

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE FISICA



**MODELAMIENTO COMPUTACIONAL  
DE SISTEMAS BIOLÓGICOS UNIDIMENSIONALES**

AYLINNE ROMAN URBINA

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIA

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

**MODELAMIENTO COMPUTACIONAL  
DE SISTEMAS BIOLÓGICOS UNIDIMENSIONALES**

AYLINNE ROMAN URBINA

Profesor Guía: Dr. Roberto Bernal

Profesores Comisión: Dr. Francisco Melo

Dr. Enrique Cerda

Dr. Francisco Vivanco

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE

INGENIERO FÍSICO

SANTIAGO DE CHILE

MAYO DE 2010

"MODELAMIENTO COMPUTACIONAL  
DE SISTEMAS BIOLÓGICOS UNIDIMENSIONALES"

Trabajo de Graduación presentado a la Facultad de Ciencia, en cumplimiento parcial de los requerimientos exigidos para optar al título de Ingeniero Físico.

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE

SANTIAGO DE CHILE

MAYO 2010

"MODELAMIENTO COMPUTACIONAL  
DE SISTEMAS BIOLÓGICOS UNIDIMENSIONALES"

AYLINNE ROMAN URBINA

Este trabajo de graduación fue preparado bajo la supervisión del profesor guía Dr. Roberto Bernal, del Departamento de Física y ha sido aprobado por los miembros de la comisión calificadora.

.....

.....

.....

.....

Profesor Guía

.....

Director



# Agradecimientos

Al termino de esta etapa quiero agradecer el apoyo ciego e infinito de mi familia, por todos los sacrificios realizados durante estos años. Al apoyo de mis hermanos, Miguel y Daniela, que soportaron largas jornadas de estudio, a los desvelos y madrugadas de mi madre y mi padre, y a la preocupación de mi abuelita Silvia.

El apoyo fundamental de Francisco Santibañez quien ha sido pilar fundamental en mis logros tanto académicos como logros de vida, a su poca paciencia, su compañerismo, sus consejos, sus tirones de oreja y conocimientos, pero sobretodo agradecer a su amor incondicional, que durante estos años me brindó.

No puedo dejar de agradecer a mis compañeros; a Nathalie por el apoyo y amistad que nació durante los meses que realizamos la practica profesional, con sus conversaciones hizo mas llevadero ese período. A Víctor y Desiree que soportaron las consecuencias que provocaba, en mi comportamiento las altas dosis de cafeína y agradecer también su compañerismo.

Les agradezco a todas las personas que aportaron en mi formación profesional y personal, y a las amistades hechas durante estos años de universidad.

# Resumen

Estudios recientes relacionados con la reología celular, han mostrado una compleja respuesta mecánica, provocada por estímulos externos, en condiciones experimentales donde es posible medir fuerzas imponiendo elongaciones controladas. Con estos resultados se han postulado nuevas ideas sobre la respuesta viscoelásticas del citoesqueleto y sobre la generación de fuerzas por la dinámica de la polimerización de proteínas y contracciones activas mediadas por los motores moleculares. Los motores moleculares, han sido modelados individualmente como sistemas de partículas con la capacidad de transitar periódicamente entre dos estados posibles, lo que se traduce en una interacción de adhesión o des-adhesión. A pesar de la dificultad que representa modelar un sistema de este tipo, se ha logrado obtener experimentalmente las características básicas de la respuesta mecánica de los motores moleculares en sistemas biológicos cuasi-unidimensionales.

Desde el punto de vista de la medicina, la reparación de nervios (neuronas) que han sido lesionadas producto de accidentes, involucra generalmente la ruptura de las neuritas, que conectan las terminaciones entre el emisor y receptor, interrumpiendo la propagación de los impulsos eléctricos provenientes del cerebro. Una posible solución médica a este tipo de lesiones, se han investigado involucrando experimentos en que ratas son quirúrgicamente lesionadas, y son nuevamente intervenidas, implantando injertos de axones, que han sido elongados in-vitro. Estos axones son elongados por medio de tensión mecánica, y pueden alcanzar una longitud de varios milímetros, para reparar el tejido lesionado. Este trabajo tiene como objetivo, recrear situaciones experimentales, de elongación axonal, mediante la utilización de simulaciones computacionales de modelos mecánicos unidimensionales. Apoyándose en experiencias físicas y biológicas, y en parámetros obtenidos por diferentes grupos y metodologías. La importancia de un estudio numérico abarca desde la comprensión básica de un sistema complejo a la posibilidad de predecir el comportamiento mecánico de las neuronas utilizadas en procedimientos médicos experimentales de regeneración del sistema nervioso luego de una lesión.

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>6</b>
1.1. ¿Qué es una neurona? . . . . .	10
1.1.1. Desarrollo Neuronal . . . . .	14
1.1.2. Refinamiento del circuito . . . . .	16
1.1.3. Estructuras y funciones . . . . .	17
1.2. Motores moleculares . . . . .	21
1.2.1. Algunos elementos de biología molecular . . . . .	24
1.3. Orígenes del mecanismo de tracción . . . . .	26
1.4. Pioneros en la elongación axonal . . . . .	27
1.4.1. Estudios más recientes . . . . .	30
1.5. Desarrollo de trasplantes de tejido nervioso formado por axones estirados	34
1.5.1. Sistema de estiramiento para el crecimiento del axón . . . . .	34
1.5.2. Creación del injerto . . . . .	35
1.5.3. Cirugía e implantación . . . . .	35
<b>2. Modelos</b>	<b>37</b>
2.1. Modelos Viscoelásticos . . . . .	37
2.2. Elementos mecánicos . . . . .	37
2.3. Modelos matemáticos para la respuesta viscoelástica lineal . . . . .	38
2.3.1. Modelo de Maxwell resorte-amortiguador . . . . .	38
2.3.2. Modelo de Kelvin-Voigt . . . . .	39

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	2
2.3.3. Sólido Lineal tipo Maxwell . . . . .	40
2.3.4. Modelo Sólido Lineal tipo Kelvin . . . . .	41
2.4. Viscoelasticidad y motores moleculares . . . . .	42
2.4.1. Motor molecular . . . . .	42
<b>3. Simulación</b>	<b>46</b>
3.1. Simulaciones preliminares . . . . .	46
3.1.1. Modelo de Dennerll <i>et al.</i> . . . . .	46
3.2. Simulación en aproximación viscosa . . . . .	47
3.3. Simulación . . . . .	50
3.3.1. Discretización . . . . .	51
3.4. Análisis de los parámetros . . . . .	55
<b>4. Resultado</b>	<b>59</b>
4.1. Resultados . . . . .	59
4.2. Conclusión . . . . .	70

# Índice de figuras

1.1. Esquema comparativo de las fibras . . . . .	11
1.2. Polimerización y despolimerización de los filamentos . . . . .	12
1.3. Esquema de microtúbulos . . . . .	13
1.4. Esquema de una neurona . . . . .	14
1.5. Estructura en el cono de crecimiento . . . . .	18
1.6. Movimiento Celular generado por fuerzas de adhesión . . . . .	20
1.7. Motores moleculares . . . . .	22
1.8. Miosina . . . . .	23
1.9. Esquema del movimiento Dineina y Kinesina . . . . .	23
1.10. Esquema experimental D.Bryan . . . . .	27
1.11. Esquema experimental P.Lamoureux . . . . .	28
1.12. Esquema experimental Dennerll . . . . .	29
1.13. Esquema experimental R. Bernal . . . . .	31
1.14. Aproximación viscosa . . . . .	32
1.15. Esquema experimental para modelo viscoso . . . . .	33
1.16. Montaje de elongación axonal . . . . .	34
1.17. Esquema del proceso experimental de elongación de axones. . . . .	35
1.18. Ilustración de la construcción de tejido nervioso . . . . .	36
1.19. Injerto . . . . .	36
2.1. Esquema de Resorte y Amortiguador . . . . .	38
2.2. Modelo Maxwell . . . . .	39

2.3. Modelo Voigt . . . . .	40
2.4. Modelo sólido lineal Maxwell . . . . .	41
2.5. Modelo sólido lineal Kelvin . . . . .	42
2.6. Representación de motor molecular . . . . .	43
2.7. Respuesta de los motores moleculares . . . . .	44
2.8. Modelo sólido lineal con motor molecular . . . . .	44
2.9. Modelo Kelvin con motor molecular . . . . .	45
3.1. Simulación Dennerll, variación de $k$ . . . . .	47
3.2. Simulación Dennerll, variación de $\kappa$ . . . . .	48
3.3. Simulación Dennerll, variación de $\mu$ . . . . .	49
3.4. Modelo a simular . . . . .	51
3.5. Cadena de elementos . . . . .	51
3.6. Test de cálculo: Variación de masas . . . . .	53
3.7. Test de cálculo: Solución analítica y numérica . . . . .	54
3.8. Test de cálculo: Comparación solución . . . . .	55
3.9. Relación de las constante . . . . .	56
3.10. Modelo a simular . . . . .	56
3.11. Parámetros: Relación entre $\gamma$ y $T_a/v$ . . . . .	57
3.12. Parámetros: Relación entre $T_a$ y $v$ . . . . .	58
4.1. Elongación . . . . .	60
4.2. Posición y Velocidad: Zona Pasiva . . . . .	61
4.3. Posición y Velocidad: Zona Activa . . . . .	61
4.4. Perfil de velocidad . . . . .	62
4.5. Perfil de velocidad: Estimación del tiempo característico . . . . .	63
4.6. Perfil de velocidad: Elongación normalizada . . . . .	64
4.7. Elongación con parámetros en zona pasiva y activa, $\tau = 30 \text{ min}$ . . . . .	64
4.8. Elongación con parámetros en zona pasiva y activa, $\tau = 60 \text{ min}$ . . . . .	65
4.9. Elongación con parámetros en zona pasiva y activa, $\tau = 90 \text{ min}$ . . . . .	65

4.10. Comparación de elongación y velocidad: axón de área transversal $1 \mu m^2$	66
4.11. Comparación de elongación y velocidad: axón de área transversal $3 \mu m^2$	66
4.12. Comparación de elongación y velocidad: axón de área transversal $5 \mu m^2$	67
4.13. Simulación de elongación con fuerza constante . . . . .	68
4.14. Simulación para axones elongados . . . . .	69
4.15. Área en función de la longitud . . . . .	69

# Capítulo 1

## Introducción

Las células de los mamíferos tienen la capacidad de cambiar de forma, ya sea, como respuesta a químicos o a señales mecánicas. Las neuronas de los animales grandes pueden experimentar un enorme crecimiento durante el desarrollo, esto sugiere que los axones del sistema nervioso crecen rápidamente. Un ejemplo extremo, lo vive la ballena azul, los axones de sus células espinales crecen a una velocidad de aproximadamente 3 [*cm/día*]. Se presume por lo tanto, que los axones se mantienen bajo una tensión mecánica continua. Estudios han examinado los efectos de la elongación mecánica sobre los axones, y en algunos casos este tipo de mecanismo de crecimiento representa la única manera de expansión, es por esto que ha despertado el interés de la comunidad científica por determinar el mecanismo de crecimiento axonal.

*Cono de crecimiento* es el termino que se utiliza para indicar la porción de axón que se expande por el medio extracelular.

En una serie de investigaciones sobre el crecimiento de los axones por medio de aplicación de tensión [1] [2] [3] , han utilizado agujas y microelectrodos que se han adherido al axón para ser arrastrado, y en breves lapsos de tiempo explorar la relación que existe entre la tensión impuesta y el crecimiento axonal. De estas observaciones, se propuso que la tensión es un importante regulador de la elongación.

En el desarrollo de las investigaciones que vinculan la tensión con la elon-



gación axonal, se conoce un comportamiento viscoelástico de los axones. Esta viscoelásticidad es una característica mecánica de algunos sistemas biológicos, los cambios pueden ser descritos de manera cualitativa y cuantitativa por parámetros característicos (como constantes elásticas y coeficiente de disipación ) involucrados en modelos mecánicos, como el modelo de Kelvin y modelo de Maxwell, entre otros. Pero, ¿ Para qué conocer los efectos de la elongación por tensión de los axones? La regeneración de lesiones en el sistema nervioso central y periférico es limitada, existen variadas terapias basadas en restaurar el tejido dañado nervioso. En particular, el énfasis principal se ha colocado en el trasplante de células madre neuronales y líneas de células neuronales, sin embargo, la tasa de supervivencia a largo plazo de las neuronas trasplantadas es baja y trae consigo otros problemas colaterales.

Una nueva estrategia consiste en trasplantar neuronas cultivadas a partir de animales y humanos, el inconveniente que se presenta en los trasplantes es un alto riesgo de rechazo. Esta idea de realizar implantes de tejido nervioso cuando se presente una lesión , ya ha sido probada en animales. El modelo del implante se basa en el crecimiento de axones por medio de elongación hasta alcanzar un largo similar de la lesión, utilizando nervios periféricos o biomateriales para mantener la dirección del eje axonal .

Se han realizado estudios con esta técnica y puede ser extendida a implantes realizados con axones elongados in vitro, estos axones se estiran por medio de tensión [4] hasta cubrir el largo de la lesión, el trasplante se apoya en un hidrogel de colágeno. Se probó en una rata a la cual se le generó una lesión de 3 [cm] de largo en el nervio ciático, y se reemplazo en la lesión un injerto realizado por células elongadas. Transcurridas 16 semanas con este implante, los resultados mostraron que el nervio ciático acogió el injerto integrándolo en los extremos de la lesión. Es así como el injerto puede crear nuevos circuitos. Pero ¿que sucederá con la capacidad de propagación de impulsos eléctricos en neuronas elongadas?, según los estudios realizados [5], se ha visto que la activación de los canales de sodio, la inactivación y la recuperación de los canales de potasio, no se altera producto de

la elongación, por lo tanto la capacidad conductora de la neurona después de la elongación permanece sin alteraciones .

Aunque el trasplante de neuronas para lesiones del sistema nervioso muestra resultados prometedores para experiencias en animales, hay pocas fuentes viables de neuronas para la aplicación clínica y son insuficientes para reparar extensos daños en los nervios de pacientes. Es por esto, que los autores buscaron una fuente de neuronas que pudieran ser manipuladas en construcciones de tejido nervioso trasplantables, eligiendo células ganglionares humanas por su viabilidad en el cultivo. Los pioneros en estudiar la reología celular, en condiciones experimentales, midiendo elongaciones controladas, postularon que el comportamiento de la célula podría ser descrito de manera simple por un modelo viscoelástico, este modelo a pesar de su simpleza no considera los motores moleculares, que son proteínas situadas entre los filamentos que conforman la estructura del axón y tienen la capacidad de adherirse y desadherirse a los filamentos, por la síntesis de la molécula de Adenosín trifosfato (ATP) usado como combustible. Los motores moleculares se consideran como un elemento más en los modelos viscoelásticos, y la fuerza que experimenta este nuevo elemento esta caracterizada por la velocidad de traslación del motor molecular y su tensión mecánica al hidrolizar una molécula de ATP. El aporte de estos motores moleculares al modelo viscoelástico explica un comportamiento de retracción, no considerado en los primeros modelos. Esta retracción depende de la velocidad con que se deforma el axón. Cabe destacar que el comportamiento depende de la escala de tiempo de las observaciones. Para deformaciones rápidas sobre los segundos o minutos, tiene comportamiento elástico. Cuando los axones son estirados lentamente en una escala de tiempo de horas y días se pueden obtener elongaciones viscosas sin dañar al axón. Un estudio reciente[6] propone un modelo que considera la elongación axonal, puramente viscosa representando al axón como una serie de amortiguadores considerando la disminución del área transversal del axón.

El objetivo de este trabajo de tesis, es crear un código de simulación compu-

tacional unidimensional para recrear las situaciones experimentales obtenidas, tanto en simples modelos viscoelásticos, como también considerando la contribución de los motores moleculares.

## Conceptos Biológicos

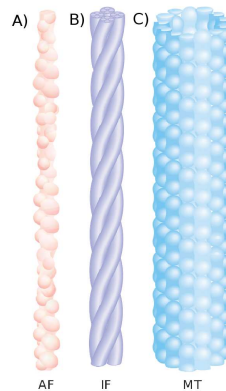
### 1.1. ¿Qué es una neurona?

El sistema nervioso se construye de dos tipos de células: las células nerviosas o neuronas y células gliales. Las neuronas son notables por su eficiencia en la transferencia de información a través de largas distancias, por medio de la multiplicación de señales eléctricas llamadas potenciales de acción. Las células gliales son mucho más numerosas que las neuronas y proporcionan nutrición, soporte iónico y mecánico, además regulan la forma y la conectividad neuronal. La neurona se compone de un cuerpo celular o *soma*, lleno con una sustancia rica en potasio llamado *citosaol*, de donde emergen los procesos celulares. Estos procesos incluyen un cierto número de *dendritas* y un *axón*, cuya longitud máxima depende de la especie animal.

Las dendritas son elementos de la neurona que son capaces de percibir señales de entrada y de salida, en una estructura de árbol, cuya gran superficie facilita la recepción de múltiples señales de otras neuronas. La integración de todas las señales de entradas se lleva a cabo dentro del soma. El axón es considerado como el proceso de salida y lleva a cabo la conducción del impulso nervioso desde el soma a otras células. El axón también puede dar origen a ramas, llamadas *colaterales*, que transmiten la información de salida a diferentes lugares del sistema nervioso.

El soma está aislado por una membrana de 5 [nm] de espesor, donde hay en su interior una serie de estructuras llamadas *organelos*. El cuerpo neuronal posee un núcleo. El citoplasma, es decir, todo lo contenido dentro de la membrana celular excluyendo el núcleo, contiene numerosas mitocondrias responsable de convertir el oxígeno en energía por medio de la catálisis de una molécula llamada adenosín trifosfato (*ATP*) que participa en muchas reacciones químicas endotérmicas. El citoplasma también está lleno de ribosomas y el retículo endoplasmático rugoso (RER) que sintetizan las proteínas, y el aparato de Golgi, que modifica y envía a distintos

lugares de las células paquetes de proteínas recién sintetizadas. El soporte de las neuronas se llama *citoesqueleto*, este determina la forma del soma y los diversos procesos que se extienden dentro de ella. Esta estructura también se utiliza para el transporte de sustancias a través de la neurona, por medio de estudios bioquímicos e inmunológicos se han identificado el conjunto específico de proteínas que caracteriza al sistema de filamentos que se encuentran en el citoesqueleto. Los tres sistemas primarios de fibras que componen el citoesqueleto son: *microfilamentos*, *microtúbulos* y *filamentos intermedios*. Existen proteínas llamadas *proteínas accesorias* que están asociadas a este sistema de fibras. Las proteínas cumplen distintas funciones y de acuerdo a estos roles se pueden clasificar en: *Proteínas reguladoras*: Encargadas de regular los procesos de polimerización y despolimerización de los filamentos principales. *Proteínas ligadoras*: Encargadas de conectar los filamentos entre sí y con distintas estructuras celulares y *Proteínas motoras*: Encargadas de la motilidad, contracción y cambios de forma celulares. También trasladan macromoléculas y organelos de un punto a otro del citoplasma.

