

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIA
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

FUERZAS CELULARES

ROBERTO ALEXANDER BERNAL VALENZUELA

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIA
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

FUERZAS CELULARES

ROBERTO ALEXANDER BERNAL VALENZUELA

Profesor Guía: Dr. Francisco Melo

Profesores Comisión: Dr. Enrique Cerda
Dr. Francisco Claro
Dr. Bernardo Morales
Dr. Nicolás Mujica

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN FÍSICA

SANTIAGO DE CHILE

ABRIL 2006

“FUERZAS CELULARES”

Trabajo de Graduación presentado a la Facultad de Ciencia, en cumplimiento parcial de los requerimientos exigidos para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Física.

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE

SANTIAGO DE CHILE

ABRIL 2006

“FUERZAS CELULARES”

ROBERTO ALEXANDER BERNAL VALENZUELA

Este trabajo de Graduación fue preparado bajo la supervisión del profesor guía Dr. Francisco Melo H., del Departamento de Física y ha sido aprobado por los miembros de la comisión calificadora, del candidato Dr. Enrique Cerda, Dr. Francisco Claro, Dr. Bernardo Morales y Dr. Nicolás Mujica.

.....

.....

.....

.....

.....

Profesor Guía

.....

Director

Agradecimientos

Todo niño es retado por el mundo a entrar en un juego de exploración, descubrimiento y comprensión. Este desafío es aceptado con la energía propia de nuestra infancia que, insaciable por saber, nos lleva a ensuciarnos las manos jugando en el patio de un amigo, rompiendo, desarmando y arreglando juguetes viejos para entender ¿Cómo se mueve?, ¿Cómo flota?, ¿Cómo se enciende?, ¿Porqué no cae?, ¿Porqué?, ¿Porqué?.

Esta increíble sed de información empieza a ser saciada en el transcurso de nuestra niñez con rutinarias salas de clases, la sed se va agotando en nuestra adolescencia con las inquietudes propias de este difícil período de nuestras vidas, y se extingue en nuestra vida como adultos absorbidos por una sociedad que busca en nosotros individuos productores de bienes y servicios.

Es por esto que debo dar las gracias a mis amigos Victor Apablaza y Claudio Fuentes con quienes compartí largas horas de estudio, a Leonardo Caballero, Enrique Cerda, L. Eugenio Hamm, Jorge Pavez y Francisco Vivanco por su amistad y ayuda en el transcurso de mi desarrollo en nuestro departamento, a Erika Inostroza, Chantal Tassius y Valérie Vidal incondicionales amigas que me brindaron su apoyo en los momentos en que lo necesité, a Rodrigo Gonzalez, Manuel Meza y Nelson Flores por su ayuda en la implementación de mis experimentos y por las continuas carcajadas que supieron arrancar de mí, a todos los profesores que se involucraron en mi educación en el transcurso de los años, a los alumnos y funcionarios por hacer más grata mi vida en la universidad, en especial a mi amigo y tutor Francisco Melo por sus enseñanzas y la motivación que inculcó en mí por la investigación, y a mis hijos por darme la oportunidad de vivir a través de sus vidas una segunda mirada a mi niñez. A todos ustedes gracias, por mantener vivo en mí, la curiosidad de un niño que no quiere dejar de preguntar.

Agradezco de igual manera al Doctor Eugenio Spencer, Teresa Castillo, al Doctor Bernardo Morales y Carlos Rozas de la Universidad de Santiago de Chile, a Francisca Bronfman, Soledad Urra, Fernanda Lisbona y Claudia Escudero de la Pontificia Universidad Católica de Chile, y de forma muy especial a las personas que trabajan en el laboratorio del profesor Albrecht Ott y a Pramod Pullarkat de la Universidad de Bayreuth-Alemania, por su ayuda, consejos e iniciación de mi trabajo en la hermosa interface de la BioFísica.

Finalmente, doy las gracias a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnología CONICYT, por su apoyo mediante su programa de becas de doctorado, Al programa MECESUP a través del proyecto USA9903 por su iniciativa de estancias de investigación en laboratorio extranjeros y a la Dirección de Graduados de nuestra universidad.

Resumen

La primera parte de esta tesis está dirigida al estudio de las propiedades elásticas de membranas biocompatibles con células para su uso en la medición de fuerzas celulares. Se presentan métodos para la medición de espesor de membranas, su constante de rigidez y su tensión residual. Adicionalmente, se desarrollan dispositivos que permiten la medición del campo total de arrugas de la membrana, indispensable para la determinación del campo de fuerzas introducido por la célula.

La segunda parte se concentra en el estudio de la respuesta mecánica de un axón, tratado aquí como modelo unidimensional de una célula, bajo una fuerza externa. La modelación de la respuesta mecánica esta basada en la representación del axón como una cuerda homogénea, con una constante de restitución acoplada en serie con un elemento disipativo y una segunda constante elástica. A este modelo le hemos incluido la acción de los motores moleculares como un ingrediente indispensable que permite capturar los estados de contracción y variados comportamientos dinámicos presentes en el axón .

J-Ch. Géminard, R. Bernal and Francisco Melo, Wrinkle Formation in axi-symmetrically stretched membranes, *Eur. Phys. J. E.* (2004), vol. 15, pp. 117.

R. Bernal, C. Tassius, J-Ch. Géminard and F. Melo, Wrinkles Formation in Semi-Spherical Membranes, to be submitted in *The European Physical Journal E*.

R. Bernal, C. Tassius, J-Ch. Géminard and F. Melo, Mechanical characterization of elastic membranes: cell mechanics applications, to be submitted in *Applied Physics Letters*.

R. Bernal, F. Melo and P. Pullarkat, Mechanical Behavior of PC-12 Neurites, to be submitted in *PNAS*.

Índice general

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducción | 12 |
| 2. Medición de Fuerzas Celulares | 18 |
| 2.1. Tensión superficial de fluidos poliméricos | 19 |
| 2.2. Propiedades de las membranas poliméricas | 21 |
| 2.2.1. Medición del espesor de membrana | 21 |
| 2.2.2. Módulo elástico de membranas poliméricas | 23 |
| 2.3. Pliegues en membranas semi esféricas | 27 |
| 2.3.1. Montaje experimental | 27 |
| 2.3.2. Resultados | 29 |
| 2.4. Generación de pliegues por la acción de fuerzas celulares | 33 |
| 2.4.1. Montaje experimental | 34 |
| 2.4.2. Medición del campo de pliegues | 35 |
| 2.4.3. Condiciones de borde experimentales | 39 |
| 2.5. Conclusiones | 42 |
| 3. Propiedades Mecánicas de Axones | 43 |
| 3.1. Respuesta mecánica de un axón | 46 |
| 3.2. Montaje experimental | 53 |
| 3.3. Mediciones de Fuerza y Elongación | 54 |
| 3.3.1. Medición de la fuerza aplicada | 54 |
| 3.3.2. Medición de la elongación | 55 |
| 3.4. Resultados: Respuesta elástica | 58 |
| 3.5. Resultados: Comportamiento viscoelástico o Pasivo | 62 |
| 3.6. Resultados: Comportamiento Activo | 67 |

| | |
|--|------------|
| 3.7. Conclusiones | 75 |
| 4. Axón bajo un flujo laminar | 77 |
| 4.1. Ecuaciones de equilibrio | 77 |
| 4.2. Montaje experimental | 82 |
| 4.3. Medición de la fuerza y Elongación | 82 |
| 4.3.1. Medición de Fuerzas | 82 |
| 4.3.2. Medición de la Elongación | 83 |
| 4.4. Resultados | 83 |
| 4.5. Conclusiones | 87 |
| 5. Conclusiones generales | 90 |
| A. Caracterización de microagujas | 92 |
| A.1. Deformación de Barras | 92 |
| A.1.1. Barra prismática bajo una carga puntual | 92 |
| A.1.2. Barra prismática bajo una carga homogénea | 94 |
| A.1.3. Deflexión de un tubo cónico: aplicación en fluidos | 94 |
| A.2. Respuesta en frecuencia de una microaguja | 99 |
| B. Protocolos de Preparación y Cultivo Celular | 101 |
| B.1. Cultivo de células PC-12 | 101 |
| B.1.1. Preparación de Medio, Colágeno y Nerve Growth Factor (NGF) | 101 |
| B.1.2. Cultivo regular | 102 |
| B.1.3. Cultivo de células en coverslips | 102 |
| B.2. Cultivo de células PH y 3T3 | 104 |
| B.2.1. Preparación de Medio | 104 |
| B.2.2. Cultivo regular | 105 |
| C. Publicaciones | 106 |
| C.1. Wrinkle Formations in Axi-Symmetrically Stretched Membranes | 107 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| 1.1. Fuerzas celulares | 14 |
| 1.2. Comportamiento mecánico de células | 16 |
| 2.1. Fenómenos capilares | 19 |
| 2.2. Medición de la tensión de superficie | 20 |
| 2.3. Recuperación de la membrana | 21 |
| 2.4. Medición del espesor de una membrana de silicona | 22 |
| 2.5. Definición de coordenadas en el capilar | 24 |
| 2.6. Medición del módulo elástico de una membrana | 25 |
| 2.7. Deformación de una membrana semi esférica | 27 |
| 2.8. Diagrama experimental de la deflexión de una membrana | 28 |
| 2.9. Formación de pliegues en membranas semi esféricas | 29 |
| 2.10. Respuesta de una membrana semi esférica ante una fuerza puntual . . . | 30 |
| 2.11. Cambio de curvatura de la membrana en función de la deflexión de la membrana | 31 |
| 2.12. Inestabilidad de pliegues | 32 |
| 2.13. Valores críticos de la formación de pliegues en función del radio de cur- vatura inicial | 33 |
| 2.14. Pliegues por efecto de fuerzas celulares | 34 |
| 2.15. Fabricación de membranas elásticas | 35 |
| 2.16. Interferómetro Linnux | 36 |
| 2.17. Preparación de las células en sustratos elásticos | 37 |
| 2.18. Mapa de la amplitud de pliegues | 38 |
| 2.19. Contracción radial de un fibroblasto y comparación con un experimento modelo | 39 |

| | |
|--|----|
| 2.20. Perfil de un fibroblasto | 40 |
| 2.21. Ángulo de contacto de membranas | 41 |
| 3.1. Estructura interna básica de un axón | 44 |
| 3.2. Modelo de potencial asimétrico de dos estados para un motor molecular | 45 |
| 3.3. Tipos de motores moleculares en un axón | 45 |
| 3.4. Esquema de la medición de la respuesta elástica | 46 |
| 3.5. Modelos de respuesta mecánica para un axón | 49 |
| 3.6. Modelación de la respuesta mecánica de los motores moleculares | 49 |
| 3.7. Esquema de la medición de la respuesta mecánica a tiempos largos | 50 |
| 3.8. Esquema básico del test mecánico | 53 |
| 3.9. Montaje experimental | 54 |
| 3.10. Calibración de microagujas | 55 |
| 3.11. Esquema de la deformación de una cuerda | 55 |
| 3.12. Test mecánico de una neurita de una célula PC-12 | 57 |
| 3.13. Ángulo de equilibrio y Fuerza experimentada por varios axones | 59 |
| 3.14. Constante de axones de células PC-12 | 60 |
| 3.15. Tensión inicial de células PC-12 | 61 |
| 3.16. Comportamiento Pasivo | 62 |
| 3.17. Elongación viscoelástica | 63 |
| 3.18. Esquema de medición de γ | 64 |
| 3.19. Fricción interna | 65 |
| 3.20. Origen de la fricción interna en una célula | 65 |
| 3.21. Comportamiento Activo | 67 |
| 3.22. Elongación-Contracción viscoelástica | 68 |
| 3.23. Amplitud de la respuesta Gaussiana | 71 |
| 3.24. Ancho de la respuesta Gaussiana vs sección transversal del axón. | 72 |
| 3.25. Constante elástica interna del axon | 72 |
| 3.26. Competición entre γ y T_a/v | 73 |
| 3.27. Transición entre estados estables | 74 |
| 3.28. Transición entre régimen pasivo/activo | 74 |
| 4.1. El axón como catenaria | 78 |
| 4.2. Deformación de un axón ante una fuerza viscosa | 80 |

| | |
|--|-----|
| 4.3. Celda de flujo laminar | 82 |
| 4.4. Tensión constante ante incrementos de la fuerza viscosa | 85 |
| 4.5. Respuesta pasiva bajo un flujo constante | 88 |
| 4.6. Respuesta Activa bajo un flujo constante | 88 |
| 4.7. Oscilaciones bajo un flujo constante | 89 |
| 4.8. Oscilaciones bajo un flujo constante | 89 |
| A.1. Barra bajo una carga puntual | 93 |
| A.2. Esquema de un tubo cónico empotrado | 94 |
| A.3. Esquema de la cámara de fluido, asumiendo un flujo laminar | 96 |
| A.4. Deflexión de microaguja bajo una carga constante | 97 |
| A.5. Perfiles de velocidad | 97 |
| A.6. Medición de la fuerza viscosa | 98 |
| A.7. Esquema experimental de la función respuesta de la microaguja | 99 |
| A.8. Función respuesta experimental | 100 |

Capítulo 1

Introducción

El interés por conocer los mecanismos de funcionamiento y propiedades generales de sistemas autoorganizados ha impulsado a la comunidad científica a explorar una diversidad de sistemas que presentan propiedades físicas únicas. Podemos decir que existe un área incipiente de la Física que consiste en dar una mirada de físico a problemas tradicionalmente abordados por la Biología; se trata de la Física motivada por la Biología.

Dentro de esta categoría de problemas, podemos encontrar el estudio de propiedades mecánicas de moléculas biológicas, tales como, el DNA, o las proteínas, por varios métodos que van desde las pinzas ópticas, trampas magnéticas, hasta espectroscopía de fuerza atómica. También las propiedades físicas de biomateriales constituyen un campo reciente de investigación desde la perspectiva de la Física. Por ejemplo, las propiedades mecánicas de telas de arañas o conchas de animales marinos milenarios, que resultan de la combinación de materiales orgánicos tradicionales con matrices biológicas, son la sana envidia de cualquier ingeniero que busque crear materiales con tales resistencias a la fractura.

Est bien aceptado que estos singulares sistemas son el resultado de la aplicación de las leyes más fundamentales de la naturaleza, cuyos mecanismos han sido optimizados durante millones de años. Naturalmente, su desarrollo ha estado basado en dichas leyes y, en consecuencia, pueden ser estudiados desde el punto de vista reduccionista de la física. Sin embargo, esta simplificación, que nos ha permitido comprender cada efecto por separado en el lenguaje estricto de las matemáticas durante los últimos siglos, se ve limitada al intentar una descripción general de un sistema autosostenido y

autoorganizado de tal complejidad.

Desde el punto de vista de la Física, lo natural es someter al sistema de interés a variados estímulos y revelar su respuesta. Aquí sólo nos limitaremos a comentar sobre la respuesta mecánica de los sistemas elegidos. La tarea que nos hemos fijado es diseñar experimentos que ubiquen a los sistemas bajo estudio en condiciones susceptibles de ser analizados sin ambigüedad, por cierto como veremos, esto no sería posible sin el desarrollo de nuevos métodos de medición.

Uno de los problemas abiertos y que atrae nuestro interés, es la fuerza que ejerce una célula viva al desplazarse sobre un sustrato, así como el mecanismo y las fuerzas responsables de la división celular. El problema remonta a la década de los años 80 cuando surgieron innovadores métodos que abrieron la posibilidad de medir las fuerzas a la escala celular. Estos métodos están basados en las deformaciones de membranas elásticas creadas a partir de la vulcanización de aceites poliméricos[3]. La idea es determinar la geometría de los pliegues generados en una membrana elástica por la aplicación de fuerza por parte de la célula[1][2]. Más precisamente, el patrón de pliegues presentes en la membrana es el resultado de la distribución de fuerzas de adhesión que le permite a la célula desplazarse (figura 1.1 *izquierda*). Aquí, la utilización de microagujas calibradas ha sido esencial para relacionar la longitud de los pliegues, cantidad que efectivamente se mide, con la fuerza aplicada que es del orden de decenas de nano Newtons. Sin embargo, a nuestro juicio, dada la naturaleza no lineal de las ecuaciones que representan la deformación de una membrana, la longitud de los pliegues no puede ser expresada como una función lineal de la fuerza aplicada. La alternativa para la medición del campo de fuerza es una determinación del campo de deflexión vertical de la membrana, para lo cual hemos desarrollado un método óptico original en el capítulo 2.

Métodos más recientes, basados en la medición de la deformación de un sustrato elástico, han permitido determinar de manera más precisa la distribución de fuerzas generadas por una célula es su movimiento. Utilizando partículas de latex[4] adheridas aleatoriamente a la membrana o marcas realizadas mediante técnicas de *soft lithography*[5], se ha logrado inferir el campo de deformación y de tensión de las membranas (figura 1.1 *derecha*). Nuevamente el uso de microagujas ha servido para determinar las propiedades elásticas de estos sustratos inferidas del campo de deformación a partir de los desplazamientos de las marcas en la superficie del sustrato.

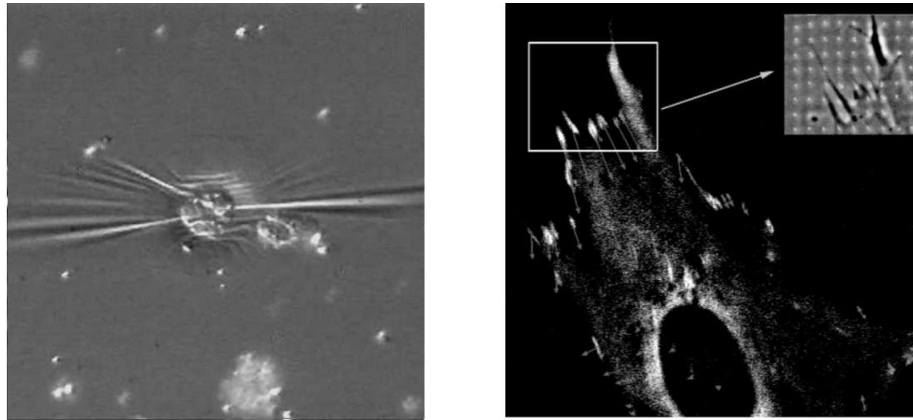


Figura 1.1: (*izquierda*) Pliegues de una membrana de Silicona generados por un fibroblasto contrayéndose radialmente. (*derecha*) Deformación de un sustrato de PDMS marcado utilizando SU-8 photoresist. Las flechas indican la magnitud y dirección de las fuerzas de adhesión [5]

Estos novedosos experimentos, sin embargo, están sujetos a complicaciones de origen técnico. Las aproximaciones que han permitido inferir las fuerzas a esta escala, se encuentran limitadas no sólo por la determinación de las propiedades de membranas y sustratos elásticos, además debemos incluir el efecto de las condiciones de borde de estos tests mecánicos. En el caso de las membranas elásticas, por ejemplo, las condiciones de borde influyen dramáticamente en la medición de las fuerzas celulares a partir de la longitud de los pliegues y el método se vuelve insensible en el caso de existir una tensión inicial en la membrana demasiado grande. Como recientemente hemos reportado en [8], la generación de pliegues muestra ser el resultado de una inestabilidad supercrítica, en la cual el número de pliegues y su largo son cantidades prácticamente independientes de la fuerza aplicada.

En esta tesis, proponemos una alternativa a estos métodos. En efecto, la determinación de la amplitud de los pliegues de la membrana permitirá, a nuestro juicio, desarrollar un método más sensible de caracterización de las fuerzas. Con nuestro método, la medición de la amplitud de deformación se realiza por medio de un microscopio interferométrico que hemos desarrollado basados en un interferómetro Linnux. Además, presentamos métodos propios de medición para la determinación de las propiedades elásticas de las membranas usadas y, más importante, las condiciones de borde

a las que están sometidas estas membranas. Sin embargo, estos métodos de medición no han contestado una pregunta de fondo: ¿Cuáles son las propiedades que regulan el comportamiento mecánico de una célula?.

Una propiedad que da cuenta parcialmente de este problema es la adhesión de una célula a un sustrato rígido, la que depende de las propiedades químicas del sustrato en cuestión. Por ejemplo, en la figura 1.2 células obtenidas del riñón de rata (fibroblastos 3T3) fueron depositados en un caso sobre una lámina de vidrio limpia y en el otro sobre una lámina de vidrio tratada previamente con metil-silano hidrofóbico. El resultado, desde un punto de vista físico, es dinámicamente distinto. En el primer caso, el fibroblasto se extendió sobre la superficie hasta una situación de equilibrio en que el área de contacto permanece constante. En el segundo caso, el área de contacto mostró una frecuencia de oscilación durante todo el experimento. Estos comportamientos están regulados por las mismas propiedades mecánicas cuyas respuestas dependen de los estímulos físico-químicos que han recibido de los distintos sustratos.

En sistemas tan complejos como el que acabamos de describir, es difícil imaginar una modelización de todas las interacciones que tienen lugar en el interior de una célula, aunque muchas han sido descritas con éxito como resultado de la dinámica de polimerización de filamentos de actina o microtubulos y su interacción con un grupo específico de proteínas denominadas motores moleculares. Es necesario entonces realizar una descripción más simple que considere sólo las interacciones más importantes que ocurren en la célula y así avanzar en la descripción del comportamiento global de ésta. Por esta razón, utilizaremos como modelo de comportamiento mecánico las prolongaciones de células especializadas como las neuronas (estas prolongaciones reciben el nombre de neuritas o axones, en el caso de las neuronas) ya que en su interior se encuentran todas las estructuras presentes en una célula y, dada su geometría, poseen la ventaja de poder ser modelizadas como un problema unidimensional.

Nuestros experimentos están basados en investigaciones realizadas inicialmente en axones por Lamoureux[14] y Dennerll[15], en cuyos trabajos se ha concluído que bajo ciertas condiciones un axón se comporta como una cuerda viscoelástica, es decir, ante una fuerza externa, el axón incrementa su longitud para relajar la tensión aplicada. Sin embargo, un axón puede presentar un comportamiento contrario a la intuición; cuando los extremos de un axón se encuentran fijos, éste puede disminuir su longitud, registrando tensiones relativamente elevadas. Este comportamiento, bautizado como

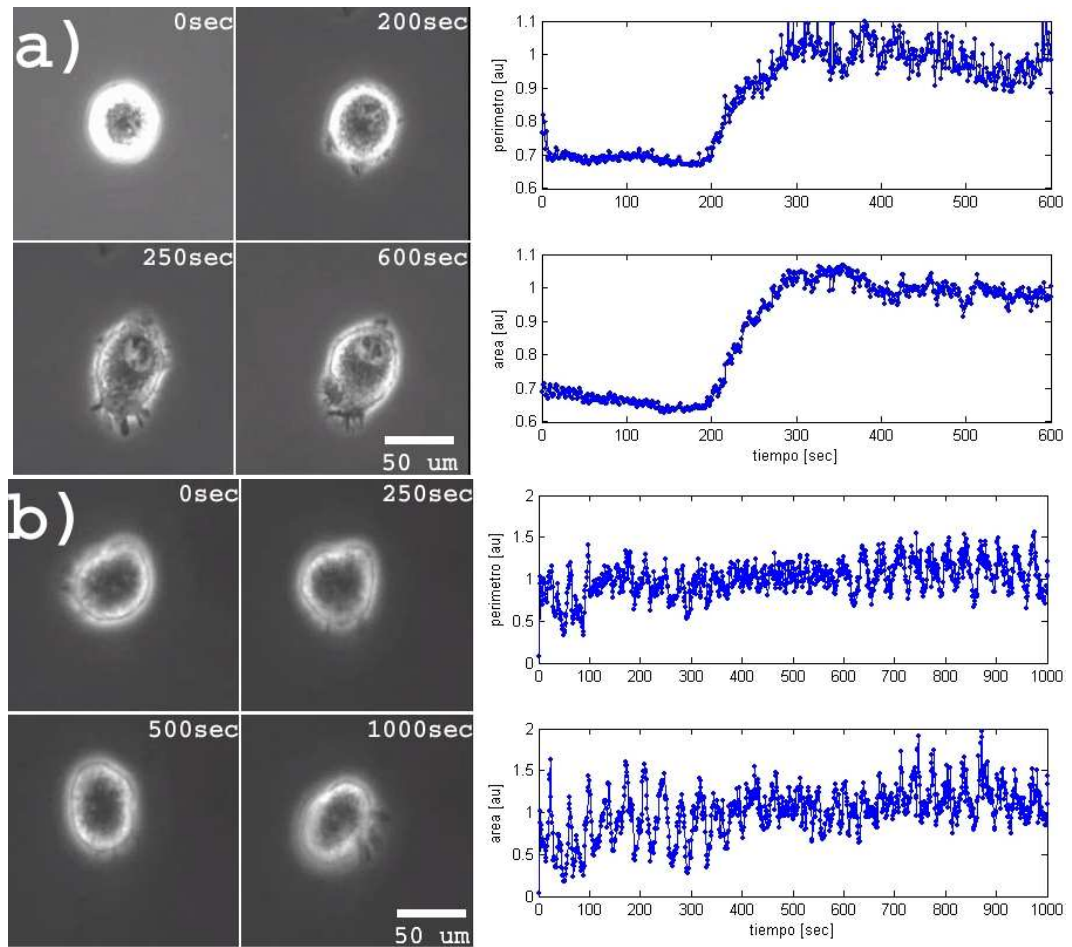


Figura 1.2: (a) Mojado de la superficie de vidrio por una célula, con un tiempo de relajación de 50 segundos, (b) Superficie de vidrio tratada con metil-silano. Se observan oscilaciones del perímetro/área de la célula, con un tiempo característico de 20 segundos.

comportamiento activo, puede ser descrito si se incluye correctamente la acción de los motores moleculares en la representación mecánica del axón.

Describimos a continuación la organización de esta tesis. En el capítulo 2 se presenta un método, basado en la formación de arrugas en membranas elásticas, para medir campos de fuerzas aplicadas por células vivas. Dadas las exigencias técnicas de este método, este capítulo está enfocado a la determinación de las propiedades mecánicas de membranas, cruciales para la aplicación cuantitativa del método. Adicionalmente, se desarrolla una técnica óptica para la medición de la amplitud de las arrugas, cantidad que tiene la potencialidad de describir el campo de fuerzas aplicado a la membrana. En anexo, se presenta un trabajo completo sobre la formación de arrugas producidas por un objeto que se contrae. Este estudio permite establecer con claridad que medidas anteriores de fuerzas en células vivas, realizadas por la simple caracterización de la longitud de los pliegues sólo pueden ser consideradas como cualitativas.

El capítulo 3, corazón de esta tesis, está enteramente dedicado a la medición de fuerzas y propiedades mecánicas de axones por medio de las técnicas de microagujas flexibles. Se describen primero las propiedades elásticas más simples de axones, tales como su módulo de Young y su coeficiente de fricción viscosa. En situaciones muy frecuentes, sin embargo, los axones después de una etapa de estiramiento pasivo o plástico, exhiben una contracción notoria, identificada como comportamiento activo. Para la descripción de estos fenómenos introducimos un modelo simplificado que toma cuenta de los motores moleculares y su fricción interna. Con ésto, algunos axones pueden presentar oscilaciones de relajación propios de una curva de respuesta mecánica con sensibilidad negativa; la transición alargamiento-contracción se describe naturalmente en este marco. El capítulo 4 es complementario al anterior, estando dirigido al desarrollo de nuevos métodos de medición de propiedades de axones. En particular, se presentan mediciones de comportamiento dinámico de axones, cuando éste se alarga o contrae producto del arrastre producido por un flujo a bajo número de Reynolds. La forma del axón en este caso es básicamente una catenaria y la situación es análoga a un cable de tendido eléctrico curvado por el efecto de la gravedad. Este método es menos intrusivo que el de microagujas y nos permite acceder a un rango menor de fuerzas.

Capítulo 2

Medición de Fuerzas Celulares

El uso de membranas o películas elásticas ha sido una herramienta esencial para la medición de las fuerzas que ejerce una célula adherida a la superficie del sustrato, permitiendo registrar fuerzas del orden de 10^{-9} Newtons. Estos métodos se encuentran, lamentablemente, limitados por la falta de sensibilidad de las mediciones basadas en la caracterización de la longitud de los pliegues presentes en la membrana.

En esta sección desarrollaremos técnicas que nos permitirán conocer las propiedades elásticas de las membranas utilizadas, de las condiciones de borde en las que se desarrolla el experimento y daremos argumentos de porqué la medición de la longitud de los pliegues no es suficientemente sensible para inferir la fuerza aplicada.

En general, las membranas se encuentran sujetas a dos tipos de deformaciones: las primeras ocurren en el plano de la membrana denominadas como *deformaciones planas*; mientras que las segundas ocurren fuera del plano; *deformaciones de doblamiento*. La energía elástica de una placa deformada se puede escribir en términos de las funciones de densidad de energía elástica ψ_1 y ψ_2 , que representan la energía de deformación de doblamiento y deformación plana por unidad de superficie respectivamente[7].

$$\psi_1 \sim Ee \frac{\xi^4}{l^4} \left(\frac{e^2}{\xi^2} \right) \quad \psi_2 \sim Ee \frac{\xi^4}{l^4}$$

donde, E es el módulo de Young, e es el espesor de la placa, la dimensión de la placa está dada por l y ξ es la deformación vertical.

En el caso de sustratos deformables en que la energía de doblamiento es mayor que la energía de deformación plana para una misma fuerza, se cumple que la amplitud de deformación fuera del plano ξ es comparable con el espesor e de la membrana ($\xi^2 \geq e^2$). En este caso, no es posible despreciar la energía de doblamiento de la membrana.

Los pliegues desarrollados no sólo dependen de la fuerza aplicada: también debemos considerar el espesor e de la membrana, el módulo de Young E , el coeficiente de Poisson ν y las condiciones de borde presentes en el sustrato. Una completa caracterización del fluido utilizado en la fabricación de las membranas y sus propiedades es fundamental antes de inferir las fuerzas aplicadas por la célula sobre el sustrato.

A continuación describiremos los procedimientos para inferir estas propiedades.

2.1. Tensión superficial de fluidos poliméricos

La utilización de los fenómenos capilares nos servirá de herramienta para la determinación de la tensión superficial de los líquidos empleados en la fabricación de membranas elásticas. Estos fenómenos descritos mediante el uso de la Mecánica de Fluidos han permitido relacionar la curvatura de una gota de fluido con su tensión superficial. Es así que para un fluido contenido en un capilar comunicado (figura 2.1 *izq.*), el radio de curvatura de las superficies libres compensa la diferencia de presión entre ambas superficies como se ilustra en la figura 2.1.

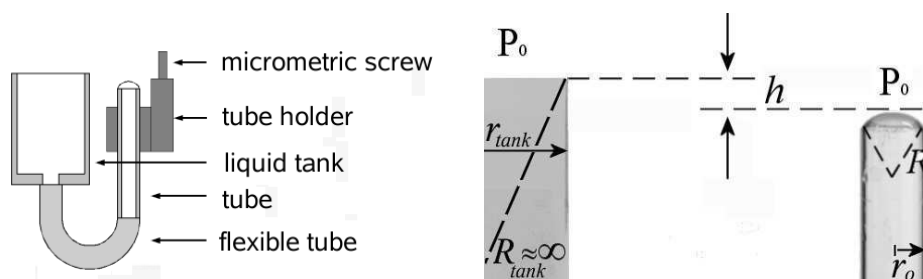


Figura 2.1: Montaje experimental que nos permite determinar la tensión de superficie del fluido en el capilar. La diferencia de altura entre ambas superficies es controlada con un micrómetro. El radio r_o del capilar es de $2mm$ y el radio del contenedor $r_{tank} = 10mm$.

Para relizar un balance de presiones, debemos considerar las curvaturas de ambas superficies. Sin embargo, la curvatura de la superficie libre en el contenedor, es

despreciable frente a la curvatura del capilar de radio r_o .

El equilibrio de presiones es entonces dado por:

$$P_o + \frac{2\gamma}{R_{tank}} + \rho gh = P_o + \frac{2\gamma}{R}$$

$$\Delta P = \rho gh = \frac{2\gamma}{R} \quad (2.1)$$

El radio de curvatura $R_{tank} \sim \infty$ nos permite despreciar la contribución del contenedor, por lo que la diferencia de presión es compensada por la tensión de superficie γ (figura 2.2). El factor dos que acompaña a la tensión de superficie γ proviene del hecho que el perfil de la figura 2.1 es en realidad una semi esfera, por lo tanto, debemos considerar las dos curvaturas principales de la superficie.

