

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Monterrey

*Estudio del comportamiento viscoelástico de la membrana
celular y su interacción con el citoesqueleto mediante un
modelo matemático*

Tesis que presenta
Abel Emanuel Martínez Luna

Para obtener el grado de
**Maestro en Ciencias con Especialidad en
Ingeniería y Física Biomédicas**

Director de Tesis:
Moisés Santillán Zerón

Agradecimientos

Quiero agradecer:

A Dios por darme salud y fuerzas para culminar esta etapa.

A mi asesor el Dr. Moisés Santillán Zerón por su paciencia, apoyo y buenos consejos para llevar a cabo este proyecto. Sin sus exigencias este trabajo no hubiese culminado.

A mis sinodales Dr. Jesús Guadalupe Rodríguez González y Dr. Daniel Sánchez Herrera por sus consejos y sugerencias al presente trabajo.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría, por hacerme parte de la institución y su apoyo incondicional.

A mis profesores, compañeros, al personal administrativo por su ayuda y apoyo en todo mi proceso académico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su financiamiento en la realización de este proyecto de tesis.

A mis padres Anastacio Martínez Martínez y Onésima Luna Silva, y a mi esposa Citlaly Hernández Quintas por apoyarme, escucharme y aconsejarme durante esta experiencia, gracias por su amor y entrega incondicional.

A mis amigos por acogerme y echarme la mano. Por sus buenas charlas y discusiones las cuales fueron de mucha utilidad para el desarrollo de este proyecto

Índice general

Índice de figuras	3
1. Introducción	9
2. Marco teórico	12
2.1. La diabetes	12
2.2. Diabetes tipo I	13
2.3. Diabetes tipo II	14
2.4. Neuropatía Diabética	15
2.5. Modelo de neuropatía diabética	17
2.6. Preliminares sobre la estructura celular	19
3. Hipótesis y objetivos	23
3.1. Planteamiento del problema	23
3.2. Hipótesis	23
3.3. Objetivos	24
4. Desarrollo del modelo	25
4.1. Modelo matemático para la respuesta mecánica de la célula ante una fuerza perpendicular a la membrana	25
4.2. Acerca de la estimación bayesiana	33
4.3. Solución del problema inverso	36
5. Resultados	42
6. Discusión	47
7. Conclusión	49

Índice de figuras

2.1. Módulo de Young de células	19
2.2. Partes de una célula animal	20
2.3. Membrana Plasmática	22
4.1. Partes principales de una célula animal	26
4.2. Esquema de una célula sometida a deformación mecánica	27
4.3. Diagrama de cuerpo libre	28
4.4. Representación mecánica del citoesqueleto de la célula	30
4.5. Gráfico de dispersión de los parámetros	38
4.6. Estimador Máximo Posterior	40
5.1. Distribución posterior para w	43
5.2. Distribución posterior para η	44
5.3. Distribución posterior para los coeficientes de rigidez	45
5.4. Comparación de medias de los coeficientes de rigidez	46

Resumen

Dentro de las diversas complicaciones que se derivan de la diabetes mellitus, la más común es la neuropatía diabética siendo ésta una causa importante de morbilidad y mortalidad asociada a la enfermedad. Trabajos previos sugieren que la neuropatía diabética, además de alterar la actividad de diversas fibras nerviosas sensoriales debido a procesos inflamatorios y de estrés oxidativo, también modifican las propiedades de la membrana lo cual eleva la actividad de los canales iónicos. Se llegó a este resultado evaluando el efecto de la patología sobre la rigidez de la membrana de neuronas sensoriales provenientes de ratones diabéticos modelo. Esto arrojó que los procesos derivados de esta enfermedad disminuyen la magnitud del módulo de Young de la membrana en conjunto con el aumento de la capacidad de respuesta.

Con el fin de corroborar estos resultados y de investigar cuáles otras propiedades mecánicas de la célula se ven modificadas ante la neuropatía diabética, en este trabajo se desarrolló un modelo viscoelástico que integra tanto la viscosidad de la célula, la rigidez de la membrana y la rigidez del citoesqueleto. Haciendo uso de este modelo y utilizando resultados de experimentos de deformación realizados sobre la membrana de células neuronales provenientes de ratones diabéticos, se realizó una estimación de parámetros mediante inferencia bayesiana. Los resultados que se obtuvieron con este modelo fue que, además de haber una

disminución en la magnitud del módulo de Young de la membrana también se observó una disminución en el coeficiente viscoso de la célula. Por otro lado, aunque no se encontraron cambios en la rigidez del citoesqueleto, fue posible observar que el citoesqueleto de actina es una estructura dos veces menos rígida que la membrana celular.

Abstract

Among the different complications derived from diabetes mellitus, the most common is diabetic neuropathy, this being an important cause of morbidity and mortality associated with the disease. Previous work suggests that diabetic neuropathy, in addition to altering the activity of various sensory nerve fibers due to inflammatory processes and oxidative stress, also modifies the properties of the membrane, which increases the activity of ion channels. This result was reached by evaluating the effect of the pathology on the stiffness of the membrane of sensory neurons from model diabetic mice. This showed that the processes derived from this disease decrease the magnitude of the Young's modulus of the membrane together with the increase of the response capacity.

In order to corroborate these results and to investigate which other mechanical properties of the cell are modified in diabetic neuropathy, in this work a viscoelastic model was developed that integrates both the viscosity of the cell, the rigidity of the membrane and the rigidity of the cytoskeleton. Making use of this model and using results of deformation experiments carried out on the membrane of neuronal cells from diabetic mice, an estimation of parameters was carried out by Bayesian inference. The results that were obtained with this model were that, in addition to having a decrease in the magnitude of the Young's

modulus of the membrane, a decrease in the viscous coefficient of the cell was also observed. On the other hand, although no changes were found in the stiffness of the cytoskeleton, it was possible to observe that the actin cytoskeleton is a structure twice less rigid than the cell membrane.

Capítulo 1

Introducción

Hasta a mediados del siglo pasado, las principales causas de muerte eran las enfermedades infecciosas. Sin embargo, con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 se marcó un antes y un después en la historia de la medicina [1]. Gracias a este descubrimiento se pudo aumentar la esperanza de vida de las personas. De acuerdo con la Organización mundial de la Salud (OMS), las enfermedades no transmisibles (ENT) son enfermedades crónicas que resultan de la combinación de factores genéticos, fisiológicos, conductuales y ambientales. Por lo general estas enfermedades tienden a ser de larga duración. Las ENT afectan a todos los grupos de edad y a todas las regiones y países [2]. Estas enfermedades se suelen asociar a los grupos de edad más avanzada, pero los datos muestran que 15 millones de todas las muertes atribuidas a las ENT se producen entre los 30 y los 69 años de edad. Más del 85% de estas muertes prematuras ocurren en países de ingresos bajos y medianos. Niños, adultos y ancianos son todos ellos vulnerables a los factores de riesgo que favorecen las ENT como la inactividad física, la exposición al humo del tabaco o el uso nocivo del alcohol. Los principales tipos de ENT son las enfermedades cardiovasculares (como los ataques cardíacos y los accidentes cerebrovasculares), el cáncer,

las enfermedades respiratorias crónicas (como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el asma) el síndrome metabólico y la diabetes. El término síndrome metabólico agrupa varios factores de riesgo cardiovascular, el principal de los cuales es la resistencia a la acción de la insulina. La fisiopatología del síndrome metabólico; la obesidad, parece ser uno de los factores desencadenantes más importantes entre otras alteraciones metabólicas que lo caracterizan: intolerancia a la glucosa, diabetes, dislipidemia e hipertensión. Por lo tanto, en la mayoría de los casos la expresión del síndrome metabólico ocurre en individuos obesos. En muchos casos, la expresión del síndrome metabólico es en buena medida una comorbilidad o morbilidad asociada de la obesidad [3].

El síndrome metabólico ha sido reconocido desde hace más de 80 años y ha recibido diversas denominaciones a través del tiempo. Como se ha mencionado en el párrafo anterior, de ninguna manera se trata de una única enfermedad, sino fundamentalmente de una asociación de problemas que por sí solos generan un riesgo para la salud y que en su conjunto se potencializa. Estas enfermedades se ven favorecidas por factores tales como la urbanización rápida y no planificada, la mundialización de modos de vida poco saludables o el envejecimiento de la población. Las dietas malsanas y la inactividad física pueden manifestarse en forma de tensión arterial elevada, aumento de la glucosa y los lípidos en la sangre, y obesidad. Son los llamados "factores de riesgo metabólicos", que pueden dar lugar a enfermedades cardiovasculares, la principal ENT por lo que respecta a las muertes prematuras [3].

La obesidad y el síndrome metabólico como fenómenos independientes hacen necesario identificar los mecanismos responsables de la asociación entre estas condiciones ya que se ha encontrado que ambas condiciones se encuentran relacionadas con la aparición de la

diabetes mellitus. La diabetes y el conjunto de complicaciones que de ella derivan han tenido fuertes repercusiones económicas por los costos médicos y la pérdida de empleos para la persona que la padece. Así mismo, para los sistemas de salud y para las economías de los países por los costos elevados en atención hospitalaria y los tratamientos necesarios para esta enfermedad. Debido a este contexto mundial sobre la diabetes y las consecuencias que tienen para la salud de la población se ha dedicado una gran cantidad de investigación al tema. Hasta la fecha aún se desconocen los mecanismos que dan origen a la diabetes, principalmente la diabetes tipo 1. Las investigaciones realizadas han sugerido una serie de factores combinados entre sí que dan origen a dicha patología tales como factores genéticos los cuales sugieren que las personas heredan a sus descendientes la predisposición a padecer esta enfermedad. La autoinmunidad que tiene que ver con la generación de una reacción contra las células productoras de insulina. Y otro factor que conlleva a la diabetes es el daño ambiental.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1. La diabetes

La diabetes mellitus (o simplemente, diabetes) es una afección grave y de largo plazo (o crónica) que ocurre cuando los niveles de glucosa en la sangre de una persona son altos porque su cuerpo no puede producir insulina o la producción de esta hormona es insuficiente, o cuando el organismo no puede utilizar de manera eficaz la insulina que produce. La insulina es una hormona indispensable que se produce en el páncreas. Permite que la glucosa del torrente circulatorio ingrese en las células del cuerpo, donde se convierte en energía. Además, es fundamental para el metabolismo de las proteínas y las grasas. La falta de insulina o la incapacidad de las células para responder a ella deriva en altos niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia), el cual es un indicador clínico de la diabetes [4]. Si no se controla el déficit de insulina a largo plazo, muchos de los órganos del cuerpo pueden resultar dañados, lo que derivaría en complicaciones de la salud incapacitantes y potencialmente mortales, como las enfermedades cardiovasculares (ECV), lesión de los nervios (neuropatía), enfermedad renal (nefropatía) y afección ocular (causante de la retinopatía, la pérdida de

visión e incluso la ceguera). Sin embargo, si se logra un tratamiento apropiado de la diabetes, estas graves complicaciones se pueden retrasar o prevenir totalmente.[5]