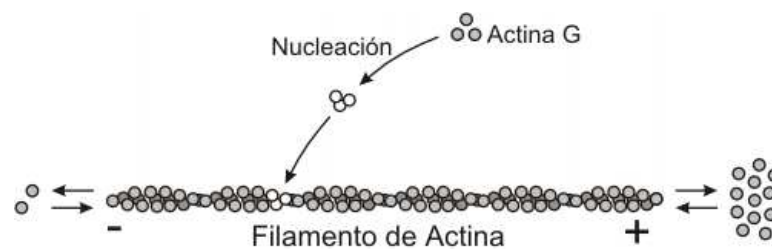


**Figura 1.1:** Diagrama comparativos de las estructuras; (AF) Filamento de Actina, (IF) Filamento intermedio,(MT) Microtúbulo

Descripción breve de las fibras mostradas en la figura 1.3 .

- Los *Microfilamentos, Actina y Miosina (AF)* (figura 1.3 a)). Están presentes en altas concentraciones como una malla debajo de la membrana. La actina es la proteína base de los microfilamentos. La asociación de estos microfilamentos de actina con la proteína miosina es la responsable de la contracción muscular, también pueden llevar a cabo los movimientos celulares, incluyendo desplazamiento y contracción. La actina es también importante para el mantenimiento la forma de la célula, miden 8-9 [ nm] de diámetro y tienen una estructura en hélice de dos cadenas.

El monómero es conocido como actina G, o actina globular, en presencia de ATP, se polimeriza formando largas hélices dobles, denominadas actina F, o actina filamentosa. Para que se lleve a cabo esta polimerización el ATP debe convertirse en ADP, liberando la energía necesaria para el proceso. La actina, presenta polaridad, tiende a polimerizarse y despolimerizarse a gran velocidad por un extremo positivo, y a realizar los mismos procesos por el otro extremo negativo, a menor velocidad.

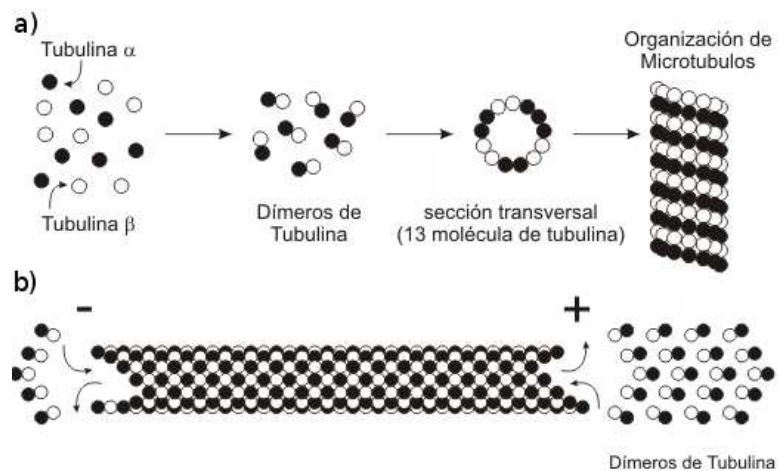


**Figura 1.2:** Polimerización y despolimerización de los filamentos de actina: actina G, nucleación, polimerización y despolimerización

- *Filamentos Intermedios (IF)*(figura 1.3 b)) . Son estrechos tubos longitudinales presentes en todos los procesos neuronales, proveen resistencia mecánica a la célula. Según el tipo celular varían sus proteínas constitutivas. Podemos decir que existen seis tipos de filamentos intermedios, como, neurofilamentos , filamentos de desmina, filamentos gliales, filamentos de vimentina, queratinas

epiteliales y laminofilamentos. Una diferencia de los filamentos intermedios, es que al agruparse pierden polaridad, por lo tanto no presentan extremo positivo y extremo negativo.

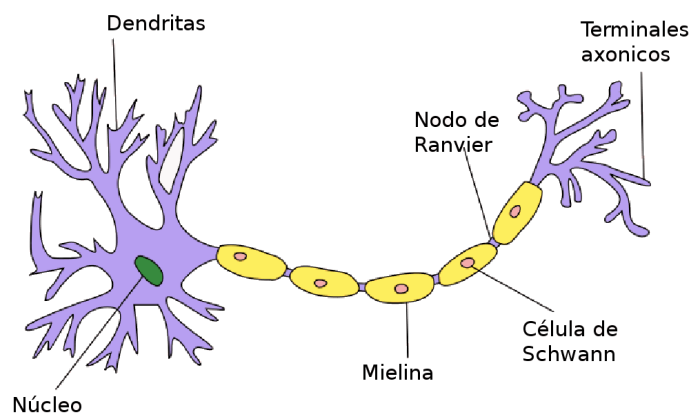
- **Microtúbulos (MT)** (figura 1.3 c)). Una de las características de este tipo de filamento es su forma, como un tubo hueco con un diámetro de 24 [nm] y sus paredes están formadas de protofilamentos. Los microtúbulos están compuestos de subunidades de la proteína tubulina, denominadas como alfa y beta. Los microtúbulos actúan como un andamio para determinar la forma celular, y proveen un conjunto de caminos para que se muevan las organelos y vesículas. También forman las fibras del huso para separar los cromosomas durante la mitosis y la meiosis. Cuando se disponen en forma geométrica dentro de cilios y flagelos, son usados para el movimiento (autopropulsión) o para mover líquido circundante o partículas (motilidad).



**Figura 1.3:** a) Polimerización de la tubulina a partir de las tubulinas alfa y beta. b) Polaridad de un microtúbulo

Un potencial de acción es un proceso de *todo o nada* con respecto a las señales de entrada. Si la activación alcanza un umbral definido, se dispara un po-

tencial de acción, generado en el *cono axónico*. Los axones conducen los impulsos eléctricos y la velocidad de conducción es función del diámetro de la fibra. Esta velocidad también depende de un buen aislamiento obtenidos por *vaina de mielina*, una porción de las células gliales que se disponen en espiral alrededor del axón. Los *nodos de Ranvier* son regiones libres de mielina. La membrana axonal en los nodos de Ranvier se encaja con los canales que son permeables a los iones de sodio y promueve la propagación del potencial de acción de un nodo al siguiente nodo, lo que se llama *conducción saltatoria*.



**Figura 1.4:** Esquema de una neurona

### 1.1.1. Desarrollo Neuronal

El principal reto del desarrollo neuronal es explicar cómo los axones y las dendritas crecen, encuentran los objetivos correctos y hacen sinapsis con sus vecinas de forma selectiva para crear una red funcional. Las diferentes partes del sistema nervioso se desarrollan acorde los propios programas locales, como la proliferación celular y la migración celular, sobre las mismas línea de células de otros tejidos del cuerpo. Después viene la etapa de diferenciación, única en células nerviosas. A partir de entonces, los diversos componentes comienzan a interactuar entre sí y la última etapa consiste en un refinamiento de las conexiones, con el uso de la activi-



dad eléctrica de la red neuronal, causada por la experiencia de la vida cotidiana, se ajustan las interacciones de la red.

### **Proliferación**

Las neuronas y células gliales son generadas principalmente en una estructura anatómica llamado *tubo neural* que consiste en un tejido de una sola capa. En el proceso se transforma en una estructura más gruesa y más compleja con muchas capas de células de diversos tipos. Las células neuronales precursoras llamadas *neuroblastos* se originan a partir de células madres neuronales que se dividen de acuerdo a un proceso de proliferación celular. El nacimiento de una neurona de un determinado tipo ocurre generalmente dentro de un período de tiempo limitado de desarrollo, tras lo cual las neuronas de este tipo no se producen. Hay un protocolo definido para la división celular, el momento de nacimiento de una neurona determinará su futura función. Durante mucho tiempo se creyó que la producción de neuronas se limita al período de desarrollo neuronal, es decir, entre la quinta semana y el quinto mes de gestación para los seres humanos.

### **Migración**

La siguiente etapa del desarrollo neuronal es un proceso llamado migración, en la que el neuroblasto migra de su lugar de nacimiento a través del tubo neural para alcanzar su posición final. Las sucesivas olas de células, nacidas en diferentes momentos, se asientan en diferentes posiciones para formar una estructura multicapa destinada a convertirse en la corteza cerebral. Las células nacidas en las capas interiores, envían sus axones a las regiones afuera de la corteza, mientras que las últimas células nacidas (en las capas externas) enviarán sus axones a las regiones dentro de la corteza. Estas opciones de destino, parecen depender principalmente de las propiedades intrínsecas de las células que se producen a horas definidas. Así, la fecha de nacimiento de una célula nerviosa, como su ubicación en el tubo neural

no sólo determinan su destino en la corteza cerebral, sino también las conexiones sinápticas que esta neurona más tarde formará .

### **Diferenciación**

Una vez que los neuroblastos llegan a su ubicación final, los procesos comienzan a crecer fuera del soma celular. Como es difícil en un primer momento distinguir entre el axón y las dendritas, en este estado se les conocerán como *neuritas*. La diferenciación de estas ocurre más tarde cuando espontáneamente uno de los procesos comienza a realizarse más rápido y recorre una distancia más grande para realizar conexiones.

Las observaciones con una técnica de grabación llamada *time-lapse* reveló una ampliación de la punta distal de las fibras en crecimiento. Esta estructura se denomina *cono de crecimiento*. El cono de crecimiento parece jugar un papel doblemente fundamental, en ser a la vez el motor del crecimiento neurítico y el aparato de detección del medio circundante para encontrar el camino hacia el destino correcto.

El cono de crecimiento se arrastra hacia adelante, ayudado tanto por numerosas terminaciones llamadas *filopodios*( que se extienden y retraen en el cono de crecimiento) y la reorganización del citoesqueleto de las neuritas. Los rasgos característicos del cono de crecimiento se completan con una especie de membrana plasmática, entre los filopodios llamada *lamelipodios*.

Con sus filopodios y lamelipodios el cono de crecimiento explora su entorno en busca de señales, como el contacto con las células específicas y/o gradiente de moléculas difusas, usadas para ser indicadores de orientación.

### **1.1.2. Refinamiento del circuito**

- Muerte celular

Una vez que la red neuronal está conectada, una primera mejora de los circuitos consiste en la eliminación de un gran porcentaje de conexiones a través

de un proceso de *competición celular*. Algunas sustancias químicas conocidas como factores neurotróficos son liberadas por cada célula y parecen ser de gran importancia para la supervivencia de la neurona. Por lo tanto, las neuronas aparentemente compiten unas con otras por estos factores neurotróficos y las que no obtienen suficiente mueren, este proceso es llamado *muerte celular programada*. Aunque puede parecer una pérdida de tiempo y energía, es una forma eficiente de ajustar el número de neuronas que van a un objetivo.

- Eliminación de sinapsis por actividad

El proceso de sinapsis sufre un proceso similar a la muerte celular: se forma en la abundancia y se distribuye en un amplio campo de destino y luego el circuito se refina por competencia. Sin embargo, a diferencia de otros procesos de desarrollo neural, la eliminación de sinapsis depende de la actividad eléctrica de la red. En la actualidad existen pruebas de que las normas de competencia para la eliminación de sinapsis implica una especie de regla biológica, que establece que cuanto más a menudo una sinapsis se activa, más fuerte se vuelve.

- Formación de los mapas neuronales específicos

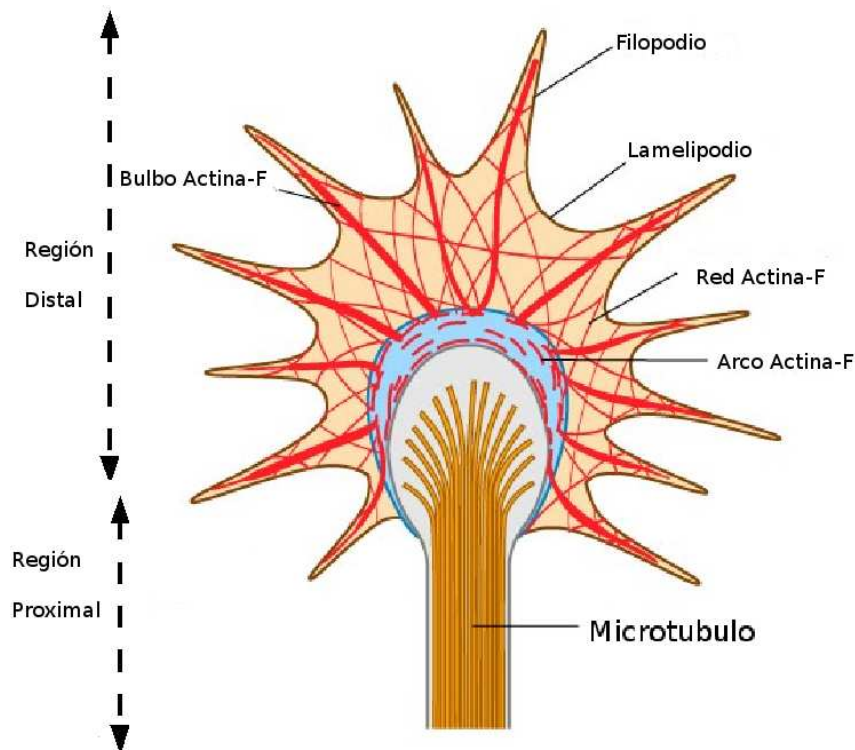
Los procesos de búsqueda de caminos axonal y eliminación de sinapsis permiten la creación de un patrón para las conexiones, organizandolas en mapas neuronales: las entradas de los órganos de los sentidos son generalmente asignada o proyectado de una manera ordenada en las regiones sensoriales en el sistema nervioso central.

### 1.1.3. Estructuras y funciones

#### Morfología del extremo axonal

Un axón extendido presenta una forma aplanada en su extremo distal, con protuberancias puntiagudas, largas y delgadas que forman dedos que se extienden

hacia adelante, son los llamados *filopodios*. Este extremo distal es el denominado *cono de crecimiento*. El espacio que queda entre los filopodios son los *lamelipodios*. Dependiendo de las señales externas que se encuentran en el medio circundante, la actividad de las lamelipodias y los filopodios puede variar.



**Figura 1.5:** Estructura en el cono de crecimiento

El cono de crecimiento puede ser subdividido en dos, región distal y región proximal, que se distinguen fácilmente por su apariencia externa y estructura interna. La región distal es extremadamente delgada y abarca tanto los filopodios y en el borde exterior lamelipodios. La región proximal del cono de crecimiento es más grueso y lleno de orgánulos como las mitocondrias y un montón de vesículas de membrana plasmática (para proporcionar nueva membrana para el cono de crecimiento que va avanzando). La mayoría de las proteínas y orgánulos necesarios para la producción del axón son suministrados por el cuerpo de la célula, y se envía por

transporte axonal rápido o lento.

Varios componentes internos del citoesqueleto forman la estructura del cono de crecimiento externo. En cuanto al cuerpo celular, las estructuras fibrilares más importantes son los microfilamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Los filamentos intermedios generalmente se extienden sólo hasta el final del axón y no penetra muy lejos en las láminas de los conos de crecimiento. Los microtúbulos se extienden lejos, llenando las laminillas y en ocasiones entran en un filopodios. En la región distal del cono de crecimiento hay una concentración inusualmente densa de filamentos de actina polimerizada o F-actina. En los filopodios, estos están estrechamente agrupadas y orientadas hacia la punta. Gran parte de la actina fibrilar en los lamelipodios también apunta hacia el borde de avance, pero una parte importante esta más orientadas aleatoriamente y forma una malla densa.

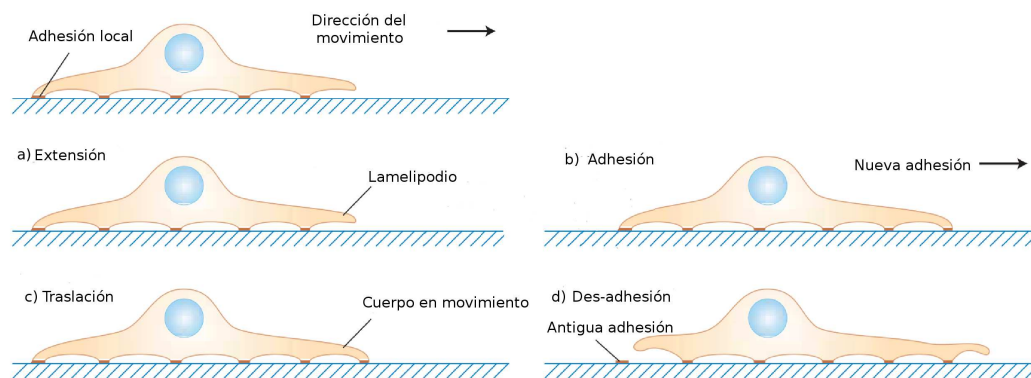
### **Rol del cono de crecimiento**

El cono de crecimiento es una estructura muy móvil que esta implicada en establecer el eje de las neuritas a medida que estas avanzan en el espacio. El cono de crecimiento es muy autónomo ya que puede migrar, una característica importante durante la búsqueda de caminos . Entre las principales funciones atribuidas al cono de crecimiento son el conjunto de funciones que se requieren para dirigir el crecimiento neurítico a lo largo de una trayectoria definida . Estas funciones se pueden clasificar como:

- Función sensorial, el cono de crecimiento tiene que leer el terreno molecular.
  
- Integración de las señales intracelular que provienen de la transducción de señales externas múltiples.

- Función de motor, que consiste en cambiar su comportamiento de acuerdo a los mensajes recibidos por los cambios en el citoesqueleto.