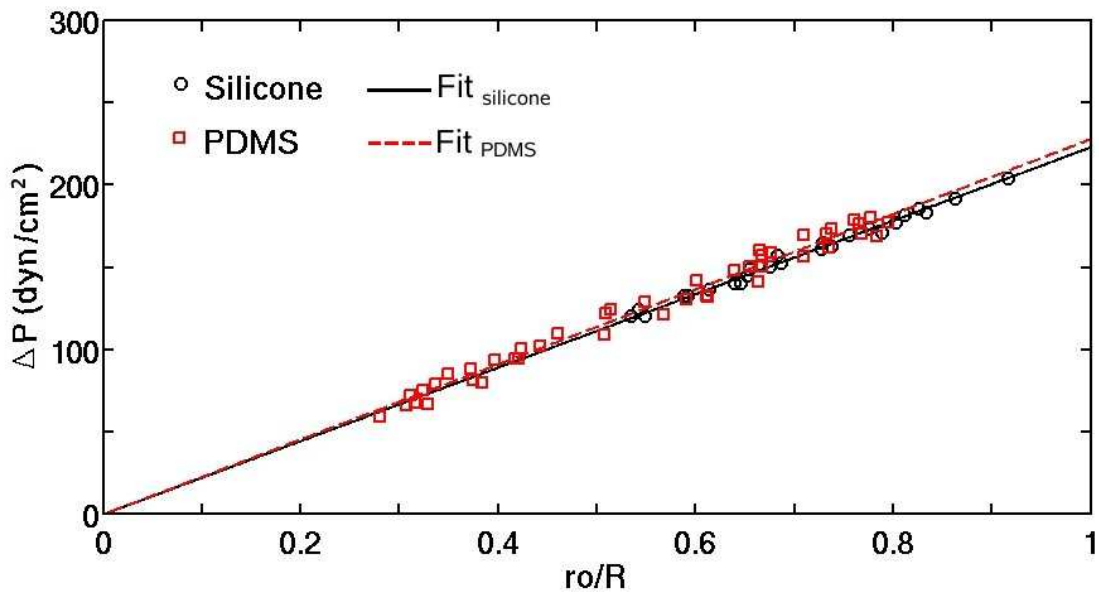


Figura 2.2: La medición de la tensión de superficie del líquido se establece mediante la pendiente de la recta que corresponde a dos veces el de γ dividido por el radio del capilar. Encontramos así la tensión superficial en la interface aire-líquido.

Tensión superficial para dos fluidos. Aceite de Silicona phenylmethyl polysiloxano, Down Corning 710, $\gamma_{silicone} = 22,3 \pm 0,5 \text{ dyn/cm}$. Polydimetilsiloxano (PDMS), Sylgard 184, $\gamma_{PDMS} = 22,7 \pm 0,6 \text{ dyn/cm}$.

2.2. Propiedades de las membranas poliméricas

Supongamos que mediante algún método seamos capaces de fabricar a partir de un fluido polimérico una membrana en su superficie libre. Utilizando el sistema de capilares comunicados podríamos entonces medir la respuesta elástica de la membrana, relacionando su curvatura con la diferencia de presión entre los capilares.

El proceso que nos permite fabricar membranas elásticas en base de un líquido polimérico es llamado *vulcanización*[3]. Este fenómeno ocurre cuando el fluido es expuesto a alta temperatura iniciando un proceso de entre-cruzamiento de las cadenas de polímero. El rol de la presencia de oxígeno en el proceso es fundamental, ya que es el oxígeno quien cataliza el entre-cruzamiento del polímero. Una descripción detallada del protocolo de fabricación será tratada en la siguiente sección.

Después del proceso de vulcanización nos vemos obligados, de forma natural, a realizar una medición del espesor de la recién fabricada superficie elástica.

2.2.1. Medición del espesor de membrana

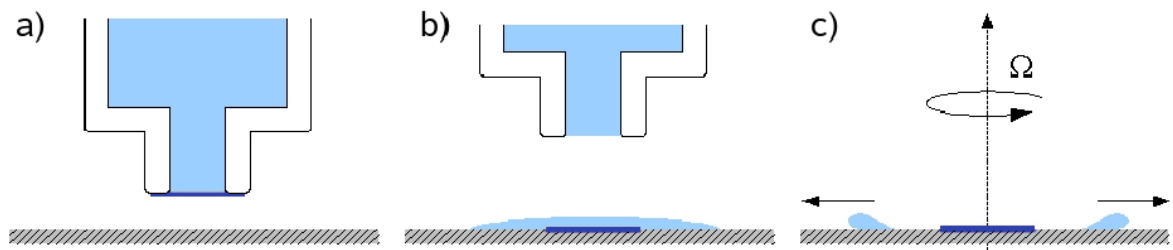


Figura 2.3: (a) Membrana creada en la punta de una jeringa. (b) La membrana es expulsada y depositada por contacto sobre la superficie de silicio. (c) Rotación de la muestra para ejectar el líquido de la superficie de la membrana.

En nuestra configuración experimental, es difícil obtener una medición no destructiva del espesor de las membranas. Los métodos ópticos basados en interferometría no proveen el contraste necesario ya que la membrana se encuentra en la superficie del film remanente con un índice de refracción similar a la del líquido, con membranas con un espesor menor que $100nm$. Para remediar este problema, la membrana se vulcaniza en el extremo de una jeringa, y el sustrato elástico es expulsado y depositado por con-

tacto mecánico en un soporte de silicio. El exceso de líquido es ejetado de la muestra de silicio por rotación como se muestra en figura 2.3.

La determinación del espesor se realizó con el uso de un microscopio de efecto fuerza en el modo de contacto. El perfil de altura obtenido por esta técnica muestra un salto entre la región del soporte de silicio y la región en la que se encuentra la membrana. El espesor del sustrato de silicona es de aproximadamente de $20nm$ y de $60nm$ para las membranas de PDMS como se muestra en la figura 2.4.

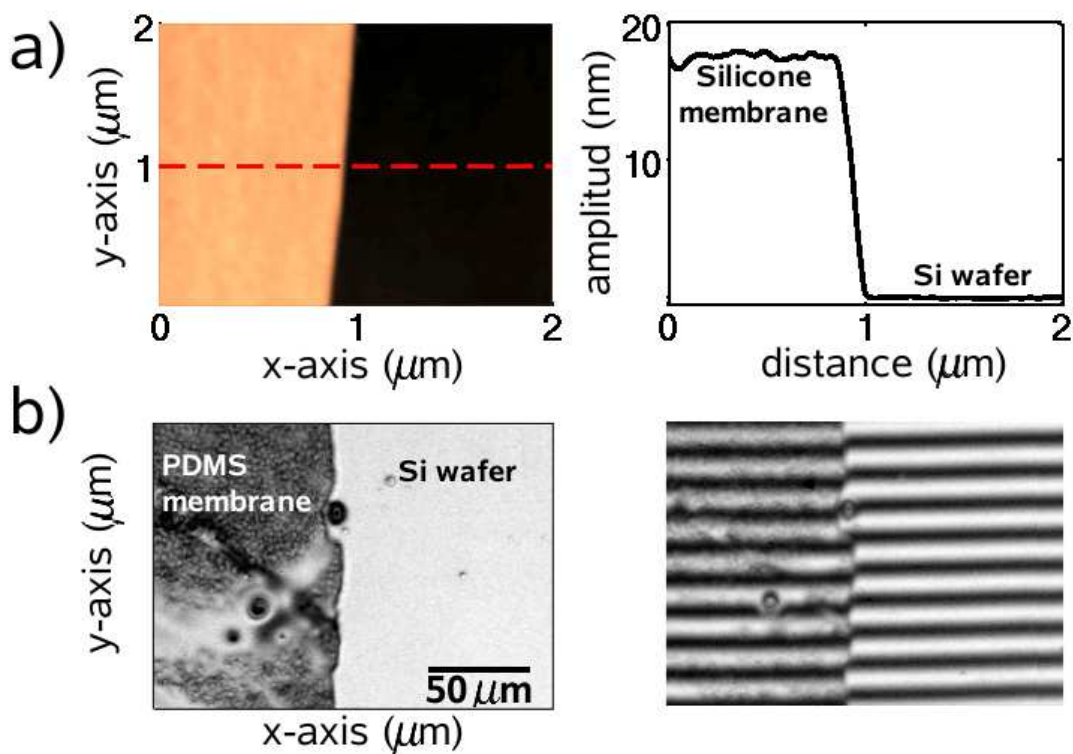


Figura 2.4: Se observa en (a *derecha*) una imagen de microscopía de efecto fuerza en modo contacto para una membrana de silicona homogénea, (a *izquierda*) perfil de altura de la muestra con un espesor $e \approx 20nm$. (b *derecha*) Imagen de reflexin de una membrana de PDMS sobre un soporte de silicio, en (b *izquierda*) se observa el corrimiento de las líneas de interferencia por la presencia de la membrana con un espesor $e \approx 60nm$.

2.2.2. Módulo elástico de membranas poliméricas

Nuevamente la utilización de los fenomenos capilares nos servirá de herramienta para contrastar la presencia de una membrana en tensión bajo una diferencia de presión.

Dado que las moléculas que componen la membrana son idénticas a las moléculas del líquido polimérico, la energía de la interface líquido-membrana es despreciable. Visto de otra manera, la tensión superficial aire-líquido es del mismo orden que la tensión de superficie aire-membrana.

La presencia de la membrana elástica deberá influir en la respuesta de la curvatura ante una diferencia de presión ΔP . En efecto, la vulcanización del fluido a una temperatura de $1300^{\circ}C$ de una superficie de líquido inicialmente plana, conlleva a una contracción térmica cuando la nueva superficie elástica es enfiada a temperatura ambiente. Esta contracción térmica introduce una tensión residual de la membrana que denotaremos por σ_o .

Además de esta tensión residual, debemos agregar la deformación de la membrana al aumentar la superficie para equilibrar la diferencia de presión. Esta contribución puede ser modelada como un módulo elástico B multiplicado por la variación de superficie, considerando que las condiciones de borde son fijas en la orilla del capilar, lo que se traduce en una deformación no homogénea en la superficie de la membrana. Teniendo este hecho en mente, hemos realizado un promedio sobre el tensor de deformación en la región de mayor curvatura[6][9].

De esta forma obtenemos en primera aproximación:

$$\Delta P = \frac{2}{r_o} \left(\gamma_{eff} + B \frac{\delta S}{S_o} \right) x$$

$$\Delta P = \frac{2}{r_o} \left(\gamma + \sigma_o + 4,32B \frac{\delta l}{l_o} \right) x, \quad (2.2)$$

en donde $x = r_o/R$ y el coeficiente 4,32 es el promedio del tensor de deformación en la región de mayor curvatura. Bajo esta aproximación, el aporte del módulo elástico $B = Ee/(1 - \nu^2)$ depende solamente de la variación del perfil de la gota formada en el extremo superior del capilar. E representa el módulo de Young de la membrana y e su espesor.

La variación δl es la diferencia del largo del perfil igual a $2\theta R$ menos el perfil inicial $2r_o$. Utilizando la definición de coordenadas de la figura 2.5, la expresión para la

diferencia de presión es,

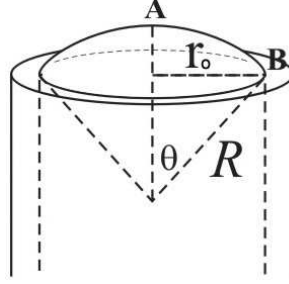


Figura 2.5: Definición de coordenadas en el capilar

$$\Delta P = \rho g h = \frac{2}{r_o}(\gamma_{eff} - 4,32B)x + 2\frac{4,32B}{r_o} \arcsin(x), \quad (2.3)$$

donde γ_{eff} representa la contribución de la tensión superficial debida a la interface membrana-aire, más la tensión residual de la membrana, producto del proceso de vulcanización. Al primer orden, $\gamma_{eff} = \gamma + \sigma_o$, es independiente de la curvatura de la membrana ya que el valor de $x = r_o/R$ en esta aproximación es de orden cero. Realizando una expansión a tercer orden de la función $\arcsin(x)$, podemos reescribir la ecuación 2.3,

$$\Delta P = \frac{2}{r_o}(\gamma + \sigma_o)x + \frac{4,32}{3r_o} Bx^3$$

La modelación de σ_o al orden más bajo (ecuación 2.4), depende del módulo elástico B y de la contracción térmica presentada por la membrana que supondremos uniforme. En la figura 2.6 el efecto del término no lineal en la respuesta de la curvatura se hace evidente en las membranas fabricadas con PDMS.

Para ambos fluidos poliméricos se observa una pendiente inicial mayor que el valor de la tensión superficial γ debido a la presencia de la tensión residual σ_o .

$$\sigma_o = B \frac{\delta S}{S} = B \frac{\pi r_o^2 - \alpha \pi r_o^2}{\pi r_o^2} = (1 - \alpha)B \quad (2.4)$$

La tensión residual σ_o y el módulo elástico B fueron determinados a partir de un ajuste de los datos experimentales con el modelo que hemos descrito. Las tensiones residuales promedio y el módulo elástico B para las membranas de silicona son $\sigma_{silicona} =$

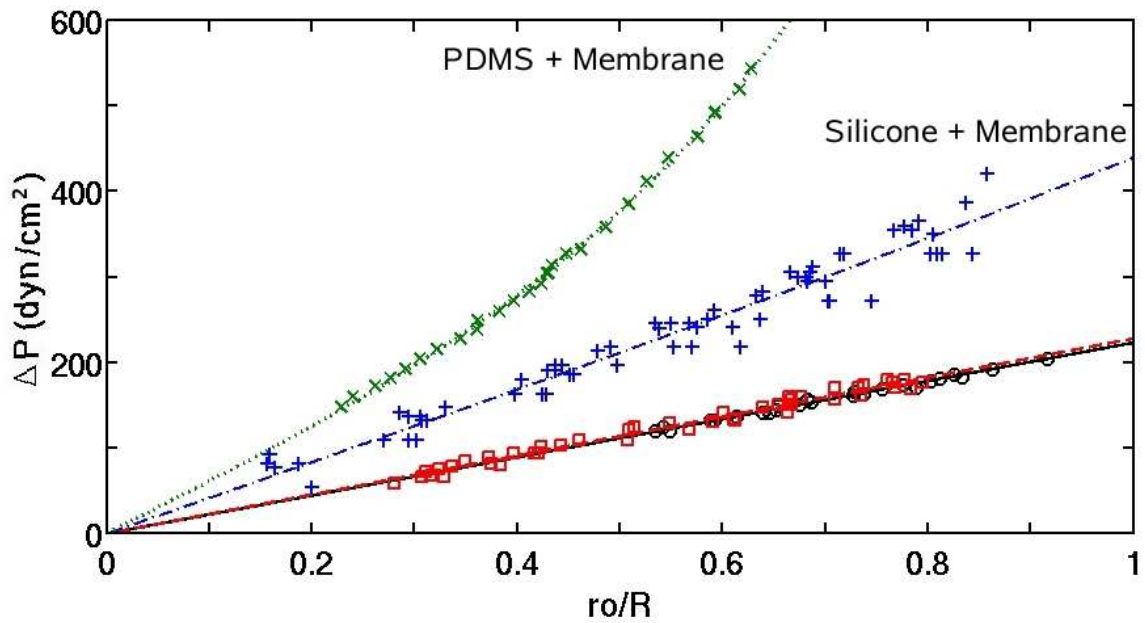


Figura 2.6: Curvas de respuesta de la curvatura como función de la diferencia de presión. Se hace evidente la presencia de la membrana que incluye una tensión residual y en el caso del PDMS, la contribución del término no lineal en la expresión de la diferencia de presión es más importante que las membranas fabricadas con aceites de silicona.

$4,8 \pm 0,4 \text{ dyn/cm}$, $B_{\text{silicona}} = 25,2 \pm 0,6 \text{ dyn/cm}$ y de $\sigma_{PDMS} = 31,1 \pm 0,3 \text{ dyn/cm}$ y $B_{PDMS} = 120,4 \pm 0,6 \text{ dyn/cm}$ para las membranas fabricadas con PDMS. En ambos casos, el coeficiente de contracción térmica α es menor que uno ($\alpha_{\text{silicona}} = 0,81 \pm 0,1$, $\alpha_{PDMS} = 0,75 \pm 0,1$).

Cuadro 2.1: Comparación entre los fluidos poliméricos

| Parámetro | Aceite de Silicona | PDMS |
|---------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| γ | $22,3 \pm 0,5 \text{ dyn/cm}$ | $22,7 \pm 0,6 \text{ dyn/cm}$ |
| e | $20 \pm 2 \text{ nm}$ | $60 \pm 2 \text{ nm}$ |
| B | $25,2 \pm 0,6 \text{ dyn/cm}$ | $120,4 \pm 0,6 \text{ dyn/cm}$ |
| σ_o | $4,8 \pm 0,4 \text{ dyn/cm}$ | $31,1 \pm 0,3 \text{ dyn/cm}$ |
| α | $0,81 \pm 0,1$ | $0,75 \pm 0,1$ |
| $\frac{E}{1-\nu^2}$ | $1,3 \pm 0,2 \text{ MPa}$ | $2,0 \pm 0,1 \text{ MPa}$ |

γ Tensión superficial de la interface aire-líquido.

e Espesor de la membrana.

B Módulo elástico efectivo.

σ_o Tensión elástica residual.

α Coeficiente de contracción térmica.

$\frac{E}{1-\nu^2}$ Módulo elástico efectivo.

2.3. Pliegues en membranas semi esféricas

Un caso en que podemos correlacionar la fuerza con el largo de los pliegues generados experimentalmente, es en el caso de una membrana semi esférica de radio R , en el que la fuerza es aplicada en la parte más alta de la membrana.

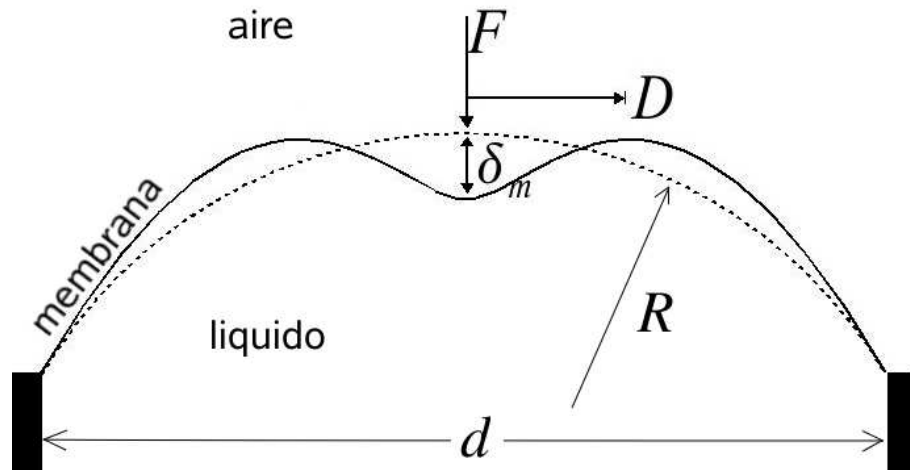


Figura 2.7: Esquema de deformación de una membrana semi esférica con condiciones de borde fijas.

Como se muestra en la figura 2.7, la fuerza aplicada por la microaguja en el centro de la membrana provoca un cambio de curvatura en torno a la posición de la microaguja. Centraremos nuestra atención entonces en la respuesta de la membrana en función de la distancia D entre la microaguja y la región en que cambia la curvatura y la deflexión de la membrana δ_m .

2.3.1. Montaje experimental

El soporte de las membranas fue fabricado utilizando un volumen de PDMS, preparado depositando una película de líquido PDMS (Sylgard 184) mezclado con el correspondiente agente curador en una razón 10:1, en una placa petri de 200mm. El espesor $h = 500\mu m$ de la película se obtiene determinando el volumen de llenado de la placa petri. Después de una hora de curado, el líquido de PDMS forma una goma transparente la cual es perforada obteniendo un agujero de diámetro $d = 3mm$ (figura 2.8).

La cavidad de PDMS es colocada sobre una superficie limpia de vidrio y llenada con el aceite de silicona (Dow Corning 710) hasta obtener en la cavidad una superficie plana de fluido. La gota de radio R es formada agregando un volumen del mismo aceite con la ayuda de una micropipeta. El exceso de líquido formará una gota esférica de radio R .

La membrana fue fabricada utilizando el procedimiento de vulcanización exponiendo la superficie libre del fluido a la flama de un mechero Bunsen a una temperatura de 1300°C durante $0,1\text{s}$.

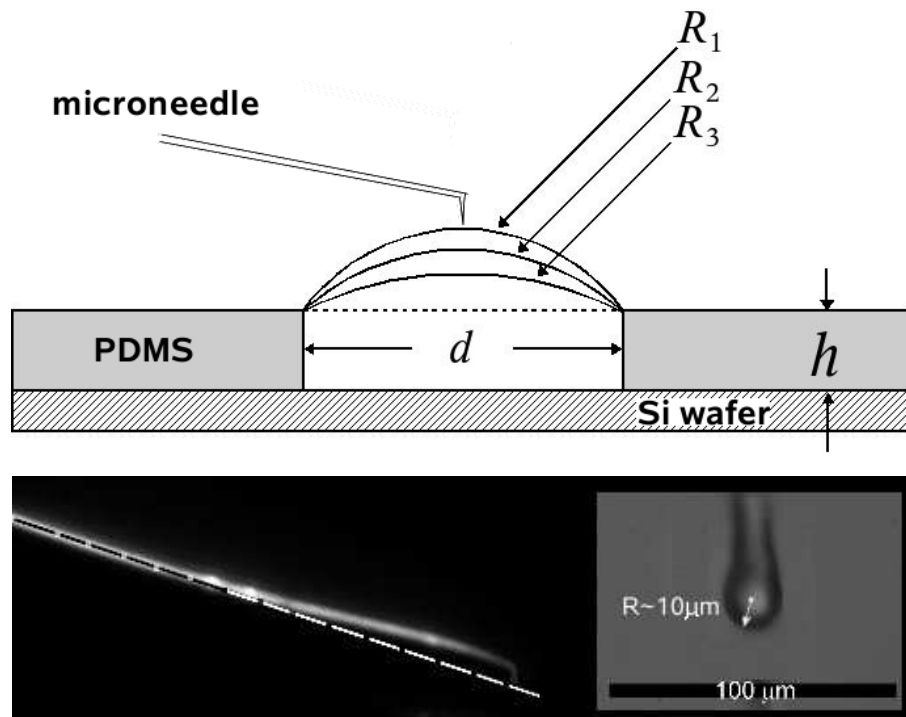


Figura 2.8: Diagrama experimental en función del radio inicial de la membrana (*panel superior*). La deflexión de la microaguja nos permite medir la fuerza aplicada, el recuadro muestra el radio de curvatura de la punta de la microaguja (*panel inferior*).

El desplazamiento de la microaguja fue medida por un micrómetro y su deflexión δ determinada por imágenes laterales. La fuerza aplicada por la microaguja fue determinada midiendo su constante de restitución $k_{needle} = 65 \pm 2 \times 10^{-3} \text{N/m}$ (apéndice A.1). La observación de los pliegues formados fueron realizadas con un microscopio Nikon Eclipse TE300, con contraste Nomarsky, cuya intensidad es proporcional al gradiente

del camino óptico. Las regiones planas de la membrana exhiben mayor intensidad que las zonas con curvatura no nula. Cuando la microaguja no está apoyada sobre la membrana la región de mayor intensidad corresponde a la aparte más alta de la membrana. Sin embargo, cuando el desplazamiento de la membrana es aplicada utilizando la microaguja se observa un anillo de máxima intensidad que corresponde al máximo del perfil de la membrana (figura 2.9a).

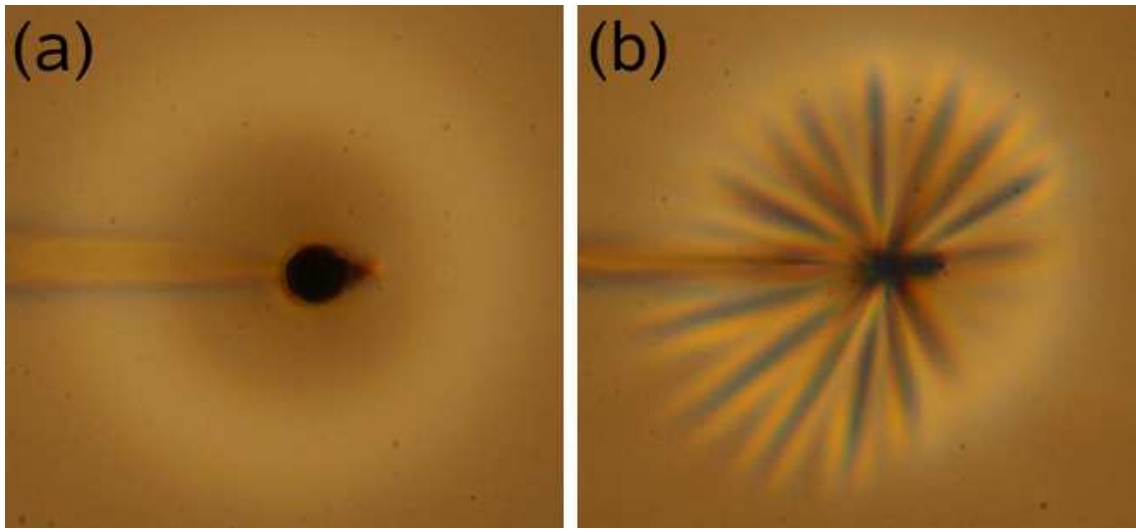


Figura 2.9: Imágenes de dos membranas de silicona diferentes (a) es una membrana aproximadamente plana y (b) tiene un radio de curvatura cercano a $2,5mm$. En ambos casos el desplazamiento de la membrana δ_m es de $2,5\mu m$ pero sólo (b) muestra un patrón de pliegues radiales.

2.3.2. Resultados

Al imponer una deflexión δ_m en la superficie de la membrana, ésta responde linealmente a la fuerza externa como si se tratara de un resorte con una constante de restitución efectiva k_m , como se muestra en la figura 2.10.

Incrementando el desplazamiento de la microaguja, el círculo de radio D que representa el cambio de curvatura de la membrana crece también. Sin embargo, para los valores de los radios R , explorados la respuesta de la coordenada D parece saturar en un rango de deflexión de la membrana del orden de $\delta_m \sim 10\mu m$. Observamos que todas las curvas de D como función de δ_m siguen una curva común como se observa en

la figura 2.11. Un comportamiento similar es observado cuando presentamos los datos en función de la fuerza aplicada.

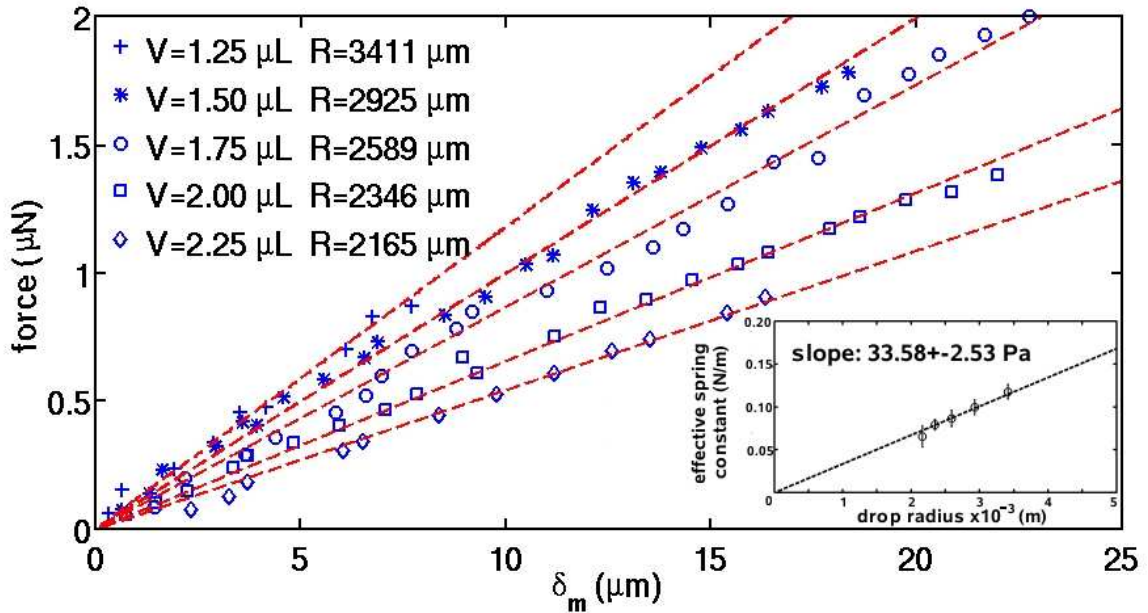


Figura 2.10: Fuerza puntual aplicada en la membrana como función de la deflexión de la membrana, δ_m , para membranas de diferentes radios R iniciales. El inset muestra la constante de restitución en función del radio de curvatura inicial, cuya pendiente es el módulo elástico efectivo de la membrana.

Para los casos en que la membrana presenta un radio de curvatura menor que el diámetro de la cavidad se observó la generación de pliegues para un valor bien definido de la deflexión de la membrana que denotaremos como δ_c .

El valor crítico de la deflexión de la membrana depende fuertemente del valor del radio inicial R . Como se observa en la figura 2.12, el largo del pliegue es igual al valor de la distancia entre la microaguja y la región de cambio de curvatura D registrando un salto en el largo del pliegue. Para radios de curvatura pequeños, el largo del pliegue parece presentar una inestabilidad supercrítica, es decir, el largo del pliegue crece gradualmente con el valor de δ_m . Para radios mayores, la inestabilidad parece ser subcrítica y la longitud salta a un valor finito. Sin embargo, ésta última inestabilidad no presenta un ciclo de histeresis en la variable δ_m .

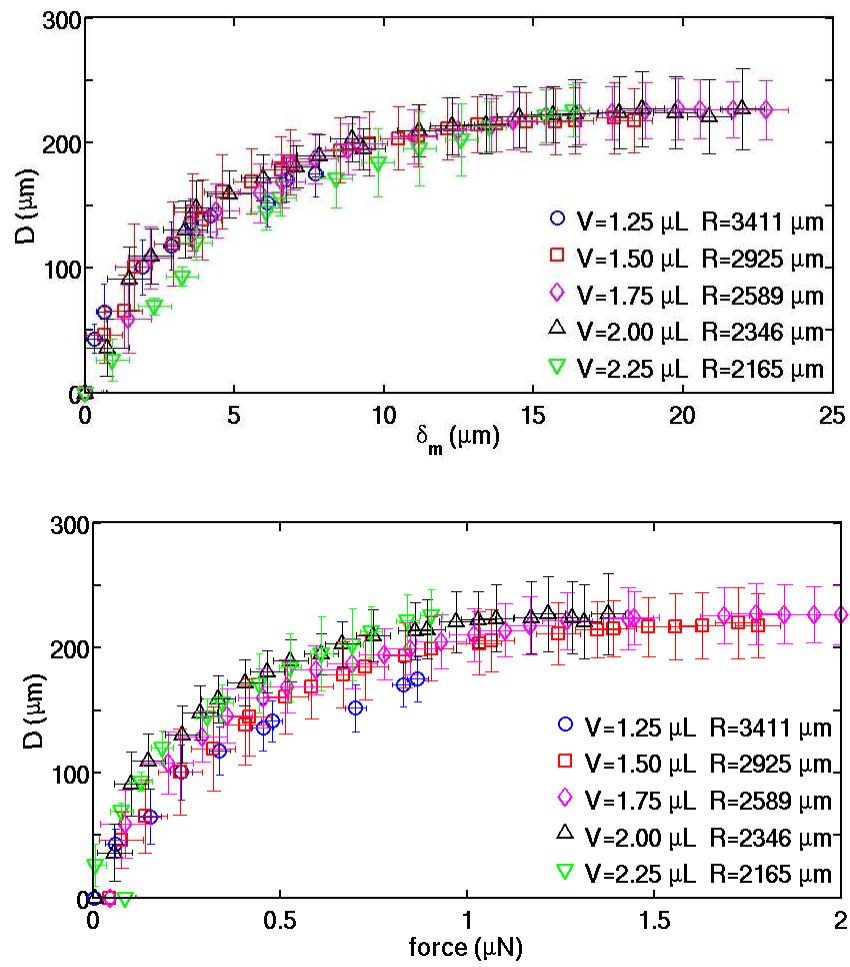


Figura 2.11: (*arriba*) Cambio de curvatura de la membrana en función de la deflexión de la membrana. (*abajo*) Se presenta la misma situación en función de la fuerza aplicada.

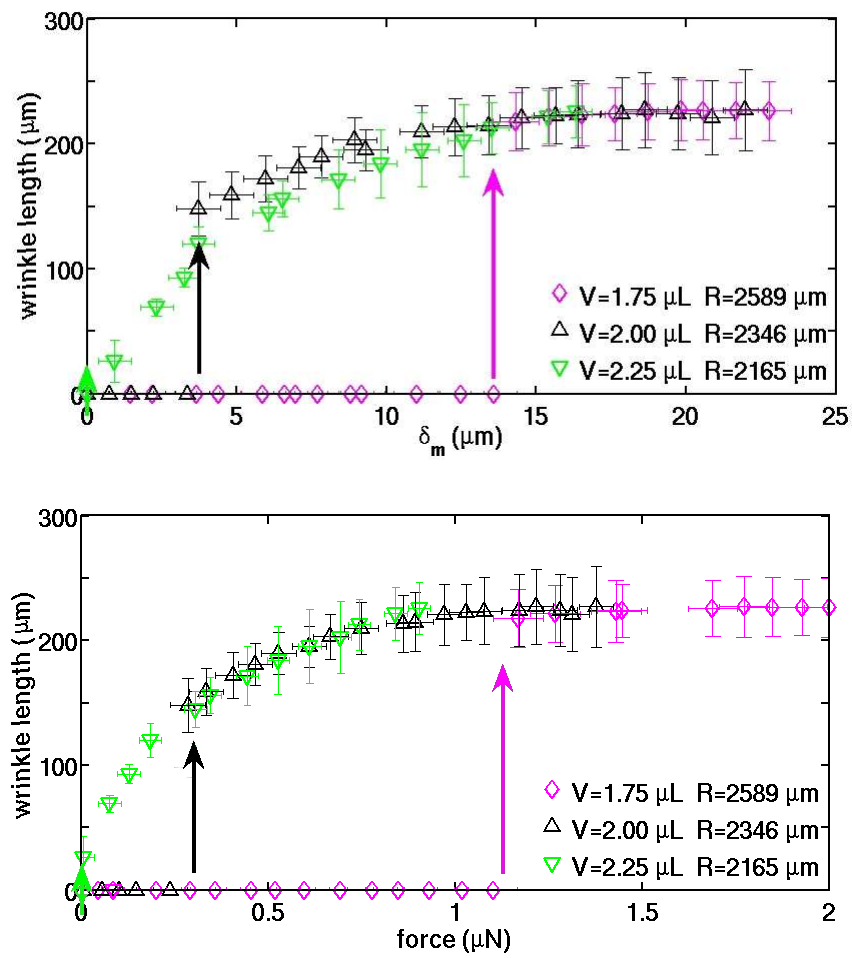


Figura 2.12: Las membranas con radios de curvatura menores que el diámetro de la cavidad generaron un patrón de pliegues radiales a la microaguja. Las flechas señalan el salto de la longitud del pliegue.

