencilla.

2.3.1. Método de volúmenes finitos

El método de volúmenes finitos es un método usado en la discretización de leyes de conservación de mucho interés para distintas áreas de la ciencia y la ingeniería como la mecánica de fluidos, los flujos en medios porosos, la meteorología, el electromagnetismo, los modelos de procesos biológicos, la simulación de semiconductores, entre otras[3]. Este método deriva su nombre del hecho de que las leyes de conservación se satisfacen en pequeños volúmenes de control, también llamados celdas, en lugar de en puntos como sucede en los métodos de diferencias finitas. En general la forma y tamaño de estas celdas, pueden ser arbitrarios, aunque lo usual es que sean polígonos en dos o tres dimensiones que están delimitados por rectas o superficies planas. Por lo cual, si la superficie que delimita un dominio es curva se lo suele aproximar [15]. Una descripción general del método está dada por Robert Eymard *et al.* (2000) [8] la cual se resume brevemente a continuación.

Sea $q(\mathbf{x}, t)$ una cantidad conservada, la cual puede ser energía, número de partículas, carga eléctrica, masa u otra y sea una ley de conservación para cada punto \mathbf{x} y cada tiempo t de la forma

$$\frac{\partial q(\mathbf{x}, t)}{\partial t} + \nabla \cdot \mathbf{F} = f(\mathbf{x}, t). \quad (2.14)$$

donde $\nabla \cdot \mathbf{F} = \frac{\partial F_1}{\partial x_1} + \frac{\partial F_2}{\partial x_2} + \frac{\partial F_3}{\partial x_3}$ es la divergencia de $\mathbf{F} = (F_1(\mathbf{x}, t), F_2(\mathbf{x}, t), F_3(\mathbf{x}, t))$. La función vectorial \mathbf{F} es un flujo que representa un mecanismo de transporte de $q(\mathbf{x}, t)$ y por su parte $f(\mathbf{x}, t)$ es un término de fuente de $q(\mathbf{x}, t)$, debido por ejemplo a reacciones químicas como las del apartado 1.3.2. Este problema puede resolverse introduciendo relaciones constitutivas entre \mathbf{F} , $q(\mathbf{x}, t)$ y $f(\mathbf{x}, t)$ a través de una dada función escalar o vectorial $u(\mathbf{x}, t)$ como la presión, la fracción molar, etc. Incluso es posible, y es lo que ocurre en el presente trabajo,

que $u(\mathbf{x}, t) = q(\mathbf{x}, t)$ y $\mathbf{F} = -D\nabla q(\mathbf{x}, t)$, donde D es una constante.

La discretización temporal de la ecuación (2.14) se logra a través de una sucesión finita y creciente de tiempos $(t_n)_{n \in \mathbb{N}}$ con $t_0 = 0$ y un paso temporal τ tal que $t_n = \tau n$, donde la derivada temporal de q se puede reemplazar mediante algún método de diferencias finitas. Utilizando el método explícito de Euler la derivada se reemplaza por $(q^{(n+1)}(\mathbf{x}) - q^{(n)}(\mathbf{x}))/\tau$, donde $q^{(n)}(\mathbf{x})$ es una aproximación de $q(\mathbf{x}, t_n)$, y el resto de los términos de la ecuación se reemplazan por aproximaciones de las correspondientes funciones al tiempo t_n , $f^{(n)}(\mathbf{x}) = f(\mathbf{x}, t_n)$ y $\mathbf{F}^{(n)}(\mathbf{x}) = \mathbf{F}(\mathbf{x}, t_n)$. Respecto a la discretización espacial, como ya se ha anticipado al comienzo de este apartado, para realizarla debe introducirse una malla Γ que represente al dominio. La misma se conforma por la unión de un conjunto finito de volúmenes de control, los cuales no se solapan, cuyo objetivo es obtener la ley de conservación (2.14) en su forma integral para cada celda. Por lo tanto, a través de dicha discretización temporal y utilizando el teorema de Gauss, para un volumen arbitrario K se obtiene que

$$\iiint_K \frac{q^{(n+1)}(\mathbf{x}) - q^{(n)}(\mathbf{x})}{\tau} dV + \iint_{\partial K} \mathbf{F}^{(n)}(\mathbf{x}) \cdot \mathbf{n}_K(\mathbf{x}) dS(\mathbf{x}) - \iiint_K f^{(n)}(\mathbf{x}) dV = 0,$$

donde $\mathbf{n}_K(\mathbf{x})$ es el versor normal exterior a la superficie ∂K . Para calcular la integral sobre ∂K se consideran las celdas contiguas a K . Tomemos una de estas celdas, L . El flujo desde el volumen K hacia L durante un intervalo $[t_n, t_{n+1})$ a través de la superficie que los separa se aproxima por una cantidad $F_{K,L}^{(n)}$. Por lo tanto, para la celda L el flujo desde L a K debe ser $F_{L,K}^{(n)} = -F_{K,L}^{(n)}$ lo cual debe cumplirse para todo $K, L \in \Gamma$ y n . En los bordes del dominio se reemplazan estos flujos entre celdas contiguas por flujos adecuados a las condiciones de contorno consideradas. Por último, las integrales deben calcularse por algún método numérico.

2.3.2. Aplicación del método

Considérese como dominio un trapecio el cual simula una célula polarizada en un plano paralelo al sustrato por donde se desplaza. Para la construcción de la malla correspondiente a dicho dominio se utilizaron celdas de dos tipos de geometría, celdas rectangulares y triangulares. En este caso, los flujos entre celdas no solo dependen de la forma geométrica de la

celda en cuestión sino también de su posición dentro de la malla. En particular, depende de la geometría de sus vecinas y de si alguno de los segmentos que la definen pertenece o no al contorno de la malla. Los distintos tipos de celdas se identifican con distintos colores en la figura 2.3. Asimismo, a cada una de las celdas, independientemente de su tipo, se la etiqueta con un par de subíndices (i, j) según su posición en el eje horizontal y vertical de la malla, respectivamente.

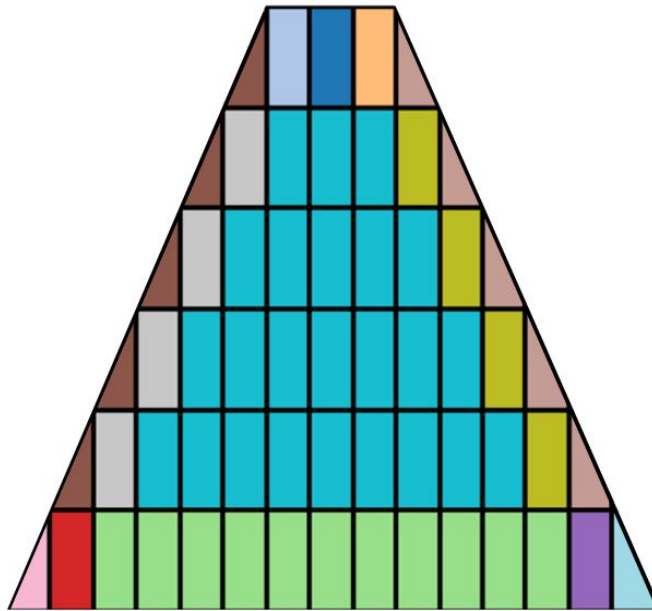


Figura 2.3: Malla del dominio trapezoidal. Distintos tipos de celdas son identificadas por colores.

Sea una celda rectangular color turquesa arbitraria de la figura 2.3, la cual está ubicada en la posición (i, j) y cuya base tiene longitud dx y altura dy . Entonces, la distancia entre los centroides de las celdas $(i - 1, j)$ e (i, j) es dx , mientras que la distancia entre los centroides de las celdas (i, j) e $(i, j + 1)$ es dy , ver figura 2.4. Se supone que el área de la celda es lo suficientemente pequeña como para que, a un dado tiempo, la concentración de cada una de las especies dentro de ella se pueda suponer uniforme. Entonces, aplicando el método de

volúmenes finitos al sistema (2.11) se obtienen las siguientes de ecuaciones:

$$\begin{aligned}
& \left(\frac{[Ca^{2+}]_{(i,j)}^{(n+1)} - [Ca^{2+}]_{(i,j)}^{(n)}}{\tau} \right) dx dy = dy f_{C(i-1,j)} - dy f_{C(i,j)} \\
& \quad + dx g_{C(i,j-1)} - dx g_{C(i,j)} + Q_{C(i,j)}^{(n)} dx dy, \\
& \left(\frac{[CaB]_{(i,j)}^{(n+1)} - [CaB]_{(i,j)}^{(n)}}{\tau} \right) dx dy = dy f_{CB(i-1,j)} - dy f_{CB(i,j)} \\
& \quad + dx g_{CB(i,j-1)} - dx g_{CB(i,j)} + Q_{BC(i,j)}^{(n)} dx dy \quad y \\
& \left(\frac{[CaBst]_{(i,j)}^{(n+1)} - [CaBst]_{(i,j)}^{(n)}}{\tau} \right) dx dy = Q_{CBst(i,j)}^{(n)} dx dy. \tag{2.15}
\end{aligned}$$

En estas ecuaciones, las cantidades

$$\begin{aligned}
f_{C(i,j)} &= -D_C \frac{[Ca^{2+}]_{(i+1,j)}^{(n)} - [Ca^{2+}]_{(i,j)}^{(n)}}{dx}, \\
g_{C(i,j)} &= -D_C \frac{[Ca^{2+}]_{(i,j+1)}^{(n)} - [Ca^{2+}]_{(i,j)}^{(n)}}{dy}, \\
f_{CB(i,j)} &= -D_B \frac{[CaB]_{(i+1,j)}^{(n)} - [CaB]_{(i,j)}^{(n)}}{dx} \quad y \\
g_{CB(i,j)} &= -D_B \frac{[CaB]_{(i,j+1)}^{(n)} - [CaB]_{(i,j)}^{(n)}}{dy},
\end{aligned}$$

son los flujos, $F^{(n)}$, entre celdas contiguas descritos en el apartado 2.3.1, ver figura 2.4. Por otro lado, los términos:

$$\begin{aligned}
Q_{C(i,j)}^{(n)} &= k_{Boff} [CaB]_{(i,j)}^{(n)} - k_{Bon} \left(B_{tot} - [CaB]_{(i,j)}^{(n)} \right) [Ca^{2+}]_{(i,j)}^{(n)} \\
&+ k_{Bstoff} [CaBst]_{(i,j)}^{(n)} - k_{Bston} \left(Bst_{tot} - [CaBst]_{(i,j)}^{(n)} \right) [Ca^{2+}]_{(i,j)}^{(n)}, \tag{2.16}
\end{aligned}$$

$$Q_{BC(i,j)}^{(n)} = -k_{Boff} [CaB]_{(i,j)}^{(n)} + k_{Bon} \left(B_{tot} - [CaB]_{(i,j)}^{(n)} \right) [Ca^{2+}]_{(i,j)}^{(n)} \quad y \tag{2.17}$$

$$Q_{BCst(i,j)}^{(n)} = -k_{Bstof} [CaBst]_{(i,j)}^{(n)} + k_{Bston} \left(Bst_{tot} - [CaBst]_{(i,j)}^{(n)} \right) [Ca^{2+}]_{(i,j)}^{(n)}, \quad (2.18)$$

describen a las reacciones químicas.

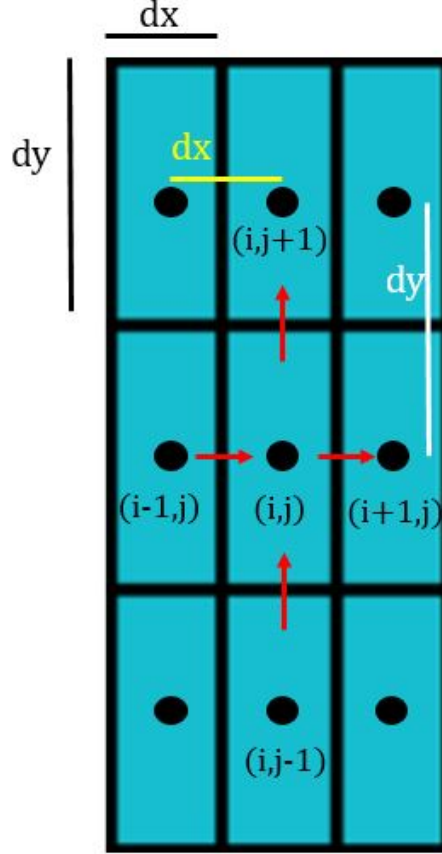


Figura 2.4: Conjunto arbitrario de celdas vecinas rectangulares. Las flechas en rojo esquematizan los flujos de Ca^{2+} . Por simplicidad no se representan los flujos de CaB .

Por otro lado, considérese algún triángulo marrón de la figura 2.3 de área $dx dy/2$. Aplicando nuevamente el método de volúmenes finitos el sistema se discretiza como

$$\left(\frac{[Ca^{2+}]_{(i,j)}^{(n+1)} - [Ca^{2+}]_{(i,j)}^{(n)}}{\tau} \right) dx dy/2 = -dy \tilde{f}_{C(i,j)} + dx \tilde{g}_{C(i,j-1)} + (J_{in} - J_{out}) \sqrt{dx^2 + dy^2} + Q_{C(i,j)}^{(n)} dx dy/2,$$

$$\begin{aligned}
& \left(\frac{[CaB]_{(i,j)}^{(n+1)} - [CaB]_{(i,j)}^{(n)}}{\tau} \right) dx dy / 2 = -dy \tilde{f}_{CB(i,j)} \\
& + dx \tilde{g}_{CB(i,j-1)} + Q_{BC(i,j)}^{(n)} dx dy / 2 \quad y \\
& \left(\frac{[CaBst]_{(i,j)}^{(n+1)} - [CaBst]_{(i,j)}^{(n)}}{\tau} \right) dx dy / 2 = Q_{CBst(i,j)}^{(n)} dx dy / 2, \tag{2.19}
\end{aligned}$$

donde los términos $Q_{C(i,j)}^{(n)}$, $Q_{BC(i,j)}^{(n)}$ y $Q_{CBst(i,j)}^{(n)}$, al igual que para el sistema (2.15), están dados respectivamente por (2.16), (2.17) y (2.18). Sin embargo, los flujos hacia/desde otras celdas del dominio de integración no son iguales a los anteriores debido a la posición del centroide de la celda triangular, como se puede apreciar en la figura 2.5b. Para poder describir estos flujos se introducen el versor $\hat{\mathbf{d}}$, orientado desde el centroide de (i, j) hacia el centroide de $(i, j - 1)$, y el versor $\hat{\mathbf{I}}$, orientado desde el centroide de (i, j) hacia el centroide de $(i + 1, j)$. Considerando los versores, $\hat{\mathbf{n}}_v$ y $\hat{\mathbf{n}}_h$, exteriores y perpendiculares al cateto vertical y horizontal del triángulo (i, j) , respectivamente, el flujo de Ca^{2+} (a través del cateto vertical) entre las celdas (i, j) e $(i + 1, j)$ resulta

$$\begin{aligned}
\tilde{f}_{C(i,j)} &= \frac{-D_C}{l} \left([Ca^{2+}]_{(i+1,j)}^{(n)} - [Ca^{2+}]_{(i,j)}^{(n)} \right) \hat{\mathbf{I}} \cdot \hat{\mathbf{n}}_v = \\
& \frac{-D_C}{l} \left([Ca^{2+}]_{(i+1,j)}^{(n)} - [Ca^{2+}]_{(i,j)}^{(n)} \right) \frac{5dx}{6l} = f_{C(i,j)} \frac{5dx^2}{6l^2},
\end{aligned}$$

donde l es la distancia entre los centroides de ambas celdas:

$$l = \frac{1}{6} \sqrt{25dx^2 + dy^2},$$

ver figura 2.5a. Análogamente, el flujo (a través del cateto horizontal) entre las celdas $(i, j - 1)$ e (i, j) es

$$\begin{aligned}
\tilde{g}_{C(i,j)} &= \frac{-D_C}{d} \left([Ca^{2+}]_{(i+1,j)}^{(n)} - [Ca^{2+}]_{(i,j)}^{(n)} \right) \hat{\mathbf{d}} \cdot \hat{\mathbf{n}}_h = \\
& \frac{-D_C}{d} \left([Ca^{2+}]_{(i,j+1)}^{(n)} - [Ca^{2+}]_{(i,j)}^{(n)} \right) \frac{5dy}{6d} = g_{C(i,j)} \frac{5dy^2}{6d^2},
\end{aligned}$$

siendo

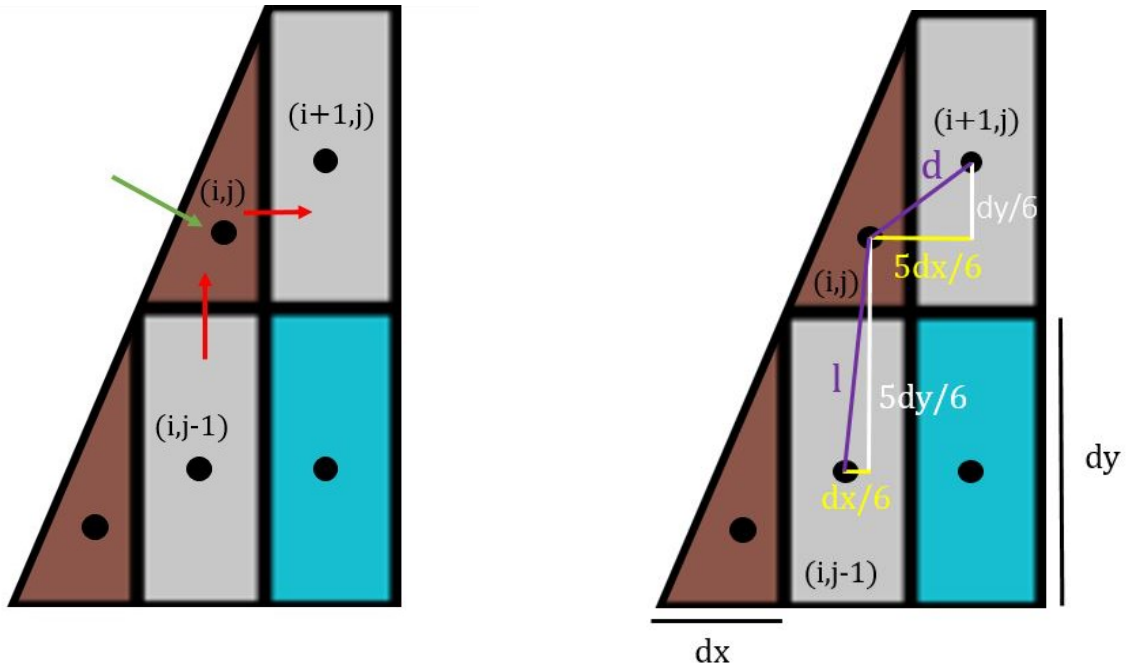
$$d = \frac{1}{6} \sqrt{dx^2 + 25dy^2}.$$

Análogamente para los flujos de CaB se obtienen

$$\tilde{f}_{CB(i,j)} = f_{CB(i,j)} \frac{5dx^2}{6l^2} \quad y$$

$$\tilde{g}_{CB(i,j)} = -g_{CB(i,j)} \frac{5dy^2}{6d^2}.$$

Debido a que la hipotenusa forma parte del contorno del dominio, el flujo a través de ella va a estar dado por las condiciones de contorno, ver figura 2.5b. La dirección del flujo a través de ese segmento de longitud $\sqrt{dx^2 + dy^2}$, es decir si el $[Ca^{2+}]$ ingresa o abandona la celda, está determinado por la diferencia de las cantidades J_{in} y J_{out} , como se puede ver en la primera ecuación del sistema (2.19). En las ecuaciones para los *buffers* no se incluyen términos de flujo a través de la hipotenusa, debido a que las condiciones de contorno son *no flux*.



(a) Las flechas en rojo esquematizan los flujos de $[Ca^{2+}]$ entre celdas. La flecha verde representa el flujo de $[Ca^{2+}]$ dado por las condiciones de contorno.

(b) Distancias del centroide de un triángulo marrón arbitrario respecto a los centroides de sus celdas vecinas.

Figura 2.5: Celda triangular arbitraria y sus celdas vecinas.

Es importante destacar que los sistemas discretizados que rigen el comportamiento del Ca^{2+} y sus *buffers* en el resto de los tipos de celdas se derivan de forma completamente análoga a los dos casos presentados. Por tal motivo, no se detallan en el presente apartado.

Capítulo 3

Resultados y discusión

En esta Sección describimos los resultados de resolver numéricamente las Ecs. (2.11) en dominios trapezoidales de distintos tamaños, usando las condiciones de contorno de Neumann con distintas distribuciones espaciales del flujo neto de Ca^{2+} a través del borde. Más específicamente, se simuló los sistemas discretizados de la Sección 2.3.2 para lo que se escribió el código en lenguaje Python que se muestra en el apéndice A.

3.1. Parámetros del modelo

Los valores de los coeficientes de difusión, concentraciones totales de *buffers*, constantes de velocidad de reacción y constantes de velocidad de disociación del presente trabajo son expuestos en la tabla 3.1. Dichos parámetros fueron utilizados por [19] en su modelo de dinámica del calcio citosólico. Aunque estamos resolviendo las ecuaciones en dos dimensiones espaciales, usamos estos parámetros realistas con unidades de μM para las concentraciones.

En todas las simulaciones se parte de una condición inicial en que todas las concentraciones son uniformes y están en equilibrio químico entre sí. Fijando la concentración inicial de Ca^{2+} libre en $[\text{Ca}_{in}^{2+}] = 0,05\mu\text{M}$ [19] se pueden obtener las del complejo calcio - *buffer* móvil, $[\text{CaB}]_{in}$, y del complejo calcio - *buffer* estático, $[\text{CaBst}]_{in}$, a partir del sistema (2.11) igualando las derivadas espaciales y temporales a cero. Así se obtienen los valores listados en la Tabla 3.2 donde se incluye también el valor de la concentración total de calcio definida por (2.9), la que debe mantenerse constante en las simulaciones realizadas en este trabajo.

	Parámetro	Valor (unidad)
Calcio libre	D_C	$200 \mu m^2 s^{-1}$
Buffer móvil	D_B	$15 \mu m^2 s^{-1}$
	B_{tot}	$300 \mu M$
	k_{Boff}	$300 s^{-1}$
	k_{Bon}	$150 \mu M^{-1} s^{-1}$
Buffer estático	Bst_{tot}	$300 \mu M$
	k_{Bstoff}	$800 s^{-1}$
	k_{Bston}	$400 \mu M^{-1} s^{-1}$

Tabla 3.1: Parámetros utilizados en las simulaciones tomados de Shuai *et al.* (2008) [19].

	Concentraciones iniciales	Valor (unidad)
Calcio libre	$[Ca^{2+}]_{in}$	$0.050 \mu M$
Buffer móvil	$[CaB]_{in}$	$7.317 \mu M$
Buffer estático	$[CaBst]_{in}$	$7.317 \mu M$
Calcio total	Ca_{tot}	$14.684 \mu M$

Tabla 3.2: Concentraciones iniciales (uniformes) usadas en las simulaciones y concentración total de Ca^{2+} derivada a partir de la Ec. (2.9) a tiempo 0.

Todas las simulaciones fueron hechas asegurándose de que el flujo neto de Ca^{2+} a través de toda la frontera del dominio de integración fuera nulo. De este modo se garantiza que Ca_{tot} (Ec. (2.9)) sea una cantidad conservada, lo que es razonable para la célula en condiciones basales.

Para establecer las condiciones de contorno se consideró que el flujo de Ca^{2+} libre hacia el exterior de la célula viene dado solamente por la actividad de las PMCA en concordancia con lo expuesto en la Sec. 1.2. Para estimar un valor de J_{out} (ver Ec. (2.7)) consistente con esta suposición se procedió del siguiente modo. Supongamos, por simplicidad, una región que solo contiene Ca^{2+} con una concentración uniforme y de la cual solo puede salir Ca^{2+} debido a la presencia de PMCA. Como ya se mencionó (ver también [11]), la variación en la cantidad de iones Ca^{2+} en la región queda determinada por el flujo neto de Ca^{2+} integrado sobre todo el contorno de la misma. Matemáticamente,

$$\frac{d(\nu[Ca^{2+}])}{dt} = \tilde{J}_{net} = - \iint_{\partial\nu} \mathbf{J} \cdot d\mathbf{S}, \quad (3.1)$$

donde ν es el volumen (área) de la región en el caso tridimensional (bidimensional) y la integral debe hacerse sobre su borde, $\partial\nu$, con \mathbf{dS} perpendicular a $\partial\nu$ apuntando hacia afuera del volumen (área). Si consideramos que la componente de \mathbf{J} a lo largo de esta normal toma el mismo valor, J , en cada punto del contorno, entonces (3.1) resulta:

$$\frac{d(\nu[\text{Ca}^{2+}])}{dt} = -JS, \quad (3.2)$$

con S el área (longitud) de $\partial\nu$. Igualando las Ecs. (3.1) y (3.2) y dividiendo por ν se obtiene

$$-JS/\nu = \tilde{J}_{net}/\nu \equiv J_{net}. \quad (3.3)$$

Despejando de (3.3) el flujo $-J$, el cual es el mismo que el flujo J_{out} de (2.7), se obtiene:

$$J_{out} = J_{net}\nu/S. \quad (3.4)$$

En esta Tesis no se tiene en cuenta la dependencia de la velocidad de bombeo de las PMCAs con la concentración citosólica del Ca^{2+} . Por lo que J_{net} se aproxima por el valor de la velocidad máxima, $J_{net} = 0,590\mu\text{M}/\text{s}$, usado en un modelo de la dinámica del Ca^{2+} en macrófagos RAW 264.7, un tipo de célula migrante [14]. Utilizando el volumen y área de una célula, la expresión (3.4) permite estimar J_{out} en casos en que este flujo puede considerarse uniforme sobre todo el contorno. Como en este trabajo las simulaciones se hacen en un dominio bidimensional se decidió estimar J_{out} , para las simulaciones con J_{out} uniforme, como:

$$J_{out} = J_{net}A/P, \quad (3.5)$$

donde P es el perímetro y A es el área del correspondiente dominio de integración. Considerando un cuadrado de lado $l = 40\mu\text{m}$ (la longitud característica de un eosinófilo en el plano paralelo a su desplazamiento [6]) resulta $P = 160\mu\text{m}$ y $A = 1600\mu\text{m}^2$ de donde se obtiene $J_{out} = 5,9\mu\text{M}\mu\text{m}/\text{s}$. Ahora bien, en los casos con concentraciones constantes y espacialmente uniformes para todas las especies, $J_{out} - J_{in}$ debe anularse en todos los puntos del contorno (ver Ec. (2.7)). Por lo tanto, en estos casos, también debe tomarse $J_{in} = 5,9\mu\text{M}\mu\text{m}/\text{s}$. Pa-

ra estudiar los casos con gradientes de Ca^{2+} consideramos variaciones locales de J_{out} y J_{in} alrededor de estos valores garantizando que se satisfaga (2.8) como se describe más adelante.

Finalmente, para todas las simulaciones de este estudio el tiempo fue discretizado en intervalos $\tau = 10^{-5} s$ y se realizaron 10^7 iteraciones temporales.

3.2. El trapecio como representación de una célula polarizada

En esta Sección presentamos los resultados de simular numéricamente el modelo definido por las Ecs. (2.11), (2.7), (2.10), usando los parámetros de la Tabla 3.1, las condiciones iniciales de la Tabla 3.2 y, como dominio de integración, distintos trapecios isósceles. Como discutimos en el Capítulo anterior, el objetivo es estudiar con un modelo simplificado de qué modo la geometría diferente de las partes anterior y posterior de la célula incide sobre la formación del gradiente de Ca^{2+} basal. Para tal fin se compararon simulaciones realizadas en dos dimensiones espaciales usando distintos trapecios que tenían alguna característica en común. Para un subconjunto de las simulaciones, se interpretaron los resultados en términos de la distinta relación entre área y perímetro de lo que pudimos identificar como el frente o la parte anterior de la célula, suponiendo que el cociente área/perímetro de la simulación cumplía un rol similar al del cociente volumen/área en la célula real. En otros casos se comparó entre sí el perímetro de ambas zonas, suponiendo en este caso que equivalía a comparar las distintas superficies de la membrana plasmática en las partes anterior y posterior de las células migrantes.

Ahora bien, independientemente de la geometría, para poder tener una distribución no uniforme de Ca^{2+} basal es necesario que $J_{out}(\mathbf{r}) - J_{in}(\mathbf{r})$ (ver Ec. (2.7)) sea distinto de cero en algún punto del borde del dominio de integración. Dada la condición (2.8), esto significa que habrá puntos con $J_{out}(\mathbf{r}) - J_{in}(\mathbf{r}) > 0$ y otros con $J_{out}(\mathbf{r}) - J_{in}(\mathbf{r}) < 0$. Por otro lado, la orientación del gradiente se relaciona con la ubicación relativa de ambas regiones de puntos. Esto queda claro en el siguiente ejemplo sencillo. Consideremos un rectángulo, con sus lados a lo largo de los ejes x (entre $x = 0$ y $x = a$) e y (entre $y = 0$ e $y = b$) dentro del cual solo hay

Ca^{2+} y que el flujo de esta especie en el borde solo es distinto de cero a través de los lados orientados en la dirección y con $J_{out}(x = a, y) - J_{in}(x = a, y) = -(J_{out}(x = 0, y) - J_{in}(x = 0, y)) = J$. En este caso, la solución estacionaria de la ecuación de difusión satisface

$$\nabla[\text{Ca}^{2+}] = -\frac{J}{D_C}\hat{y}.$$

Veamos que en un rectángulo con condiciones de contorno como en el párrafo anterior para el calcio libre, pero que además también presenta las dos especies de *buffers* con condiciones de contorno no flux, se generan gradientes en la dirección del flujo. Tomemos entonces para poder realizar una simulación que el rectángulo posee $50\mu\text{m}$ de base y $30\mu\text{m}$ de altura. Supongamos que hay flujo entrante por la recta $x = 0$ y saliente en igual medida por la recta $x = 50\mu\text{m}$. Entonces, tomamos las derivadas temporales de las ecuaciones del sistema 2.11 igual a cero y reemplazamos la segunda y tercera ecuación en la primera, luego tenemos que

$$0 = \nabla^2([\text{Ca}^{2+}] + [\text{CaB}]D_B/D_C) = \frac{d^2}{dy^2}([\text{Ca}^{2+}] + [\text{CaB}]D_B/D_C).$$

Esto implica que $[\text{Ca}^{2+}] + [\text{CaB}]D_B/D_C$ varía linealmente con y , es decir,

$$[\text{Ca}^{2+}] + [\text{CaB}]D_B/D_C = \alpha y + \beta,$$

con α y β cantidades a determinar por las condiciones de contorno y las condiciones iniciales. En los bordes sabemos que

$$\left. \frac{d}{dy}[\text{Ca}^{2+}] \right|_{x=0} = -J_{x=0}/D_C$$

y

$$\left. \frac{d}{dy}[\text{CaB}] \right|_{x=0} = 0$$

por lo tanto

$$\alpha = -J_{x=0}/D_C.$$

El cálculo de β no es tan trivial. Con los parámetros de la Sección 3.1, $J_{x=0} = 1\mu\text{M}\mu\text{m}/\text{s}$ y $J_{x=30\mu\text{m}} = -1\mu\text{M}\mu\text{m}/\text{s}$ el valor de la pendiente resulta $\alpha = -0,005\mu\text{M}/\mu\text{m}$. Resolviendo numéricamente el problema mediante el método de volúmenes finitos efectivamente se obtiene

que tras 10^7 iteraciones la cantidad $[Ca^{2+}] + [CaB]D_B/D_C$ en función de la posición en y es lineal y se muestra en 3.7. Mediante el método de cuadrados mínimos se calculó la pendiente de dicho gráfico y esta resultó ser $-0,00499936\mu M/\mu m$ mientras que la ordenada al origen fue $0,67377724\mu M$. Por lo cual, nuestra simulación arroja un resultado prácticamente idéntico al calculo analítico de α . Asimismo, en las figuras 3.1 y 3.2 se muestran los mapas de color de la concentración de calcio libre y el complejo móvil respectivamente en la última iteración. En ellas se puede apreciar, al igual que en el problema del rectángulo sin *buffers*, que la concentración de calcio libre solo varía en la dirección y en forma lineal, mientras que no lo hace en la dirección perpendicular. Estas observaciones se aprecian con mayor claridad en los gráficos 3.3 y 3.5. Lo mismo se observa para la concentración del complejo calcio - *buffer* móvil (ver figuras 3.4 y 3.6).

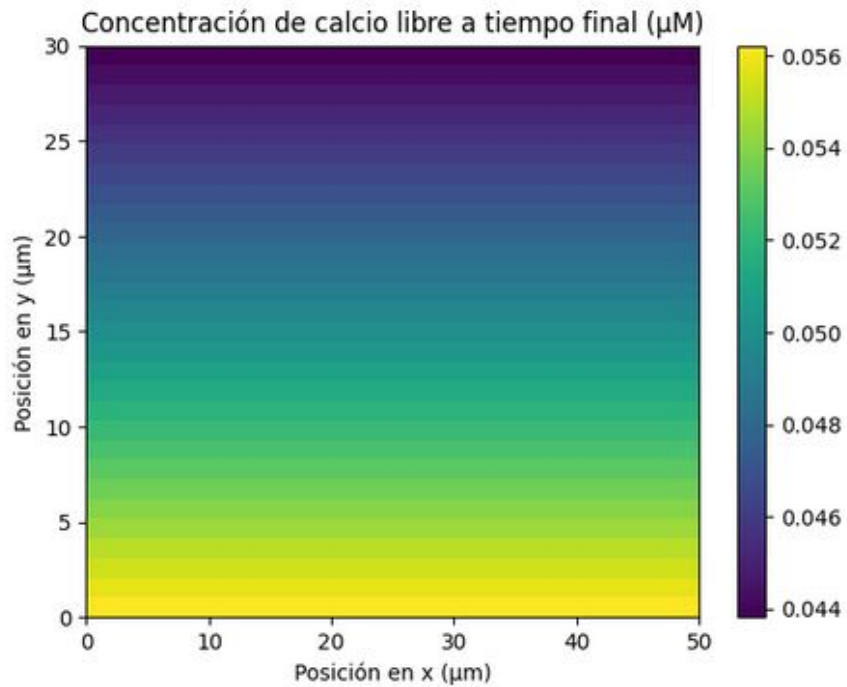


Figura 3.1: Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.

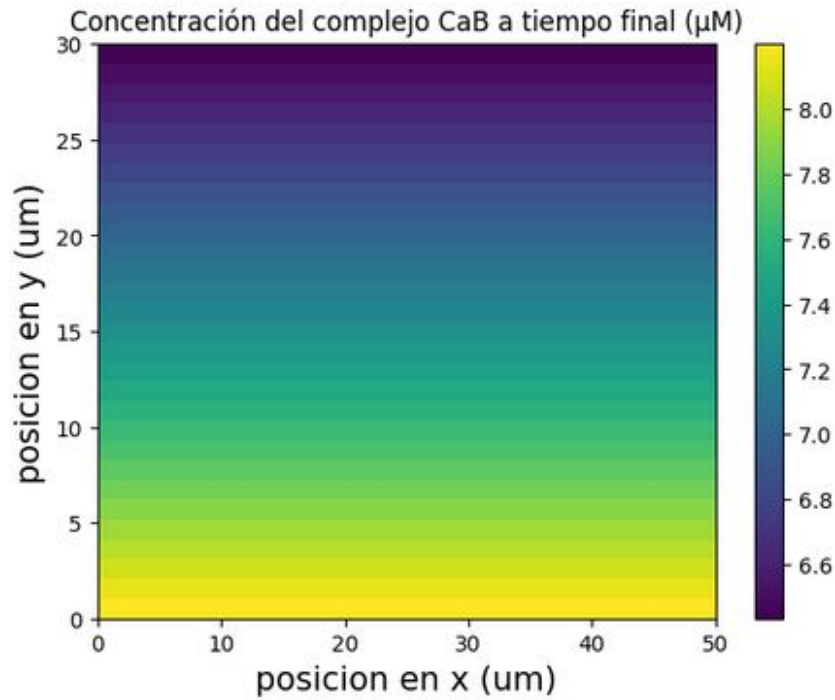


Figura 3.2: Mapa de color de la concentración del complejo CaB en la última iteración temporal.

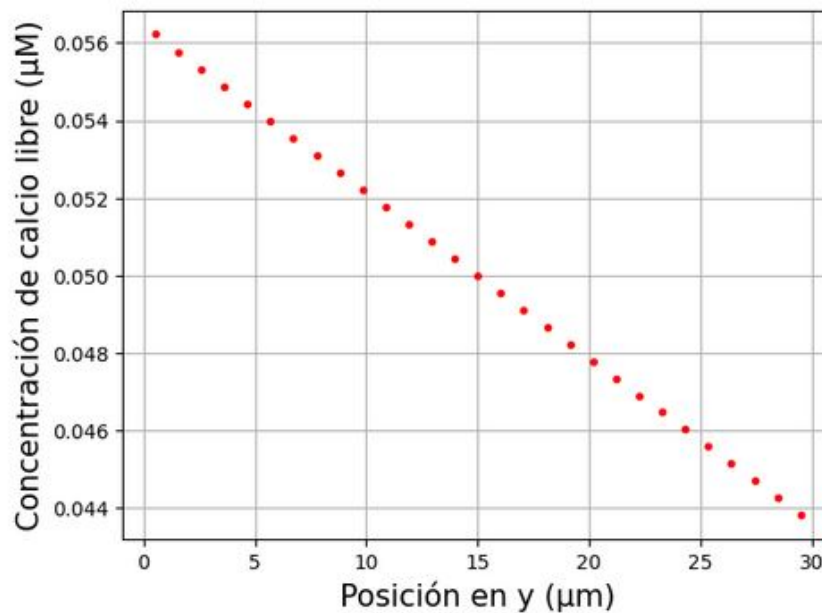


Figura 3.3: Concentración de calcio libre en función de la posición en el eje paralelo al flujo.