Los conos de crecimiento desempeñan un papel clave en conectar la red y permitir el establecimiento de conexiones con los objetivos adecuados.



**Figura 1.6:** Movimiento Celular generado por fuerzas de adhesión: La extensión comienza con el alargamiento de una o más Lamelipodia desde un borde de la célula. a) Lamelipodia se adhiere al sustrato b) la célula fluye hacia adelante c) el borde de la célula permanece unida al sustrato hasta que la cola se separa y se retrae hacia el cuerpo de la célula d) Comienza un nuevo ciclo.

## Segundos mensajeros

Estos segundos mensajeros parecen desencadenar algunos sucesos en el citoplasma y caracterizan los diferentes aspectos del comportamiento del cono de crecimiento. Uno de los segundos mensajeros que se describirán es el calcio que se encuentran en el citoplasma.

- Calcio

Estudios han mostrado que existe una correlación entre el crecimiento neuro-

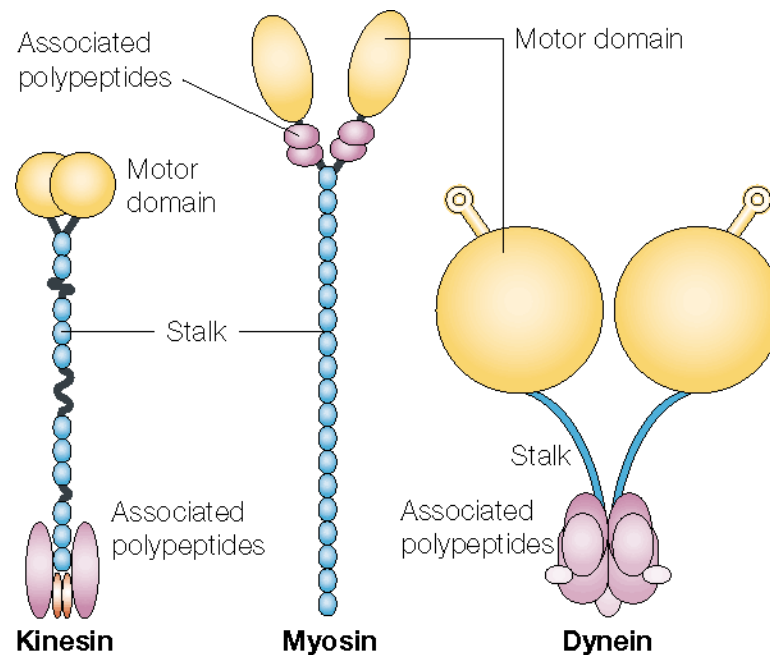
nal y el nivel de calcio intracelular. El calcio dentro de la neurona puede aumentar por su ingreso desde el medio extracelular a través de los canales de la membrana plasmática. Este aumento del calcio intracelular provoca reacciones de colapso y un medio privado de calcio extracelular tiende a desacelerar la tasa de crecimiento. Es por esto que se propone un modelo de distribución gaussiana, donde una concentración ideal de calcio intracelular da lugar a un rápido crecimiento y cuando la concentración de calcio incrementa o decrece la consecuencia sería un crecimiento reducido.

## 1.2. Motores moleculares

Como ya se menciona en la sección anterior, el citoesqueleto está formado por tres tipos de neufibrillas: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos.

Al igual que los microfilamentos, los microtúbulos participan en los movimientos celulares, controlan el latido de los cilios y flagelos y el transporte de vesículas en el citoplasma. Estos movimientos resultan de la polimerización y despolimerización de los microtúbulos o de las acciones de proteínas motoras. Existen varios tipos de estas proteínas motoras dependiendo del elemento que transporten, orgánulos o vesículas, y de la dirección que tomen.

Los motores moleculares son proteínas capaces de caminar a lo largo de filamentos celulares, de estos hay dos clasificaciones; actina y tubulina. El principal motor molecular asociado a la actina es la miosina-I y miosina-II, cada una de ellas con una estructura característica. Los filamentos de actina y los microtúbulos son estructuras polares la miosina-I tiene una cabeza que contiene lugares donde hay ligaduras de actina y la miosina-II tiene dos cabezas que contienen lugares donde hay ligaduras de actina. El motor de miosina camina hacia el extremo positivo del filamento de actina. Para formar un filamento grueso (1.8  $\mu\text{m}$ ), las colas de las moléculas individuales se asocian por uniones hidrofóbicas, así se dejan las cabezas sueltas, de modo que un filamento tendrá cabezas a todo lo largo. Las cabezas de las fibras son la parte de



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figura 1.7:** Esquema comparativo de los motores moleculares.

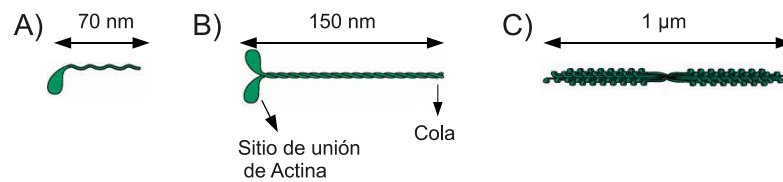
la molécula de miosina que interactúa con la actina. Estas moléculas son capaces de hidrolizar ATP, con lo que se produce la energía necesaria para la interacción y para los movimientos que se llevan a cabo en las interacción.

Estructuralmente, los dímeros de Kinesina tiene la misma apariencia que la miosina-II, la diferencia es el tamaño de la cola y la cabeza. Las proteínas motoras de los microtúbulos son: La kinesina que se dirigen hacia el extremo positivo (por donde crecen los microtúbulos) y la dineína hacia el negativo (por donde se degradan), la rapidez con la que se mueven es de aproximadamente  $4 \mu \text{ m/s}$ .

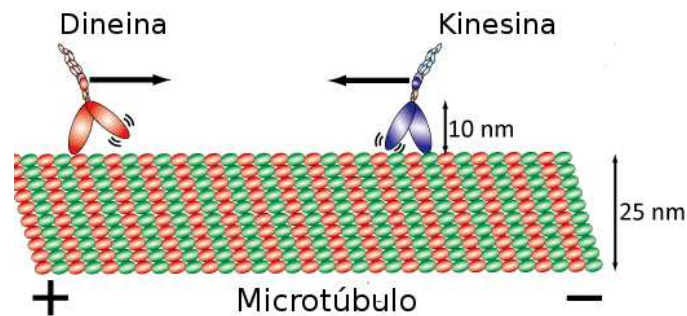
### Inhibidores

La polimerización de los microtúbulos puede inhibirse por temperatura, presión, falta de cationes como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y por drogas. Algunas de estas drogas





**Figura 1.8:** A) Molécula Miosina-I B) Molécula Miosina-II C) Filamento de Miosina-II



**Figura 1.9:** Dineína y Kinesina

son:

- Colchicina, inhibidor de la polimerización.

Algunas drogas como la colchicina, la vincristina, la vinblastina o el nocodazol provocan un acortamiento de los microtúbulos, seguido de su desaparición por la falta de polimerización. Esta es la razón por la que se inhibe la división celular (en la fase de mitosis). Las moléculas de tubulina poseen sitios de unión para el GTP y sitios de unión para las drogas inhibidoras de la polimerización (estas drogas son usadas en quimioterapia del cáncer). Estas moléculas actúan solo sobre los microtúbulos.

- Taxol, estabilizador del microtúbulo

El Taxol favorece la polimerización de los microtúbulos de tal manera que disminuye considerablemente la cantidad de tubulinas libres. Así, el taxol bloquea

la división celular porque no se puede producir la alternancia de polimerización y despolimerización de los microtúbulos. El estudio estequiométrico revela que una molécula de taxol se fija sobre cada uno de los dímeros de tubulina de un microtúbulo. La unión tiene lugar sobre la tubulina  $\beta$ .

### 1.2.1. Algunos elementos de biología molecular

Las señales externas de orientación puede ser percibida por el cono de crecimiento, por lo tanto, es necesario introducir algunos conceptos específicamente de biología. Las membranas biológicas consisten en una *bicapa lipídica* impermeable con moléculas de proteínas que se encuentran en el espesor de la membrana. Las proteínas cruzan las membranas por poros que se encuentran en la membrana o canales, que permiten que las sustancias extracelulares (como los iones) fluyan a través de la membrana. Se les llama *receptores* cuando se activan (es decir, en estado abierto) por sustancias químicas específicas contenidas en el medio extracelular. Estas sustancias actúan entonces como llaves y son llamados *ligandos*, en referencia a su capacidad de enlace con el receptor. Los ligandos son responsables de la creación de vínculos entre algunas moléculas de adhesión de la matriz extracelular y el cono de crecimiento. Cuando un receptor se abre, la membrana se vuelve permeable y se produce un intercambio entre el medio intracelular extracelular. Este proceso fundamental, llamado transducción de señales, se encuentra en la base de cualquier señalización sensorial en el que se traduce una señal externa en una señal biológica interna. Las sustancias que se introducen en la célula, se les denomina *segundos mensajeros* y por lo general se difunde a nivel local en el medio intracelular, desencadenando en forma de cascada las reacciones moleculares. El destino de una célula es entonces, determinada por el tipo de receptores expresados por sus membranas. El cono de crecimiento posee un conjunto de receptores específicos capaces de detectar las señales correspondientes. Sin embargo, es una enorme tarea identificar las moléculas que actúan en cada etapa. No sólo las molé-

culas de orientación deben ser identificadas, sino también a sus respectivos receptores a fin de determinar cuál será el flujo de segundos mensajeros en el interior del cono de crecimiento. Por otra parte, aunque algunos segundos mensajeros han sido descubiertos, los distintos mecanismos intracelulares que se desencadenan son complejos y difíciles de cuantificar. Por ejemplo, dependiendo del tipo de receptores expresados por el cono de crecimiento, algunas moléculas de orientación puede tener un efecto bimodal y luego puede ser atractivo para algunos conos de crecimiento y repulsivo para otros.

### **Factores de crecimiento y receptores**

Es necesario distinguir entre las moléculas que promueven el crecimiento y moléculas que promueven la orientación.

Es el caso de muchas moléculas incorporadas en la matriz extracelular (MEC), que proporcionan una permisividad o no permisividad, dependiendo de la clase de neuronas que se este considerado. Estas moléculas no son moléculas de orientación, pero modulan el crecimiento neurítico. Los ejemplos más conocidos son la *lamina*, *tenascina*, *colágeno*, *fibronectina*, *vitronectina* y *proteoglicanos*. Laminina y el colágeno, por ejemplo, es un apoyo importante para el crecimiento neurítico. Estas proteínas están normalmente en la matriz extracelular. Sus receptores asociados pertenecen en su mayoría a la familia de las *integrinas*.

Las *neurotrofinas* son moléculas solubles que pueden difundir en el sustrato. Las neurotrofinas más familiares son factor de crecimiento nervioso o NGF, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

### **Moléculas de orientación y sus receptores**

- Los neurotransmisores son sustancias de gran importancia una vez que el sistema nervioso está conectado, ya que, son las sustancias químicas respon-

sables de transmitir la activación eléctrica de una neurona a sus vecinos por medio de sinapsis. Hay diferentes tipos de neurotransmisores como la acetilcolina (ACh) y el glutamato que son señales potenciales de orientación, ya que, se observa una respuesta de giro del cono de crecimiento hacia una fuente que contengan estos neurotransmisores.

- Las moléculas de adhesión celular (CAMs) controlan la adhesión entre las células y el crecimiento del cono. Ellos están incrustados en la membrana celular y actuar como un receptor de la propia célula y como un ligando, debido a que pueden unirse a otras células. Se dividen en dos principales familias de receptores:
  - . Inmunoglobulina (Ig) que son receptores de calcio independiente.
  - . Cadherina receptores que son calcio dependientes.

### 1.3. Orígenes del mecanismo de tracción

Las observaciones realizadas fracasaron cuando se intento explicar cual era el mecanismo de estiramiento, pero hay cuatro hipótesis que explican la movilidad del cono de crecimiento.

1. **La protrusión de lamelipodios** El cono de crecimiento avanza a una tasa que esta relacionada con la brotación de lamelipodios.

2. **Flujo retrógrado de la actina** Un flujo retrógrado de la actina fue observado dentro del cono de crecimiento. Algunos investigadores manifestaron que dicho movimiento podría inducir a una especie de movimiento de arrastre hacia adelante, llamado movimiento de oruga.

3. **Flujo retrógrado de la bicapa lipídica** Este mecanismo presenta otro sistema de movimiento de oruga que podría mover al cono de crecimiento hacia adelante.

4. **Fuerzas de tracción de los filopodios** Se establece que los conos de crecimien-

to ejercen una fuerza hacia atrás, sobre los filopodios, para poder avanzar.

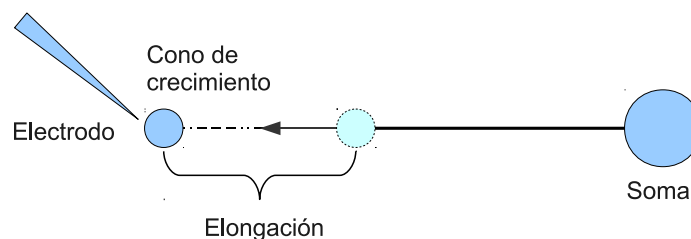
## 1.4. Pioneros en la elongación axonal

### Primeras aproximaciones

Una de las primeras aproximaciones experimentales realizadas para conocer la respuesta elástica de los axones fueron las realizadas por Bray[1], Lamoureux[2] y Denerll [7].

### Experimentos de D. Bray y P. Lamoureux

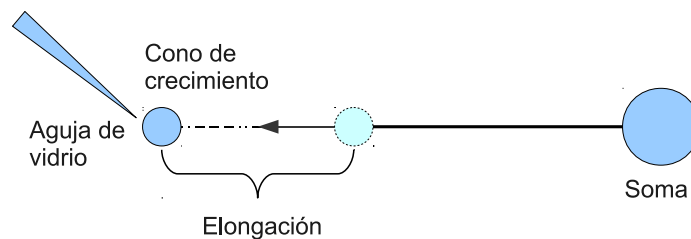
Bray *et al.*, construyó una maquina que permitía estirar una neurona a velocidad constante por medio de un microelectrodo. Esta velocidad era del orden de los  $170 [\mu m/hr]$ , en esta investigación se utilizaron células ganglionares de pollo, elongadas por un tiempo máximo de 34 horas y alcanzando una elongación de  $960 [\mu m]$ . El microelectrodo se adhiere en la punta de la neurona como se muestra en la figura 1.10.



**Figura 1.10:** Esquema experimental: Neurita elongada por tensión externa

Lamoureux, utiliza la misma idea de Bryan, en su montaje cambió el microelectrodo por una microaguja de vidrio (fig.1.11). Esta aguja de vidrio es usada para medir la tensión axial de la neurita. En esta investigación también se utilizó neuritas

ganglionares de pollo, esta aguja de vidrio es calibrada y se monta en un micro-manipulador para su manejo. En la realización de estos experimentos, el cono de crecimiento es la única estructura neuronal que permanece unida a la aguja, así se puede tener una medida directa de la fuerza axial en la neurita. El cono de crecimiento fue elongado por periodos de tiempo de 15 minutos a 3 horas. Para obtener la estimación de la elongación se midió la neurita antes del estiramiento y al término de este, la fuerza aplicada se mantuvo bajo las  $100[\mu\text{dinas}]$  ( $[1\text{nN}]$ ). Se pensó que estas diferencias en la longitud no puede deberse solo a un estiramiento elástico, ya que, se observa que las neuritas rápidamente vuelven a desarrollar una tensión axonal cuando no se le aplica fuerza, manteniendo una cierta tensión característica cuando la neurita se encuentra en reposo. De los resultados, se aprecia una correlación temporal entre el incremento de la tensión neuronal y los periodos de avance del cono de crecimiento.

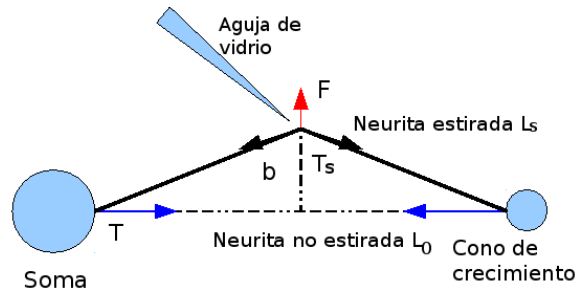


**Figura 1.11:** Esquema experimental: Neurita elongada por tensión externa

## Experimentos de Dennerll

Dennerll [7], demostró que las neuritas tienen un comportamiento elástico cuando se estiran por períodos breves y actúan como un sólido viscoelástico cuando son estiradas por periodos más extensos de tiempo. En el primer caso, la neurita se comporta como un sólido cuando está bajo tensión, con una relación lineal entre

la fuerza aplicada y el alargamiento elástico resultante, y cuando aumenta el estiramiento se comporta como un fluido viscoso. Los autores utilizaron una aguja de vidrio calibrado para tirar en el medio de una neurita, que midió la variación de la longitud y verificaron la relación lineal con la tensión aplicada.



**Figura 1.12:** Esquema experimental Dennerll: Se estira la neurita con una fina aguja de vidrio para conocer la constante de restitución del axón.

Con la geometría del esquema experimental 1.12, se puede llegar al siguiente sistema de ecuaciones.

$$\begin{aligned} F &= 2T_s \sin(\theta) = 2T_s \frac{2b}{L_s} \\ T_s &= T_0 + k(L_s - L_0) \end{aligned} \quad (1.1)$$

Se supone que la tensión se mantiene pasiva en el cono de crecimiento, por lo tanto, se calculó la constante elástica de la neurita  $\kappa$ , así como la tensión la neurita en reposo  $L_0$ , es decir, la tensión sin aplicación de fuerzas externas. También observaron que cuando la tensión en la neurita es menor a  $F_0 = 100 \text{ } [\mu\text{dina}]$  la neurita se deforma de manera viscoelástica.

El tratamiento con productos químicos ayuda a comprender mejor los mecanismos implicados:

El largo en reposo de las neuritas se reduce significativamente en neuritas tratadas con citocalasina-B (CB) (ya que la droga CB actúa en la red de actina, de

manera similar que colchicina), esta es una evidencia que parte de la tensión en reposo es sostenida por la red de actina que rodean a la neurita. Los microtúbulos son despolimerizados con otro químico llamado nocodazol. Usando nocodazol la tensión de las neuritas en reposo aumenta. Los investigadores esperaron que este fenómeno sucediese por la función de la compresión de los microtúbulos.

