



Herramientas cuantitativas para el análisis de trayectorias de partículas individuales aplicadas a la difusión del neuroreceptor de nAChR

Pablo A. Camino

Tesis de Licenciatura en Ciencias Físicas

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenos Aires

Noviembre 2020

TEMA: Biofísica
ALUMNO: Pablo A. Camino
(pabloantoniocamino@gmail.com)
LU: 546/08
DIRECTOR: Dr. Francisco J. Barrantes
(francisco_barrantes@uca.edu.ar)
CODIRECTORA: Dra. Luciana Bruno
(lbruno@df.uba.ar)
LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Neurobiología Molecular,
BIOMED UCA-CONICET
INICIO: 2019
FINALIZACIÓN: 2020
FECHA DE EXAMEN:
INFORME FINAL APROBADO POR:

Autor: Pablo A. Camino

Director: Francisco J. Barrantes

Co-directora: Luciana Bruno

Jurado: Luis Morelli

Jurada: Verónica I. Marconi

**Profesora de Tesis:
Silvina Ponce Dawson**

Jurada: Silvina Ponce Dawson

*A mis padres,
Vale, Nico, Amy
y Juana.*

Resumen

Las herramientas cuantitativas consisten en el uso de métodos matemáticos, estadísticos y computacionales, que se aplican con el objetivo de probar una hipótesis o lograr una descripción matemática de un fenómeno. Se basan en el análisis de datos para la identificación de patrones y tendencias.

En este trabajo, estas herramientas se utilizan para analizar trayectorias de partículas individuales de moléculas biológicas. Se entiende por trayectoria al conjunto de coordenadas espaciales que evolucionan a lo largo del tiempo. Con “individuales” se hace referencia a que cada trayectoria es analizada independientemente de las otras.

Este proyecto de investigación se centra en evaluar las herramientas antes mencionadas. En primer lugar, son aplicadas a trayectorias simuladas para su validación, y luego a trayectorias experimentales. Estas últimas son obtenidas a partir de un sistema biológico: la difusión del receptor de acetilcolina de tipo nicotínico (nAChR) en la membrana plasmática. Las características de este sistema serán presentadas a continuación.

El sistema nervioso es uno de los sistemas más complejos y sorprendentes conocidos, y ha tomado millones de años en evolucionar. Está compuesto por millones de neuronas que se comunican entre sí mediante mecanismos químicos y eléctricos, cuyo elemento central, tanto estructural como funcional se denomina sinapsis.

En una sinapsis química, el sitio de la neurona desde donde parte la señal (pre-sináptica) libera biomoléculas llamadas neurotransmisores. Estos neurotransmisores, después de un breve recorrido, actúan sobre receptores especializados en un sitio de la célula receptora (post-sináptica), produciendo un cambio en la conductancia de la membrana, ya sea aumentándola (despolarización) como disminuyéndola (hiperpolarización). Tanto los sitios presinápticos como postsinápticos requieren de una maquinaria molecular, que une la membrana plasmática de ambas células y permite el proceso de comunicación. Dicha sinapsis es regulada por la interacción entre diferentes elementos celulares, como proteínas de superficie, recep-

tores de neurotransmisores, lípidos y el citoesqueleto. Para entender correctamente la fisiología sináptica, es necesario estudiar la dinámica y la distribución espacial de los actores que intervienen; en especial de los receptores de neurotransmisores, ya que son un elemento de vital importancia. Uno de los receptores más importantes, y ampliamente estudiado, es el receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR), motivo por el cual será el objeto de estudio de las herramientas de análisis a evaluar.

El objetivo principal de este trabajo es proponer y evaluar una serie de herramientas cuantitativas para analizar trayectorias de partículas individuales, específicamente, las trayectorias del nAChR. Este objetivo es parte de uno de los temas más dinámicos de la biofísica de membranas, i.e aquel que intenta comprender la dinámica de difusión translacional de proteínas inmersas en el plasmalema (diagrama de la figura 1):