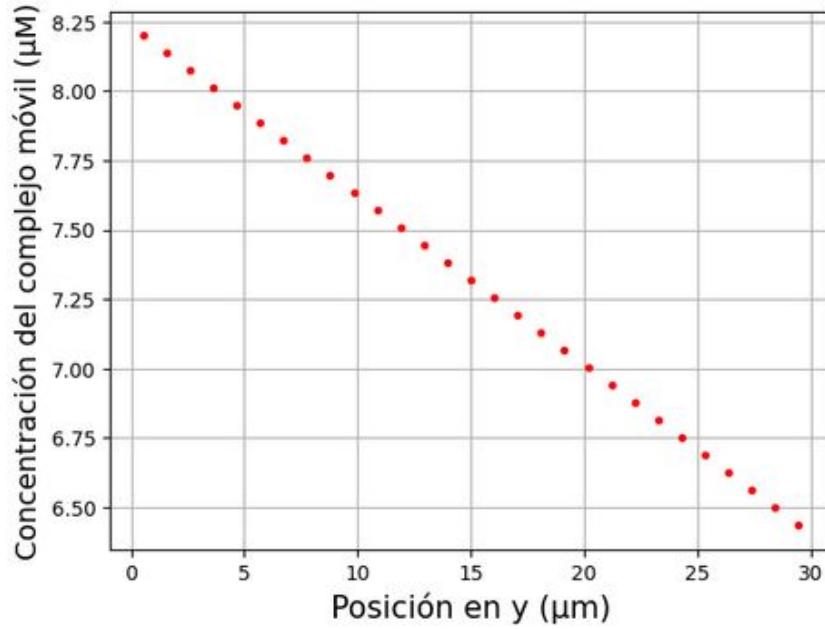


Figura 3.4: Concentración del complejo CaB en función de la posición en el eje paralelo al flujo.

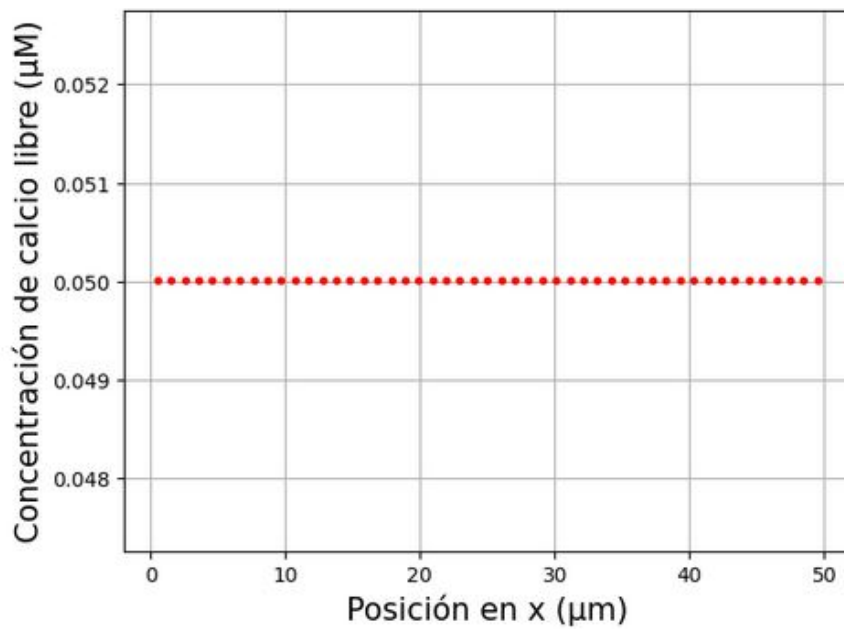


Figura 3.5: Concentración de calcio libre en función de la posición en el eje perpendicular al flujo.

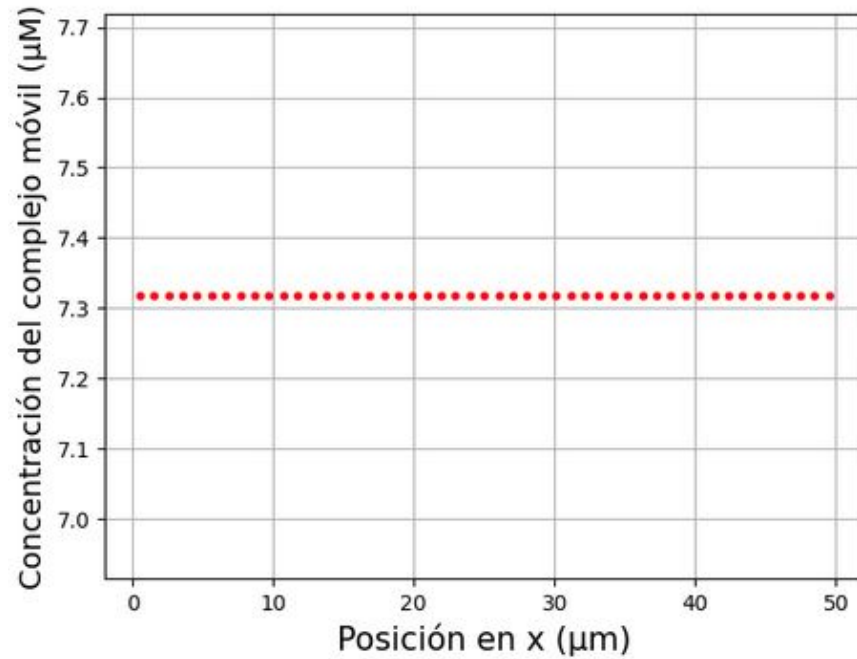


Figura 3.6: Concentración del complejo móvil en función de la posición en el eje perpendicular al flujo.

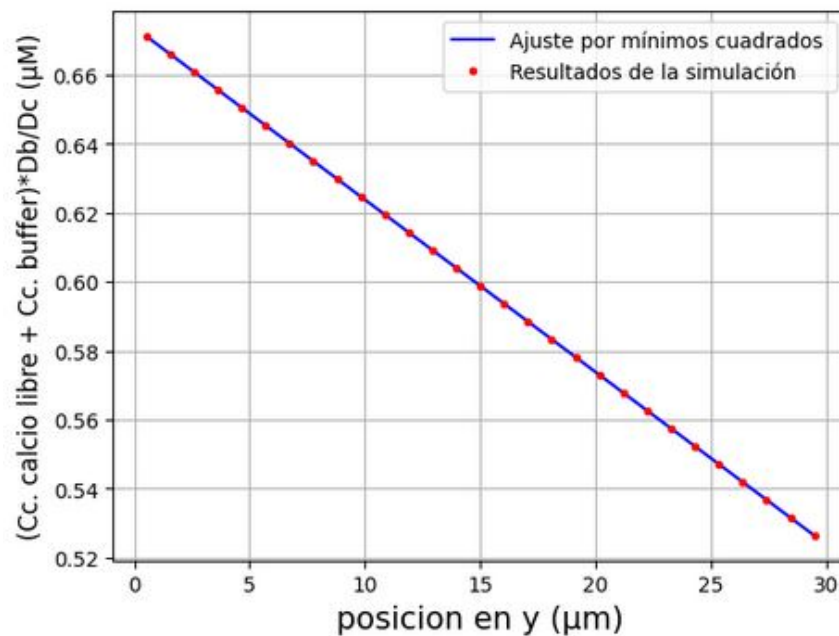


Figura 3.7: Curva de $[Ca^{2+}] + [CaB]D_B/D_C$ en la última iteración temporal en función de la posición en la dirección de los flujos.

Por lo tanto, la polarización de una célula migrante que involucra, entre otras cosas, el

paso de una distribución uniforme de Ca^{2+} basal a otra no uniforme, conlleva también un cambio en la dependencia espacial del flujo neto de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. Como mencionamos en la Introducción, diversos experimentos muestran que la tasa de bombeo es significativamente mayor en la zona delantera de las células migrantes (polarizadas) [21]. Una forma posible de que ocurra este cambio en un tiempo relativamente corto es que se redistribuyan espacialmente los componentes involucrados en la remoción y/o ingreso del Ca^{2+} desde/hacia el citosol al mismo tiempo que la célula cambia de forma. La remoción ocurre a través de bombas, es decir proteínas, cuyo número variará significativamente en la medida en que haya cambios de expresión génica, esto es, en escalas de tiempo relativamente largas. La deformación de la célula puede causar su redistribución espacial manteniendo su número constante. El ingreso de Ca^{2+} por mecanismos inespecíficos, por otro lado, puede suponerse que permanece relativamente uniforme sobre toda la membrana. De este modo, $J_{out} - J_{in}$ podría pasar a ser localmente distinto de cero induciendo la formación de un gradiente basal de Ca^{2+} citosólico. En lo que sigue presentamos los resultados obtenidos simulando el modelo dado por las Ecs. (2.11) para distintas formas del dominio de integración y distribuciones espaciales de $J_{out} - J_{in}$.

3.3. La región de la base mayor del trapecio como representación de la zona delantera de la célula polarizada

En esta Sección presentamos los resultados de simulaciones donde el flujo neto entrante es mayor en la zona de la base menor del trapecio por lo que los interpretaremos suponiendo que la zona de la base mayor corresponde al lamelipodio. Se hicieron, en particular, simulaciones manteniendo distintas cantidades constantes como se describe en lo que sigue.

3.3.1. Simulaciones con perímetro y altura constantes

Utilizando los parámetros de la Sección 3.1 se realizaron simulaciones para estudiar la formación de un gradiente de Ca^{2+} citosólico en dominios con forma de trapecio isósceles

comparando los resultados obtenidos para dominios de perímetro y altura constantes, siendo éstos $160\mu m$ y $40\mu m$, respectivamente. Se tomaron diez ángulos entre los 67.3 y 82.9 grados, medidos como el ángulo interior definido por la base mayor y el cateto del trapecio. Es importante destacar que la diferencia entre el área de los trapecios y el de un cuadrado de $40\mu m$ de lado en ningún caso superó el 9.14 %.

En estas simulaciones se usó un flujo, J_{out} , uniforme sobre todo el contorno e igual al valor estimado en la Sección anterior, $J_{out} = 5,9\mu M\mu m/s$. Respecto al flujo hacia el interior del recinto, J_{in} , se tomó un valor diferente para cada una de las caras de acuerdo a

$$J_{in}^i = J_{out}40\mu m/d_i \quad (3.6)$$

con

$$\begin{aligned} d_1 &= d_3 = \text{longitud de los catetos,} \\ d_2 &= \text{longitud de la base mayor y} \\ d_4 &= \text{longitud de la base menor.} \end{aligned}$$

Por lo tanto, el flujo neto de calcio libre integrado sobre toda la superficie resulta nulo pero no el integrado sobre cada cara, resultando en la formación de un gradiente interno. Con esta elección, por otro lado, J_{in} resulta mayor cuanto menor sea la longitud del lado del trapecio correspondiente. En estas simulaciones esperamos entonces obtener una mayor concentración de Ca^{2+} en la región más cercana a la base menor del trapecio por lo que interpretamos a la región más cercana a la base mayor como la correspondiente al lamelipodio.

En la Tabla 3.3 se muestran para cada ángulo los valores de los flujos salientes integrados sobre cada segmento. Análogamente se muestran los flujos entrantes integrados en la Tabla 3.4. Por su parte, el módulo del flujo integrado neto a lo largo de todo el perímetro en ninguno de los casos fue mayor a un valor del orden de $10^{-12}\mu M\mu m^2/s$.

Ángulo (grados)	Flujo saliente integrado cara lateral ($\mu M \mu m^2/s$)	Flujo saliente integrado base menor ($\mu M \mu m^2/s$)	Flujo saliente integrado base mayor ($\mu M \mu m^2/s$)
67.3	255.76139473893892	117.65924109793124	314.81796942419476
68.9	252.86003778640597	128.35340643939196	309.92651798779946
70.6	250.2249476863988	138.60940769600148	304.94069693120355
72.2	247.85156854896326	148.4226100148763	299.87425288719896
73.8	245.73336069218638	157.7912089909757	294.7420696246532
75.4	243.86192068205605	166.71628873234405	289.55986990354467
77.0	242.22716470607529	175.20178691161766	284.34388367623194
80.0	239.62042339785714	190.88322363747466	273.8759295668116
81.5	238.62217077448656	198.09978527281973	268.65587317820746
82.9	237.8086671951616	204.91741620423377	263.4652494054434

Tabla 3.3: Flujos salientes integrados sobre cada cara de los 10 trapecios de perímetro y altura constantes. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales.

Ángulo (grados)	Flujo entrante integrado cara lateral ($\mu M \mu m^2/s$)	Flujo entrante integrado base menor ($\mu M \mu m^2/s$)	Flujo entrante integrado base mayor ($\mu M \mu m^2/s$)
67.3	236.00000000000001	236.00000000000006	236.00000000000037
68.9	236.00000000000006	235.99999999999986	236.00000000000037
70.6	235.99999999999986	235.99999999999983	236.00000000000037
72.2	235.99999999999994	236.00000000000028	236.00000000000037
73.8	235.99999999999983	236.00000000000026	236.00000000000037
75.4	236.00000000000003	236.00000000000014	236.00000000000037
77.0	236.00000000000009	235.99999999999997	236.00000000000037
80.0	235.99999999999991	236.00000000000017	236.00000000000037
81.5	236.00000000000006	235.99999999999966	236.00000000000037
82.9	235.99999999999994	236.00000000000003	236.00000000000037

Tabla 3.4: Flujos entrantes integrados sobre cada cara de los 10 trapecios de perímetro y altura constantes. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales.

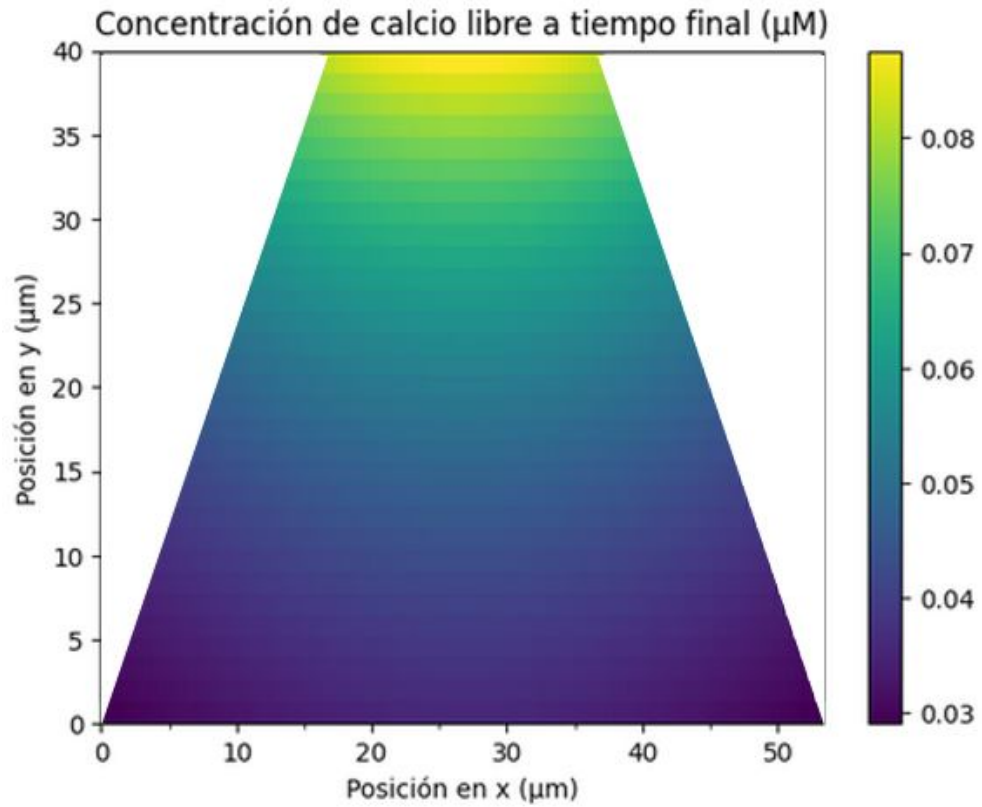
En 3.8a, 3.9a, 3.10a, 3.11a, 3.12a, 3.13a, 3.14a, 3.15a, 3.16a y 3.17a se muestran los mapas de color de la concentración de calcio libre tras 10^7 iteraciones temporales del código. Se denominó como y al eje paralelo a la dirección que va de la parte trasera al frente de la célula polarizada (la que eventualmente corresponderá a la dirección del desplazamiento), mientras que se tomó el eje x como perpendicular a éste. A simple vista se puede apreciar que la concentración de Ca^{2+} disminuye hacia la base mayor del trapecio que identificamos en estas simulaciones con el frente de la célula. Asimismo, para una dada fila de celdas, la concentración no es uniforme sino que presenta un máximo en el valor central de x y disminuye hacia los extremos.

Por lo expuesto, en 3.8b, 3.9b, 3.10b, 3.11b, 3.12b, 3.13b, 3.14b, 3.15b, 3.16b y 3.17b se graficaron en rojo la concentración de Ca^{2+} libre promediada sobre todas las celdas de una dada fila en función de la posición en el eje y , mientras que en azul solamente se toma el valor de concentración en la celda central. Puede apreciarse como la distribución de puntos de ambas cantidades presentan la misma tendencia disminuyendo en su magnitud hacia el frente.

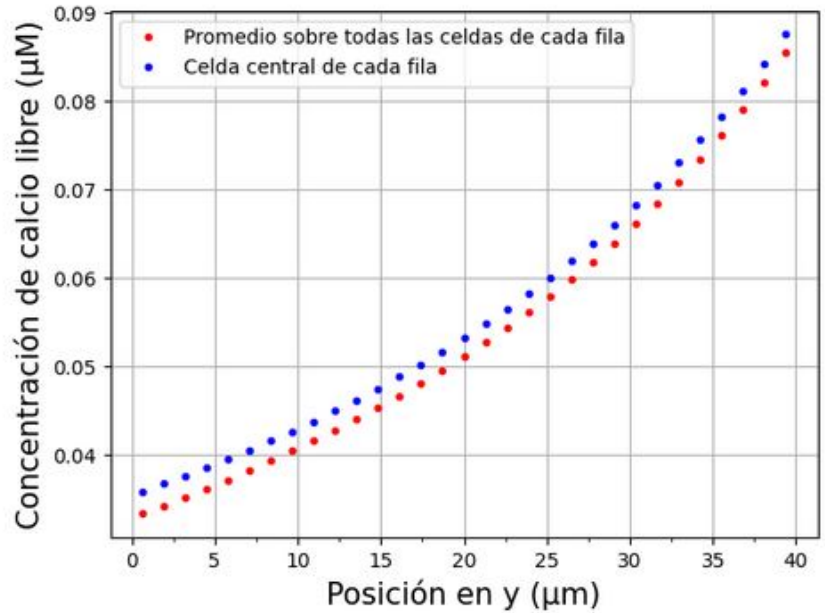
Para constatar que los resultados de las simulaciones eran consistentes con las cantidades conservadas descritas en la Sec. 2 se calculó $C_{a_{tot}}$ en cada paso temporal. En 3.8c, 3.9c, 3.10c, 3.11c, 3.12c, 3.13c, 3.14c, 3.15c, 3.16c y 3.17c se muestra el valor de $C_{a_{tot}}/C_{a_{tot}}(t=0)$ como función del tiempo. En todos los casos se ve claramente que las variaciones son del orden de 10^{-14} por lo cual $C_{a_{tot}}$ se puede considerar constante. Por su parte, como el complejo calcio libre - *buffer* estático no difunde, entonces la derivada temporal numérica de su concentración se puede calcular fácilmente mediante la ecuación (2.18) instante a instante. Los gráficos 3.8d, 3.9d, 3.10d, 3.11d, 3.12d, 3.13d, 3.14d, 3.15d, 3.16d y 3.17d muestran el promedio sobre todas las celdas de la derivada temporal de la concentración de dicho complejo. En todos los casos se ve cómo tiende a cero y por lo tanto alcanza el equilibrio como era de esperarse.

Finalmente, en el gráfico 3.19 se observan los gradientes promedios normalizados de Ca^{2+} libre en función de la posición a lo largo del eje antero-posterior. Estas cantidades fueron calculadas como las derivadas numéricas respecto de y de las curvas 3.18. La normalización permite apreciar cómo la intensidad del gradiente disminuye a medida que el ángulo lo hace, es decir que el gradiente disminuye a medida que la forma del trapecio “se parece” más a

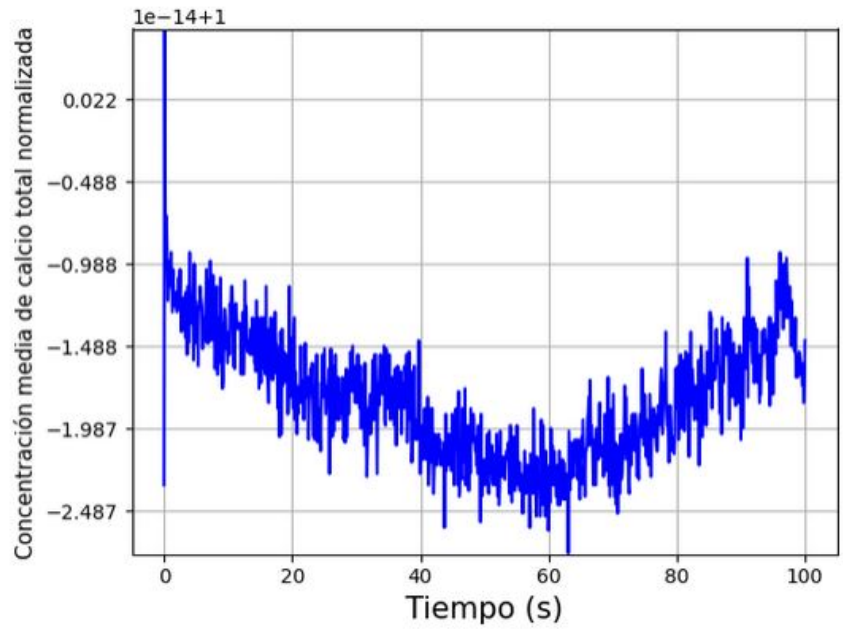
la del cuadrado. Esto se debe a que el módulo de flujo saliente integrado sobre un dado segmento tiende al módulo del flujo entrante integrado sobre ese mismo segmento, ver tablas 3.3 y 3.4.



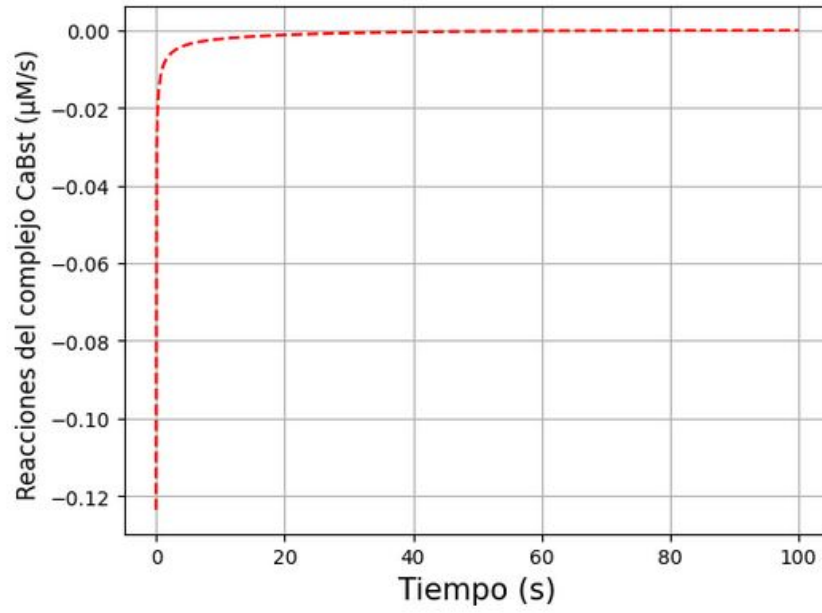
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

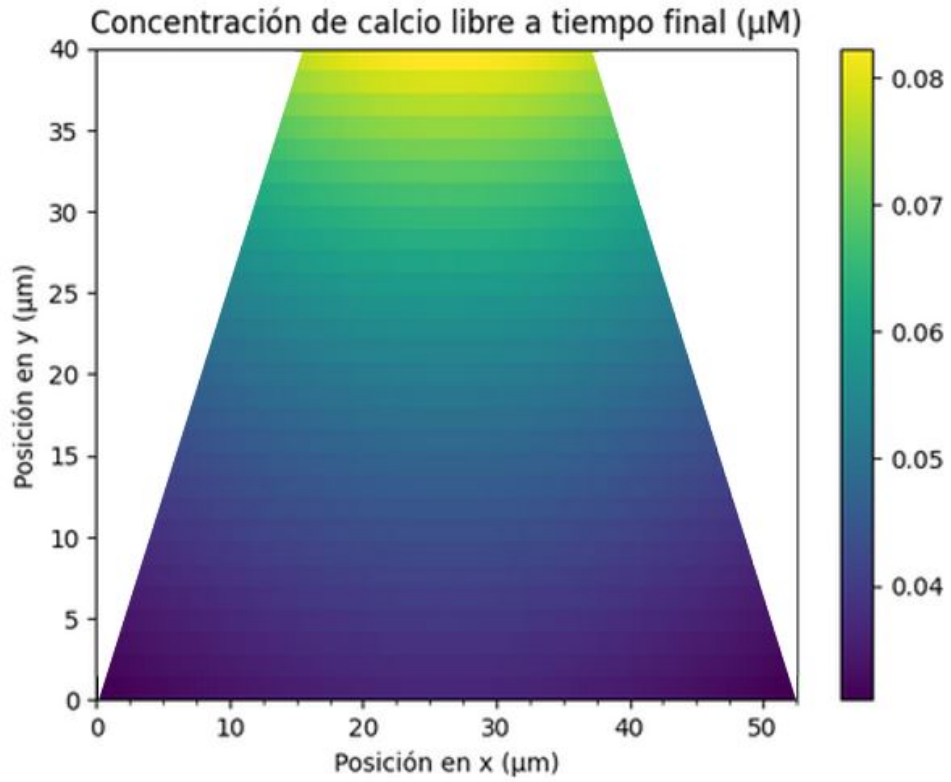


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

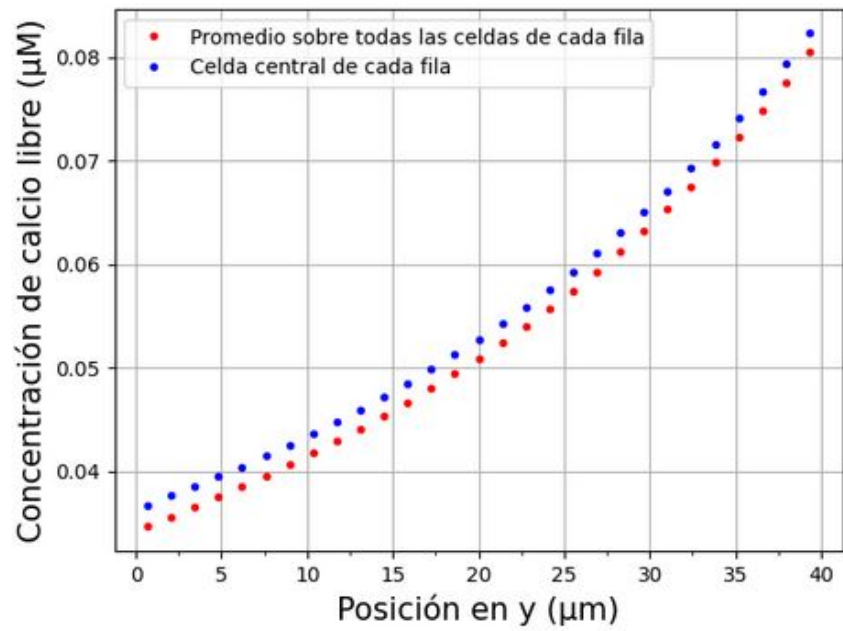


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

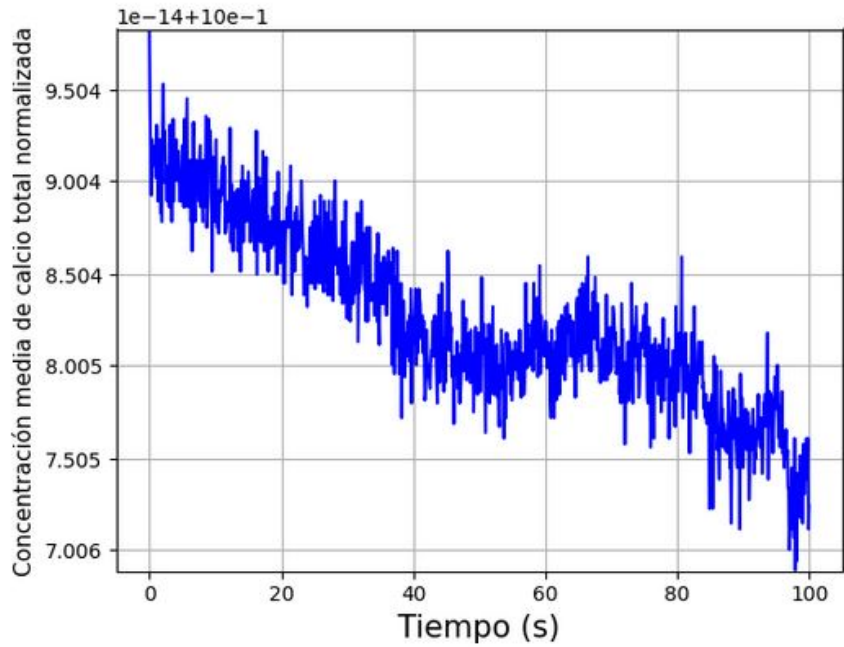
Figura 3.8: Simulación ángulo de 67.3 grados.



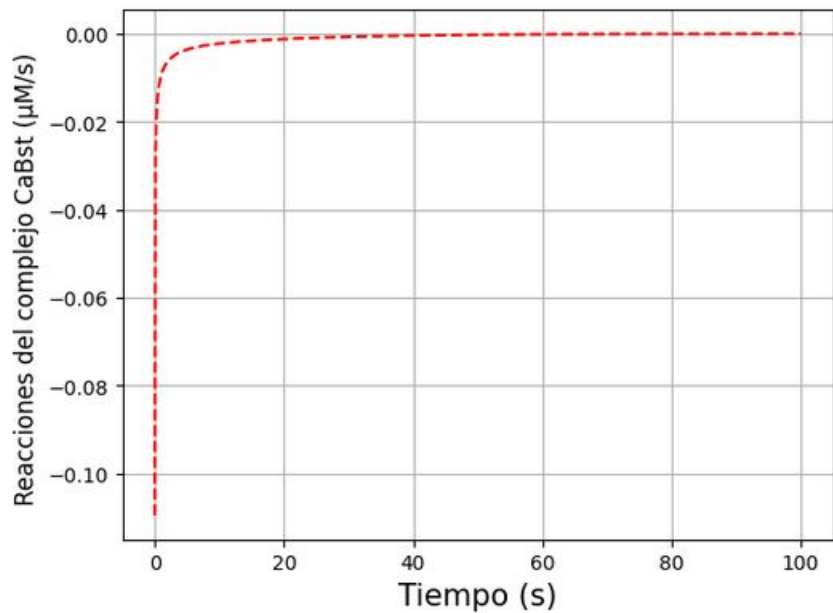
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

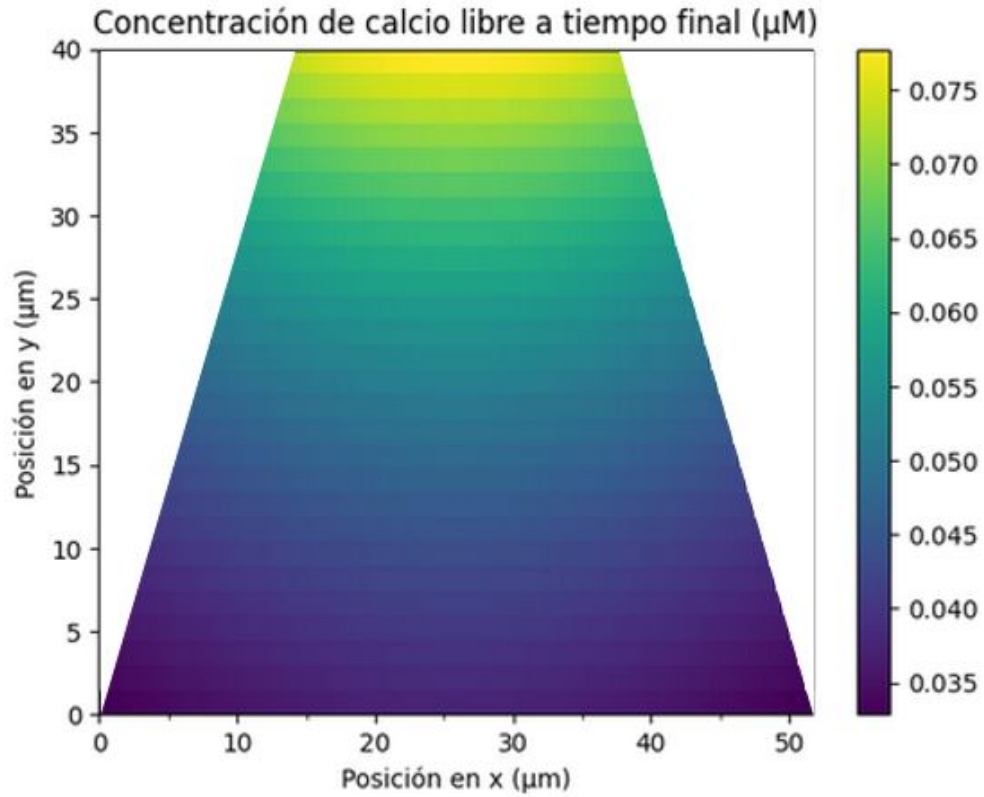


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

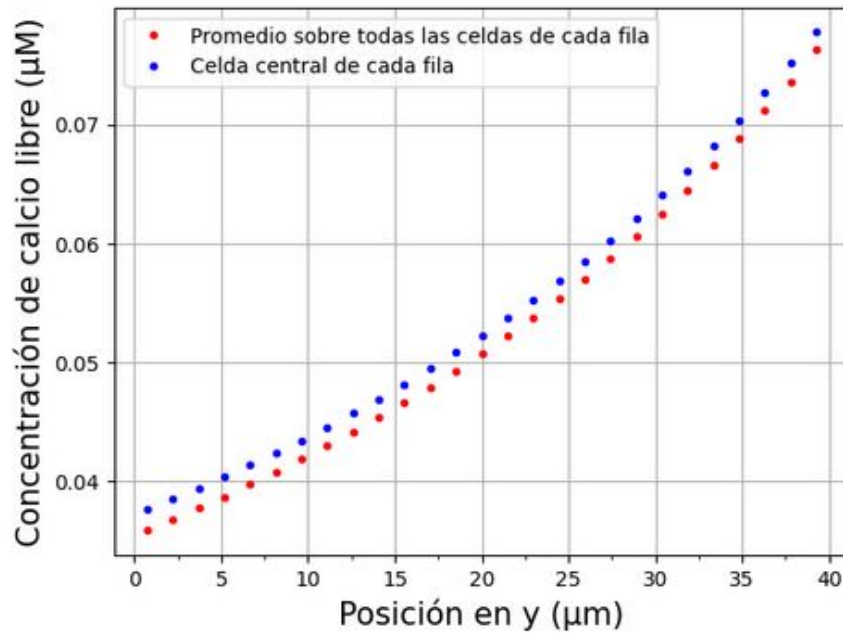


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

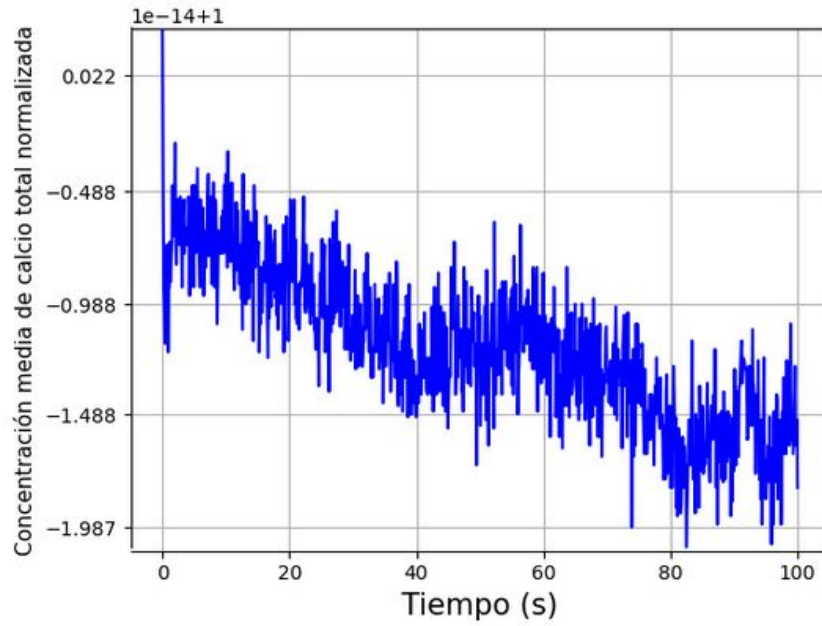
Figura 3.9: Simulación ángulo de 68.9 grados.