### 1.4.1. Estudios más recientes

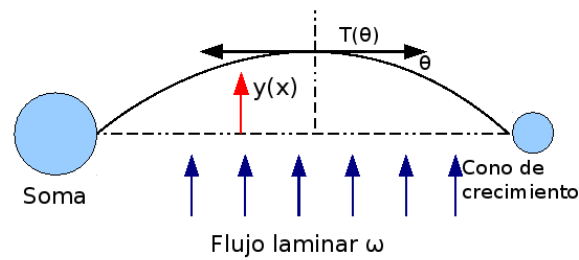
Variados autores realizaron investigaciones, utilizando la técnica de estirar la neurona desde el punto de medio del axón, por medio de microelectrodos y micro-agujas. Con estas técnicas se pudo conocer el valor de los parámetros elásticos que caracterizan a la neurita, como es su modulo elástico, el coeficiente de viscosidad y el valor de la tensión inicial del axón (tensión en reposo). Con estas técnicas experimentales, se desprecia la tensión inicial del axón, esta tensión es producida por filamentos que conforman la neurita, es por esto que Bernal *et al.* utiliza una técnica que aplica un flujo laminar perpendicular al eje del axón [8]. Con esta técnica se impone una fuerza de arrastre, el esquema experimental se muestra en la figura 1.13. El efecto de este flujo sobre el axón forma una curvatura llamada catenaria, al llegar al equilibrio mecánico. Esta fuerza provocada por el flujo da información sobre la elongación y la tensión del axón, principalmente información sobre la tensión inicial, da cuenta del valor de los parámetros viscoelásticos de las neuritas PC12 y brinda una visión sobre la respuesta de los motores moleculares

De el trabajo [8] se infieren las siguientes ecuaciones:

$$\kappa (\delta_l - \delta_k^0) + \gamma \dot{\delta}_l + T_a e^{\delta_l^2/v^2} = T(\delta_l) \quad (1.2)$$

De esta experiencia la elongación elástica es importante para  $t = 0 \rightarrow \delta_\kappa^0$  elongación elástica. La ecuación 1.4 describe la dinámica del axón bajo flujo a tiempos prolongados existen dos escalas de tiempo,  $\tau_1$  y  $\tau_2$  que están definida por las ecuación 1.3.





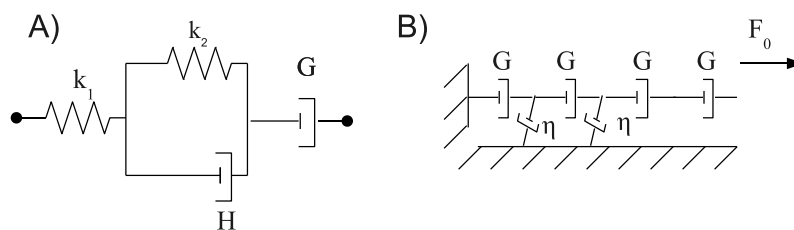
**Figura 1.13:** Esquema experimental: Se impone un flujo laminar al axón de la neurita.

$$\begin{aligned}
 \tau_1 &= \frac{2\gamma}{3\kappa} \\
 \tau_2 &= \frac{L^3}{12Ta^3} \left( \gamma - \frac{T_a}{v} \right) \omega^2 \\
 \omega &= \frac{4\Pi\eta U}{\ln\left(\frac{3.7\nu}{rU}\right)}
 \end{aligned} \tag{1.3}$$

Donde  $\omega$  es denominada la fuerza de arrastre del fluido. Las relaciones para poder encontrar las escalas de tiempo, depende de la configuración experimental.

Analizando los modelos anteriores, en todos se consideran una respuesta viscoelástica. Un nuevo trabajo de investigación [6] propone un modelo para describir la elongación axonal y considera la disminución del área transversal durante la elongación del axón. Este modelo describe la elongación del cono de crecimiento, incorpora la generación de fuerzas, las propiedades viscoelásticas del axón y la adherencia del axón al sustrato. Para la implementan del modelo, según sus autores, fue necesario conocer perfiles de velocidad de movimiento del transporte axonal, la fuerza ejercida en el cono de crecimiento, el coeficiente de fricción entre el sustrato y el axón. Con estos antecedentes el modelo sugiere, que la elongación del axón dependerá de la generación de fuerzas en el cono de crecimiento, la viscosidad del

axón, y el nivel de adhesiones del axón en toda su longitud. Basado en datos experimentales, sugiere que el axón se asemeja a una serie de amortiguadores en serie que actúan como un fluido viscoso (ver fig. 1.14 b). Con este supuesto, se podría explicar que el transporte de organelos a lo largo del axón no se detiene durante una pausa de la elongación, caso contrario sería si se suponiese al axón como una cadena de sólidos lineales 2.3, ya que, el material a lo largo del axón detendría su movimiento durante una pausa.



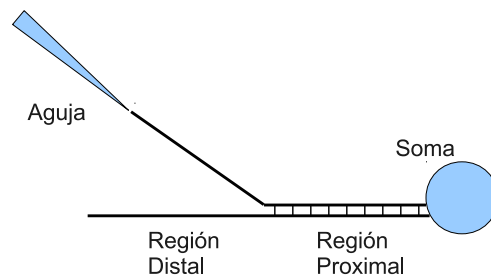
**Figura 1.14:** A) Elemento de Kelvin-Voigt mas un amortiguador en serie. B) Modelo unidimensional de la elongación de la neurita como una serie de amortiguadores, bajo un tensión  $F_0$ , el elemento que domina son los amortiguadores.

En el desarrollo de esta investigación se tomo el modelo de Dennerll, extendiéndolo a todo el largo del axón, como si cada segmento estuviese constituido con un elemento de Kelvin-Voigt mas un amortiguador en serie figura 1.14 a). Con este modelo se puede estudiar las fuerzas de tracción que son responsables de la elongación considerando los efectos de adherencia, la tensión del cono de crecimiento y la disipación a lo largo del axón.

En la tabla 1, se puede encontrar el valor de los distintos parámetros mecánicos, según los trabajos de investigación mencionados anteriormente. Donde:

$\kappa$  es la constante de restitución relacionada a la respuesta elástica de los motores moleculares.

$k$  es la constante de restitución relacionada a la interacción de las fibras y los motores moleculares



**Figura 1.15:** Esquema experimental durante la elongación de la neurita. La región distal de la neurita esta libre del sustrato, mientras que la región proximal se encuentra con numerosas adherencias lo que produce que la neurita se encuentre pegada al sustrato.

$\gamma$  es el coeficiente disipación relacionada a la fricción interna del axón

$T_0$  Tensión en reposo del axón.

$T_a$  Tensión impuesta por los motores moleculares, para velocidad de deformación igual a cero.

$v$  es la velocidad característica de los motores moleculares.

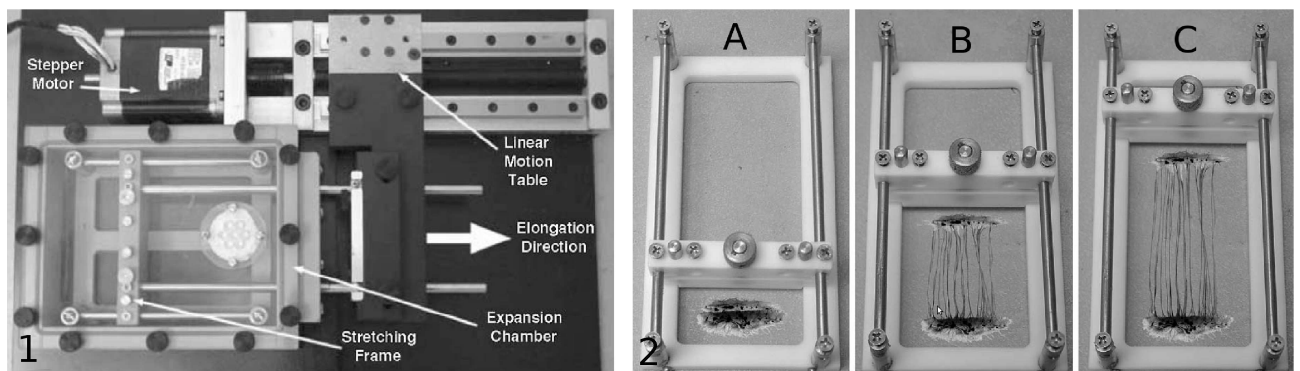
Constante	Ref [7]	Ref [9]	Ref [8]
$\kappa$ (mN/m)	0.1-0.7	0.05-0.6	0.4-0.5
$k$ (mN/m)	$\sim 6 \cdot 10^{-3}$	$10^{-3}$ - $10^{-2}$	$10^{-3}$ - $10^{-1}$
$\gamma$ (mNs/m)	6	0.5-2	4-10
$T_0$ (nN)	...	0-2	0-1.2
$T_a$ (nN)	...	0-1.5	0-1.2
$v$ ( $\mu$ m/s)	...	0.01-1	0.01-1

Tabla 1: Comparación de las constantes viscoelásticas de investigaciones mencionadas. Extraída de Tabla 2 ref.[8]

## 1.5. Desarrollo de trasplantes de tejido nervioso formado por axones estirados

### 1.5.1. Sistema de estiramiento para el crecimiento del axón

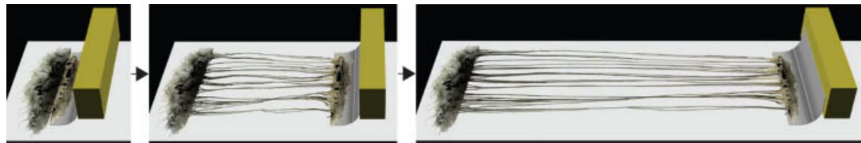
Diversas investigaciones presentan el montaje experimental que se utiliza para la elongación de axones [10][11]. El sistema para realizar la elongación de los axones se compone de una cámara donde se realiza la expansión y un controlador que esta compuesto de un motor paso a paso. La cámara donde se sitúan las neuritas para la expansión, debe cumplir con las condiciones biológicas para que el cultivo de tejidos no tenga problemas durante la experiencia, algunas condiciones básicas que debe cumplir esta cámara son: ser cerrada y que cuente con suministro de oxígeno y  $CO_2$  al 5% para mantener el cultivo en buenas condiciones. La elongación se realiza uni-direccionalmente, esta cámara es diseñada para elongar lentamente la población de células utilizandose dos sustratos durante la elongación,el primer sustrato cubre el fondo de la cámara donde luego se sitúan las células.



**Figura 1.16:** 1.- Sistema de elongación axonal. 2.-Esquema de las fases de un axón alargado por aplicación de tensión. A)Preparación de las neuronas antes de ser estiradas, colocadas en la cámara de elongación B) Estiramiento de los axones C)La extensión del axón puede ser a una velocidad de 1 [cm/día]

El crecimiento de los axones se realizo con sustratos como: polilisina (PLL),

colágeno y laminina, en distintos porcentajes. Luego de realizar la elongación de los axones los estudios indican que el revestimiento con gel de colágeno permite una alta densidad de axones, a diferencia de los otros sustratos utilizados ( PLL y laminina) también tiene la ventaja de re-hidratar el cultivo por su característica hidrofóbica.



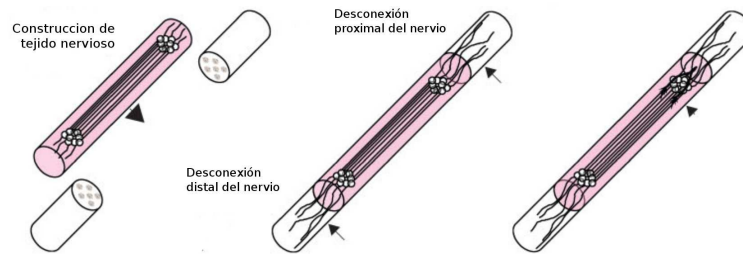
**Figura 1.17:** Esquema del proceso experimental de elongación de los axones.

### 1.5.2. Creación del injerto

De los trabajos de reconstrucción de tejido nervioso [11] se muestra que el tejido tiene como función ser un recubrimiento externo que forma un conducto, el tejido se compone de axones sanos elongados por medio de aplicación de tensión. El cultivo de estos axones elongados artificialmente, se construye con la ayuda de hidrogeles de colágeno para proteger a los axones de los daños y mantener su orientación uniaxial durante la construcción de injerto. Una vez obtenido el largo deseado de los axones contenidos en el hidrogel se retiran de la cámara, luego son dispuestos en forma cilíndrica para formar una construcción trasplantable.

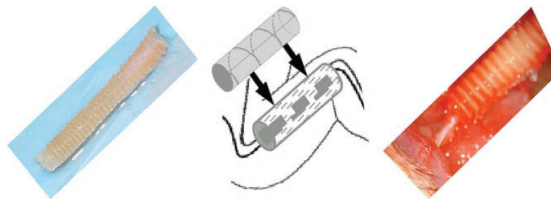
### 1.5.3. Cirugía e implantación

El trabajo de investigación [10] indica que la construcción del implante fue realizada por células de ganglio espinal(DRG). Este implante fue probado en una rata y el protocolo utilizado en la cirugía consta de la aplicación de anestesia y la realización de un corte de un segmento de 1,2 a 1,5 centímetros del nervio ciático, procedimiento genera una lesión. El siguiente paso, el trozo de nervio se retira, ya



**Figura 1.18:** Ilustración de la construcción del tejido nervioso. La estructura del tejido nervioso está formada por tres componentes: Axones elongados, hidrogel que facilita la manipulación para la construcción del injerto y por ultimo, esta construcción se envuelve en una funda biocompatible para sostener el injerto dentro de la lesión.

que, sera reemplazado por el injerto, se suturan los extremos distal y proximal al nervio ciático.



**Figura 1.19:** Injerto que se utiliza en reemplazo del nervio ciático dañado

Cuatro meses después del trasplante, la rata fue sacrificada para poder estudiar el comportamiento del injerto en la lesión del nervio ciático. En una primera instancia se realizo un examen macroscópico de la región trasplantada, que da cuenta que el nervio aparece casi normal. Luego de la inspección macroscópica, se realizo un inspección microscópica, donde las neuronas trasplantadas en cada extremo del injerto se encontraban totalmente intacta. Se observaron enlaces entre los axones del injerto y el nervio de acogida.

# Capítulo 2

## Modelos

### 2.1. Modelos Viscoelásticos

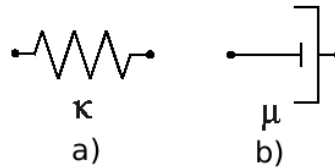
La respuesta mecánica de algunos sistemas biológicos puede ser descrita en función de sus componentes, obteniéndose datos cuantitativos que depende del modelo utilizado y de la identificación o relación que exista entre el sistema modelado y los parámetros utilizados. Así, por ejemplo, en fisiología son frecuentemente utilizados los modelos de Kelvin-Voigt y Maxwell

### 2.2. Elementos mecánicos

En esta sección se ilustraran algunos modelos reológicos lineales. La fuerza aplicada sobre el modelo se representa por  $\sigma$ , y el desplazamiento relativo entre los puntos extremos del modelo se representa por  $\epsilon$ . El modelo mecánico más simple que describe el comportamiento físico exhibido por los organismos sujetos a una elongación unidireccional es un resorte (fig. 2.1 a ). Este elemento es puramente elástico. Un resorte se caracteriza por sufrir una deformación proporcional a la tensión aplicada. Si un material elástico se somete a un estiramiento  $\epsilon_0$  producirá instantáneamente una tensión  $\sigma_0$  relacionado por la ecuación 2.1

$$\sigma = \kappa \epsilon \quad (2.1)$$

Donde  $\sigma$  y  $\epsilon$  es análogo a la fuerza del resorte y a su desplazamiento, y la constante del resorte  $\kappa$  es análogo al módulo de Young  $E$ . Donde  $\kappa$  tiene unidades de  $N/m$ .



**Figura 2.1:** a) Resorte: Elemento elástico b) Amortiguador: Elemento disipador

El amortiguador que se designa con el símbolo  $\mu$  representa la viscosidad y tiene unidades de  $Ns/m$ , y es constante para fluidos newtonianos. Aquí la diferenciación en el tiempo se denota  $\dot{\epsilon}$  (donde  $\dot{\epsilon} = \frac{d\epsilon}{dt}$ ), para este elemento mecánico la velocidad es proporcional a la tensión, como se muestra en la ecuación 2.2.

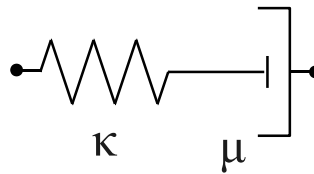
$$\sigma = \mu \dot{\epsilon} \quad (2.2)$$

## 2.3. Modelos matemáticos para la respuesta viscoelástica lineal

### 2.3.1. Modelo de Maxwell resorte-amortiguador

La dependencia temporal de la respuesta viscoelástica puede ser descrita por ecuaciones diferenciales ordinarias. Es el caso del modelo de Maxwell, mostrado en la figura 2.2. Es un modelo mecánico en el que está conectado un resorte y un amortiguador en serie. El resorte debe ser visualizado como representante de





**Figura 2.2:** Modelo Maxwell

la componente elástica, mientras que el amortiguador representa la componente de disipación. En una conexión en serie como el modelo de Maxwell, la tensión en cada elemento es el mismo e igual a la tensión impuesta, mientras que la elongación total es la suma las elongaciones de cada elemento:

$$\begin{aligned}\sigma &= \sigma_s = \sigma_d \\ \epsilon &= \epsilon_s + \epsilon_d\end{aligned}\quad (2.3)$$

Donde los subíndices  $s$  y  $d$  representan el resorte y el amortiguador, respectivamente. Para tener una única ecuación que relacione el desplazamiento y la tensión, es conveniente diferenciar la ecuación de tensión y luego escribir diferencial de deformación del resorte y del amortiguador en términos de la tensión.