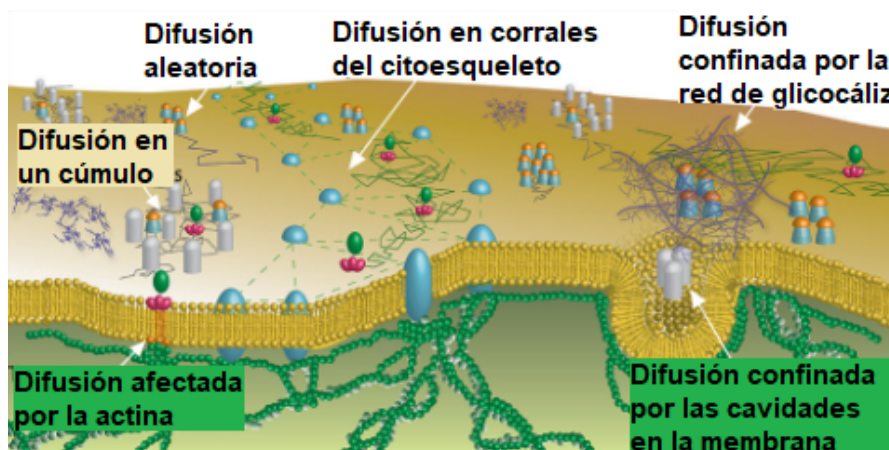


Figura 1: Esquema de los diversos modos de difusión lateral de los componentes de la membrana plasmática. Diferentes actores moleculares contribuyen a modificar la difusión de las moléculas, i.e. acúmulos de moléculas, corrales formados por el citoesqueleto, cavidades en la membrana o la red de glicocáliz. Adaptación de (Manzo y Garcia-Parajo 2015).

Los objetivos específicos son: 1) estudiar el agrupamiento espacial de los receptores mediante diagramas de Voronoi, 2) analizar la robustez del análisis de desplazamientos cuadráticos medios (mean square displacement, MSD) y utilizarlo para estudiar los regímenes de transporte de los receptores, 3) explorar mecanismos que

subyacen a las trayectorias confinadas a partir del análisis de la distribución de la densidad de localizaciones y 4) estudiar las posibles transiciones locales entre regímenes de movimiento a nivel de trayectoria individual.

Los datos estudiados a lo largo de esta investigación recuperan, en parte, análisis realizados por el autor, Francisco J. Barrantes y Alejo Mosqueira en el marco del Laboratorio de Neurobiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas BIOMED (UCA - CONICET). Dicho trabajo dio lugar a dos publicaciones (Mosqueira, Camino y F. J. Barrantes 2018) (Mosqueira, Camino y F. J. Barrantes 2020) y a dos presentaciones en congresos (Mosqueira, Camino y F. J. Barrantes 2016) y (Camino, Mosqueira y F. J. Barrantes 2017). Por su parte, el capítulo sobre el estudio del agrupamiento mediante diagramas de Voronoi (capítulo 2) forma parte de un manuscrito en preparación.

Índice

Resumen	3
1. Introducción	9
1.1. Receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR)	9
1.2. Efectos del colesterol de la membrana plasmática sobre las propiedades dinámicas del nAChR	10
1.3. Microscopía de súper-resolución de tipo STORM	13
1.4. Determinación de las coordenadas espaciales del nAChR mediante STORM	17
1.5. Reconstrucción de las trayectorias a partir de las localizaciones . . .	19
1.6. Distinción entre partículas móviles e inmóviles	20
1.7. Materiales y métodos para obtener las trayectorias del nAChR . . .	21
1.8. Trayectorias del nAChR y organización del trabajo	22
2. Estudio mediante diagramas de Voronoi	24
2.1. Introducción	24
2.2. Desarrollo	26
2.2.1. Construcción del diagrama de Voronoi a partir de las trayectorias	26
2.2.2. Análisis de las áreas de un diagrama de Voronoi	26
2.2.3. Distribución de áreas en un diagrama de Voronoi para un proceso de Poisson	27
2.2.4. Incerteza de ΔM	30
2.3. Resultados	32
2.3.1. Efecto de la concentración de colesterol y la movilidad en la distribución de los receptores	34
2.3.2. Fracción de campos con mayor agrupamiento a la situación aleatoria	36
2.3.3. Efecto del tiempo en los diagramas de Voronoi experimentales	37
2.3.4. Agrupamiento en diferentes regiones de células fijadas	39