2.2. Diabetes tipo I

La diabetes tipo 1 es causada por una reacción autoinmunitaria en la que el sistema inmunitario del organismo ataca a las células beta del páncreas que producen insulina. Como consecuencia, el cuerpo no produce insulina o la cantidad que produce no es suficiente [4]. Aunque no se entienden totalmente las causas de este proceso destructivo, una explicación probable es que la reacción autoinmunitaria se origine a raíz de la combinación de una sensibilidad genética (que se atribuye a una gran cantidad de genes) y un desencadenante ambiental, como una infección vírica. También se ha atribuido a algunas toxinas o factores alimenticios. La afección puede aparecer a cualquier edad, aunque la diabetes tipo 1 ocurre con más frecuencia en niños y en jóvenes. La diabetes tipo 1 es una de las enfermedades crónicas mas comunes en la infancia, aunque también se detectan casos de diabetes tipo 2 en adolescentes, debido al incremento en los niveles sobrepeso y a la obesidad [5]. Las personas con diabetes tipo 1 necesitan inyecciones de insulina para mantener el nivel de glucosa dentro de los valores apropiados. Sin ellas, no sobrevivirían. No obstante, con el tratamiento apropiado de insulina diaria, un control regular de la glucosa en sangre, educación y apoyo, pueden llevar vidas saludables y retrasar o prevenir muchas de las complicaciones que se asocian con la diabetes. Durante la primera infancia y la adolescencia, resulta muy difícil seguir un plan estructurado de autocontrol, que incluye la utilización de insulina, la monitorización de la glucosa en sangre, actividad física y una dieta saludable. En muchos países, en particular en familias con pocos recursos económicos, el acceso a la insulina y

a las herramientas de cuidado personal, incluida la educación estructurada en diabetes, son limitados. Esto puede llevar a una grave incapacidad y a una muerte prematura como consecuencia de las sustancias dañinas que se forman en el cuerpo, conocidas como cuerpos cetónicos (cetoacidosis diabética o CAD) [6]

2.3. Diabetes tipo II

La diabetes tipo 2 es una enfermedad crónica que se da cuando el organismo no utiliza la insulina adecuadamente; esto se conoce como resistencia a la insulina. Primero el páncreas produce insulina adicional para compensar pero con el tiempo el páncreas no puede producir suficiente insulina para hacer que su nivel de glucosa en la sangre sea normal. Durante el estado de resistencia a la insulina, la hormona no es eficaz, lo que deriva en un aumento de la producción de insulina [7]. Con el tiempo, se puede llegar a una producción de insulina inadecuada porque las células beta pancreáticas no cumplen con la demanda. La diabetes tipo 2 se ve con más frecuencia en adultos mayores, pero se evidencia cada vez más en niños y adultos jóvenes por los niveles crecientes de obesidad, inactividad física y dieta inapropiada [8]. Este tipo de diabetes puede aparecer con síntomas similares a los de la diabetes tipo 1 pero, en general, la aparición del tipo 2 es mucho menos drástica y es probable que ocurra sin síntomas. Además, suele ser imposible determinar el momento exacto de la aparición de la diabetes tipo 2. Aún no se comprenden totalmente las causas de la diabetes tipo 2, pero existe una estrecha relación con el sobrepeso, la obesidad y la edad madura, así como con el origen étnico y los antecedentes familiares. Como con la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 se origina a partir de la combinación de una predisposición multigénica y desencadenantes ambientales [9].

2.4. Neuropatía Diabética

Los vertebrados tienen un sistema sensorial complejo regulado por la actividad de una red de neuronas que se encargan de captar los estímulos, de transmitir la información y procesarla. Gracias a estos mecanismos, los humanos tenemos la oportunidad de sentir una multitud de estímulos del exterior que permiten nuestra interacción en sociedad, por lo que su adecuado funcionamiento resulta crucial para el bienestar del individuo. Muchos de estos procesos están relacionados con los cambios en las diferentes propiedades mecánicas de la membrana de las células; la rigidez, la fluidez, entre otras, así como de muchas proteínas presentes en las células. Entender las implicaciones de los diferentes cambios en las propiedades mecánicas puede permitir el desarrollo de procedimientos y/o moléculas que ayuden a combatir ciertas afecciones como la neuropatía diabética [10].

La neuropatía diabética (ND) es un tipo de neuropatía periférica causada por complicaciones en pacientes que presentan algún tipo de diabetes mellitus, aunque existe una mayor probabilidad de que se desarrolle en personas con diabetes tipo 2 (DT2) o prediabéticas. No obstante, es posible que la mitad de estas personas, incluyendo pacientes con diabetes tipo 1 (DT1), presenten alguna especie de neuropatía durante su vida. La ND afecta principalmente a los nervios sensoriales y, comúnmente, a aquellos que inervan a las extremidades más largas, con un gradiente de severidad distal a proximal, es decir, la diabetes produce un mayor daño conforme más largo sea el nervio. En general, al establecerse algún tipo de diabetes, este tipo de fibras son las primeras estructuras que resultan afectadas por la hiperglucemia, dislipidemia y la resistencia a la insulina, con un efecto marcado principalmente por fenómenos derivados de estrés oxidativo e inflamación. Esto resulta, en las primeras etapas de la neuropatía, en el desarrollo de alodinia e hiperalgesia y culmina con

la pérdida de la sensibilidad. Las afectaciones de la neuropatía promueven un incremento de la reactividad eléctrica de la membrana de las fibras lo que se observa como una mayor cantidad de mensajes aferentes que viajan por la fibra [11].

Durante las etapas tempranas de la ND, los pacientes experimentan dolor, hormigueo y picazón o parestesia en los pies, además de entumecimiento, alodinia (sensación de dolor al tacto suave) e hiperalgesia (sensibilidad al dolor incrementada), o bien, algún tipo de dolor neuropático. Al progresar la enfermedad, los síntomas se extienden a las manos y es posible que ocurra la pérdida total de sensibilidad o incluso se presente un daño a los nervios motores. Se cree que esta susceptibilidad que presentan los nervios sensoriales es debido tanto al grado de acople entre los nervios y las células de Schwann como a la cantidad de mielinización de la fibra nerviosa puesto que son las fibras carentes o poco mielinizadas las que presentan una afección principal [12]. La diabetes, en sus distintas condiciones, promueve el aumento de la glucosa en sangre (hiperglucemia), el desbalance en diversos lípidos (dislipidemia) y la resistencia a la insulina. Estas complicaciones comprometen la actividad de diversas rutas metabólicas lo que origina la producción de metabolitos que tienen un impacto negativo para la fisiología de la fibra nerviosa, entre otras estructuras. Estas alteraciones estimulan la actividad de la ruta de los polioles, la ruta de las hexosaminas y de la proteína quinasa C (PKC); además, permiten la acumulación de productos finales de glicación avanzada (AGE, por su siglas en inglés) en la fibra nerviosa, así como el flujo excesivo de glucosa y ácidos grasos. En conjunto, todas estas rutas activas ocasionan un desbalance metabólico lo que lleva a la formación de diversos metabolitos como el metilglicoxal y especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales son las principales causantes del daño nervioso y por lo tanto del dolor neuropático [13].

2.5. Modelo de neuropatía diabética

Con el fin de poder entender el posible efecto que tiene la neuropatía diabética sobre la rigidez de la membrana celular, se realizó un trabajo experimental en el CINVESTAV Monterrey en el año 2019 [14] en el cual se utilizó un modelo murino. Para lograr establecer la neuropatía diabética se utilizó un modelo de diabetes mellitus tipo 1 en ratón siguiendo la metodología que a continuación se detalla:

Se utilizaron ratones de la cepa CD1 de un mes de edad de entre 20 y 30 gramos, los cuales fueron divididos en dos grupos: uno control, es decir, sin tratamiento y otro como modelo de diabetes tipo 1. Para lograr esto, al primer grupo se le suministró un buffer de solución salina como control. Al segundo grupo se suministró vía intraperitoneal una dosis de 180 mg/kg de estreptozotocina disuelta en una mezcla de buffer de citrato 0.1 M a pH 4.5 y solución salina. Este compuesto es sintetizado por *Streptomyces achromogenes* y se utiliza para inducir diabetes mellitus tanto dependiente de insulina como independiente de ésta según el método de administración implementado, por lo que fue tomado como modelo de estudio de la ND. Una noche previa a la inyección, el alimento fue retirado para mejorar la eficiencia de captación de STZ por las células β del páncreas. Con el fin de corroborar la efectividad del tratamiento, a ambos grupos se les monitoreó semanalmente, desde una semana previa al tratamiento hasta por diez semanas posteriores, el peso y la glucosa en sangre, mediante un detector de glucosa comercial, Accu-Chek Performa (Roche). Se determinó que aquellos ratones tratados con STZ que no presentaran valores superiores a 300 mg/dl de glucosa, resultaron ser resistentes y fueron descartados del estudio. Todos los ratones se mantuvieron en condiciones *ad libitum* de agua y comida.

Asimismo, durante el tiempo de observación, se realizó simultáneamente un examen se-

manal para medir la sensibilidad mecánica y, así, observar la presencia de hiperalgesia y alodinia lo que determina el desarrollo de la neuropatía diabética. Luego de 10 semanas posteriores a la inyección, antes del desarrollo de hipoalgesia, los ratones fueron sacrificados y las neuronas sensoriales del DRG fueron extraídas.