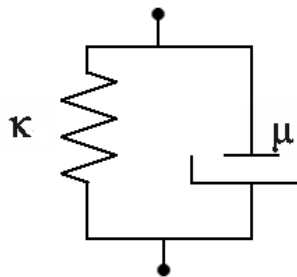
$$\dot{\epsilon} = \dot{\epsilon}_s + \dot{\epsilon}_d = \frac{\dot{\sigma}}{\kappa} + \frac{\sigma}{\mu}\quad (2.4)$$

Esta ecuación puede ser resuelta para la tensión  $\sigma(t)$  y de la deformación  $\epsilon(t)$ .

### 2.3.2. Modelo de Kelvin-Voigt

Otro modelo simple, es el de Kelvin-Voigt, se ha utilizado con frecuencia en relación con el comportamiento viscoelástico. El modelo de Kelvin-Voigt como se muestra en la figura 2.3 se compone de los mismos elementos fundamentales como

el modelo de Maxwell, excepto que aquí el resorte y el amortiguador están en paralelo en lugar de ser en serie. Debido a esta configuración, el modelo de Kelvin-Voigt representa la forma más simple de un elemento viscoelástico. En este modelo, la elongación debe ser la misma en ambos elementos. La tensión de todo el elemento debe ser entonces la suma de las tensiones de los dos elementos individuales. Así, la ecuación fundamental del movimiento del elemento de Kelvin-Voigt es:



**Figura 2.3:** Modelo de Kelvin-Voigt

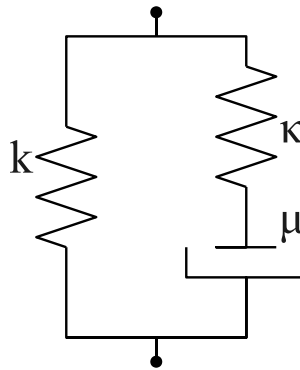
$$\sigma = \kappa\epsilon + \mu\dot{\epsilon} \quad (2.5)$$

### 2.3.3. Sólido Lineal tipo Maxwell

El modelo de Maxwell sólo es válido para un conjunto muy limitado de materiales. La colocación de un resorte en paralelo con una unidad de Maxwell da un modelo muy útil conocido como Sólido Lineal, que se muestra en la figura 2.4. Este resorte puesto en paralelo tiene una constante elástica  $k$ . De este modelo podemos ver lo siguiente:

$$\begin{aligned}\sigma &= \sigma_k + \sigma_m \\ \epsilon &= \epsilon_k = \epsilon_m\end{aligned}\quad (2.6)$$

Donde los subíndices  $k$  y  $m$  corresponden al resorte paralelo y al elemento de maxwell.



**Figura 2.4:** Modelo sólido lineal tipo Maxwell

La ecuación que gobierna este modelos es:

$$\sigma + \frac{\mu}{\kappa} \dot{\sigma} = k\epsilon + \mu\left(1 + \frac{k}{\kappa}\right)\dot{\epsilon}\quad (2.7)$$

### 2.3.4. Modelo Sólido Lineal tipo Kelvin

Como muestra la figura 2.5 este elemento esta compuesto de un elemento Kelvin-Voigt con un resorte en serie, realizando el mismo análisis de los modelos anteriores, donde la deformación del sistema es la suma de la deformación del elemento de Kelvin-Voigt mas la deformación del resorte en serie, la relación de la tensión

$$\begin{aligned}\sigma &= \kappa\delta_1 \\ \sigma &= k\epsilon_2 + \gamma\dot{\epsilon}_2\end{aligned}\tag{2.8}$$

Este modelo es el usado en los trabajos de Dennerll [3], este modelo es idéntico a un sólido lineal de Maxwell cuando  $k \ll \kappa$

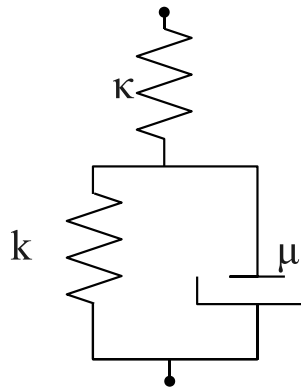


Figura 2.5: Modelo sólido lineal tipo Kelvin

La ecuación que gobierna este modelos es:

$$\left(1 + \frac{k}{\kappa}\right)\sigma + \frac{\mu}{\kappa}\dot{\sigma} = \kappa\epsilon + \mu\dot{\epsilon}\tag{2.9}$$

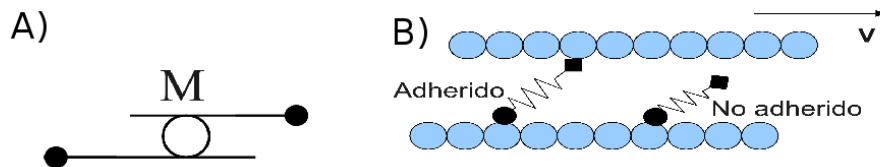
## 2.4. Viscoelasticidad y motores moleculares

### 2.4.1. Motor molecular

Luego de una relajación viscoelástica, cuando se trabaja con un axón, se puede apreciar en algunos casos una pequeña contracción de él. Esto se debe a la acción de los motores molecular [9], el nuevo elemento que se denota como  $M$

(fig. 2.6 a) ). La fuerza aplicada al motor molecular es representada por una tensión característica  $T_a$  en función de la velocidad de deformación  $\dot{\delta}$  y la velocidad del motor molecular  $v$ . La representación para la fuerza del motor molecular es:

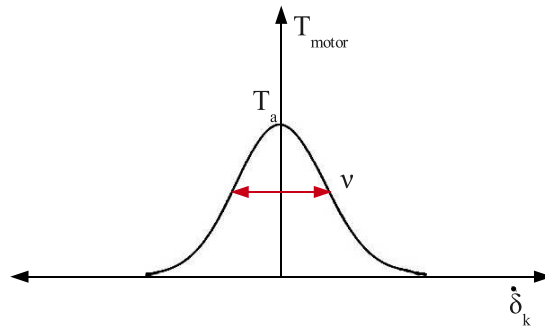
$$M(\dot{\delta}) = T_a e^{-\left(\frac{\dot{\delta}}{v}\right)^2} \quad (2.10)$$



**Figura 2.6:** A) Representación del elemento motor molecular. B) Representación de la adherencia y desadherencia del motor molecular a los filamentos.

El motor molecular tiene la habilidad de adherirse periódicamente a los filamentos (fig.2.6 b)). El periodo de adhesión esta dado por  $\tau$  (tiempo relacionado con el ciclo de hidrólisis del ATP), la constante de restitución del motor  $\kappa_{mot}$ , la velocidad del motor  $V$ . Con estos parámetros se puede indicar cual es la fuerza de restitución del motor que viene dada por:  $F = \kappa_{mot} V \tau_{on}$ , donde  $\tau_{on}$  es el tiempo de adhesión del motor al filamento y la disipación del motor en un periodo es de  $\gamma_{mot} = p \kappa_{mot} \tau_{mot}$  con  $p = \frac{\tau_{mot}}{\tau}$ .

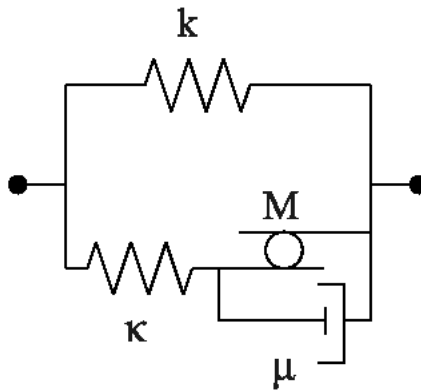
Se representa la respuesta mecánica de los motores moleculares como una gaussiana, en función de la velocidad de deformación  $\dot{\delta}$ . La velocidad de los motores moleculares dentro del axón,  $v$ , corresponde al ancho típico de esta gaussiana y  $T_a$  corresponde a la fuerza máxima que ejercer el conjunto de motores a velocidad de deformación nula ( $\dot{\delta} = 0$ ).



**Figura 2.7:** Respuesta de los motores moleculares en función de la velocidad de elongación  $\dot{\delta}$ .

### Sólido lineal mas motores moleculares

Considerando modelo de sólido lineal (fig. 2.4) mas el motor molecular, se obtiene el modelos mostrado en la figura 2.8



**Figura 2.8:** Modelo sólido lineal incluyendo el motor molecular

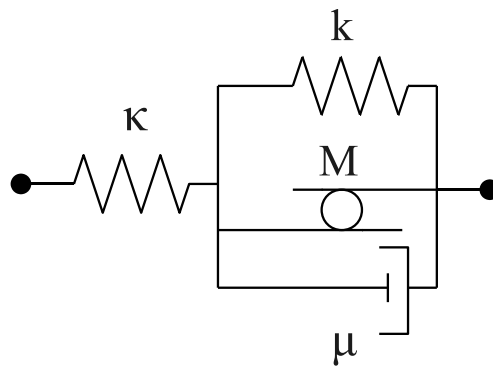
La ecuación que relaciona la fuerza y los parámetros del modelo, es 2.11, donde la fuerza  $\sigma$  se denotara por  $F$  y la elongación  $\epsilon$  se denominara  $\delta$ :

$$F + \frac{\mu}{\kappa} \dot{F} = k\delta + \mu(1 + \frac{k}{\kappa})\dot{\delta} + M(\ddot{\delta})$$

$$F + \frac{\mu}{\kappa} \dot{F} = k\delta + \mu(1 + \frac{k}{\kappa})\dot{\delta} + Te^{-\frac{((1+\frac{k}{\kappa})\dot{\delta} - \frac{\dot{F}}{\kappa})}{v}} \quad (2.11)$$

**Modelo de Dennerll mas motores moleculares**

Considerando el modelo usado por Dennerll (fig. 2.5) mas el motor molecular, se obtiene el modelo mostrado en la figura 2.9 La ecuación que relaciona la fuerza y los parámetros del modelo, es 3.2.



**Figura 2.9:** Modelo sólido lineal kelvin incluyendo el motor molecular

$$(1 + \frac{k}{\kappa})F + \frac{\mu}{\kappa} \dot{F} = k\delta + \mu\dot{\delta} + M(\ddot{\delta} - \frac{\dot{F}}{\kappa})$$

$$(1 + \frac{k}{\kappa})F + \frac{\mu}{\kappa} \dot{F} = k\delta + \mu\dot{\delta} + Te^{-\frac{(\dot{\delta} - \frac{\dot{F}}{\kappa})}{v}} \quad (2.12)$$

# Capítulo 3

## Simulación

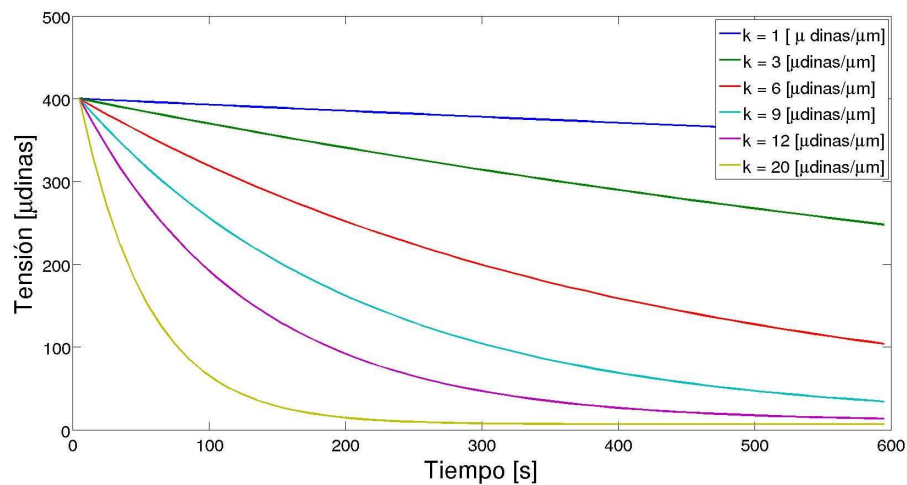
### 3.1. Simulaciones preliminares

#### 3.1.1. Modelo de Dennerll *et al.*

Para tiempos relativamente largos, el comportamiento mecánico presenta dos comportamientos. Uno de ellos relaciona el tiempo característico, cociente de  $\mu/k$ , que corresponde al tiempo característico de la relajación viscoelástica. A través del modelo utilizado por Dennerll [3] se puede comprender esta relajación viscosa. Y el segundo tiempo característico, es considerado por la contracción del axón que viene luego de la relajación inicial.

En esta sección se reproducirán sus simulaciones utilizando, los valores experimentales publicados en sus trabajos. Basándonos en el montaje experimental [3] (fig. 1.12) y utilizando las ecuaciones del modelo propuesto por Dennerll. En las figuras (3.1),(3.2),(3.3) se aprecia el efecto, de los cambios en los valores de las constantes elásticas y de viscosidad que determina el comportamiento del modelo. En todos los casos se aplica una fuerza inicial de 400 [ $\mu\text{dinas}$ ].

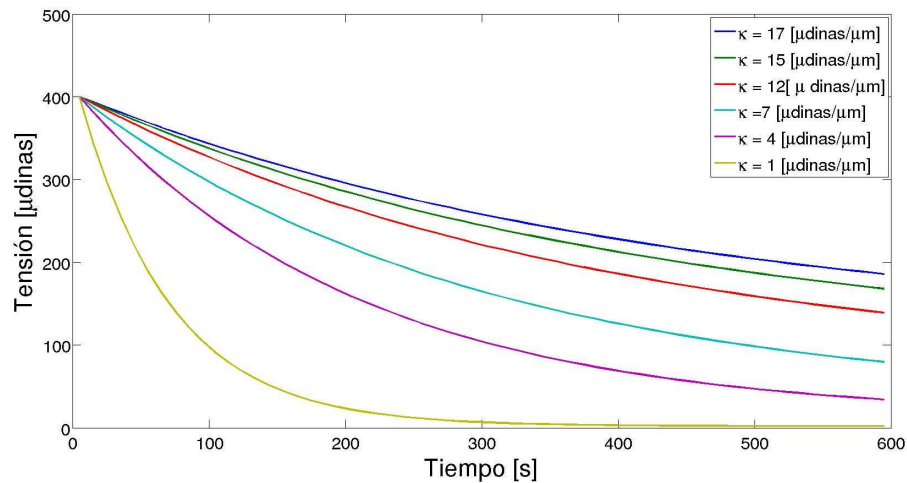




**Figura 3.1:** Simulación aplicando una fuerza inicial de  $400[\mu\text{dinass}]$  los valores de las constantes  $\kappa = 4[\mu\text{dinass}/\mu\text{m}]$ ,  $\mu = 6000[\mu\text{dinass}/\mu\text{m}]$

### 3.2. Simulación en aproximación viscosa

El trabajo de investigación [6] propone un modelo de Dennerll modificado, ampliado a la totalidad del axón, subdividiéndolo en pequeños segmentos, esto permite estudiar cómo las fuerzas de tracción causa la elongación axonal en cada punto a lo largo de la neuritas. El modelo incluye efectos de adherencias extracelular a lo largo del axón. La nueva visión que incorpora este modelo es el arrastre viscoso que se interpreta por la interacción entre el eje axonal y el sustrato, los datos experimentales obtenidos por los autores sugieren que el axón se modela como una serie de amortiguadores que actuarían como un fluido viscoelástico. De sus observaciones, infieren que a rápidas deformaciones, en intervalos de tiempo que van de segundos a minutos, el axón tiene un comportamiento elástico y a deformaciones lentas durante horas o días, el axón puede ser elongado por varios milímetros sin que se rompa. La elongación de los axones producto del estiramiento por tensión se explica con este modelo mediante la variación de los parámetros que incluye la fuerza, comportamiento mecánico axonal, y las interacciones de fricción con el sustrato.

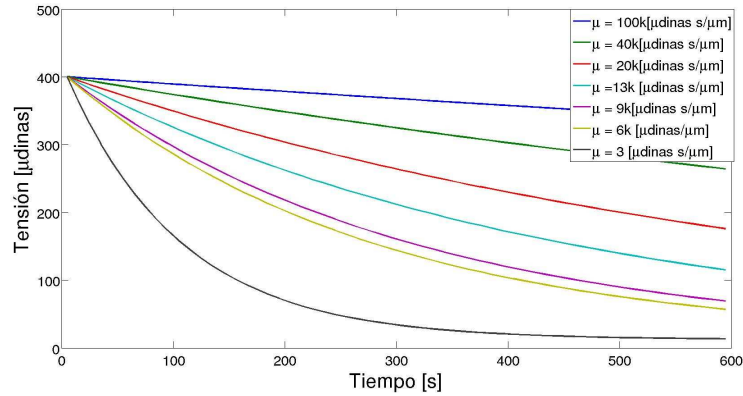


**Figura 3.2:** Simulación aplicando una fuerza inicial de  $400[\mu\text{dinas}]$  los valores de las constantes  $k = 9$  [ $\mu\text{dinas}/\mu\text{m}$ ],  $\mu = 6000$  [ $\mu\text{dinas s}/\mu\text{m}$ ]

### Derivación del modelo y ecuaciones

Se considera un axón que experimenta una fuerza constante, esta fuerza puede generarse internamente o externamente. El axón se trata como un modelo continuo formado de una serie de elementos de Maxwell en serie con un resorte. Si la tensión se aplica durante un tiempo considerable, sobre 10 minutos, el axón crece a una tasa constante. En estas condiciones los elementos elásticos de la célula se encuentran en un estado estacionario y la elongación se comporta como la fuerza que actúa sobre un amortiguador .

Para analizar el transporte a lo largo de la longitud del axón, el modelo se simplifica y trata al axón, en este estado, como una serie de amortiguadores (fig. 1.14 B)). Esta serie de amortiguadores bajo tensión constante, tiene un perfil de velocidad lineal. Los dos factores que desempeñan un rol importante en el perfil de velocidad de un axón que se encuentra bajo tensión son, la viscosidad del axón y la constante de fricción,  $\eta$ , que permite cuantificar las interacciones entre el axón y el sustrato. Si hay un gran número de microtúbulos o mucho entrecruzamiento



**Figura 3.3:** Simulación aplicando una fuerza inicial de  $400[\mu\text{dinás}]$  los valores de las constantes  $\kappa = 4 [\mu\text{dinás}/\mu\text{m}]$ ,  $k = 9 [\mu\text{dinás}/\mu\text{m}]$

entre ellos el axón será resistente al estiramiento y el valor de la viscosidad axial sera grande, el diámetro del axón también afectará su capacidad de ser estirado.  $G$  es el parámetro que esta asociado al amortiguador del cono de crecimiento, es la relación entre el área transversal y la viscosidad del axón, cuantifica la respuesta de la fuerza aplicada a la zona distal del axón. El coeficiente de fricción  $\eta$ , se caracteriza por la fuerza y el número de adherencias entre el axón y el sustrato.  $\eta$  es cero si el axón no esta adherido al sustrato, como sucede en la zona distal del axón. El comportamiento del axón en la región sin adherencia puede ser bien descrito por el modelo de tres elementos 2.5. El modelo incorpora la disipación de las fuerzas y describe el perfil de velocidad del material adherido.