2.4. Conclusiones	43
3. Regímenes de Transporte	45
3.1. Introducción	45
3.1.1. Regímenes de movimiento	45
3.1.2. Método alternativo para calcular el exponente β	48
3.1.3. Error de localización en el MSD	48
3.1.4. Los parpadeos en las trayectorias no afectan el exponente β	49
3.2. Análisis de los regímenes de transporte del receptor mediante el MSD	51
3.2.1. Cálculo del exponente β de la difusión a partir del MSD . .	51
3.3. Evaluación de la performance de los métodos para la determinación del exponente β	53
3.4. Análisis del exponente β	54
3.4.1. Influencia del colesterol en los regímenes de movimiento de los receptores	55
3.4.2. Coeficiente de difusión de las trayectorias difusivas	58
3.5. Conclusiones	59
4. Estudio de las propiedades mecánicas	60
4.1. Distribución de la densidad radial	62
4.2. Resultados	67
4.2.1. Ajustes de los diferentes ansatz	67
4.2.2. Ajustes individuales a las partículas marcadas con BTX . . .	69
4.2.3. Ajustes colectivos a las partículas marcadas con BTX	71
4.2.4. Ajustes a las partículas inmóviles marcadas con mAb	72
4.3. Conclusiones	74
5. Regímenes transitorios de Transporte	75
5.1. Introducción al análisis HMM-Bayes	75
5.1.1. Ejemplo de análisis HMM-Bayes sobre trayectoria simulada con dos regímenes	78

<i>ÍNDICE</i>	8
5.2. Análisis de trayectorias de receptores utilizando el método HMM-Bayes	81
5.2.1. Evaluación de la sensibilidad del método HMM-Bayes mediante simulaciones numéricas	82
5.3. Conclusiones del análisis HMM-Bayes	84
6. Conclusiones y Perspectivas	85
7. Anexo	88
7.1. Código MATLAB de simulaciones de ejemplos de trayectorias para calcular el MSD	88
7.2. Código MATLAB de simulaciones de ejemplos de trayectorias para analizar con el HMM-Bayes	89
8. Agradecimientos	91

1. Introducción

1.1. Receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR)

La familia de canales iónicos pentaméricos activados por ligando (pLGIC) es un conjunto de proteínas de membrana, presentes en el sistema nervioso central y periférico. Allí, estas macromoléculas llevan a cabo importantes funciones de comunicación intercelular, la más importante de las cuales es la transducción de las señales químicas mediadas por neurotransmisores, cuyo epifenómeno es el permitir el paso de iones a través de la membrana postsináptica (F. Barrantes 2004).

Uno de los receptores más estudiados de la familia pLGIC es el receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR), tópico de gran interés por su relevancia en enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas. El nAChR es una proteína integral de membrana, formada por cinco subunidades, con un peso molecular aproximado de 290kDa (Figura 2). El subtipo de receptor estudiado en este trabajo es el muscular en edad adulta; el mismo está compuesto por dos subunidades α , una subunidad β , una subunidad δ y una subunidad ϵ .

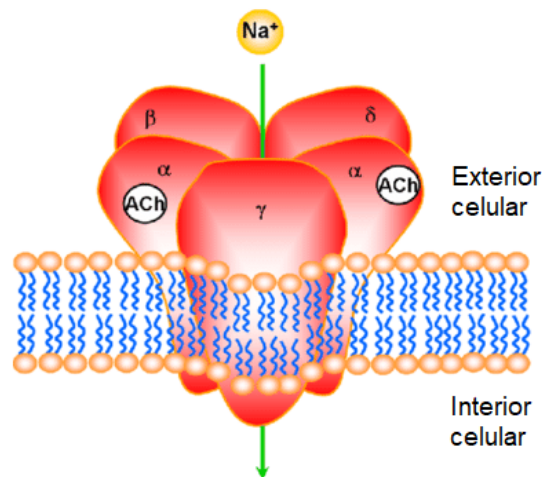


Figura 2: Esquema del receptor de acetilcolina nicotínico. Las cinco subunidades que lo componen forman un canal permeable al Na^+ . Se indica la posición relativa de los sitios de unión del neurotransmisor, acetilcolina (ACh), en las interfases entre las subunidades α - δ y α - γ , respectivamente, en este ejemplo correspondiente al receptor de tipo embrionario. Adaptación de (Xia y Peng 2013)

El nAChR se halla principalmente en la membrana sináptica de las uniones neuromusculares, agrupado en acúmulos con una densidad aproximada de 20 mil moléculas por μm^2 . Dicho agrupamiento asegura una transmisión correcta de las señales electroquímicas. Fuera de estas regiones, la concentración de nAChR es significativamente menor (Hirsch 2007).