Para lograr una medida de la rigidez de la membrana celular se tomó como parámetro el módulo de Young. Para la obtención del módulo de Young de la membrana celular de neuronas sensoriales, las células se disgregaron y sembraron con el fin de poder hacer estimulaciones por deformación sobre células individuales. Las deformaciones se realizaron con un flujo de líquido producido por la aplicación de una rampa de presión de hasta 60 kPa, o hasta obtener una deformación no mayor al 20 % del grosor de la célula ($\approx 5\mu\text{m}$), en la punta de una pipeta situada al centro y normal a la superficie. Durante cada estimulación, se registró la posición de la pipeta, la corriente que la atraviesa y la presión aplicada. Con los registros de la deformación obtenida se trazó el cambio de la presión en función de la deformación con el fin de ajustar a una línea recta cada registro debido a que la pendiente de la recta resultante es proporcional al módulo de Young de la célula observada. Se tomaron en consideración solo aquellas regiones de la curva que presentara un comportamiento lineal uniforme para asegurar que dichas contribuciones correspondieran solo a la membrana de la célula. Humberto encontró que de manera patológica en la neuropatía diabética, la función de las fibras nerviosas de los receptores sensoriales se encuentra comprometida. Humberto sugirió que es posible que este aumento se deba a la disminución en los valores umbral de respuesta en las terminales nerviosas o, bien, a la elevada actividad de los receptores con lo que se logran los umbrales con mayor facilidad. Esta conclusión se obtuvo después de encontrar una diferencia significativa entre los módulos de Young entre ambos grupos, observando una disminución de este parámetro en el caso del grupo tratado con respecto

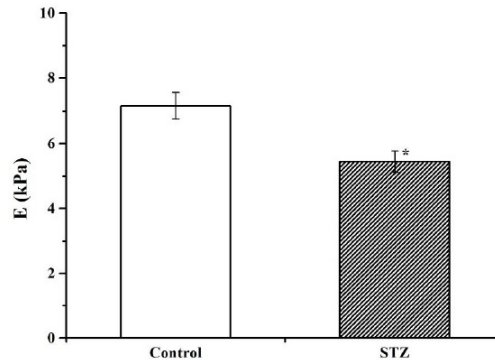


Figura 2.1: Efecto de la neuropatía diabética sobre la rigidez de neuronas sensoriales. La media de los módulos de Young de la membrana celular de neuronas sensoriales de ratones con neuropatía diabética (STZ) es comparada contra los valores obtenidos de ratones control. $p < 0.05$, $n=39$ ratones, media \pm SEM. Fuente: [14]

al grupo control (ver figura 2.1).

2.6. Preliminares sobre la estructura celular

La célula animal es la unidad básica de construcción de los organismos animales. Es un tipo de célula eucarionte al igual que las células vegetales por lo tanto su contenido genético se encuentra rodeada por una estructura membranosa llamada núcleo. En este núcleo, dicha información se encuentra almacenada en forma de ácido desoxirribonucleico o **ADN**. Se encuentra delimitado por una envoltura nuclear la cual es una membrana doble con aberturas porosas por donde circulan diferentes compuestos de una manera específica y regulada. El líquido interior donde flotan los compuestos nucleares se conoce como nucleoplasma [23]. Cerca del núcleo celular dentro del citoplasma se encuentra una zona conocida como centrosoma. Esta es la zona donde se producen los microtúbulos. Los microtúbulos son un componente del citoesqueleto con un papel crucial en la organización interna de todas las células eucariotas. Realizan numerosas y variadas funciones: establecer la disposición

espacial de algunos orgánulos, formar un sistema de rieles para el tráfico vesicular o de macromoléculas entre compartimentos celulares, son imprescindibles para la división celular puesto que forman el huso mitótico, ayudan en el desplazamiento celular, permiten la polarización de ciertos tipos celulares y son esenciales para los cilios y de los flagelos. Son tubos largos y relativamente rígidos formados por dímeros de proteínas globulares denominadas α y β tubulina. Estas parejas se alinean mediante enlaces no covalentes en filas longitudinales denominadas protofilamentos como se muestra en la figura 2.2a. Un microtúbulo está formado normalmente por 13 protofilamentos [17], [18].

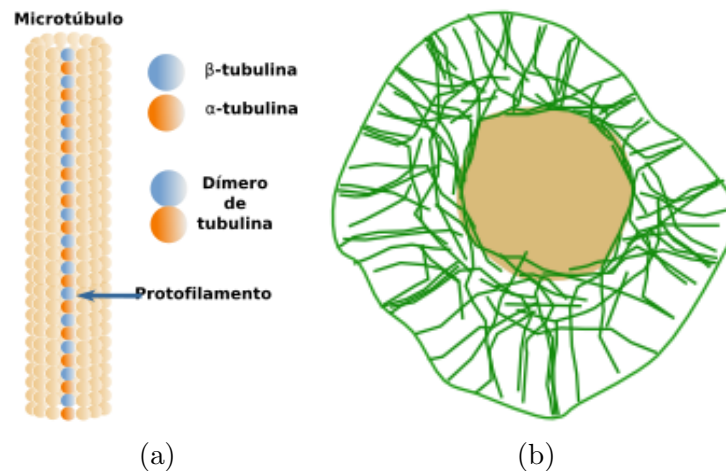


Figura 2.2: a) Imagen ilustrativa de un microtúbulo b) Esquema de la disposición de los filamentos intermedios en una célula animal. Tomado de [17]

Otro conjunto de microfilamentos son los filamentos intermedios cuya principal misión es permitir a las células o estructuras celulares soportar tensiones mecánicas. Se denominan intermedios porque su diámetro es de aproximadamente 8 a 15 nm, que se encuentra entre el de los filamentos de actina (7 a 8 nm) y el de los microtúbulos (25 nm) [19]. Los filamentos intermedios son flexibles y resistentes, dos propiedades óptimas para soportar las tensiones mecánicas. Se ha estimado que pueden estirarse entre un 250 % y un 350 % de su longitud

inicial cuando se someten a fuerzas de tensión. Cuando esto ocurre disminuyen su diámetro, por lo que se estima que los monómeros pueden deslizarse unos sobre otros. Se extienden desde la periferia hasta el núcleo y permiten la integridad de la célula [20] [21].

Otro grupo de filamentos que se encargan de la organización celular son los microfilamentos. En el caso de la célula animal, estos suelen encontrarse justo debajo de la membrana plasmática formando una capa con un grosor aproximado de 300 nm y constituyen un armazón de soporte para mantener o cambiar la forma celular. Los filamentos de actina se forman por la polimerización de una proteína globular denominada actina. Hay dos variantes: alfa y beta actina. La beta actina aparece en la mayoría de las células animales. La alfa actina abunda en el músculo. La actina es una proteína citosólica muy abundante, representa aproximadamente el 10% de las proteínas citosólicas. Una parte se encuentra formando parte de los filamentos (F-actina) de actina y el resto son proteínas no polimerizadas (G-actina) [22].

A todo este entramado de microtúbulos y microfilamentos se le conoce como citoesqueleto. El término no debe tomarse literal puesto que no es un entramado inerte que funciona únicamente como andamiaje para dar soporte físico a la células y a sus diferentes estructuras. El citoesqueleto es una estructura muy cambiante, es decir, a pesar de su nombre, el citoesqueleto no es sólo los huesos de las células sino también sus músculos.

Tras nuestro recorrido desde la parte más interna de la célula hacia la periferia tropezamos con la membrana plasmática la cual ya hemos mencionado en párrafos anteriores pero sin haber profundizado en ella. Las membranas celulares están formadas por lípidos, proteínas y, en menor medida, por glúcidos. La estructura y la organización de las membranas

celulares, así como sus propiedades, están condicionadas fundamentalmente por los lípidos [23]. Éstas son moléculas anfipáticas, con una parte hidrofílica y otra hidrofóbica, que se disponen formando una bicapa lipídica donde las partes hidrofóbicas se encuentran en el centro de la membrana y las hidrofílicas en contacto con el agua. Por tanto las membranas son como láminas extensas que cuando se observan en secciones transversales, perpendiculares a sus superficies, con el microscopio electrónico presentan un aspecto trilaminar: dos franjas oscuras que corresponden con las partes hidrofílicas de los lípidos y una franja clara más ancha entre ellas que son sus cadenas de ácidos grasos. A esto se denomina unidad de membrana y es así para todas las membranas celulares. El espesor de las membranas varía entre los 6 y los 10 nm.

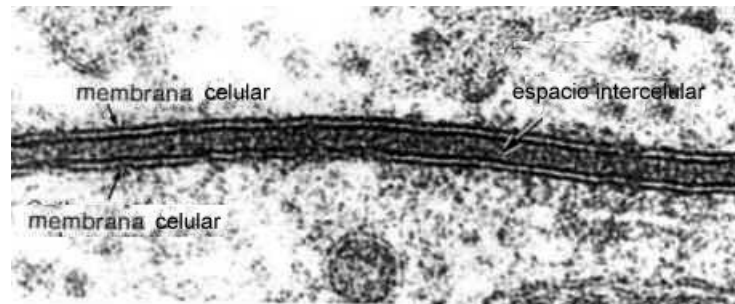


Figura 2.3: Microscopía electrónica de la membrana plasmática. Tomado de [23]

Muchas de las funciones de la membrana se deben a sus propiedades fisicoquímicas las cuales la convierten en una estructura fluida permitiendo movilidad lateral a sus moléculas como si se tratase de una lámina de un líquido viscoso [24].

Capítulo 3

Hipótesis y objetivos

3.1. Planteamiento del problema

En el trabajo desarrollado por Humberto en su tesis doctoral [14] en el 2019 se encontró que la diabetes induce cambios en la rigidez de la membrana celular observándose como una disminución del módulo de Young en células provenientes de ratones diabéticos con respecto a ratones no diabéticos. Sin embargo nosotros creemos que dichos cambios no solo se le atribuyen a la rigidez de la membrana sino también a otras propiedades mecánicas que se están ignorando como lo son la viscosidad y la rigidez de estructuras internas, en particular las del citoesqueleto. Por ello en este trabajo partimos de estos resultados para poder establecer la siguiente hipótesis.

3.2. Hipótesis

Los cambios observados en la respuesta mecánica de células neuronales provenientes de ratones diabéticos se deben a modificaciones en las propiedades viscoelásticas de la mem-

brana celular.

3.3. Objetivos

Para poder responder la hipótesis anterior se ha planteado cumplir con los siguientes objetivos:

Desarrollar un modelo matemático que nos permita estudiar las propiedades viscoelásticas de la membrana de células neuronales DRG provenientes de ratones diabéticos.

Resolver el modelo anterior para hallar los parámetros de mejor ajuste.

Capítulo 4

Desarrollo del modelo

El proyecto se desarrolló con el fin de poder entender como se modifican la elasticidad de la membrana celular así como del citoesqueleto bajo condiciones de diabetes. Se utilizan los conocimientos que se tienen de la estructura celular para plantear un modelo matemático que involucre la elasticidad de la membrana así como la viscosidad de la célula y la rigidez del citoesqueleto.

4.1. Modelo matemático para la respuesta mecánica de la célula ante una fuerza perpendicular a la membrana

En la siguiente imagen se muestra una caricatura de la célula en la cual se muestran sus principales elementos.