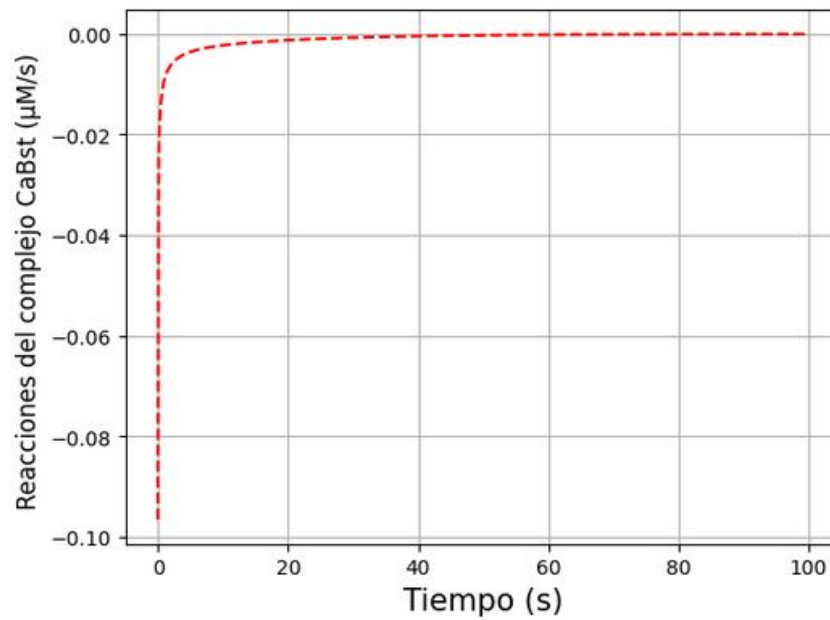
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

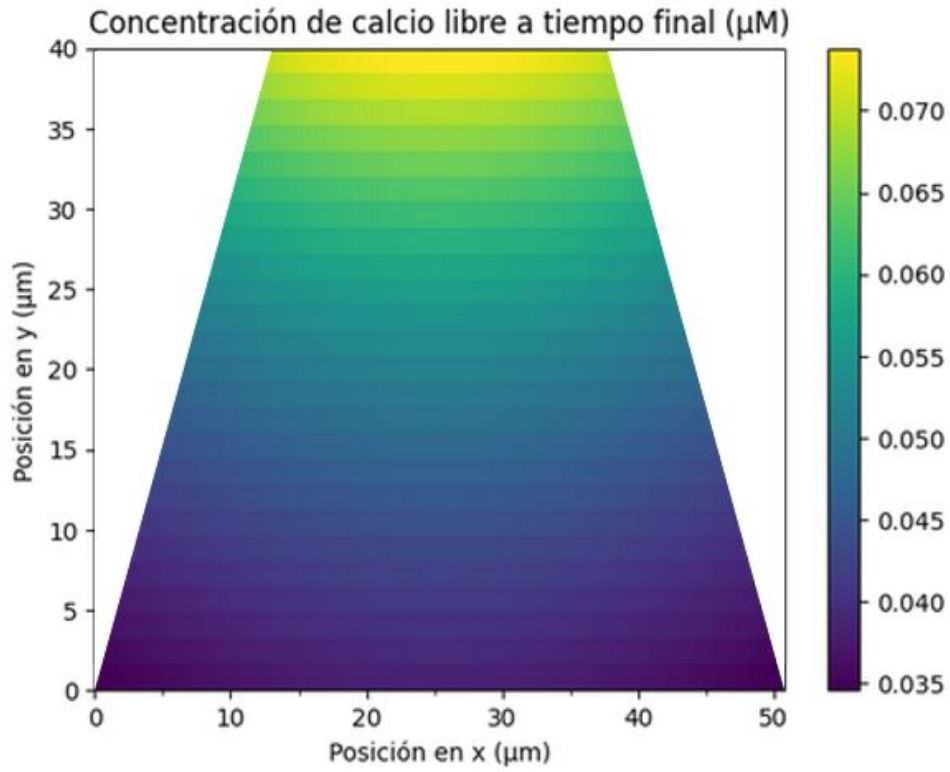


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

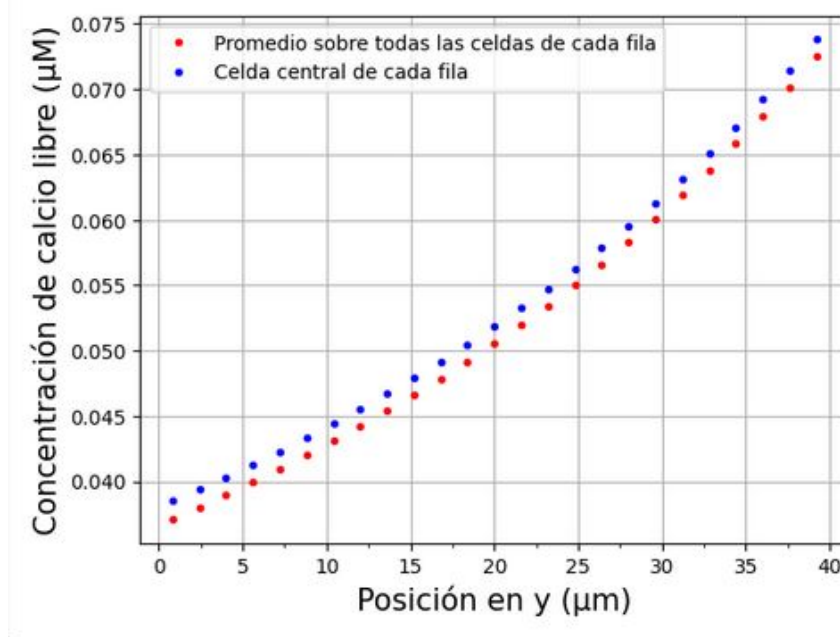


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

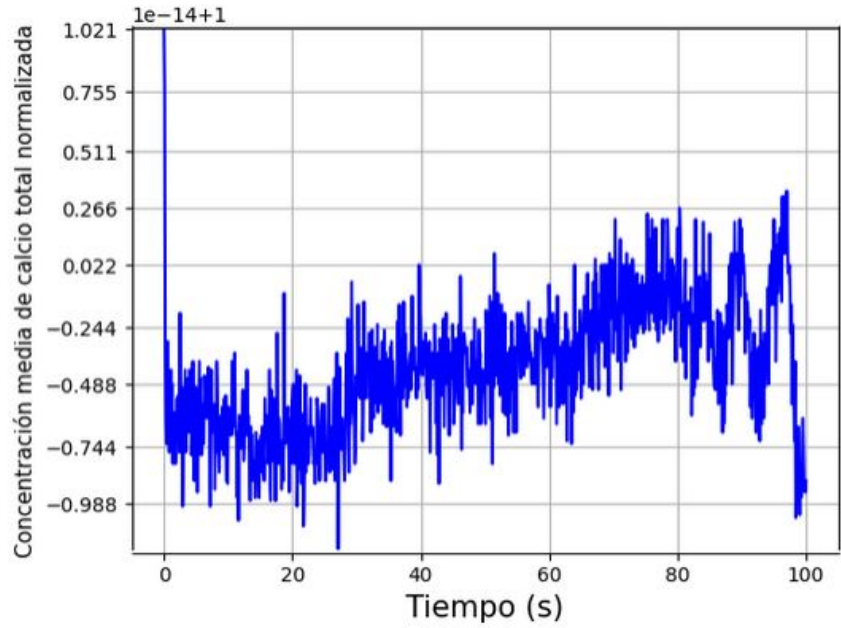
Figura 3.10: Simulación ángulo de 70.6 grados.



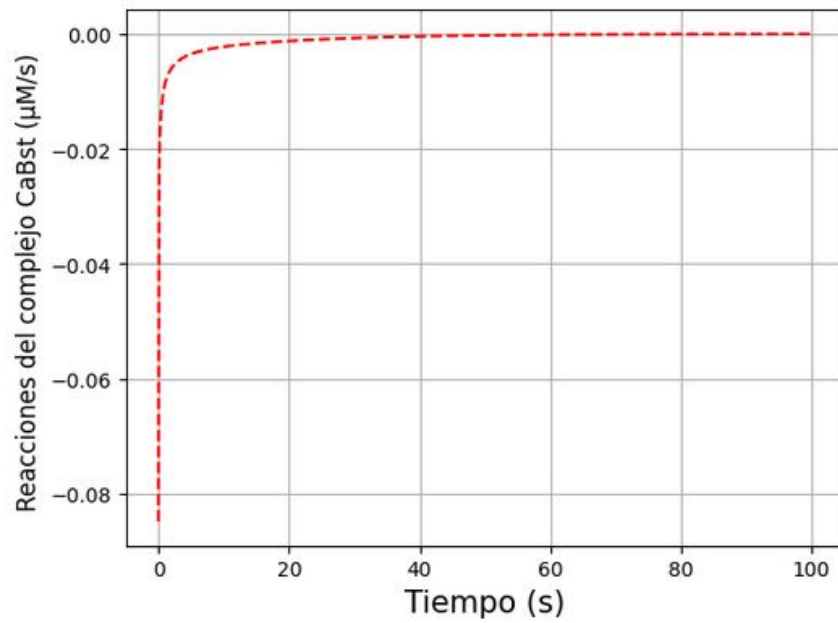
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

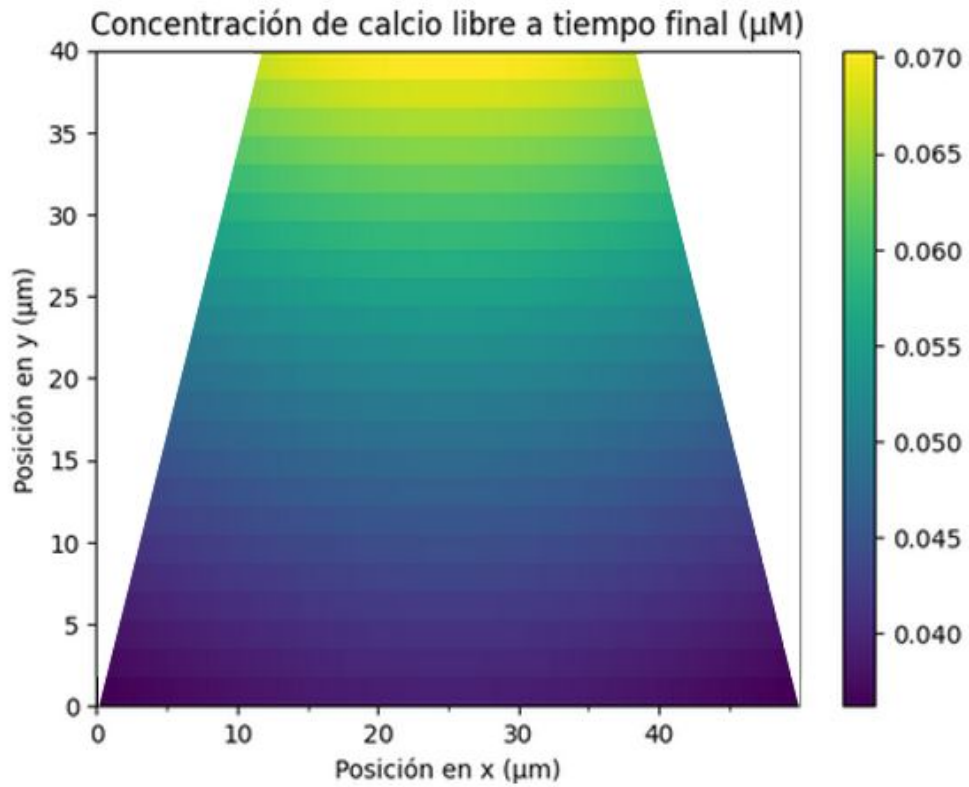


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

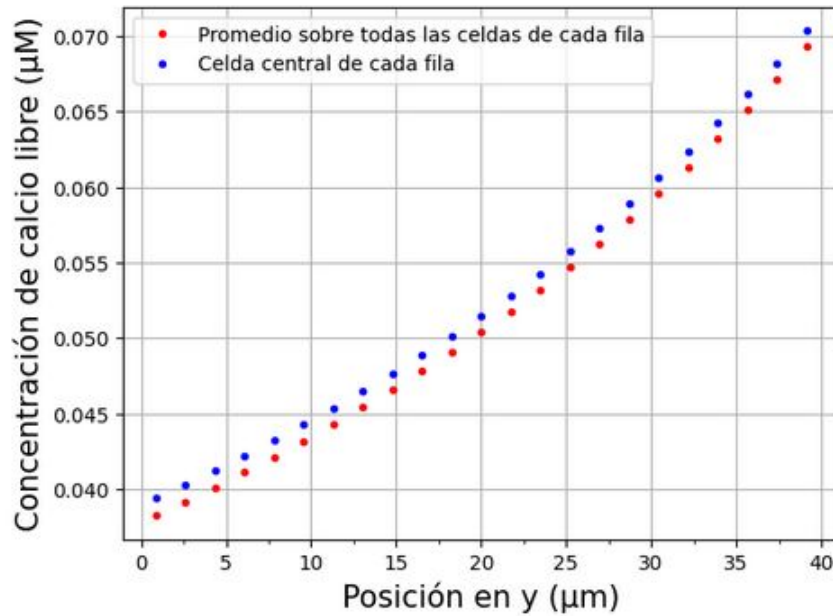


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

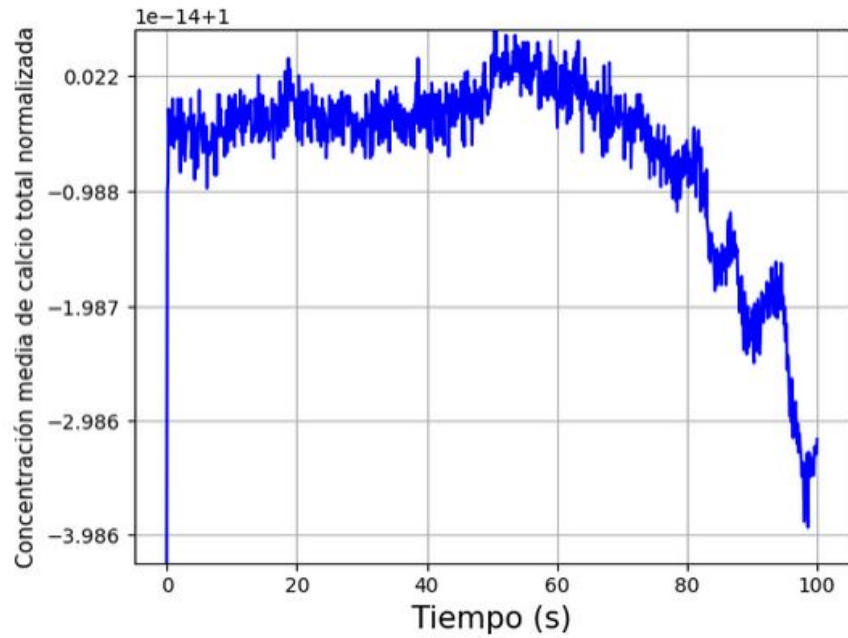
Figura 3.11: Simulación ángulo de 72.2 grados.



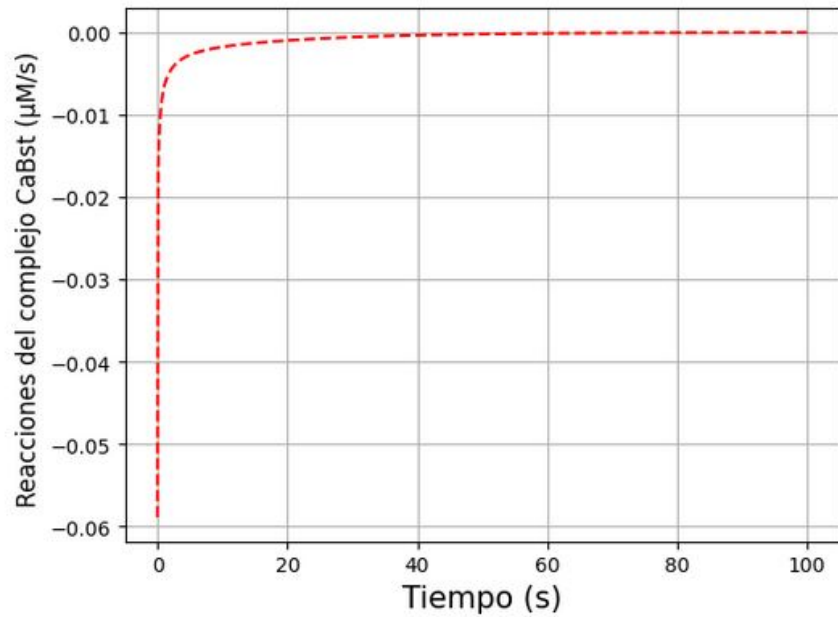
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

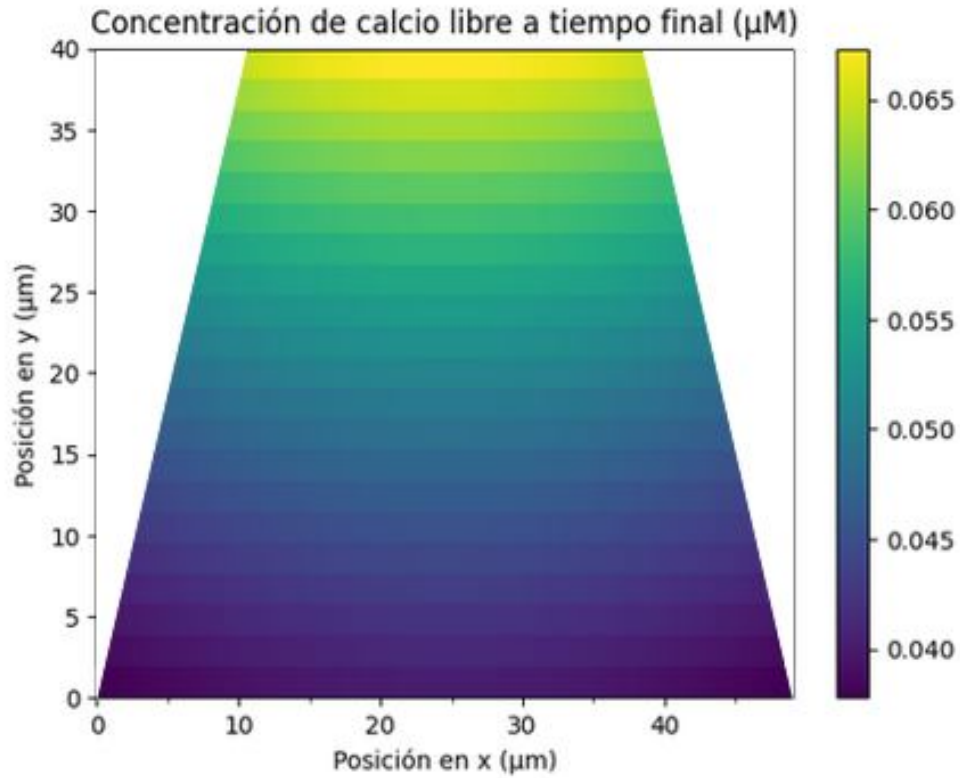


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

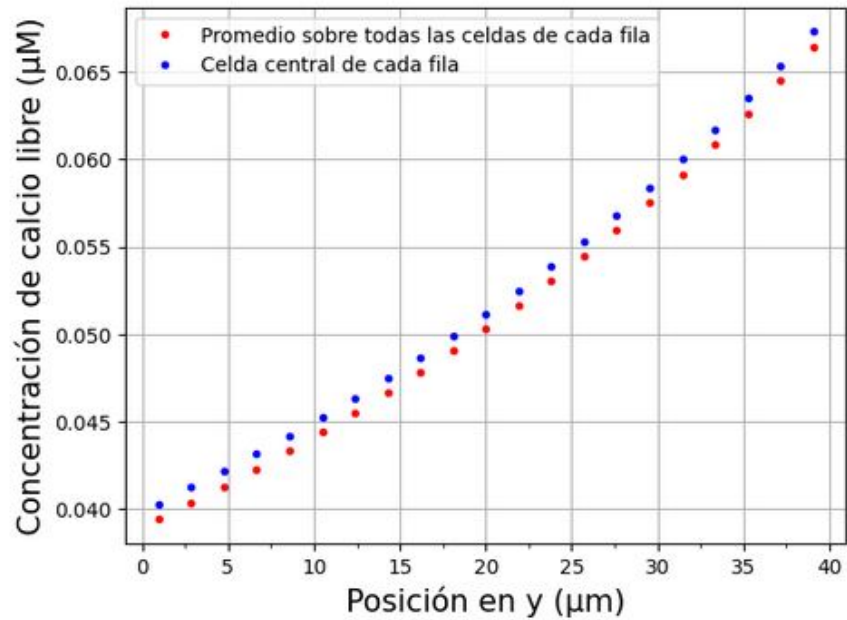


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

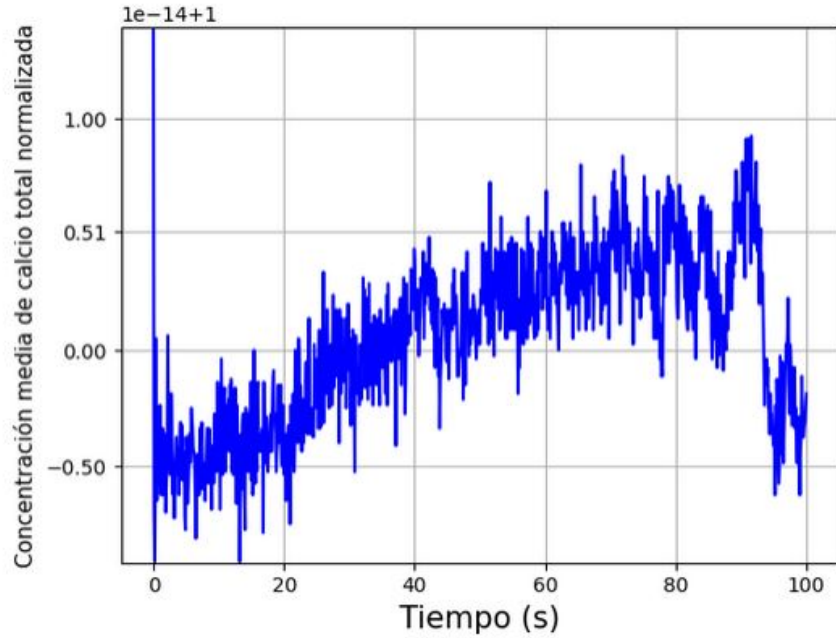
Figura 3.12: Simulación ángulo de 73.8 grados.



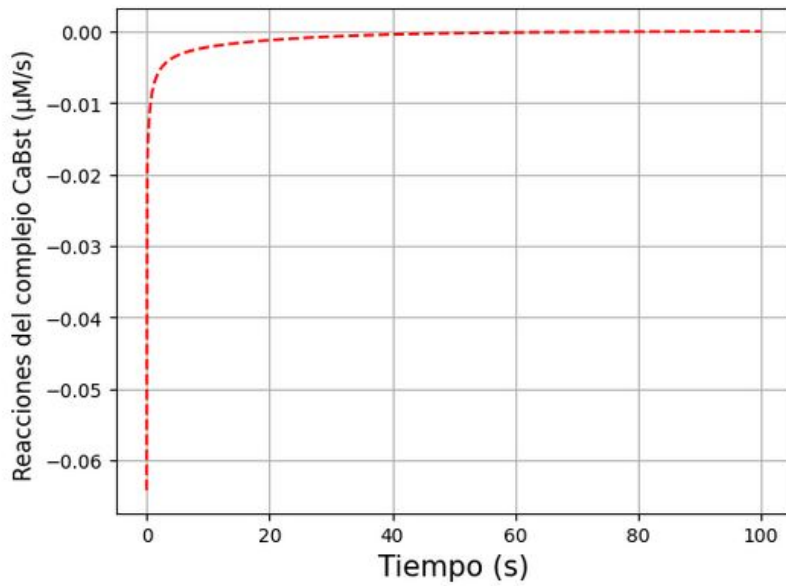
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

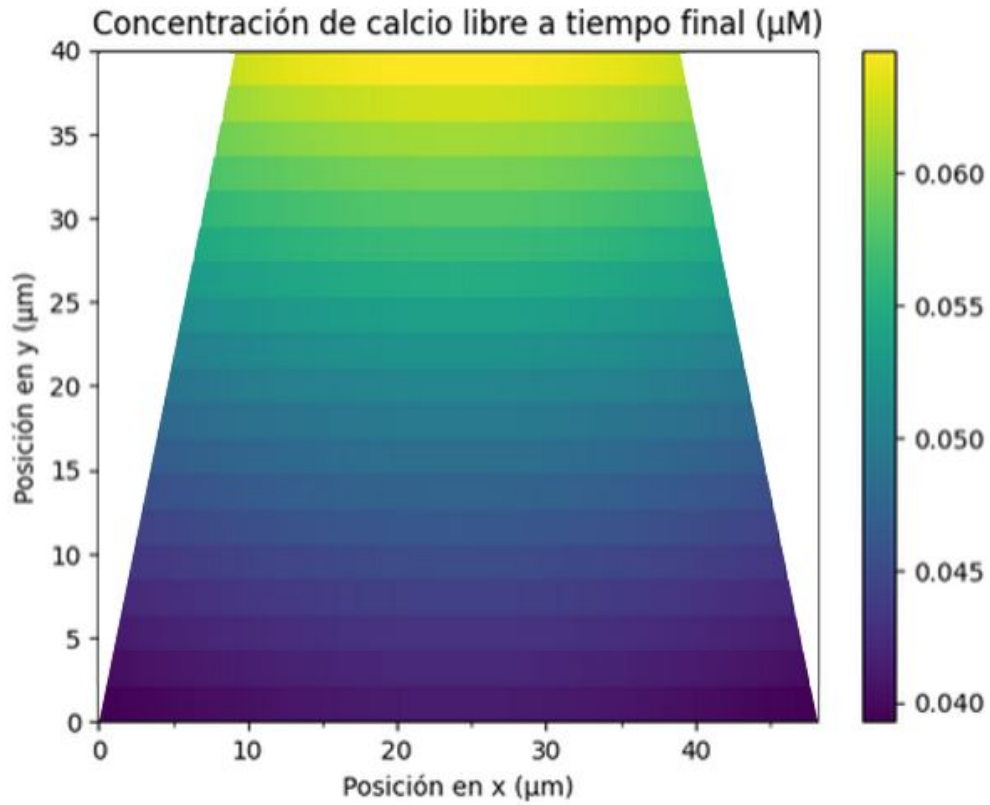


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

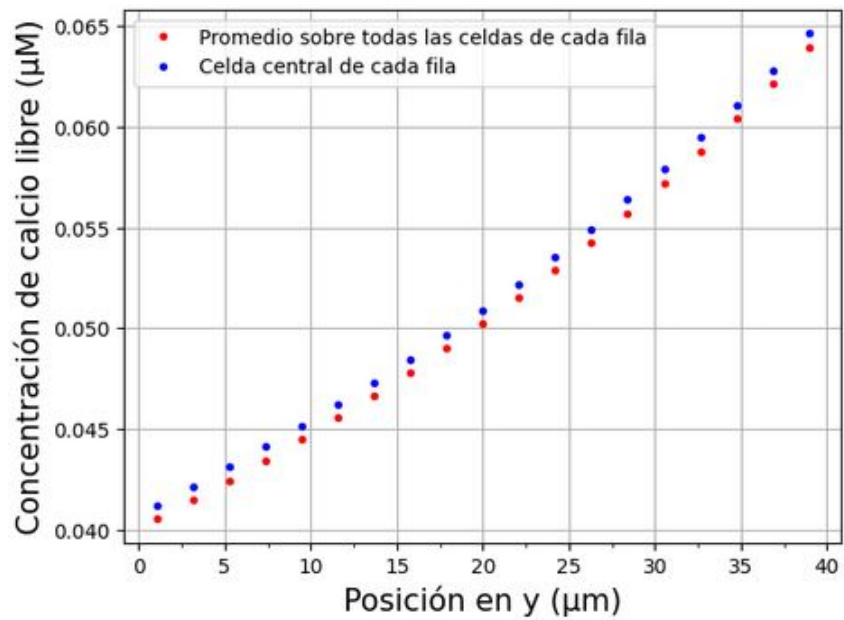


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

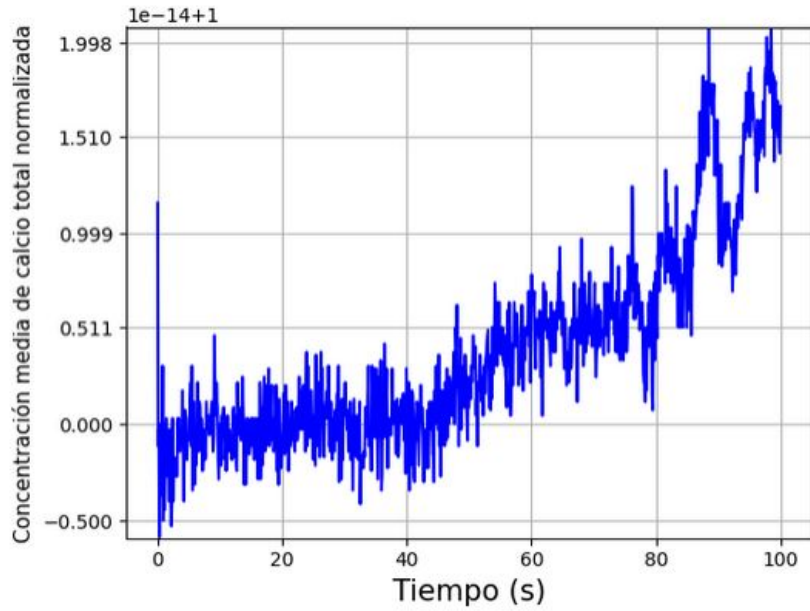
Figura 3.13: Simulación ángulo de 75.4 grados.



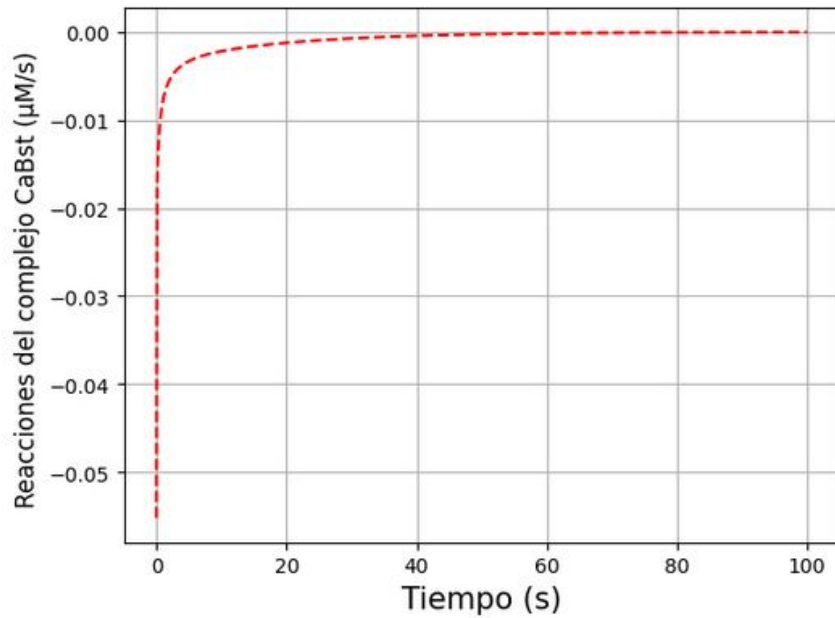
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

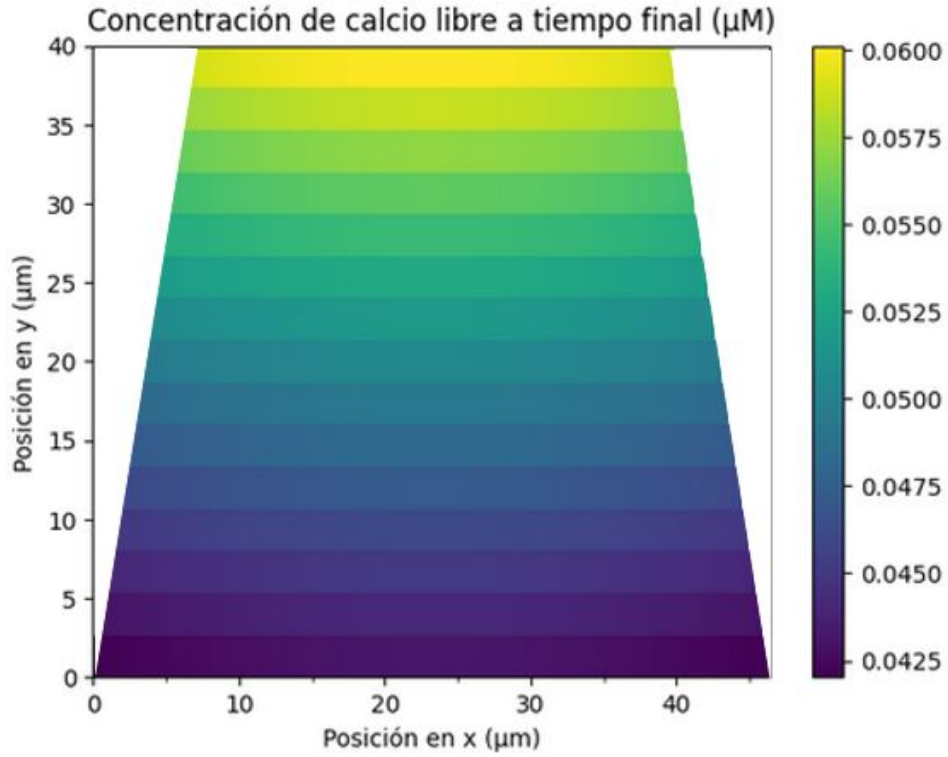


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

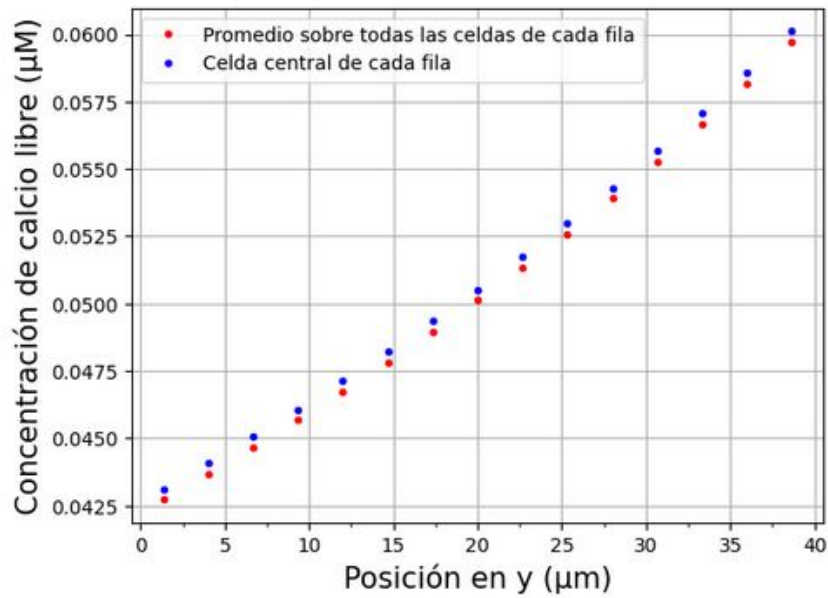


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

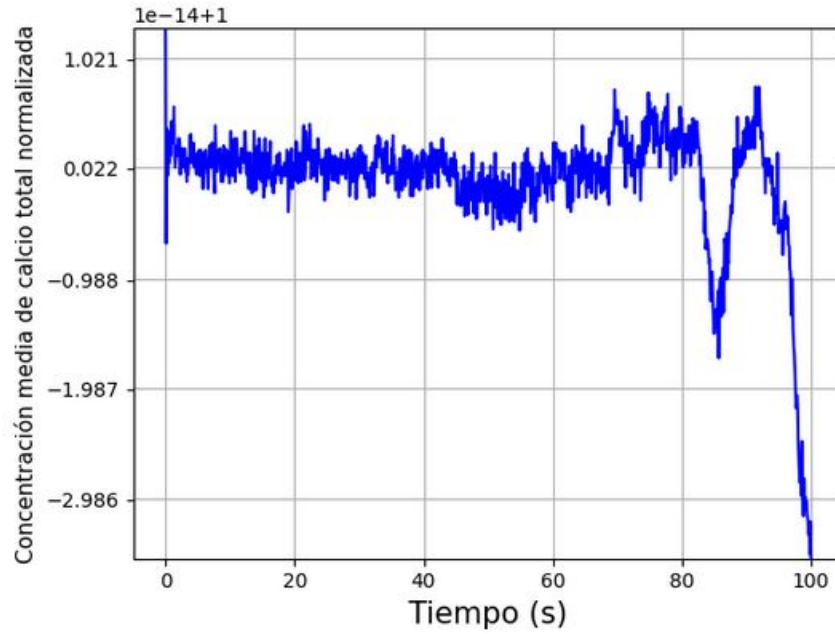
Figura 3.14: Simulación ángulo de 77.0 grados.