En algunas enfermedades autoinmunes, como la miastenia gravis¹, los anticuerpos reducen la cantidad de nAChR disponibles, dando como resultado una neurotransmisión deficiente (Paz y F. J. Barrantes 2019). Por otro lado, existen evidencias que indican una deficiente regulación del metabolismo del colesterol en la enfermedad de Alzheimer. Dada la relación entre el colesterol y el nAChR, los efectos de la enfermedad podrían estar parcialmente relacionados con una interacción anómala entre los mismos (F. J. Barrantes, Virginia Borroni y Vallés 2010).

Debido a la relevancia que tiene el nAChR con múltiples patologías como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, y algunas enfermedades autoinmunes, es importante estudiar su funcionamiento y estructura. En particular, su dinámica y su distribución en la membrana plasmática; cómo es su difusión y qué mecanismos pueden afectarla.

1.2. Efectos del colesterol de la membrana plasmática sobre las propiedades dinámicas del nAChR

La membrana plasmática es una bicapa lipídica semipermeable, de unos pocos nanómetros de espesor ($\approx 5nm$), que envuelve el perímetro de la célula separándola del exterior. Dicha bicapa es polar en sus contactos con el medio extracelular e intracelular, mientras que su interior es hidrofóbico; y está compuesta principalmente por fosfolípidos que cumplen una función estructural, y que poseen una alta variabilidad bioquímica (Fantini y F. J. Barrantes 2013). A su vez, en ella reside una multitud de moléculas, como receptores químicos, canales iónicos, proteínas

¹La miastenia gravis es una enfermedad autoinmune y crónica, en la cual los anticuerpos bloquean o destruyen los receptores de acetilcolina en la unión neuromuscular, interrumpiendo así la comunicación normal entre el nervio y el músculo.

membrana, etc., y entre ellos se encuentra el nAChR. (figura 3).

La función de la membrana plasmática es regular la entrada y salida de sustancias entre el medio interior (citoplasma) y el medio exterior gracias a su permeabilidad selectiva. Además, cumple importantes funciones de reconocimiento, señalización y adhesión celular.

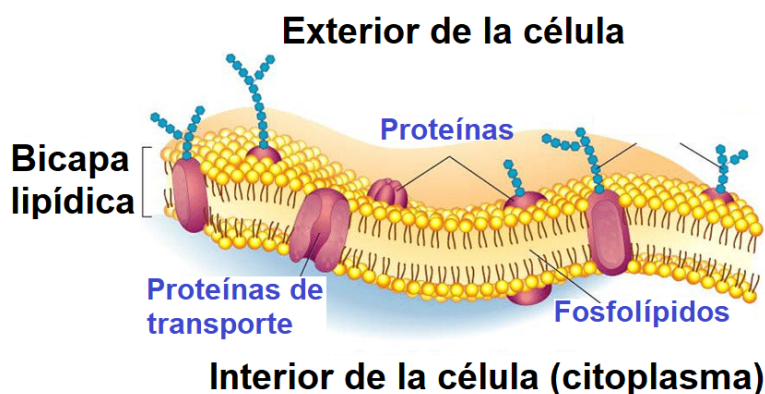


Figura 3: Esquema de la membrana plasmática. Pueden observarse las diferentes proteínas que residen sobre la membrana; una de esas proteínas es el nAChR.

La membrana plasmática, en donde residen los receptores nAChR, afecta tanto sus propiedades funcionales como su distribución espacial. Algunas moléculas esteroides, como el colesterol, influyen significativamente en las propiedades físico-químicas de las membranas al modificar su rigidez y fluidez (F. Barrantes 2004) (Simons y Sampaio 2011).

Por otro lado, el colesterol también podría influir en la dinámica del nAChR al unirse a sus sitios de unión con el colesterol (CRAC) (Fantini y F. J. Barrantes 2013). El nAChR posee sitios de unión para aproximadamente 15 moléculas diferentes de colesterol (Mantipragada y col. 2003). El colesterol es un componente abundante en la membrana postsináptica, por lo que hay gran cantidad de evidencia sobre los diferentes efectos causados por el colesterol al nAChR (F. J. Barrantes 2007).