En el centro de la figura 4.1 podemos ver la representación del núcleo (ovalo oscuro) y junto a el un pequeño círculo correspondiente al centrosoma de donde surgen los microtúbulos (líneas verdes). En líneas cafés se representan los túbulos intermedios que, como ya hemos

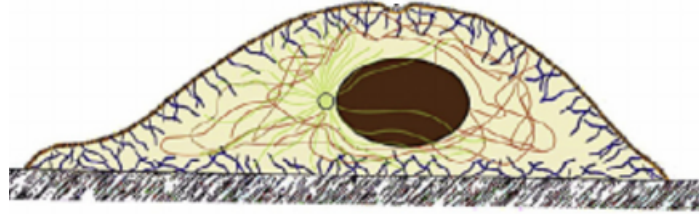


Figura 4.1: Estructura interna de la célula animal: de adentro hacia afuera, en color café se muestra el núcleo de la célula. Junto a este núcleo está el centrosoma de donde parten los microtúbulos (color verde). En color café claro se observa una red de túbulos intermedios que se extienden hasta la periferia de la célula. En color azul oscuro se representa la red de actina. La membrana celular se representa con una línea oscura la cual delimita y rodea a toda la célula.

mencionado, se extienden desde el núcleo hasta la periferia. Enseguida se observa un tercer conjunto de filamentos localizados debajo de la periferia (líneas azules) correspondientes a la red del citoesqueleto de actina. Finalmente podemos observar a la membrana plasmática la cual está representada por la línea oscura que delimita a todo nuestro sistema.

Para comenzar con el desarrollo de nuestro modelo se considerará el esquema de la figura 4.2 sometida a una deformación mecánica debida a una fuerza externa perpendicular a la superficie de la membrana. Esta fuerza simulará el jet de líquido expulsado por la micropipeta en los experimentos.

Tomaremos una sección de nuestro sistema; justamente la región que está siendo deformada, la cual marcamos con un cuadro rojo. Si se realiza un acercamiento de esta sección podremos apreciar tres elementos principales:

El segmento de línea en negro representa una porción de la membrana que está siendo deformada y al mismo tiempo está sujeta a tensión por el resto de la membrana circundante. Debajo de este elemento representamos en líneas azules una sección del citoesqueleto de actina y más abajo, en líneas grises, se muestra una sección del citoesqueleto más interno

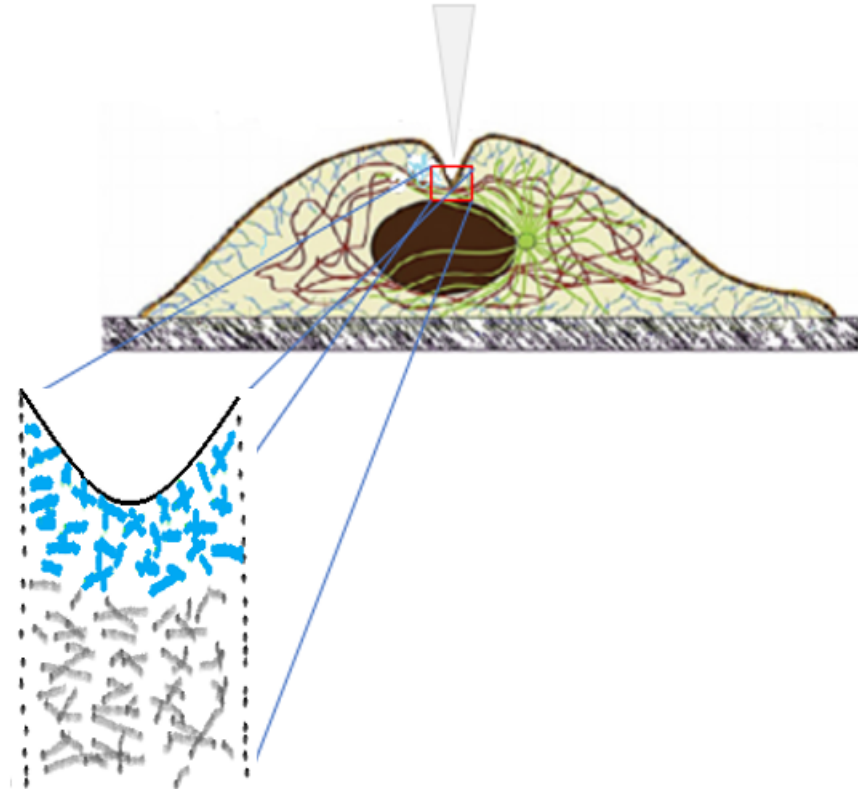


Figura 4.2: Imagen ilustrativa de una célula sometida a deformación mecánica por una fuerza externa perpendicular a la superficie

compuesto por los microtúbulos y túbulos intermedios principalmente. Para fines de nuestro modelo nos quedaremos con este último

Tomaremos la sección transversal donde se está llevando a cabo la máxima deformación. Esto es posible hacerlo ya que es la información que se tienen en los resultados experimentales. Procedemos a realizar un esquema con elementos mecánicos como se muestra en la figura 4.3. Primero representamos la porción de la membrana mediante un segmento rectangular. Sobre este elemento está actuando una fuerza externa de manera perpendicular. La red de actina la representaremos con un elemento mecánico de constante elástica k_1 y el citoesqueleto mas interno se representará con un segundo resorte de constante elástica

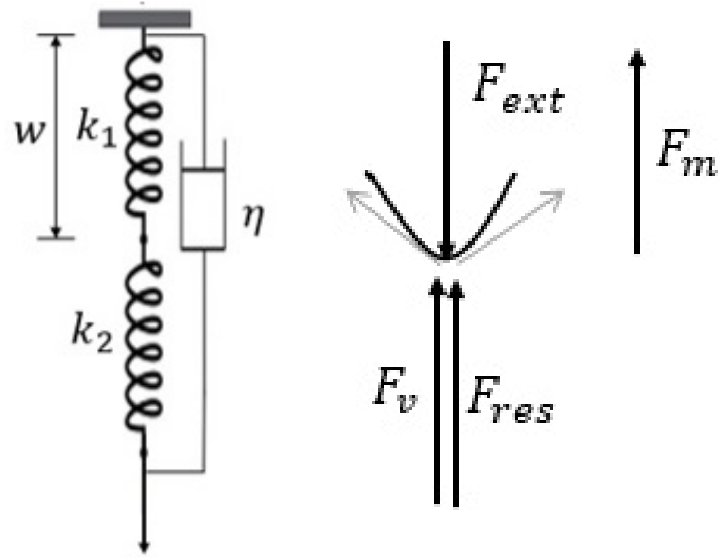


Figura 4.3: Esquema para hallar la ecuación de movimiento del modelo. a) Diagrama mecánico del sistema b) Diagrama de cuerpo libre del sistema. El punto de referencia se ubica en la superficie de la membrana y la dirección positiva es hacia abajo. Fuente: Elaboración propia

k_2 . Vamos a considerar que la red de actina tiene un grosor w y el grosor del citoesqueleto mas interno lo vamos a considerar sin restricción. Esto es posible realizarlo ya que las deformaciones que se realizaron en los experimentos no fueron mas allá del 20% del grosor total de la célula. Para modelar la parte viscosa del sistema añadiremos un elemento más el cual caracterizaremos con un coeficiente viscoso η . Al analizar el diagrama de cuerpo libre de la figura 4.3 podemos escribir la ecuación de movimiento como:

$$F_{ext} - F_v - F_{res} - F_m = m\ddot{x} \quad (4.1)$$

En donde x es la deformación total del sistema. En el lado izquierdo de esta ecuación de movimiento podemos apreciar cuatro fuerzas de las cuales, la fuerza externa F_{ext} es la fuerza ejercida sobre la membrana como consecuencia de la presión aplicada por el jet

de líquido a través de la micropipeta. F_v es la fuerza viscosa de la membrana celular y de la parte fluida interna de la célula la cual se opone a la deformación de la misma. Enseguida tenemos F_{res} la cual corresponde a la fuerza de resistencia que opone la red del citoesqueleto a ser deformado. Por último, F_m es la fuerza que ejerce la membrana celular al ser deformada. Estas últimas tres fuerzas apuntan en dirección contraria a la fuerza que deforma a la membrana F_{res} , he ahí el signo negativo de cada una de éstas. La primera de éstas fuerzas es un dato conocido ya que se puede determinar al conocer la presión aplicada sobre cada una de las células. Así que necesitamos expresiones para las tres fuerzas restantes. De la ley de Newton de los fluidos sabemos que la fuerza viscosa F_v es directamente proporcional a la velocidad con la cual el fluido se deforma [26]. La constante de proporcionalidad es justamente el parámetro viscoso η que hemos propuesto previamente. De esta manera tenemos que

$$F_v = \eta \dot{x} \quad (4.2)$$

Para hallar la forma de F_{res} consideremos el diagrama de la figura 4.4 y en principio se puede observar que:

La deformación total del sistema es la suma de las deformaciones individuales. Esto se representa mediante $x = x_1 + x_2$. La fuerza de compresión es la misma en ambos materiales, por lo tanto, la fuerza de restitución se encuentra utilizando la ley de Hooke para dos elementos en serie [27]

$$F_{res} = \frac{k_1 k_2}{k_1 + k_2} x \quad (4.3)$$

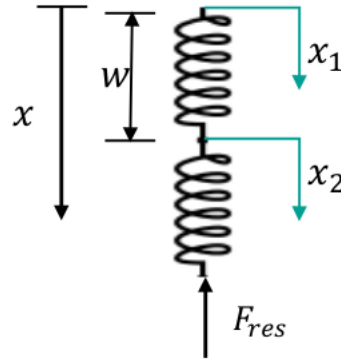


Figura 4.4: Representación mecánica del citoesqueleto de la célula: dado que la fuerza de compresión que se ejerce sobre la membrana es la misma fuerza que deforma la estructura interna de la célula, es posible considerar al citoesqueleto como dos materiales distintos, dispuestos en serie. Fuente: Elaboración propia

A medida que se aplica fuerza sobre nuestro sistema, cada uno de los resortes se va deformando y la fuerza de restitución se va dando conforme a la expresión 4.3 hasta llegar a un valor umbral. En algún punto de la compresión, el primer elemento se deformará por completo y en ese momento, la fuerza de restitución en el primer material será proporcional a su longitud, es decir,

$$F_1 = k_1 w \quad (4.4)$$

y la deformación total del sistema será $x = w + x_2$. Justo en ese instante la fuerza de restitución en el segundo material será entonces proporcional a la diferencia entre la deformación total y lo que ya se ha deformado el primer material. De este modo tenemos:

$$F_2 = F_{res} = k_2(x - w) \quad (4.5)$$

Esta última igualdad es posible hacerla ya que sabemos que la fuerza de restitución en

cada uno de los materiales es la misma. Sea x^* el valor umbral del sistema el cual se da cuando se alcanza la máxima deformación del primer material. Al igualar las expresiones 4.4 y 4.5 y sustituir x por x^* y despejar este último, obtenemos una expresión que nos permite saber cuánto se ha deformado el sistema justo en el instante en que el primer material se deforma por completo. Este valor está dado por:

$$x^* = w\left(1 + \frac{k_1}{k_2}\right) \quad (4.6)$$

Resumiendo lo anterior tenemos:

$$F_{res} = \begin{cases} \frac{k_1 k_2}{k_1 + k_2} x & \text{si } x \leq x^* \\ k_2(x - w) & \text{si } x > x^* \end{cases} \quad (4.7)$$