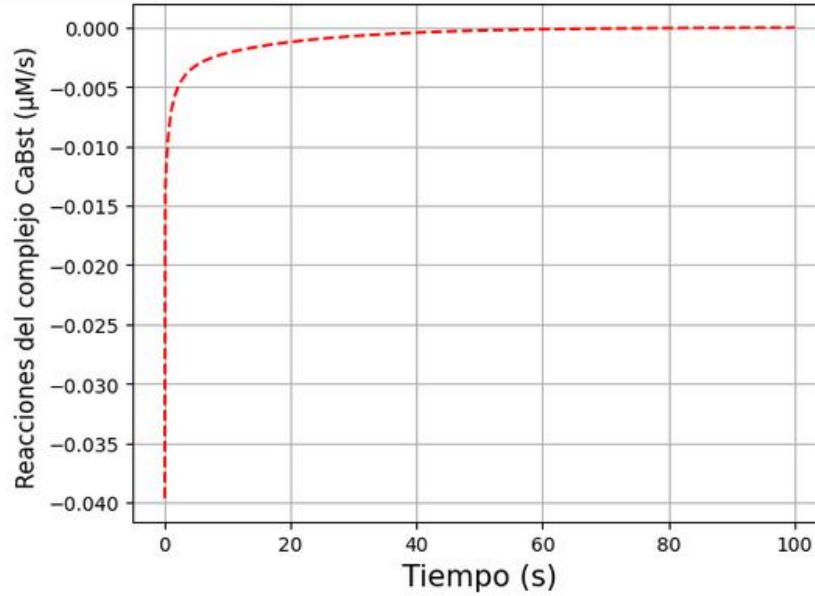
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

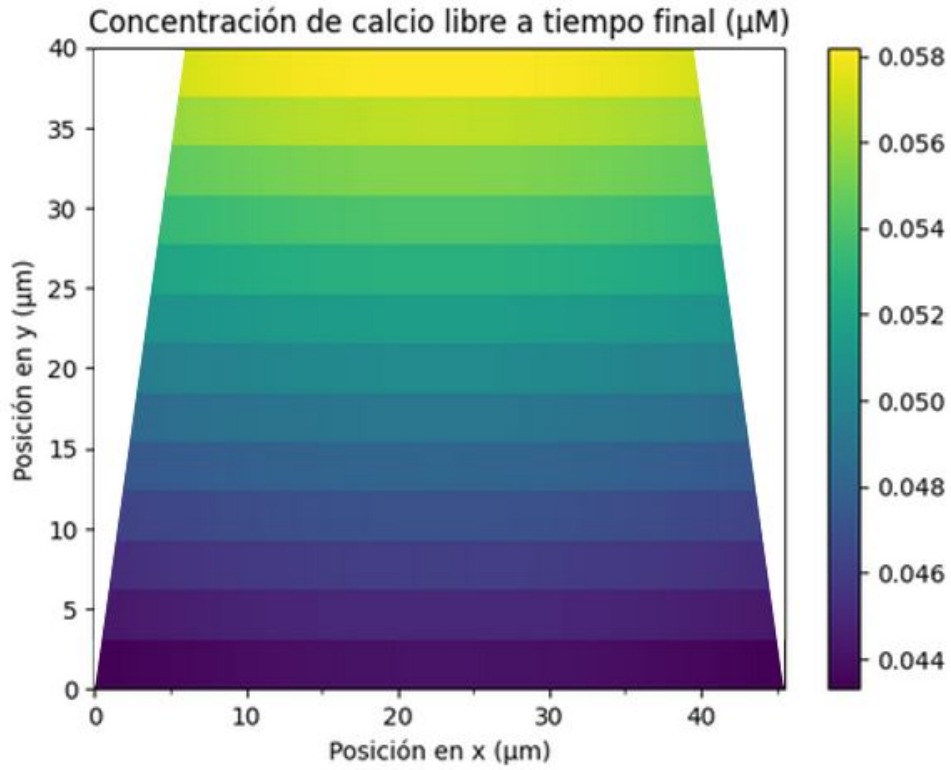


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

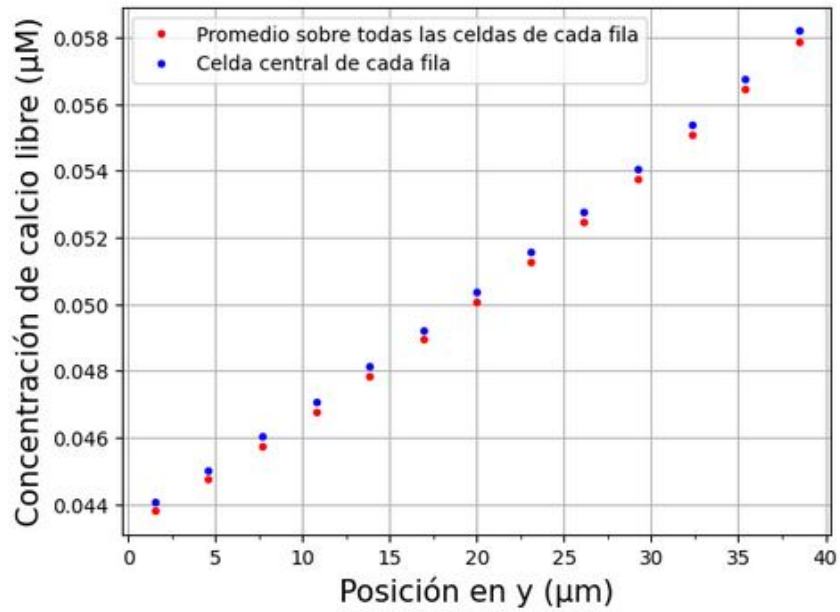


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

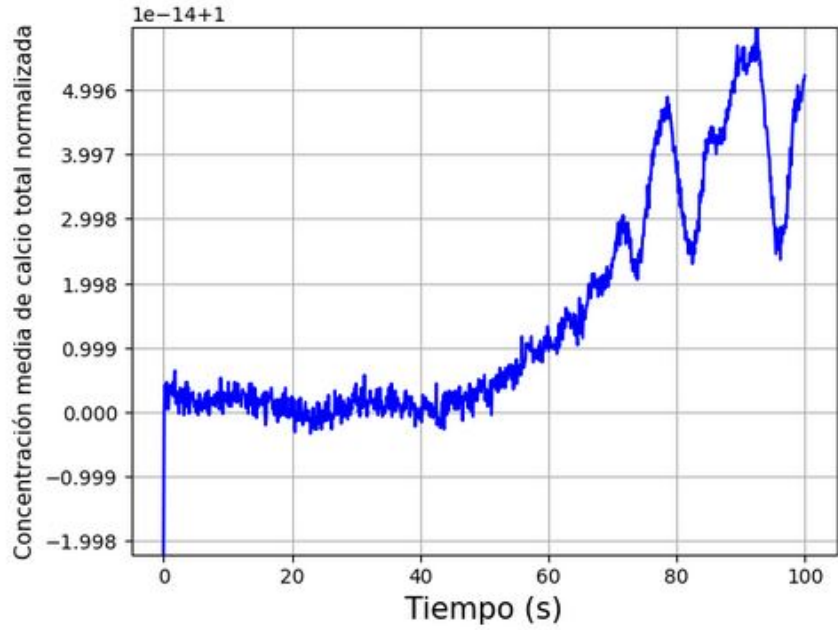
Figura 3.15: Simulación ángulo de 80.0 grados.



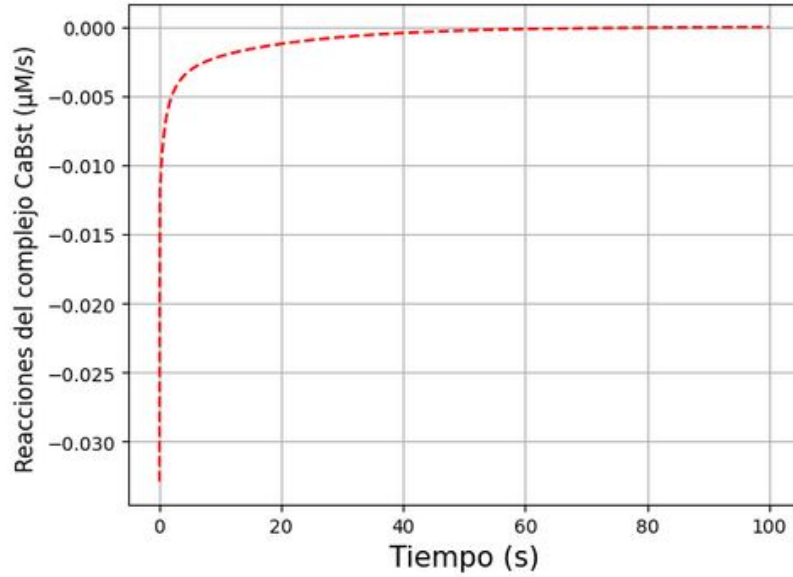
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

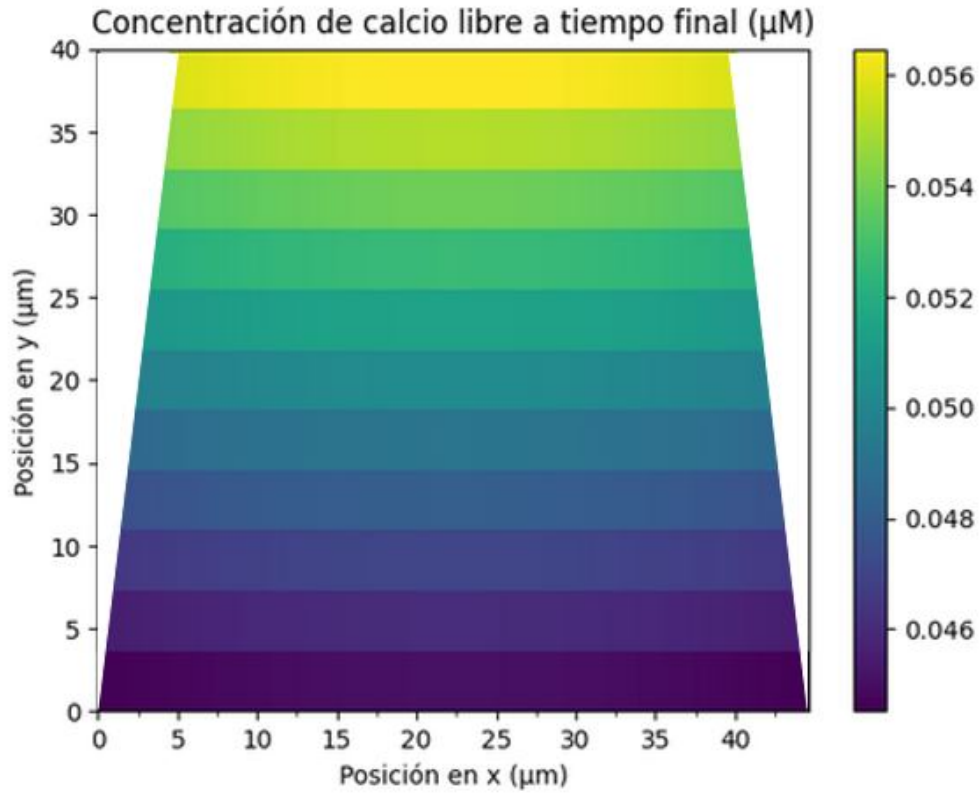


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

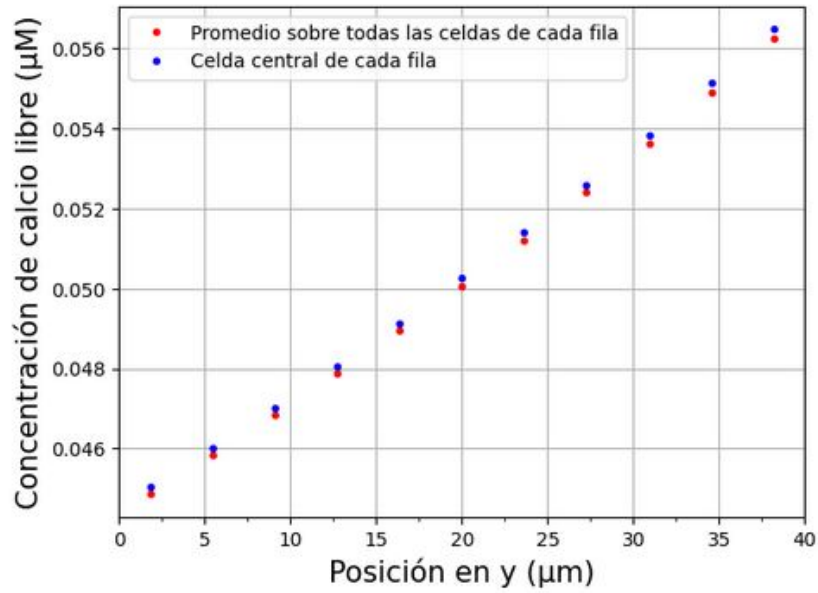


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático en función del tiempo.

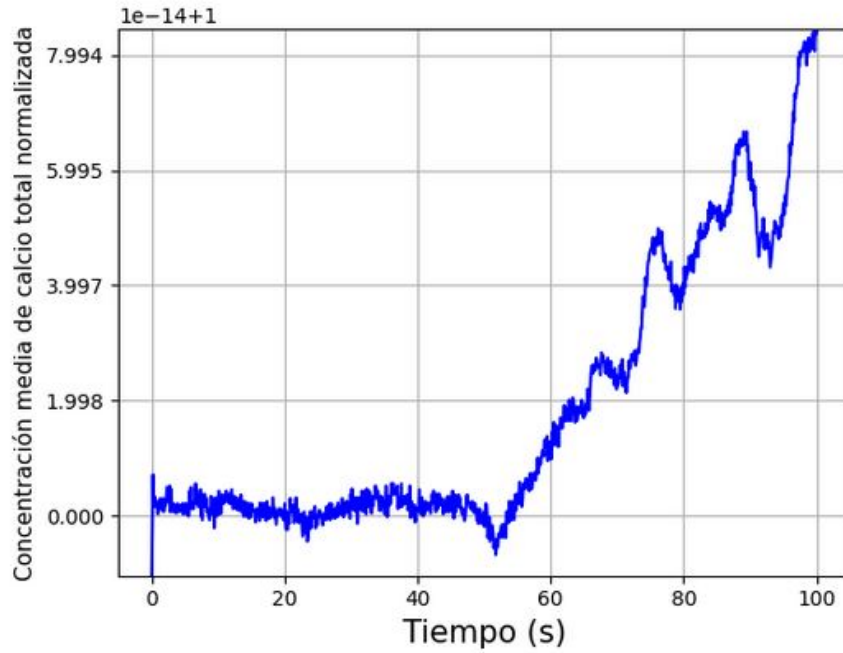
Figura 3.16: Simulación ángulo de 81.5 grados.



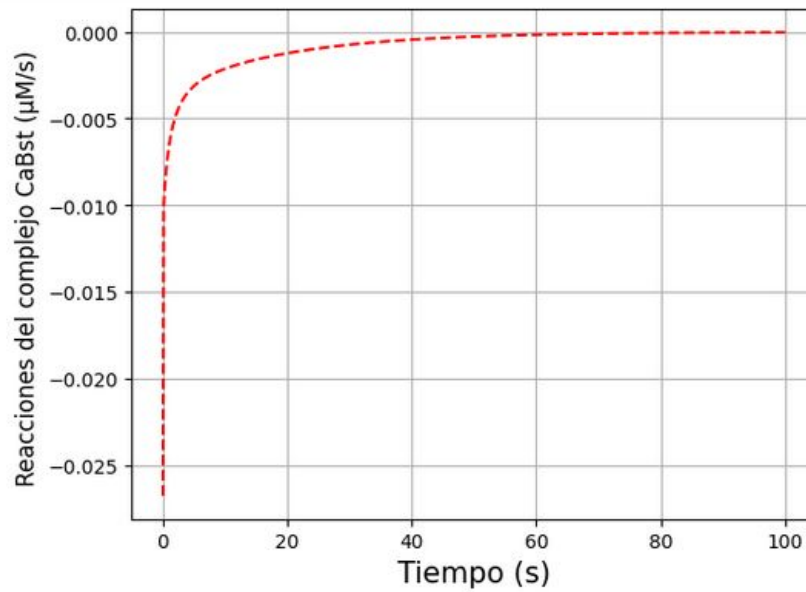
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.



(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.



(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

Figura 3.17: Simulación ángulo de 82.9 grados.

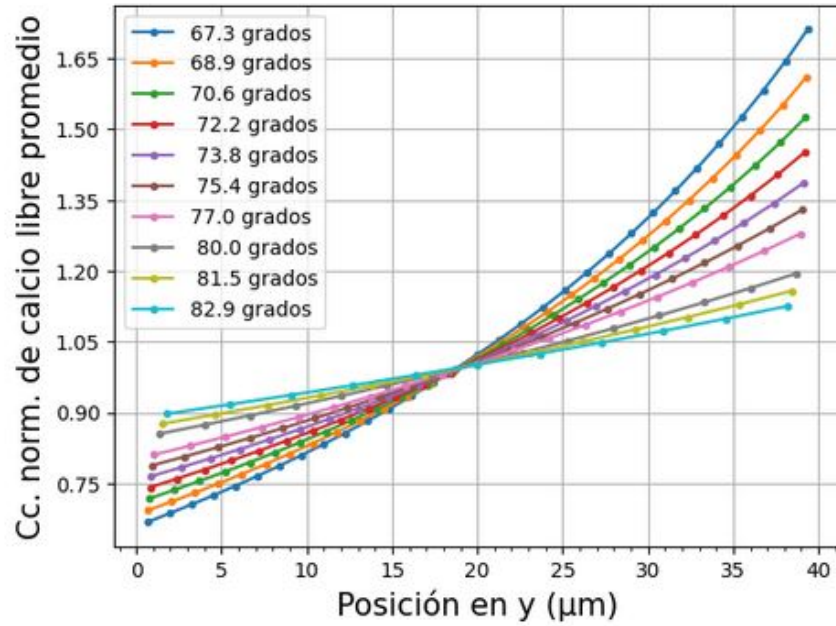


Figura 3.18: Para distintos ángulos se muestra el promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento. Dicha concentración fue normalizada por la concentración de calcio libre inicial.

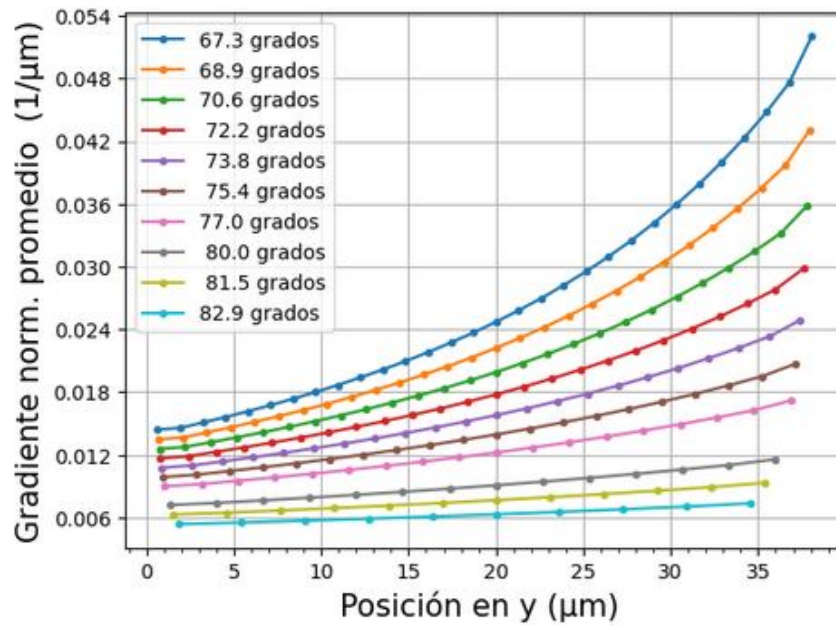


Figura 3.19: Para distintos ángulos se muestra el gradiente calculado numéricamente a partir del promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento. Dicho gradiente fue normalizado por la concentración de calcio libre inicial.

3.3.2. Perímetro y área constantes

En el presente apartado se estudió el efecto de fijar el perímetro y el área de los trapecios en la formación del gradiente. Para ello se tomaron 5 trapecios de ángulos distintos. Respecto a los parámetros utilizados, éstos fueron los mismos de las simulaciones del apartado 3.3.1, a excepción de las dimensiones de las células en reposo y por consiguiente del área, el perímetro y los flujos J_{in} y J_{out} definidos en la Sección 2.3.2.

Se consideró como “punto de partida” una región rectangular de base $50\mu m$, en la dirección perpendicular al desplazamiento de la célula, y de altura $30\mu m$, en la dirección paralela. La elección de un rectángulo de base mayor a la altura en vez de un cuadrado no fue arbitraria. Esta geometría fue necesaria para garantizar áreas y perímetros constantes en los trapecios tal que sus alturas no fueran menores a la altura del rectángulo. Luego, el área resultó ser de $1500\mu m^2$ y el perímetro de $160\mu m$.

Análogamente a la Sección anterior se eligió que el flujo neto integrado sobre toda el perímetro sea nulo. Utilizando la ecuación 3.5 resulta $J_{out} = 5,53125\mu M\mu m/s$, mientras que J_{in} se calculó para cada cara de cada trapecio según la ecuación 3.6. Los flujos integrados salientes y entrantes sobre cada segmento se muestran en las tablas 3.5 y 3.6, respectivamente. El módulo del flujo neto integrado sobre todo el perímetro nunca superó el orden de $10^{-10}\mu M\mu m^2/s$ para ninguno de los ángulos.

Los mapas de color de la concentración de Ca^{2+} libre resultado de las simulaciones se muestran en 3.20a, 3.21a, 3.22a, 3.23a y 3.24a. Puede verse que los gradientes formados son muy similares a los mapas de la Sección 3.3.1. No obstante, en este apartado la diferencia entre la concentración máxima, la del centro de la fila, y la concentración mínima, la de los extremos, fue mucho más acentuada. En 3.20b, 3.21b, 3.22b, 3.23b y 3.24b se graficó la concentración de calcio libre promedio sobre cada fila y la concentración en la celda central en función de la posición en y . Allí puede verse que efectivamente las curvas siguen la misma tendencia que las curvas del apartado anterior. Mientras que en las figuras 3.25b y 3.25a, se muestra para 5 ángulos distintos, la razón entre el valor de concentración de la celda central y la concentración media de las simulaciones de este apartado y del anterior, respectivamente. Como la altura del trapecio de cada simulación es distinta se optó por utilizar una escala de

posición relativa la cual crece linealmente de 0 a 180, donde 0 representa la posición de la base mayor y 180 la posición de la base menor. En ambos gráficos se aprecia como a medida que disminuye el ángulo, es decir el trapecio se aleja más de la geometría de la célula no polarizada, la razón es mayor. Por su parte, para cada ángulo la razón aumenta en dirección a la base mayor, la cual representa el frente de la célula. Comparando las curvas entre ambos gráficos, se ve que para ángulos ligeramente menores de las simulaciones de esta Sección respecto a los de la Sección anterior la razón resulta significativamente mayor.

Las gradientes observados dentro de cada fila pueden atribuirse en parte al flujo neto integrado de Ca^{2+} libre sobre las caras laterales del trapecio. En la figura 3.26 puede verse cómo a medida que el ángulo interior tiende a 90 grados, el flujo neto integrado sobre una de las caras laterales tiende a cero. El gráfico para la otra cara es idéntico. Sin embargo, el flujo neto para ángulos similares es de magnitud significativamente mayor comparando ambos conjuntos de simulaciones. Esto puede explicarse debido a que el flujo saliente para cada segmento viene dado por la ecuación 3.5, mientras que la razón entre la cara lateral del trapecio y la altura del rectángulo es mucho mayor que la relación entre la cara lateral del trapecio y el lado del cuadrado (ver figura 3.27). Por su parte, la relación que existe entre los flujos sobre las bases del trapecio y el gradiente en el eje y no es tan clara.

En la figura 3.28 se muestra para cada ángulo el promedio de la concentración por fila de calcio libre normalizada por la concentración inicial en función de la posición a lo largo de la altura del trapecio. Comparando con la figura 3.18 se advierte que la relación entre la concentración adelante y atrás fue levemente menor para ángulos similares. A partir de la derivada numérica en dirección del eje de movimiento de esas curvas se obtuvo el gráfico 3.29. Contrastando con 3.19 se ve como para ángulos similares en la zona delantera, los gradientes fueron relativamente menores mientras que en la parte trasera no se observan diferencias cualitativas.

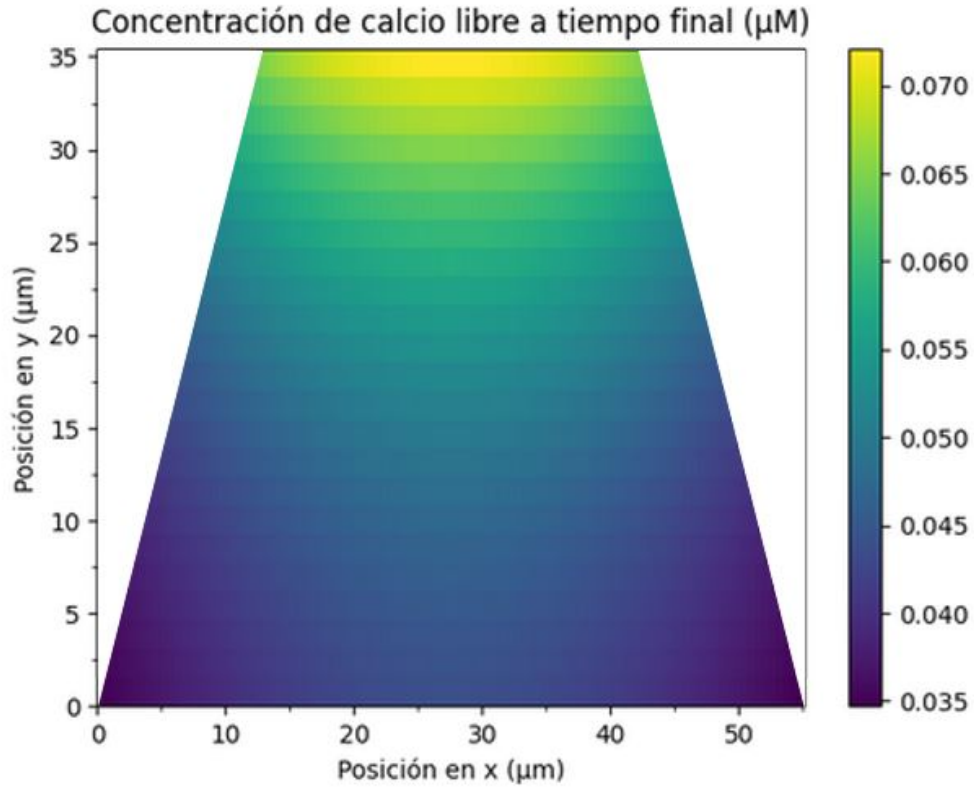
Por su parte, en 3.20c, 3.21c, 3.22c, 3.23c y 3.24c se muestra cómo efectivamente la concentración media de Ca^{2+} total se conserva en cada simulación. Por su parte la derivada temporal media del complejo calcio libre - *buffer* tiende a cero como se esperaría según 3.20d, 3.21d, 3.22d, 3.23d y 3.24d.

Ángulo (grados)	Flujo saliente integrado cara lateral ($\mu M \mu m^2/s$)	Flujo saliente integrado base menor ($\mu M \mu m^2/s$)	Flujo saliente integrado base mayor ($\mu M \mu m^2/s$)
70.1	208.5434662330282	163.15389854808015	304.7591689860361
71.6	196.98482584067943	183.35943386583295	307.67091445283796
73.6	187.6917698580621	201.98213364910276	307.6343266347877
76.1	180.23904829430307	219.06503024829073	305.4568731631094
78.9	174.46278406929923	234.5325639393644	301.54186792203956

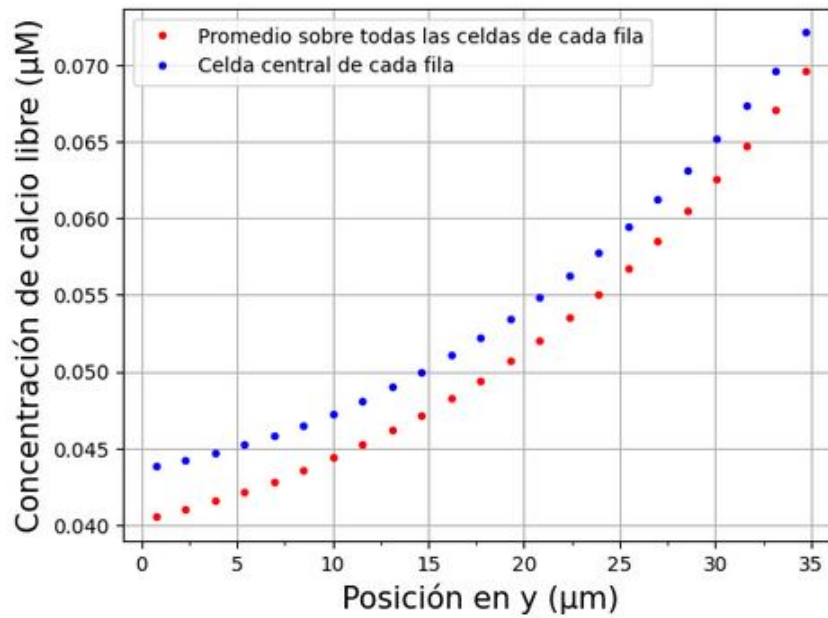
Tabla 3.5: Flujos salientes integrados sobre cara de los 5 trapecios de área y perímetro constantes. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales.

Ángulo (grados)	Flujo entrante integrado cara lateral ($\mu M \mu m^2/s$)	Flujo entrante integrado base menor ($\mu M \mu m^2/s$)	Flujo entrante integrado base mayor ($\mu M \mu m^2/s$)
70.1	165.9375	276.56249999999994	276.56249999999997
71.6	165.9375	276.5625	276.56249999999997
73.6	165.9375	276.56249999999996	276.56249999999997
76.1	165.937500000000003	276.562500000000006	276.56249999999997
78.9	165.9375	276.562500000000057	276.56249999999997

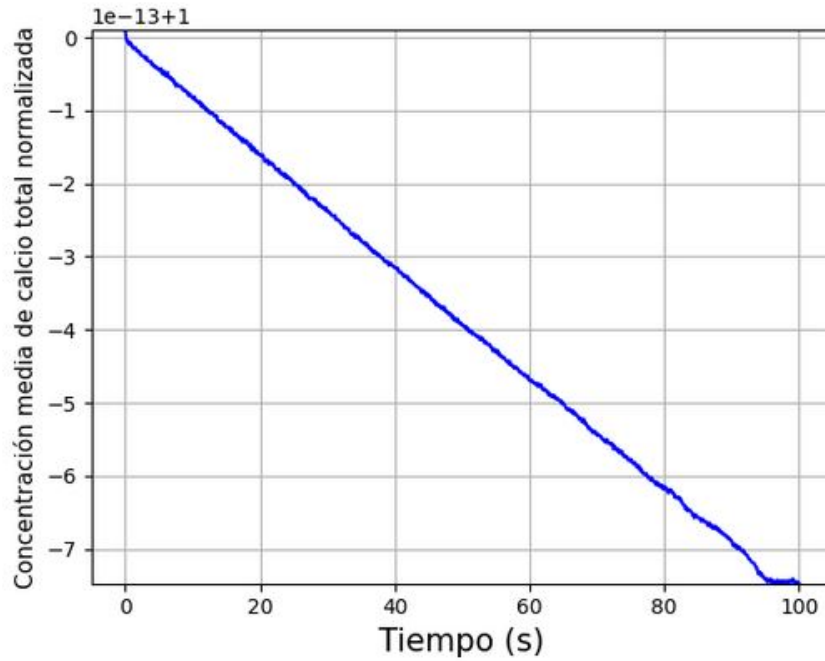
Tabla 3.6: Flujos entrantes integrados sobre cada cara de los 5 trapecios de área y perímetro constantes. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales.



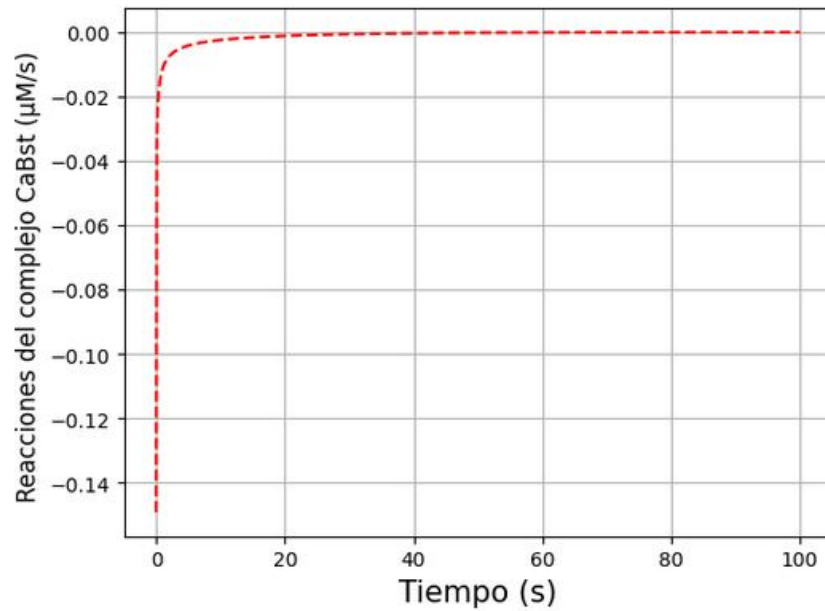
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

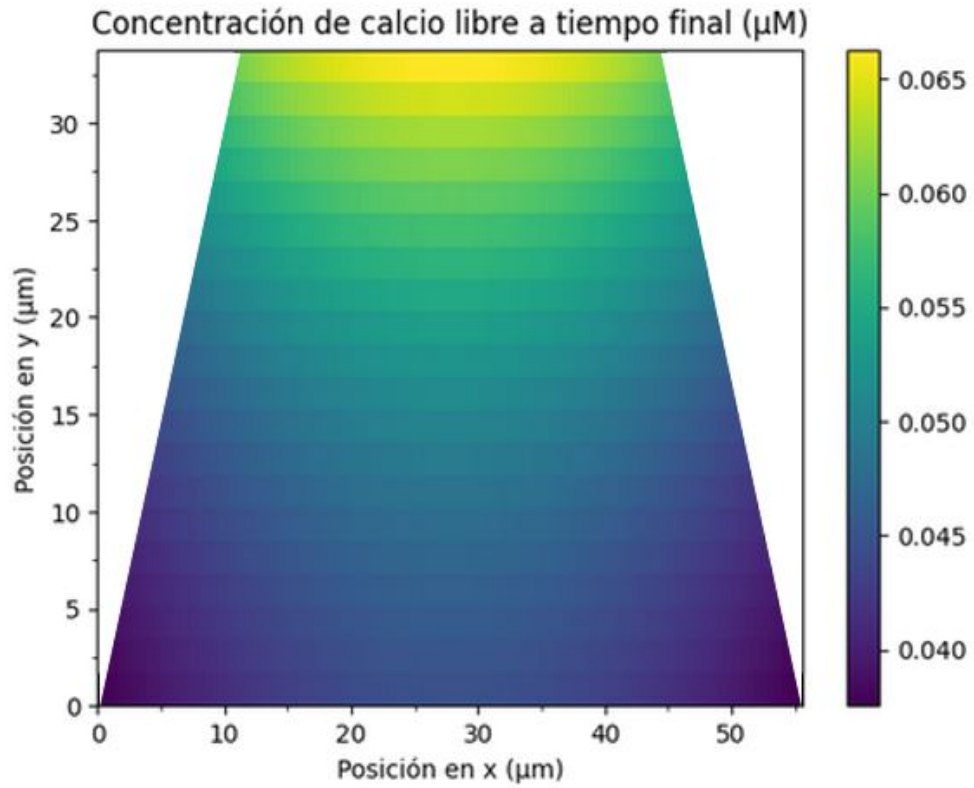


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

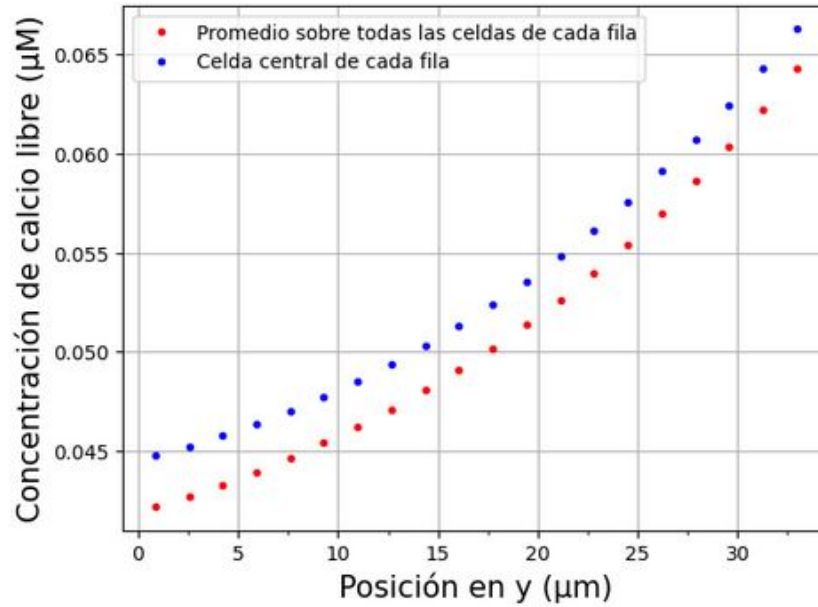


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

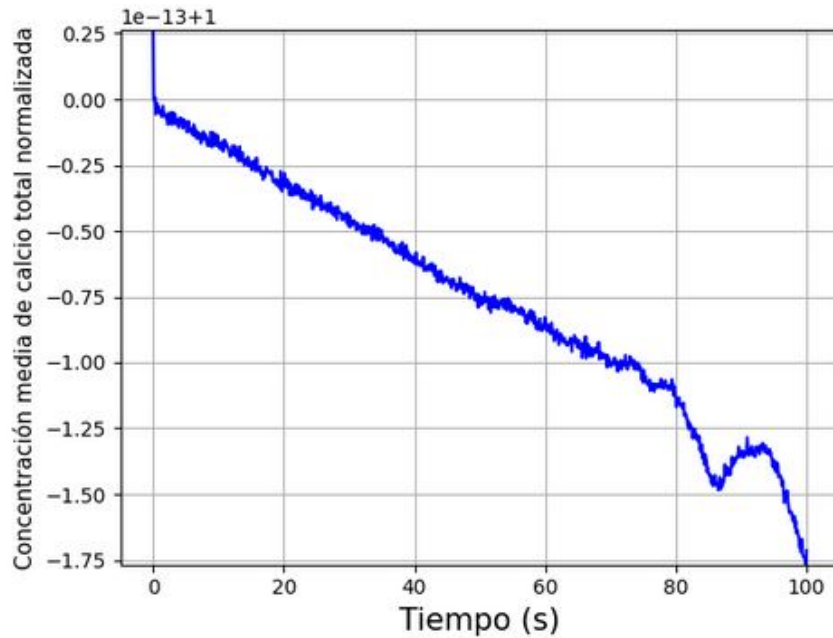
Figura 3.20: Simulación ángulo de 70.1 grados.