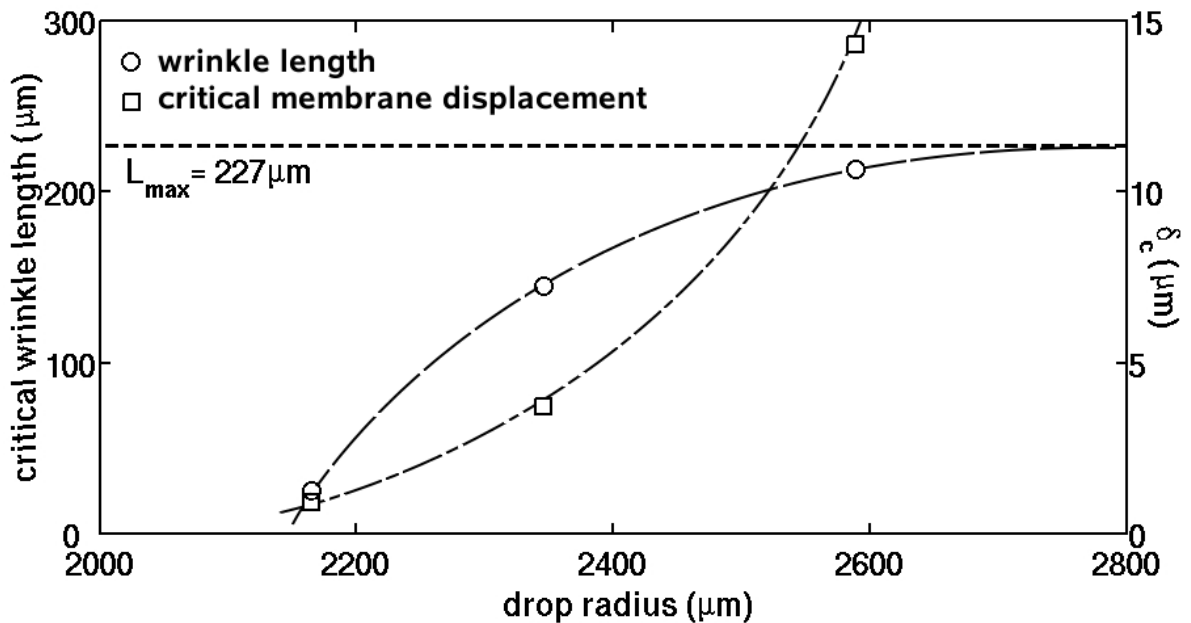


Figura 2.13: Valores críticos de la formación de pliegues en función del radio de curvatura inicial. La longitud de los pliegues satura a un valor cercano a $L_{max} = 230 \mu m$.

2.4. Generación de pliegues por la acción de fuerzas celulares

En biomecánica celular, los patrones de pliegues generados por una célula en su movimiento han probado ser una herramienta útil en la caracterización y test de sistemas vivos. En trabajos previos se ha correlacionado la longitud de los pliegues en función de la fuerza de tracción aplicada por la célula[1][2]. Por nuestra parte, en investigaciones recientes[8] hemos presentado resultados experimentales y teóricos de las características de la formación de pliegues formados en una membrana inicialmente plana enmarcada en un anillo circular con condiciones de borde fijas y tensión no nula en el borde. Una tracción radial en el centro de la membrana fue aplicada en un intento por hacer una mímica de las fuerza generadas por una célula, ver figura 2.14.

Así, nuestros resultado muestran que tanto la amplitud como la longitud de los pliegues son el resultados de una inestabilidad supercrítica. Sobre el valor umbral de

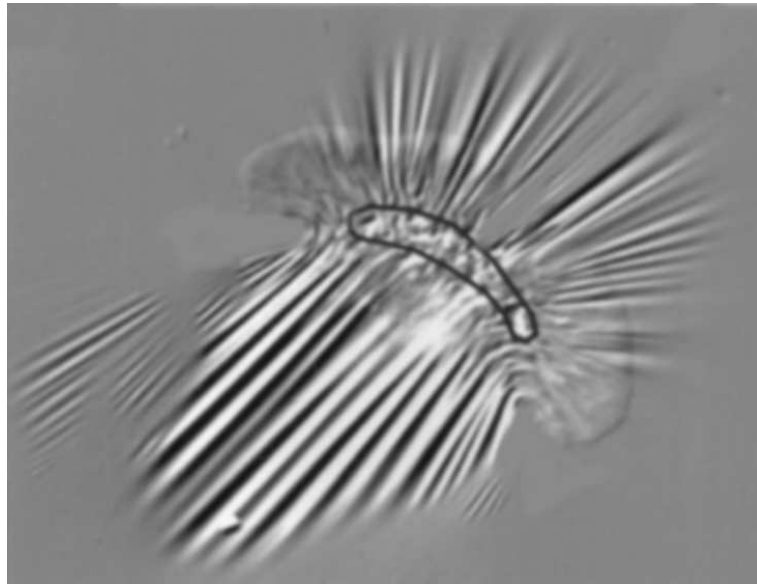


Figura 2.14: Pliegues por efecto de fuerzas aplicadas por un keratocito adherido a una membrana de silicona, Burton et al. Ref [2].

la inestabilidad, el número de pliegues generados es independiente de la fuerza central aplicada, varía lentamente con la tensión de la membrana y aumenta linealmente con el tamaño del objeto. En resumen, nuestros resultados cuestionan la sensibilidad de las mediciones de fuerza celular basados en mediciones directas de la longitud de los pliegues por lo que proponemos que una medición más sensible de las fuerzas puede ser obtenida directamente de la amplitud de los pliegues. En consecuencia, en las secciones que siguen presentamos en cierto detalle nuestro método para reconstruir enteramente el campo de arrugas producidas por la célula. Aunque la discusión de cómo remontar al campo de deformación a partir de estas mediciones está más allá del alcance de esta tesis, daremos algunas indicaciones al respecto. La mayor parte de los argumentos se encuentran en la Ref. [8].

2.4.1. Montaje experimental

Para fijar ideas de lo que se desea lograr ilustramos en la figura 2.14 una configuración típica en donde una célula actúa sobre el sustrato elástico. Aquí, los pliegues tienen dimensiones comparables a aquellas de la célula y son visualizados por medio de contraste de interferencial diferencial (DIC). Aunque estos pliegues son evidentes en

la figura, ninguna información cuantitativa sobre su amplitud puede ser obtenida con este método de observación.

Para avanzar en la descripción de nuestro método comenzamos por recordar algunas consideraciones sobre la preparación de nuestras membranas. Un volumen de $50\mu L$ de fluido (Dow Corning 710), de viscosidad cinemática $\nu = 500\text{cm}^2/\text{s}$ y densidad $\rho = 0,99\text{g}/\text{cm}^3$, es depositada sobre un soporte de silicio (Si: B[111],P/E). Una película de fluido es obtenida por rotación de la muestra a una velocidad de 4500rpm después de 20 segundos se obtiene un film de aproximadamente $20\mu\text{m}$ de espesor. Las membranas son el resultado de la vulcanización de aceite de silicona descrito anteriormente y se obtienen exponiendo el film de silicona a un mechero Bunsen modificado que genera una flama homogénea (figura 2.15). La temperatura de la flama es de 1300°C y el tiempo exposición del film a la flama del mechero es controlado por un motor de paso. Para un tiempo de exposición de $0,1\text{s}$ se obtiene una membrana homogénea de 20nm de espesor.

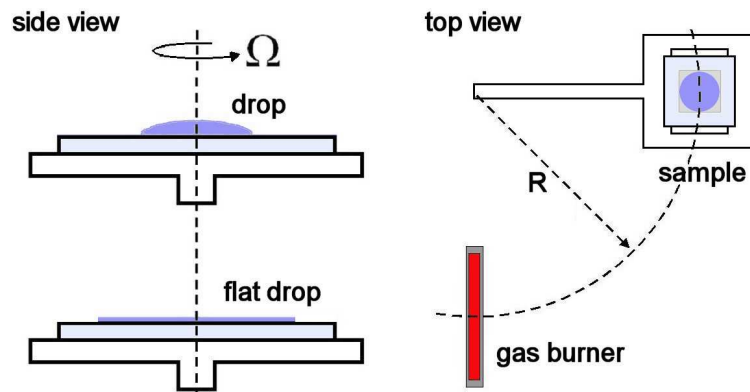


Figura 2.15: Fabricación de membranas elásticas por el método de spin coating y vulcanización.

2.4.2. Medición del campo de pliegues

A fin de medir la amplitud de los pliegues hemos construido un interferómetro que en conjunto con un microscopio de reflexión modificado nos permite lograr la magnificación y sensibilidad adecuada. Nuestro sistema está compuesto por dos objetivos, Carl Zeiss CP Acromat $10\times/0,25$ y un cubo dicróico de 25mm de arista que provee la división, en igual intensidad, de los rayos provenientes de una lámpara de sodio cuya longitud de onda es $\lambda = 635\text{nm}$. Este interferómetro llamado genéricamente

“interferómetro Linnux”, configurado en el modo de contacto óptico, para muestras perfectamente planas, genera un patrón de interferencia de líneas paralelas. La separación entre las líneas de interferencia es controlada por el ángulo α del espejo de referencia (figura 2.16). La diferencia de camino óptico entre dos líneas de interferencia contiguas es de $d = \lambda/2n$, donde $n = 1,61$ es el índice de refracción del aceite de silicona. Sin embargo, en presencia de pliegues o membranas estas líneas sufren una distorsión lateral cuya amplitud es directamente proporcional a diferencia de camino óptico entre la situación de referencia, sustrato plano, y la deflexión vertical de la membrana. La amplitud de los pliegues se reconstruye a partir de imágenes numéricas siguiendo la deflexión de las líneas de igual espesor. El algoritmo desarrollado para el análisis de imágenes detecta las líneas de máxima y mínima amplitud, y un proceso de interpolación entre éstas permite mejorar la resolución espacial. Con este procedimiento, se obtienen resoluciones verticales del orden de $25nm$ con una resolución espacial inferior a $1\mu m$. Las imágenes fueron adquiridas utilizando una cámara Nikon DXM 1200, de 12 Megapíxeles de resolución.

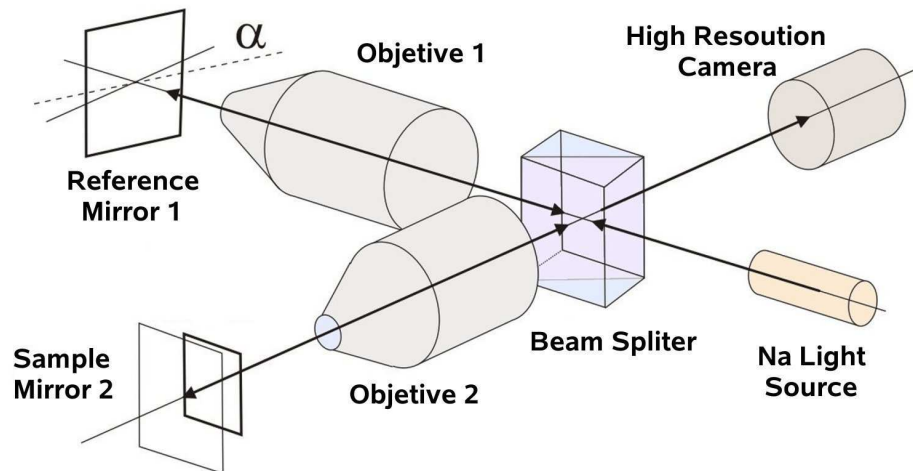


Figura 2.16: Esquema del microscopio interferométrico Linnux.

El tipo de células utilizadas, fibroblastos de pulmón fetal humano, fueron obtenidas del Instituto de Salud Pública (ISP). Del cultivo similar al descrito en el apéndice B.2 se obtuvieron las células con las propiedades de adhesión necesarias para nuestros experimentos. Los fibroblastos fueron depositados en el sustrato elástico de silicona como se observa en la figura 2.17. La altura interna de la celda es de $0,5mm$, provista

por un separador fabricado en PDMS. La celda se llena con medio de cultivo regular para este tipo específico de célula y se sella con un cubre objeto de $125\mu\text{m}$. Una celda idéntica, desprovista del film y membrana de silicona, se inserta en el brazo de referencia del interferómetro, disminuyendo de esta forma la diferencia de camino óptico entre los brazos del interferómetro y aumentando así el contraste.

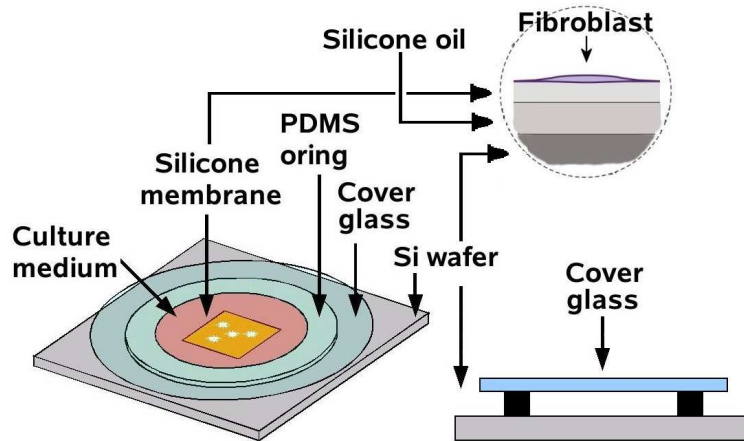


Figura 2.17: El soporte utilizado en la celda es una superficie espejadora de silicio que cumple el rol de espejo en el esquema del microscopio interferométrico.

En la figura 2.18 se representa la imagen directa de una célula y sus pliegues obtenida por medio del interferómetro. Las deflexiones de las líneas paralelas introducidas por los pliegues son claramente visibles con la resolución alcanzada. En la misma figura se representa un mapa cuantitativo de la amplitud de los pliegues obtenido por el protocolo descrito más arriba. Asimismo, para ilustrar la resolución del método se presentan cortes a lo largo de varios pliegues de donde se distingue el decaimiento de su amplitud con la distancia a la célula. Notemos que la variación de la amplitud del pliegue con la distancia, obtenido aquí, se compara cualitativamente con aquellos obtenidos en la Ref. [8], (ver figura 2.19c, Ref. [8]).

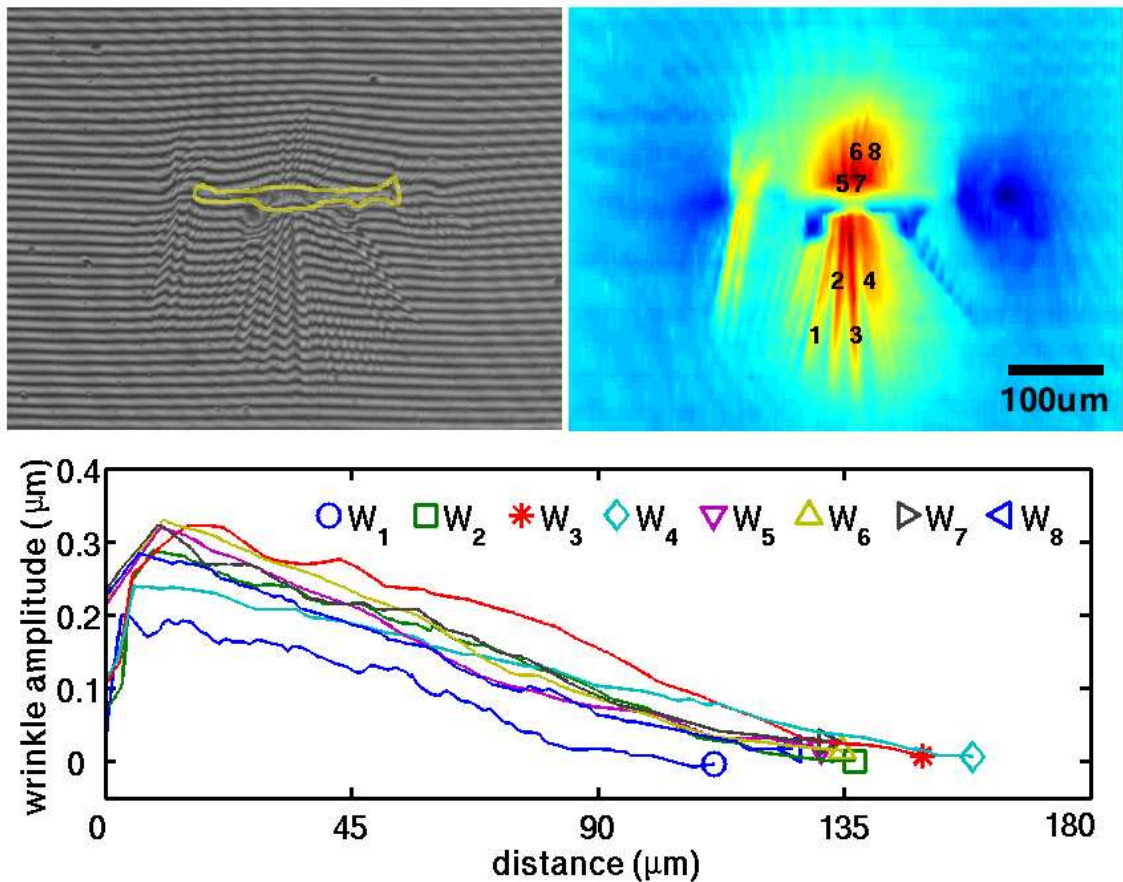


Figura 2.18: (Izquierda) Imagen de una célula y sus pliegues obtenida por el interferómetro Linnix, en el que se puede observar el contorno delimitando el cuerpo de la célula. (Derecha) Mapa cuantitativo de la amplitud de los pliegues obtenido por medio del análisis de las imágenes de interferometría, según se describe en el texto. (Abajo) Corte a lo largo de los pliegues enumerados de 1 al 8 ilustrando el decaimiento de su amplitud con la distancia a la célula.

Por otro lado, aunque la adquisición de imágenes a la resolución espacial alcanzada es relativamente lenta, dadas las escalas de tiempo involucradas en el desplazamiento de la célula, el método proporciona la resolución temporal suficiente para un estudio dinámico. Una de las limitantes del método es que no permite obtener información del cuerpo mismo de la célula. Sin embargo, para aplicaciones donde la célula se encuentra adherida a un sustrato plano indeformable, las deflexiones de las líneas de igual espesor son únicamente debidas a los cambios de forma de la célula. De la figura 2.20 que ilustra

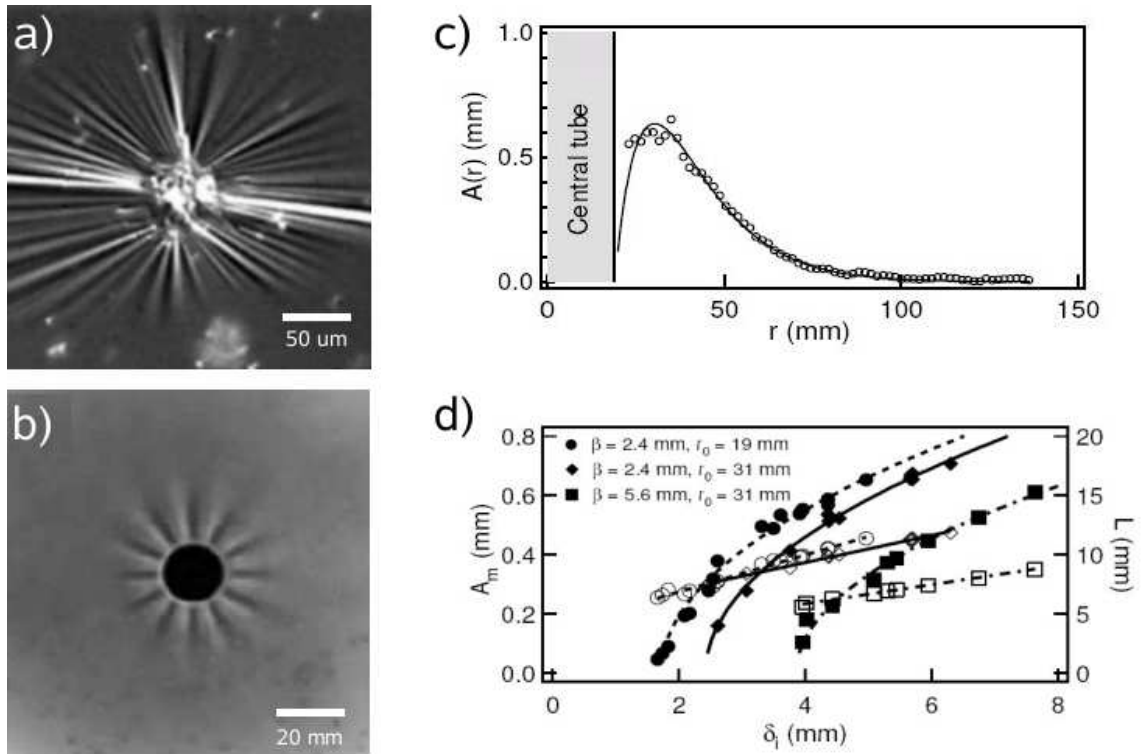


Figura 2.19: (a) Contracción de un fibroblasto adherido a una membrana de silicona y los pliegues generados con simetría cuasi radial. En (b) los pliegues generados por una contracción radial en el centro de una membrana con una tensión inicial no nula. (c) Muestra el perfil experimental y teórico de los pliegues. Por último en (d) hemos graficado la amplitud máxima de los pliegues y su correspondiente longitud en función del desplazamiento impuesto δ_i y variando la tensión inicial β (referencia [8]).

el perfil de una célula reconstruido por este método, se deduce que nuestro dispositivo de medición puede ser valioso en variadas aplicaciones donde se busque identificar los cambios de forma o estrategias utilizadas por una célula durante su desplazamiento.

2.4.3. Condiciones de borde experimentales

Antes de concluir, comentaremos brevemente sobre las condiciones de borde predominantes en los sustratos elásticos. Como ya se ha dicho, experimentalmente, la membrana de silicona es vulcanizado en la superficie libre del fluido depositado sobre el soporte de silicio. Durante el proceso el fluido alcanza temperaturas cercanas de

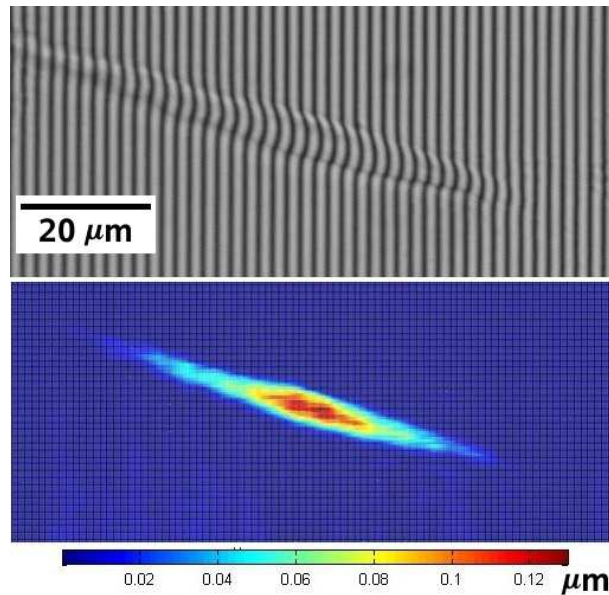


Figura 2.20: Perfil de un fibroblasto de pulmón humano obtenido por interferometría, panel superior. Panel inferior, reconstrucción del cuerpo de la célula a partir del análisis de imágenes descrito en el texto.

1300°C, por aproximadamente un 0,1 segundos. En este proceso, todo el fluido sufrió una dilatación térmica dada por su correspondiente coeficiente de expansión. Bajo estas condiciones, el proceso de vulcanización dió paso a la creación de una membrana, la que al momento de enfriarse debe sufrir una contracción térmica. Experimentalmente hemos concluido, por medio de los resultados de caracterización del módulo elástico de las membranas, que la razón de cambio entre el volumen y la superficie elástica es menor que uno, es decir, el coeficiente de contracción es mayor para la membrana elástica, lo cual implica que la membrana se encuentra bajo tensión σ_o .

Utilizando el microscopio interferométrico se obtuvo el perfil de altura de la película de silicona antes y después del proceso de vulcanización y se realizó una caracterización del ángulo de contacto, θ en ambas condiciones, figura 2.21. Para ambos casos el perfil puede ser ajustado a un círculo, lo que indica que la gravedad no juega ningún rol, en otras palabras nos encontramos en el régimen capilar donde domina, ya sea la tensión de superficie o tensión de superficie más la tensión de la membrana. Sin embargo, dada la precisión del método se observan pequeños cambios en los ángulos de contacto, que ocurren en el lapso de tiempo que toma la medición de éste sin membra-

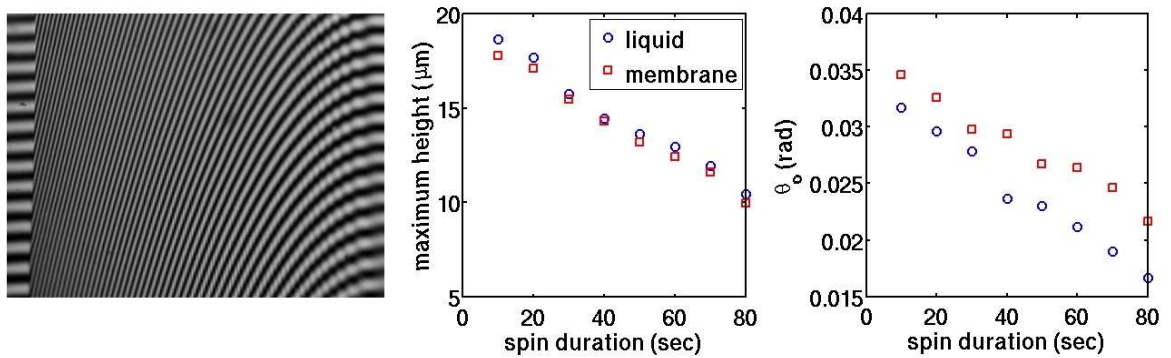


Figura 2.21: El ángulo de contacto se obtuvo reconstruyendo el perfil del film antes y después de la vulcanización. El cuadro central muestra la altura máxima del film de silicona y el cuadro contiguo el ángulo de contacto θ_o . Se observa que la amplitud del film disminuye ligeramente y θ_o aumenta levemente en presencia de la membrana.

na y con membrana y que son debidos a que el fluido utilizado moja perfectamente la superficie de silicio. En conclusión, bajo estas condiciones, la membrana está sometida a una tensión homogénea efectiva producto de la tensión de superficie más la contribución debida a la contracción térmica durante su preparación. Demás esta decir que el simple análisis del perfil del sustrato en estas condiciones no permite obtener ninguna información sobre la tensión de la membrana. Por consiguiente, la tensión efectiva de la membrana debe ser obtenida por alguno de los métodos descritos en las secciones precedentes.

2.5. Conclusiones

En conclusión, en esta sección hemos desarrollado un método de medición de amplitud de pliegues lo que proporciona un protocolo más preciso para la determinación de fuerzas celulares en variadas configuraciones experimentales. Nuestra aseveración está basada en la figura 8 del estudio teórico experimental sobre la formación de membranas [8]. Como se aprecia en aquella figura, la longitud del pliegue posee un salto al umbral de la inestabilidad y varía lentamente con la tensión de la membrana. En contraste, la amplitud del pliegue es una función suave al umbral de inestabilidad, variando apreciablemente con la tensión de la membrana. Desde el punto de vista experimental, como ya lo hemos dicho, deducir la tensión a partir del conocimiento de la longitud del pliegue es un método de una sensibilidad cuestionable, por lo tanto, los resultados obtenidos en la literatura con este método deben ser considerados sólo indicativos.

Capítulo 3

Propiedades Mecánicas de Axones

En este capítulo abordaremos el estudio de las propiedades biomecánicas de axones. Este sistema, aunque complejo desde el punto de vista biológico, presenta ciertas ventajas que hacen posible su estudio desde la perspectiva de la Física. En efecto, los axones o neuritas son prolongaciones de células especializadas como por ejemplo neuronas. Estas extensiones tienen como propósito enviar señales entre el conjunto de miles de millones de otras neuronas distribuidas en el sistema nervioso. Los axones también son utilizados por la célula como conducto para el transporte de vesículas, filamentos y proteínas, con el objetivo final de regular el buen desempeño a nivel biológico de la célula.

La característica más sobresaliente de los axones, desde el punto de vista de la física, son sus dimensiones, con un radio promedio de $0,5\mu m$ y una longitud que va desde unas cuantas decenas de micrones hasta la increíble longitud de $1m$. Desde un punto de vista puramente mecánico, los axones poseen características similares a una cuerda, es decir, pueden soportar un esfuerzo mecánico respondiendo con una deformación elástica. Sin embargo, un axón es un objeto mucho más complejo que una cuerda. Su estructura se encuentra constituida por membranas lípidas de doble capa en la superficie, filamentos de actina, microtubulos y motores moleculares en el interior (figura 3.1). Los filamentos de actina y microtubulos, están formados a su vez por monómeros de actina y α β -*tubulin* respectivamente. En ambos casos, la periodicidad del filamento está acompañada por un potencial asimétrico periódico de carga eléctrica. La interacción de los filamentos con los motores moleculares cambia cuando una molécula de *AdenosineTriphosphate* (ATP) es hidrolizada por el motor molecular. Es por medio de este proceso que el

motor molecular se desplaza sobre el filamento (ver figura 3.2).

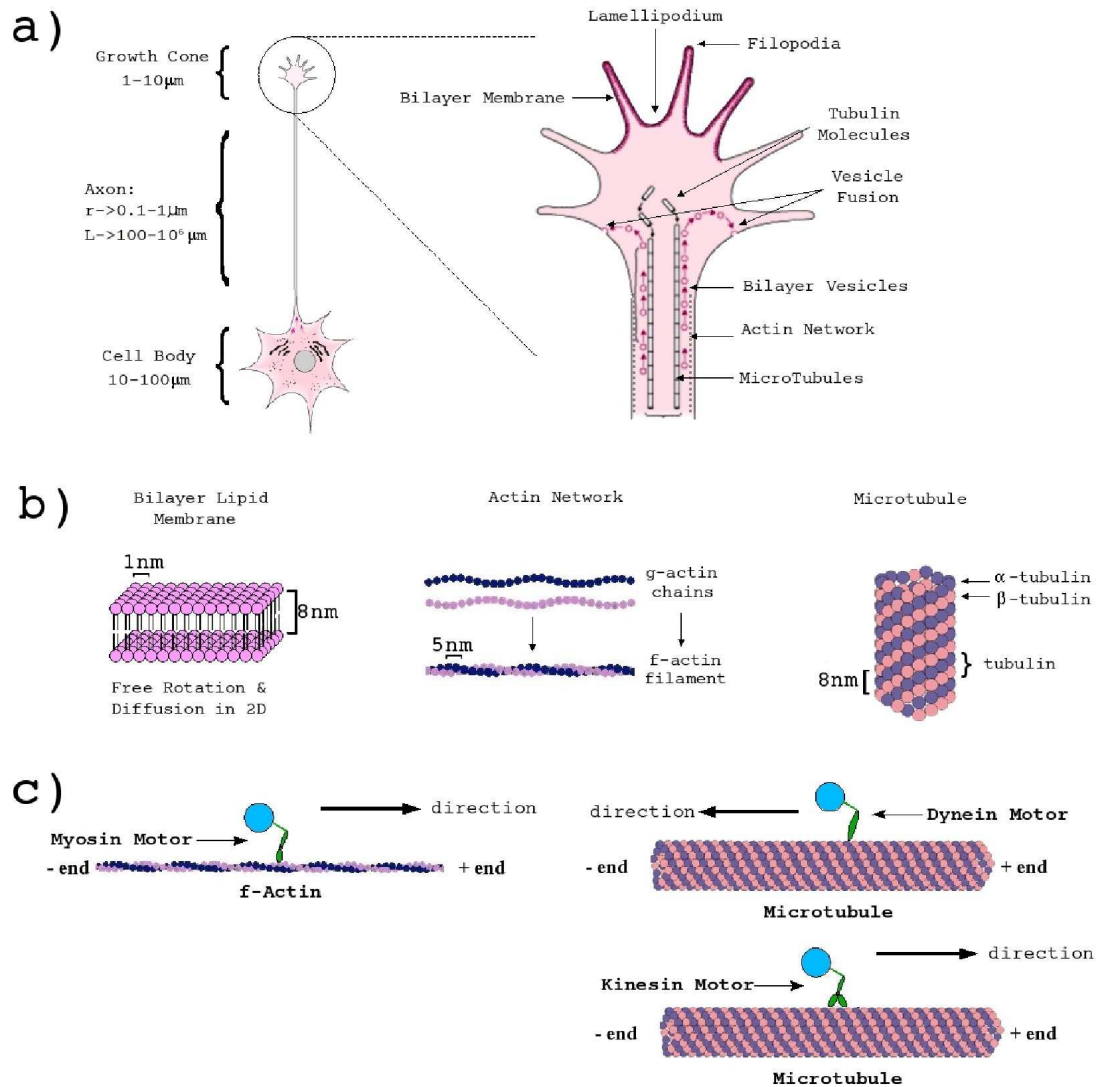


Figura 3.1: (a) Esquema general de las características principales de un axón, (b) estructuras principales que conforman el axón, (c) las interacciones entre los distintos tipos de filamentos se encuentran mediados por proteínas llamadas motores moleculares.