Ahora solo nos hace falta encontrar la forma para F_m . Para esto, consideremos que en la figura 4.1 sólo se está deformando la membrana y que debajo de ella no se encuentra ningún otro elemento. cuando la fuerza deformante F_{ext} actúa sobre el elemento de membrana, el resto de la membrana circundante ejerce una fuerza que se opone a dicha deformación. Esta fuerza de oposición tiene simetría axial, lo cual significa que las componentes horizontales se cancelan mutuamente, quedando sólo las componentes verticales. Éstas componentes se suman en una sola fuerza la cual hemos llamado F_m . Al aplicar la ecuación de Euler-Bernoulli de mecánica estructural a este sistema obtenemos que esta fuerza de oposición es directamente proporcional a la deformación. La constante de proporcionalidad será la constante elástica de la membrana k_m . Con esto tenemos que:

$$F_m = k_m x \quad (4.8)$$

La ecuación de movimiento 4.1 involucra dos tipos de fuerzas: en el lado derecho se tiene una fuerza inercial mientras que el lado izquierdo predomina una fuerza viscosa F_v . Cuando están presentes estas dos fuerzas lo cual sucede cuando una partícula se mueve a través de un medio fluido, resulta conveniente utilizar el número de Reynolds el cual es un cociente entre las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas de un sistema. El número de Reynolds está dado por la siguiente expresión [28]

$$R_e = \frac{\rho a v}{\eta} \quad (4.9)$$

en donde ρ es la densidad del fluido, η es la viscosidad, a es el radio de la partícula que se mueve en el medio a una velocidad v . Por la definición del número de Reynolds es claro ver que cuando este parámetro es muy grande ($R_e > 1$) hay un dominio de las fuerzas inerciales y cuando este valor es pequeño ($R_e < 1$) entonces existe un dominio de las fuerzas viscosas. Realizando una estimación de este valor para nuestro sistema considerando la densidad y la viscosidad del agua, suponiendo una velocidad de una micra por segundo y un radio de una micra encontramos que: $R_e \approx 10^{-6}$. Dado que el resultado anterior es muy pequeño, podemos prescindir del lado derecho de la ecuación de movimiento 4.1 ya que este resultado sugiere que las fuerzas inerciales son despreciables en nuestro sistema. Tomando esto en cuenta y despejando \dot{x} de la ecuación 4.1 encontramos finalmente que:

$$\dot{x} = \frac{1}{\eta}(F_{ext} - k_m x - F_{res}) \quad (4.10)$$

La solución de la ecuación 4.10 no es trivial ya que se trata de un modelo en el cual las incógnitas no son la variable independiente ni la dependiente sino lo que se busca hallar

son los valores de los coeficientes los cuales, a partir de ahora, los llamaremos **parámetros**

En este capítulo se propone el ajuste del modelo propuesto a los datos experimentales como un problema de estimación de los parámetros. Dicho problema se formula como una estimación bayesiana de los parámetros η , k_m , k_1 , k_2 y w . Los datos experimentales que se utilizarán son aquellos obtenidos por Humberto los cuales obtuvo siguiendo la metodología descrita en el capítulo 2.

Antes de proceder a la solución del problema inverso abriré un paréntesis para dar una breve explicación de la herramienta que se usará para encontrar dicha solución.

4.2. Acerca de la estimación bayesiana

Un problema bien planteado en matemáticas es aquel que tiene existencia, unicidad y continuidad de la solución con respecto a los datos. Existe una relación de causalidad datos-solución. Por otra parte, un problema mal planteado es aquel que no satisface algunas de las propiedades antes mencionadas. Un problema inverso es, en general, un problema mal planteado. Lo encontramos en situaciones en las cuales uno puede realizar observaciones indirectas de una cantidad de interés.

En los problemas inversos clásicos, se mide una cantidad $y \in \mathbb{R}^m$ para obtener información de otra cantidad $x \in \mathbb{R}^n$. Para relacionar ambas cantidades se necesita plantear un modelo en donde exista dependencia entre éstas [29]. El modelo puede no ser correcto y contener otros parámetros que no son muy bien conocidos. Además, las cantidades medidas y siempre contienen ruido. El modelo de un problema inverso lo podemos escribir como:

$$y = f(x, e) \tag{4.11}$$

donde $f : \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^k \rightarrow \mathbb{R}^m$ es la función del modelo y $e \in \mathbb{R}^k$ es un vector que contiene los parámetros los cuales son desconocidos. Los métodos de inversión estadísticos buscan reformular el problema inverso en una búsqueda estadística de información. Se tienen cantidades que pueden ser observadas y otras que no se pueden observar. En los problemas inversos, las cantidades que no pueden ser observadas son de gran interés y estas dependen de las cantidades que pueden ser observadas a través de modelos. El objetivo de la inversión estadística es extraer información y evaluar la incertidumbre acerca de las variables basado en el conocimiento durante el proceso de medición, y de la información y el modelo de las variables desconocidas que se tiene antes de la medición [30].

El enfoque de la inversión estadística se basa en los siguientes principios:

- 1.- Todas las variables que se encuentren en el modelo se consideran como variables aleatorias.
- 2.- La aleatoriedad describirá el grado de información sobre las realizaciones.
- 3.- El grado de información que concierne a estos valores se codifica en distribuciones de probabilidad conocidas como distribuciones a priori.
- 4.- La solución del problema inverso sera la distribución de probabilidad posterior.

Como en los problemas inversos estadísticos todos los parámetros son variables aleatorias, las denotaremos con letras mayúsculas y las realizaciones o cantidades conocidas las denotaremos con letras minúsculas. De ésta manera el modelo (4.11) quedará de la forma:

$$Y = f(X, E) \tag{4.12}$$

Esta es una relación entre las tres variables aleatorias Y , X y E y sus distribuciones aleatorias dependen unas de otras. La nomenclatura con la que se trabajará en este proyecto será la siguiente:

La variable aleatoria observable Y la llamaremos **la medición** y sus realizaciones $Y = y_{obs}$ en el proceso de medición serán los datos o experimentos. La variable aleatoria no observable X la llamaremos **variable desconocida**. Las variables que no sean las observables o las no observables las llamaremos **parámetros**. Antes de comenzar a trabajar con la variable aleatoria Y se tiene una información previa de la variable X la cual codificaremos en una función de densidad $x \rightarrow p_{pr}(x)$ que denotaremos como función de **densidad a priori**.

Después de analizar el ajuste de medición y la información disponible alrededor de las variables, se encuentra la función de densidad conjunta $p(x, y)$. En conclusión, resolver un problema inverso desde el enfoque bayesiano se puede resumir en los siguientes pasos:

- 1.- Con la información de la variable desconocida X proponer una función de densidad a priori, $p_{pr}(x)$ que contenga toda la información conocida de dicha variable.
- 2.- Encontrar la función de verosimilitud $p(y|x)$ que describe la relación entre las observaciones y las variables desconocidas.
- 3.- Desarrollar métodos que exploren la función de densidad posterior.

Para poder desarrollar el paso número tres, en este trabajo haremos uso del método Markov Chain Monte Carlo (MCMC) con la implementación del módulo de python `pytwalk` [31]. La solución del problema inverso mediante el enfoque bayesiano será una distribución

posterior. Si la variable desconocida es una variable aleatoria que tiene pocas entradas, la visualización de la función de densidad como una función no negativa de estas variables es posible. En los problemas inversos que se presentan normalmente la dimensionalidad del problema es grande, y la distribución posterior estará en un espacio de dimensión alta donde la visualización no es posible. Aunque, si se conoce la distribución posterior, se puede calcular estimadores puntuales o estimadores de propagación o de intervalo. Cuando se trabaja con un estimador puntual se busca responder a la pregunta: Dado un conjunto de observaciones y una información a priori, Cuál es el valor más probable de la variable desconocida X ? Uno de los estimadores estadísticos mas comunes es el **estimador máximo posterior (MAP)**. Dada la función de densidad posterior $\pi(x|y)$, de la variable desconocida $X \in \mathbb{R}^n$, el estimador MAP satisface,

$$x_{MAP} = \operatorname{argmax}_x \pi(x|y) \quad (4.13)$$

siempre y cuando el maximizador exista. Para poder hallar el estimador MAP se debe primero encontrar la solución de un problema de optimización [30].

4.3. Solución del problema inverso

Para la estimación de los parámetros del modelo se utilizaron los datos proporcionados en formato ABF los cuales fueron adquiridos con el software Clampex10 a una frecuencia de muestreo de 100 Khz. Estos archivos contenían 5 entradas las cuales fueron la corriente eléctrica registrada en la punta de la pipeta, la presión con la que salía el flujo de líquido a través de ésta y la posición de la misma en las tres direcciones x , y y z . De éstas variables solo dos fueron utilizadas para el ajuste del modelo; la presión aplicada y la deformación

en la dirección vertical, z . Así que se extrajeron estos datos los cuales fueron guardadas en un archivo .txt, uno por cada experimento. Para fines de nuestro análisis la frecuencia de muestreo de los datos de nuestro interés se redujo 100 veces con el fin de tener 1000 datos por cada segundo. Se seleccionaron 57 experimentos del grupo control y 55 experimentos del grupo tratado. Una vez que se seleccionaron los experimentos se procedió a establecer las **distribuciones a priori** para cada uno de los parámetros del modelo. En los problemas inversos con enfoque estadístico, uno de los pasos más cruciales en la solución es la construcción de la función de densidad a priori. Con frecuencia ésta es la parte más variante de la solución. El mayor problema para encontrar una función de distribución a priori cae en la naturaleza de la información que se tiene acerca de los parámetros. Normalmente el conocimiento que se tiene de estos parámetros es de naturaleza cualitativa y el problema consiste en transformar ese tipo de información en forma cuantitativa. Una vez teniendo esto, es posible codificar esta información en una función de densidad a priori. Las distribuciones a priori que se tomaron para este trabajo fueron todas distribuciones uniformes. Dado que al principio no se tenía una idea de los rangos para cada uno de los parámetros se procedió a realizar una primera estimación utilizando una herramienta de regresión no lineal. Los resultados encontrados se muestran en la figura 4.5. Enumerando las imágenes mostradas en el orden de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, en la primera imagen se muestra el valor del parámetro η en el eje vertical correspondiente a cada uno de los experimentos marcados en el eje horizontal. Podemos ver que los valores para este parámetro oscilan entre un mínimo de 0 y un máximo de 20 tanto para los experimentos del grupo control (color azul) como para los del grupo experimental (color naranja). En la segunda imagen se tienen los resultados para el parámetro k_m . Observamos que este parámetro se encuentra entre 0 y 50 para el grupo control y entre 0 y 32 para el grupo tratado. En la tercera imagen

se tiene el resultado para el parámetro k_1 . Este valor también oscila entre un mínimo de 0 y un máximo de 20. En la penúltima gráfica se muestran los valores para el parámetro k_2 observando una dispersión entre un mínimo de 0 y un máximo de 50. Por último en la subfigura número 5 se tienen los valores para el coeficiente w . Podemos observar que este valor se encuentra entre 0 y 1.8