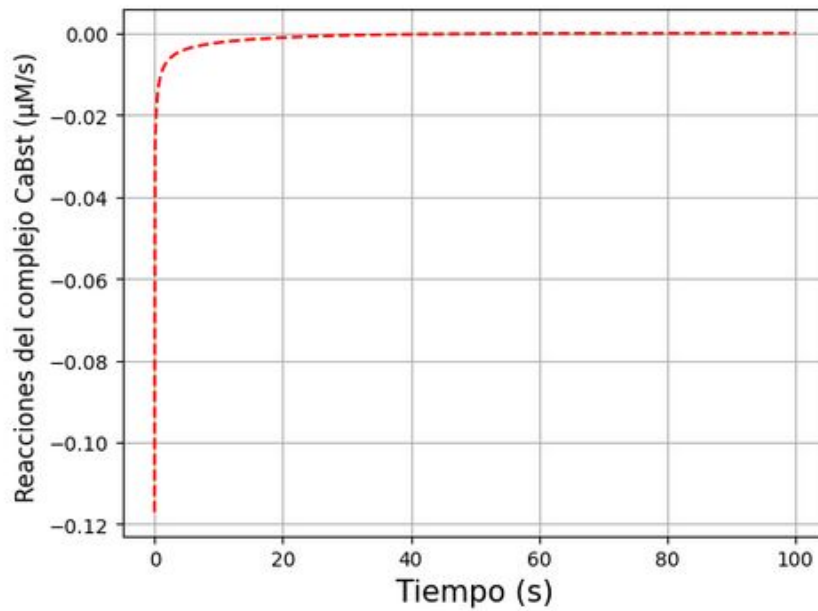
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

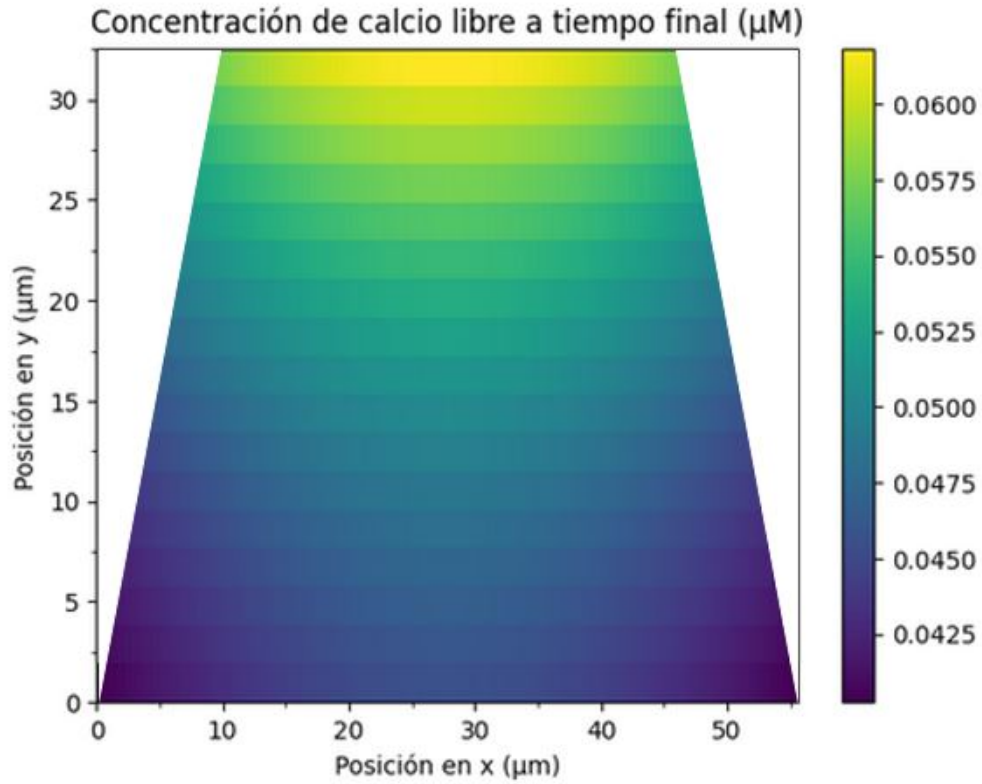


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

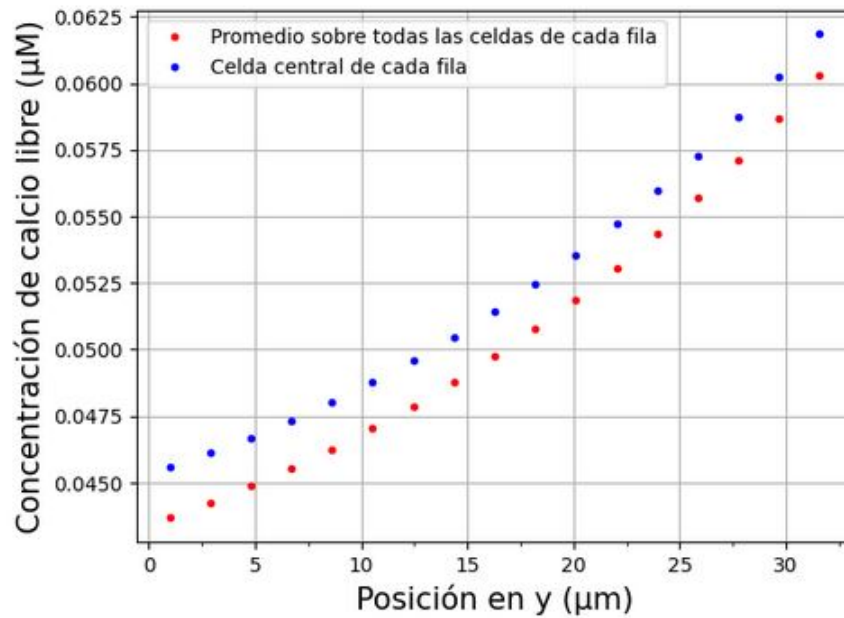


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

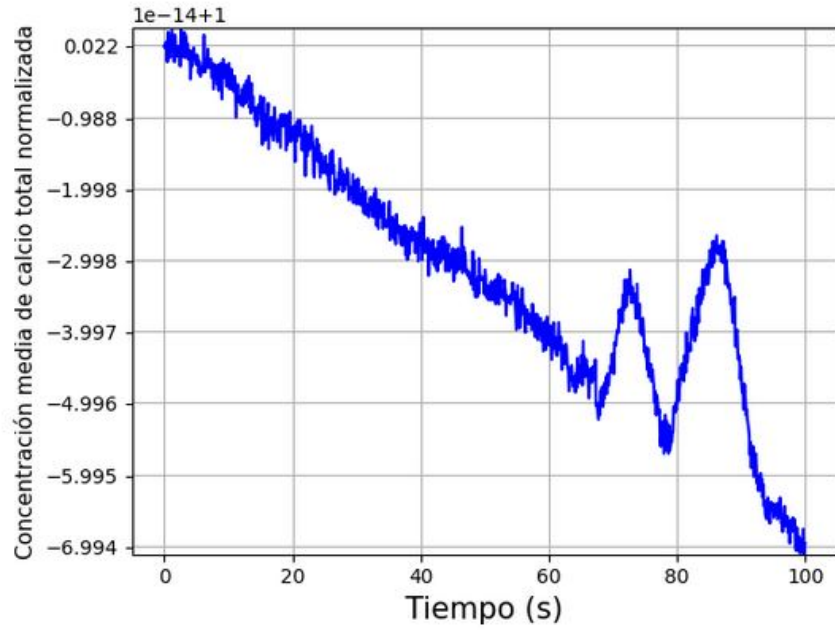
Figura 3.21: Simulación ángulo de 71.6 grados.



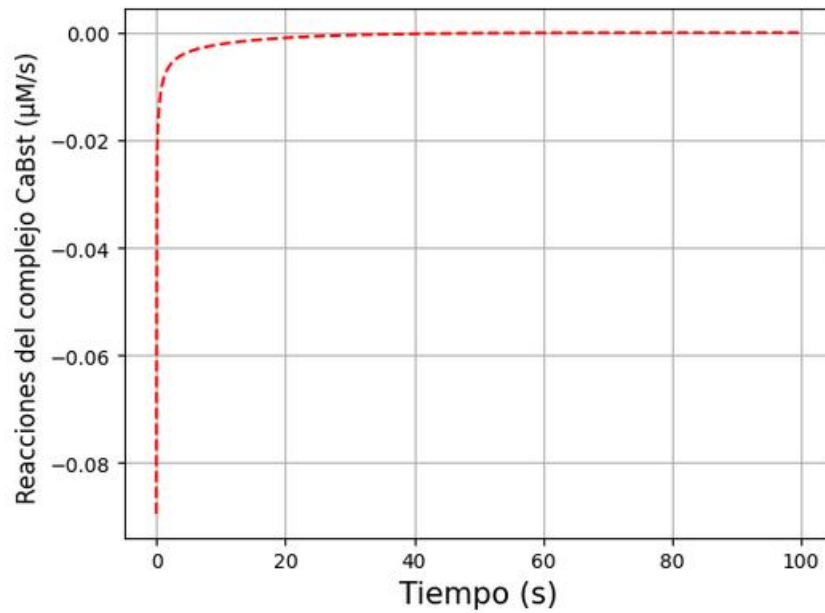
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

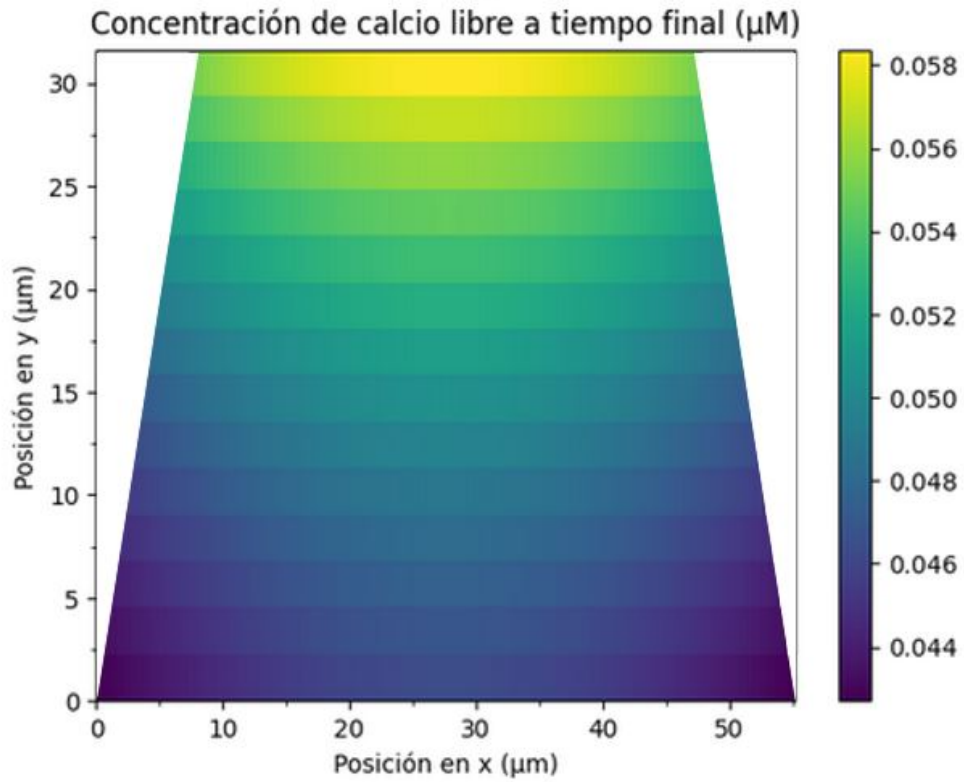


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

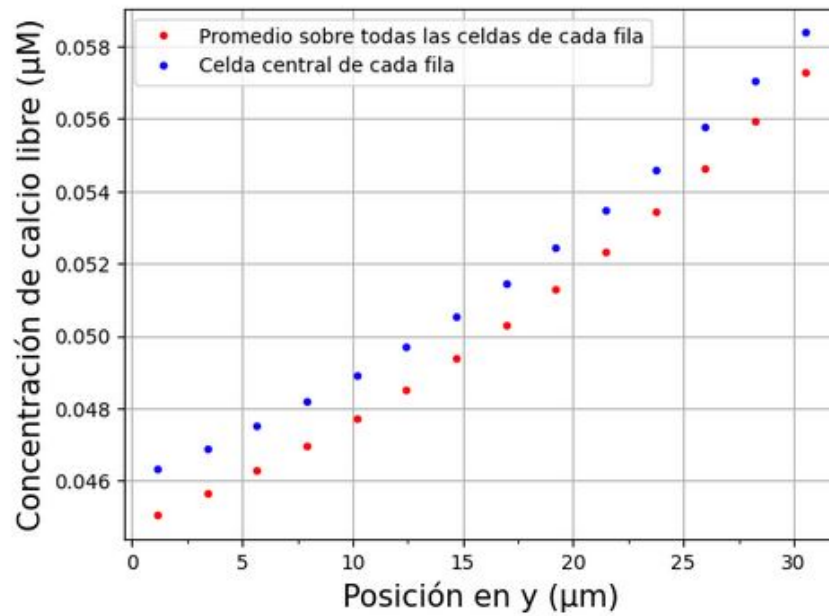


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

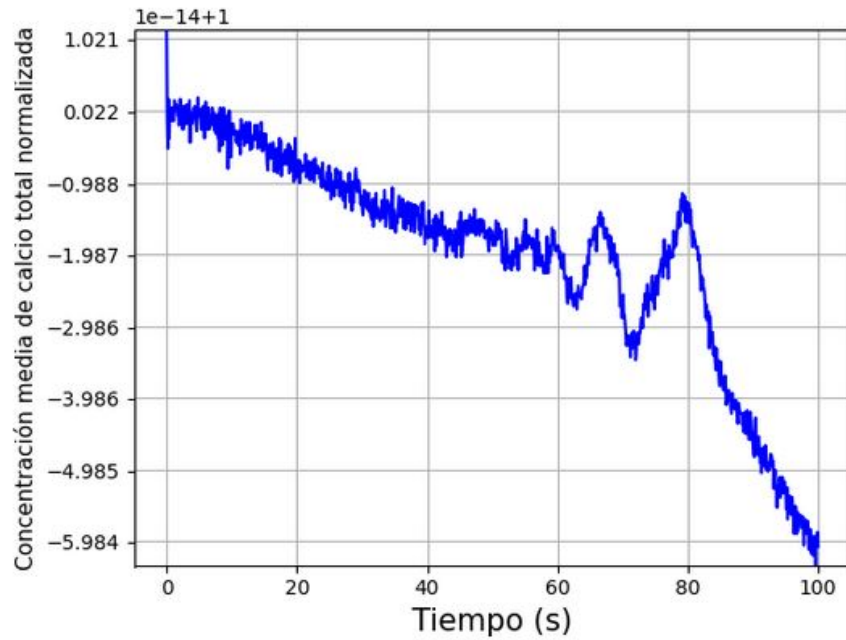
Figura 3.22: Simulación ángulo de 73.6 grados.



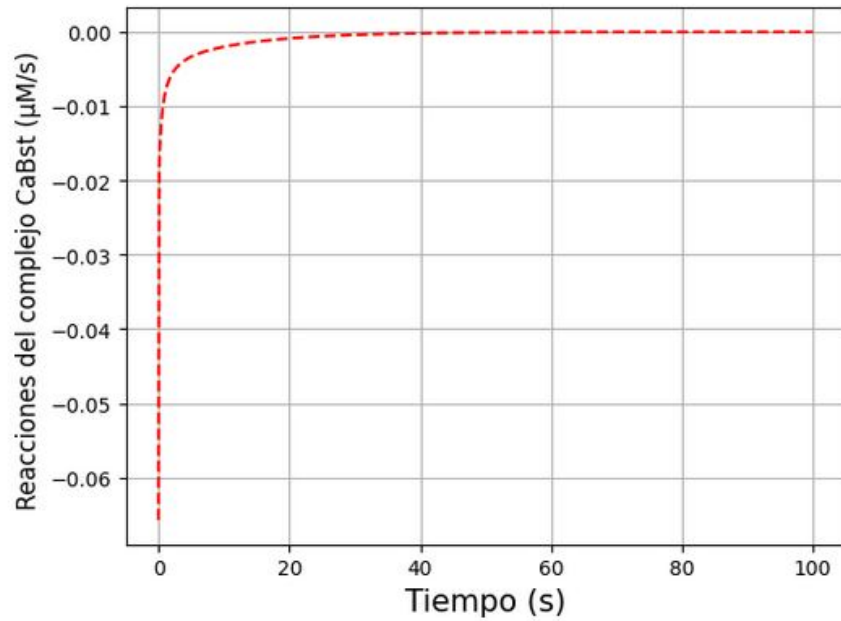
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

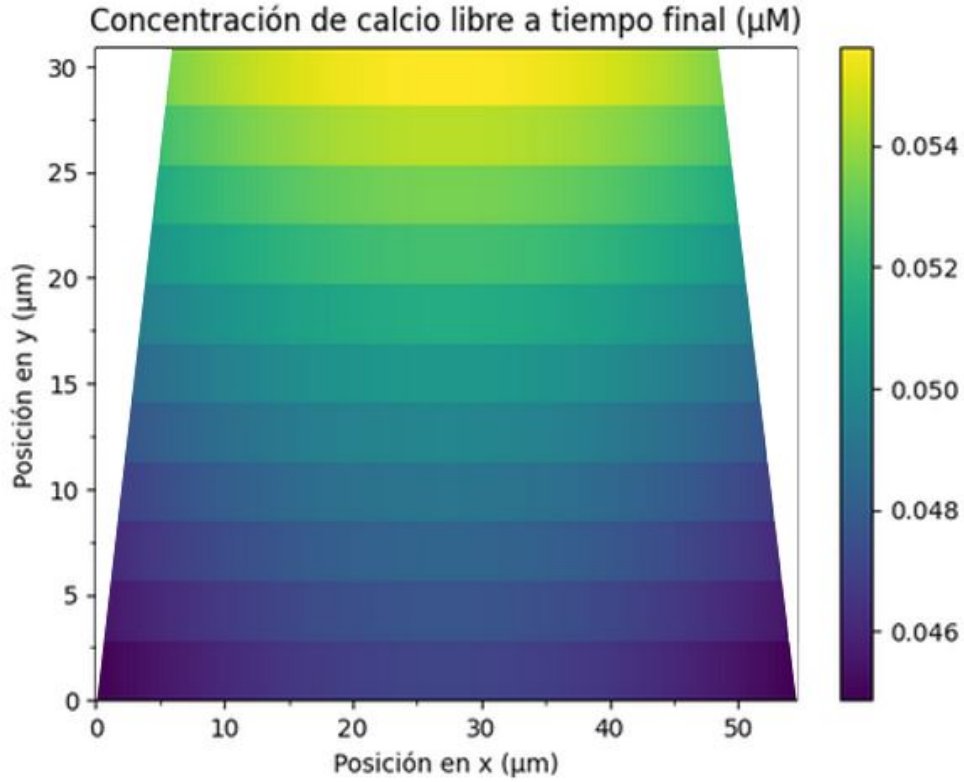


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

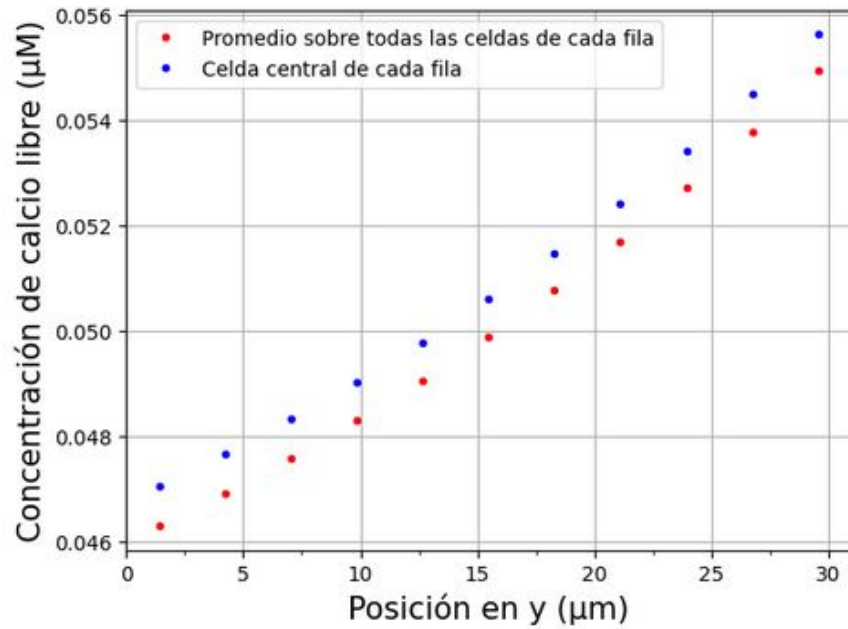


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

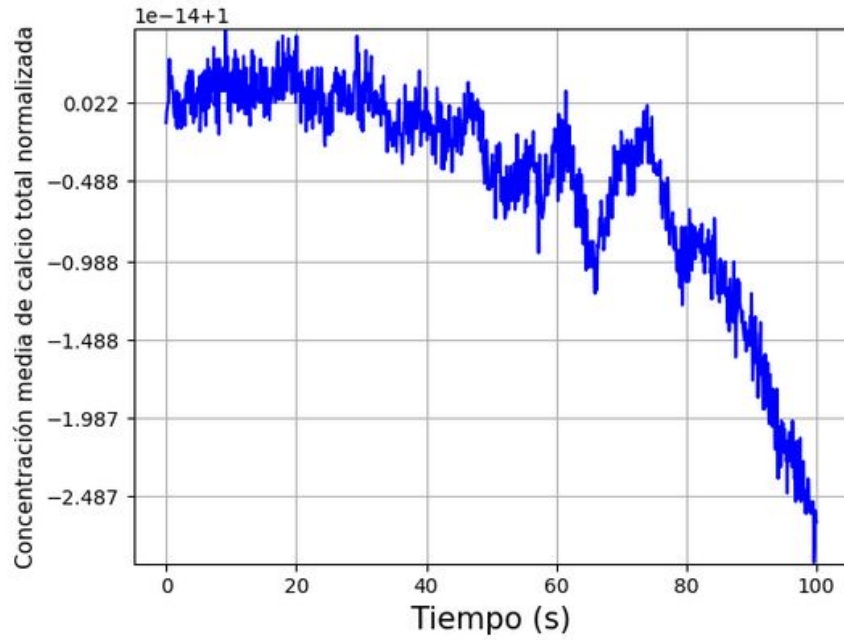
Figura 3.23: Simulación ángulo de 76.1 grados.



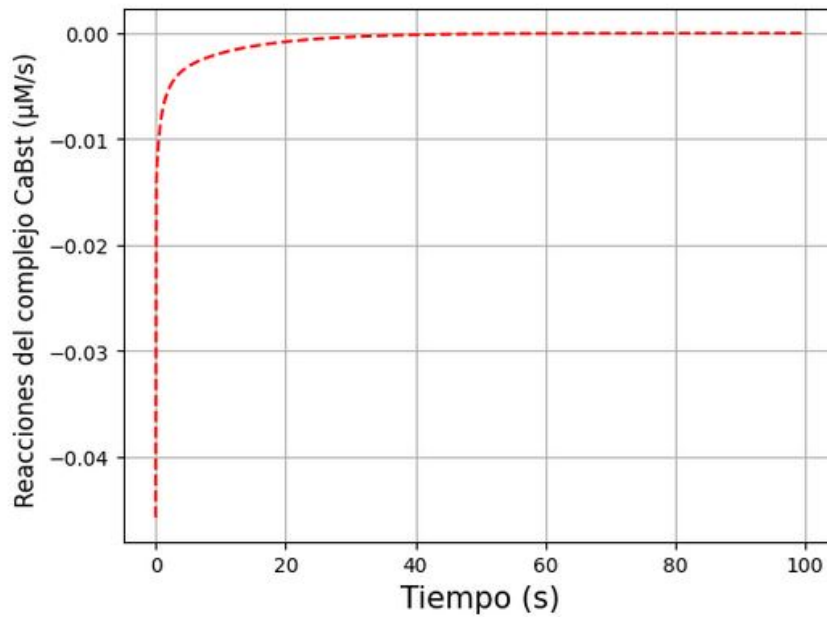
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

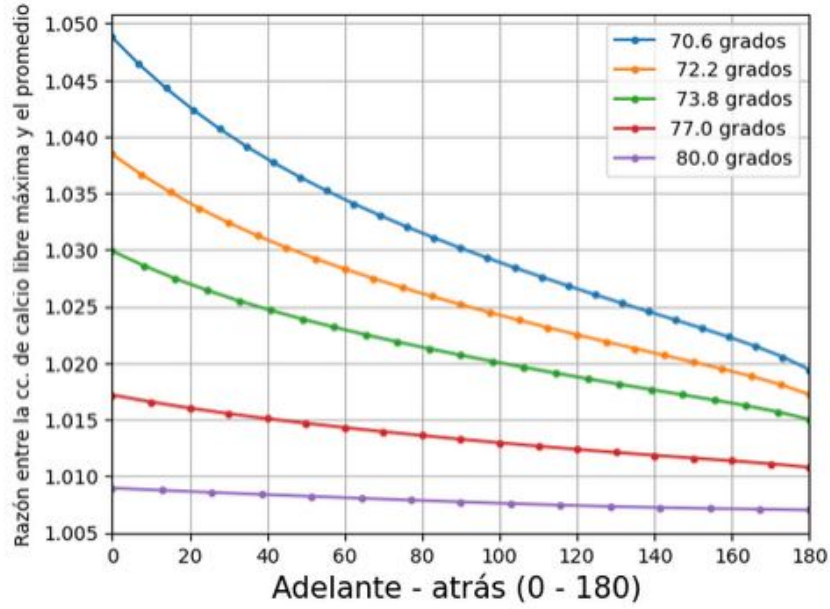


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

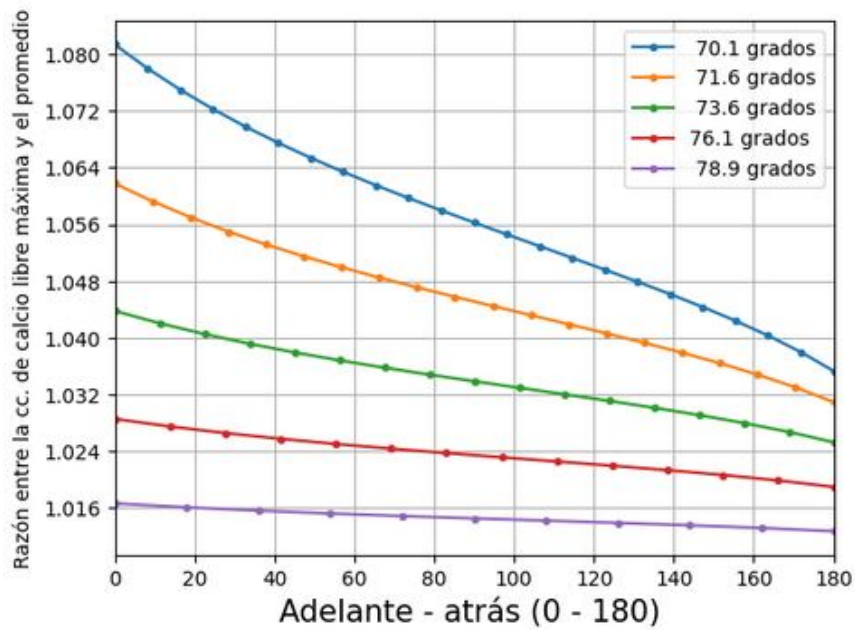


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

Figura 3.24: Simulación ángulo de 78.9 grados.



(a) Simulaciones con altura y perímetro constante.



(b) Simulaciones con área y perímetro constante.

Figura 3.25: Razón entre el valor de calcio libre máximo y la media para cada fila en función de su posición en la dirección de movimiento.

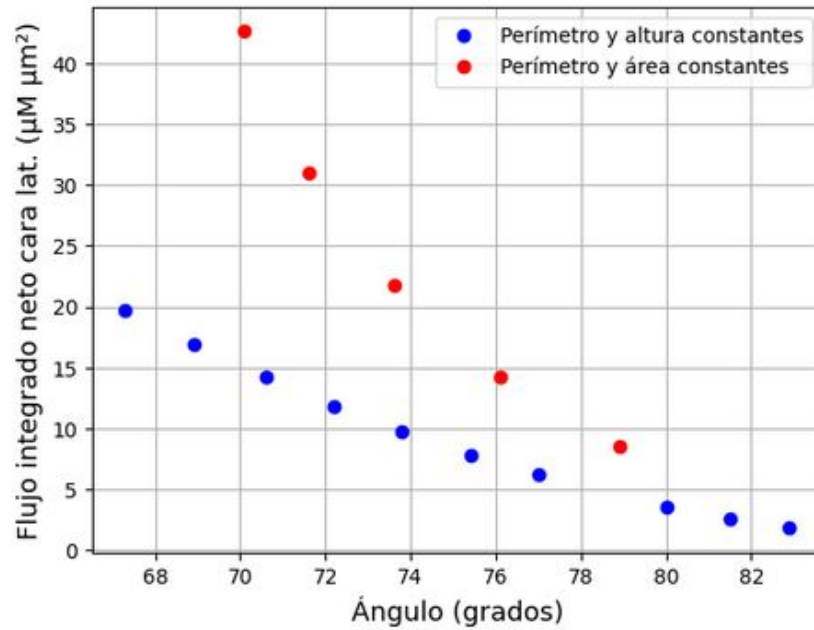


Figura 3.26: Flujo neto integrado sobre una cara lateral de los trapecios de ambas simulaciones en función del ángulo. Los flujos netos integrados laterales en todas las simulaciones son hacia el interior del recinto. Los valores de flujos neto integrados son idénticos para la otra cara lateral.

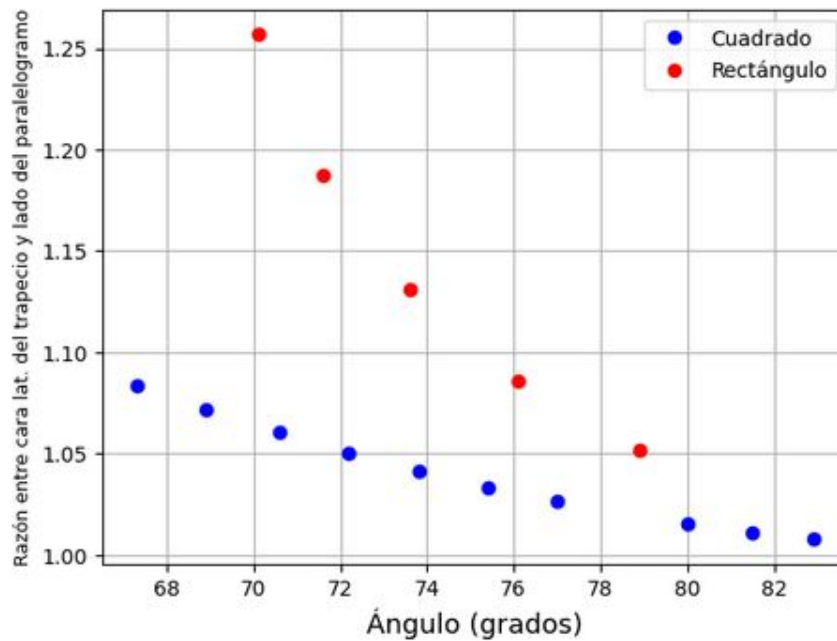


Figura 3.27: Razón entre la cara lateral del trapecio y el lado del cuadrado en azul. Análogo para el rectángulo en rojo.

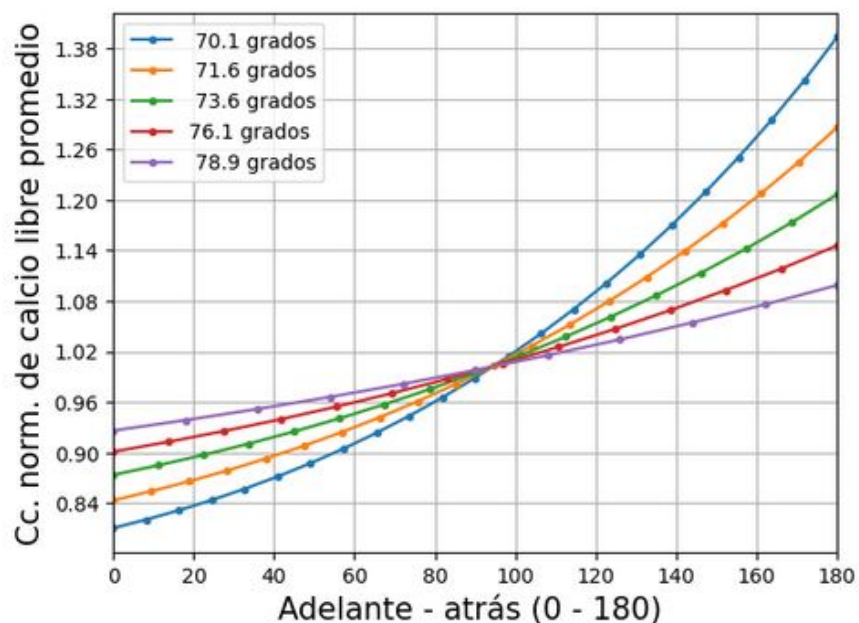


Figura 3.28: Para distintos ángulos se muestra el promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento. Dicha concentración fue normalizada por la concentración de calcio libre inicial.

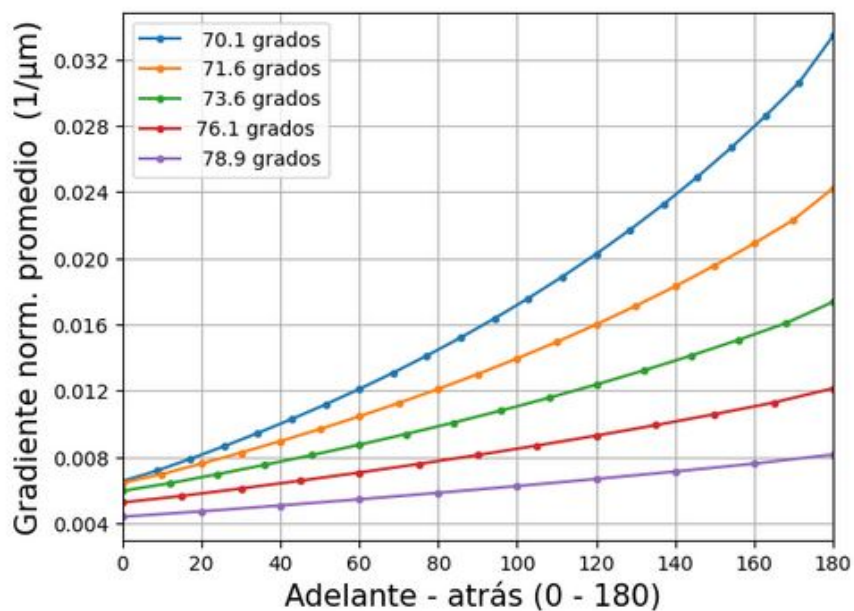


Figura 3.29: Para distintos ángulos se muestra el gradiente calculado numéricamente a partir del promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento. Dicho gradiente fue normalizado por la concentración de calcio libre inicial.

3.4. La región de la base menor del trapecio como representación de la zona delantera de la célula polarizada

En esta Sección presentamos los resultados de simulaciones donde el flujo neto entrante es mayor en la zona de la base mayor del trapecio, por lo que los interpretaremos suponiendo que la zona de la base menor corresponde al lamelipodio. Se hicieron en particular, simulaciones manteniendo distintas cantidades constantes como se describe en lo que sigue.

3.4.1. Igual cantidad de bombas sobre los lados del trapecio

Para este subconjunto de simulaciones se utilizaron nuevamente los parámetros del subconjunto de simulaciones de la Sección 3.3.1. No obstante, en esta oportunidad fue J_{in} el que se consideró constante e igual para cada una de los lados de los trapecios. Luego el flujo hacia el interior del trapecio integrado sobre cada uno de estos segmentos resultó distinto mientras que el flujo hacia el exterior se definió como

$$J_{out}^i = J_{in}l/d_i \quad (3.7)$$

con

$$d_1 = d_3 = \textit{longitud de los catetos},$$

$$d_2 = \textit{longitud de la base mayor y}$$

$$d_4 = \textit{longitud de la base menor};$$

lo que implica que flujo hacia afuera integrado sobre cada segmento sea el mismo. A diferencia de los dos subconjuntos de simulaciones anteriores donde el flujo hacia afuera integrado sobre cada segmento era distinto, con esta nueva elección de los flujos se es consistente con la hipótesis de que la deformación de la célula puede causar una redistribución de las bombas PMCA manteniendo su número constante como fue explicado anteriormente. Notar que,

por como se eligieron los J_{in} y J_{out} en las Secciones anteriores para un dado ángulo el flujo saliente integrado sobre un dado lado en las simulaciones de este apartado, se corresponde con el flujo entrante integrado sobre ese mismo lado de la Sección 3.3.1. Para una mayor claridad se muestran en las tablas 3.7 y 3.8 los flujos integrados, hacia fuera y hacia dentro respectivamente, para las simulaciones de esta Sección y en 3.4 y 3.3 los de la otra Sección.

En las figuras 3.30a, 3.31a, 3.32a, 3.33a y 3.34a se muestra la concentración de calcio libre tras 10^7 iteraciones. Nuevamente se visualiza un gradiente en la dirección y , así como también que para cada fila la concentración no es uniforme. Efectivamente estas observaciones se confirman en los gráficos 3.30b, 3.31b, 3.32b, 3.33b y 3.34b. Teniendo en cuenta que ahora la posición $y = 0$ representa el borde trasero de la célula, las curvas de la concentración de calcio libre disminuyen, al igual que antes, hacia la zona delantera. La principal diferencia que se observa es la concavidad de las curvas, las cuales resultan opuestas al caso anterior. Esto implica que el gradiente ahora varía mucho más en la zona delantera que la trasera, es decir lo opuesto de lo que ocurre en las simulaciones de 3.3.1. Si calculamos la derivada numérica en y podemos verlo con mayor claridad comprando 3.36 con 3.29.