Las ecuaciones de fuerza, velocidad y largo que proponen para el modelo son:

$$\begin{aligned}
 f(x, L(t)) &= \frac{F_0 \cosh(x(\eta/G)^{1/2})}{\cosh(L(t)(\eta/G)^{1/2})} \\
 L(t) &= \left(\frac{G}{\eta}\right)^{1/2} \sinh^{-1}\left(\beta \exp\left(\frac{F_0 t}{G}\right)\right) \quad \beta = \sinh(L_0(\eta/G)^{1/2}) \\
 v(x, L(t)) &= \frac{F_0 \sinh(x(\eta/G)^{1/2})}{(\eta G)^{1/2} \cosh(L(t)(\eta/G)^{1/2})} \tag{3.1}
 \end{aligned}$$

De las ecuaciones anteriores, la fuerza  $f$  y los perfiles de velocidad de los

axones  $v$  son funciones de la distancia del cuerpo celular,  $x$ , y la longitud del axón,  $L(t)$ .

### Consideraciones del código

El código de la simulación numérica del trabajo descrito anteriormente, se encuentra abierto, por lo tanto para poder comparar los obtenidos con la simulación numérica propuesto en este trabajo de tesis y los resultados obtenidos por la simulación aplicando el conjunto de ecuaciones 3.1, sera necesario cambiar solo los parámetros de entrada.

## 3.3. Simulación

En esta sección se pretende dar respuesta al comportamiento mecánico que no puede ser explicado por el modelo usado en la sección 3.1.1, este comportamiento consiste en la contracción de la longitud del axón, luego de la relajación inicial que se presenta en un segundo tiempo característico mas grande que el tiempo característico de la relajación viscoelástica. El modelo completo que caracteriza el comportamiento del axón (en la figura 2.9) involucra la solución de una ecuación diferencial que requiere la utilización de un método numérico específico, el cual está fuera del alcance de este trabajo. Para poder obtener una solución numérica es necesario considerar un nuevo modelo, mostrado en la figura 3.4.

La ecuacion diferencial que gobierna este nuevo modelo es:

$$F = k\delta + \mu\dot{\delta} + T_a e^{-\left(\frac{\dot{\delta}}{v}\right)^2} \quad (3.2)$$

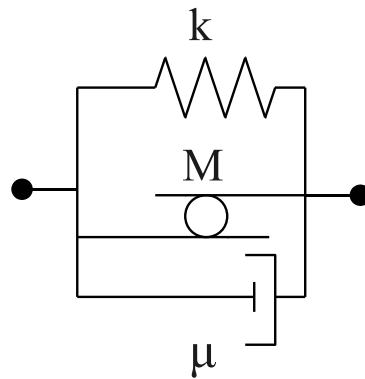


Figura 3.4: Modelo a usar

### 3.3.1. Discretización

El axón se supone como un conjunto de elementos acoplados (fig. 3.4), dispuestos en serie como lo muestra el esquema de la figura 3.5

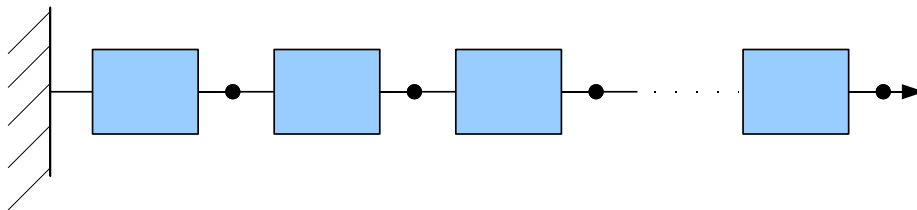


Figura 3.5: Cadena de elementos, cada celda (cuadros celestes) corresponde a un elemento del modelo propuesto 3.4

Conjunto de ecuaciones que gobiernan el comportamiento del axón, desde

el punto de vista de una serie de elementos

$$\begin{aligned}
 F_1 &= -k_1(\delta_1 - \delta_0) - \mu_1(\dot{\delta}_1 - \dot{\delta}_0) - T_{a1}e^{-\left(\frac{\delta_1 - \delta_0}{v_1}\right)^2} + k_2(\delta_2 - \delta_1) + \mu_2(\dot{\delta}_2 - \dot{\delta}_1) + T_{a2}e^{-\left(\frac{\delta_2 - \delta_1}{v_2}\right)^2} \\
 F_2 &= -k_2(\delta_2 - \delta_1) - \mu_2(\dot{\delta}_2 - \dot{\delta}_1) - T_{a2}e^{-\left(\frac{\delta_2 - \delta_1}{v_2}\right)^2} + k_3(\delta_3 - \delta_2) + \mu_3(\dot{\delta}_3 - \dot{\delta}_2) + T_{a3}e^{-\left(\frac{\delta_3 - \delta_2}{v_3}\right)^2} \\
 &\vdots \\
 F_N &= -k_N(\delta_N - \delta_{N-1}) - \mu_N(\dot{\delta}_N - \dot{\delta}_{N-1}) - T_{aN}e^{-\left(\frac{\delta_N - \delta_{N-1}}{v_N}\right)^2}
 \end{aligned} \tag{3.3}$$

En el caso de la simulación, se considera que los parámetros de todas las celdas son iguales. Un extremo del axón se mantiene fijo, por lo tanto,  $\delta_0 = 0$  y el ultimo nodo será tirado a una velocidad constante. Usando la relación de  $F = m\ddot{\delta}$ .

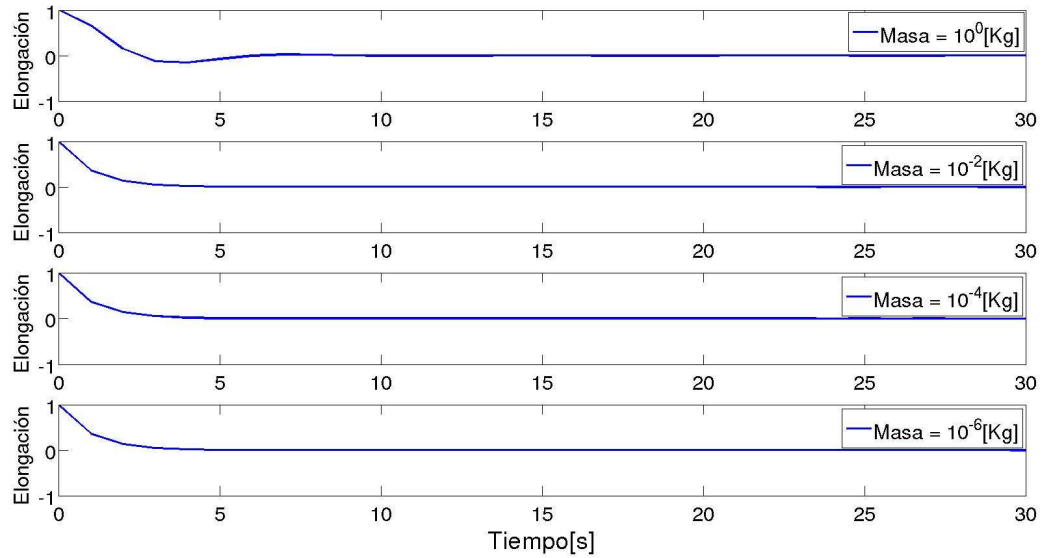
$$\begin{aligned}
 m_1\ddot{\delta}_1 &= -k_1(\delta_1 - \delta_0) - \mu_1(\dot{\delta}_1 - \dot{\delta}_0) - T_{a1}e^{-\left(\frac{\delta_1 - \delta_0}{v_1}\right)^2} + k_2(\delta_2 - \delta_1) + \mu_2(\dot{\delta}_2 - \dot{\delta}_1) + T_{a2}e^{-\left(\frac{\delta_2 - \delta_1}{v_2}\right)^2} \\
 m_2\ddot{\delta}_2 &= -k_2(\delta_2 - \delta_1) - \mu_2(\dot{\delta}_2 - \dot{\delta}_1) - T_{a2}e^{-\left(\frac{\delta_2 - \delta_1}{v_2}\right)^2} + k_3(\delta_3 - \delta_2) + \mu_3(\dot{\delta}_3 - \dot{\delta}_2) + T_{a3}e^{-\left(\frac{\delta_3 - \delta_2}{v_3}\right)^2} \\
 &\vdots \\
 m_N\ddot{\delta}_N &= -k_N(\delta_N - \delta_{N-1}) - \mu_N(\dot{\delta}_N - \dot{\delta}_{N-1}) - T_{aN}e^{-\left(\frac{\delta_N - \delta_{N-1}}{v_N}\right)^2}
 \end{aligned} \tag{3.4}$$

### Consideraciones del código: Test de cálculo

A pesar de que la inercia del axón no afecta el proceso de elongación, es necesario considerar la masa del axón para poder resolver la ecuación diferencial 3.2. Para elegir el orden de magnitud de la masa, apto para los cálculos, se realizan una serie de pruebas, las cuales resolvían la ecuación diferencial del modelo Kelvin-Voigt 2.3, por medio de una solución analítica y solución numérica. La programación de los cálculos fue realizada en el programa computacional MATLAB, por medio del método de Runge-Kutta (ode45).

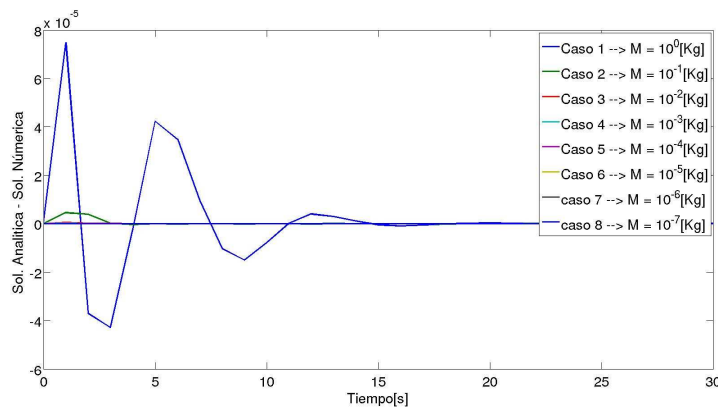
La elección del orden de magnitud del parámetro de la masa, dependerá del tiempo de cálculo y la calidad de la solución de la ecuación diferencial.

Considerando los parámetros del modelo 3.2 con los siguientes valores  $\kappa = 1N/m$  y  $\mu = 1Ns/m$ . Los resultados de la simulación numérica del modelo se muestran en la figura 3.6, se cambia los valores de las masas en un orden de magnitud.



**Figura 3.6:** Solución analítica de la ecuación diferencial. Se consideran distintos valores de masas

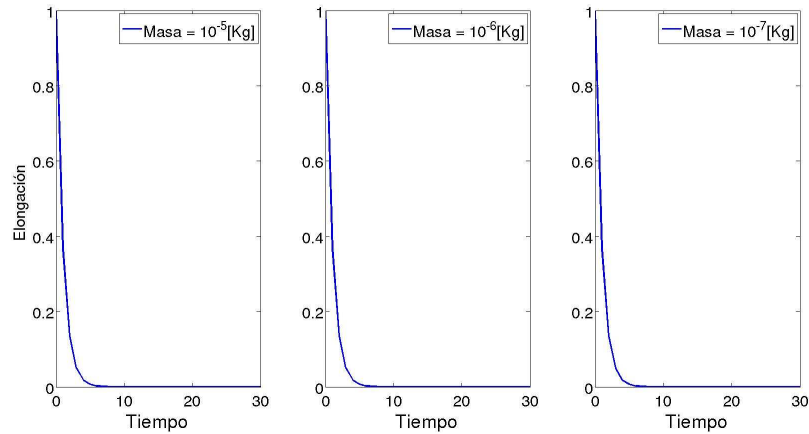
Para poder comparar se soluciona la ecuación diferencial de manera analítica utilizando la herramienta *dsolve*, considerando los mismos valores para las condiciones iniciales y para los parámetros  $\kappa$  y  $\mu$ .



**Figura 3.7:** Diferencia entre la solución analítica y numérica en cada una de las soluciones de la ecuación diferencial calculado con las distintas masas.

De los cálculos se concluye lo siguiente: el método de cálculo numérico, Runge-Kutta programado en Matlab (ode45), al ser de paso variable, a valores de masas muy pequeñas, en relación a las constantes  $\kappa$  y  $\mu$ , no es capaz de considerar pasos muy pequeños, y es por esto que usando masas de valor  $0,0001[Kg]$ , el método considera el mismo paso de tiempo para el cálculo realizado para masa un orden mas pequeña ( $0,00001[Kg]$ ), y los resultados son similares (con un error relativo de menos del 1 %), aunque el tiempo de cálculo también incrementa en un orden de magnitud. La elección de la masa considerada en los cálculos de este trabajo, será estudiada bajo este criterio, considerando los valores de la solución y el tiempo que demora en obtener la solución.





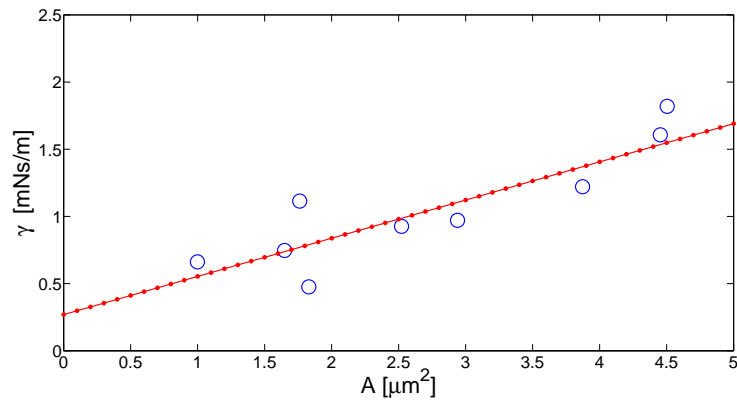
**Figura 3.8:** Comparación de las soluciones numéricas, realizadas con masas de  $10^{-5}[Kg]$ ,  $10^{-6}[Kg]$ ,  $10^{-7}[Kg]$ , respectivamente

### 3.4. Análisis de los parámetros

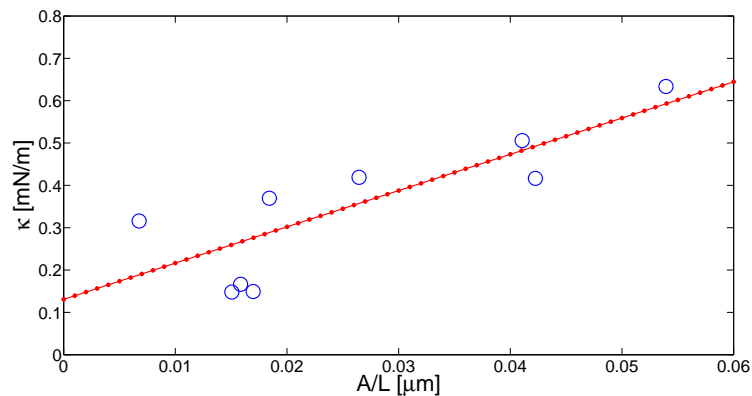
Para poder caracterizar un axón es necesario, realizar un análisis de los parámetros a usar, para esto se supone un axón homogéneo. Los primeros análisis relacionan la constante de restitución del axón con su sección transversal, su largo y su elongación una vez aplicada una fuerza.

$$\begin{aligned}
 F &= k\Delta x \\
 \sigma &= \frac{F}{A} = E\frac{\Delta x}{L} \\
 k &= E\frac{A}{L}
 \end{aligned} \tag{3.5}$$

Con  $E \simeq 12kPa$  este módulo de Young involucra los componentes interiores del axón. Los siguientes, corresponden a valores experimentales de neuritas PC-12 [9]. Para llevar a cabo la elección de los parámetros, se seleccionará el valor la disipación a través de la relación entre el coeficiente de disipación y el área transversal, luego, conocida la relación  $A/L$  y con el largo del axón impuesto, se conocerá el valor de la constante de restitución  $\kappa$ .

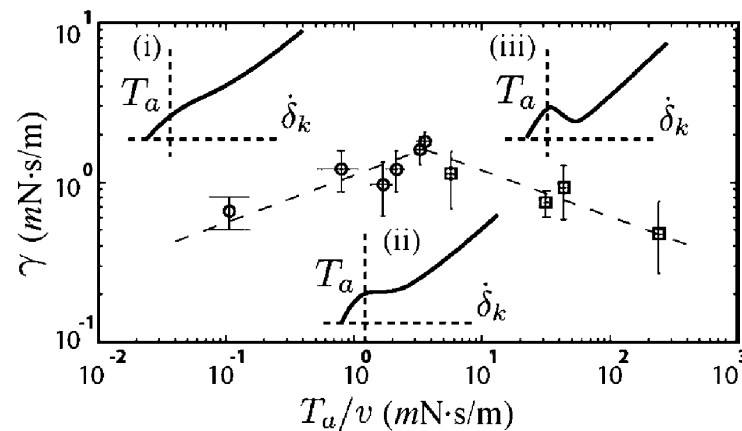


**Figura 3.9:** Relación de la disipación con el área transversal del axón.



**Figura 3.10:** Relación de la constante elástica de los axones de células PC-12.

Conocida la constante de disipación, el siguiente paso es utilizar la relación que maneja la transición entre el régimen pasivo al activo que se muestra en la figura 3.11, donde se vincula la constante viscosa  $\gamma$  con el cociente  $T_a/v$ . Conocida la relación  $T_a/v$ , elige el valor de  $T_a$  y  $v$ , de la relación funcional mostrada en el gráfico de la figura 3.12. Se hablara de zona pasiva y zona activa al referirse a: Caso Activo con  $\gamma < T_a/v$  y  $v < 0.1$  [ $\mu\text{m}/\text{s}$ ], Caso Pasivo con  $\gamma > T_a/v$  y  $v > 0.1$  [ $\mu\text{m}/\text{s}$ ].