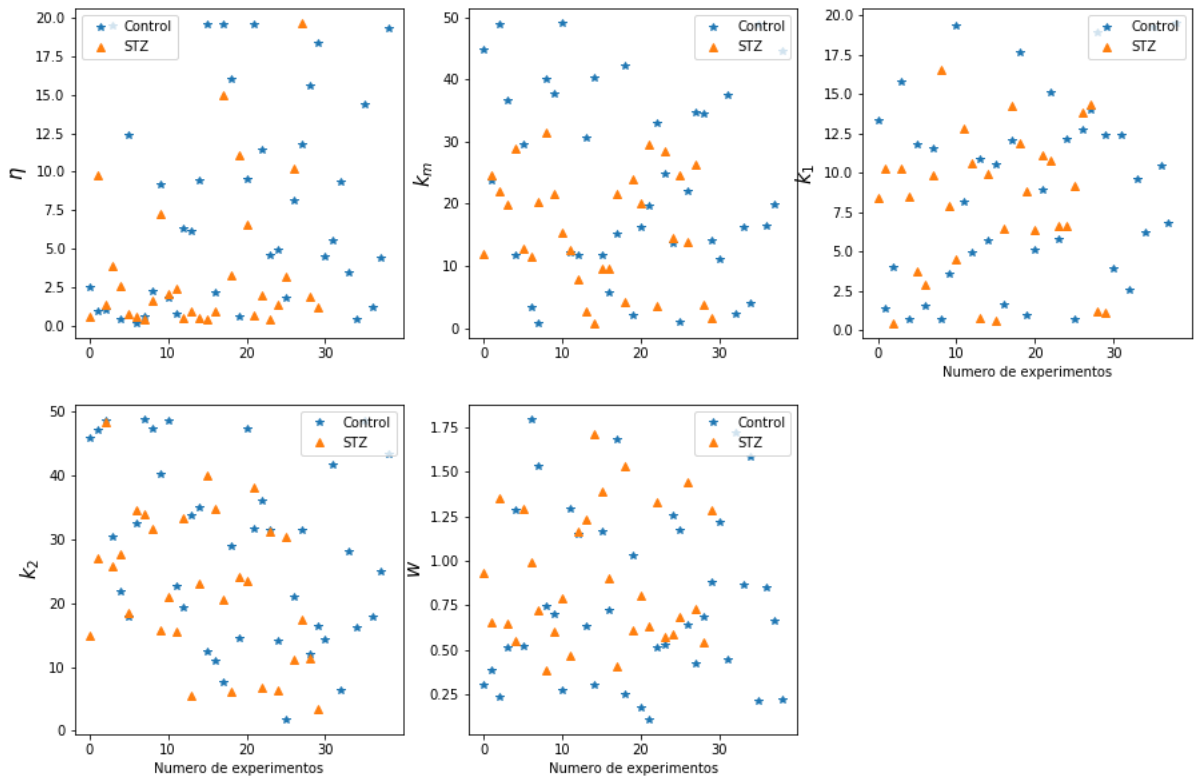


Figura 4.5: Gráfico de dispersión de los parámetros. En todas las imágenes mostradas, en el eje vertical se muestra el valor del parámetro y en el eje horizontal el número de experimento. A cada experimento le corresponde un único valor del parámetro. Etiquetando las imágenes de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: a) valores del coeficiente viscoso η . b) Valores para la rigidez de la membrana k_m . c) Rigidez de la red de actina k_1 d) coeficiente de rigidez del citoesqueleto interno k_2 . e) Grosor de la red de actina w . Los puntos en color naranja corresponden a experimentos del grupo tratado y los puntos en color azul corresponden a experimentos del grupo control.

Con estos resultados se establecieron los rangos para las distribuciones uniformes de cada

parámetro:

El parámetro η es el coeficiente viscoso de nuestro sistema. Teóricamente el valor que se tomó fue de 0 a 20. Sin embargo para evitar indeterminaciones en nuestro modelo se consideró un valor mínimo de 1×10^{-5} .

El parámetro k_m corresponde al coeficiente de rigidez de la membrana. El rango que se tomó para este parámetro fue entre 0 y 50.

El parámetro k_1 representa la rigidez del citoesqueleto de actina. De acuerdo con los resultados obtenidos en el gráfico de dispersión, para este parámetro se utilizó un rango de 0 a 20.

El parámetro k_2 representa la rigidez del citoesqueleto más interno de la célula. Este coeficiente se tomó entre 1×10^{-5} y 50, esto para evitar indeterminaciones en nuestro modelo.

El parámetro w representa el grosor del citoesqueleto de actina. Este valor se tomó entre un mínimo de 0 y un máximo de 2.

Con esta información se procedió a la solución del problema inverso utilizando el algoritmo pytwalk [31] el cual utiliza un método en el que se genera una caminata aleatoria en el espacio de parámetros, y en el tiempo, va a generar un conjunto representativo de muestras. Para aplicar este método se tomó una caminata aleatoria de 5000 pasos (muestras) y para generar la distribución posterior se descartaron las primeras 2000 muestras. En otras palabras, lo que se está realizando con este algoritmo es un barrido de 5000 soluciones de

nuestro modelo alrededor de cada curva experimental. Dado que las primeras soluciones siempre van a estar lejos de la solución real”, descartamos cierto número de estas soluciones y nos quedamos con las últimas para evitar sesgos en nuestra solución final. La siguiente imagen muestra una idea mas clara de lo que se acaba de explicar.

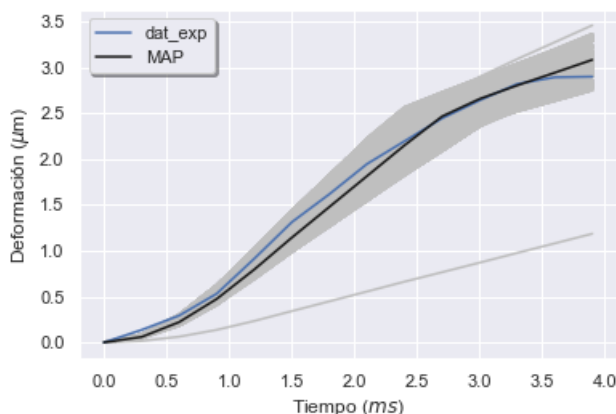


Figura 4.6: Dinámica del algoritmo pytwalk.

Curva representativa de la deformación (eje vertical) contra el tiempo (eje horizontal). La curva en azul representa los datos experimentales. Alrededor de ésta se realiza un barrido de 5000 posibles soluciones y se grafican las 1000 últimas soluciones del algoritmo (curvas en color gris). En color negro se muestra la solución mas probable o estimador máximo posterior (MAP) por sus siglas en inglés

En la figura 4.6 se esta graficando la deformación en el eje vertical contra el tiempo en el eje horizontal. Esta imagen corresponde a una curva representativa de un experimento (curva color azul). Alrededor de esta curva experimental se realiza un barrido de 5000 posibles soluciones y se grafican las últimas 1000 soluciones mostradas en color gris. En color negro se muestra el promedio de todas estas curvas conocido como estimador máximo posterior (MAP).

El resultado final que se obtiene con esta herramienta será una distribución para cada uno de los 5 parámetros de nuestro modelo. Esta distribución se conoce como **distribución a posteriori**.

Capítulo 5

Resultados

Una vez que se ejecutó el algoritmo con cada uno de los experimentos disponibles se obtuvieron distribuciones finales para cada uno de los 5 parámetros de nuestro modelo. A continuación en la figura 5.1 se muestra la distribución obtenida para el parámetro w el cual corresponde al grosor del citoesqueleto de actina.

En color azul se muestran los resultados obtenidos para el grupo control y en color naranja los resultados obtenidos para el grupo tratado. En el eje horizontal de la figura 5.1a se muestran los diferentes valores encontrados para este parámetro. En la figura 5.1b se muestra una comparación de las medias calculadas para este parámetro en ambos grupos experimentales. Las barras de error indicadas en color negro representan un intervalo de confianza del 90 %. Este resultado no muestra una diferencia significativa entre ambos grupos, sin embargo, es de gran relevancia hacer notar que los valores promedios encontrados para este parámetro se encuentran en el orden de magnitud de los ya reportados en la literatura para diferentes tipos de células [35]. Este resultado nos permite validar nuestro modelo.

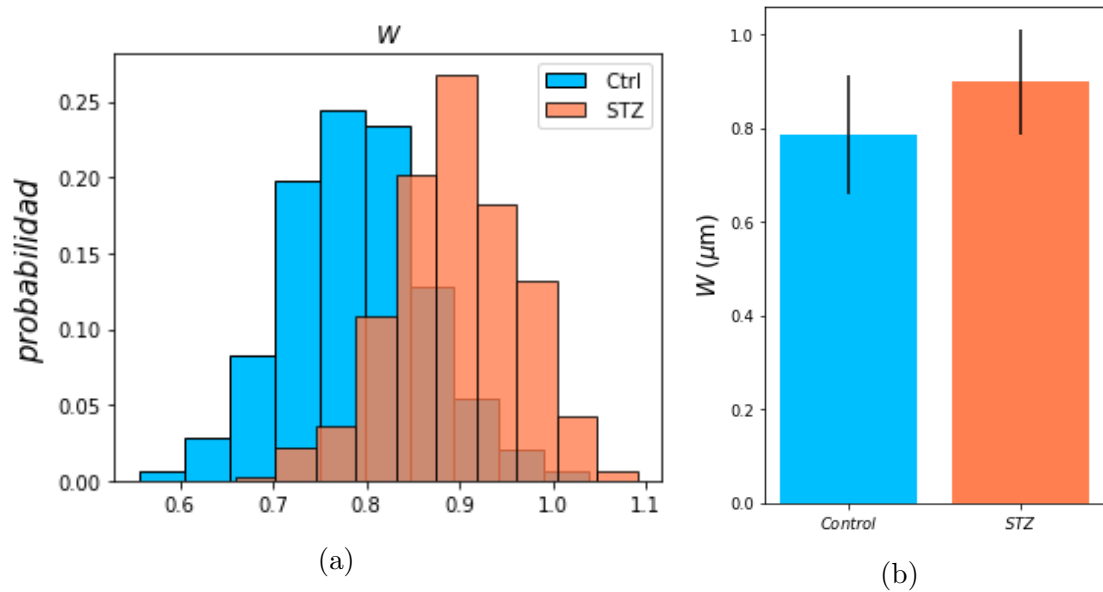


Figura 5.1: Distribución posterior para el parámetro w .

a) Función de densidad de probabilidad para el grupo control (azul) y para el grupo tratado (naranja) b) Comparación de las medias de ambos histogramas en donde las barras de error representan un intervalo de confianza del 90 %

En la figura 5.2 se muestra el resultado obtenido para el parámetro viscoso η de nuestro modelo. De igual manera como en el caso anterior, en la figura 5.2a se muestra la función de densidad de probabilidad para ambos grupos. En la figura 5.2b se muestra una comparación de las medias para este parámetro en donde las barras de error en color negro están marcadas con un intervalo de confianza del 90 %. Este resultado nos permite ver que existe una diferencia significativa entre ambos grupos experimentales. Podemos observar que el parámetro viscoso disminuye en células provenientes de ratones diabéticos.