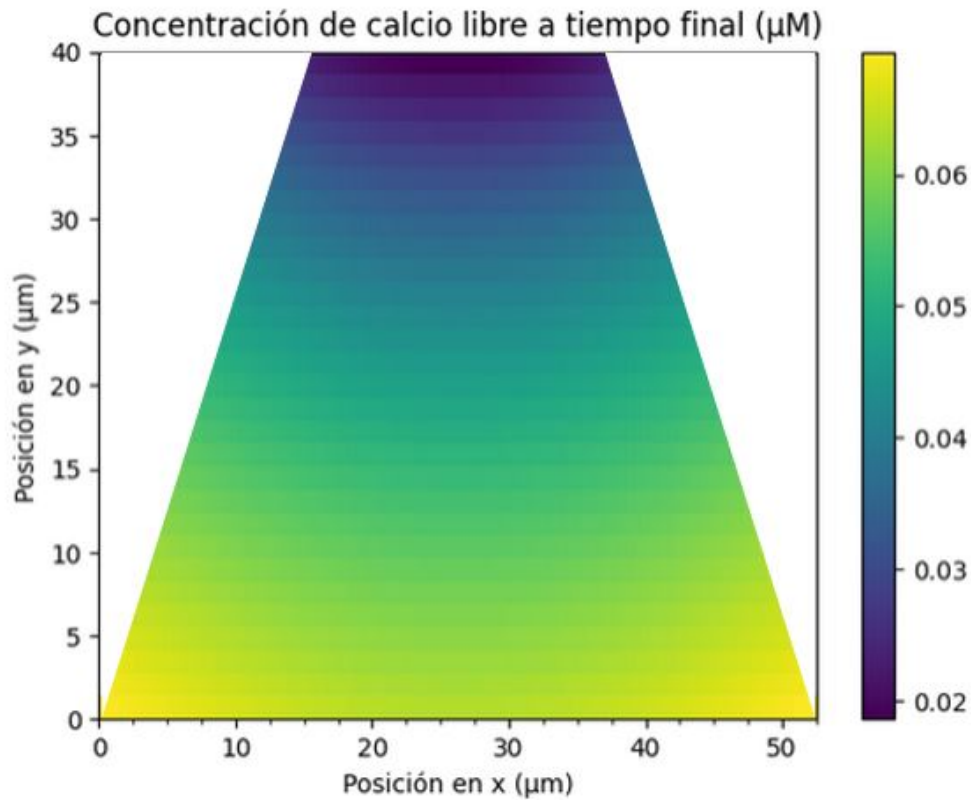
Por su parte, tal como era de esperar la concentración media de Ca^{2+} total se conserva durante cada simulación, ver figuras 3.30c, 3.31c, 3.32c, 3.33c y 3.34c. Mientras que la derivada temporal media del complejo calcio libre - *buffer* tiende a cero en el equilibrio como debe ser (ver gráficos 3.30d, 3.31d, 3.32d, 3.33d y 3.34d).

Ángulo (grados)	Flujo saliente integrado cara lateral ($\mu M \mu m^2 / s$)	Flujo saliente integrado base menor ($\mu M \mu m^2 / s$)	Flujo saliente integrado base mayor ($\mu M \mu m^2 / s$)
68.9	236.00000000000006	235.99999999999986	236.00000000000037
70.6	235.99999999999986	235.99999999999983	236.00000000000037
73.8	235.99999999999983	236.00000000000026	236.00000000000037
77.0	236.00000000000009	235.9999999999997	236.00000000000037
81.5	236.00000000000006	235.99999999999966	236.00000000000037

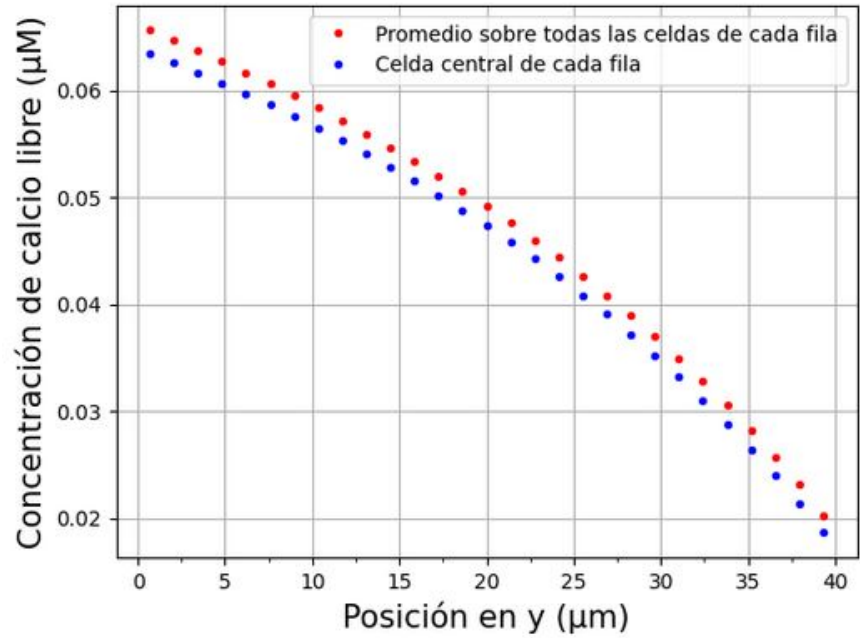
Tabla 3.7: Flujos salientes integrados sobre cada cara de los 5 trapecios de perímetro y altura constantes. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales.

Ángulo (grados)	Flujo entrante integrado cara lateral ($\mu M \mu m^2 / s$)	Flujo entrante integrado base menor ($\mu M \mu m^2 / s$)	Flujo entrante integrado base mayor ($\mu M \mu m^2 / s$)
68.9	252.86003778640597	128.35340643939196	309.92651798779946
70.6	250.2249476863988	138.60940769600148	304.94069693120355
73.8	245.73336069218638	157.7912089909757	294.7420696246532
77.0	242.22716470607529	175.20178691161766	284.34388367623194
81.5	238.62217077448656	198.09978527281973	268.65587317820746

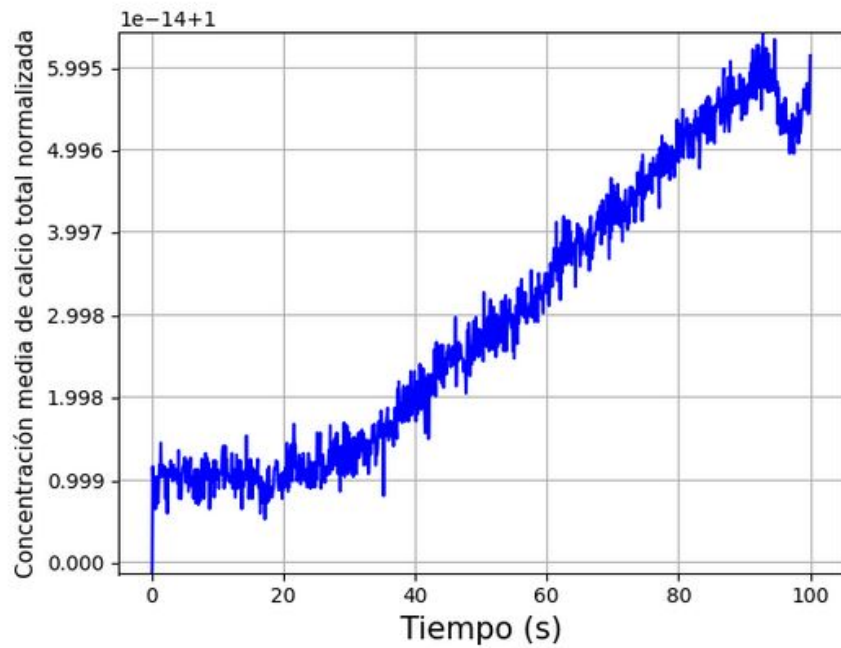
Tabla 3.8: Flujos entrantes integrados sobre cada cara de los 5 trapecios de perímetro y altura constantes. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales.



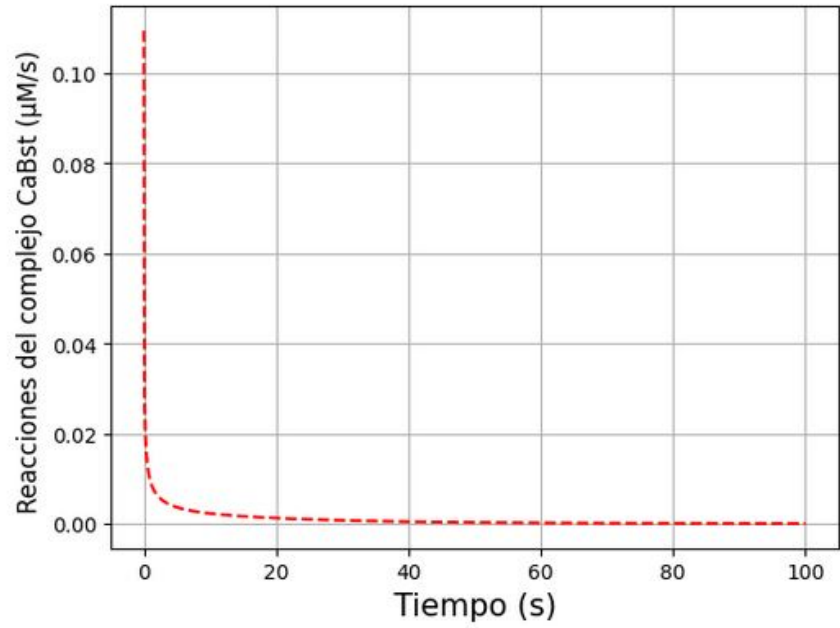
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

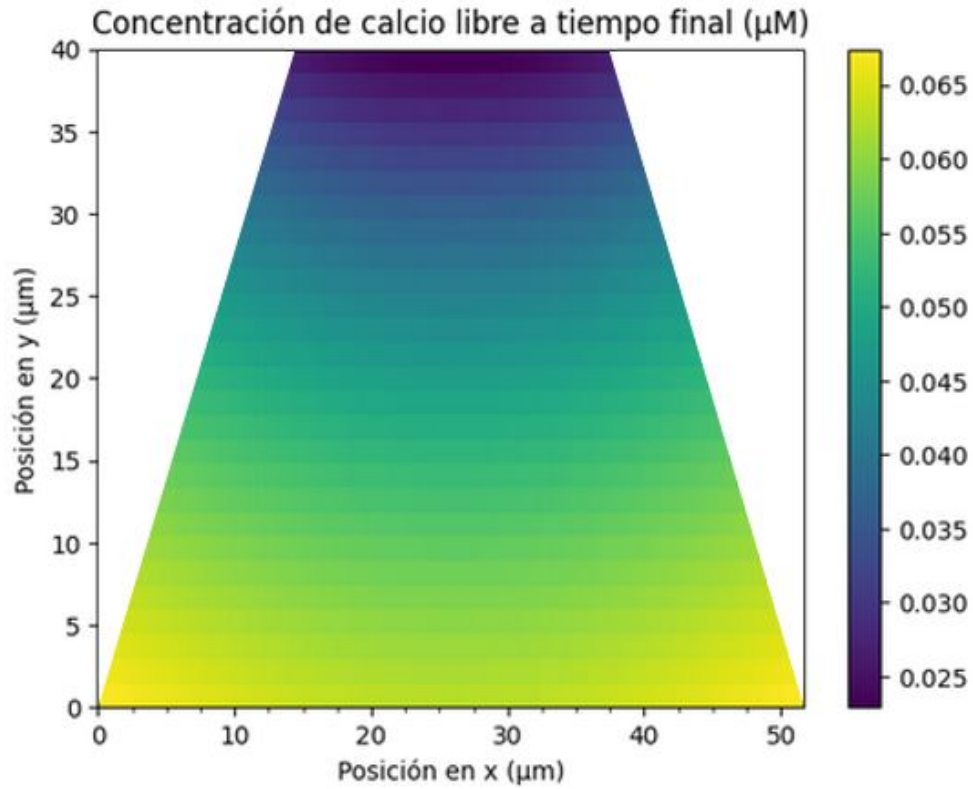


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

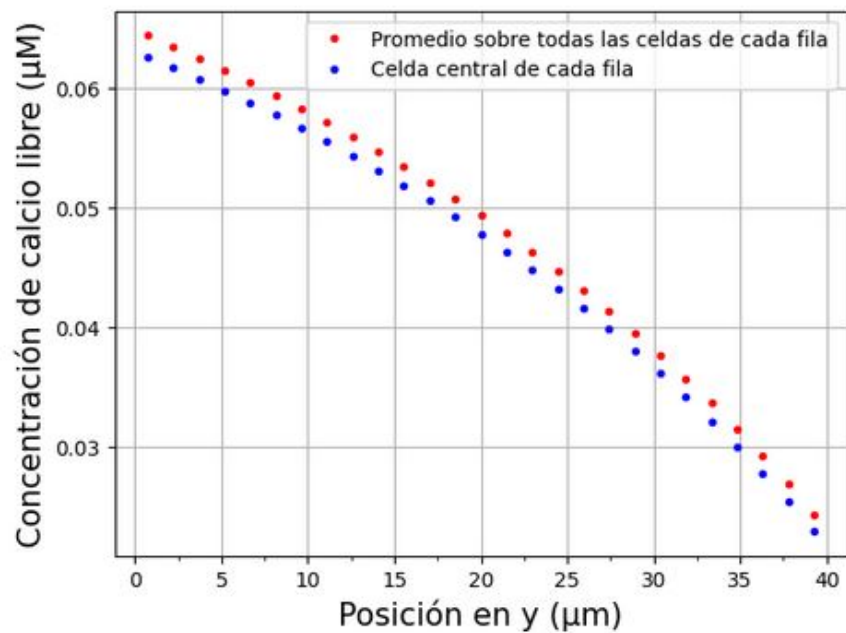


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

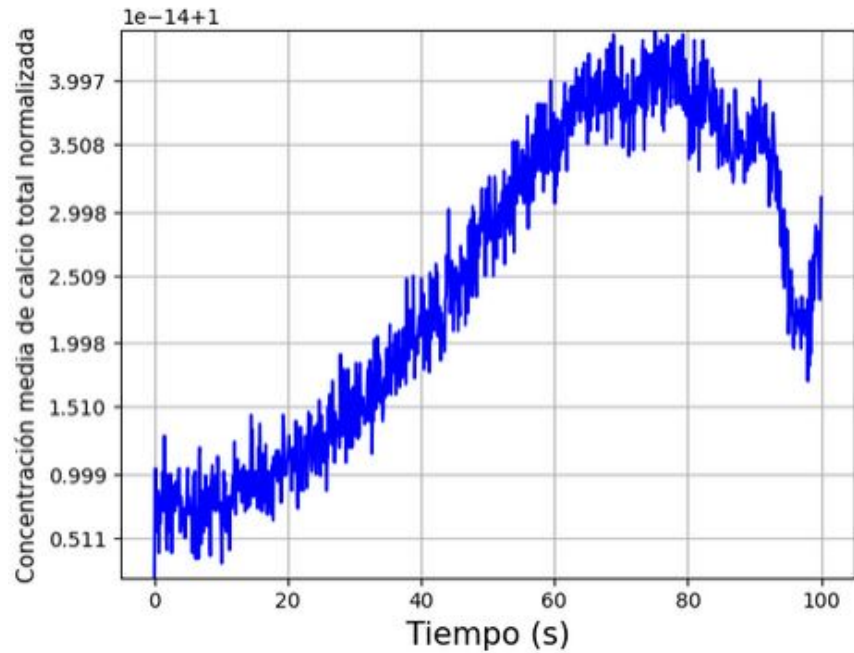
Figura 3.30: Simulación ángulo de 68.9 grados.



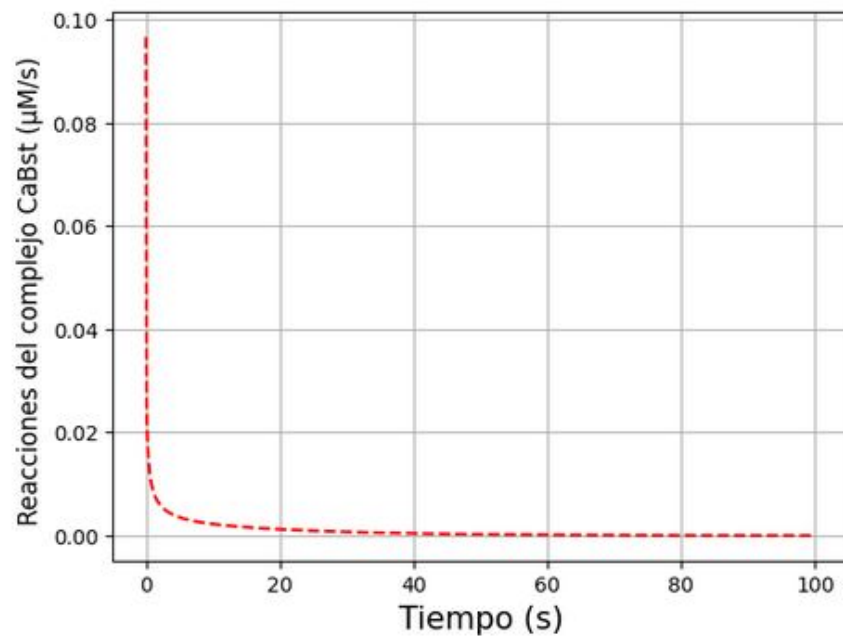
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

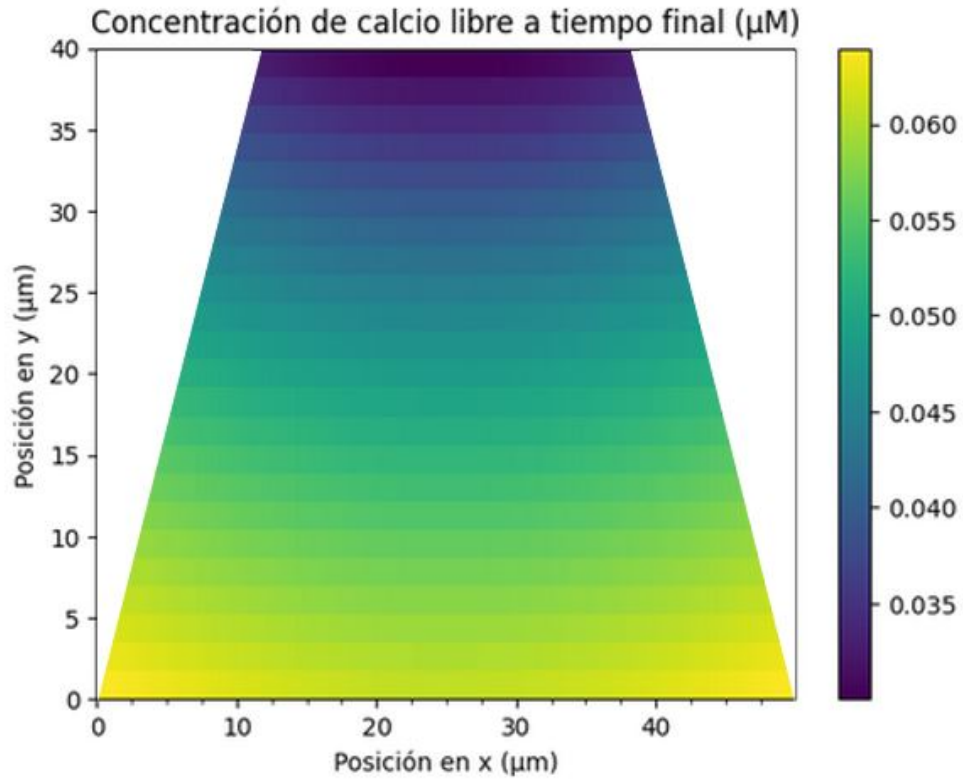


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

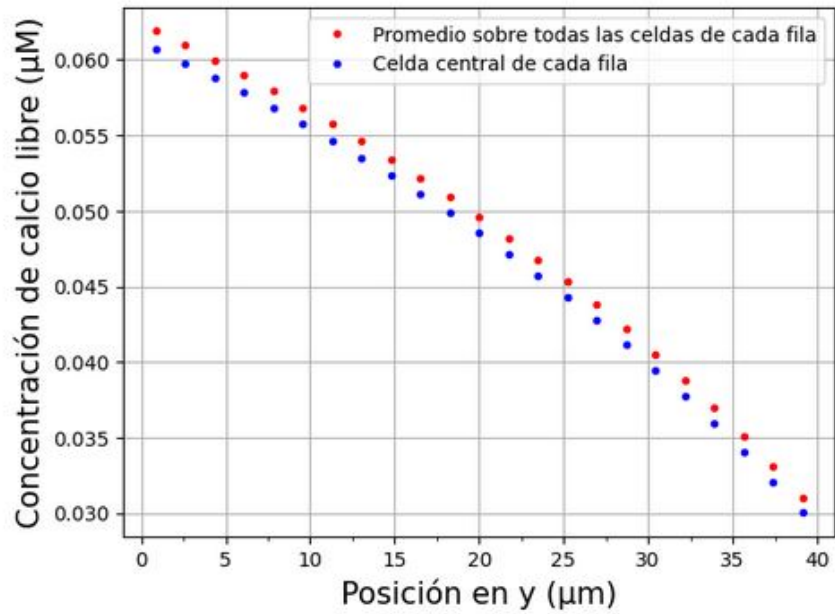


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

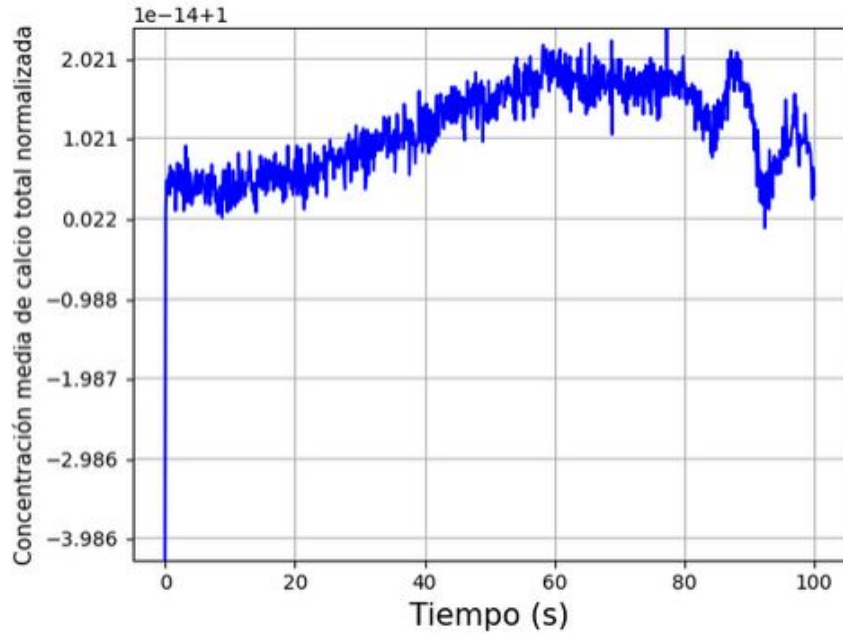
Figura 3.31: Simulación ángulo de 70.6 grados.



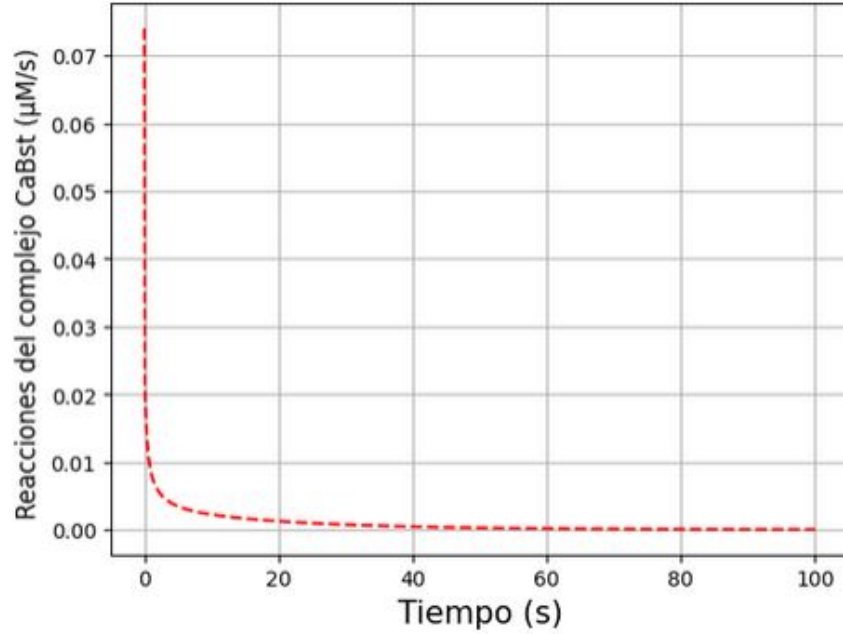
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

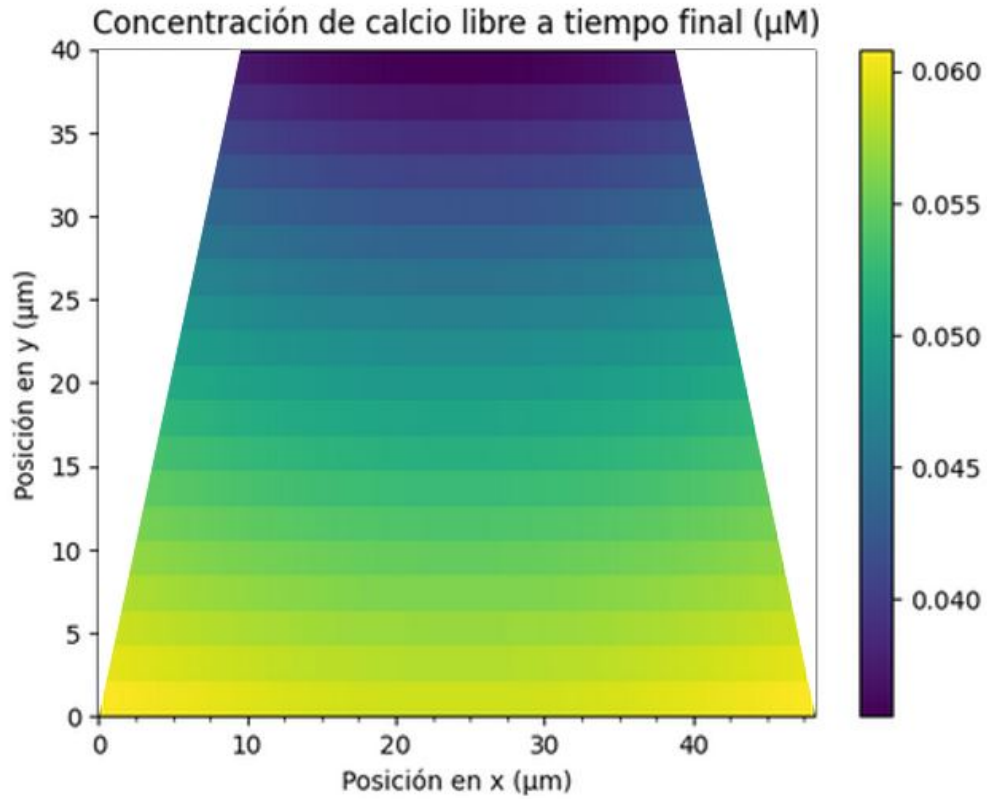


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

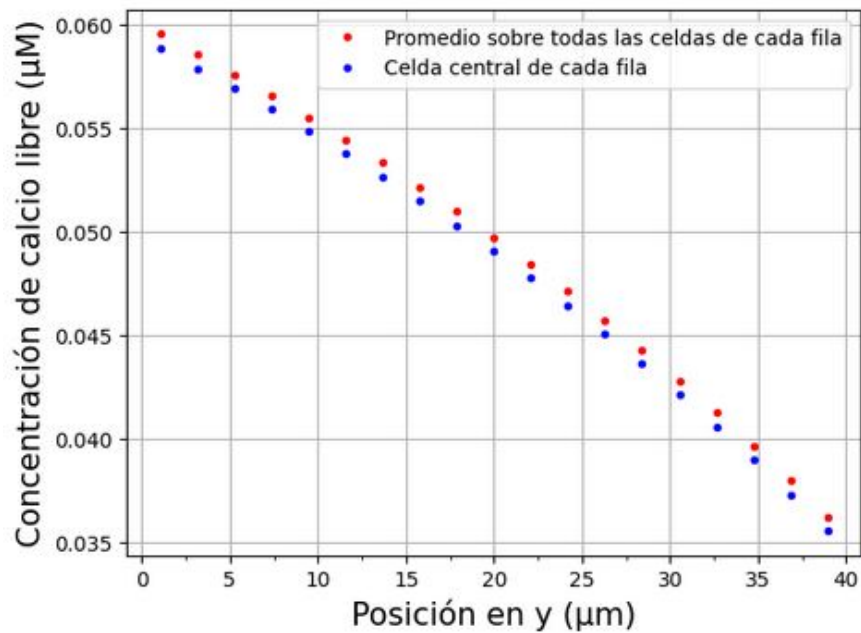


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

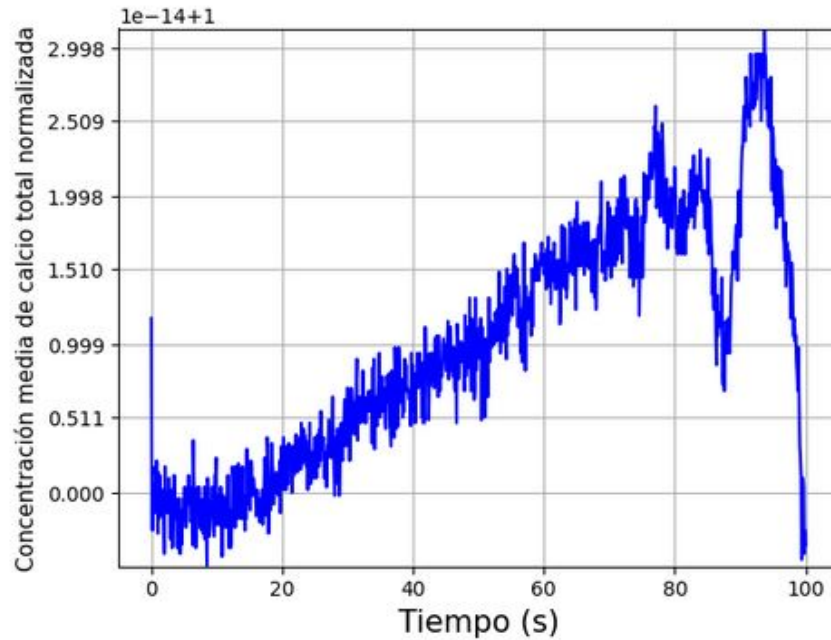
Figura 3.32: Simulación ángulo de 73.8 grados.



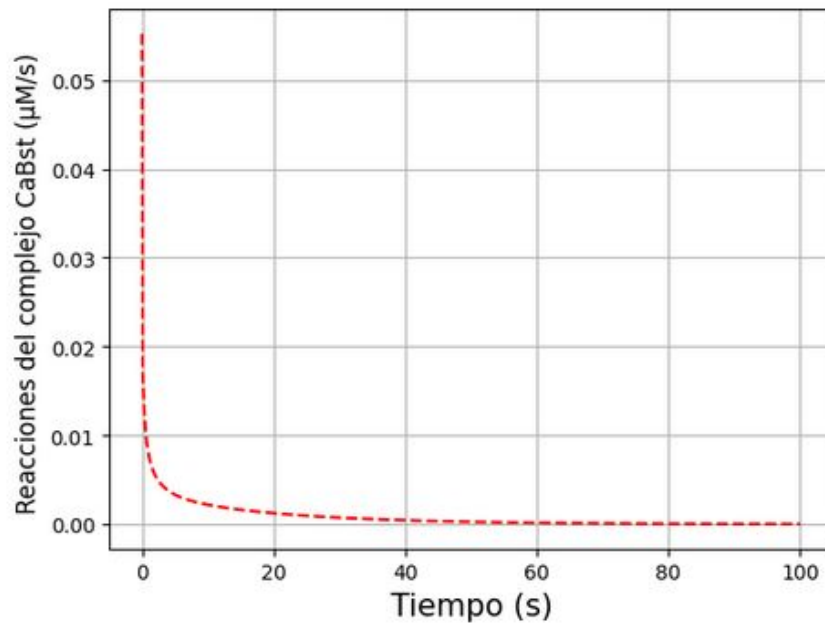
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

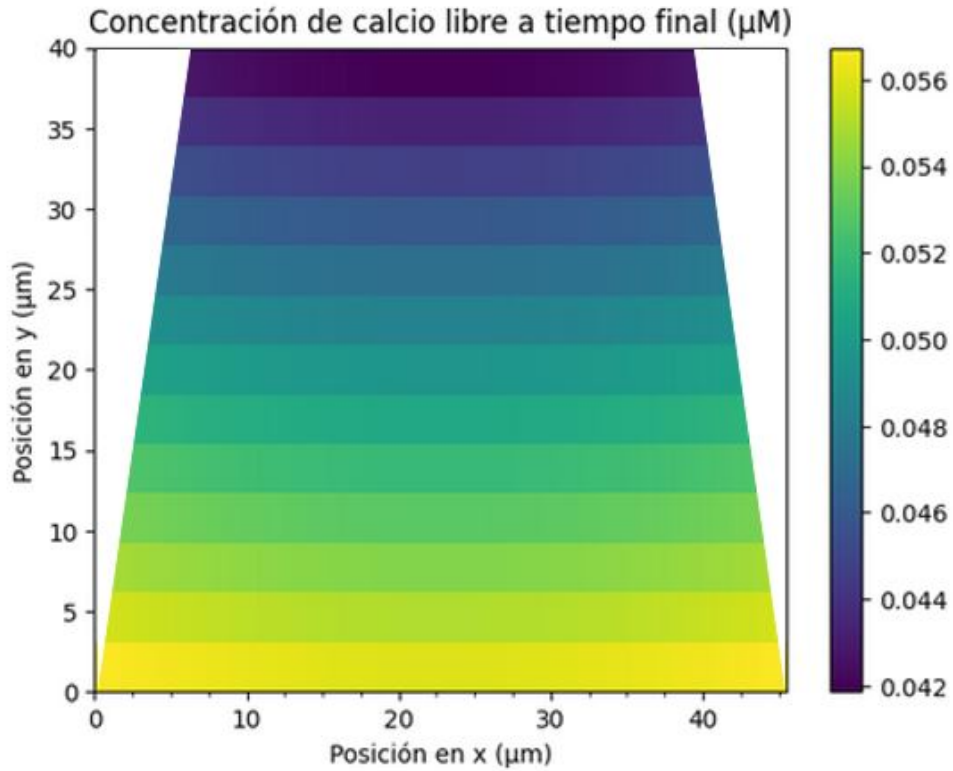


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

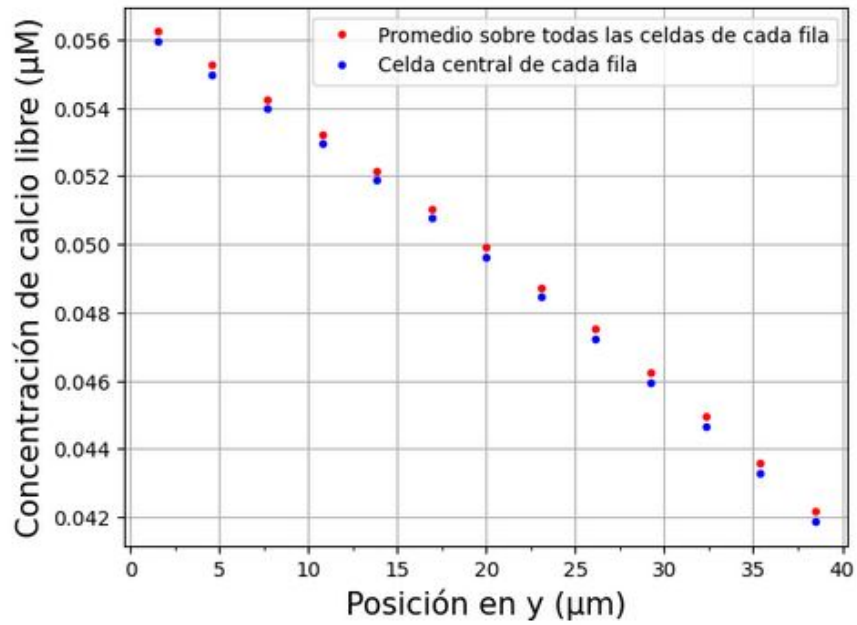


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

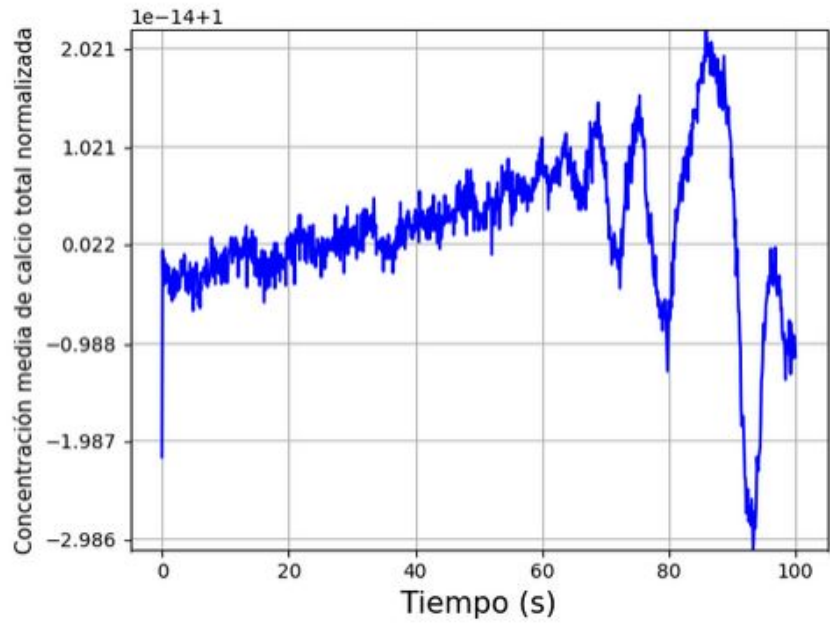
Figura 3.33: Simulación ángulo de 77.0 grados.



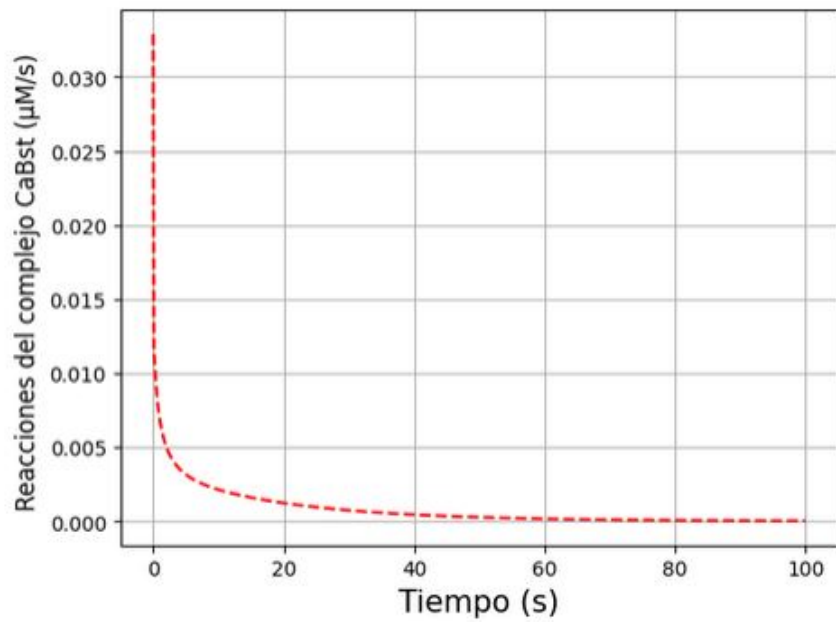
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.