**Figura 3.11:** Diagrama que relaciona  $\gamma$  con el cociente  $T_a/v$  para los cambios del comportamiento de un axón. Gráfico extraído ref[9]

### Consideraciones del cálculo

Se consideran todas las celdas con las mismas constantes. La longitud del axón es de  $100 [\mu m]$  y se divide en 100 partes iguales. En condiciones experimentales el axón, es elongado por medio de una imposición de una fuerza o velocidad conocida, en el transcurso de esta simulación, se impondrá una velocidad constante de elongación.

La velocidad de elongación, será normalizada a la velocidad característica del motor molecular ( $v = 0,1 \mu m/s$ ), considerando ordenes de que van desde 0,1 a 10 veces la velocidad del motor molecular.

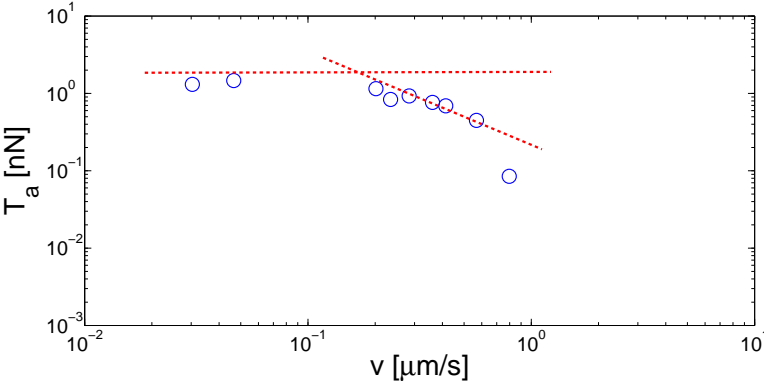


Figura 3.12: Relación entre  $T_a$  y  $v$ .

# Capítulo 4

## Resultados

### 4.1. Resultados

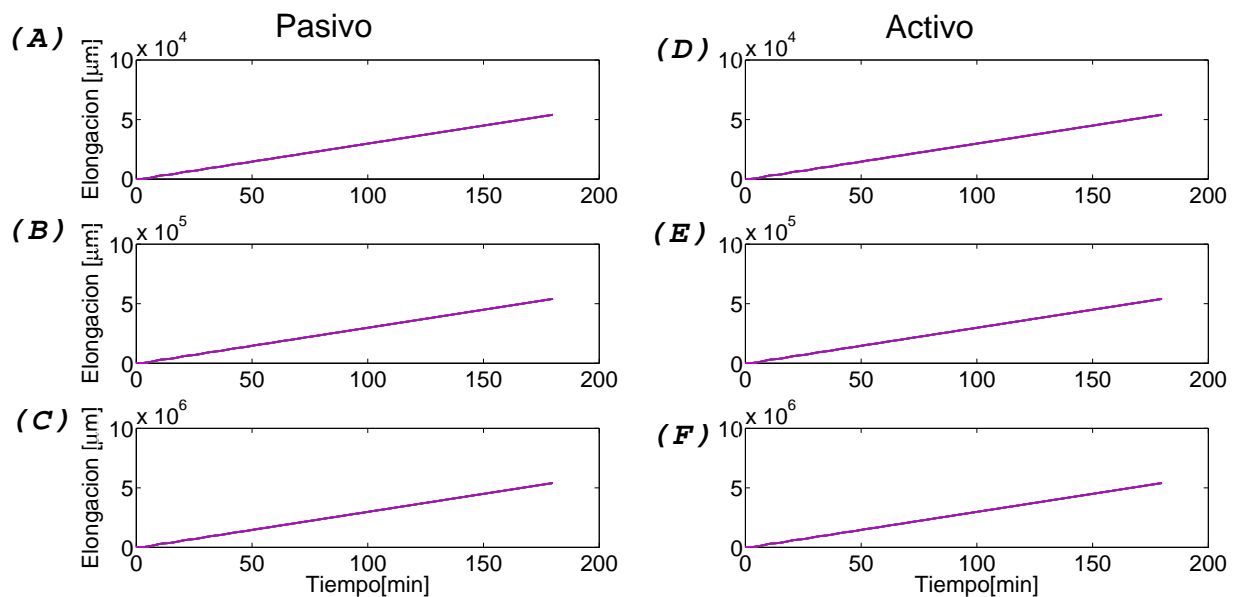
Seleccionando los parámetros que caracterizaran el modelo propuesto, se prosigue a realizar una serie de simulaciones. Tomando parámetros de las relaciones descritas por los gráficos de las figuras (3.9), (3.10), (3.11) y (3.12), en la región Pasiva y Activa, con  $v_0$  como la velocidad impuesta en el ultimo nodo.

#### Imposición de velocidad constante

Para la realización de los cálculos el valor de la masa usada es de  $10^{-4}$  [Kg] y un tiempo de simulación de 180 [min]. Se hacen las pruebas a velocidades de 0,1 a 10 [ $\mu\text{m}/\text{s}$ ] y área transversal del axón con los valores de  $1 - 5$  [ $\mu\text{m}^2$ ]. Los primeros resultados se muestran en la figura (4.1), estas simulaciones se llevaron acabo, suponiendo que todos los nodos, se encontraban inicialmente en reposo y aplicando una velocidad constante al ultimo nodo. En los gráficos podemos ver la elongación en función de tiempo, para las distintas velocidades y secciones transversales del axón.

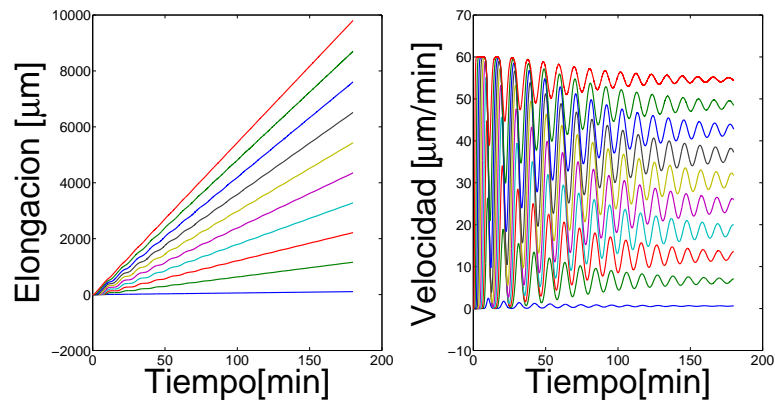
Se aprecia que la elongación total esta relacionada con la velocidad impuesta en el ultimo nodo, pero al realizar una inspección al comportamiento de la velocidad,

esta muestra bastante inestabilidad en algunos casos. En la figura (4.2) se muestra el sistema con constantes elegidas en la zona pasiva y en la figura (4.3) se muestra con constantes elegidas en la zona activa, en ambos casos, el ultimo nodo es estirado a una velocidad de  $1[\mu\text{m}/\text{s}]$  y sección transversal de  $2[\mu\text{m}^2]$ . El comportamiento inestable de la velocidad es característico en este tipo de estímulos, realizados a velocidad constante, una razón para explicar este comportamiento, es la repentina aceleración que sufre el sistema, es por esto que la respuesta del sistema puede ser inestable.



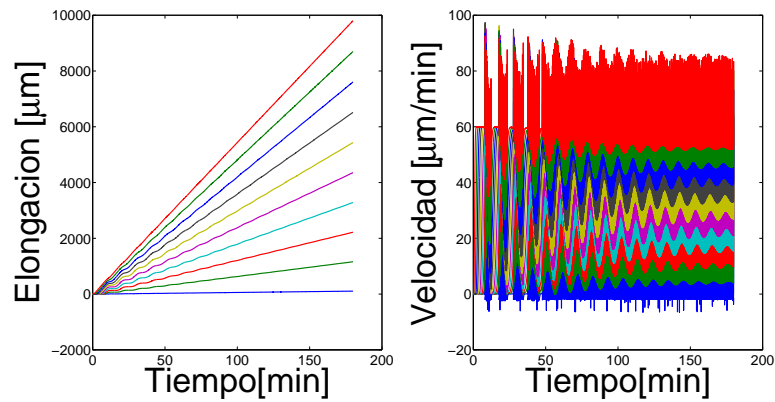
**Figura 4.1:** Elongación total: (A), (B) y (C) con parámetros de la zona pasiva, simuladas con velocidades de  $v_0 = 0,1, 1, 10[\mu\text{m}/\text{s}]$ , respectivamente, y (D), (E) y (F) con parámetros de la zona activa, simuladas con velocidades de  $v_0 = 0,1, 1, 10[\mu\text{m}/\text{s}]$ , respectivamente.

Se ve el comportamiento inestable de la velocidad, una razón que explicaría esto es la aceleración infinita que sufriría el sistema luego del tiempo inicial, como el ultimo nodo se mueve a velocidad constante, este saca del reposo al sistema abruptamente, por lo tanto, la respuesta puede ser inestable. En cuanto a la elongación, en la figura (4.1), se muestra la variación en amplitud respecto a los distintos valores



**Figura 4.2:** Elongación y velocidad en función del tiempo para velocidad  $v_0 = 1 \text{ } [\mu\text{m}/\text{s}]$  con parámetros en zona pasiva.

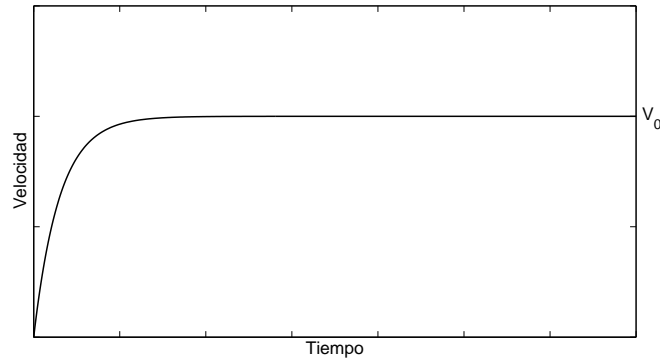
de la sección transversal del axón.



**Figura 4.3:** Elongación y velocidad en función del tiempo para velocidad  $v_0 = 1 \text{ } [\mu\text{m}/\text{s}]$  con parámetros en zona activa.

### Imposición de un perfil de velocidad

Considerando, el comportamiento inestable de los nodos producto de una aceleración repentina, se opta por incluir un perfil de velocidad, para lograr una elongación a velocidad constante. Este perfil de velocidad esta dado por la ecuación (4.1), donde  $v_t$ , corresponde a la velocidad impuesta al ultimo nodo (ver figura 4.4).



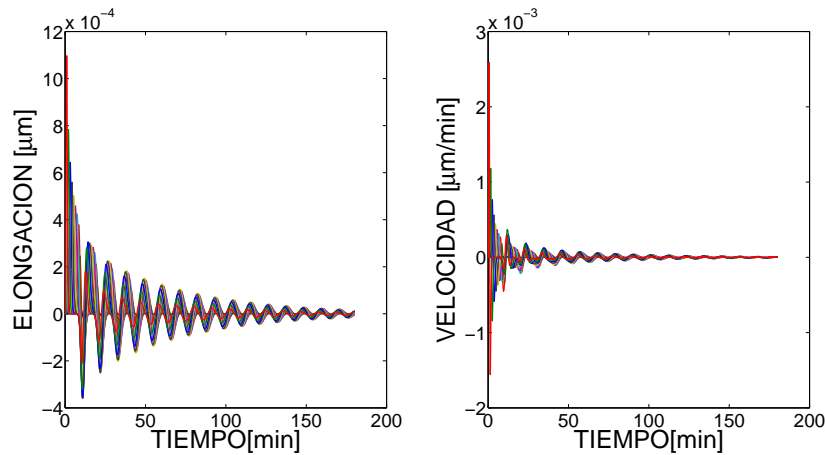
**Figura 4.4:** Perfil de velocidad que sera aplicada al último nodo

$$v(t) = v_0(1 - e^{-\frac{t}{\tau_p}}) \quad (4.1)$$

### Tiempo de relajación

La inestabilidad observada en las curvas de velocidad, en los casos en que se impone una velocidad constante al ultimo nodo, esta relacionada con el tiempo característico ( $\tau_p$ ) presente en el sistema (viscoelástico y respuesta activa). Este problema es resuelto imponiendo el perfil de velocidad (4.4) , resultando en una aceleración monotonicamente decreciente, alcanzando la velocidad de tiro en un tiempo estimado de  $\tau_p \approx 30 [min]$ , este tiempo es calculado desde los datos que se muestran en la figura (4.6), estos datos se obtienen aplicando una excitación finita y espectro plano, al ultimo nodo que se encuentra libre, el comportamiento a este tipo de estímulos se pueden ver en la figura (4.5 ). Encontrado el tiempo



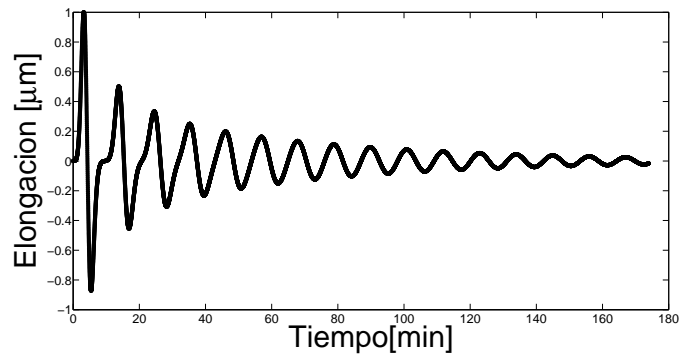


**Figura 4.5:** Estimación del tiempo característico. Elongación y velocidad en función del tiempo para cada nodo, estimulada con velocidad de  $0,1 \text{ } [\mu\text{m}/\text{s}]$  axón de área transversal  $1 \text{ } \mu\text{m}^2$

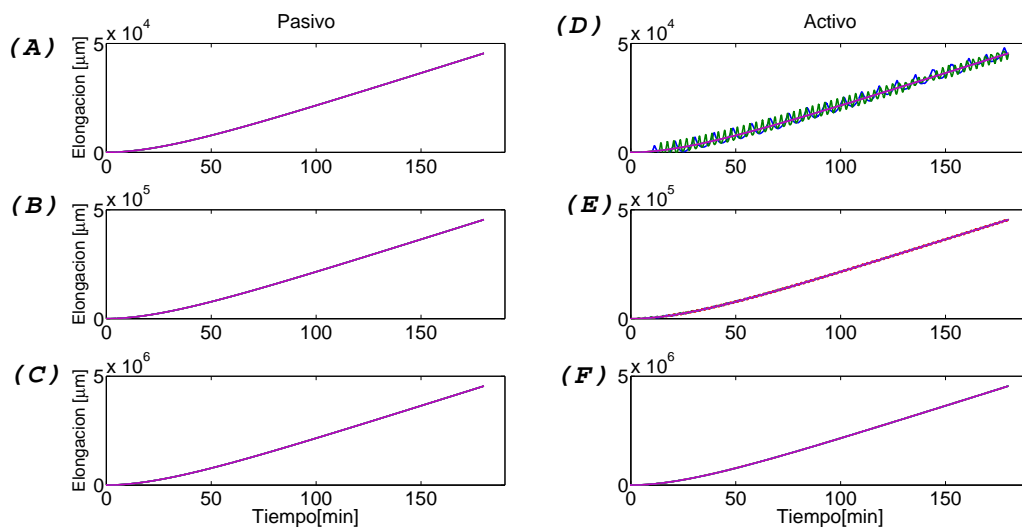
de relajación  $\tau_p$ , las simulaciones que siguieron se realizaron con tiempo dos y tres veces mas grande que el tiempo  $\tau_p$ . En la figura (4.7), (4.8) y (4.9), se muestran las elongaciones para los distintos  $\tau_p$  en los casos pasivos y activos, con variación de la sección transversal de  $1\text{-}5 \text{ } [\mu\text{m}^2]$ .

Observando el comportamiento detenidamente, se aprecia que las velocidades de cada uno de los nodos cambian dependiendo del valor de la sección transversal, en las figuras (4.10), (4.11) y (4.12) se muestra la variación de la elongación y la velocidad en función del tiempo.

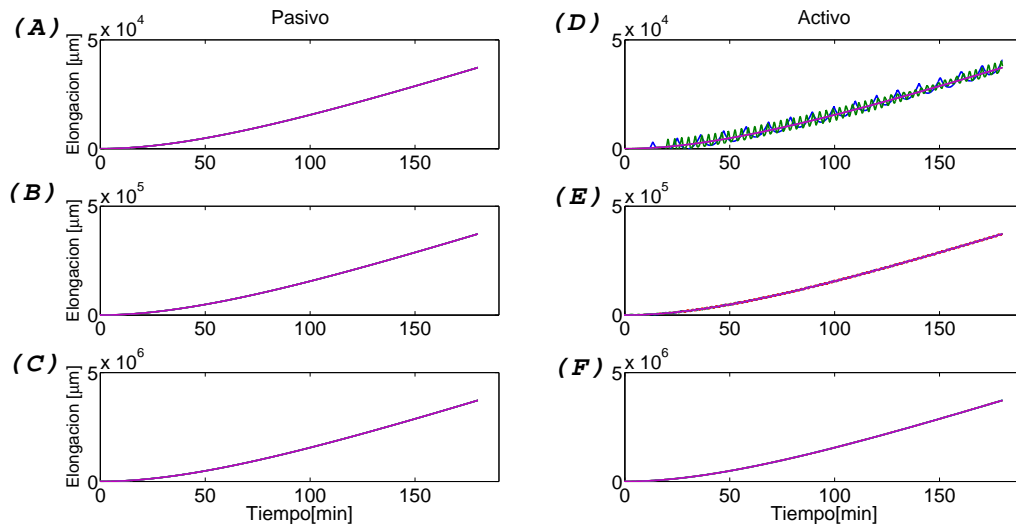
Las simulaciones realizadas, consideraron un tiempo de elongación de  $3 \text{ horas}$ , a mayor velocidad de elongación, mayor debe ser el tiempo característico, para que los nodos no muestren un comportamiento inestable en las velocidades.