Un tercer efecto relevante del colesterol es que promueve la formación de microdominios en la membrana plasmática, llamados balsas lipídicas, causando la

compartimentalización lateral de la misma. Estas balsas, abundantes en colesterol, glicerolípidos saturados y esfingomiélin, poseen una fluidez menor a la de su entorno, causando que la dinámica y distribución de las proteínas en su interior sea diferente en comparación al resto de la membrana. Sin embargo, estas balsas pueden desplazarse libremente sobre la membrana plasmática (Figura 4) (Kusumi y col. 2012) (Fujiwara y col. 2002).

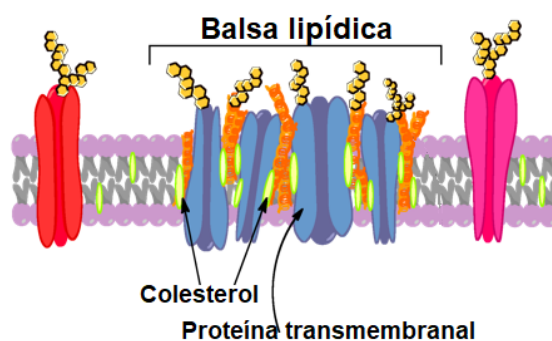


Figura 4: Esquema de las balsas lipídicas en la membrana plasmática. Estas balsas poseen una fluidez menor al resto de la membrana, pero pueden desplazarse libremente sobre la misma.

A escala subcelular, existe evidencia de la interacción entre nAChR con las balsas tanto *in vitro* como *in vivo* (Brusés, Chauvet y Rutishauser 2001) (Campagna y Fallon 2006) (Marchand y col. 2002). La disminución en la concentración de colesterol reduce el número de receptores, dado que se acelera la velocidad de endocitosis y cambia la internalización hacia un mecanismo endocítico diferente (Virginia Borroni y F. J. Barrantes 2011).

Un método para estudiar los cambios de la célula al modificar su concentración de colesterol en membrana, consiste en incubar las células con metil- β -ciclodextrina (CDx) y producir una disminución aguda del colesterol. De forma análoga, es posible incrementar la concentración de colesterol al incubar las células con metil- β -ciclodextrina cargada con colesterol (CDx-Chol).

Es este trabajo se utilizaron las células CHO-K1/A5, usando el protocolo del laboratorio para modificar el colesterol (V. Borroni y col. 2007) (Almarza, Sánchez y F. J. Barrantes 2014).

1.3. Microscopía de súper-resolución de tipo STORM

La microscopía de fluorescencia es una forma de microscopía óptica que utiliza el marcaje de los elementos a estudiar mediante sondas fluorescentes. Se denominan sondas fluorescentes a las moléculas que se unen específicamente al objeto de estudio, y que poseen un grupo químico fluoróforo. Se define como fluoróforo al componente de la sonda que realiza el proceso de fluorescencia, es decir, que tiene la capacidad de absorber luz en una longitud de onda específica y emitir luz en una diferente, típicamente mayor. Ejemplos de sondas fluorescentes son los anticuerpos y proteínas que poseen un grupo químico fluoróforo.

Existe una gran variedad de fluoróforos disponibles que incluyen moléculas orgánicas, puntos cuánticos, proteicos, etc. Los mismos varían en peso molecular, fotoestabilidad, longitud de onda emitida, etc. (Figura 5)



Figura 5: En la actualidad los fluoróforos provenientes de la síntesis orgánica cubren una paleta muy amplia de posibilidades, cubriendo esencialmente todo el espectro visible.

Como se sigue de lo anterior, las sondas fluorescentes se implementan con el fin de ayudar a visualizar el objeto de estudio. El espécimen a observar es iluminado con luz de una longitud de onda específica determinada por el fluoróforo de la sonda utilizada. Como el fluoróforo sólo se encuentra en el compuesto de interés, dada su afinidad específica, es posible estudiar solamente dicho compuesto, filtrando la luz producida por el resto del espécimen para lograr un mejor contraste.