(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.



(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

Figura 3.34: Simulación ángulo de 81.5 grados.

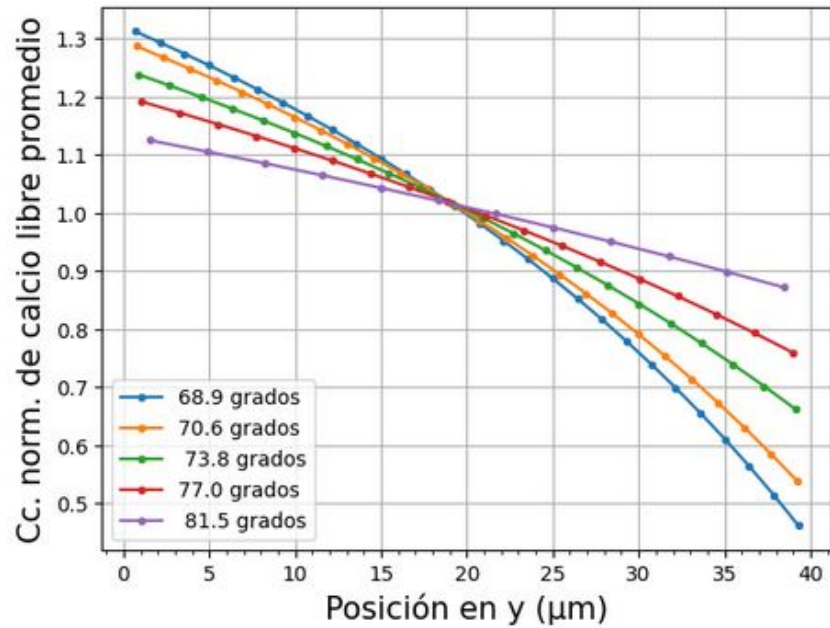


Figura 3.35: Para distintos ángulos se muestra el promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento. Dicha concentración fue normalizada por la concentración de calcio libre inicial.

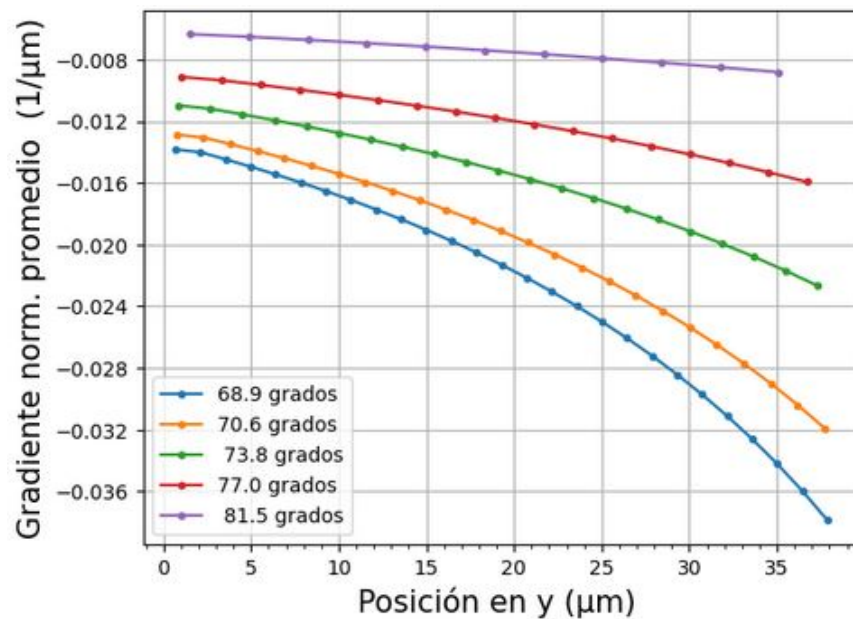


Figura 3.36: Para distintos ángulos se muestra el gradiente calculado numéricamente a partir del promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento. Dicho gradiente fue normalizado por la concentración de calcio libre inicial.

3.4.2. Mayor cantidad de bombas sobre la base menor del trapecio

En este último caso estudiamos el efecto del aumento en la cantidad de bombas sobre la base menor del trapecio, el cual representa la zona delantera de la célula. Esto lo simulamos a partir del trapecio de 73.8 grados de la Sección 3.4.1. Para ello realizamos tres simulaciones disminuyendo el flujo hacia el exterior en la base mayor y los catetos en un 5 %, 10 % y 15 %. Es decir

$$J_{out}^i = J_{in}(l/d_i)p \quad (3.8)$$

con

$$\begin{aligned} d_1 = d_3 &= \textit{longitud de los catetos y} \\ d_2 &= \textit{longitud de la base mayor} \end{aligned}$$

con $p = 0,85; 0,90$ y $0,95$. Mientras que para garantizar un flujo neto integrado sobre todo el perímetro nulo tomamos

$$J_{out}^4 = J_{in} - (J_{out}^2 - J_{in})\frac{d_2}{d_4} - 2(J_{out}^1 - J_{in})\frac{d_1}{d_4} \quad (3.9)$$

con

$$d_4 = \textit{longitud de la base menor.}$$

Puesto que, como en las simulaciones anteriores, consideramos al flujo hacia fuera dependiente solo de las bombas PMCA entonces el aumento del flujo integrado exterior en la base menor se interpreta como un aumento en el número de bombas en la parte delantera. Esto es consistente con que la célula tiene más superficie para alojar una mayor cantidad de bombas en el frente. En este trabajo suponemos que este aumento de la cantidad de bombas en una misma curva (superficie) no afecta la velocidad de cada bomba, la cual sigue siendo constante como en las Secciones anteriores. En las tablas 3.9 y 3.10 se muestran los flujos

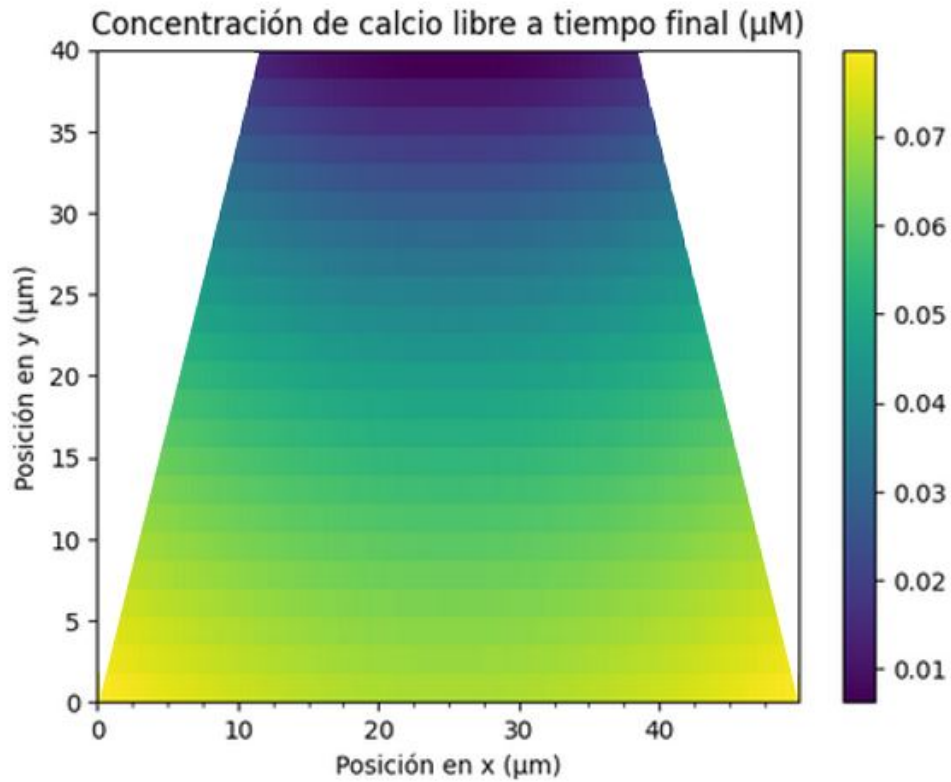
integrados hacia fuera y hacia dentro, respectivamente para los distintos p . Desde ya los valores de la tabla 3.10 coinciden con los flujos entrantes integrados en 3.6. En las figuras 3.37a, 3.38a y 3.39a se muestran las concentraciones de calcio libre tras 10^7 pasos temporales. Como era de esperar los gradientes en la dirección y se hicieron más intensos a medida que aumentó la cantidad de bombas, esto se evidencia en 3.40 y más precisamente en la derivada numérica en y de la curva anterior mostrada en 3.41. Sin embargo, no se observaron mayores diferencias en la forma de la distribución de puntos. Puede verse que la concentración en x sigue siendo no uniforme, ver 3.37b, 3.38b y 3.39b. Finalmente, como en los casos anteriores, el buen comportamiento de las simulaciones en cada paso temporal es consistente con los gráficos 3.37c, 3.38c y 3.39c. Por su parte las figuras 3.37d, 3.38d y 3.39d son consistentes con que el sistema haya alcanzado el equilibrio.

Porcentaje de flujo (%)	Flujo saliente integrado cara lateral ($\mu M \mu m^2/s$)	Flujo saliente integrado base menor ($\mu M \mu m^2/s$)	Flujo saliente integrado base mayor ($\mu M \mu m^2/s$)
85	200.5999999999999	342.2000000000009	200.5999999999997
90	212.3999999999986	306.8000000000013	212.4000000000003
95	224.1999999999985	271.4000000000007	224.1999999999968

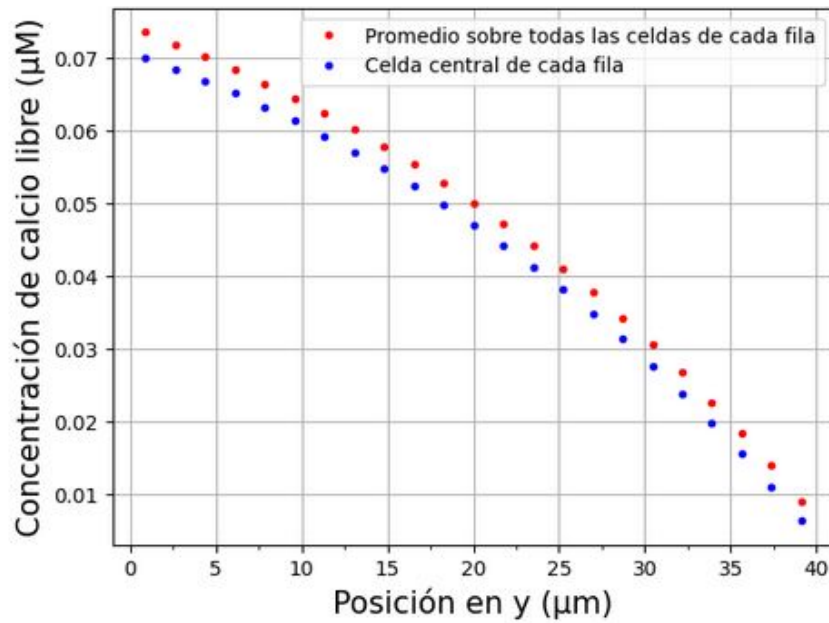
Tabla 3.9: Flujos salientes integrados sobre cada cara de los 3 trapecios. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales.

Porcentaje de flujo (%)	Flujo entrante integrado cara lateral ($\mu M \mu m^2/s$)	Flujo entrante integrado base menor ($\mu M \mu m^2/s$)	Flujo entrante integrado base mayor ($\mu M \mu m^2/s$)
85	245.73336069218638	157.7912089909757	294.7420696246532
90	245.73336069218638	157.7912089909757	294.7420696246532
95	245.73336069218638	157.7912089909757	294.7420696246532

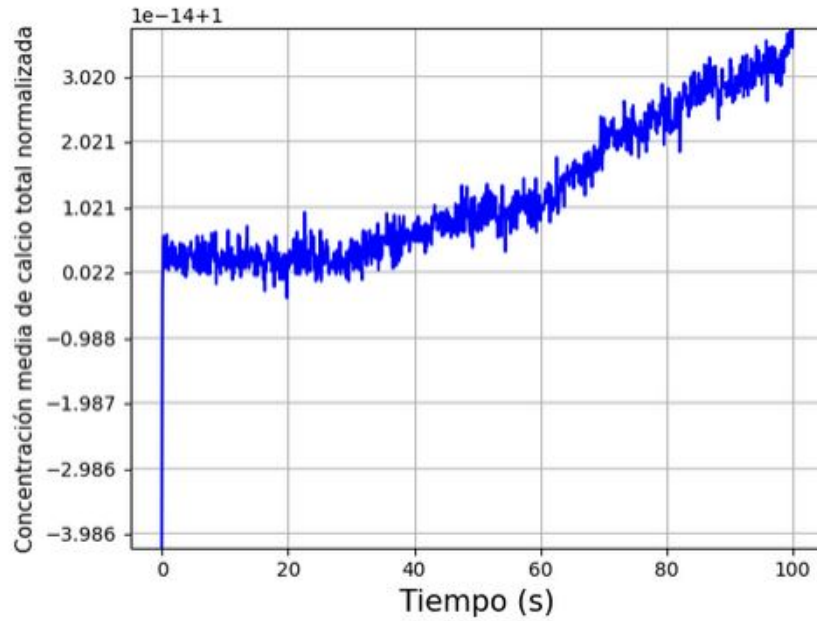
Tabla 3.10: Flujos entrantes integrados sobre cada cara de los 3 trapecios. Se obtuvo el mismo valor para ambas caras laterales.



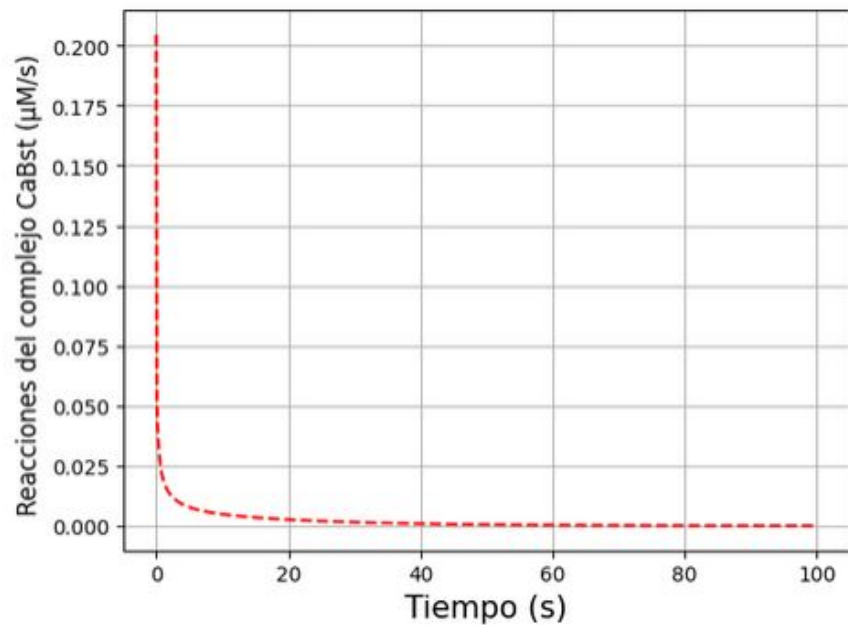
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

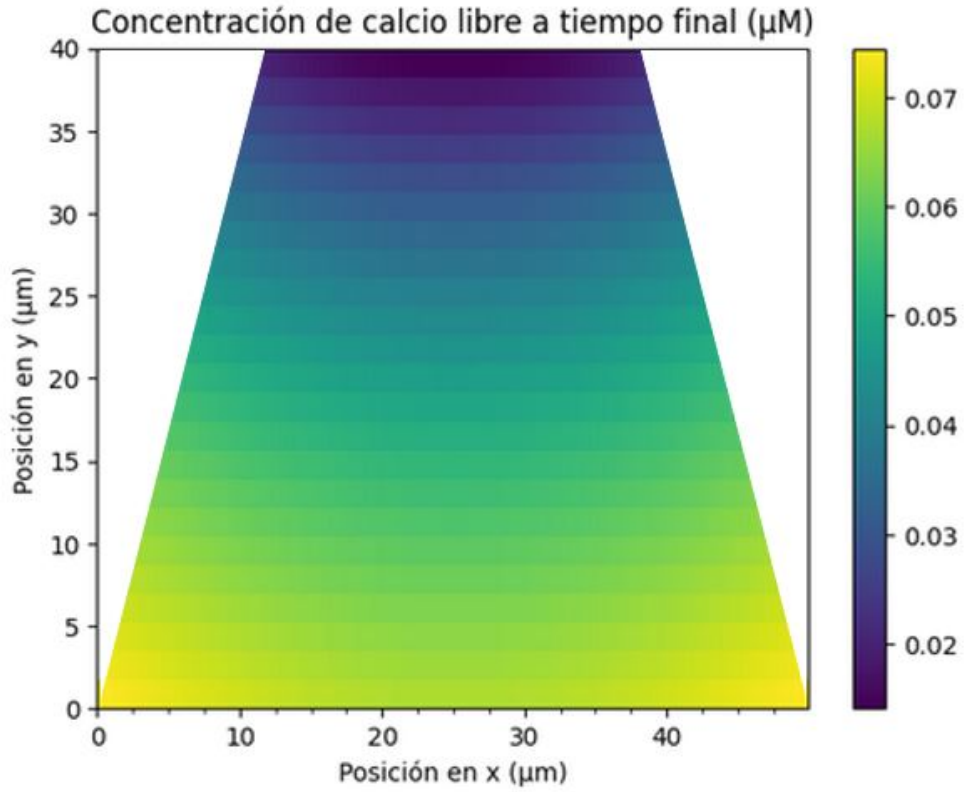


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

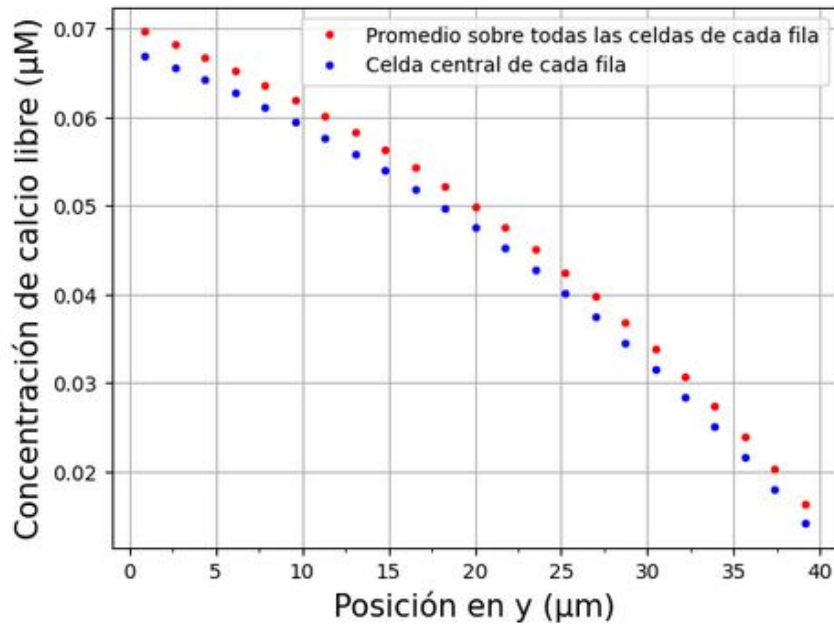


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

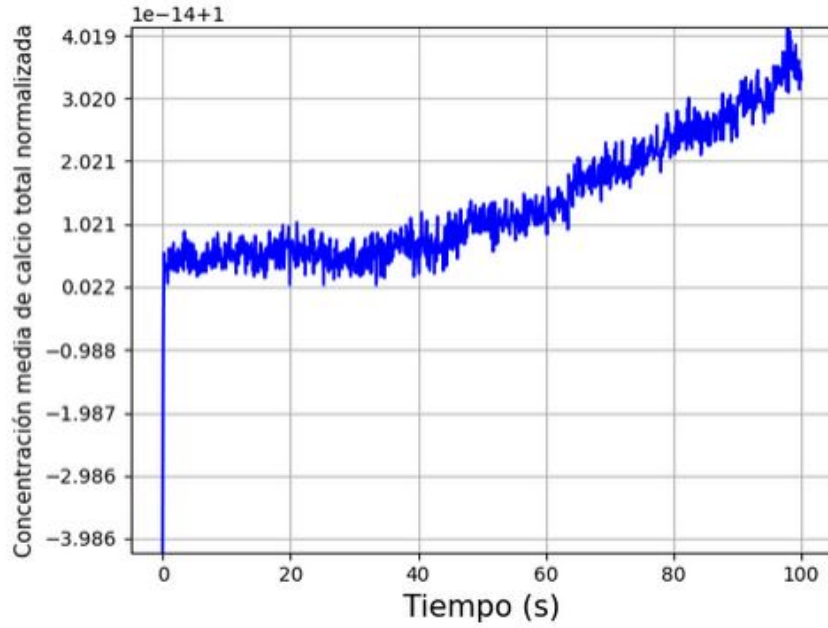
Figura 3.37: Simulación con reducción del flujo hacia el exterior de la base mayor y catetos al 85 %.



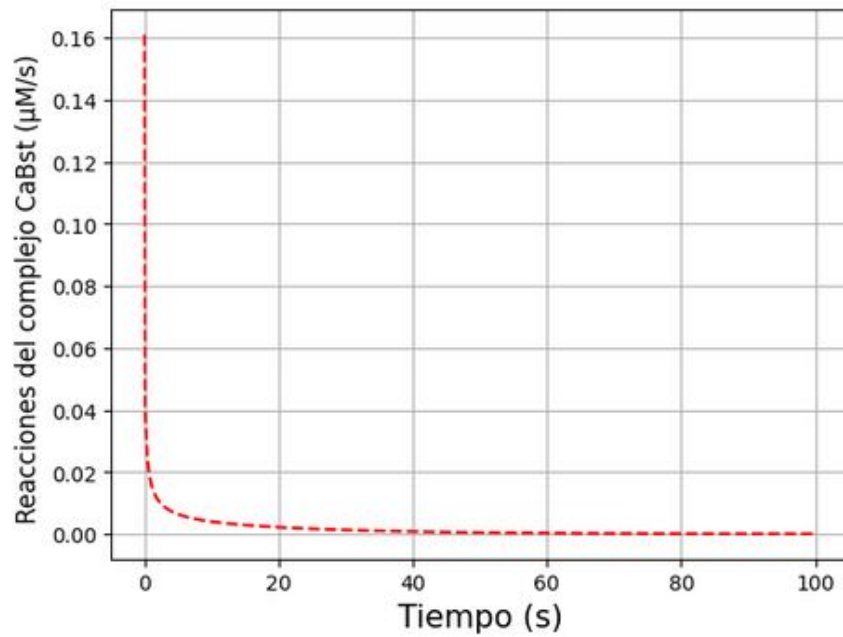
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.

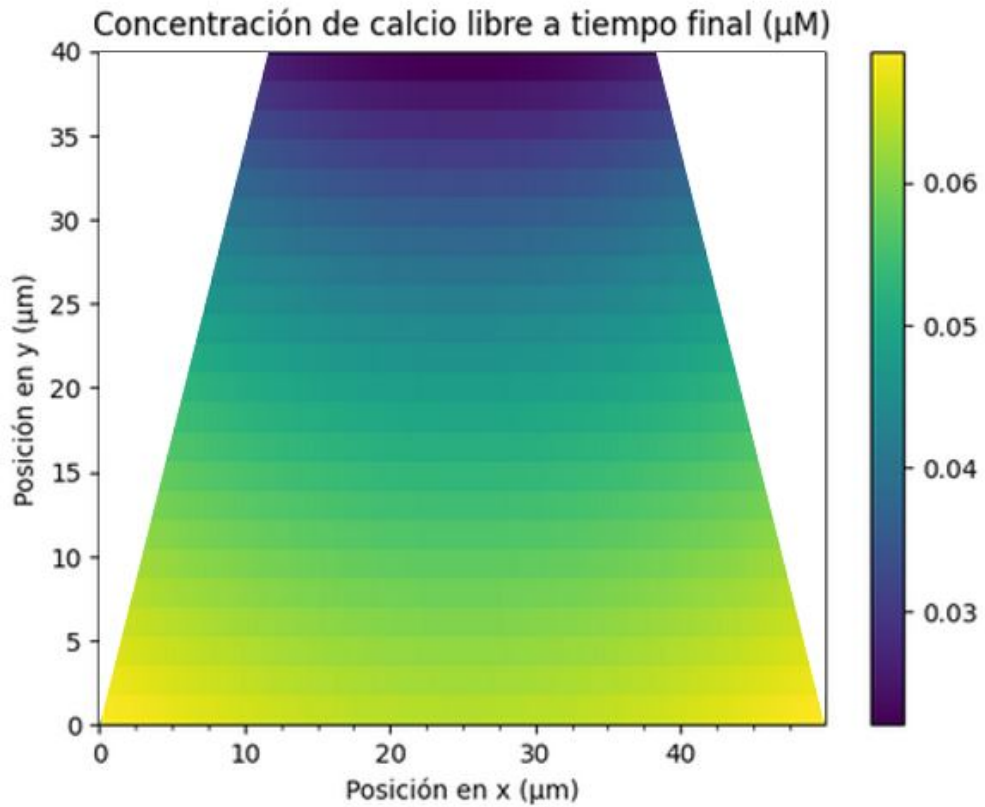


(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.

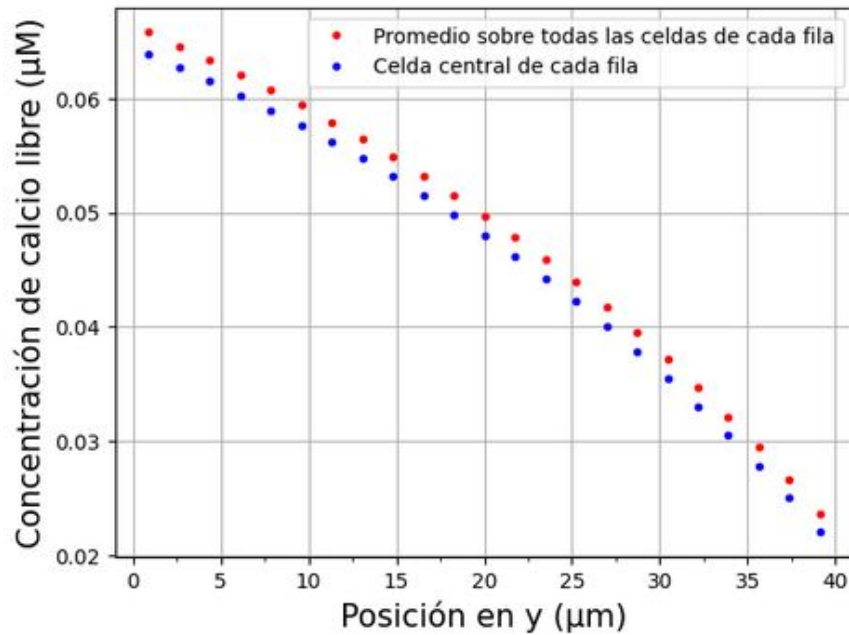


(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

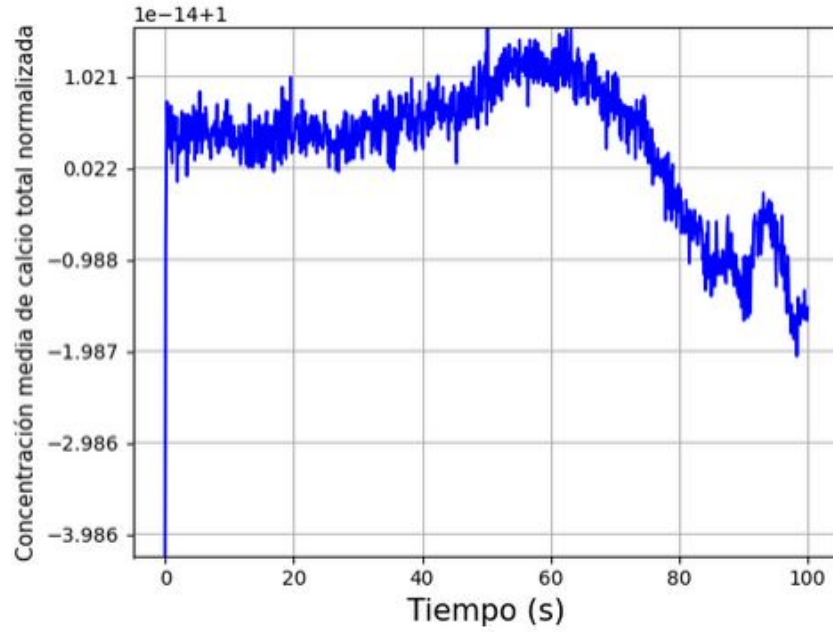
Figura 3.38: Simulación con reducción del flujo hacia el exterior de la base mayor y catetos al 90 %.



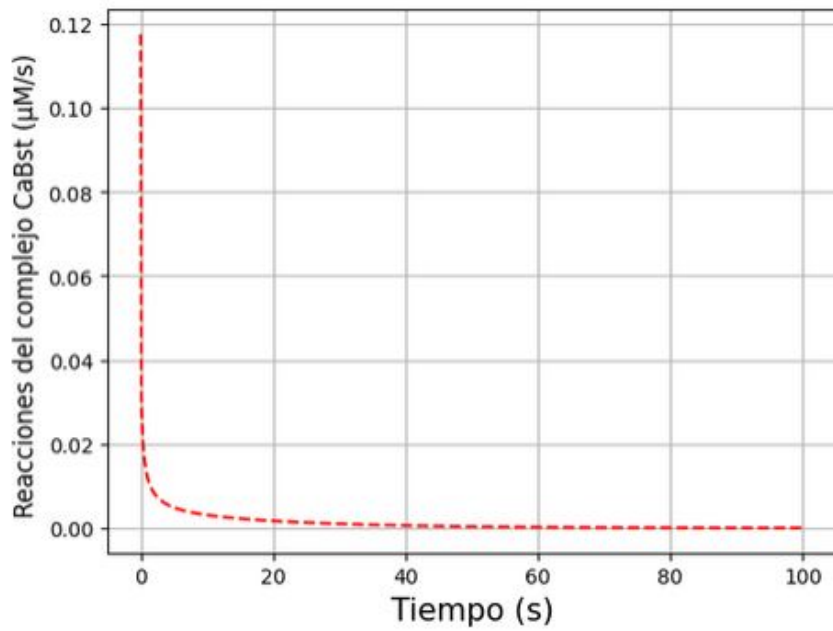
(a) Mapa de color de la concentración de calcio libre en la última iteración temporal.



(b) Concentración de calcio libre en la última iteración temporal en función de la posición en el eje de desplazamiento.



(c) Promedio de la concentración de calcio total sobre todas las celdas normalizado por la concentración de calcio total inicial en función del tiempo.



(d) Derivada temporal de la concentración del complejo calcio libre - *buffer* estático promediada sobre todas las celdas en función del tiempo.

Figura 3.39: Simulación con reducción del flujo hacia el exterior de la base mayor y catetos al 95 %.

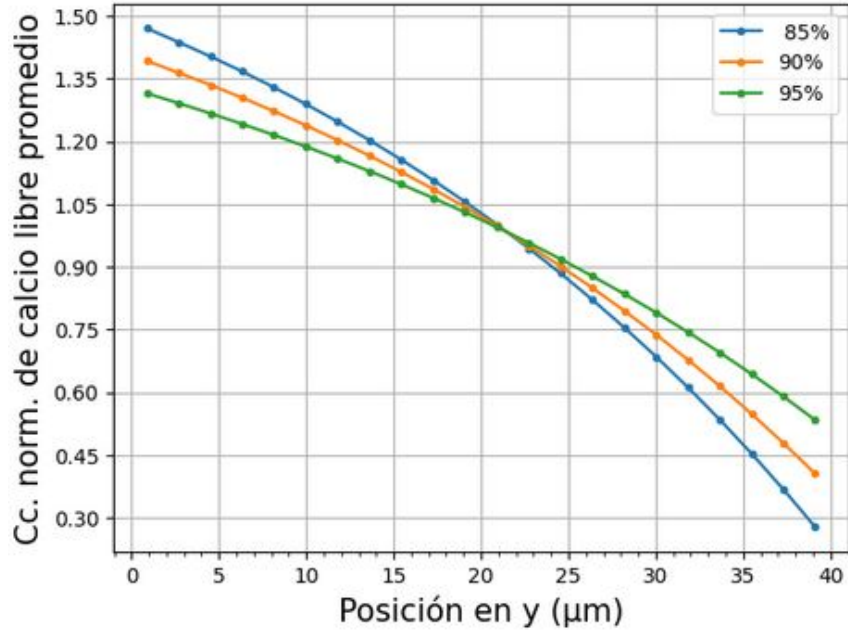


Figura 3.40: Promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento para distintos porcentajes de bombas en la base mayor y en los catetos. Dicha concentración fue normalizada por la concentración de calcio libre inicial.

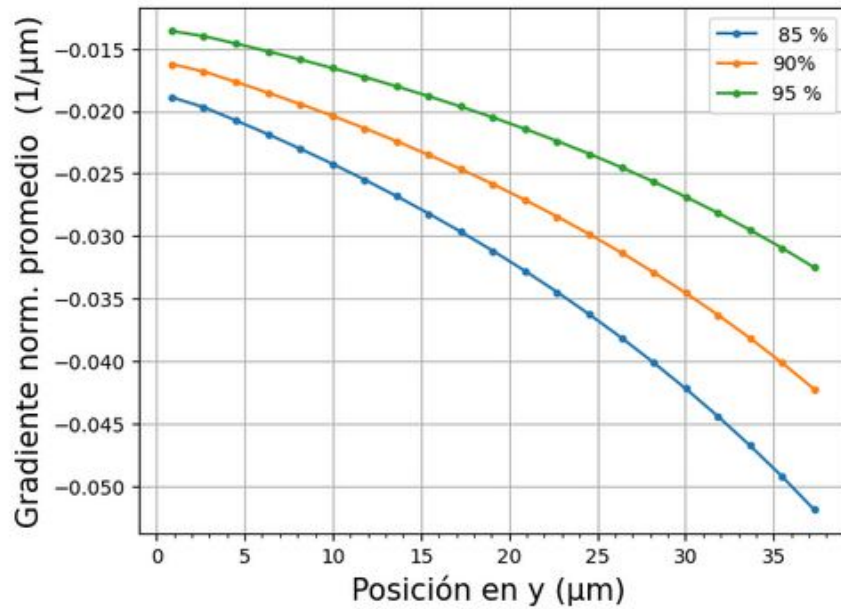


Figura 3.41: Gradiente calculado numéricamente a partir del promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración de calcio libre en función de la posición en el eje de desplazamiento para distintos porcentajes de bombas en la base mayor y en los catetos. Dicho gradiente fue normalizado por la concentración de calcio libre inicial.

3.5. Comparación de los gradientes obtenidos dependiendo de las distintas geometrías

En esta Sección estudiaremos el efecto de las distintas geometrías de los trapecios en la formación de gradientes de las simulaciones de los apartados 3.3.1, 3.3.2 y 3.4.1. Si bien la relación aproximada entre el cociente área/volumen de la célula fue $\sim 0,05$ (ver 2.2) las relaciones perímetro/área de nuestras simulaciones fueron mucho mayores. En la figura 3.44b se muestra la relación perímetro/área entre la parte inferior y superior de los trapecios de la Sección 3.4.1 en función de los ángulos. No obstante, la relación tiende a uno a medida que el ángulo crece, lo cual puede interpretarse como una despolarización morfológica de la célula. Por otro lado, la relación entre la superficie delantera y trasera de la célula era de $\sim 0,33$, mientras que la relación entre perímetros en función del ángulo se muestran en las figuras 3.42b y 3.43b para las simulaciones de las Secciones 3.3.1 y 3.3.2. En ambas simulaciones las relaciones son mayores que para la célula. Sin embargo, como también estas relaciones tienden a uno con el ángulo, su aumento lo relacionamos nuevamente con la despolarización. Es importante destacar que para ángulos similares, la relación resulta mayor en el caso de las simulaciones con área y perímetro constantes respecto a las simulaciones con perímetro y altura constantes, pues se interpreta a las primeras como “más despolarizadas”. Esto justifica que en la Sección 3.3.2, la relación entre la concentración delante y atrás fue levemente menor para ángulos similares.

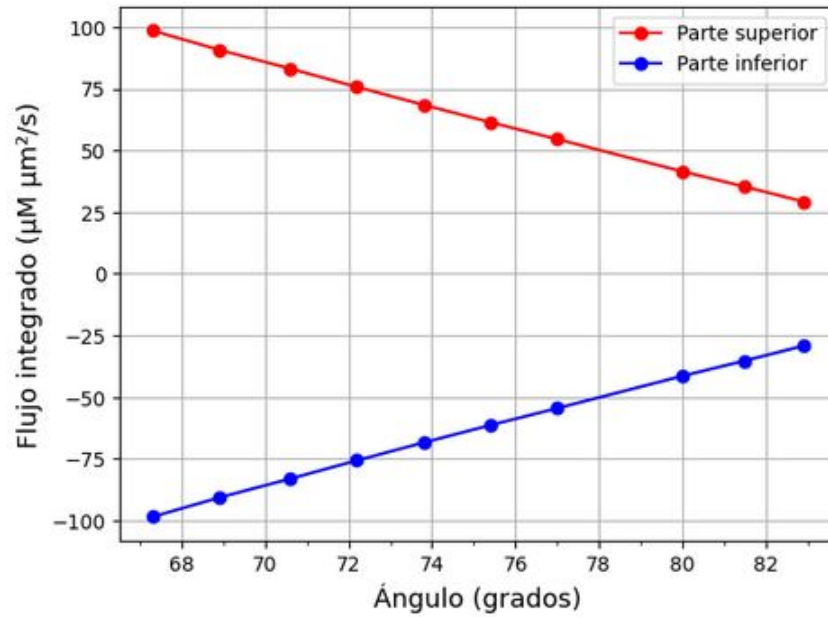
Observemos el gráfico 3.42a donde se muestran los flujos integrados sobre el perímetro de la parte superior y de la parte inferior del trapecio, definidas como en la figura 2.2, en función del ángulo de los distintos trapecios del apartado 3.3.1. Allí los flujos integrados sobre el perímetro de la parte superior e inferior son de igual módulo y signo contrario, por ende cumplen con la ecuación (2.8), tal como debe ser. Por otro lado, al aumentar el ángulo se observa que disminuyen los flujos integrados, lo cual es consistente con los gradientes observados en 3.19, quienes se hacen menos intensos a medida que aumenta el ángulo. Esto se debe a como se definieron los J_{in} y J_{out} , ya que a medida que el trapecio “ tiende” al

cuadrado, la razón entre el lado del cuadrado y cualquiera de los segmentos que definen al trapecio tiende a uno. En el límite tenemos $J_{in} = J_{out}$ punto a punto sobre la curva y por supuesto no se forma gradiente. Por lo anterior, efectivamente a medida que la relación que existe entre el perímetro de la parte superior y la parte inferior tiende a uno (ver figuras 3.42b y 3.19) la magnitud del gradiente decrece.