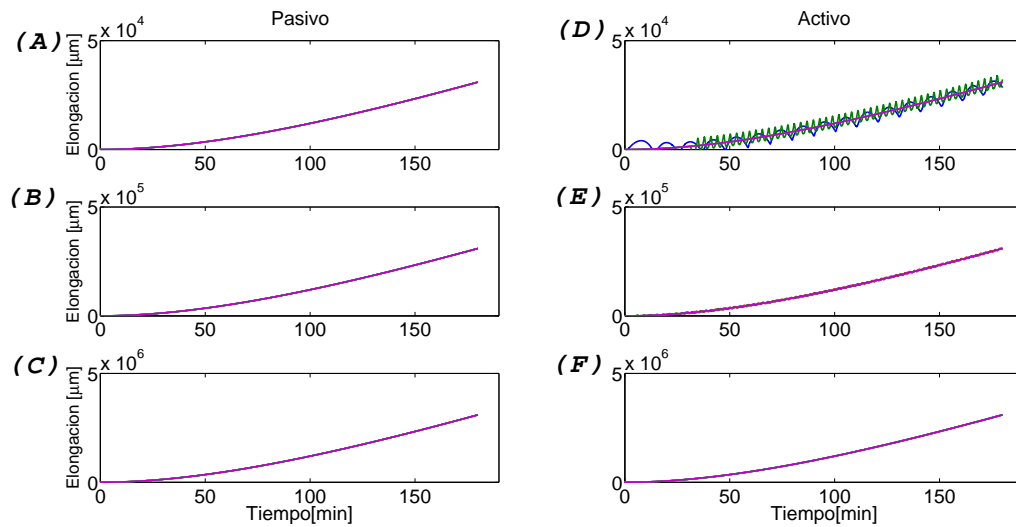
**Figura 4.6:** Elongación normalizada para conocer el tiempo de relajación



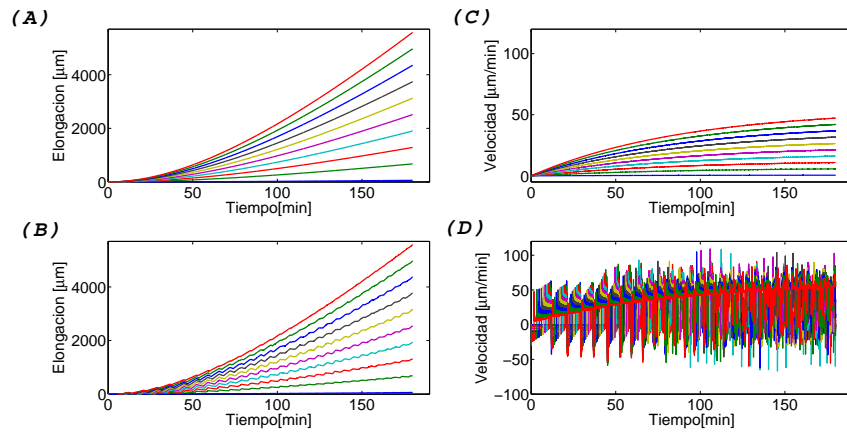
**Figura 4.7:** Elongación con parámetros elegidos en zona pasiva y activa, usando  $\tau = 30 \text{ min}$ . (A) y (D) con velocidad de  $0,1 \mu\text{m/s}$ , (B) y (E) con velocidad de  $1 \mu\text{m/s}$ , (C) y (F) con velocidad de  $10 \mu\text{m/s}$ .



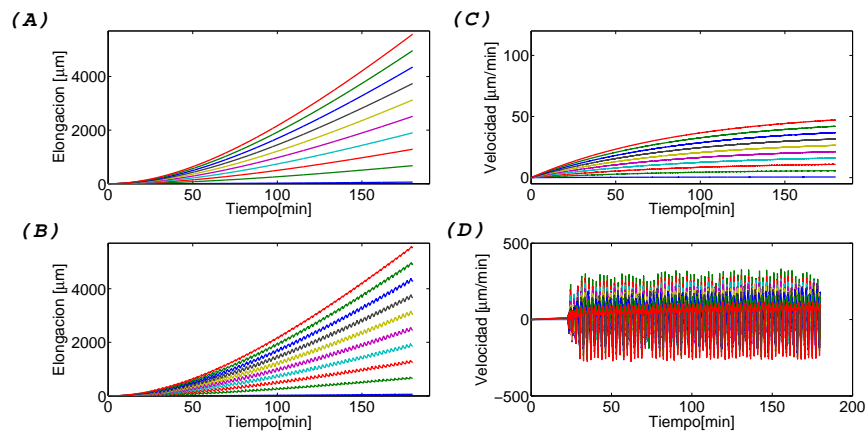
**Figura 4.8:** Elongación con parámetros elegidos en zona pasiva y activa, usando  $\tau = 60 \text{ min}$ . (A) y (D) velocidad de  $0,1 \mu m/s$ , (B) y (E)  $1 \mu m/s$ , (C) y (F) para velocidad  $10 \mu m/s$ .



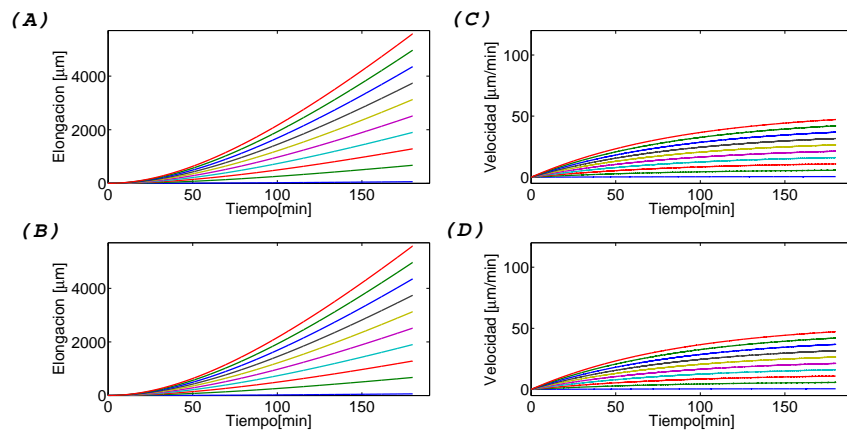
**Figura 4.9:** Elongación con parámetros elegidos en zona pasiva y activa, usando  $\tau = 90 \text{ min}$ . (A) y (D) velocidad de  $0,1 \mu m/s$ , (B) y (E) velocidad de  $1 \mu m/s$ , (C) y (F) para velocidad  $10 \mu m/s$ .



**Figura 4.10:** Comparación de la elongación y velocidad en el tiempo  $v_0$  igual a  $1 [\mu m/s]$  axón de área transversal  $1 [\mu m^2]$ , (A) y (C) con elementos de la zona pasiva, (B) (D) con elementos en zona activa



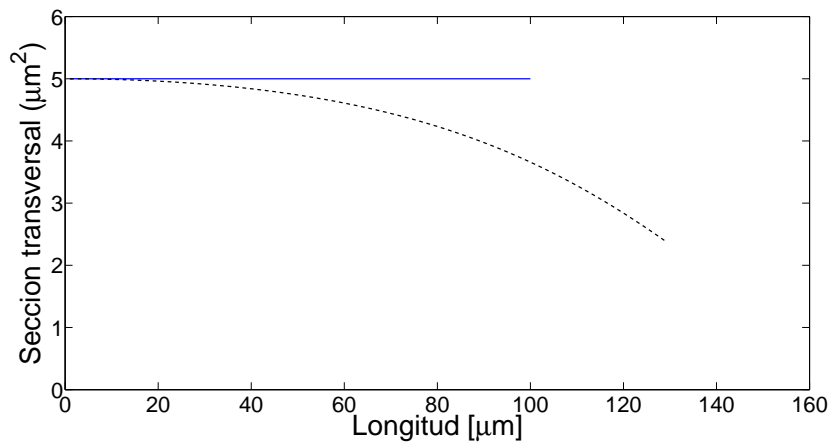
**Figura 4.11:** Comparación de la elongación y velocidad en el tiempo  $v_0$  igual a  $1 [\mu m/s]$  axón de área transversal  $3 [\mu m^2]$ , (A) y (C) con elementos de la zona pasiva, (B) (D) con elementos en zona activa



**Figura 4.12:** Comparación de la elongación y velocidad en el tiempo  $v_0$  igual a  $1 [\mu\text{m}/\text{s}]$  axón de área transversal  $5 [\mu\text{m}^2]$ , (A) y (C) con elementos de la zona pasiva, (B) (D) con elementos en zona activa

### Comparación de áreas

Basándonos en el trabajo [6], utilizaremos el código para comparar la variación de la longitud de las simulaciones con la variación de las áreas en el tiempo. En la figura 4.13 se muestra en línea azul el largo inicial del axón de  $100 \mu m$  pasada 3 horas de elongación con una fuerza de  $100 \mu dinas$  el largo final llega a ser de  $129,09 \mu m$ . El comportamiento que se ve en la figura 4.15, es el que gobierna a todas las



**Figura 4.13:** Simulación de elongación con fuerza de  $100 \mu dinas$  y largo inicial de  $100 \mu m$ . Línea azul indica el largo inicial y línea segmentada corresponde al largo final con área inicial de  $5 \mu m^2$ , elongado por 3 horas.

simulaciones realizadas con el código propuesto. El área cambia abruptamente, en términos simple, este tipo de comportamiento no es compatible para la elongación del axón, ya que en pocos minutos se obtiene un área cercana cero.

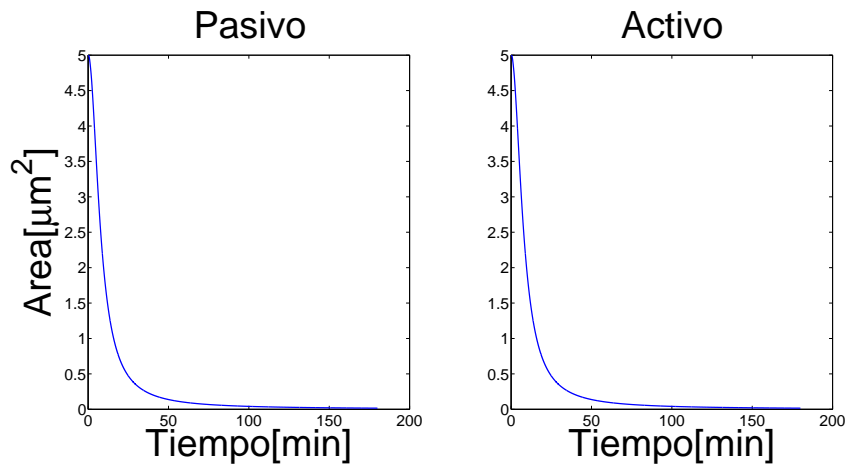


Figura 4.14: Simulación para axones elongados con  $v_0 = 1 \mu\text{m}^2$  elongado por 3 horas.

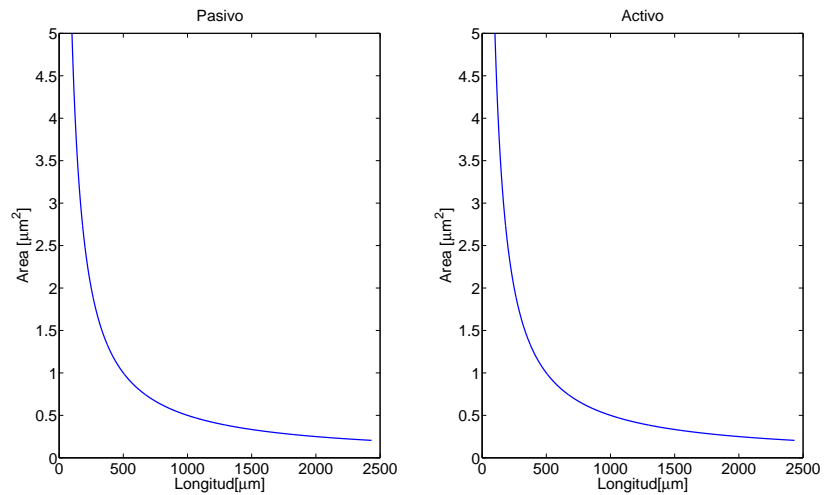


Figura 4.15: Área en función de la longitud, utilizando el código propuesto.

## 4.2. Conclusión

Las razones al cambio del modelo propuesto se basan en la posibilidad de poder solucionar la ecuación diferencial. En el modelo propuesto (figura 2.9) se presenta una ecuación diferencial que no tiene solución analítica conocida, ya que es, una ecuación trascendental, por lo tanto, en el transcurso del trabajo, se propone utilizar un modelo mas simple, el cual puede ser resuelto a través de métodos numéricos convencionales. No obstante, se presenta la dificultad de considerar un sistema con masa, a pesar de que la inercia de los axones no afecta al proceso de elongación, en términos de solución numérica, es necesario considerarla.

A pesar del cambio del modelo original, el nuevo modelo que se sugiere (figura ??), describe el comportamiento del axón utilizando elementos clásicos como, resorte y amortiguador, elementos que también fueron incluidos en las primeras trabajos de investigación sobre elongación axonal [1] [7], pero además el modelo incluye la respuesta mecánica de los motores moleculares. Es por esto que el código computacional realizado es capaz de simular situaciones experimentales conocidas, considerando los valores de los parámetros desde trabajos de investigación [9], donde se conoce un comportamiento pasivo y activo, en el proceso de elongación del axón. En este trabajo, las simulaciones se realizaron considerando la elongación por medio de la imposición de una velocidad constante. El valor de esta velocidad, al igual que los valores de los otros parámetros, es conocido por medio de datos experimentales[1], [7],[9], donde el rango de velocidades utilizadas es de  $0.1-1 [\mu m/s]$ .

Como se menciona anteriormente la solución de la ecuación diferencial sugiere la incorporación de la masa del axón, esta masa con los datos experimentales conocidos es del orden de  $m \approx 10^{-12} [Kg]$ , al considerar masa de este orden de magnitud y comparando este valor con los valores de los otros parámetros, la diferencia en ordenes de magnitud es de un factor  $10^{-8}$ , lo cual trae consigo, un gran costo numérico, es por esto que el valor de la masa que se utiliza en las simulaciones, es del orden de  $m \approx 10^{-4} [Kg]$ , esta elección de la masa, se realiza comparando la solu-



ción numérica con la solución analítica de un modelo mas simple (3.7), y calculando el error relativo de estas soluciones que es de menos del 1 %, además, de esto la elección del valor la masa, esta dominado por el tiempo que toma el calculo en ser realizado.

Con la elección de los parámetros, la elongación del axón se realiza con una velocidad constante, sin embargo, el código de simulación es susceptible a inestabilidades numéricas que se originan por la respuesta del sistema a cambios de velocidad de tipo escalón, es por esto que se sugiere, lograr esta elongación por medio de una velocidad constante a través de la imposición un perfil de velocidad, que logra llegar a una velocidad constante pero de una manera mas suave, evitan inestabilidades del sistema.

De los resultados, utilizando el perfil de velocidad, se observa que en todos los casos se producen elongaciones, la diferencia esta en el comportamiento de las velocidades de los nodos. En el caso de la selección de los elementos en la zona activa, el comportamiento de la velocidad de los nodos a lo largo del axón muestra zonas con velocidades positivas, que se traducen en elongación y de velocidades negativas, interpretadas como contracciones. Si bien, los estados de elongación y contracción a lo largo del axon dependen de los parametros utilizados, aun son necesarias realizar mas simulaciones para estudiar, por ejemplo, la separación carateristica de zonas de dilatación-contracción Otro punto a considerar, es el cambio de la sección transversal del axón, en el tiempo. Utilizando el código computacional del trabajo de investigación [6] y la elongación del axón desde el código propuesto, deduce que la constante de viscosidad que se utiliza en este trabajo, esta relacionada solo con una viscosidad de elongación, es por esto que el valor de la sección transversal cae abruptamente como se muestran en la figura (4.15), a diferencial del cambio del valor de la sección transversal visto en la figura (4.13), ya que en esas simulaciones están presente dos tipos de viscosidades, una de elongación ( $G$ ) y otra transversal ( $\eta$ ).

# Bibliografía

- [1] Bray D. Axonal growth in response to experimentally applied mechanical tension. *Developmental biology*, 102:379–389, 1984.
- [2] R. E. Buxbaum P. Lamoureux and S. R. Heidemann. Direct evidence that growth cones pull. *Nature*, 340:159–162, 1989.
- [3] Robert E. Buxbaum Steven R. Heidemann Timothy J. Dennerll, Phillip Lamoureux. The cytomechanics of axonal elongation and retraction. *the Journal of Cell Biology*, 109:3073–3083, 1989.
- [4] Jason H Huang, Eric L Zager, Jun Zhang, Robert F Groff, Bryan J Pfister, Akiva S Cohen, M Sean Grady, Eileen Maloney-Wilensky, and Douglas H Smith. Harvested human neurons engineered as live nervous tissue constructs: implications for transplantation. laboratory investigation. *J. Neurosurg.*, 108(2):343–7, 2008.
- [5] Bryan J Pfister, David P Bonislawski, Douglas H Smith, and Akiva S Cohen. Stretch-grown axons retain the ability to transmit active electrical signals. *FEBS Lett.*, 580(14):3525–31, 2006.
- [6] Matthew O’Toole, Phillip Lamoureux, and Kyle E Miller. A physical model of axonal elongation: force, viscosity, and adhesions govern the mode of outgrowth. *Biophys. J.*, 94(7):2610–20, 2008.

- [7] Joshi H.C. Dennerll T.J. Tension and compression in the cytoskeleton of pc-12 neurites ii:quantitative measurements. *the journal of cell biology*, 107:665–674, 1988.
- [8] P. Pullarkat R.Bernal, F.Melo. Drag force as a tool to test the active mechanical response of pc12 neurite. *Biophysical Journal*, 98, 2010.
- [9] F. Melo R.Bernal, Pramod A. Pullarkat. Mechanical properties of axons.
- [10] Long-termsurvival. *Long-Term Survival and Integration of Transplanted Engineered nervous Tissue Constructs Promotes Peripheral Nerve Regeneration*, 15, 2009.
- [11] Bryan J Pfister, Akira Iwata, Andrew G Taylor, John A Wolf, David F Meaney, and Douglas H Smith. Development of transplantable nervous tissue constructs comprised of stretch-grown axons. *J. Neurosci. Methods*, 153(1):95–103, 2006.