Naturalmente, parte importante de las propiedades elásticas o mecánicas de los axones provienen de las interacciones que ocurren entre los distintos filamentos en combinación con los motores moleculares. Un modelamiento físico de estos motores, en base a su ciclo de hidrolización de ATP se puede encontrar en la Ref .[10] Básicamente, esta reacción permite a los motores moleculares cambiar su configuración estructural y

proporciona la energía de interacción con el filamento al cual se encuentran anclados. Una vez ocurrido el cambio configuracional, es energéticamente más favorable para un motor molecular desplazarse hasta el próximo monómero. Experimentos in vitro han mostrado que, para concentraciones constantes de ATP, los motores moleculares se mueven con velocidad constante a lo largo del filamento como si se tratara de un riel.

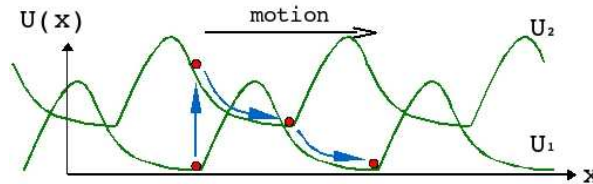


Figura 3.2: Movimiento de una partícula por un cambio en el potencial.

No es nuestro objetivo aquí dar una descripción detallada de los motores moleculares involucrados en los procesos biológicos que ocurren dentro del axón por lo que nos limitamos a esquematizarlos en la figura 3.3. Como veremos más adelante, la complejidad de los fenómenos mecánicos observados en axones requiere de dramáticas simplificaciones.

| | Kind | Velocity (nm/s) | Operation mode |
|----------------|--------------|-----------------|----------------|
| Myosin | II | 8000 (FSM) | 1e4-1e9 (LA) |
| | III | 250 (SMC) | 1e4-1e9 (LA) |
| | V | 350 (VT) | <10 (AsN) |
| Dynein | Cytoplasmic | -1250 (RAT) | <10 (AsN) |
| Kinesin | Conventional | 840 (ArAT) | <10 (AsN) |
| | Fla10/KinII | 400 (AT) | 10-1000 (SA) |

| | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| FSM : Fast Skeletal Muscle | RAT : Retrograde Axonal Transport |
| SMC : Smooth Muscle Contraction | ArAT: Anterograde Axonal Transport |
| VT : Vesicle Transport | AT : Axonal Transport |
| LA : Large Array | |
| SA : Small Array | |
| AsN : Alone or Small Numbers | |

Figura 3.3: Motores moleculares involucrados en el transporte axonal, transporte de vesículas al interior del axón, y de la contracción/dilatación del citoesqueleto celular.

3.1. Respuesta mecánica de un axón

En esta sección discutiremos algunas consideraciones básicas para el modelamiento de la respuesta mecánica de axones y describiremos en detalle los métodos experimentales usados para caracterizar las propiedades viscoelásticas de éstos.

Una primera mirada del comportamiento mecánico de un axón se realiza mediante su idealización a una cuerda homogénea con sus extremos fijos y sometida a una fuerza externa F . Para el caso de materiales homogéneos y considerando deformaciones pequeñas, la respuesta mecánica se refleja en la curva de elongación como función de la fuerza a la que se somete el material. Para el caso puramente elástico, la fuerza externa es proporcional a la elongación del objeto y la constante de proporcionalidad es su constante de restitución elástica (*Ley de Hook*). Para una cuerda de extremos fijos con un largo inicial L_x , al aplicar una fuerza F perpendicular a su punto medio, éste se desplazada una distancia Y_o . La elongación está dada por $\Delta L = L_o - L_x$, donde L_o es la longitud de la cuerda deformada.

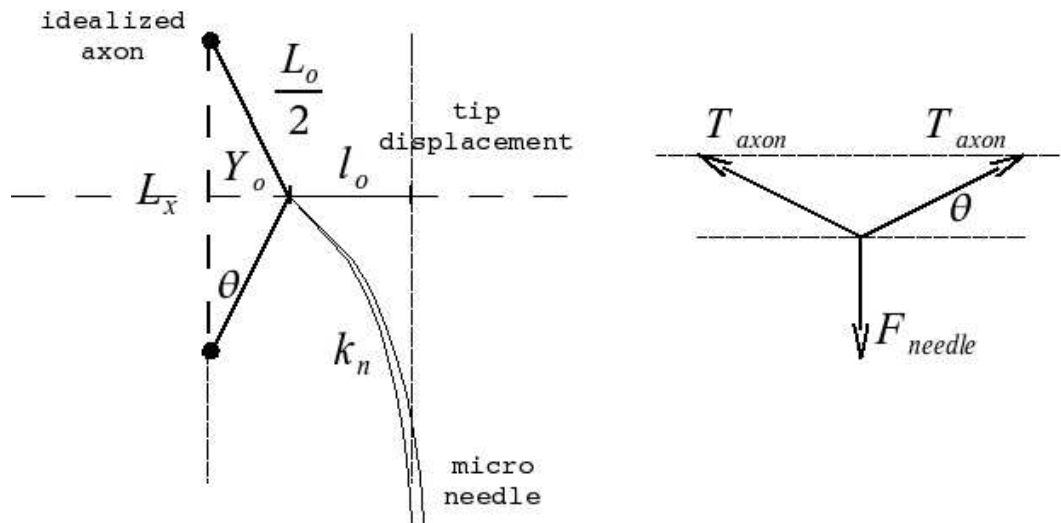


Figura 3.4: Esquema de la medición de la respuesta elástica de un axón utilizando microagujas.

En nuestro caso, la medición de la fuerza externa se realiza por medio de la deflexión de la punta de la microaguja, denotada por l_o , multiplicada por su constante de restitución de pandeo k_n . En condiciones simétricas, el equilibrio de fuerzas, como se muestra en la figura 3.4, está dado por,

$$0 = -T_{axon} \cos \theta + T_{axon} \cos \theta \quad (3.1)$$

$$k_n l_o = T_{axon} \sin \theta + T_{axon} \sin \theta, \quad (3.2)$$

donde

$$F_{needle} = k_n l_o = 2T_{axon} \sin \theta. \quad (3.3)$$

Continuando con nuestra modelización, si la respuesta del axón puede ser idealizada por medio de la ley de Hook, con una constante de restitución κ , la tensión T_{axon} debe ser igual a $\kappa \delta_\kappa$, donde δ_κ es la deformación elástica. Sin embargo, el estado inicial de equilibrio es desconocido, dado que la longitud inicial L_x no es necesariamente la longitud a la que el axón se encuentra a tensión nula. Notemos que, aún en ausencia de fuerza lateral aplicada, por la acción de los motores moleculares, el axón podría presentar una tensión T_o , que debe ser incluida en la expresión de la tensión del axón. Entonces,

$$F_{needle} = 2(\kappa \delta_\kappa + T_o) \sin \theta. \quad (3.4)$$

De la figura 3.4, se observa que $\sin \theta = 2Y_o/L_o \ll 1$, con lo que podemos aproximar $\sin \theta$ por θ , y escribir la tensión como función del ángulo θ

$$\frac{L_x}{2} = \frac{L_o}{2} \cos \theta \quad Y_o = \frac{L_o}{2} \sin \theta$$

$$\delta_\kappa = \frac{L_o - L_x}{2} = \frac{L_o}{2} (1 - \cos \theta)$$

Utilizando la relación entre L_x y L_o y expandiendo las funciones sinusoidales a segundo orden, obtenemos finalmente el equilibrio entre la fuerza externa y la tensión del axón.

$$\begin{aligned} \sin \theta &\sim \theta + O(\theta^3) \\ \cos \theta &\sim 1 - \frac{\theta^2}{2} + O(\theta^3) \end{aligned}$$

$$\delta_\kappa = \frac{L_x}{2} \left(1 + \frac{\theta^2}{2} \right) \frac{\theta^2}{2}$$

$$F_{needle} = 2 \left(\kappa \frac{L_x}{2} \left[\frac{\theta^2}{2} + \frac{\theta^4}{4} \right] + T_o \right) \theta$$

$$F_{needle} = \kappa \frac{L_x}{2} \theta^3 + 2T_o \theta. \quad (3.5)$$

En estricto rigor, el coeficiente que acompaña a θ^3 es igual a $(\kappa L_x/2 - T_o/3)$, que proviene de conservar el término θ^3 en la expansión de la función $\sin \theta$. Sin embargo, como veremos en la sección 3.4, la contribución de este último término es despreciable frente a la respuesta elástica.

Desde el punto de vista estructural, el origen del comportamiento elástico de una célula proviene de la red de actina que la rodea. En efecto, estos filamentos interactúan directamente mediante los motores moleculares de *miosina*; la adhesión de la miosina a las fibras de actina tiene como resultado la creación de un soporte elástico para el axón[11][12].

Hasta aquí podríamos contentarnos con modelar un axón con un resorte elástico y una tensión residual. Sin embargo, en experimentos pioneros de Lamoureux[14] y Dennerll[15], se muestra que para tiempos largos, la respuesta mecánica de los axones exhibe un comportamiento viscoelástico, presentando deformaciones plásticas ante una fuerza externa. El modelo mecánico más sencillo que reproduce este comportamiento, también propuesto por Lamoureux[14] y Dennerll[15], está constituido por un resorte de constante elástica κ , en serie con un segundo resorte de constante k , y una disipación de constante γ que representa las pérdidas por fricción al interior del axón (figura 3.5a). Estas constantes representan las interacciones entre los distintos componentes al interior del axón. Bajo este modelo, frente a una fuerza externa, un axón alcanzará una situación de equilibrio mecánico a un tiempo caracterizado por el cociente γ/k , lo que efectivamente se observa experimentalmente. Sin embargo, en muchos casos también se detectan contracciones de los axones, es decir, un comportamiento activo, debido a los motores moleculares, que este modelo no incluye en absoluto.

Dada la limitación del modelo propuesto en la década de los 80, proponemos agregar un tercer elemento en paralelo a k y γ . Este nuevo elemento, que denotaremos con M (figura 3.5b), da cuenta de la acción conjunta promedio de los motores involucrados en los distintos procesos biológicos al interior del axón.

En este punto, deberíamos proponer un modelo para el elemento M , que deberá basarse en la existencia de una viscosidad entre dos filamentos unidos por un

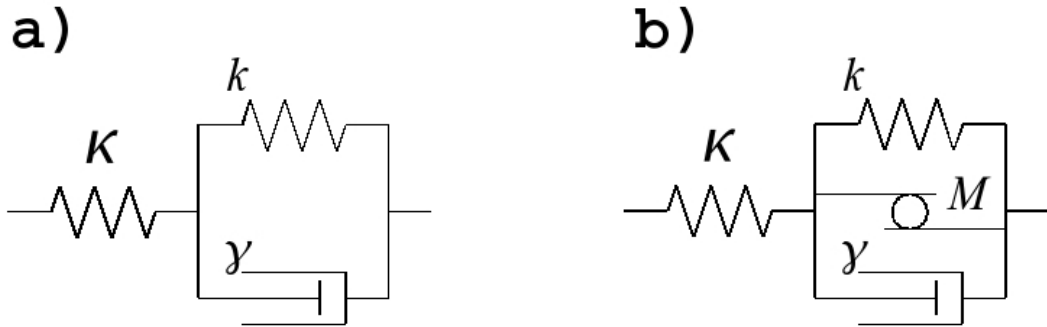


Figura 3.5: (a) Modelo mecánico propuesto por Dennerll[15] compuesto sólo por componentes pasivos. En (b) hemos incluido la acción de los motores moleculares ya que éstos pueden aumentar o disminuir la tensión mecánica del axón.

motor molecular [18]. Por ahora, sin embargo, nos limitaremos a dar una descripción operacional de M y relegaremos la discusión a la sección final.

Representaremos, entonces, por una gaussiana la respuesta mecánica T_{motors} , a una velocidad de deformación $\dot{\delta}_k$, del conjunto de motores involucrados en los procesos de transporte al interior del axón, con un ancho típico v correspondiente a la velocidad promedio debida a la hidrolización. La altura T_a corresponderá a la fuerza máxima que puede ejercer el conjunto de motores a velocidad nula, tal como se observa en la figura 3.6.

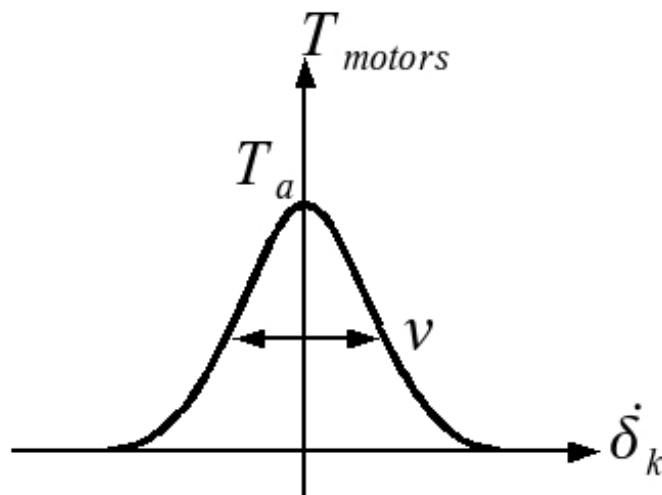


Figura 3.6: Modelo de la respuesta conjunta de los motores moleculares en un axón que depende de la velocidad de elongación $\dot{\delta}_k$.

Con los ingredientes que acabamos de describir, la etapa siguiente que nos proponemos desarrollar es el balance detallado de las fuerzas que actúan en el axón. El equilibrio mecánico se encuentra establecido por tres ecuaciones que vinculan la fuerza externa con la respuesta mecánica, la tensión interna del axón, y la elongación total (figura 3.7), según,

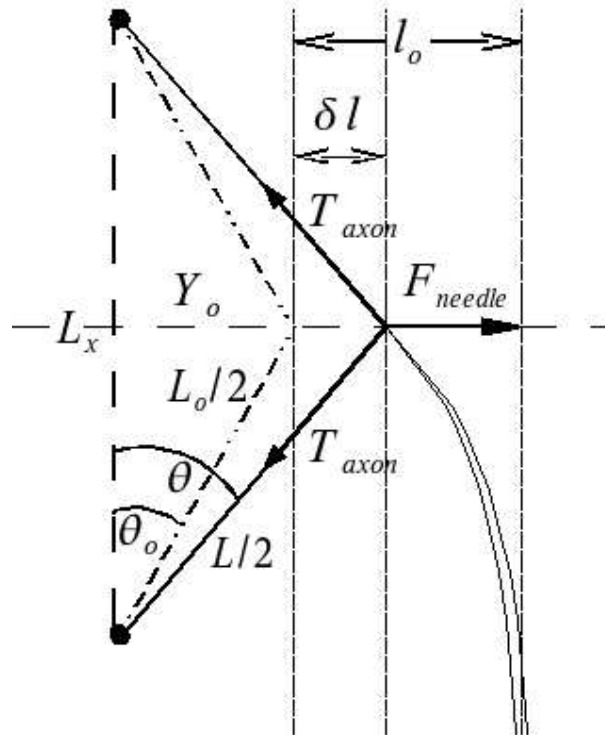


Figura 3.7: Esquema de la medición de la respuesta mecánica a tiempos largos y definición de las variables del sistema tomando como referencia un axón ya alargado y de longitud L_0 .

$$2(\kappa\delta_\kappa + T_o) \sin \theta = k_n(l_o - \delta l) \quad (3.6)$$

$$k\delta_\kappa + \gamma\dot{\delta}_\kappa + T_a e^{-\delta_\kappa^2/v^2} = \kappa\delta_\kappa + T_o \quad (3.7)$$

$$2(\delta_\kappa + \delta_\kappa) = \Delta L + 2\delta_\kappa^o. \quad (3.8)$$

La ecuación 3.6, da cuenta del equilibrio mecánico entre la fuerza externa aplicada por la microaguja $k_n(l_o - \delta l)$ y la tensión de respuesta del resorte $\kappa\delta_\kappa$ más la tensión inicial T_o (considerando el equilibrio proyectado en el ángulo θ). Esta tensión es equilibrada a su

vez por el sistema k - M - γ en la ecuación 3.7, con δ_k como su elongación. Finalmente, la ecuación 3.8 es una igualdad entre la elongación total del axón, referida a la elongación elástica inicial L_o , igual a dos veces la suma de las elongaciones δ_κ y δ_k . Note que en la figura 3.7 hemos considerado la deformación del axón a partir de un estado de referencia en el que su largo es L_o en lugar de L_x , y actúa una fuerza compatible con este estado. El interés de esta elección será explicitado en la sección experimental.

Las condiciones iniciales del sistema se obtienen automáticamente evaluando las ecuaciones 3.6, 3.7 y 3.8 en $t = 0$ y considerando que inicialmente la deflexión de la microaguja es $l_o \Rightarrow \delta l = 0$ y dada la respuesta del término disipativo γ , la elongación $\delta_k(t = 0) = 0$. Por lo tanto,

$$\delta_\kappa^o = \frac{k_n l_o}{2\kappa \sin \theta_o} - \frac{T_o}{\kappa}$$

De la figura 3.7, realizando la aproximación $\delta l/L_o \ll 1$, encontramos,

$$L_o = \sqrt{L_x^2 + 4Y_o^2} \quad L = \sqrt{L_x^2 + 4(Y_o + \delta l)^2}$$

$$\begin{aligned} \Delta L &= \sqrt{L_x^2 + 4Y_o^2 + 8Y_o\delta l + 4\delta l^2} - L_o \\ \Delta L &= L_o \left[\sqrt{1 + \frac{8Y_o\delta l + 4\delta l^2}{L_o^2}} - 1 \right] \approx \frac{4Y_o\delta l + 2\delta l^2}{L_o} \end{aligned}$$

por lo que a primer orden, ΔL se escribe,

$$\Delta L = 2 \left(2 \frac{Y_o}{L_o} \right) \delta l = 2 \sin \theta_o \delta l. \quad (3.9)$$

Reescribiendo $\sin \theta$ en términos de las elongaciones,

$$\begin{aligned} \sin \theta &= \frac{Y_o + \delta l}{L/2} = 2 \frac{Y_o + \delta l}{L_o + 2 \sin \theta_o \delta l} \\ \sin \theta &= 2 \frac{Y_o + \delta l}{L_o} \frac{1}{1 + 2 \frac{\sin \theta_o}{L_o} \delta l} \\ \sin \theta &= 2 \frac{Y_o}{L_o} + 2 \cos^2 \theta_o \frac{\delta l}{L_o} - 4 \sin \theta_o \frac{\delta l^2}{L_o^2} \end{aligned}$$

y,

$$\sin \theta \approx \sin \theta_o. \quad (3.10)$$

Con estas simplificaciones las ecuaciones 3.6, 3.7 y 3.8 dependen del ángulo θ_o sólo como parámetro experimental ya que en los experimentos el término $\delta l/L_o$ es mucho menor que el término Y_o/L_o que da cuenta de la elongación elástica inicial,

$$2(\kappa\delta_\kappa + T_o) \sin \theta_o = k_n(l_o - \delta l) \quad (3.11)$$

$$k\delta_k + \gamma\dot{\delta}_k + T_a e^{-\delta_k^2/v^2} = \kappa\delta_\kappa + T_o \quad (3.12)$$

$$\delta_\kappa + \delta_k = \sin \theta_o \delta l + \delta_\kappa^o \quad (3.13)$$

Experimentalmente tenemos acceso al valor δl , por lo que, escribiremos las elongaciones δ_κ y δ_k como funciones de δl utilizando las ecuaciones 3.11 y 3.13. Designando $\alpha = \sin \theta_o$, obtenemos,

$$\delta_\kappa = \frac{k_n}{2\alpha\kappa}(l_o - \delta l) - \frac{T_o}{\kappa} \quad (3.14)$$

$$\delta_k = \left(\alpha + \frac{k_n}{2\alpha\kappa} \right) \delta l \quad (3.15)$$

$$\dot{\delta}_k = \left(\alpha + \frac{k_n}{2\alpha\kappa} \right) \dot{\delta} l \quad (3.16)$$

Finalmente, reemplazando las expresiones para δ_κ , δ_k y $\dot{\delta}_k$ en la ecuación 3.12 y nombrando $\beta = (\alpha + k_n/2\alpha\kappa)$ encontramos,

$$\beta\gamma\dot{\delta} l + T_a e^{-\beta^2\delta l^2/v^2} + k \left(\beta + \frac{k_n}{2\alpha\kappa} \right) \delta l = \frac{k_n l_o}{2\alpha} \quad (3.17)$$

Esta es por último la ecuación que da cuenta del equilibrio mecánico entre la tensión del axón y la fuerza externa aplicada por la microaguja. Este sistema cuenta con un término de restitución, una disipación y la respuesta de los motores moleculares.

3.2. Montaje experimental

La dificultad técnica de estos experimentos radica en el posicionamiento de la microaguja (figura 3.8a), de tal forma de enganchar el axón que se encuentra a menos de $1\mu\text{m}$ sobre la superficie del sustrato de colágeno. Por este motivo, hemos modificado la punta de la microaguja para hacerla parecer una “L” (figura 3.8b) y acceder a cualquier axón sin perturbar a las células cercanas. Por su parte, la posición de la microaguja se regula inicialmente con el uso de un micromanipulador de tres ejes (figura 3.9). Una vez seleccionado el axón la aguja permanece inmóvil para permitir su fácil observación bajo el microscopio. El microscopio utilizado fue un Nikon Eclipse TE300, y un objetivo Plan Fluor ELWD $40\times/0.6$, utilizando la técnica de microscopía de contraste de fase. La adquisición de imágenes se realizó mediante un CCD monocromático, una tarjeta de adquisición IMAQ PCI-1411 y el software LabView 7.0. La deflexión de la aguja se obtiene por medio de un análisis de imágenes.

Para imponer una fuerza sobre el axón, el cubre objeto que contiene las células puede ser desplazado por medio de un micromotor (ThorLabs $T25X-D/M$), controlado por un computador, que permite la implementación de movimientos simples o complejos según los requerimientos experimentales. La temperatura del medio celular es fijada a 37°C por un controlador PID (Warner Instrument CL-100 Controller, SC-20 In-Line Heater/Cooler).

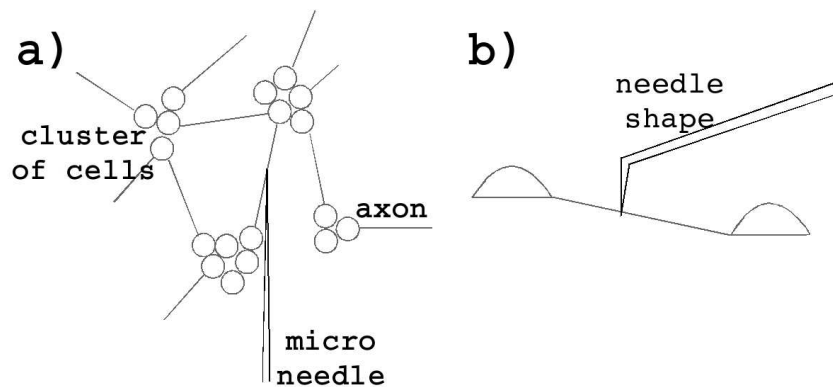


Figura 3.8: (a) Esquema general del experimento en donde se muestra la disposición típica de las células. (b) Forma de la aguja que nos permite explorar axones individuales.

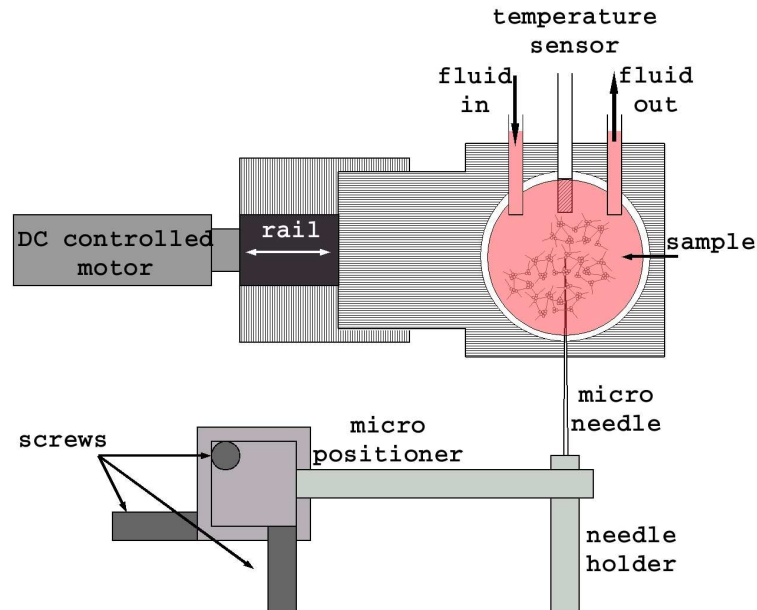


Figura 3.9: La microaguja se encuentra fija y es posicionada por un micromanipulador, la muestra en tanto es desplazada con la ayuda de un motor microcontrolado por un computador.

3.3. Mediciones de Fuerza y Elongación

3.3.1. Medición de la fuerza aplicada

Las microagujas fueron construídas utilizando un Flaming/Brown Micropipette Puller P-87, y capilares de vidrio (Borosilicate Glass Capillaries GC100-10). La calibración de éstas se realizó mediante dos métodos, el primero de ellos consiste en un análisis de la función de respuesta en frecuencia de las microagujas sometidas a vibración, como se describe en detalle en el apéndice A.1.1. Una forma alternativa de calibración, es mediante el uso de una “punta” (*cantilever tip*) de un microscopio de fuerza atómica (AFM). Estos tips se encuentran calibrados, por lo que se conoce su constante de restitución de flexión. Como se muestra en la figura 3.10, la deflexión δ_{tip} nos permite conocer la fuerza que ejercemos, $k_{tip}\delta_{tip}$, en la punta de nuestra microaguja, $k_n\delta_n$. La pendiente entre la fuerza aplicada y el desplazamiento de la punta de la microaguja determina la constante de restitución k_n del orden de $10^{-4} N/m$ equivalente a $10 \mu dyn/\mu m$.

$$k_{tip}\delta_{tip} = k_n\delta_n.$$

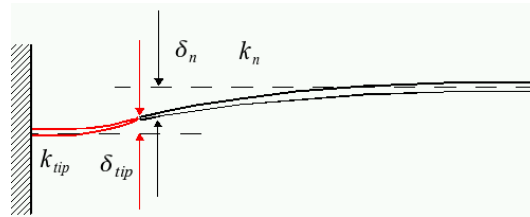


Figura 3.10: Esquema de la calibración de las microagujas cuya observación se realiza también bajo el microscopio. El dispositivo de AFM utilizado es un *cantilever de contacto* con constante de restitución de $0,06N/m$.

3.3.2. Medición de la elongación

En la figura 3.12 se observa un experimento típico en el que un axón es sometido a una fuerza lateral. Para completar los detalles experimentales es necesario describir nuestro método para la medición de la elongación sufrida por el axón. Aquí, la medición de la deformación del axón se realizó utilizando las pendientes que se forman entre los puntos fijos de la célula y la posición de la microaguja como se puede observar en la figura 3.11. Estos trazos pueden ser naturalmente descritos por tres rectas cuyas intersecciones representan los puntos de adhesión y la aguja.

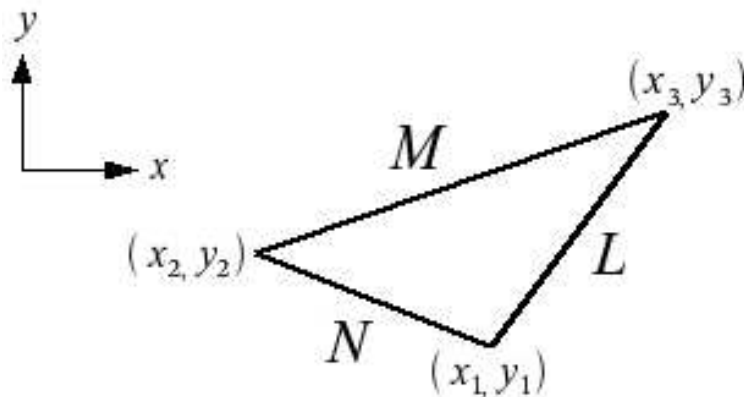


Figura 3.11: Esquema de la deformación de una cuerda

Entonces, los trazos $|L|$, $|M|$ y $|N|$ están contenidos en las rectas,

$$L(x) = lx + a \quad (3.18)$$

$$M(x) = mx + b \quad (3.19)$$

$$N(x) = nx + c, \quad (3.20)$$

donde los puntos de intersección están dados por,

$$x_1 = \frac{a-c}{n-l} \quad x_2 = \frac{b-c}{n-m} \quad x_3 = \frac{a-b}{m-l} \quad (3.21)$$

$$y_1 = \frac{cl-an}{l-n} \quad y_2 = \frac{cm-bn}{m-n} \quad y_3 = \frac{bl-am}{l-m} \quad (3.22)$$

Con ésto, las longitudes de los trazos $|L|$, $|M|$ y $|N|$ vienen naturalmente dadas por,

$$|L| = \sqrt{\left(\frac{a-b}{m-l} - \frac{a-c}{n-l}\right)^2 + \left(\frac{bl-am}{l-m} - \frac{cl-an}{l-n}\right)^2} \quad (3.23)$$

$$|M| = \sqrt{\left(\frac{a-b}{m-l} - \frac{b-c}{n-m}\right)^2 + \left(\frac{bl-am}{l-m} - \frac{cm-bn}{m-n}\right)^2} \quad (3.24)$$

$$|N| = \sqrt{\left(\frac{a-c}{n-l} - \frac{b-c}{n-m}\right)^2 + \left(\frac{cl-an}{n-l} + \frac{cm-bn}{m-n}\right)^2}, \quad (3.25)$$

obteniéndose de esta manera la elongación de la cuerda, ΔL , según,

$$\Delta L = |L| + |N| - |M| \quad (3.26)$$

Experimentalmente, en la mayoría de los casos y tal como se muestra en la figura 3.12, los puntos de adhesión del axón permanecen fijos en el transcurso del test mecánico, asegurando la validez de este método de medición de la deformación. Cuando esta condición no se satisface, los experimentos son desechados.

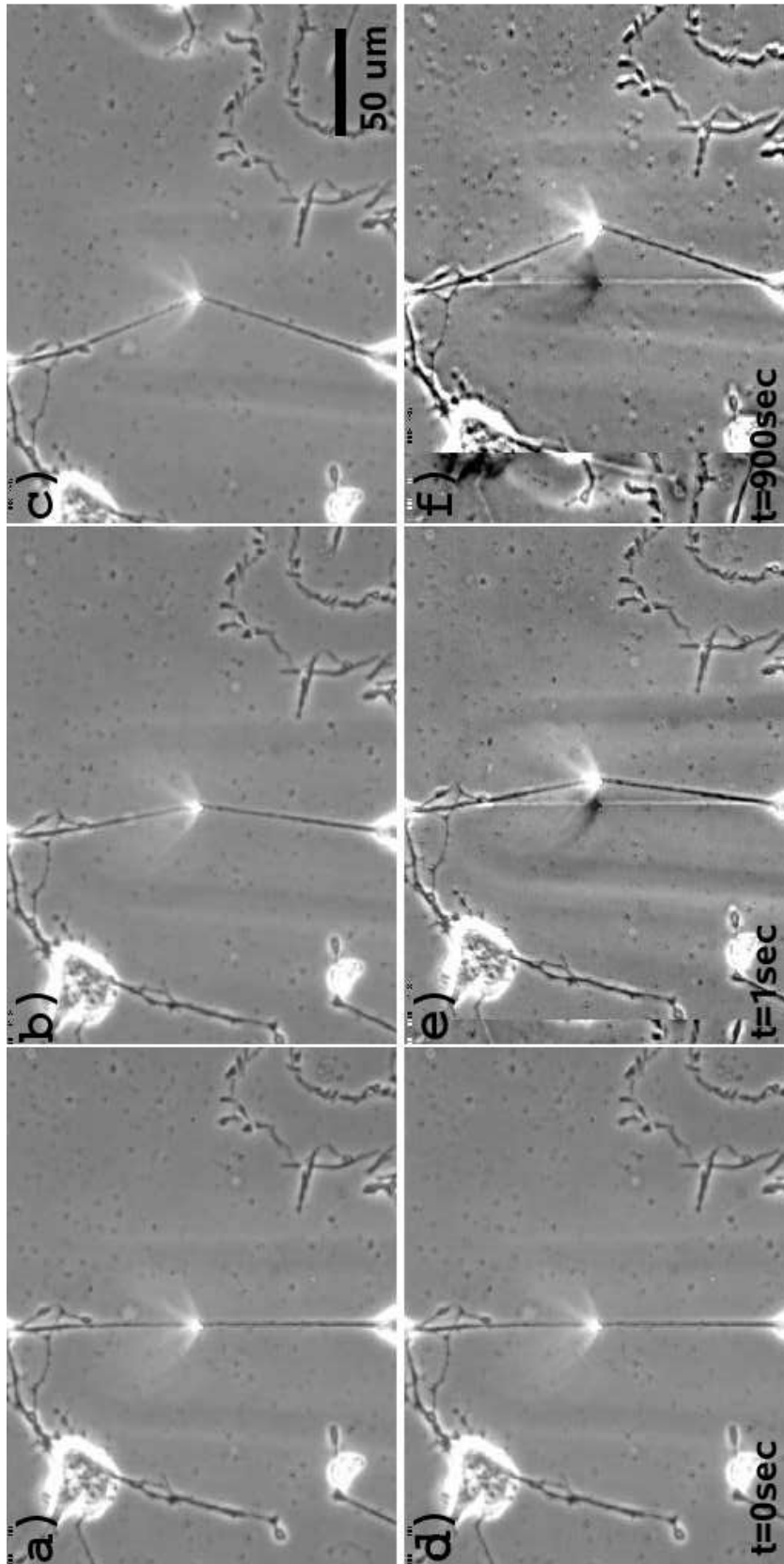


Figura 3.12: Secuencia de imágenes en que se observa en (a) al axón inicialmente recto, la fuerza aplicada por la microaguja es nula, cuya punta aparece como un punto brillante en la sección media del axón. (b) La deformación elástica inicial se realizó moviendo el motor a velocidad constante, $25\mu\text{m}/\text{s}$, durante un segundo. En (c) se observa una elongación plástica del axón después de 15 minutos. En los cuadros (d), (e) y (f) se ha realizado la comparación con el cuadro inicial, visualizándose un triángulo en el que los extremos permanecen fijos.