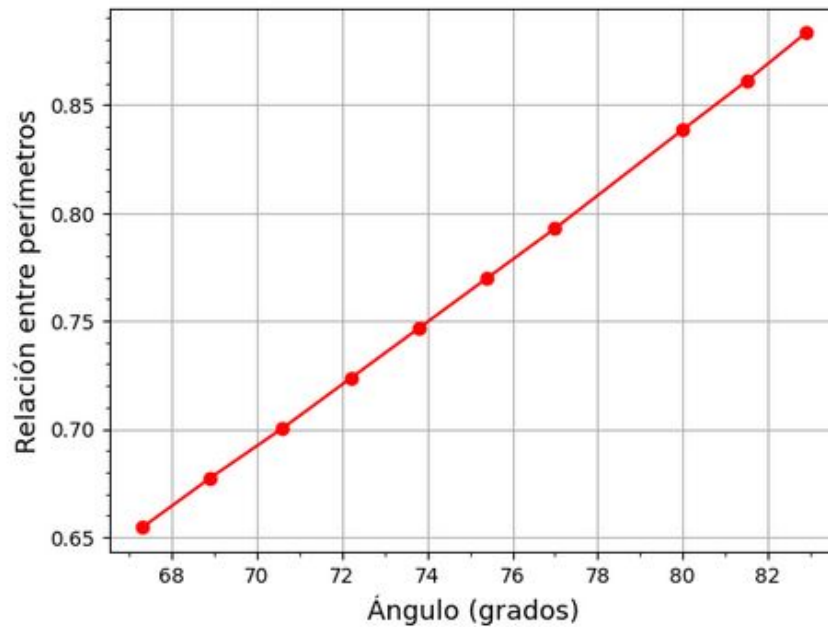
En el caso de las simulaciones de la Sección 3.3.2, se observa que la Fig. 3.43a es muy similar a la Fig. 3.42a. Sin embargo, los flujos integrados resultan ser de menor módulo para ángulos similares respecto al caso anterior. Esta afirmación es consistente con la formación de gradientes menos pronunciados para ángulos similares, como se puede ver en 3.19 y 3.29. Respecto a la relación entre perímetros de la parte superior con la inferior, ver 3.29 y 3.43b, nuevamente como era de esperarse, el gradiente decrece cuando esta relación lo hace.

Por lo tanto, ambos subconjuntos de simulaciones contemplan que la polarización morfológica de la célula es necesaria para la formación del gradiente y su intensidad aumenta cuando lo hace la superficie (curva) de intercambio con el medio externo de la parte delantera.

En la figura 3.44a se observa una inversión de signo en los flujos integrados entre la parte superior e inferior debido a que, en dicho apartado la base menor representa la parte delantera de la célula. Con esta consideración, la relación entre los gradientes y flujo integrado resulta completamente análoga a la de las simulaciones de la Sección 3.3.1. A partir de las ecuaciones 2.12 y 2.13 se graficaron en 3.44b las relaciones entre el cociente área/perímetro de la parte superior con la parte inferior para trapecios de distintos ángulos. Comparando esa figura con el resultado 3.36 se puede apreciar que el gradiente decrece a medida que la relación área/perímetro de la parte superior crece respecto a la parte inferior.

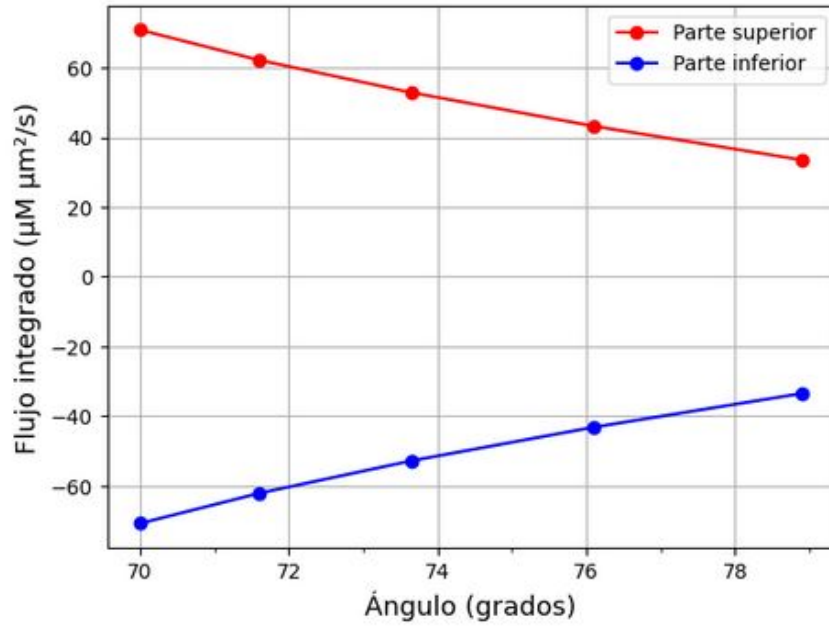


(a) Flujo integrado sobre el perímetro de la parte superior y de la parte inferior en función del ángulo de los distintos trapecios isósceles.

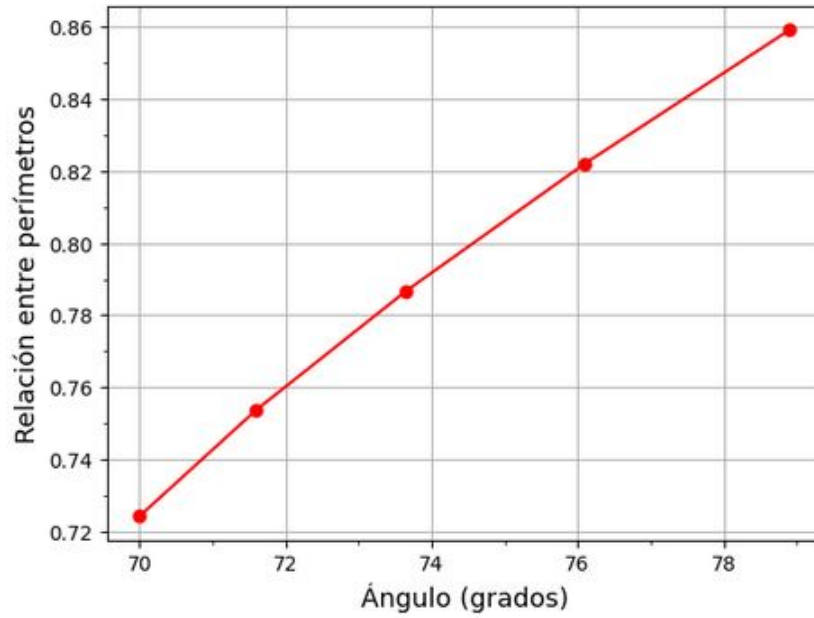


(b) Relación entre los perímetros de la superior y la parte inferior de los trapecios de distintos ángulos.

Figura 3.42: Simulaciones de la Sección 3.4.1.

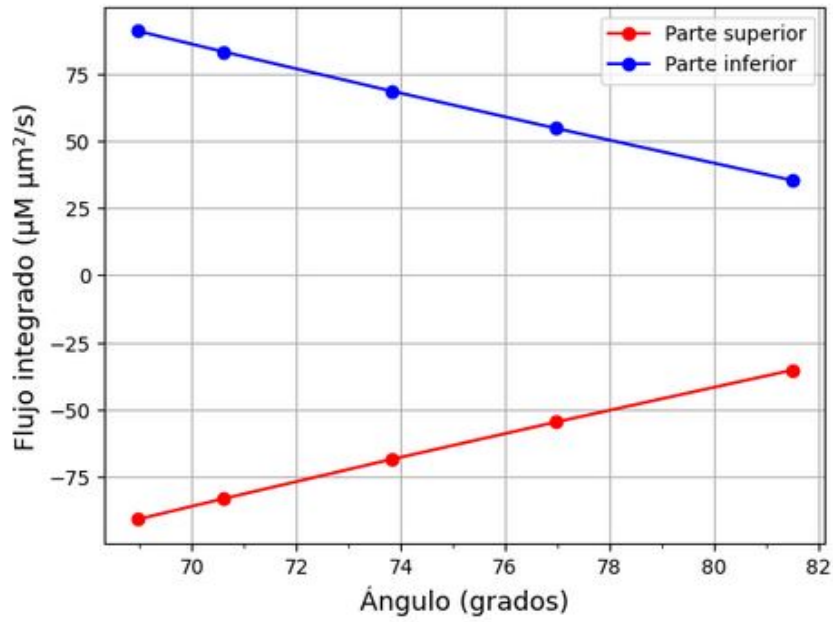


(a) Flujo integrado sobre el perímetro de la parte superior y de la parte inferior en función del ángulo de los distintos trapecios isósceles.

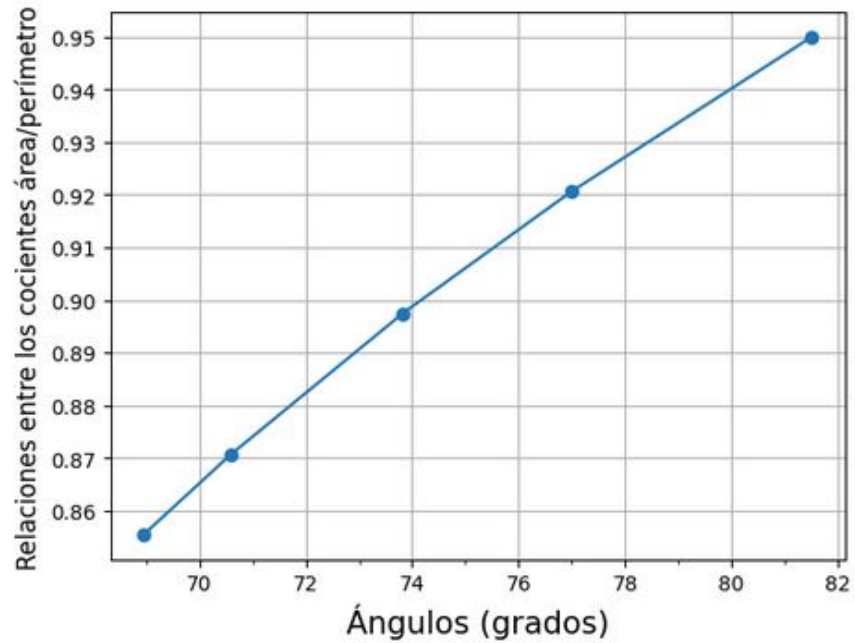


(b) Relación entre los perímetros de la superior y la parte inferior de los trapecios de distintos ángulos.

Figura 3.43: Simulaciones de la Sección 3.3.2.



(a) Flujo integrado sobre el perímetro de la parte superior y de la parte inferior en función del ángulo de los distintos trapecios isósceles.



(b) Relación entre los cocientes área/perímetro de la superior y la parte inferior de los trapecios de distintos ángulos.

Figura 3.44: Simulaciones de la Sección 3.3.1.

3.6. Comparación con observaciones experimentales

Feng-Chiao Tsai *et al.* (2014) [22] estudiaron la migración colectiva en respuesta a suero en un espacio abierto de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) sembradas en monocapas. Realizaron las mediciones de la $[Ca^{2+}]$ citosólico utilizando el marcador Fura-2. En el gráfico 3.45 se muestra la concentración relativa de Ca^{2+} libre a lo largo de la dirección de desplazamiento promediado sobre 14 células. La normalización fue realizada dividiendo por la concentración promedio. Las concentraciones de Ca^{2+} simuladas de esta Sección fueron normalizadas dividiendo por la concentración de Ca^{2+} libre inicial de la Tabla 3.1 a fin de poder comparar los resultados simulados con la evidencia experimental.

Los gráficos de la figuras 3.18, 3.28 y 3.35 muestran para cada ángulo el promedio, sobre todas las celdas de una dada fila, de la concentración normalizada de Ca^{2+} libre en función de la posición en el eje y . Comparando con 3.45 se puede ver claramente cómo las simulaciones siguen la forma de la distribución de puntos de los experimentos. Como ya se ha mencionado en nuestras simulaciones esta curva presenta distinta concavidad dependiendo de cómo interpretemos al trapecio, sin embargo observando la media de 3.45 la concavidad varía en función de la posición por lo cual no nos dice nada respecto a cual interpretación es mejor que la otra. Por otro lado, en los resultados de Feng-Chiao Tsai *et al.* (2014) la concentración en el frente de la célula fue aproximadamente del 50% de la concentración atrás. Mientras que en los apartados 3.3.1, 3.3.2 y 3.4.1 las simulaciones con ángulos de 72.2 a 77.0 grados la concentración en el frente de la célula también fue alrededor del 50% respecto de la concentración atrás. Para ángulo mayores y menores la proporción fue mayor y menor respectivamente. Por otro lado, los resultados de Rodney A. Brundage *et al.* (1991) [6], utilizando Fura-2 y promediando sobre tres eosinófilos, muestran que el gradiente en la zona del núcleo $(0,92 \pm 0,18)nM/\mu m$ es menor que en la zona delantera $(0,95 \pm 0,16)nM/\mu m$. En este caso parecería ser más consistentes con los experimentos las simulaciones de la Sección 3.4.1. No obstante, debemos tener en cuenta que en nuestras simulaciones, fue mucho mayor la diferencia entre los gradientes de cada mitad del trapecio que representan la parte delantera y trasera de la célula. Para los resultados experimentales la diferencia fue aproximadamente

del 4,2%. Mientras que en las simulaciones, promediando los gradientes sobre cada mitad, obtuvimos que en el menor de los casos la relación fue aproximadamente del 16%. También es importante destacar que los resultados de Rodney A. Brundage *et al.* (1991) además de ser muy similares se solapan debido al alto error relativo.

Finalmente, en la Sección 3.4.2, donde consideramos un aumento en el número de bombas en la zona delantera (la base menor de los trapecios) manteniendo nulo el flujo neto integrado sobre todo el perímetro, puede apreciarse que la diferencia entre la parte delantera y trasera es mucho mayor al 50% (ver 3.40). Esto se debe al aumento de los flujos netos integrados en la parte superior e inferior, los cuales son mayores en módulo a los $75 \mu M \mu m^2/s$ (ver figura 3.46). Siendo éste el límite a partir del cual también las simulaciones de las Secciones anteriores sobrepasaron la diferencia del 50% entre las concentraciones de los extremos.

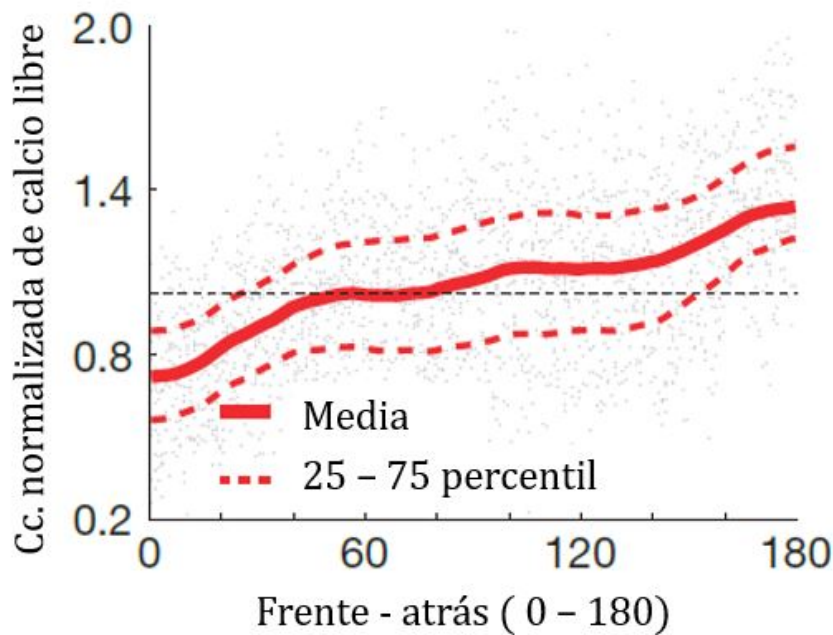


Figura 3.45: Concentración experimental normalizada de calcio libre promediada sobre 14 células HUVEC en función de su ubicación a lo largo de la dirección de desplazamiento. Fuente: Feng-Chiao Tsai *et al.* (2014) [22] .

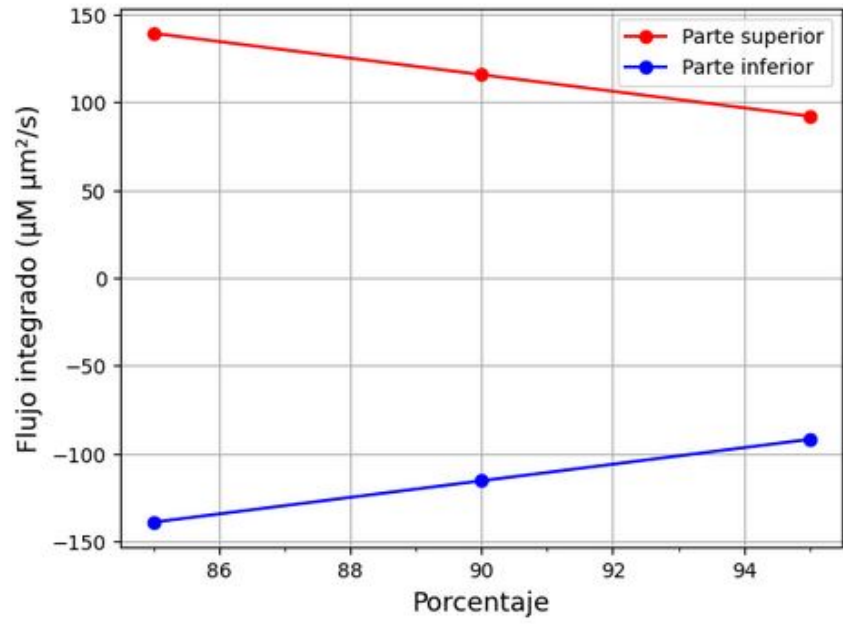


Figura 3.46: Flujo integrado sobre el perímetro de la parte superior y de la parte inferior para distintos porcentajes de bombas en la base mayor y en los catetos.

Capítulo 4

Conclusiones

A partir de los resultados de nuestras simulaciones detallados en el Capítulo 3 y así como también a partir de la evidencia experimental obtenida de la bibliografía que allí se cita, en la presente Tesis arribamos a las siguientes conclusiones:

En primer lugar es posible reproducir resultados experimentales a partir de un modelo muy simplificado de la dinámica citosólica del calcio en una geometría en dos dimensiones. El modelo muestra que la variación en la forma de los trapecios modifica el gradiente de calcio. Éste tiende a desaparecer cuando el trapecio tiende al cuadrado (o rectángulo). Estas simulaciones son consistentes con que la polarización morfológica de la célula es necesaria para la formación del gradiente de calcio basal.

Además, en la simulaciones donde se interpretó a la base menor de los trapecios como la parte delantera de las células se observó un decrecimiento del gradiente a medida que aumentaba la relación del cociente área-perímetro (volumen-área) entre la parte superior y la inferior del trapecio. Mientras que, en la simulaciones donde se interpretó a la base mayor de los trapecios como la parte delantera de las células, el gradiente creció a medida que la relación entre el perímetro de la parte superior era mayor que la de la parte inferior. La comparación con las observaciones experimentales pareció indicar que las simulaciones donde el número de bombas permanecía constante, y solo se producía su redistribución espacial, eran más consistentes con los experimentos (ver Sec. 3.4.1). Sin embargo, la diferencia de los gradientes experimentales entre la zona delantera y trasera de la célula es demasiado pequeña, mientras que en los resultados simulados la diferencia fue como mínimo 4 veces

más grande. Por lo tanto, no es posible determinar a partir nuestras simulaciones de forma concluyente, si el aumento en la tasa de bombeo en la zona del lamelipodio se debe a la redistribución de las bombas PMCA manteniendo su número constante al deformarse la célula (y suponiendo que el ingreso de calcio es uniforme y por lo tanto dependiente de la relación volumen-área), o si se debe a un aumento en el número de bombas en la parte delantera respecto a la parte trasera.

Consideramos que este estudio en dos dimensiones que pudo ser implementado con un código sencillo ejecutado en una computadora personal sirve como base para profundizarlo en un futuro usando modelos más realistas. Para ello se podría extender el dominio de integración a tres dimensiones a fin de estudiar la relación que existe entre la morfología de la célula y el gradiente de calcio libre. En este caso, podría ser conveniente implementar el programa en otro lenguaje como por ejemplo C++ para mejorar el tiempo de cómputo.

Bibliografía

- [1] Allsop, G. and Peckham, M. (2011). Cytoskeleton and cell motility. In *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier.
- [2] Ames, W. F. (1984). *Numerical Methods for Partial Differential Equations*. Academic Press, 2 edition.
- [3] Barth, T. and Ohlberger, M. (2003). *Finite volume methods: foundation and analysis*. In Encyclopedia of Computational Mechanics Second Edition (eds E. Stein, R. Borst and T.J.R. Hughes).
- [4] Berg, H. C. (1983). *Random Walks in Biology*. Princeton University Press.
- [5] Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., and Carafoli, E. (2013). Intracellular calcium homeostasis and signaling. *Metallomics and the Cell*, pages 119–168.
- [6] Brundage, R. A., Fogarty, K. E., Tuft, R. A., and Fay, F. S. (1991). Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science*, 254(5032):703–706.
- [7] Carafoli, E. and Krebs, J. (2016). Why calcium? how calcium became the best communicator. *Journal of Biological Chemistry*, 291(40):20849–20857.
- [8] Eymard, R., Gallouët, T., and Herbin, R. (2000). Finite volume methods. In *Handbook of Numerical Analysis*, volume 7, pages 713–1018.
- [9] Hahn, K., DeBiasio, R., and Taylor, D. L. (1992). Patterns of elevated free calcium and calmodulin activation in living cells. *Nature*, 359(6397):736–738.
- [10] Horwitz, R. and Webb, D. (2003). Cell migration. *Current Biology*, 13(19):756–759.

- [11] Keener, J. and Sneyd, J. (2009). *Mathematical Physiology I: Cellular Physiology*. Springer, 2 edition.
- [12] Lauffenburger, D. A. and Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *cell*, 84(3):359–369.
- [13] Lopez, L. F. and Dawson, S. P. (2016). Luminal ca^{2+} dynamics during ip3r mediated signals. *Physical Biology*, 13(3):036006.
- [14] Maurya, M. R. and Subramaniam, S. (2007). A kinetic model for calcium dynamics in raw 264.7 cells: 1. mechanisms, parameters, and subpopulational variability. *Biophysical Journal*, 93(3):709–728.
- [15] Mazumder, S. (2015). *Numerical Methods for Partial Differential Equations: Finite Difference and Finite Volume Methods*. Academic Press.
- [16] Mousavi, S. J. and Doweidar, M. H. (2019). Computational simulation of cell behavior for tissue regeneration. In *Advances in Biomechanics and Tissue Regeneration*. Academic Pres.
- [17] Piegari, E., Lopez, L. F., and Dawson, S. P. (2018). Using two dyes to observe the competition of ca^{2+} trapping mechanisms and their effect on intracellular ca^{2+} signals. *Physical Biology*, 15(6):066006.
- [18] 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.
- [19] Shuai, J., Pearson, J. E., and Parker, I. (2008). Modeling ca^{2+} feedback on a single inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor and its modulation by ca^{2+} buffers. *Biophysical Journal*, 95(8):3738–3752.
- [20] Trepap, X., Chen, Z., and Jacobson, K. (2012). Cell migration. In *Comprehensive Physiology*, R. Terjung (Ed.), 2(4):2369–2392.

- [21] Tsai, F. C., Kuo, G. H., Chang, S. W., and Tsai, P. J. (2015). Ca²⁺ signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration and cancer metastasis. *BioMed research international*.
- [22] Tsai, F. C., Seki, A., Yang, H. W., Hayer, A., Carrasco, S., Malmersjö, S., and Meyer, T. (2014). A polarized ca²⁺, diacylglycerol and stim1 signalling system regulates directed cell migration. *Nature cell biology*, 16(2):133–144.
- [23] Wei, C., Wang, X., Chen, M., Ouyang, K., Song, S., L., and Cheng, H. (2009). Calcium flickers steer cell migration. *Biophysical Journal*, 96(3):21a.

Apéndice A

Código fuente para la simulación de trapecios

```
import numpy as np
import time
from numba import jit
@jit(nopython=True)
def solvereq(Nx, Ny, NT, SNt, Nt, cccaleq, cccalbeq, cccalbsteq, Dc, Db, dx, dy, konst,
koffst, kon, koff, bt, bstt, Juo, Jui, Jdo, Jdi, Jlo, Jli, Jro, Jri):
    C = np.zeros((Nx-1,Ny-1))
    C_n = np.zeros((Nx-1,Ny-1))
    Cb = np.zeros((Nx-1,Ny-1))
    Cb_n = np.zeros((Nx-1,Ny-1))
    Cbst = np.zeros((Nx-1,Ny-1))
    Cbst_n= np.zeros((Nx-1,Ny-1))
    Ca=np.zeros((Nx-1,Ny-1,NT))
    Cabst=np.zeros((Nx-1,Ny-1,NT))
    Cab=np.zeros((Nx-1,Ny-1,NT))
    i= Ny
    j=Ny - 2
    while i < (Nx - Ny - 1 ):
```

```

    C_n[i,j] = cccaleq
    Cb_n[i,j] = cccalbeq
    Cbst_n[i,j] = cccalbsteq
    i += 1
i=Ny - 1
j=Ny-2
C_n[i,j] = cccaleq
Cb_n[i,j] = cccalbeq
Cbst_n[i,j] = cccalbsteq
i=Nx - Ny - 1
j=Ny- 2
C_n[i,j] =cccaleq
Cb_n[i,j] =cccалbeq
Cbst_n[i,j] = cccalbsteq
i=2
j=0
while i < Nx - 3 :
    C_n[i,j] = cccaleq
    Cb_n[i,j] = cccalbeq
    Cbst_n[i,j] = cccalbsteq
    i += 1
i=1
j=0
C_n[i,j] = cccaleq
Cb_n[i,j] = cccalbeq
Cbst_n[i,j] = cccalbsteq
i=Nx - 3
j=0
C_n[i,j] =cccaleq
Cb_n[i,j] =cccалbeq

```

```

Cbst_n[i,j] = cccalbsteq
i=1
j=1
while i<=j and j<Ny-1:
    C_n[i,j] = cccaleq
    Cb_n[i,j] = cccalbeq
    Cbst_n[i,j] = cccalbsteq
    i += 1
    j += 1
i=Nx -3
j=1
while i>j and j<Ny-1:
    C_n[i,j] = cccaleq
    Cb_n[i,j] = cccalbeq
    Cbst_n[i,j] = cccalbsteq
    i -= 1
    j += 1
i=0
j=0
C_n[i,j] = cccaleq
Cb_n[i,j] = cccalbeq
Cbst_n[i,j] = cccalbsteq
i=Nx -2
j=0
C_n[i,j] = cccaleq
Cb_n[i,j] = cccalbeq
Cbst_n[i,j] = cccalbsteq
i=2
j=1
while i>j and j<Ny-2:

```

```

    C_n[i,j] = cccaleq
    Cb_n[i,j] = cccalbeq
    Cbst_n[i,j] = cccalbsteq
    i += 1
    j += 1
i=Nx-4
j=1
while i>j and j<Ny-2:
    C_n[i,j] = cccaleq
    Cb_n[i,j] = cccalbeq
    Cbst_n[i,j] = cccalbsteq
    i -= 1
    j += 1
for j in range(1,Ny-2,1):
    for i in range(1,Nx-1,1):
        if j + 1 < i < -j + Nx - 3 :
            C_n[i,j] = cccaleq
            Cb_n[i,j] = cccalbeq
            Cbst_n[i,j] = cccalbsteq
def fc(i,j):
    x=-Dc*(C_n[i+1,j]-C_n[i,j])/dx
    return x
def gc(i,j):
    x=-Dc*(C_n[i,j+1]-C_n[i,j])/dy
    return x
def fcb(i,j):
    x=-Db*(Cb_n[i+1,j]-Cb_n[i,j])/dx
    return x
def gcb(i,j):
    x=-Db*(Cb_n[i,j+1]-Cb_n[i,j])/dy

```



```

        return x
l2=(25*dx**2 +dy**2) / 36
d2=(25*dy**2 +dx**2) / 36
def Qc(i,j):
    x=- konst*C_n[i,j]*(bstt-Cbst_n[i,j]) + koffst*Cbst_n[i,j] - kon*C_n[i,j]*(bt-
    Cb_n[i,j]) + koff*Cb_n[i,j] return x
def Qcb(i,j):
    x= kon*C_n[i,j]*(bt-Cb_n[i,j]) - koff*Cb_n[i,j]
    return x
def Qcbst(i,j):
    x=konst*C_n[i,j]*(bstt - Cbst_n[i,j]) - koffst*Cbst_n[i,j]
    return x
for n in range(0, Nt):
    i= Ny
    j=Ny - 2
    while i < (Nx - Ny - 1 ):
        C[i,j] = (C_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j) - dy*fc(i,j) + dx*gc(i,j-1) +
dx*(-Juo+Jui)) + dt*(Qc(i,j)))
        Cb[i,j] = Cb_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fcb(i-1,j) - dy*fcb(i,j) + dx*gcb(i,j-1)
) + dt*(Qcb(i,j))
        Cbst[i,j] = Cbst_n[i,j] + dt*Qcbst(i,j)
        i += 1
    i=Ny - 1
    j=Ny-2
    C[i,j] = (C_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j)*(((dx**2)/l2)*6/5) - dy*fc(i,j) +
dx*gc(i,j-1) + dx*(-Juo+Jui)) + dt*(Qc(i,j)))
    Cb[i,j] = Cb_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fcb(i-1,j)*(((dx**2)/l2)*6/5) - dy*fcb(i,j)
+ dx*gcb(i,j-1) ) + dt*(Qcb(i,j))
    Cbst[i,j] = Cbst_n[i,j] + dt*Qcbst(i,j)
    i=Nx - Ny - 1

```

```

j=Ny- 2
C[i,j] = (C_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j) - dy*fc(i,j)*(((dx**2)/l2)*6/5) +
dx*gc(i,j-1) + dx*(-Juo+Jui)) + dt*(Qc(i,j)))
Cb[i,j] = Cb_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j) - dy*fc(i,j)*(((dx**2)/l2)*6/5)
+ dx*gcb(i,j-1) ) + dt*(Qcb(i,j))
Cbst[i,j] = Cbst_n[i,j] + dt*Qcbst(i,j)
i=2
j=0
while i < Nx - 3 :
    C[i,j] = (C_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j) - dy*fc(i,j) - dx*gc(i,j) +
dx*(Jdi-Jdo) ) + dt*(Qc(i,j)))
    Cb[i,j] = Cb_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j) - dy*fc(i,j)- dx*gcb(i,j))
+ dt*(Qcb(i,j))
    Cbst[i,j] = Cbst_n[i,j] + dt*Qcbst(i,j) i += 1
i=1
j=0
C[i,j] = (C_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(-dy*fc(i,j) - dx*gc(i,j)*(((dy**2)/d2)*6/5) +
dy*fc(i-1,j)*(((dx**2)/l2)*6/5) + dx*(Jdi-Jdo) ) + dt*(Qc(i,j)))
Cb[i,j] = (Cb_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(-dy*fc(i,j) - dx*gcb(i,j)*(((dy**2)/d2)*6/5)
+ dy*fc(i-1,j)*(((dx**2)/l2)*6/5) ) + dt*(Qcb(i,j)))
Cbst[i,j] = Cbst_n[i,j] + dt*Qcbst(i,j)
i=Nx - 3
j=0
C[i,j] = (C_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j) - dx*gc(i,j)*(((dy**2)/d2)*6/5) -
dy*fc(i,j)*(((dx**2)/l2)*6/5) + dx*(Jdi-Jdo))+ dt*(Qc(i,j)))
Cb[i,j] = (Cb_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j) - dx*gcb(i,j)*(((dy**2)/d2)*6/5)
- dy*fc(i,j)*(((dx**2)/l2)*6/5) ) + dt*(Qcb(i,j)))
Cbst[i,j] = Cbst_n[i,j] + dt*Qcbst(i,j)
i=1
j=1

```

while i<=j and j<Ny-1:

$$C[i,j] = (C_n[i,j] + (2*dt/(dx*dy))*(-dy*fc(i,j)*(((dx**2)/12)*6/5) + dx*gc(i,j-1)*(((dy**2)/d2)*6/5) + np.sqrt(dx**2 + dy**2)*(Jli-Jlo)) + dt*(Qc(i,j)))$$

$$Cb[i,j] = (Cb_n[i,j] + (2*dt/(dx*dy))*(-dy*fc(i,j)*(((dx**2)/12)*6/5) + dx*gcb(i,j-1)*(((dy**2)/d2)*6/5)) + dt*(Qcb(i,j))$$

$$Cbst[i,j] = Cbst_n[i,j] + dt*Qcbst(i,j)$$

$$i += 1$$

$$j += 1$$

$$i=Nx -3$$

$$j=1$$

while i>j and j<Ny-1:

$$C[i,j] = (C_n[i,j] + (2*dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j)*(((dx**2)/12)*6/5) + dx*gc(i,j-1)*(((dy**2)/d2)*6/5) + np.sqrt(dx**2 + dy**2)*(Jri-Jro)) + dt*(Qc(i,j)))$$

$$Cb[i,j] = (Cb_n[i,j] + (2*dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j)*(((dx**2)/12)*6/5) + dx*gcb(i,j-1)*(((dy**2)/d2)*6/5)) + dt*(Qcb(i,j))$$

$$Cbst[i,j] = Cbst_n[i,j] + dt*Qcbst(i,j) \quad i -= 1$$

$$j += 1$$

$$i=0$$

$$j=0$$

$$C[i,j] = (C_n[i,j] + (2*dt/(dx*dy))*(-dy*fc(i,j)*(((dx**2)/12)*6/5) + dx*(Jdi-Jdo) + np.sqrt(dx**2 + dy**2)*(Jli-Jlo)) + dt*(Qc(i,j)))$$

$$Cb[i,j] = Cb_n[i,j] + (2*dt/(dx*dy))*(-dy*fc(i,j)*(((dx**2)/12)*6/5)) + dt*(Qcb(i,j))$$

$$Cbst[i,j] = Cbst_n[i,j] + dt*Qcbst(i,j)$$

$$i=Nx -2$$

$$j=0$$

$$C[i,j] = (C_n[i,j] + (2*dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j)*(((dx**2)/12)*6/5) + dx*(Jdi-Jdo) + np.sqrt(dx**2 + dy**2)*(Jri-Jro)) + dt*(Qc(i,j)))$$

$$Cb[i,j] = Cb_n[i,j] + (2*dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j)*(((dx**2)/12)*6/5)) + dt*(Qcb(i,j))$$

$$Cbst[i,j] = Cbst_n[i,j] + dt*Qcbst(i,j)$$

$$i=2$$

```

j=1
while i>j and j<Ny-2:
    C[i,j] = (C_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j)*(((dx**2)/l2)*6/5) - dy*fc(i,j)
+ dx*gc(i,j-1) - dx*gc(i,j)*(((dy**2)/d2)*6/5)) + dt*(Qc(i,j))
    Cb[i,j] = (Cb_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j)*(((dx**2)/l2)*6/5) - dy*fc(i,j)
+ dx*gcb(i,j-1) - dx*gcb(i,j)*(((dy**2)/d2)*6/5)) + dt*(Qcb(i,j))
    Cbst[i,j] = Cbst_n[i,j] + dt*Qcbst(i,j)
    i += 1
    j += 1
i=Nx-4
j=1
while i>j and j<Ny-2:
    C[i,j] = (C_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j) - dy*fc(i,j)*(((dx**2)/l2)*6/5)
+ dx*gc(i,j-1) - dx*gc(i,j)*(((dy**2)/d2)*6/5)) + dt*(Qc(i,j))
    Cb[i,j] = (Cb_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j) - dy*fc(i,j)*(((dx**2)/l2)*6/5)
+ dx*gcb(i,j-1) - dx*gcb(i,j)*(((dy**2)/d2)*6/5)) + dt*(Qcb(i,j))
    Cbst[i,j] = Cbst_n[i,j] + dt*Qcbst(i,j)
    i -= 1
    j += 1
for j in range(1,Ny-2,1):
    for i in range(1,Nx-1,1):
        if j + 1 < i < -j + Nx - 3 :
            C[i,j] = (C_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j) - dy*fc(i,j) +
dx*gc(i,j-1) - dx*gc(i,j)) + dt*(Qc(i,j)))
            Cb[i,j] = (Cb_n[i,j] + (dt/(dx*dy))*(dy*fc(i-1,j) - dy*fc(i,j)
+ dx*gcb(i,j-1) - dx*gcb(i,j)) + dt*(Qcb(i,j)))
            Cbst[i,j] = Cbst_n[i,j] + dt*Qcbst(i,j)
C_n[:,:] = C
Cb_n[:,:] = Cb
Cbst_n[:,:] = Cbst

```

```
if n % SNt == 0:
    Ca[:, :, int(n/SNt)] = C_n
    Cab[:, :, int(n/SNt)] = Cb_n
    Cabst[:, :, int(n/SNt)] = Cbst_n
return Ca[:, :, :], Cab[:, :, :], Cabst[:, :, :]
```

Tesis disponible bajo Licencia: Creative Commons, Atribución – No Comercial – Compartir

Igual (by-nc-sa) 2.5

Argentina, Buenos Aires, 2023