En la figura 5.3 se muestran las densidades a posteriori de los tres coeficientes de rigidez de nuestro modelo. La figura 5.3a corresponde a la distribución posterior del coeficiente de rigidez de la membrana. En la figura 5.3b se muestran los resultados para el coeficiente de

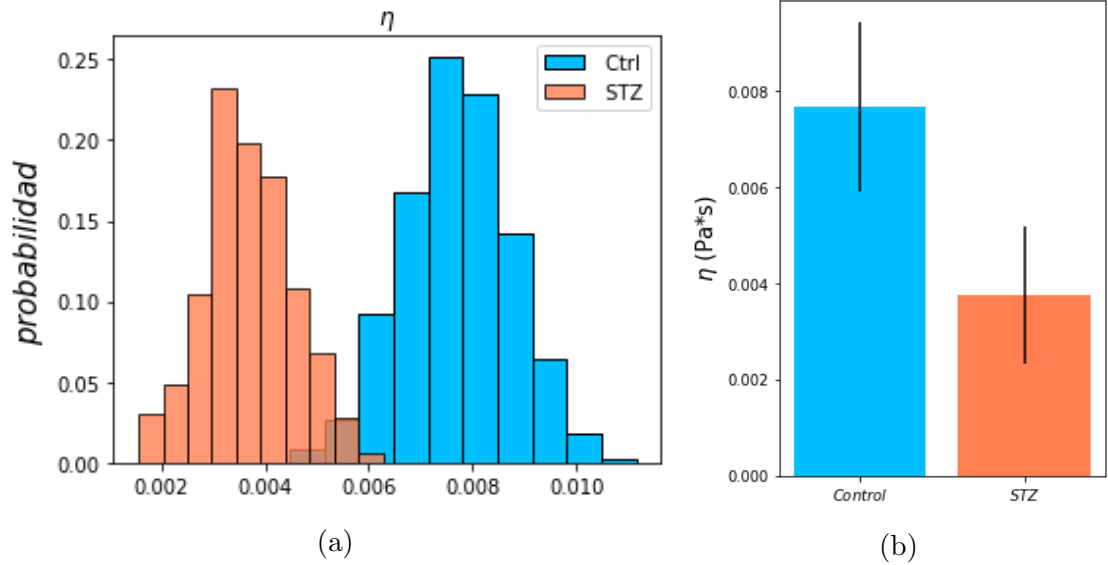


Figura 5.2: Distribución posterior para el parámetro η .

a) Función de densidad de probabilidad para el grupo control (azul) y para el grupo tratado (naranja) b) Comparación de las medias de ambos histogramas en donde las barras de error representan un intervalo de confianza del 90 %

rigidez del citoesqueleto de actina y en la figura 5.3c se muestra la distribución posterior para el coeficiente de rigidez del citoesqueleto mas interno k_2 . En las tres figuras se está graficando la probabilidad en el eje vertical contra el valor del parámetro en el eje horizontal. Nuevamente el color azul corresponde a resultados del grupo control y el color naranja corresponde a resultados del grupo tratado. En la figura 2.1 se muestra una comparación de las medias para los tres coeficientes de rigidez de ambos grupos experimentales. Las barras de error mostradas en segmentos verticales color negro representan un intervalo de confianza del 90 %.

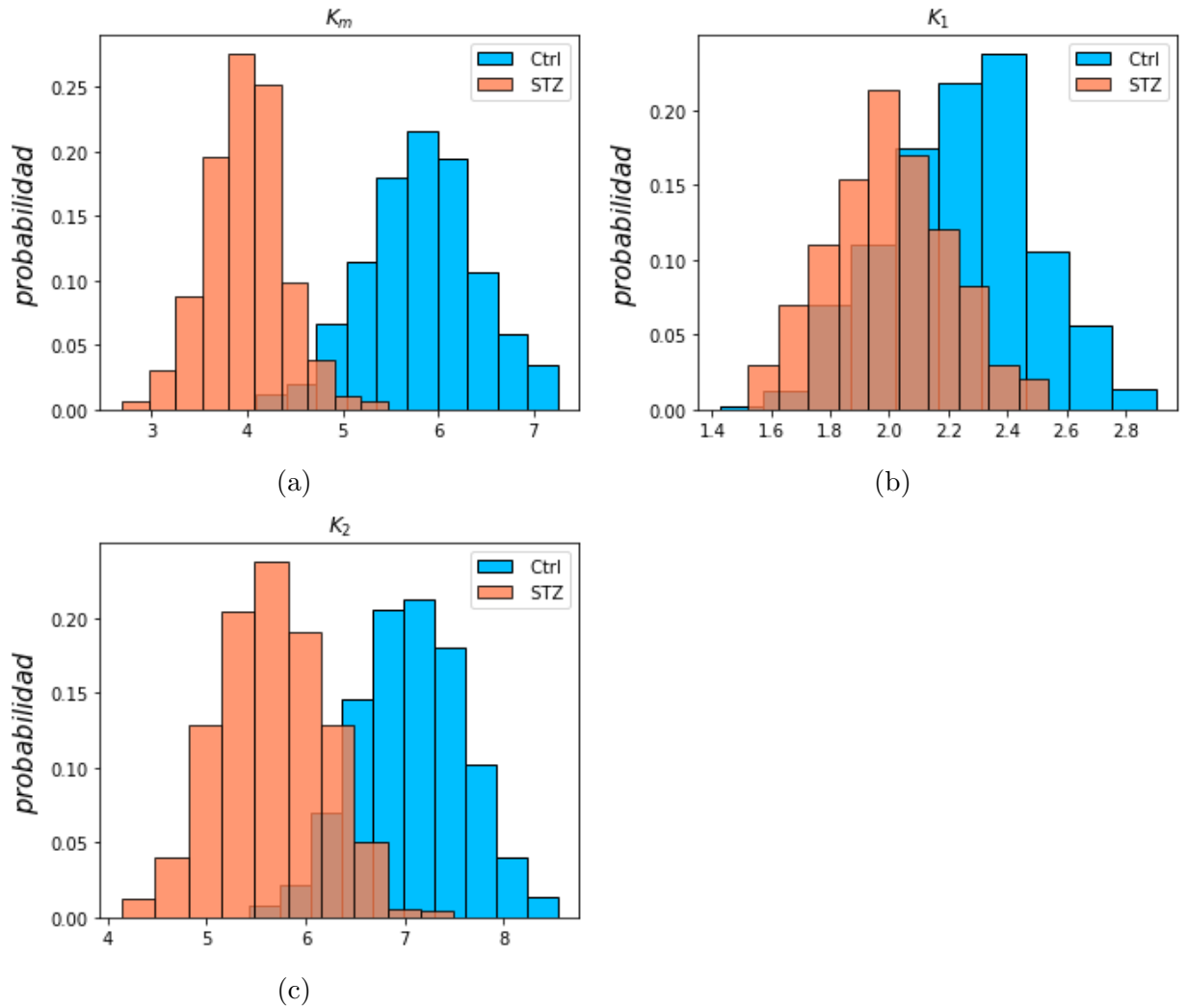


Figura 5.3: Distribución posterior para los coeficientes de rigidez de nuestro sistema. a) Función de densidad de probabilidad para el coeficiente de rigidez de la membrana k_m b) Función de densidad de probabilidad para el coeficiente de rigidez del citoesqueleto de actina k_1 c) Función de densidad de probabilidad para el coeficiente de rigidez del citoesqueleto mas interno k_2 .

En todos los casos las curvas en azul corresponden a los experimentos del grupo control y las curvas naranjas corresponden al grupo tratado.

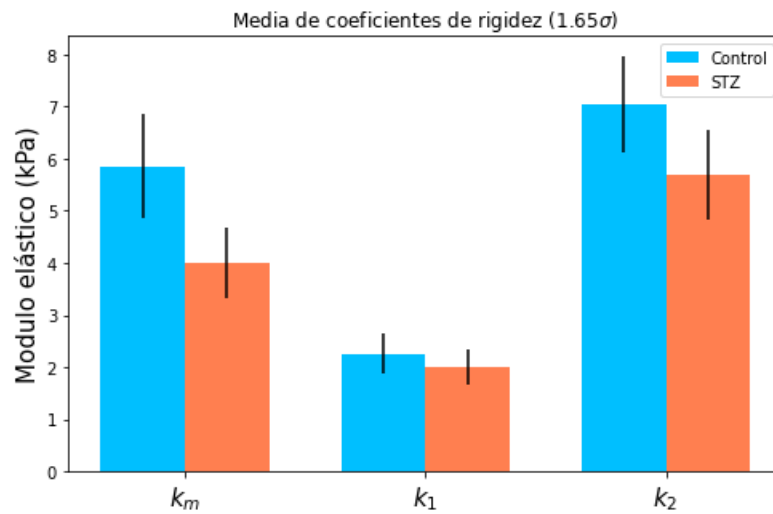


Figura 5.4: Comparación de las medias para los coeficientes de rigidez de ambos grupos experimentales; grupo control (color azul) y grupo tratado (color naranja). Las barras de error mostradas en color negro representan un intervalo de confianza del 90 %

Capítulo 6

Discusión

El primer resultado que nos brinda este trabajo es el valor promedio calculado para el parámetro w correspondiente al grosor de la red de actina el cual fue de $0.787 \pm 0.076 \mu\text{m}$ para el grupo control y de $0.898 \pm 0.067 \mu\text{m}$ para el grupo diabético. En la literatura se encuentra reportado que el grosor promedio de la red de actina en células animales se encuentra entre 300 nm y 700 nm [35]. Sin embargo, las células con las que se trabajaron en este proyecto (DRG) son mas grandes que la mayoría de las células y por tanto es posible especular que el grosor de su red cortical de actina sea de mayor tamaño. El haber estimado un valor que se encuentra dentro del orden de magnitud de los valores reportados nos permite utilizar este resultado para validar la funcionalidad de nuestro modelo. Por otro lado, al observar las barras de error de la figura 5.1b podemos ver que no se presentan cambios en el grosor de la red de actina.