3.4. Resultados: Respuesta elástica

Para todos los experimentos se utilizaron neuritas de células PC-12, siguiendo el protocolo de cultivo celular descrito en el apéndice B. Se eligieron estas células puesto que éstas constituyen una especie de paradigma de la neurociencia, existiendo variados estudios sobre sus propiedades transmisoras. Esta elección también nos permite contrastar nuestros resultados con aquellos obtenidos por Lamoureux[14] y Dennerll[15].

Como ya se ha dicho, la respuesta mecánica de un axón puede ser bastante compleja y nuestro objetivo es obtener el máximo de información experimental para caracterizarla. En consecuencia, debemos encontrar una manera de separar las contribuciones de los mecanismos que regulan la respuesta del axón. En efecto, una forma de explorar casi únicamente la respuesta elástica, y excluir la respuesta viscoelástica, es producir una deformación rápida del axón. Esto se realiza experimentalmente imponiendo una velocidad constante al motor por un corto período. En experimentos preliminares, observamos que el tiempo característico de relajación viscoelástica es del orden de 10 segundos. Tomando este tiempo como antecedente, decidimos que cualquier medición de la respuesta elástica debe realizarse a lo menos en un décimo del tiempo de relajación. Así, el equilibrio entre la fuerza externa y la tensión mecánica de la neurita corresponde efectivamente a la elongación de un resorte. Sin embargo, el axón podría estar sometido a una tensión inicial T_o distinta de cero, como producto de la acción de los motores moleculares.

Los parámetros $\kappa L_x/2$ y $2T_o$ fueron obtenidos mediante un ajuste de los datos experimentales, utilizando el modelo de respuesta elástica, de la ecuación 3.5, como se muestra en la figura 3.13. El modelo simplificado captura razonablemente bien la dependencia de la fuerza observada experimentalmente.

Para un axón de sección homogénea sometido a una fuerza externa F , podemos relacionar la constante de restitución κ con su área transversal A , su largo L , su elongación Δx y un módulo de Young E , según,

$$F = k\Delta x \quad \sigma = \frac{F}{A} = E\frac{\Delta x}{L} \quad \Rightarrow \quad k = E\frac{A}{L} \quad (3.27)$$

Se observa de la figura 3.14 que la constante de restitución de los axones posee va-

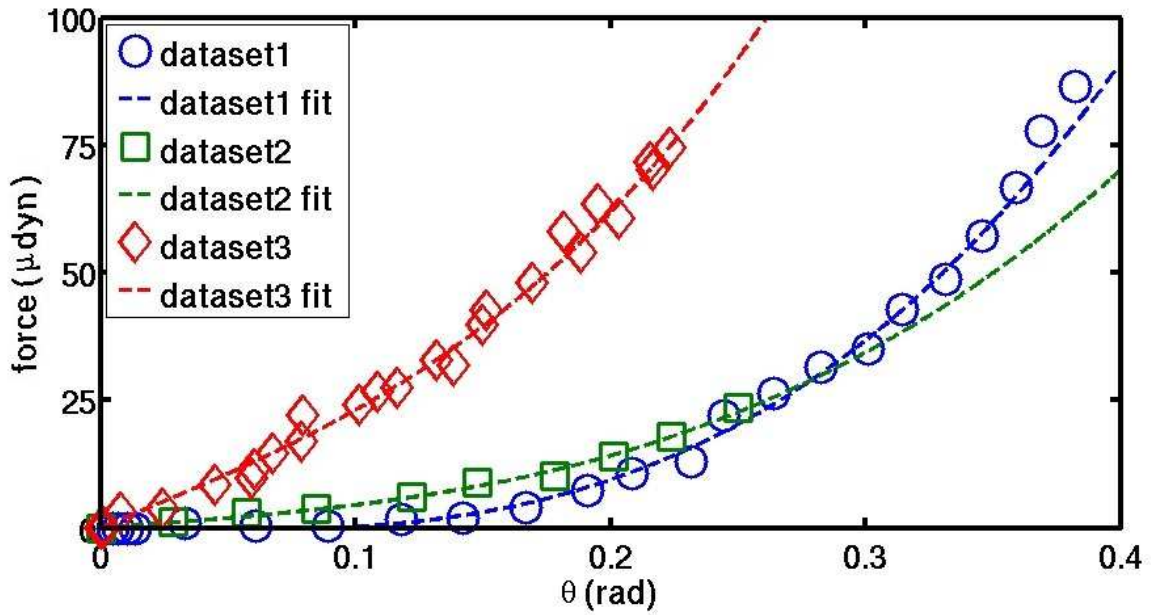


Figura 3.13: Ángulo de equilibrio y Fuerza experimentada por varios axones. Los valores de los parámetros obtenidos mediante un ajuste del modelo minimizando el error cuadrático son $\kappa(1) = 17 \pm 2 \mu\text{dyn}/\mu\text{m}$, $T_o(1) = 110 \pm 10 \mu\text{dyn}$, $\kappa(2) = 37 \pm 9 \mu\text{dyn}/\mu\text{m}$, $T_o(2) = 69 \pm 16 \mu\text{dyn}$, $\kappa(3) = 32 \pm 8 \mu\text{dyn}/\mu\text{m}$, $T_o(3) = 84 \pm 12 \mu\text{dyn}$ respectivamente.

riaciones apreciables, que consideramos relativamente normales al tratarse cada punto de un axón distinto. Sin embargo, el conjunto de datos presenta una tendencia lineal que permite determinar un valor de un módulo elástico efectivo E que representa el promedio de los axones testeados.

Este módulo elástico no es precisamente el módulo de Young asociado a un axón debido a la anisotropía presente en la estructura interna del axón, la que cuenta con una clara orientación de los microtubulos a lo largo del axón y una red cuasi orientada en la dirección de crecimiento del axón. Entonces, este módulo de Young se debe entender como un módulo asociado al conjunto de los componentes internos de un axón, es decir, la membrana celular, la red de actina los microtúbulos y los motores moleculares. Cabe mencionar que el valor de $E \simeq 12 \text{kPa}$ obtenido es comparable a módulos de Young de geles y células vivas, tales como fibroblastos. Sólo para fijar ideas recordemos que para el acero $E \simeq 200 \text{GPa}$. El coeficiente elástico asociado a la contracción transversal del axón, el coeficiente de Poisson, no pudo ser determinado dada nuestra limitación en la

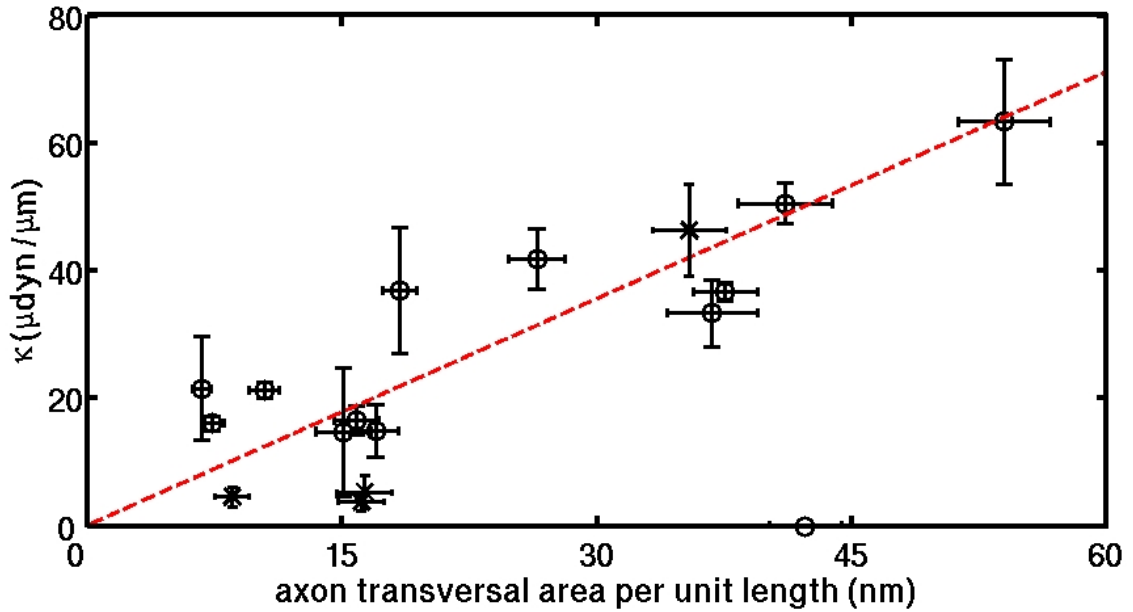


Figura 3.14: Constante elástica κ de los axones de células PC-12, para cultivos celulares con suero (\circ), y sin suero (\times). El módulo de Young se debe entender como un módulo asociado al conjunto de los componentes internos de un axón (membrana celular, red de actina, microtúbulos y motores moleculares).

resolución óptica requerida para tal medición.

Para el caso en que los axones han sido mantenidos sin suero por un período de tres horas antes del test mecánico, no hay variaciones notorias del módulo de Young. Sin embargo, el segundo parámetro de ajuste que da cuenta de la tensión inicial, contrariamente a lo que ingenuamente se podría esperar, no tiene una relación clara con las propiedades geométricas del axón (figura 3.15). Es preciso destacar, que esta tensión T_o es siempre significativa en el caso de los cultivos con concentración normal de suero (ver apéndice B). Los cultivos a los cuales les fue reemplazado el medio normal por un medio de cultivo sin suero, tres horas antes del experimento, mostraron que la tensión inicial es despreciable frente a la tensión proveniente de la elongación elástica.

Notemos finalmente que los valores de las constantes de restitución, $\kappa \sim 20 - 60 \mu dyn/\mu m$, multiplicado por el largo inicial, $L_x \sim 100 - 200 \mu m$, es siempre mayor que el valor de las tensiones iniciales T_o , validando la aproximación de la ecuación 3.5.

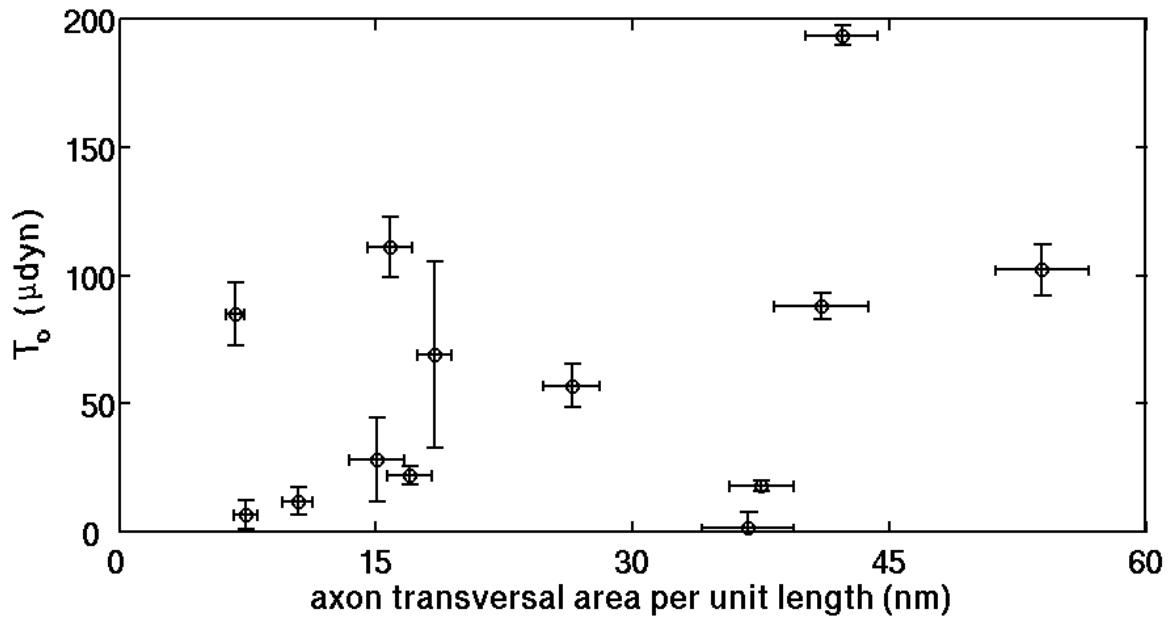


Figura 3.15: Tensión inicial T_0 obtenida mediante el ajuste del modelo de respuesta elástica.

Habiendo establecido la componente elástica principal de la respuesta mecánica de axones, en la siguiente sección nos dedicaremos a identificar su componente viscosa y activa. Antes de entrar en detalle, se debe precisar que, dado que hemos descrito la elongación total del axón en función de la posición de la microaguja, y escrito la ecuación de equilibrio 3.17 en términos de δl , podemos realizar el análisis de nuestros datos directamente de la deflexión de la microaguja, lo que en la práctica disminuye los errores experimentales.

El comportamiento mecánico de las neuritas de células PC-12 muestra dos casos límites para tiempos relativamente largos. El primero es un tipo de relajación viscoelástica con un tiempo característico que depende del cociente γ/k y que se explica relativamente bien con el modelo clásico de Dennerll[15] y Lamoureux[14] (figura 3.5a). Sin embargo, en el segundo caso, la relajación inicial es seguida por una contracción de la longitud del axón, con un segundo tiempo característico mucho más grande que el correspondiente a la relajación viscoelástica.

3.5. Resultados: Comportamiento viscoelástico o Pasivo

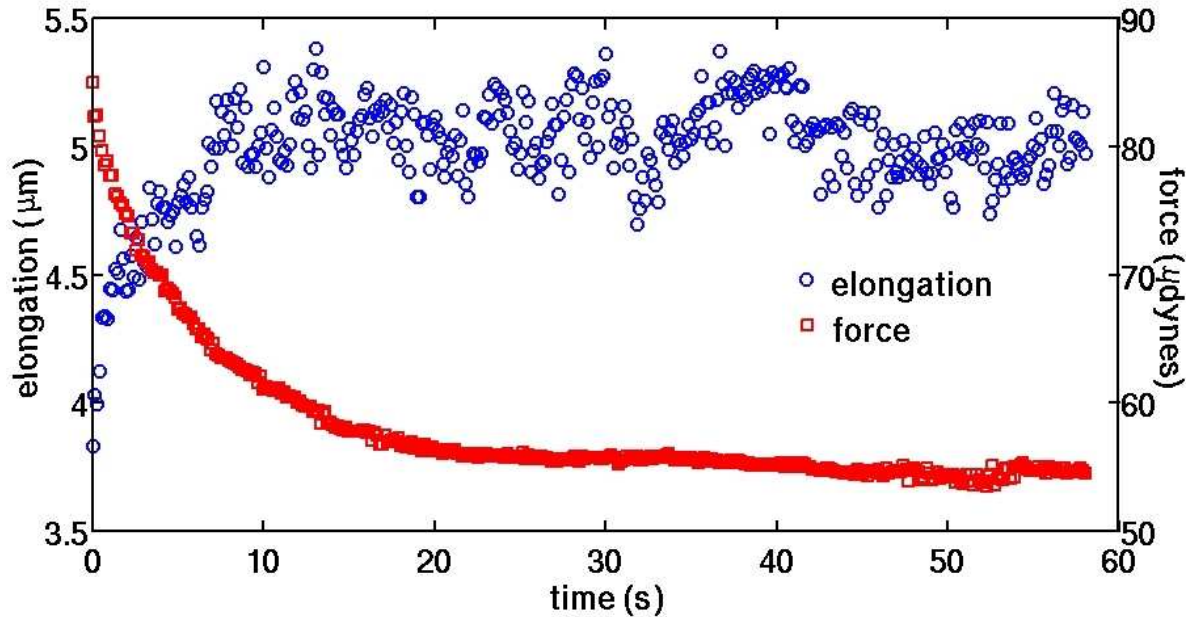


Figura 3.16: Elongación viscoelástica de un axón ante una fuerza inicial aplicada por la microaguja, $k_n l_o = 85 \mu dyn$. La longitud y tensión inicial del axón son determinadas por el test elástico $L_x = 82 \mu m$, $T_o = 102 \mu dyn$ respectivamente. El tiempo característico de relajación en este caso es del orden de 20 segundos con una fuerza final $F_f = 55 \mu dyn$.

Como se observa en la figura 3.16, la elongación del axón muestra una relajación en apariencia viscoelástica. Para observar este régimen de elongación lenta del axón se ha producido una deformación inicial rápida, como se ha descrito en la sección anterior, y luego se ha dejado evolucionar libremente el sistema aguja-axón hasta alcanzar su equilibrio; la figura 3.7 esquematiza la situación experimental y sus variables.

Hay que notar que una simple relajación exponencial no cubre todos los casos experimentales de la figura 3.17, en los que cualitativamente parece haber dos tiempos característicos. Creemos que el origen de este efecto radica en que para tasas de deformación pequeñas del axón, el comportamiento de su tensión en función de la tasa de deformación puede ser altamente no lineal.

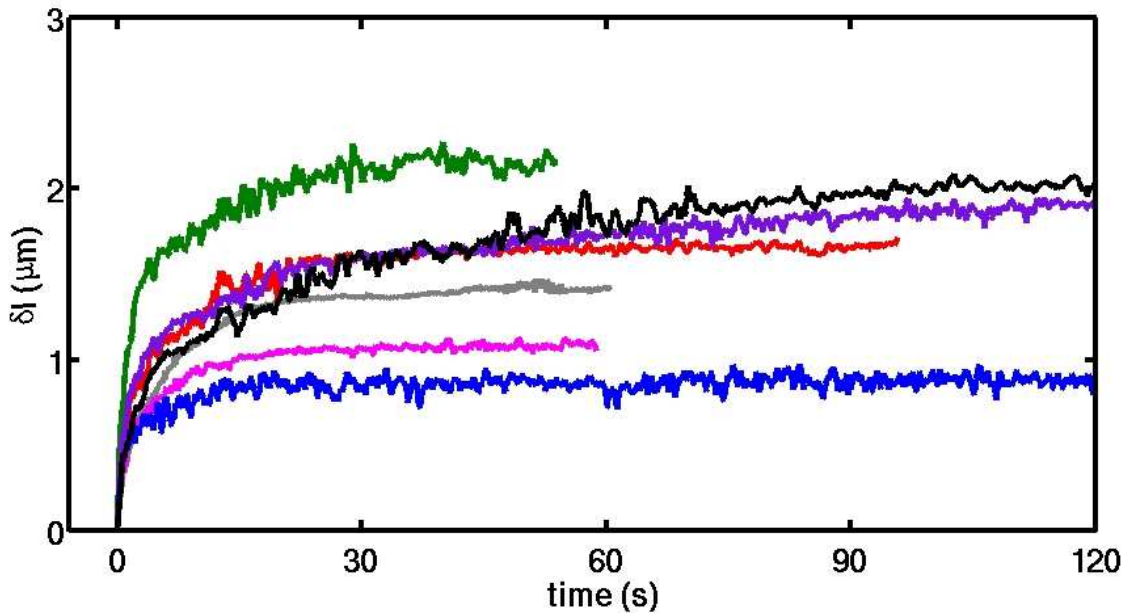


Figura 3.17: Elongación viscoelástica de axones de células PC-12, el tiempo característico es del orden de 10 segundos.

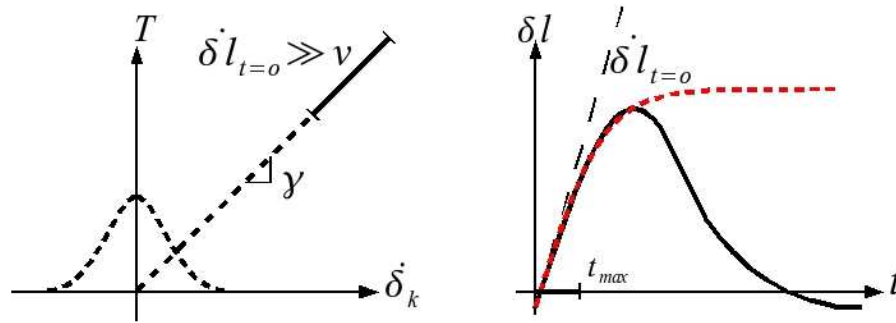
Para obtener el valor de γ sacaremos ventaja de que la fuerza aplicada sobre el axón, inmediatamente después del test elástico, es siempre mayor a T_o . Dicho de otro modo, inicialmente la relajación del axón debe estar dominada principalmente por γ . Esta hipótesis se cumple con una buena aproximación si para tiempos cortos la velocidad de deformación impuesta por la aguja es mucho mayor que el ancho v de la respuesta de los motores moleculares, como se muestra en la figura 3.18. Así, podemos reducir la ecuación 3.17, que describe la evolución de la variable δl , despreciando el término de la función gaussiana,

$$\beta\gamma\dot{\delta l} + \frac{T_a e^{-\beta^2 \delta l^2 / v^2}}{2\alpha k} + k \left(\beta + \frac{k_n}{2\alpha k} \right) \delta l = \frac{k_n}{2\alpha} l_o$$

$$\beta\gamma\dot{\delta l} + k \left(\beta + \frac{k_n}{2\alpha k} \right) \delta l = \frac{k_n}{2\alpha} l_o$$

cuya solución esta dada por,

$$\delta l(t) = \frac{k_n l_o}{2\alpha\beta k + k_n} \left(1 - e^{-\frac{2\alpha\beta k + k_n}{2\alpha\beta\gamma} t} \right)$$


 Figura 3.18: Esquema de medición de γ

Para la determinación del parámetro γ , se requiere determinar la pendiente inicial de la solución anterior. Aquí, se optó por hacer una expansión a cuarto orden de dicha solución y proceder con un ajuste polinomial del mismo orden a los datos experimentales. Esta expansión nos permite determinar el valor de γ tomando sólo los valores experimentales iniciales de la deflexión de la microaguja, sin ambigüedad y con un error del 10 %.

$$\delta l(t) \approx \frac{k_n l_o}{2\alpha\beta\gamma} t - \frac{k_n l_o(2\alpha\beta k + k_n)}{8\alpha^2\beta^2\gamma^2} t^2 + \frac{k_n l_o(2\alpha\beta k + k_n)^2}{48\alpha^3\beta^3\gamma^3} t^3 - \frac{k_n l_o(2\alpha\beta k + k_n)^3}{384\alpha^4\beta^4\gamma^4} t^4$$

con,

$$\gamma = \frac{k_n l_o}{2\alpha\beta\delta \dot{l}_o}$$

donde $\delta \dot{l}_{t=0}$ es la derivada de δl respecto del tiempo evaluada en $t = 0$. Los resultados de estos ajustes experimentales se encuentran en la figura 3.19 presentados como función de la sección del axón correspondiente. Los valores del coeficiente de disipación obtenidos aquí son comparativamente inferiores en factor que varía entre 0,1 y 0,5 a los obtenidos por Dennerll[15] y Lamoureux[14]. Esto podrá parecer una diferencia demasiado grande, sin embargo, a nuestro juicio una comparación exacta tampoco es esperable al tratarse de células de diferentes fuentes.

Desde el punto de vista físico, es interesante constatar que la tendencia lineal de γ con el área del axón puede explicarse con un modelo muy simplificado que presentamos a continuación.

Supongamos que el origen de esta disipación se encuentra relacionada con la fricción entre los distintos filamentos al interior de un axón y la acción de los motores

moleculares que están adheridos a estos filamentos [18]. Considerando además a un motor molecular como un resorte con la habilidad de adherirse periódicamente a un filamento (figura 3.20). El período de adhesión está dado por τ y su constante de restitución es k_{mot} . La elongación que sufre el motor por el desplazamiento del filamento a velocidad V es, $V\tau_{on}$, donde τ_{on} es la fracción de tiempo durante el cual el motor ha permanecido adherido. La fuerza de restitución es $k_{mot}V\tau_{on}$, la que podemos escribir como γV , por lo que en términos de la disipación por motor en un período es $\gamma_{mot} = pk_{mot}\tau_{on}$, con $p = \tau_{on}/\tau$.

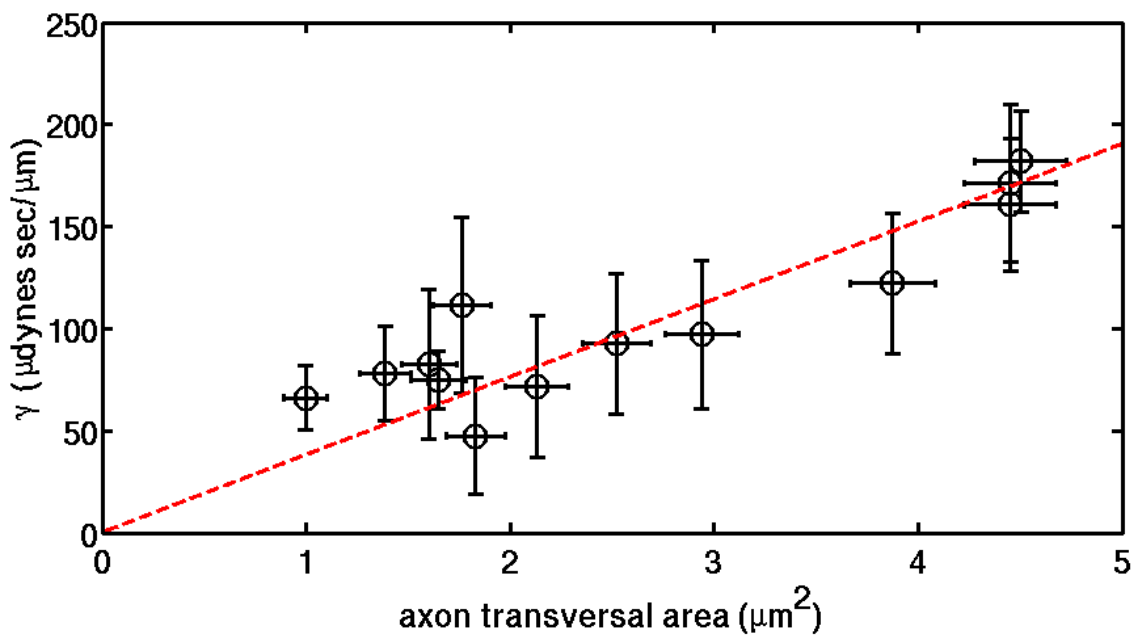


Figura 3.19: Medición de la disipación γ en función del área transversal del axón.

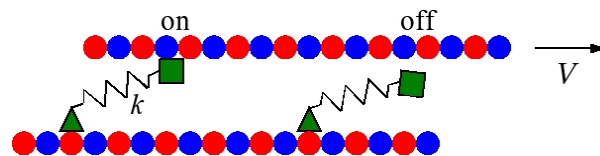


Figura 3.20: En este esquema la energía elástica almacenada en el resorte que representa al motor molecular es liberada cuando el motor se desprende de la fibra. Entonces, podemos considerar este proceso como si se tratara de disipación.

Dado que la disipación asociada a un motor molecular adherido a una fibra es proporcional a su constante de restitución k_{mot} y considerando el mismo análisis que nos permitió estimar el módulo de Young de nuestros axones, podemos reescribir la disipación como una función proporcional al módulo de Young promediado por el número y tipo de motores presentes, así como el tiempo $\hat{\tau}$ ahora es el tiempo promedio que caracteriza un ciclo promedio de hidrolización de ATP para todos los motores moleculares.

$$\gamma = \left[p \frac{E \hat{\tau}}{l_{mot}} \right]_{motor} A_{axon} \quad (3.28)$$

Para validar esta última expresión, supongamos:

$$p = 1/2 \quad \Rightarrow \quad \tau_{on} = \tau_{off}$$

$A_{axon} = 1 \mu m^2$, área transversal de un axón.

$E \approx 10 kPa = 10^5 dyn/cm^2$, módulo de Young efectivo.

$\hat{\tau} \approx 10^{-3} s$, tiempo promedio de hidrolización del ATP in vivo.

$l_{mot} \approx 10 nm = 10^{-6} cm$, tamaño típico de un motor molecular.

Con estos valores, obtenemos un valor para γ del orden de $50 \mu dyn \cdot s / \mu m$, validando la hipótesis de que la viscosidad proviene de la fricción entre los motores moleculares y las fibras al interior del axón (Ref. [18]).

3.6. Resultados: Comportamiento Activo

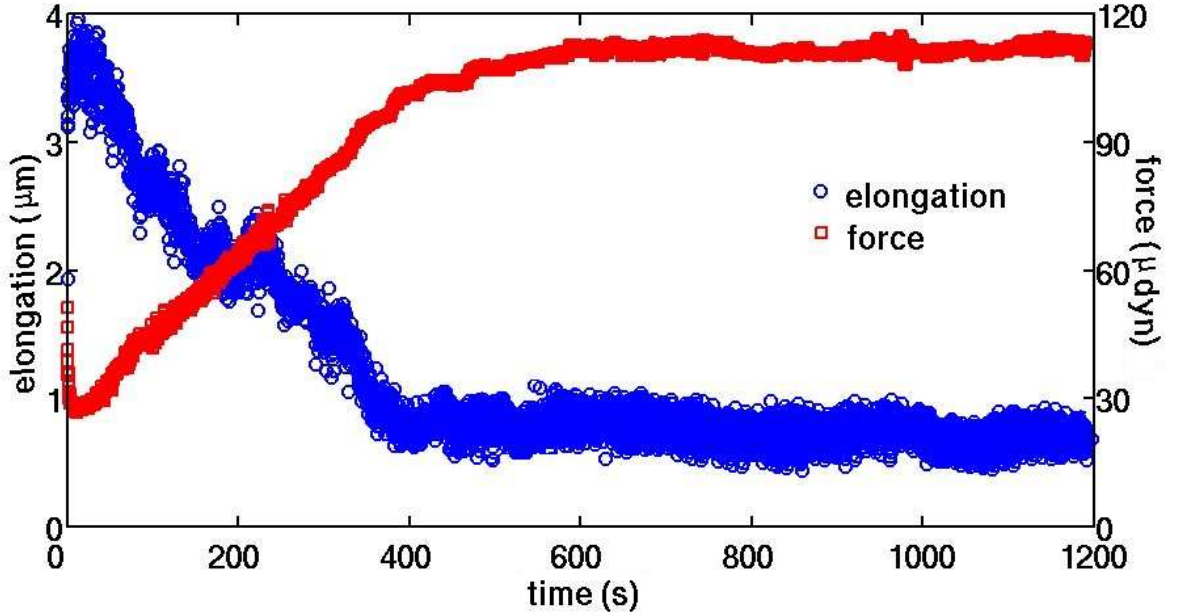


Figura 3.21: La fuerza final registrada por la microaguja es aproximadamente el doble de la fuerza inicial impuesta. Se observa también que la pendiente de la elongación a tiempos largos es negativa, lo que indica una contracción o equivalentemente, una velocidad de deformación negativa. La fuerza inicial aplicada es de $50\mu dyn$, el largo y el inicial $L_x = 104\mu m$.

En muchos de los casos investigados la relajación viscoelástica del axón está seguida por una contracción con un segundo tiempo que caracteriza este comportamiento (figuras 3.21 y 3.22). Esta nueva escala de tiempo, que denominaremos τ_{mot} , está dada esencialmente por la pendiente de la respuesta mecánica con la que hemos modelado a los motores moleculares T_a/v , jugando un rol similar al de γ .