La luz emitida por el fluoróforo es correctamente detectada si supera cierta intensidad, y su contraste con el ruido de fondo es suficiente. A su vez, debido a la difracción de la luz, la imagen producida por una fuente puntual es modificada por la función de dispersión de punto (PSF), usualmente resultando en una imagen

borrosa de la fuente puntual. De allí que si dos fuentes de luz se encuentran muy cercanas entre sí, podrían detectarse como un única fuente. Para determinar si dos fuentes son distinguibles entre sí, se enuncia el criterio de Abbe (ecuación 1):

$$d \approx \frac{\lambda}{2AN} \quad (1)$$

Donde λ es la longitud de onda, AN la apertura numérica del microscopio y d la distancia mínima que debe haber entre las fuentes para ser distinguibles. En la figura 6 se observa a modo de ejemplo un perfil de intensidades para el caso de dos fuentes.

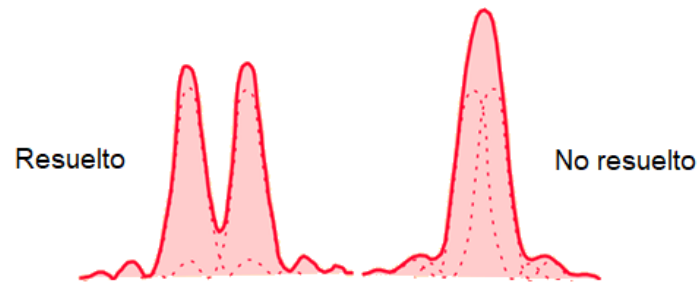


Figura 6: Ilustración del perfil de la distribución de intensidad de emisión típica de dos fluoróforos cercanos; para el caso resuelto y no resuelto. En el caso resuelto la distancia entre las fuentes satisface el criterio de Abbe, permitiendo discernir entre las dos fuentes. Adaptación de (*HyperPhysics* s.f.).

Esta técnica permite una resolución aproximada del orden de 200nm, la cual no es suficiente para resolver algunos sistemas biológicos, como por ejemplo macromoléculas biológicas, cuyos tamaños oscilan entre 30nm y 100nm (Sahl, Hell y Jakobs 2017).

Un posible camino para superar dicho límite de difracción es utilizar microscopía de super-resolución. Existen en la actualidad varias modalidades de tales microscopías, como se muestra en el diagrama de la figura 7, que ilustra el compromiso entre resolución espacial y temporal que alcanzan dichas técnicas actualmente.

La técnica de microscopía de súper-resolución STED (del inglés, *Stimulated emission depletion*) consigue superar el límite de difracción mediante la disminución de la PSF. Esto se logra usando un láser que suprime la fluorescencia de los

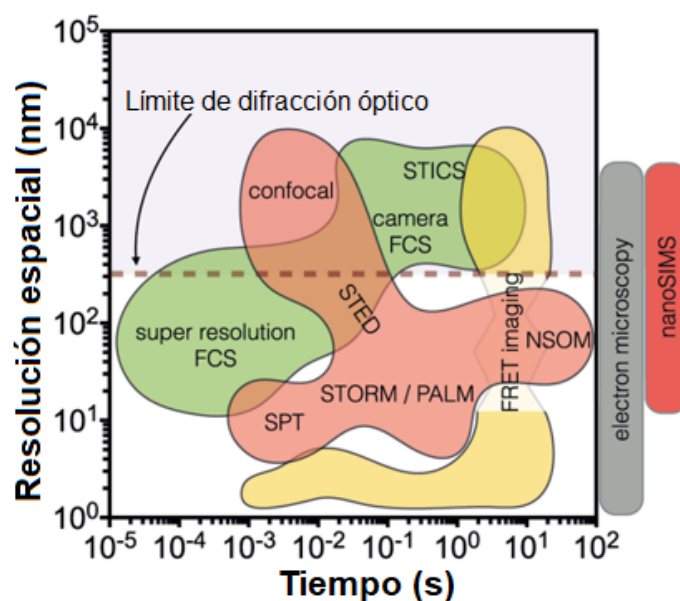


Figura 7: Resolución temporal y espacial de los métodos de microscopía. Abreviaciones: FCS, fluorescence correlation spectroscopy; FRET, Förster resonance energy transfer; NSOM, near-field scanning optical microscopy; PALM, photoactivatable localization microscopy; SPT, single particle tracking; STED, stimulated emission depletion; STICS, spatio-temporal image correlation spectroscopy; STORM, stochastic optical reconstruction microscopy. Adaptación de (Zanten y Mayor 2015)

fluoróforos que se encuentran inmediatamente alrededor del sitio que se busca estudiar. De esta forma, se restringe la emisión de fluorescencia a un área reducida, dando como resultado una PSF menor.