En el caso del parámetro viscoso η se calculó un valor de $0.007 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ para los experimentos del grupo control y de $0.003 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ para el caso del grupo tratado. En la literatura se ha reportado un valor promedio de $0.005 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ para la viscosidad en células el cual esta en el orden de los valores encontrados [36] [37]. Observando la figura 5.2b podemos ver que

existe una diferencia significativa entre ambos grupos. Esta diferencia se presenta como una disminución en el parámetro viscoso en células provenientes de ratones diabéticos con respecto a los del grupo control.

Veamos ahora lo que está sucediendo con los coeficientes de rigidez de las células. Lo primero que podemos observar al comparar las medias mostradas en la figura 5.4 es que la membrana celular es una región muy rígida comparada con la red cortical de actina. La rigidez promedio calculada para la membrana celular en experimentos control fue de 5.85 ± 0.605 kPa mientras que el módulo elástico calculado para la red cortical de actina fue de 2.26 ± 0.23 kPa. Este resultado nos sugiere que la membrana celular es dos veces más rígida que la red de actina.

Lo segundo que podemos observar en la figura 5.4 es una diferencia significativa en la rigidez de la membrana de ratones diabéticos con respecto a aquellas células del grupo control. El valor calculado para este parámetro en células del grupo control fue de 5.85 ± 0.605 kPa mientras que en células de ratones diabéticos el valor promedio estimado fue de 3.99 ± 0.415 kPa. Estos datos se encuentran en el orden de los valores ya reportados [39]. Este resultado sugiere que la membrana se vuelve menos rígida ante esta patología lo cual correlaciona con la disminución observada en el parámetro viscoso. Aunque cabe mencionar que η es un parámetro que engloba la viscosidad de toda la célula por lo cual es muy apresurado establecer estas conclusiones.

Capítulo 7

Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo sustentan la hipótesis que se planteó al principio, al permitirnos ver que el principal cambio que se presenta se encuentra en la rigidez de la membrana y en el parámetro viscoso de nuestro sistema. Ambos parámetros se vieron disminuidos en los experimentos de células provenientes de ratones diabéticos con respecto a los del grupo control. Recordemos que el parámetro viscoso presente en nuestro modelo engloba la viscosidad de toda la célula y no solamente la de la membrana. Sin embargo, al no observar diferencias significativas en los parámetros internos de la célula como lo fueron la rigidez del citoesqueleto y el grosor de la red de actina, es posible atribuir el cambio en la viscosidad principalmente a la membrana celular. De esta manera, al disminuir la viscosidad de la membrana, ésta se vuelve mas fluida y por consecuencia su rigidez se verá disminuida tal como lo muestran nuestros resultados. Esto podría estar correlacionado con el aumento de la excitabilidad neuronal observada en pacientes con neuropatía diabética. Esta pérdida de rigidez de la membrana podría aunar la disminución de los umbrales de respuesta y elevar la capacidad de respuesta ante estímulos lo cual correlaciona con el aumento de la sensibilidad. Sin embargo, esto es solo una especulación y no deberá tomarse

como un resultado concluyente. Lo que sí es cierto es que estos resultados nos permiten tener un mayor acercamiento a lo que está sucediendo dentro de las células y deja abierto el camino para nuevas preguntas.

Otra cosa que es importante señalar es que el modelo que en este trabajo se desarrolló no solo se puede aplicar a estas células en particular sino que, por la forma en la que fue hecho, es posible trasladarlo a otros tipos celulares.

Bibliografía

- [1] Walter Ledermann D.(2006) “ Penicillin history and about its manufacture in Chile.”
Rev Chil Infect 2006; 23 (2): 172-176
- [2] World Health Organization(WHO) Recuperado en: <https://www.who.int/es/newsroom/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- [3] Juan Carlos Lizarzaburu Robles (2013). Síndrome Metabólico: concepto y aplicación práctica. An Fac med. pp;74(4):315-20.
- [4] International Diabetes Federation. Atlas de la diabetes de la FID [homepage en Internet]; IDF, 2019. Disponible en: <https://www.diabetesatlas.org/en/>
- [5] World Health Organization (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation.
- [6] American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes 2018. Diabetes Care. 2018;41(Suppl 1):S1327; DOI:10.2337/dc18-S002.
- [7] World Health Organization and International Diabetes Federation. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. Report of a WHO/IDF Consultation. Geneva; 2016.

-
- [8] Fazeli Farsani S, van der Aa MP, van der Vorst MMJ, Knibbe C a. J, de Boer A. Global trends in the incidence and prevalence of Type 2 diabetes in children and adolescents: a systematic review and evaluation of methodological approaches. *Diabetologia*. 2013 Jul;56(7):147188; DOI:10.1007/s00125-013-2915-z.
- [9] Largay J. Case Study: New-onset diabetes: How to tell the difference between Type 1 and Type 2 Diabetes. *Clinical Diabetes*. 2012 Jan 1;30(1):256; DOI:10.2337/diaclin.30.1.25.
- [10] C. Gooch and D. Podwall, “The diabetic neuropathies,” *Neurologist*, vol. 10, no. 6, pp. 311322, 2004.
- [11] B. C. Callaghan, H. T. Cheng, C. L. Stables, A. L. Smith, and E. L. Feldman, “Diabetic neuropathy: Clinical manifestations and current treatments,” *Lancet Neurol.*, vol. 11, no. 6, pp. 521534, 2012.
- [12] R. Pop-Busui et al., “Diabetic neuropathy: A position statement by the american diabetes association,” *Diabetes Care*, vol. 40, no. 1, pp. 136154, 2017.
- [13] J. M. Forbes and M. E. Cooper, “Mechanisms of diabetic complications”, *Physiol. Rev.*, vol. 93, no. 1, pp. 137188, 2013.
- [14] Humberto Reyes Pardo (2019) “Análisis de la rigidez de la membrana de neuronas sensoriales de ratón bajo condiciones que comprometen su integridad”. Tesis doctoral, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV).
- [15] Robertson, J. D. The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochem. Soc. Symp.* 16, 343 (1959)

-
- [16] B. Pontes et al., “ Membrane elastic properties and cell function” PLoS One, vol. 8, no. 7, p. e67708,2013.
- [17] Goodson HV, Jonasson EM. 2018. Microtubules and microtubule-associated proteins. Cold Spring Harbor Perspective in Biology. 10:a022608.
- [18] Ohi R, Zanic M. 2016. Ahead of the curve: new insights into microtubule dynamics. F1000Research. 5:314.
- [19] Etienne-Manneville S. 2018. Cytoplasmic intermediate filaments in cell biology. Annual review of cell and developmental biology. 34:1-28.
- [20] Goldman RD, Grin B, Mendez MG, Kuczmarski ER. 2008. Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. Current opinion in cell biology. 20:28-34.
- [21] Margiotta A, Bucci C. 2016. Role of intermediate filaments in vesicular traffic. Cells 5, 20
- [22] Svitkina TM. 2018. Ultrastructure of the actin cytoskeleton. Current opinion in cell biology. 54:1-8.
- [23] Edidin M. 2003. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. 2003. Nature reviews in molecular and cell biology. 4:414-418.
- [24] Nicolson GL. 2014. The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. Biochimica and biophysica acta. 1838:1451-1466
- [25] R. M. Hochmuth, “ Micropipette aspiration of living cells,” J. Biomech., vol. 33, no. 1, pp. 1522,2000.

-
- [26] Achenbach, J. D., and Sun, C. (1965).” Dynamic response of beam on viscoelastic subgrade. *J. Eng. Mech.*, 91(5), 6176.
- [27] Basu, D., and Rao, N. S. V. K. (2012). “ Analytical solutions for Euler- Bernoulli beam on viscoelastic foundation subjected to moving load.” *Int. J. Numer. Anal. Methods Geomech.*, 37(8), 945960.
- [28] Purcell E. 1977. Life at low Reynolds number. *Am. J. Phys.* 45:311
- [29] James, G., Witten, D., Hastie, T., and Tibshirani, R. (2013). An introduction to statistical learning (Vol. 112). New York: springer.
- [30] Paola Vargas Bernal (2017). “ Un algoritmo de clasificacion como herramienta de diagnostico de diabetes con datos de la prueba oral de tolerancia a la glucosa ”. Tesis doctoral, Centro de Investigacion en Matematicas, A.C. (CIMAT)
- [31] Christen, JA y Fox, C. (2010). “ Un algoritmo de muestreo de propósito general para distribuciones continuas (el t-walk)” . *Análisis Bayesiano*, 4 (2): 263282.
- [32] Bauchau, O. A., and Craig, J. I. (2009). “ Euler-Bernoulli beam theory.” *Structural analysis*, Springer, Houten, Netherlands, 173221.
- [33] Biot, M. A. (1937). “ Bending of an infinite beam on an elastic foundation ” *J. Appl. Mech.*, 4(1), A1A7.
- [34] Younesian, D., A. Hosseinkhani, H. Askari, and E. Esmailzadeh. 2019. Elastic and viscoelastic foundations: A review on linear and nonlinear vibration modeling and applications. *Nonlinear Dynamics* 97 (1):85395. doi:10.1007/s11071-019-04977-9

-
- [35] Clausen et al., 2017 M.P. Clausen, H. Colin-York, F. Schneider, C. Eggeling, M. Fritzsche Dissecting the actin cortex density and membrane-cortex distance in living cells by super-resolution microscopy *J. Phys. D Appl. Phys.*, 50 (2017), p. 064002
- [36] Ashmore J. Cochlear outer hair cell motility. *Physiol Rev.* 2008 Jan88(1):173-210. doi: 10.1152/physrev.00044.2006 p.186 left column 2nd paragraph
- [37] Jensen KH, Mullendore DL, Holbrook NM, Bohr T, Knoblauch M, Bruus H. Modeling the hydrodynamics of Phloem sieve plates. *Front Plant Sci.* 2012 3: 151. doi: 10.3389/fpls.2012.00151
- [38] R. Phillips, J. Kondev, and J. Theriot. *Physical Biology of the Cell*, Second edition. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York, (November 2008).
- [39] D. Sánchez et al., “ Noncontact measurement of the local mechanical properties of living cells using pressure applied via a pipette,” *Biophys. J.*, vol. 95, no. 6, pp. 30173027, 2008.