Dado que la contracción implica $\dot{\delta}l < 0$, y en esta región la respuesta del sistema debe estar gobernada por la respuesta de los motores, y a fin de obtener una estimación del tiempo de contracción, simplificaremos su acción por una función triangular de alto T_a y base $2v$. Con esta aproximación podemos escribir la ecuación 3.17 como,

$$\frac{T_a}{v}\dot{\delta}l + k\left(\beta + \frac{k_n}{2\alpha k}\right)\delta l = \frac{k_n l_o}{2\alpha} - T_a$$

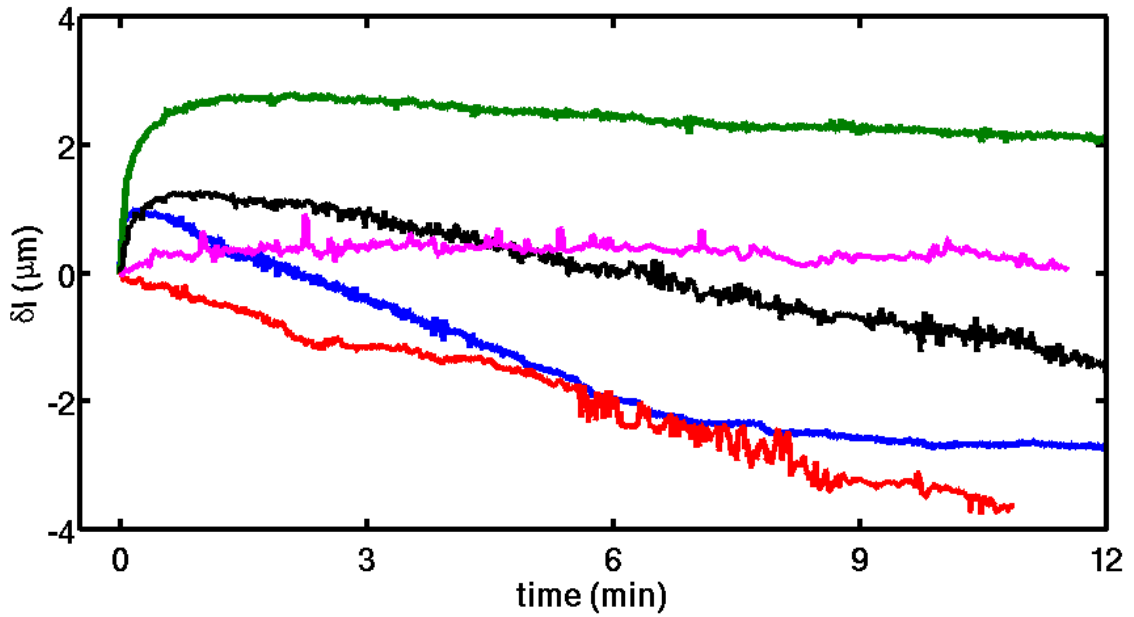


Figura 3.22: Deflexión de la aguja para los axones que presentaron comportamiento activo. Al igual que el caso anterior, la elongación viscoelástica inicial posee un tiempo característico del orden de 10 segundos. La contracción es mucho más lenta, lo que indica que existe otra escala de tiempo que no puede ser asociada a la fricción interna.

obteniendo así un tiempo característico de la respuesta según,

$$\tau_{mot} = \frac{1}{k \left(\beta + \frac{k_n}{2\alpha k} \right)} \frac{T_a}{v} \quad (3.29)$$

A partir de los resultados experimentales de deflexión de la aguja, y con el modelo que incluye una respuesta en forma de gaussiana para los motores moleculares, se ajustaron los valores de T_a , v y k . En principio el ajuste a tres parámetros parecería excesivo, sin embargo, examinemos primero los valores obtenidos para T_a que se ilustran en la figura 3.23b en función de la velocidad v y comparémoslos con la tensión inicial T_o , figura 3.23a. La figura 3.23c nos muestra que, en la mayoría de los casos estas tensiones a lo más difieren en un 30 %, salvo en dos casos en que la diferencia puede ir hasta un 100 %, indicando que ambas tensiones son consistentes entre ellas.

Notemos que en condiciones de equilibrio, y dado que k es pequeño ambas tensiones deben ser muy cercanas. De este modo, aunque T_a haya sido obtenido de un ajuste a tres parámetros, su rango de variación está muy limitado no pudiendo ser variado arbitrariamente. Nuestro ajuste entonces nos permite estimar v y k con una aproximación razonable. Un hecho notable de estos datos es que T_a y en menor proporción T_o están claramente correlacionadas con v . Esto podría ser una coincidencia para el caso de T_o , pero a nuestro juicio encierra algo profundo que trataremos de dilucidar en el futuro, sobre todo porque al graficar T_o (o T_a) en función del área del axón no obtuvimos correlación alguna, ver figura 3.15.

Por su parte, el ancho de la gaussiana v se presenta como función del área del axon en la figura 3.24. Sus valores son del orden de fracciones de $\mu m/s$ y no presenta correlación clara con el área del axón.

La constante de rigidez k , introducida por Dennerll[15] y Lamoureux[14], en paralelo con la disipación viscosa γ , no parece tener una relación con la geometría del axón, contrariamente a lo observado para κ que resultó ser lineal con el área del axón. Por completitud, la figura 3.25 ilustra k como función del área aparente del axón, si bien, los valores obtenidos son compatibles con aquellos determinados en [15] y [14], no se observa correlación alguna con el área. Cabe destacar que los valores de k obtenidos aquí indican que las fuerzas asociadas a esta rigidez son casi siempre despreciables frente a T_o , lo que limita la precisión de los ajustes realizados para obtener esta constante.

A modo de resumen, en la figura 3.26 ilustramos la conexión entre el comportamiento pasivo y activo y los parámetros de los motores moleculares definidos en nuestro modelo. En la figura 3.26a ilustramos el caso puramente pasivo y estable, en el que la respuesta de los motores moleculares influencia la respuesta pasiva del axon sólo a tasas de deformación comparables con v . Un comportamiento similar se presenta en la figura 3.26b, sólo que aquí la respuesta viscosa, representada por γ , y el efecto de los motores moleculares, representado por v , claramente compiten dando origen a una respuesta global pasiva, es decir, una fuerza viscosa casi insensible a la tasa de deformación, cuando esta última es pequeña. En este caso, es interesante notar que el aparente ruido de los datos presentados en la figura correspondiente no necesariamente se debe a alguna imprecisión experimental. Más bien, éste podría estar relacionado con una alta sensibilidad del axón a fluctuaciones mecánicas externas (figura 3.27). Esta sensibilidad

a fluctuaciones por parte del axón, naturalmente se debería a que, en este régimen, cualquier variación de la tasa de deformación prácticamente no introduce un cambio de la fuerza viscosa, lo que constituye un argumento interesante a explorar para validar nuestra descripción. Por último, para un régimen de parámetros adecuados, como los presentados en la figura 3.26c, a tasas de deformación pequeñas, la respuesta pasiva total del axón es dominada por la contribución de los motores moleculares, produciendo una sensibilidad negativa a cambios en la tasa de deformación. Naturalmente las regiones de pendiente negativa de la curva tipo N están prohibidas por ser inestables ante cualquier perturbación, permitiendo explicar la transición entre un alargamiento del axón y su posterior contracción. En efecto, de no existir esta región de inestabilidad, el axón sólo podría relajar a una tensión cercana a T_a sin contracción alguna. La figura 3.27(a) ilustra la trayectoria seguida por las variables del axón para transitar desde un estado de alargamiento a uno de contracción. En alargamiento, cuando la tasa de deformación alcanza el valor para el cual la fuerza viscosa es mínima, el sistema debe saltar a tasas de deformación negativas o contracción, a fin de evitar la región de inestabilidad figura 3.27(b). La ecuación que rige tal transición requiere de un nuevo término capaz de manejar un cambio brusco de tasa de deformación, es decir, un término de inercia. En nuestro caso, este término no juega ningún rol en el comportamiento mecánico del axón, entonces el balance de fuerzas implica,

$$\beta m \ddot{\delta} l + \beta \gamma \dot{\delta} l + T_a e^{-\beta^2 \dot{\delta} l^2 / v^2} + k \left(\beta + \frac{k_n}{2\alpha k} \right) \delta l = \frac{k_n}{2\alpha} l_o \quad (3.30)$$

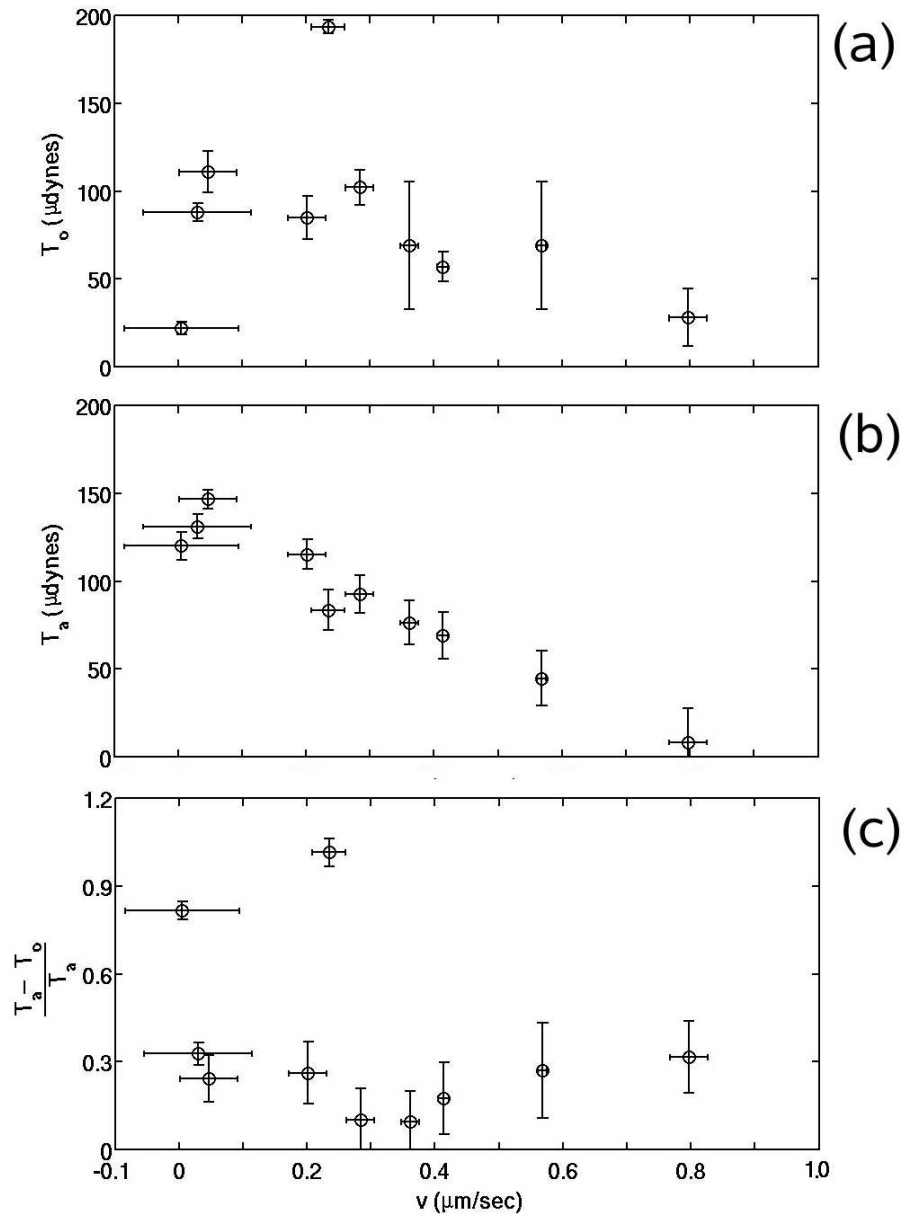


Figura 3.23: Tensiones características de los motores moleculares T_a , comparada a la tensión inicial del axón inferida del test elástico, T_o . En (a) se muestra la tensión inicial T_o obtenida del test mecánico como función del ancho v encontrado por el modelo que hemos introducido. En (b) hemos relacionado la tensión T_a y el ancho de la respuesta gaussiana v , que corresponden a la respuesta mecánica de los motores moleculares. Se puede observar que las tensiones T_o y T_a , inferidas por métodos completamente independientes, son compatibles con el hecho de existir una tensión residual producto de la presencia de los motores moleculares. En (c) se muestra el error relativo referido a la tensión T_a con un error, salvo 2 casos, del 30 %.

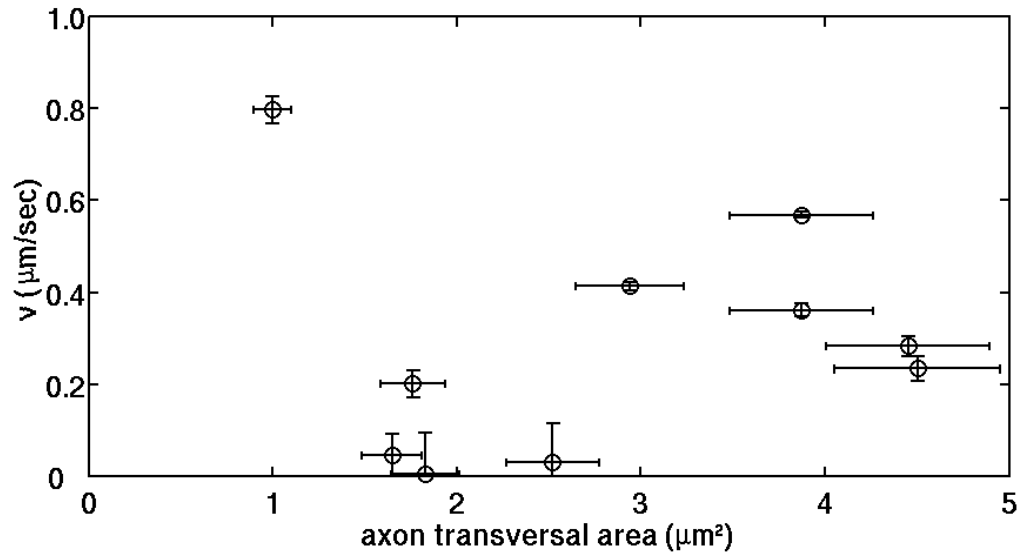


Figura 3.24: Ancho de la respuesta Gaussiana vs sección transversal del axón.

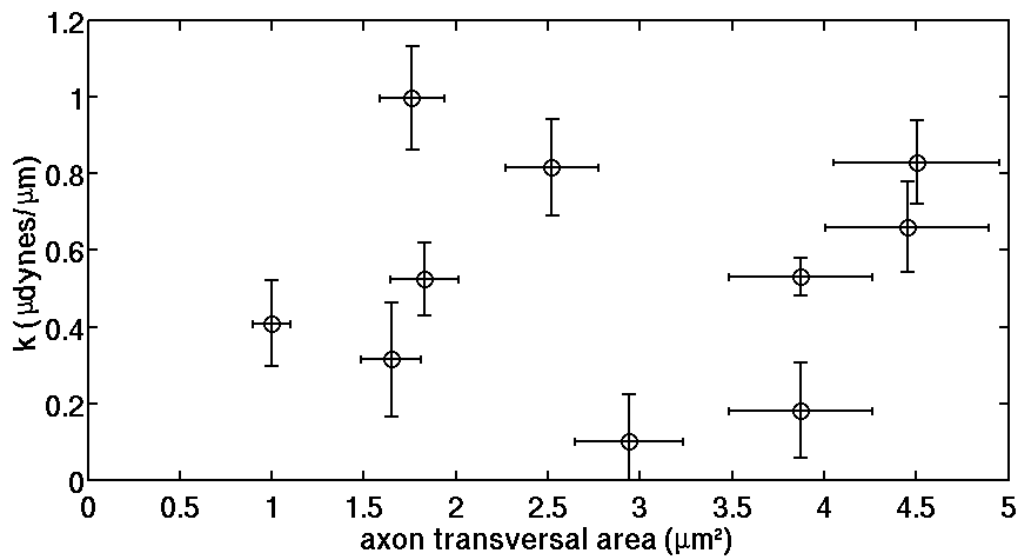


Figura 3.25: Constante elástica k de axones en función de su área. No se observa correlación entre estas cantidades.

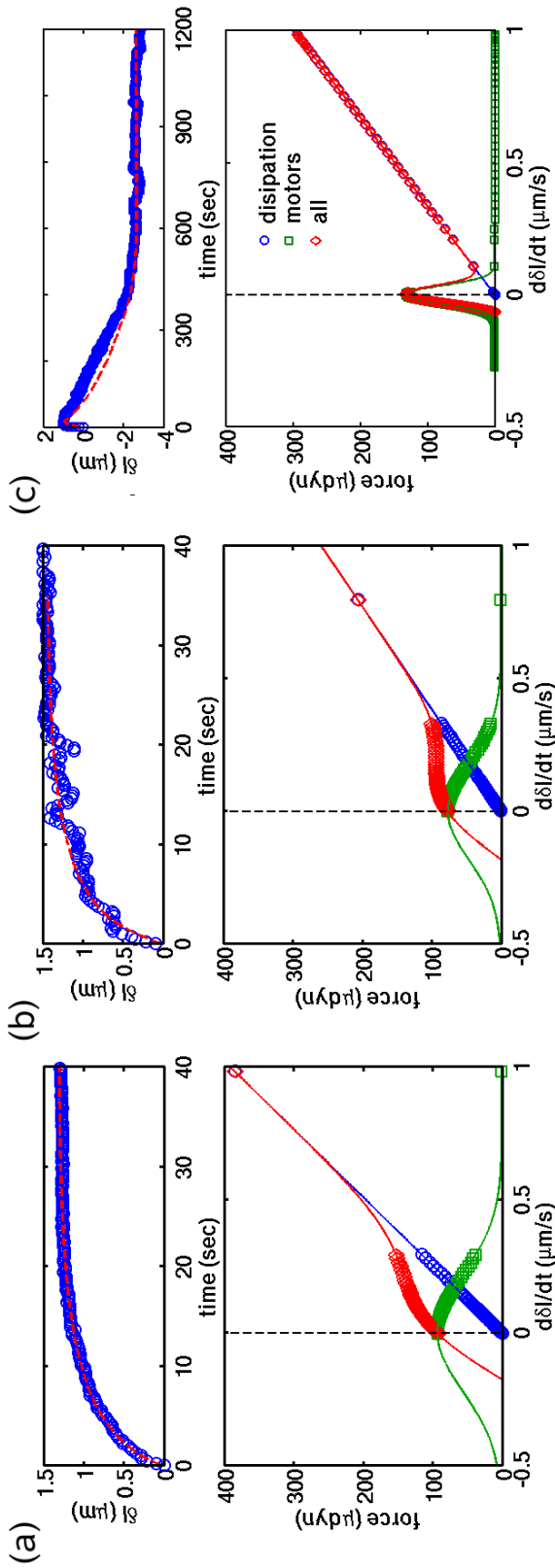


Figura 3.26: Como se muestra en estas tres figuras, la respuesta mecánica depende del valor de la disipación interna dada por el valor de γ y la pendiente máxima de la respuesta gaussiana del conjunto de motores moleculares dada por el cociente T_a/v , en los dos primeros casos (a) y (b), el valor de γ es igual o mayor que T_a/v , mostrando una relajación en la variable δl y para el tercer caso (c), vemos que la pendiente de la respuesta de los motores es más pronunciada que la disipación, por lo que hay una región en la que la fuerza disminuye para velocidades de deformación positivas.

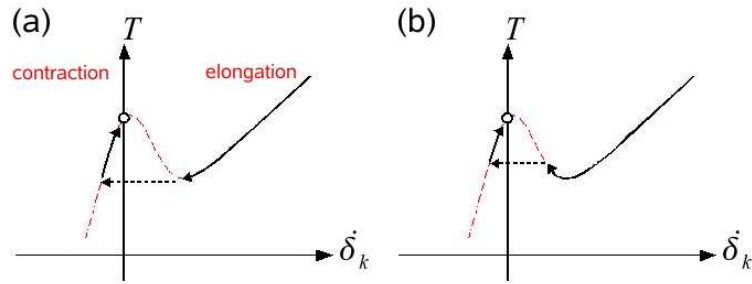


Figura 3.27: Transición entre estados estables que depende del término inercial.

Finalmente, la transición entre el régimen pasivo a activo observado en nuestros experimentos puede sintetizarse en el diagrama de fases definido por γ y el cociente T_a/v , según se ilustra en la figura 3.28. La razón entre estas dos cantidades determina si existe una región de inestabilidad para la respuesta global del axon. Como regla general, si $\gamma < T_a/v$, aparece una región de inestabilidad y una transición desde un estado de alargamiento a uno de contracción es observable.

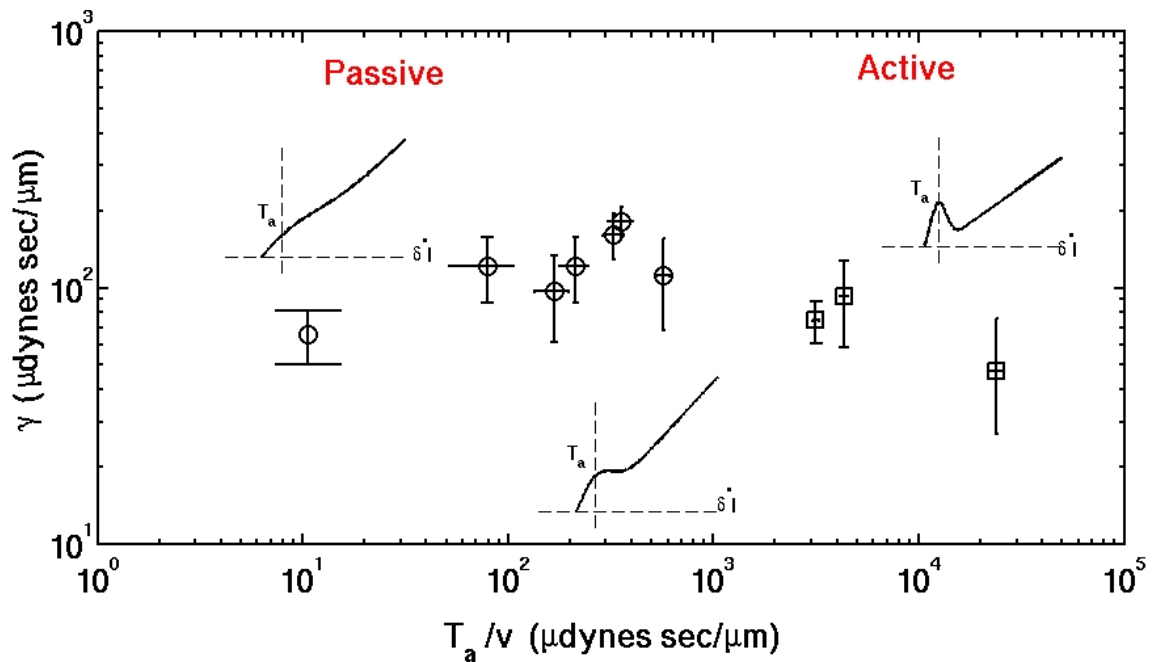


Figura 3.28: Diagrama de fase ilustrando la transición entre el comportamiento pasivo y activo, en el espacio definido por γ y T_a/v

3.7. Conclusiones

Las constantes elástica encontradas, κ , son compatibles con los valores medidos en trabajos previos [14] y [15]. Sin embargo, nuestros resultados permitieron demostrar experimentalmente que la constante de rigidez de un axón es función de la geometría de éste. Este resultado, aparentemente obvio, permite además determinar un módulo de Young efectivo, cuyo valor es compatible con aquel de la materia constitutiva de los axones. Contrariamente a lo que se podría esperar, la tensión residual T_o del axón no presentó correlación visible con su geometría.

A partir del modelo más simple concebible compatible con los comportamientos pasivo y activo observados experimentalmente, se determinaron los parámetros básicos del axón, a saber, γ , T_a , v y k .

El parámetro γ también mostró un comportamiento lineal con la sección transversal del axón ya que la fricción interna depende del número de filamentos al interior del axón que es proporcional a su área.

T_a definida como tensión máxima producida por los motores moleculares, presentó cierta correlación con T_o , y resultó ser una función decreciente de la velocidad v . Consistentemente, T_a no exhibió ninguna correlación con el área del axón. Ambas tensiones, la residual T_o , y T_a , deben depender de cada axón, puesto que representan básicamente la concentración de motores moleculares. Por otro lado, la velocidad característica de contracción también debe ser una función de la concentración de motores, lo que explicaría la relación entre T_a y v .

Por su parte, los valores de v , del orden de $0,1 - 1\mu m/s$, obtenidos a partir de nuestro modelo mecánico simplificado, son compatibles con los valores determinados *ex-situ* para motores individuales. Nuestros datos experimentales sugieren que los distintos motores moleculares [16][17] presentes en el axón ejercen una tensión que depende de la velocidad de deformación del axón.

Finalmente, en nuestra discusión sobre nuestro modelo operacional del axón y los motores moleculares hemos evitado las consideraciones de estabilidad. Estas condiciones, sin embargo, son absolutamente necesarias para entender una transición entre comportamiento pasivo y activo, que es la que nos concierne aquí. Veremos en el capítulo siguiente, que bajo ciertas condiciones, los axones pueden presentar comportamientos oscilatorios, compatibles con una región de inestabilidad en la respuesta viscosa.

Cuadro 3.1: Correlación entre los parámetros

| Parámetro | Tiene correlación con | No tiene correlación con |
|-----------|-----------------------|--------------------------|
| κ | A/L | — |
| γ | A | — |
| T_o | v | A, L |
| T_a | v | A, L |
| k | — | A, L, T_a, v |

A Sección transversal del axón.

L : Longitud del axón.

κ : Constante de restitución asociada a la respuesta elástica de la red de actina.

T_o : Tensión inicial del axón.

γ : Disipación asociada a la fricción interna del axón.

k : Interacción entre las distintas fibras y los motores moleculares.

T_a : Tensión máxima de los motores moleculares a velocidad de deformación nula.

v : Velocidad típica de respuesta de los motores moleculares.

Capítulo 4

Axón bajo un flujo laminar

Los experimentos de respuesta mecánica nos han permitido inferir el módulo elástico, su tensión inicial, la fricción interna y la respuesta global de los motores moleculares.

Sin embargo, un test mecánico utilizando microagujas no nos permite explorar las propiedades de axones en los casos en los que hemos reducido la concentración normal de suero (apéndice B). Las tensiones iniciales T_o inferidas bajo estas condiciones resultaron ser siempre despreciables frente a la tensión elástica. Por lo que un método complementario debe ser desarrollado para estos casos.

Una solución a esta limitación es el uso de un flujo laminar, con el que nos es posible imponer una fuerza viscosa o *drag* alrededor de un axón. La acción de este flujo es compensada por la respuesta mecánica del axón, el que alcanzará el equilibrio, ante esta fuerza externa, bajo la forma de una catenaria como veremos a continuación.

4.1. Ecuaciones de equilibrio

Consideremos al axón como una cuerda con extremos fijos (figura 4.1), la ecuación de onda para una cuerda sometida a un flujo viscoso se escribe:

$$\rho_l \frac{\partial^2 \xi}{\partial t^2} = T \frac{\partial^2 \xi}{\partial x^2} + \omega \left(1 - \frac{1}{U} \frac{\partial \xi}{\partial t} \right) \quad (4.1)$$

donde ρ_l es la densidad lineal, T es la tensión de la cuerda, y ω es la fuerza viscosa, que depende de la velocidad relativa del punto $\xi(x, t)$. La solución estacionaria para esta ecuación es $\xi_0(x) = -\omega/2Tx^2$.

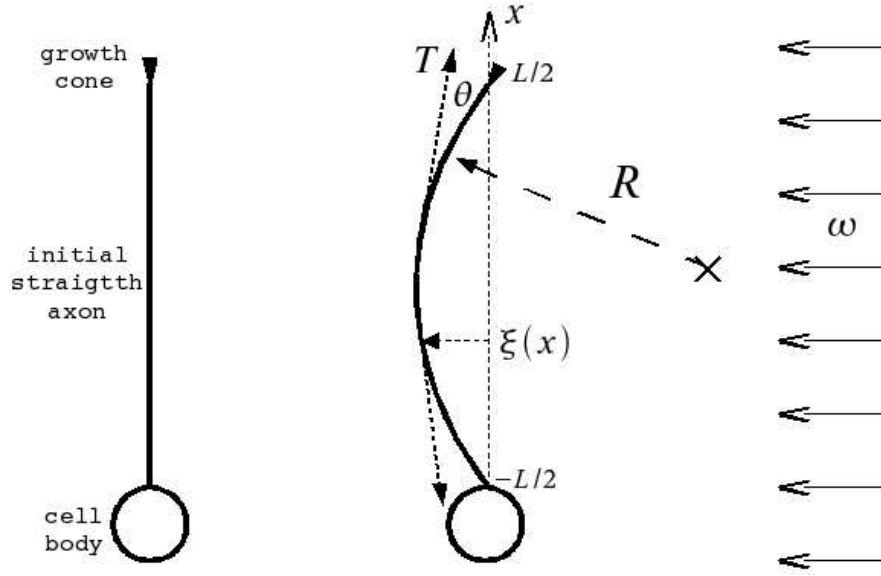


Figura 4.1: La curvatura de una cuerda o en este caso un axón depende de las propiedades elásticas del objeto y de la fuerza viscosa aplicada.

Ante una perturbación en el flujo, esperamos que la solución a la ecuación se encuentre en torno a la solución estacionaria, es decir $\xi = \xi_0 + \delta\xi$, por lo que la ecuación diferencial en torno a este punto se reescribe como:

$$\rho_l \frac{\partial^2 \delta\xi}{\partial t^2} + \frac{\omega}{U} \frac{\partial \delta\xi}{\partial t} = T \frac{\partial^2 \delta\xi}{\partial x^2} \quad (4.2)$$

De esta ecuación, podemos obtener el tiempo característico de relajación ante una perturbación de la fuerza viscosa comparando el término inercial con la disipación:

$$\rho_l \frac{\delta\xi}{\tau^2} \sim \frac{\omega}{U} \frac{\delta\xi}{\tau}$$

$$\tau \sim \frac{U \rho_l}{\omega} \quad (4.3)$$

Para fijar las escalas presentes, tomemos la densidad del agua como un valor aceptable para la densidad de una célula $\rho = 1g/cm^3 = 10^{-12}g/\mu m^3$, el radio de un axón del orden de $r = 1\mu m$, la velocidad del fluido cercano a una pared $U \sim 100\mu m/s$, y la fuerza viscosa asociada $\omega = 10 \times 10^{-4} \mu dyn/\mu m$, obtenemos un tiempo característico $\tau \sim 10^{-1}s$, es decir, para considerar la inercia en nuestro problema, debemos explorar

tiempos menores a τ , en los que el término de disipación no influye demasiado. En otras palabras, podemos despreciar la inercia en comparación con la fuerza viscosa para tiempos mayores que τ . Con esta ventaja, podemos escribir la tensión mecánica de nuestra cuerda biológica como un sistema en equilibrio.

Consideremos una cuerda fija en los puntos $x = \pm L_x/2$, la cual soporta una fuerza por unidad de longitud ω como se muestra en la figura 4.2. El equilibrio mecánico se encuentra dado por:

$$T(\theta + d\theta) \sin(\theta + d\theta) - T(\theta) \sin(\theta) = \omega ds \quad \rightarrow \quad d(T(\theta) \sin(\theta)) = \omega ds \quad (4.4)$$

$$T(\theta + d\theta) \cos(\theta + d\theta) - T(\theta) \cos(\theta) = 0 \quad \rightarrow \quad d(T(\theta) \cos(\theta)) = 0 \quad (4.5)$$

La solución a la última ecuación, la cual establece el equilibrio mecánico en el eje x es $T(\theta) = T / \cos(\theta)$, donde T es la tensión de la cuerda. Reemplazando este resultado en la ecuación que establece el equilibrio mecánico en el eje y :

$$d \left(T \frac{\sin(\theta)}{\cos(\theta)} \right) = \omega ds$$

$$d \left(T \frac{dy}{dx} \right) = \omega \sqrt{1 + \frac{dy^2}{dx^2}} dx \quad (4.6)$$

La solución a esta ecuación diferencial, es la correspondiente a una cuerda bajo la acción de su propio peso (*catenaria*). Pero en este caso en particular, el peso por unidad de longitud es debido a la fuerza viscosa por unidad de longitud ω .

$$y(x) = \frac{T}{\omega} \cosh\left(\frac{\omega}{T}x\right) \quad (4.7)$$

$$T(x) = T \cosh\left(\frac{\omega}{T}x\right) \quad (4.8)$$

Utilizando los valores típicos de la fuerza viscosa ω , tensión mecánica T y longitud de un axón L_x , la tensión $T(x) = T \cosh(\omega L_x/2T) \approx T$, este resultado nos dice que existe una tensión homogénea a lo largo del axón.

Dado que en equilibrio, la curvatura del axón es descrita por una catenaria, podemos calcular su elongación y escribir el estado de tensión a lo largo del axón como función de la elongación experimentada por la presencia de la fuerza de arrastre del fluido.

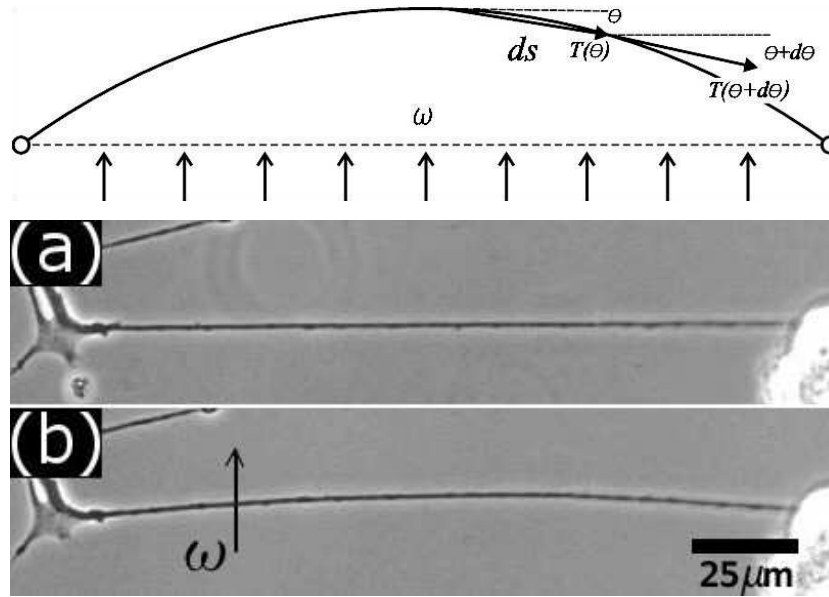


Figura 4.2: (arriba) Representación esquemática de una cuerda bajo una tensión homogénea ω , (a) Neurita(axón) de una célula PC12 sin la acción del flujo, (b) Efecto del flujo sobre la neurita después de dos minutos.

$$y(x) = \frac{T}{\omega} \cosh\left(\frac{\omega}{T}x\right)$$

$$\delta l = \int_{-L_x/2}^{L_x/2} \sqrt{1 + y'(x)^2} dx - L_x$$

$$\delta l = 2\frac{T}{\omega} \sinh\left(\frac{\omega L_x}{2T}\right) - L_x$$

$$\delta l \approx 2\frac{T}{\omega} \left(\frac{\omega}{2T} L_x + \frac{1}{6} \left(\frac{\omega L_x}{2T} \right)^3 \right) - L_x \approx \frac{L_x^3 \omega^2}{24T^2}$$

La tensión del axón en función de la elongación experimentada se escribe:

$$T(\delta l) \approx \sqrt{\frac{L_x^3 \omega^2}{24\delta l}} \quad (4.9)$$

Esta tensión es debida a la acción del flujo laminar sobre el axón, la que es compensada por la tensión interna que hemos modelizado anteriormente. Por lo que nos es posible escribir un set de ecuaciones que describan el equilibrio del sistema,

considerando ahora que el valor de la tensión inicial T_o es igual a la tensión máxima de respuesta de los motores moleculares.

$$\kappa\delta_\kappa + T_a = \sqrt{\frac{L_x^3\omega^2}{24\delta l}} \quad (4.10)$$

$$k\delta_k + \gamma\dot{\delta}_k + T_a e^{-\delta_k^2/v^2} = \kappa\delta_\kappa + T_a \quad (4.11)$$

$$\delta_\kappa + \delta_k = \delta l \quad (4.12)$$

Ahora, δl representa la elongación total del axón, y realizando el mismo procedimiento para obtener la ecuación de equilibrio para esta variable,

$$\delta_\kappa = \frac{1}{\kappa} \sqrt{\frac{\omega^2 L_x^3}{24\delta l}} - \frac{T_a}{\kappa} \quad (4.13)$$

$$\delta_k = \delta l - \frac{1}{\kappa} \sqrt{\frac{\omega^2 L_x^3}{24\delta l}} + \frac{T_a}{\kappa} \quad (4.14)$$

$$\dot{\delta}_k = \left(1 + \frac{1}{2\kappa} \sqrt{\frac{\omega^2 L_x^3}{24\delta l^3}}\right) \dot{\delta} l \quad (4.15)$$

Finalmente, reescribiendo la ecuación 4.11:

$$\gamma \left(1 + \frac{1}{2\kappa} \sqrt{\frac{\omega^2 L_x^3}{24\delta l^3}}\right) \dot{\delta} l + T_a e^{-\left(1 + \frac{1}{2\kappa} \sqrt{\frac{\omega^2 L_x^3}{24\delta l^3}}\right)^2 \delta l^2/v^2} - \left(1 + \frac{k}{\kappa}\right) \sqrt{\frac{\omega^2 L_x^3}{24\delta l}} + k\delta l = -\frac{k}{\kappa} T_a \quad (4.16)$$

A pesar de la dificultad técnica que representa esta última ecuación, podemos, sin embargo, hacer observaciones cualitativas en los siguientes experimentos, los que han sido realizados bajo una fuerza por debajo de los $50\mu dyn$ y con deformaciones máximas del 1%.

4.2. Montaje experimental

La celda de flujo laminar fue construida de acero inoxidable con una cámara interior de 20mm de largo 8mm de ancho y $0,5\text{mm}$ de alto (figura 4.3). Esta celda es introducida en una segunda celda de aluminio, la que es mantenida a una temperatura de 37°C , por medio de un baño térmico Haake, DC1, la temperatura en la muestra es medida con el uso de una termocupla. El medio celular es introducido por una bomba de pistón controlada por un motor DC, con él que podemos explorar caudales de hasta $100\mu\text{L}/\text{s}$.

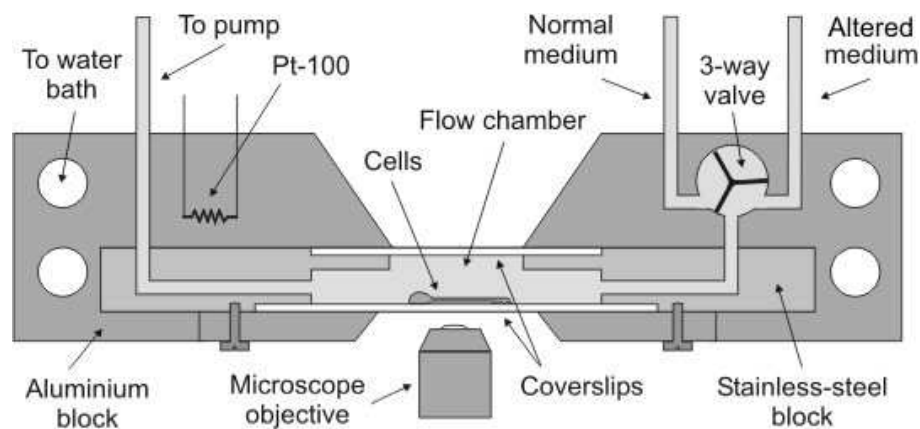


Figura 4.3: Vista lateral de la celda utilizada en los experimentos de flujo laminar.

El microscopio utilizado es un Ziess Axiovert-135, en modo de contraste de fase, con una magnificación total de $60\times$. La adquisición de imágenes fue realizada con una cámara Visitron System modelo 9.0 monochrome-6, y el software de adquisición de imágenes MetaVue 6.1.

4.3. Medición de la fuerza y Elongación

4.3.1. Medición de Fuerzas

La fuerza viscosa por unidad de longitud fue medida por medio del seguimiento de partículas de latex en el mismo plano focal del axón en cuestión, con la que realizamos una medición local de la velocidad U del fluido. Por tanto, la carga que soporta el axón es aproximadamente igual a la carga que soporta un cilindro de radio R inmerso en un fluido con velocidad U , como se ha descrito en el apéndice A.1.3.

$$\omega = \frac{4\pi\eta U}{\ln\left(\frac{3,7\nu}{RU}\right)} \quad (4.17)$$

Las propiedades del medio de cultivo GIBCO RPMI a $37^\circ C$ son $\nu = 0,6953 \times 10^{-2} Stokes$, $\eta = 0,6947 \times 10^{-2} Poise$ y su densidad $\rho = 0,9992 g/cm^3$.

La medición de la tensión del axón fue realizada por medio de un ajuste del perfil experimental obtenido de la secuencia de imágenes que describe al axón utilizando la solución de catenaria.

$$y(x)_{exp} = \frac{T}{\omega_{exp}} \cosh\left(\frac{\omega_{exp}}{T}x\right)$$

4.3.2. Medición de la Elongación

La forma usual de medir la elongación calculando la longitud final e inicial de un axón introduce un error relativo significativo, dado que la resolución óptica usando los objetivos de microscopio descritos, es de aproximadamente de $0,3\mu m/pixel$, y la elongación típica de una neurita bajo la acción de un flujo es menor al $1\% \sim 1\mu m$. Por otro lado, la medición de la curvatura experimentada por la neurita es una medida global de la elongación, por lo que la medición de la elongación fue realizada midiendo la curvatura del perfil por medio de un ajuste parabólico con: $y''(x=0) \approx 1/R = C$, donde C es igual a dos veces el valor de la constante de ajuste de la parábola. Con este método, podemos registrar elongaciones del orden de $10nm$. Bajo estas consideraciones, podemos escribir la elongación como:

$$\delta l = L - L_x = \frac{C^2 L_x^3}{24} \quad (4.18)$$

4.4. Resultados

Los cultivos celulares desarrollados para estos experimentos difieren de los cultivos normales sólo en la última etapa, en la cual es retirado el medio de cultivo regular y en su lugar es introducido un medio sin presencia de suero. En estas condiciones, como hemos explisitado en la sección anterior, podremos explorar la respuesta mecánica de las neuritas de células PC-12 para valores pequeños de T_o , lo que no es posible con un test utilizando microagujas.

Dado que el flujo toma alrededor de un segundo en alcanzar su estado de equilibrio al interior de la celda, no es posible realizar una medición de la tensión inicial presente en el axón. Sin embargo, en los experimentos realizados en neuritas de células PC-12, se observó en todos los casos un salto en la curvatura al momento en que el flujo es introducido. Este salto, corresponde a la respuesta elástica del axón, haciendo que el radio de curvatura del axón, inicialmente recto, disminuya drásticamente desde infinito a un valor finito del radio de curvatura, con un valor de tensión en primera aproximación igual a ωR .

Bajo la influencia de la fuerza viscosa, las elongaciones máximas registradas son del orden de $1\mu m$. Además, el salto de curvatura involucra una elongación inicial del orden de $10nm$. Es decir, las elongaciones experimentadas por la respuesta elástica son despreciables frente a las elongaciones provenientes del sistema en paralelo que hemos denotado δ_κ . Sin embargo, dado que el resorte representado por κ se encuentra acoplado en serie con los otros elementos, la tensión de este elemento es del orden de T_a aún cuando la elongación δ_κ sea nula.

Bajo estas consideraciones, la ecuación 4.10, se reduce a:

$$2T_a = \sqrt{\frac{\omega^2 L_x^3}{24\delta l}} \quad (4.19)$$

Como se muestra en la figura 4.4, la elongación experimentada por el axón ante un incremento de la fuerza viscosa ω es compatible con un estado de tensión constante T_a . Éste es nuevamente, un resultado que no puede ser capturado con un modelo que sólo incluya elementos mecánicos clásicos (figura 3.5).

La posterior evolución del sistema reveló nuevamente el comportamiento viscoelástico, en el que la disipación predomina en la respuesta mecánica de los axones, evidenciado por una relajación hasta un valor estacionario en su elongación como se observa en la figura 4.5. Y en el caso de respuesta activa la elongación inicial es seguida por una contracción como se aprecia en la figura 4.6.

Sin embargo, debemos destacar, que las elongaciones experimentadas son menores a $1\mu m$, en un tiempo del orden del minuto, por lo que las velocidades de deformación son del orden de $10^{-3}\mu m/s$, es decir, nos encontramos explorando la estabilidad del punto de funcionamiento de la respuesta mecánica en función de la velocidad de deformación.

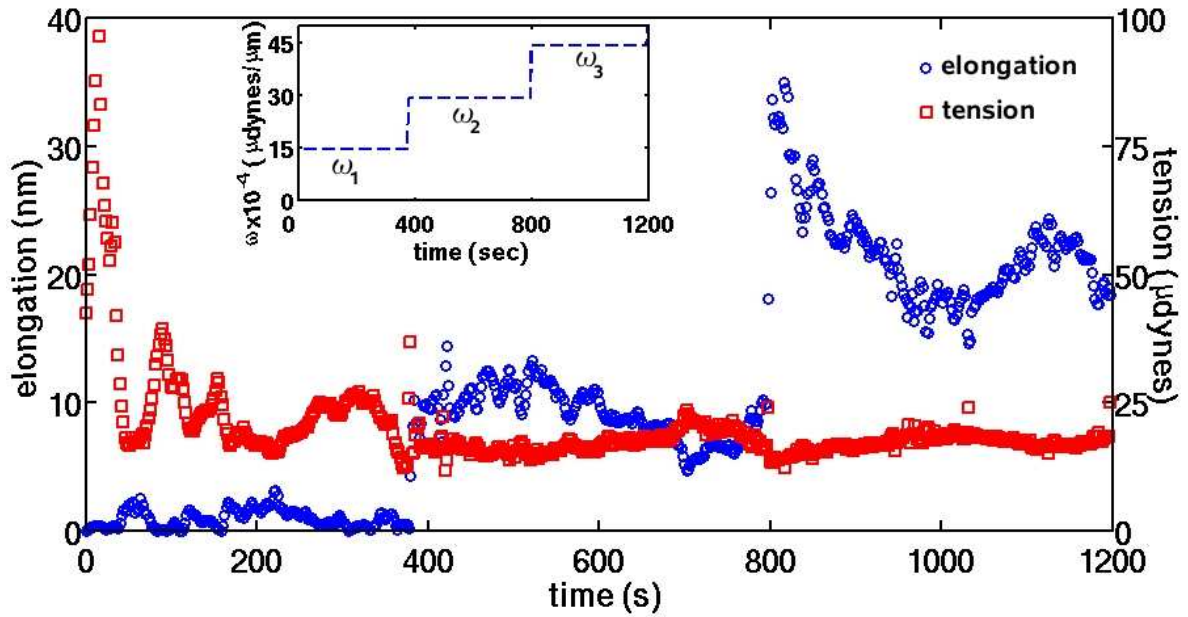


Figura 4.4: Experimento realizado con incrementos de la fuerza viscosa (*inset*), la longitud inicial $L_x = 198\mu m$, la fuerza viscosa por unidad de longitud $\omega_1 = 14,7$, $\omega_2 = 29,4$, $\omega_3 = 44,2 \times 10^{-4} \mu dyn/\mu m$, la tensión promedio es de $20,23 \mu dyn$. La tensión inicial T_a inferida por los incrementos de ω es de $T_a = 9,6 \pm 1,62 \mu dyn$.

Bajo nuestro modelo de respuesta, el punto de funcionamiento de los axones en función de la velocidad de deformación es siempre estable para valores cercanos a cero. En efecto, si la fuerza impuesta se encuentra en torno al valor de la tensión T_a , será difícil diferenciar la curva de respuesta entre un caso pasivo y uno activo, a menos que aumentemos la magnitud de la fuerza externa, lo que implicará una velocidad de deformación instantánea compatible con esta fuerza. Y sólo en este caso podremos vislumbrar el tipo de respuesta mecánica que caracteriza al axón en cuestión.

Para evidenciar este comportamiento, en el caso de respuesta activa, en que la pendiente dada por T_a/v es mayor que γ , debemos imponer una fuerza mayor que el umbral de estabilidad, y seremos testigos de una ya conocida oscilación de relajación. Aún cuando no hemos caracterizado este umbral, experimentalmente hemos registrado oscilaciones de relajación periódicas (ver figura 4.7). Dado que la fuerza externa es del orden de T_a , cualquier fluctuación comparable al umbral crítico, hará que el axón salga del estado de equilibrio, debiendo explorar cada vez la curva de respuesta.

Bajo estas condiciones $\delta l \sim \delta_k \sim 0$, podemos despreciar el término de restitución y escribiendo la respuesta gaussiana en torno a $\delta_k \sim 0$, encontramos:

$$\gamma \delta l - T_a \frac{2}{v^2} \left(1 - \frac{\dot{\delta} l^2}{v^2} \right) \delta l^2 = 2T_a$$

Este comportamiento periódico es finalizado al aumentar la fuerza viscosa ω (ver figura 4.8). Debiendo incluir en este caso la deformación δl , ya que la aproximación $\delta_k \sim 0$ no es válida en este caso y bajo este análisis, la curva de respuesta según la ecuación 4.16, depende tanto de $\dot{\delta} l$, como de δl .

4.5. Conclusiones

La utilización del flujo laminar, con el que hemos impuesto una fuerza de arrastre sobre el axón, ha mostrado ser una herramienta útil en los casos en que los axones han sido privados de suero. Bajo estas condiciones, la tensión T_o , T_a disminuye considerablemente en comparación con las muestras en las que se utilizó una concentración normal de suero.

La fuerza de arrastre en estos casos, $F_w \approx \omega R$, es comparable a la tensión residual y las deformaciones observadas experimentalmente son en general menores $1\mu m$, es decir, nos encontramos explorando la estabilidad del punto de equilibrio, $\dot{\delta}_k \sim 0$. En torno a este punto de funcionamiento mecánico estable, la pendiente se encuentra influenciada por γ , ya que en esta región la respuesta es gaussiana es plana. Para los casos en que el valor de γ es mayor o igual al cociente T_a/v , se observa nuevamente un comportamiento del tipo viscoelástico (ver figura 4.5), y en los casos en que γ es menor a T_a/v , la respuesta dinámica ante una fuerza externa nos permitiera explorar nuevamente el tránsito entre las regiones estables del comportamiento activo.

La curva de respuesta mecánica posee un punto estable en $\dot{\delta}_k = 0$ para γ y T_a/v positivos, y en los casos en que existe una zona de sensibilidad negativa (comportamiento activo), el cambio de pendiente de la curva está dado por:

$$T_{motor}(\dot{\delta}_k) = \gamma \dot{\delta}_k + T_a e^{-\dot{\delta}_k^2/v^2}$$

$$\frac{\partial T_{motor}}{\partial \dot{\delta}_k} = 0,$$

a primer orden, encontramos $\bar{v} = \gamma v^2/2T_a$. Sin embargo, la curva de funcionamiento, descrito como función de la velocidad de deformación, es modificada por el tipo de test mecánico a realizar, y que en este caso, no solo depende de la velocidad de deformación $\dot{\delta}_k$, sino que además es función de la deformación δ_k , haciendo que un análisis más profundo sea significativamente más complejo.

A pesar de esta dificultad, nuestro modelo es capaz de describir incluso oscilaciones de relajación observadas experimentalmente por primera vez (ver figura 4.7), y como esta respuesta oscilatoria depende de la fuerza externa aplicada y del estado de deformación y (figura 4.8).

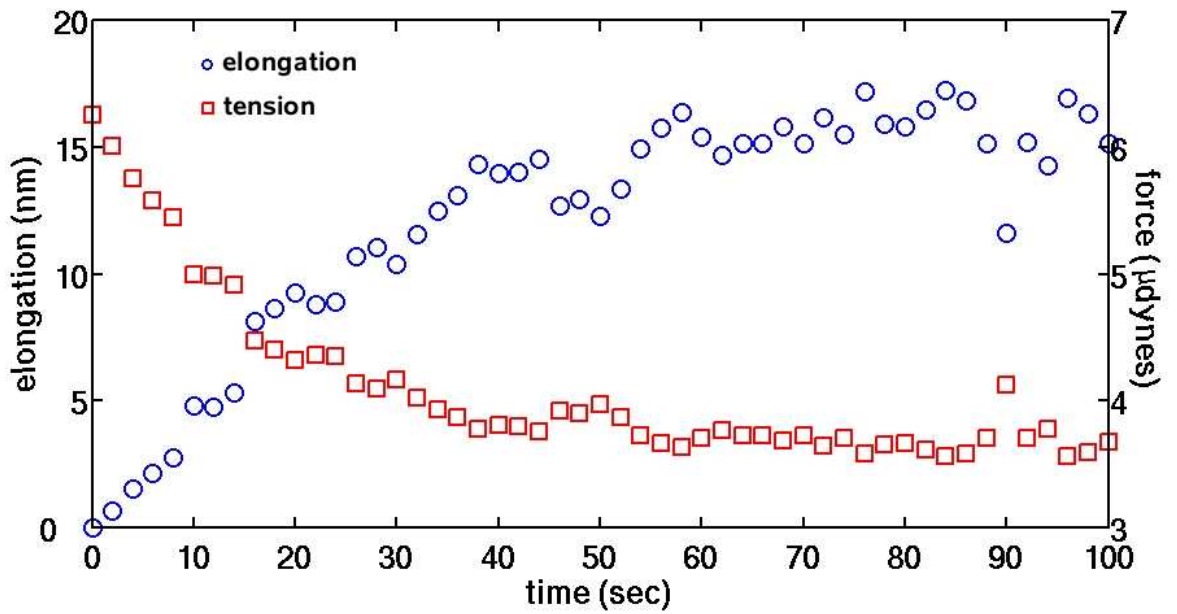


Figura 4.5: Experimento bajo un flujo constante, evidenciando un comportamiento pasivo con una longitud inicial $L_x = 95,5\mu m$, la fuerza viscosa por unidad de longitud $\omega = 29,415 \times 10^{-4}\mu dyn/\mu m$ y tensión $T_a = 3,7\mu dyn$.

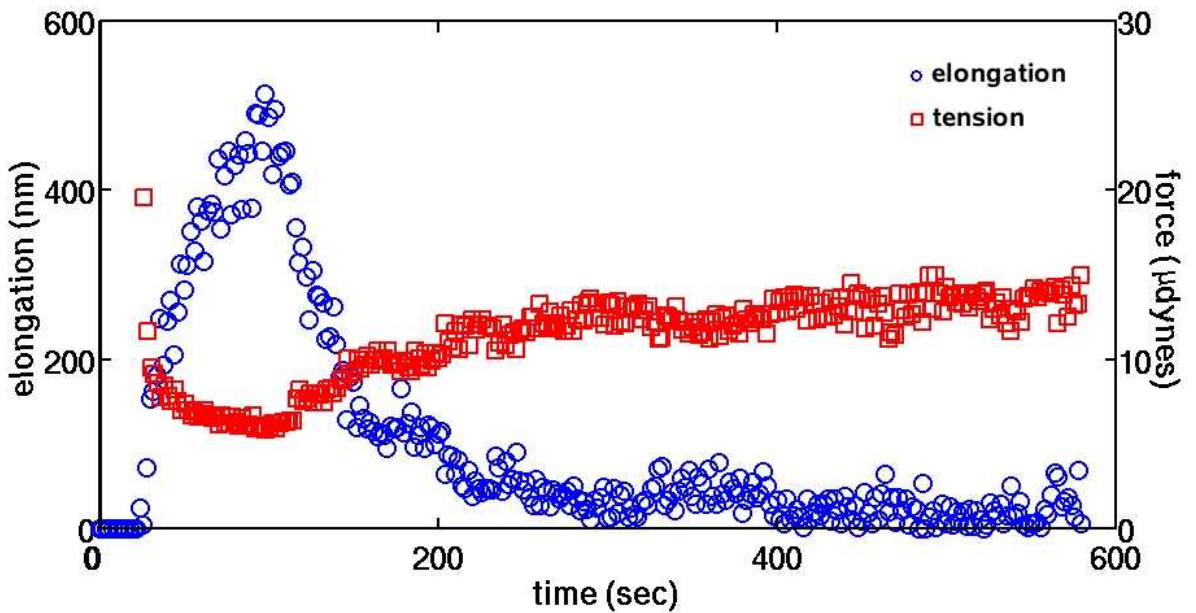


Figura 4.6: En este caso, el comportamiento activo con una fuerza viscosa por unidad de longitud $\omega = 63 \times 10^{-4}\mu dyn/\mu m$, longitud inicial del axón $L_x = 244,7\mu m$ y la tensión $T_a = 14,6\mu dyn$.

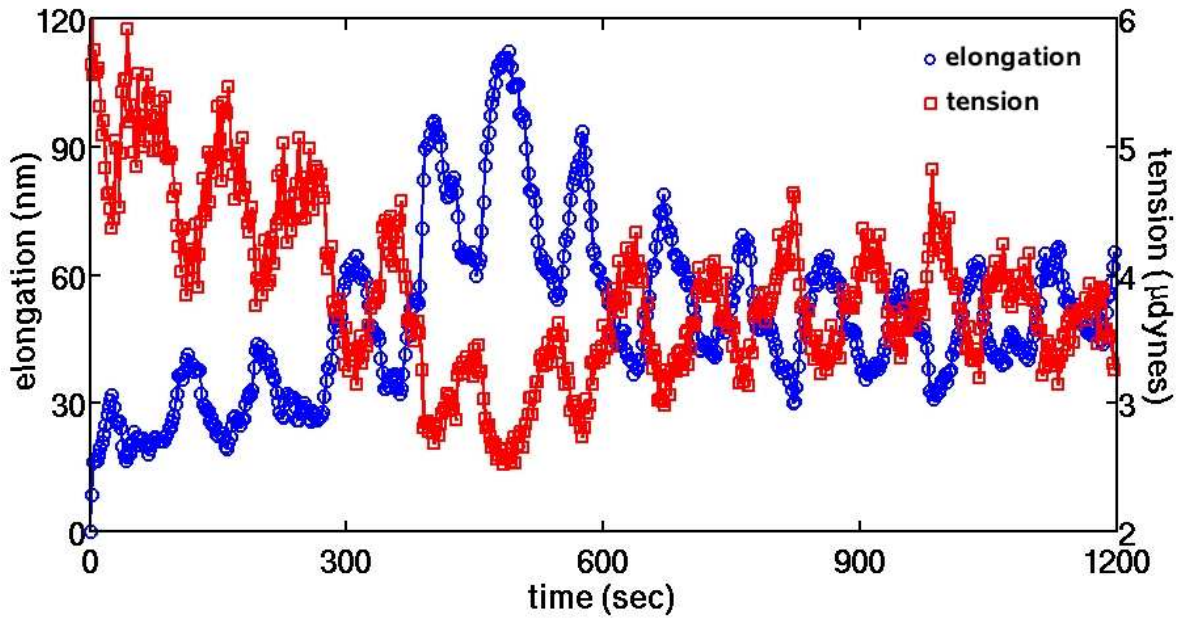


Figura 4.7: Experimento bajo un flujo constante, la longitud inicial de la neurita es $L_x = 196\mu m$ y fuerza viscosa por unidad de longitud $\omega_1 = 15,8 \times 10^{-4}\mu dyn/\mu m$. Las oscilaciones tienen una periodicidad del orden de 50 segundos, una amplitud y tensión promedio de $20nm$ y $3,7\mu dyn$ respectivamente.

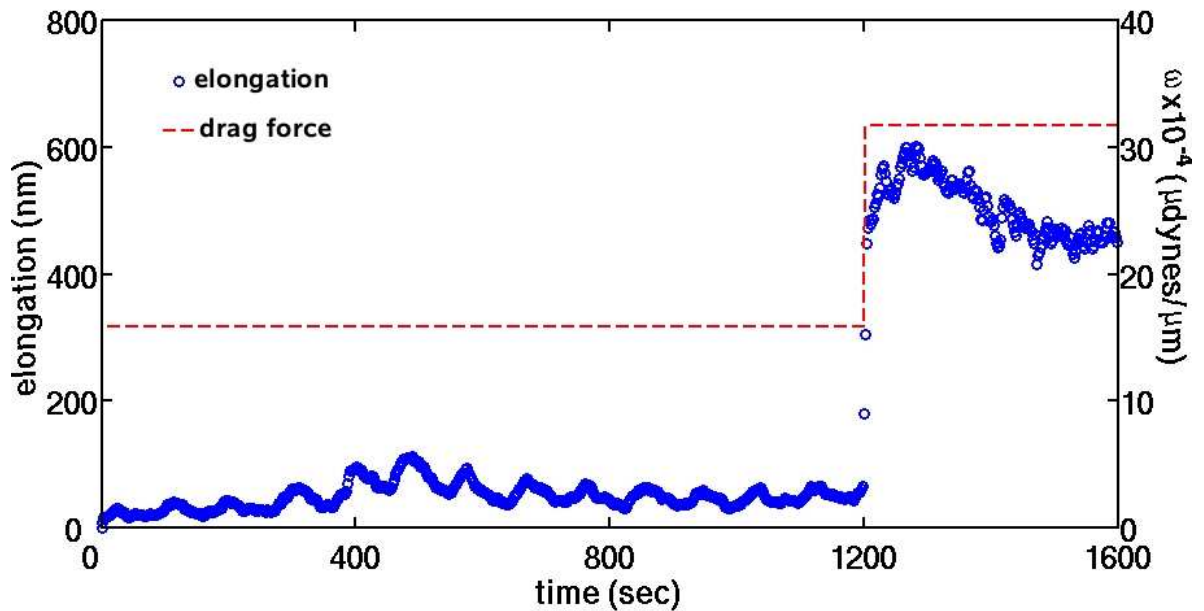


Figura 4.8: Las oscilaciones en la longitud del axón cesaron al aumentar la fuerza viscosa a $\omega_2 = 31,6 \times 10^{-4}\mu dyn/\mu m$, cambiando la curva de respuesta del axón.

Capítulo 5

Conclusiones generales

A partir de los métodos experimentales desarrollados en esta tesis, hemos inferido las propiedades elásticas de membranas de espesor nanométrico y las condiciones de borde de membranas en las que se medieron las fuerzas que ejerce una célula en su movimiento. Así también, hemos proporcionado evidencia y mostrado un ejemplo en el que la longitud de los pliegues no es sensible a la fuerza aplicada, mostrando además que la aparición de los pliegues obedece a una inestabilidad que depende fuertemente de la tensión inicial de la membrana. A pesar de la dificultad técnica del problema, hemos propuesto un método alternativo basado en la medición de la amplitud del campo de “arrugas” en las membranas, que a nuestro juicio, dará una mayor sensibilidad a la medición de las fuerzas ejercidas por una célula sobre un sustrato elástico.

La medición de las fuerzas generadas por una célula es ya un problema de interés básico en biología, sin embargo, la pregunta de fondo que persiste es ¿Cuál es la respuesta mecánica de una célula bajo un estímulo físico-químico externo?.

Dada la intrincada complejidad de este tipo de sistemas fue necesario realizar una serie de aproximaciones tanto del punto de vista biológico como del físico, reemplazando el objeto de nuestro estudio por una neurita o axón. Dada la geometría quasiunidimensional del axón, podemos abordar su estudio como si se tratase de una cuerda unidimensional sometida a una fuerza de tracción.

Utilizando el modelo propuesto por Dennerll[15] hemos incluido la acción de los motores moleculares introduciendo un nuevo elemento al que hemos llamado M , que depende de la velocidad de deformación del axón.

De este modelamiento, hemos inferido las propiedades elásticas de las neuritas de células PC-12 representadas por la constante elástica κ , y la tensión inicial T_o presente en cada axón.

Este mismo modelo permitió obtener de manera más consistente el valor de la disipación γ que representa la fricción entre las distintas fibras al interior de un axón y los motores moleculares, y su competición con el cociente entre T_a y v que caracterizan la respuesta de los motores moleculares ante una fuerza externa.

En un principio, los elementos γ y M nacieron bajo la idea de que representaban dos fenómenos distintos al interior de los axones, siendo en realidad, la separación en dos cantidades del mismo fenómeno.

La respuesta M identifica a los motores moleculares que ejercen una fuerza contraria a la fuerza externa F y γ representa a los motores moleculares que fueron vencidos por F introduciendo una fricción entre estos motores y las fibras al interior del axón.

De esta competición entre γ y M hemos identificado dos casos límites. El primero se refiere a la respuesta pasiva del axón ante una fuerza externa, ante la cual el axón aumenta su longitud para disminuir su tensión mecánica, convergiendo asintóticamente a una situación de equilibrio con una tensión final compatible con la tensión T_a . Y un segundo caso en que la elongación es seguida por una contracción de la longitud para alcanzar nuevamente el mismo estado de tensión final T_a .

Si bien hemos introducido los ingredientes básicos que dan cuenta del comportamiento mecánico de un axón, lo siguiente es identificar a qué corresponde cada elemento del modelo. Además de desarrollar nuevos experimentos que permitan medir la deformación local del axón bajo un test mecánico para así introducir la dependencia espacial en el problema. Este tipo de medición es posible realizarla introduciendo proteínas fluorescentes que se ligen específicamente a la estructura de actina y/o microtubulos.

Estos nuevos experimentos darán pie, de forma natural, a la extensión para representar bidimensionalmente a una célula sometida a estímulos externos.

Apéndice A

Caracterización de microagujas

El uso de resortes para la medición de fuerzas mecánicas tiene una data histórica posterior a Robert Hook en el año 1662, fecha en la que estableció empíricamente la ley $F = k\Delta x$.

En nuestros días, hemos sido capaces de construir dispositivos con un tamaño del orden de los micrómetros. Estos dispositivos, simples en su mayoría, nos permiten medir fuerzas del orden de $\times 10^{-9}$ Newtons.

Lamentablemente, los métodos de fabricación no nos permiten conocer de antemano las constantes elásticas de estas fabulosas herramientas. Este es el caso de las microagujas, con radios que van desde las decenas de micrón hasta cerca de $1\mu m$, y unos cuantos milímetros de longitud. Entonces la pregunta es, ¿cómo medir la constante de restitución de una barra de estas dimensiones?

A.1. Deformación de Barras

A.1.1. Barra prismática bajo una carga puntual

Mediante las ecuaciones de elasticidad aplicadas a barras prismáticas en la aproximación de pequeñas deformaciones[21], es posible anticipar la respuesta en flección de la barra ante una fuerza puntual ejercida en la punta de la barra (figura A.1). Para el caso de una barra de largo L , radio R y módulo de Young E , con condiciones de borde fijas para un extremo de la barra y libre para su otro extremo, podemos escribir:

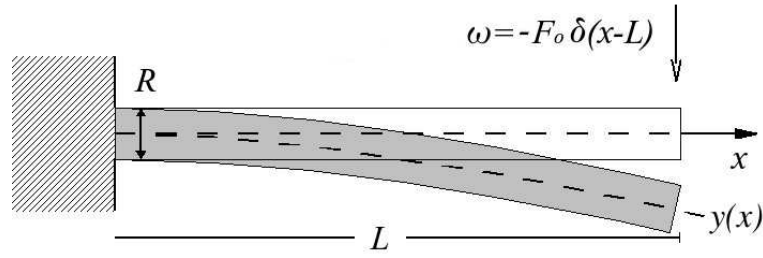


Figura A.1: Barra bajo una carga puntual

$$\frac{dF}{dl} = -\omega(x) = F_o \delta(x - L)$$

Donde $\omega(x)$ es la fuerza por unidad de longitud que soporta la barra y F_o representa la fuerza que ejercemos en el extremo libre. Debemos considerar, que el torque soportado por el extremo libre es igual a cero, ya que la curvatura en este punto es nula, de este modo encontramos:

$$F(x) = F_o$$

Dado que las deflexiones son pequeñas en comparación con el largo de la barra, podemos escribir:

$$EI \frac{d^3 y(x)}{dx^3} = F(x)$$

En que I representa el momento de torción, y el desplazamiento vertical de la barra esta dado por $y(x)$.

$$y(x) = \frac{1}{6} \frac{F_o}{EI} x^3 - \frac{1}{2} \frac{F_o L}{EI} x^2$$

Podemos determinar la constante de restitución de la barra evaluando el perfil de deflexión en $x = L$ y asignando un desplazamiento $y(x = L) = -\delta$ en respuesta a una fuerza $F_o \hat{y}$, obteniendo:

$$F_o = \frac{3EI}{L^3} \delta$$

A.1.2. Barra prismática bajo una carga homogénea

Para el caso de una carga homogénea, la ecuación para la carga se escribe como:

$$\frac{dF}{dl} = -\omega$$

Donde ω representa la fuerza por unidad de longitud que soporta la barra, que en este caso es constante.

$$F(x) = \omega(x - L)$$

$$EI \frac{d^3y(x)}{dx^3} = \omega(x - L)$$

$$y(x) = \frac{1}{24} \frac{\omega}{EI} x^4 - \frac{1}{6} \frac{\omega L}{EI} x^3 + \frac{1}{4} \frac{\omega L^2}{EI} x^2$$

$$\omega = \frac{8EI}{L^4} \delta$$

A.1.3. Deflexión de un tubo cónico: aplicación en fluidos

Aunque el cálculo para la deformación de una barra prismática tienen soluciones analíticas cerradas, éstas ecuaciones no tienen solución exacta para el caso de un tubo cónico. En efecto, para este caso, el momento de torsión depende de la posición, ya que el área transversal, en el caso de una microaguja real, cambia con el largo. Considerando esta información y reescribiendo la ecuación de equilibrio tomando en cuenta que el momento de torsión ya no es constante, tenemos:

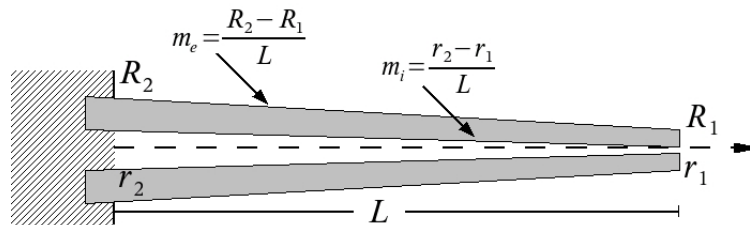


Figura A.2: Esquema de un tubo cónico empotrado

$$\frac{d}{dx} \left(EI(x) \frac{d^2 y(x)}{dx^2} \right) = F(x)$$

Asumiendo que el perfil de la microaguja es descrito por la figura A.2, el momento de torción, $I(x) = \pi/4[(R_2 - m_e x)^4 - (r_2 - m_i x)^4]$, con R_2 y r_2 como los radios exterior e interior del cono en la base empotrada, m_e y m_i son las pendientes exterior e interior respectivamente, y la fuerza integrada a lo largo del cono $F(x) = \omega(x - L)$.

$$E \frac{d}{dx} \left(\frac{\pi}{4} [(R_2 - m_e x)^4 - (r_2 - m_i x)^4] \frac{d^2 y(x)}{dx^2} \right) = \omega(x - L)$$

La fuerza viscosa fue determinada resolviendo numéricamente las ecuaciones que describen el perfil de deformación, ajustando el valor de ω minimizando la diferencia al cuadrado del perfil experimental en comparación al perfil obtenido teóricamente del siguiente set de ecuaciones.

$$\frac{dy}{dx} = u(x) \quad (\text{A.1})$$

$$\frac{du}{dx} = v(x) \quad (\text{A.2})$$

$$\frac{dv}{dx} = \frac{F(x)}{EI(x)} - \frac{d}{dx} (\ln I(x)) v(x) \quad (\text{A.3})$$

Por otro lado, la teoría de mecánica de fluidos[22] da a conocer la fuerza por unidad de longitud que ejerce el fluido de viscosidad dinámica η , densidad constante ρ , y velocidad uniforme U , al pasar alrededor un cilindro de radio R y largo infinito.

$$\omega = \frac{4\pi\eta U}{\ln \left(\frac{3.7\nu}{RU} \right)}$$

Sin embargo, en nuestro caso el fluido se encuentra confinado en una celda de alto h y ancho D con condiciones de borde $U_y = 0$ para $z = \{0, h\}$. El perfil estacionario de velocidad del fluido es parabólico para valores del número de Reynold $Re < 1$. En nuestro caso, la velocidad del fluido, en el rango de caudales explorados, es de $U = 0 - 400 \times 10^{-4} \text{cm/s}$, la longitud característica R , corresponde al radio de la microaguja $R \sim 20 \times 10^{-4} \text{cm}$ con una viscosidad cinemática $\nu = 0,6 \times 10^{-2} \text{cm}^2/\text{s}$, nos entrega un Reynold máximo de $Re \sim 0,8$.

$$\rho \frac{\partial \vec{U}}{\partial t} + \rho \vec{U} \cdot \nabla \vec{U} = -\nabla P + \eta \nabla^2 \vec{U} \quad (\text{A.4})$$

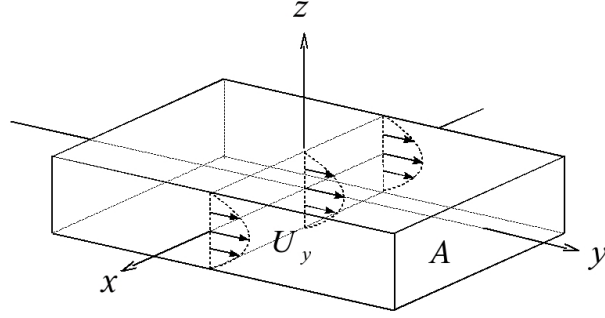


Figura A.3: Esquema de la cámara de fluido, asumiendo un flujo laminar

$$Re = \frac{|\vec{U} \cdot \nabla \vec{U}|}{|\nu \nabla^2 \vec{U}|} < 1$$

Podemos despreciar, en este límite, el término inercial de la ecuación A.4. Además, el gradiente de presión es nulo dentro de la celda en las direcciones \hat{x} y \hat{z} , mientras que en la dirección \hat{y} se cumple $\partial P / \partial y = 0$, y considerando las condiciones de borde ya establecidas, encontramos:

$$\eta \nabla_z^2 U_y = C$$

$$U_y = \frac{C}{2\eta} (z^2 - hz)$$

El valor de la constante C se obtiene integrando el perfil de velocidad U_y en el alto de la celda multiplicada por su ancho D , que debe ser igual al caudal impuesto.

$$Q = \int U_y(z) dx dz = \frac{CD}{2\eta} \int_0^h (z^2 - hz) dz$$

$$C = -\frac{12\eta}{Dh^3} Q$$

$$U_y(z) = -\frac{6Q}{Dh^3} (z^2 - hz)$$

En resumen, debemos considerar la velocidad local del fluido para realizar una estimación de la fuerza viscosa a la altura z , ya que la velocidad del fluido no es homogénea.

El drag ejercido por el fluido fue medido por medio de una microaguja fijada dentro de la cámara de flujo laminar a $50\mu m$ por sobre la superficie de un cubreobjeto, registrando el perfil de deflexión como función del flujo. La velocidad en el plano de la microaguja fue medido realizando un seguimiento de partículas de latex de $1\mu m$ de radio.

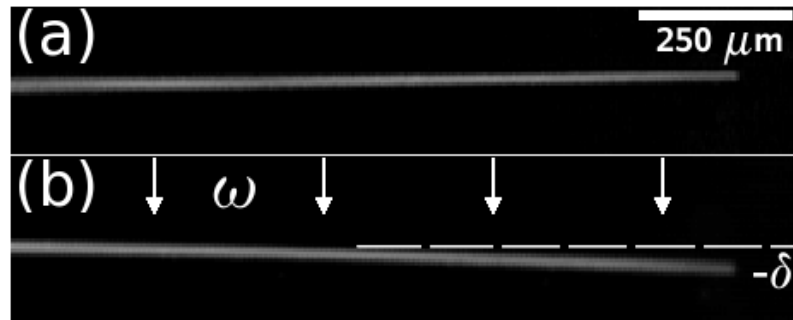


Figura A.4: La microaguja de $3mm$ de longitud, $21\mu m$ de radio base, y $12\mu m$ de radio en la punta, dentro de la celda de flujo laminar de dimensiones $0,5 \times 1 \times 1,5cm^3$, fue sometida a la acción del fluido registrando el perfil de deflexión como se muestra en (a) con caudal cero, y (b) con caudal de $34\mu L/s$

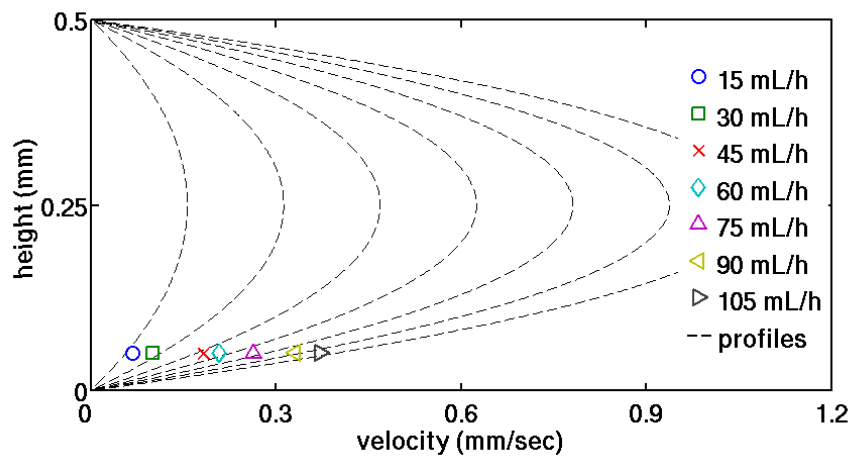


Figura A.5: Realizando el seguimiento de varias partículas, se calculo la velocidad local promedio para cada caudal y se infirio el perfil de velocidad en función de la altura de la celda para cada flujo.

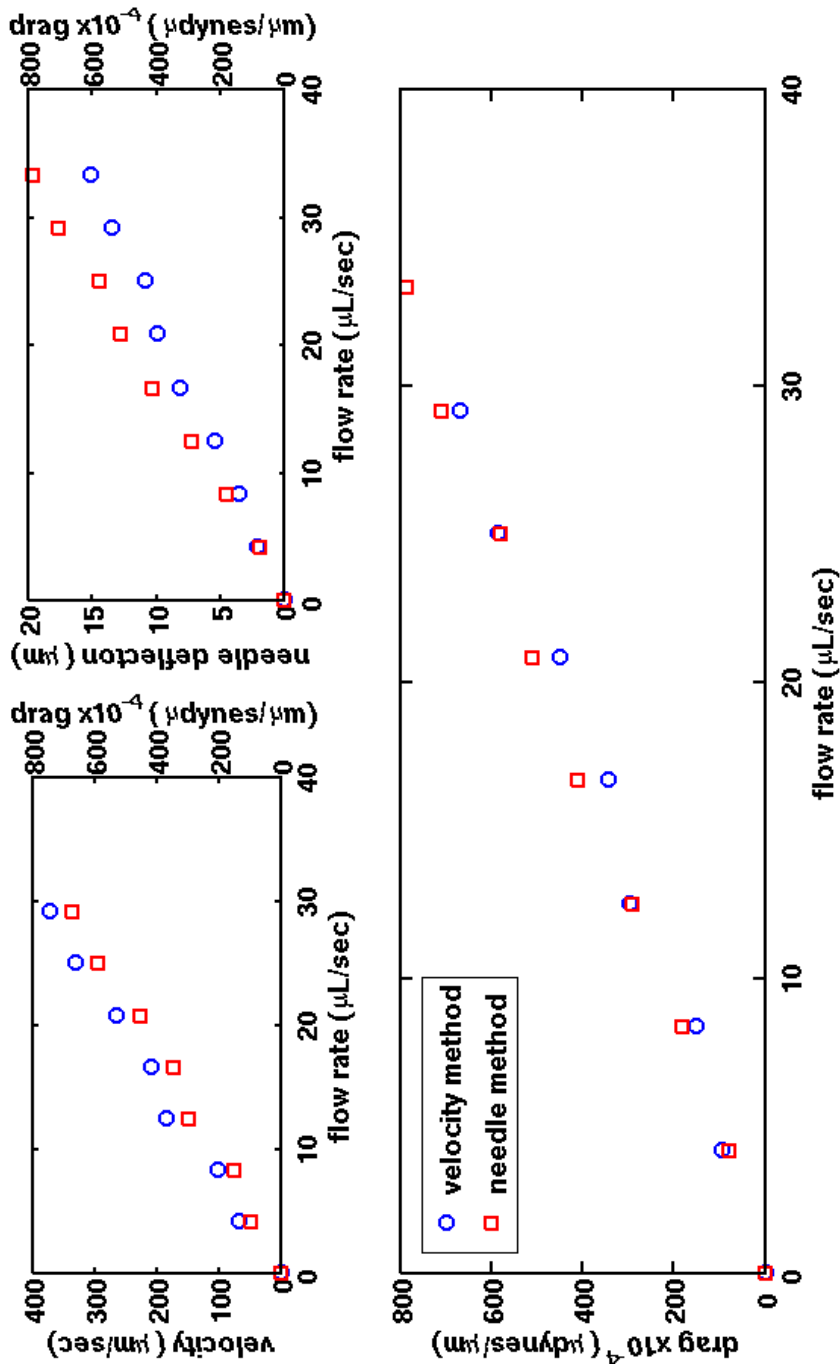


Figura A.6: El gráfico izquierdo superior, muestra la velocidad promedio de las partículas de latex en función del caudal impuesto, el drag calculado a partir de la mediciones de velocidad. En el cuadro derecho superior, se aprecia la deflexión máxima de la microaguja en función del caudal, y el drag estimado a partir del perfil de deflexión. Abajo se contrasta la medición de la fuerza viscosa por unidad de longitud por ambos métodos.

A.2. Respuesta en frecuencia de una microaguja

Un método alternativo que nos permite determinar la constante de restitución de una microaguja es la respuesta mecánica ante una señal externa de amplitud y frecuencia conocida.

Designemos por x , la deflexión de la punta de la aguja ante una fuerza externa, la aceleración de la punta ante esta fuerza es $m\ddot{x}$. Teniendo en cuenta que la aguja se encuentra rodeada de un fluido, en nuestro caso aire, la aguja se encuentra ante una fuerza viscosa $\gamma\dot{x}$. Finalmente, la fuerza de restitución de flección para pequeños desplazamientos esta dada por kx . Por lo que el equilibrio mecánico es descrito por:

$$m\ddot{x} + \gamma\dot{x} + kx = F$$

La fuerza externa F provendrá del movimiento oscilatorio impuesto en el punto de apoyo de la aguja. La fuerza externa se escribe $F = kx_0 e^{i\omega t}$ como se muestra en la figura A.7.

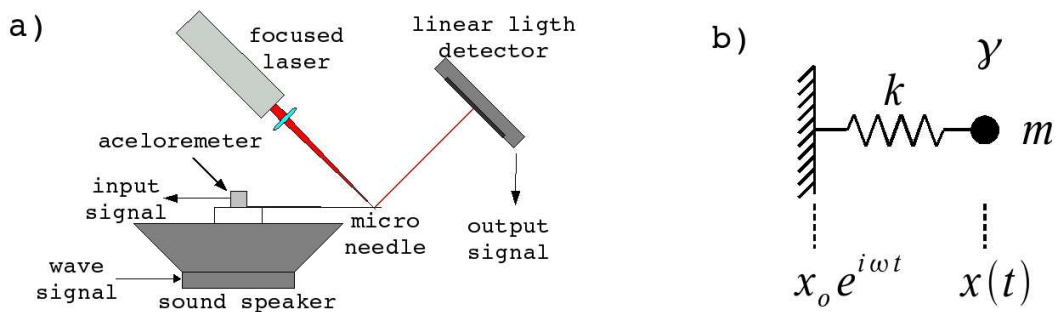


Figura A.7: (a) Montaje experimental para la medición de la respuesta mecánica de la microaguja. (b) Análogo mecánico del sistema.

La solución para $x(t)$ es de la forma $x(t) = Ae^{i\omega t}$, dado que se trata de un sistema lineal. Utilizando la definición de la función respuesta como el cociente entre la amplitud de oscilación del sistema denotado por A y la amplitud de excitación x_0 , obtenemos:

$$-m\omega^2 Ae^{i\omega t} + i\gamma\omega Ae^{i\omega t} + kAe^{i\omega t} = kx_0 e^{i\omega t}$$

$$(k - m\omega^2 + i\gamma\omega)A = x_o$$

$$G = \frac{A}{x_o} = \frac{k}{k - m\omega^2 + i\gamma\omega}$$

La amplitud de oscilación está relacionada con su aceleración por $a = x_o\omega^2$, magnitud a la que es sensible nuestro acelerómetro, por lo que la función respuesta es $G = A/a$. Además debemos recordar que la frecuencia natural de oscilación es $\omega_o = \sqrt{k/m}$. Existe una segunda frecuencia asociada al roce viscoso con el medio, esta es $\omega_d = \gamma/m$. Por lo que podemos reescribir la función respuesta como $G = |G|e^{i\phi}$.

$$|G| = \frac{\omega_o^2}{\omega^2} \frac{1}{\sqrt{(\omega_o^2 - \omega^2)^2 + \omega_d^2\omega^2}}$$

$$\tan \phi = \frac{\omega_d\omega}{\omega^2 - \omega_o^2}$$

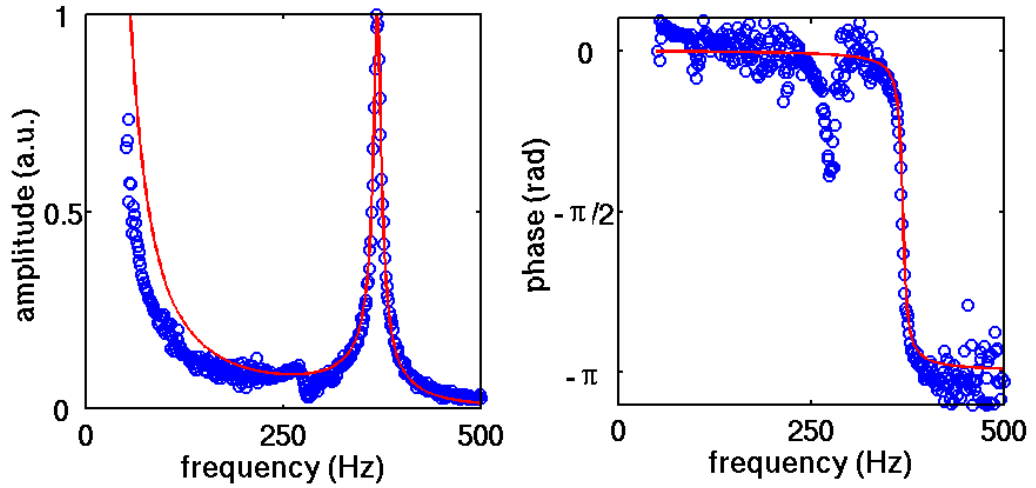


Figura A.8: Amplitud y fase de respuesta en función de la frecuencia de excitación. Los valores de las constante $k_{needle} = 29\mu dyn/\mu m$, $m = 54,48 \times 10^{-9}g$, fueron obtenidos utilizando el modelo de respuesta calculado y minimizando el error absoluto entre los datos experimentales y la teoría.

Apéndice B

Protocolos de Preparación y Cultivo Celular

En esta sección se encuentran descritos los procedimientos básicos para la preparación del cultivo celular y de las muestras experimentales.

Este apéndice ha de ser leído por una persona con cierta experiencia en cultivo celular. Se debe tener en cuenta que existen muchas variantes para cada una de las secciones aquí descritas.

B.1. Cultivo de células PC-12

B.1.1. Preparación de Medio, Colágeno y Nerve Growth Factor (NGF)

Medio de Cultivo

Añada 10 % HS (suero de caballo, inactivado por calor y testeado), y 5 % de FBS (suero fetal de bovino, inactivado por calor y testeado) en medio RPMI 1640 con L-Glutamina (21875-34, Gibco/Invitrogen), finalmente agregue 1 % de antibióticos. Mezcle y guarde a 4°C.

Para los experimentos necesitamos medio RPMI 1640 con 25mM de HEPES y L-Glutamina (52400-025, Gibco/Invitrogen). Esto nos permite trabajar a concentraciones atmosféricas de CO_2 . Podemos añadir suero mas tarde si así lo requerimos.

Colágeno

Disuelva 10mg de colágeno (C7661, Sigma) en 10mL de solución de ácido acético al 0.1M. El colágeno se disolverá en aproximadamente 90 minutos. Es buena idea agitar cuidadosamente de vez en cuando, sin hacer burbujas (las burbujas destruyen las proteínas en la superficie). Cuando este seguro de que todo el colágeno este disuelto, guarde en eppendorfs estériles de 1ml a -20°C .

Nerve Growth Factor

Disuelva 0,1mg de NGF (N0513, Sigma) en 1mL de medio de cultivo sin suero. Agite cuidadosamente, sin hacer burbujas. Una vez disuelto, agregue 10 μL de solución en eppendorfs estériles de 500 μL y guarde a -20°C .

B.1.2. Cultivo regular

Las células crecen en un ambiente a 37°C y en una atmosfera con 5% CO_2 y normalmente en suspensión. Si ellas se encuentran saludables, crecerán en pequeños cumulos. Si muchas células se encuentran adheridas a la superficie probablemente significa que no están en buena condición. Si esto sucede con células nuevas se puede incrementar el suero fetal de bovino por un par de semanas. La adhesión también se presenta cuando la concentración de células es demasiado alta.

El medio debe ser cambiado una vez cada dos días. Remueva dos tercios del medio incluyendo las células, añada medio nuevo para conservar las células en el mismo contenedor. Cada dos semanas, siga el mismo procedimiento y cambie la placa petri.

B.1.3. Cultivo de células en coverslips

Solución de Silano

Mezcle 90 % de etanol absoluto y 8 % de agua bidestilada ($d\text{H}_2\text{O}$) en un contenedor plástico para la silanización. Añada el 2 % restante de aminosilano (3-Aminopropyl-triethoxylane, Aldrich 44,014-0). Usando una jeringa, agite suavemente el contenedor. Cubra con papel de aluminio. Para cerrar la botella de silano, es aconsejable hacerlo en una atmósfera de Nitrogeno ó Argon, evitando así que la humedad reaccione con el

silano. Debe asegurarse que el volumen de solución sea suficiente para cubrir los coverslips que deberán ser dispuestos de tal forma que la ambas caras esten expuestas a la solución con silano.

Preparación de los coverslips y cilindros de vidrio

Prepare una solución de jabón ó Deconex al 10 % en agua Millipore y caliente la mezcla a 80°C. Sumerja los coverslips en la solución y coloque el contenedor dentro de un baño ultrasonico durante 15 minutos. Enjuague con dH_2O directamente del agua Milipore. Se debe remover completamente la solución de jabón. Finalmente, enjuague una vez más usando etanol al 98 % para remover el agua adherida, y sumerja inmediatamente sin secar los coverslips dentro del contenedor con la solución con silano.

Después de una hora en el silano, remueva los coverslips enjuagando con etanol técnico, para remover la solución de silano, y enjuague por última vez usando etanol absoluto.

Los cilindros de vidrio, son fabricados cortando una pipeta graduada, cada cilindro tiene una capacidad aproximada de $1mL$. Lave usando la misma mezcla de jabón en el baño ultrasónico, enjuagar con dH_2O y posteriormente con etanol técnico.

La solución de silano debe ser almacenada en un tanque de residuos orgánicos, y el contenedor debe ser lavado con el uso de etanol.

Preparación del cultivo en las superficies de colágeno

Para evitar filtraciones de medio, use grasa de silicona en el borde del cilindro, coloque los cilindros encima de los coverslips en una placa Petri de plástico, y exponga la placa en luz UV por 20 minutos.

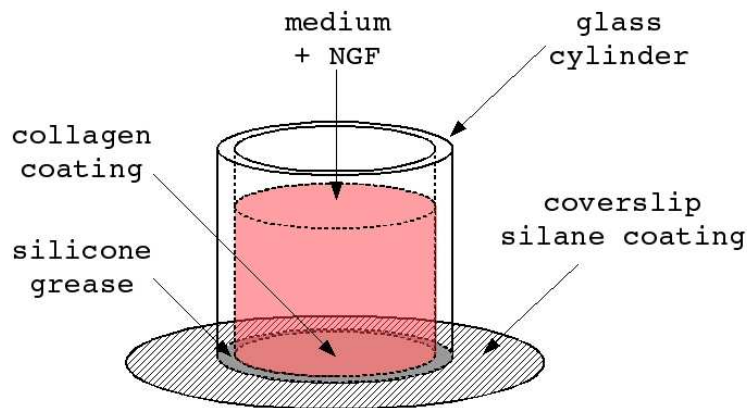
En una solución de etanol al 30 % esterilizado por filtración, agregue 10 % de la solución de colágeno, y coloque $100\mu L$ de la solución final en cada cilindro. Deje secar durante la noche con la tapa de la placa petri entre abierta dentro de la cámara de flujo con el flujo encendido. No exponga las muestras a la luz innecesariamente. Apague la luz de la cámara y no encienda la luz UV de la cámara.

Use el medio regular de cultivo, y añada un $1mL$ en cada cilindro. Diluya $10\mu L$ de la solución de NGF en $500\mu L$ de medio. Agregue $20\mu L$ de está solución a cada cilindro.

Del cultivo celular, tome 1mL de medio con células y disgreguelas cuidadosamente con la micropipeta en un eppendorf de 1ml . Añada $5\mu\text{L}$ de suspensión a cada cilindro. Para obtener axones con longitudes por sobre $100\mu\text{m}$ la concentración de células debe ser de aproximadamente $1000\text{células}/\text{cm}^2$ en la base del cilindro.

El cambio de medio de cultivo con NGF precalentado a 37°C es realizado cada dos días. Removiendo $900\mu\text{L}$ del medio del cilindro y agregue el medio fresco con NGF con una micropipeta o una jeringa sin perturbar las células adheridas en el sustrato de colágeno. La muestra estará lista al paso de 5-6 días.

Para los experimentos sin suero, se realiza el cultivo normal ya descrito en el párrafo anterior, y tres horas antes del experimento se debe reemplazar el medio de cultivo normal por el medio base RPMI 1640.



B.2. Cultivo de células PH y 3T3

B.2.1. Preparación de Medio

El medio DMEM (12800-017, Gibco/Invitrogen) se presenta en polvo. Disuelva el contenido del sobre en 950mL de agua autoclavada a $15 - 30^\circ\text{C}$, añada $3,7\text{g}$ de NaHCO_3 por litro de medio, y diluya agitando suavemente. Ajuste el pH del medio $0,2 - 0,3$ por debajo del pH final de trabajo utilizando NaOH ó 1N HCl . Finalmente esterilice el medio usando membrana de filtración. El pH del medio subirá entre $0,2 - 0,3$ después del filtrado. Añada 10% CS (suero de becerro, inactivado por calor y testeado) y agregue 1% de antibióticos. Mezcle y guarde a 4°C .

B.2.2. Cultivo regular

Las células crecen en un ambiente de 37°C y 5 %CO₂, sin embargo estos dos tipos de fibroblastos no necesitan de colágeno en la superficie para adherirse, por lo que crecen normalmente en la superficie del contenedor. Si las células no crecen saludablemente, se desprenderán de la superficie. En el caso de que su número sea muy bajo, se recomienda colocarlas en un contenedor de menor superficie para aumentar la concentración.

El medio es cambiado una vez cada dos días. Remueva todo el medio, y añada medio base (sin sueros ni antibióticos) con 1 % de *trypsin*. Después de un minuto las células comenzarán a desprenderse. Si la concentración de células ocupa el 80 % de la superficie, desheche dos tercios de las células en suspensión, y añada medio fresco para conservar las células en el mismo contenedor. Después de dos semanas, siga el mismo procedimiento y cambie la placa petri.

Apéndice C

Publicaciones

C.1. Wrinkle Formations in Axi-Symmetrically Stretched Membranes

Bibliografía

- [1] A. K. Harris, P. Wild and D. Stopak, *Science* (1980), vol. 208, pp. 177
- [2] Kevin Burton, Jung H. Park, and D. Lansing Ta, Keratocytes Generate Traction Forces in Two Phases, *Molecular Biology of the Cell* (1999), vol. 10, pp. 3745-3769
- [3] Armitage, D. A., et. al., *J. Chem. Educ.* (June 1973), vol. 50, pp. 434
- [4] Juliet Lee, Michelle Leonard, Tim Oliver, Akira Ishihara, and Ken Jacobson, Traction Forces Generated by Locomoting Keratocytes, *Journal of Cell Biology* (1994), vol. 127, pp. 1957-1964
- [5] Nathalie Q. Balaban, Ulrich S. Schwarz, Daniel Riveline, Polina Goichberg, Gila Tzur, Ilana Sabanay, Diana Mahalu, Sam Safran, Alexander Bershadsky, Lia Ad-dadi, and Benjamin Geiger, Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates, *Nature Cell Biology* (2001), vol. 3, pp. 466-472
- [6] L.D. Landau and E. M. Lifshitz, volume 7, *Theory of Elasticity*, third edition, "Chapter 2: Equilibrium Equations", pp. 22
- [7] L.D. Landau and E. M. Lifshitz, volume 7, *Theory of Elasticity*, third edition, "Chapter 14: Deformación de placas", pp. 74
- [8] J-Ch. Géminard, R. Bernal and Francisco Melo, Wrinkle Formation in axi-symmetrically stretched membranes, *Eur. Phys. J. E.* (2004), vol. 15, pp. 117
- [9] Roberto Bernal, Chantal Tassius, Jean-Christophe Géminard, and Francisco Melo, Wrinkles Formation in Semi-Spherical Membranes, in preparation
- [10] Frank Jülicher, Force and Motion Generation of Molecular Motors: A Generic Description, arXiv:physics/9908054 v1 28 Aug 1999
- [11] Nobutaka Hirokawa, Cross-linker System between Neurofilaments, Microtubules, and Membranous Organelles in Frog Axons Revealed by the Quick-freeze, Deep-etching Method, *Journal of Cell Biology* (1982), vol. 94, pp. 129-142
- [12] B.J. Schnapp and T.S. Reese, Cytoplasmic Structure in Rapid-frozen Axons, *Journal of Cell Biology* (September 1982), vol. 94, pp. 667-679

- [13] T. J. Dennerll, H. C. Joshi, V. L. Steel, R. E. Buxbaum and S. R. Heidemann. Tension and Compression in the Cytoskeleton of PC-12 Neurites II: Quantitative Measurements. *The Journal of Cell Biology* (1988), vol. 107, pp. 665-674
- [14] P. Lamoureux, R. E. Buxbaum and S. R. Heidemann. Direct Evidence that Growth Cones Pull. *Nature* (1989), vol. 340, pp. 159-162
- [15] Timothy J. Dennerll, Phillip Lamoureux, Robert E. Buxbaum. And Steven R. Heidemann. The Cytomechanics of Axonal Elongation and Retraction. *The Journal of Cell Biology* (1989), vol. 109, pp. 3073-3083
- [16] Fridoom J. Ahmad, Jessica Hughey, Torsten Wittmann, Anthony Hyman, Marion Greaser and Peter W. Baas, Motor protein regulate force interaction between microtubules and microfilaments in the axon, *Nature Cell Biology* (2000), vol. 2, pp. 276-280
- [17] Peter W. Baas and Fridoom J. Ahmad, Force generation by cytoskeletal motor proteins as a regulator of axonal elongation and retraction, *TRENDS in Cell Biology* (2001), vol. 11 No 6, pp. 244-249
- [18] Jonathon Howard, *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*, “Chapter 3: Mass, Stiffness, and Damping of proteins”, pp. 39
- [19] Kensal E. van Holde, W. Curtis Johnson and P. Shing Ho, *Principles of Physical BioChemistry*, “Chapter 15: Chemical equilibria involving macromolecules”, pp. 587
- [20] Kazuo Obara, Koji Nobe, Hiromi Nobe, Michael S. Kolodney, Primal De Lanerolle and Richard J. Paul. Effects of Microtubules and Microfilaments on $[Ca^{2+}]_i$ and Contractility in a Reconstituted Fibroblast Fiber. *Am J Physiol Cell Physiol* (2000), vol. 279, C785-C796
- [21] L.D. Landau and E. M. Lifshitz, volume 7, *Theory of Elasticity*, third edition, “Chapter 20: Small deflections of rods”, pp. 76
- [22] L.D. Landau and E. M. Lifshitz, volume 6, *Fluid Mechanics*, second edition, “Chapter 11: The drag force in potential flow past a body”, pp. 26

- [23] J. Teichman and L. Mahadevan. The viscous catenary. *J. Fluid Mech.* (2003), vol. 478, pp. 71-80
- [24] Y.C. Fung, *Biomechanics*, second edition, “Chapter 9: Skeletal Muscle”, pp. 399