Las técnicas de microscopía de súper-resolución SMLM (del inglés, *Single-molecule localization microscopy*) poseen dos variedades: PALM (del inglés, *Photo-activated localization microscopy*) y STORM (del inglés, *Stochastic optical reconstruction microscopy*), las cuales consisten en microscopía de fluorescencia de súper-resolución basada sobre la alta precisión de localización de fluoróforos fotoconmutables. La emisión de estos fluoróforos siguen un comportamiento estocástico, es decir, que se enciende y apagan de forma aleatoria (Adhikari y col. 2019).

En cada fotograma, sólo una fracción de los fluoróforos son encendidos, para evitar la superposición entre la PSF de los fluoróforos, permitiendo así que sus posiciones sean determinadas con una precisión nanométrica a través de ajustes

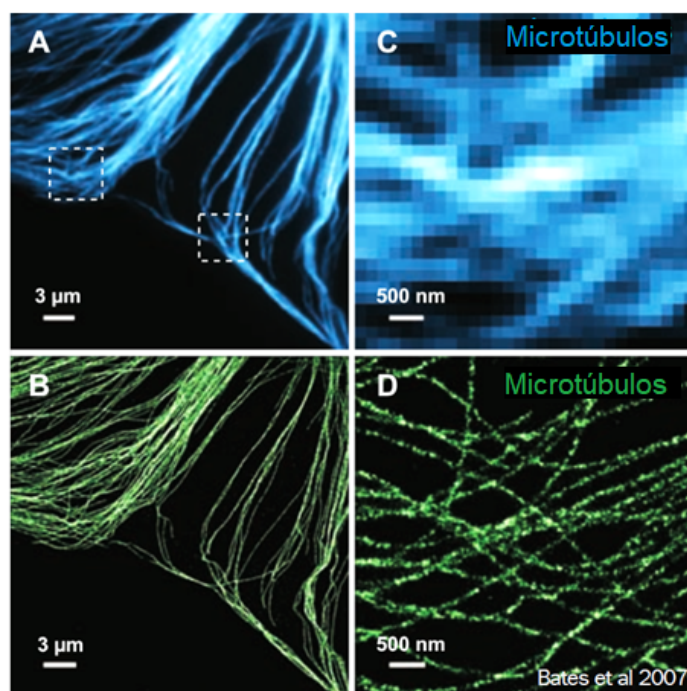


Figura 8: La técnica de STORM original, tal cual la desarrollara Xiaowei Zhang y colaboradores. **Superior)** Microscopía convencional de microtúbulos de células mamarias. **Inferior)** Microscopía STORM del mismo área. Adaptación de (M. Bates y col. 2007).

matemáticos. Las posiciones de los fluoróforos obtenidas a partir de una serie de fotogramas son utilizadas para reconstruir la imagen completa, y así obtener una resolución de aproximadamente 20nm (Rust, Mark Bates y Zhuang 2006) (Fölling y col. 2008), como muestra la figura 9.

En esta investigación se utilizará como marcador fluorescente a la α -bungarotoxina (BTX), un péptido derivado de la serpiente *Bungarus multicinctus*, conjugada con el fluoróforo AlexaFluor555. La BTX es un péptido de alta afinidad al nAChR, con un peso molecular de sólo 8 kDa, considerablemente menor al del nAChR (Couturier y col. 1990) (Dellisanti y col. 2007). Por otra parte, en el estudio de la sección 4 se usará también el anticuerpo monoclonal IgG1 mAb35 como marcador (Mosqueira, Camino y F. J. Barrantes 2020).

Las muestras se observaron por un máximo de 2-4 minutos con una frecuencia de muestreo de 10 ms/foto. Para evitar el fotoblanqueo, cada 70 segundos se mueve la platina cambiando la región de la muestra (Mosqueira, Camino y F. J. Barrantes 2018).

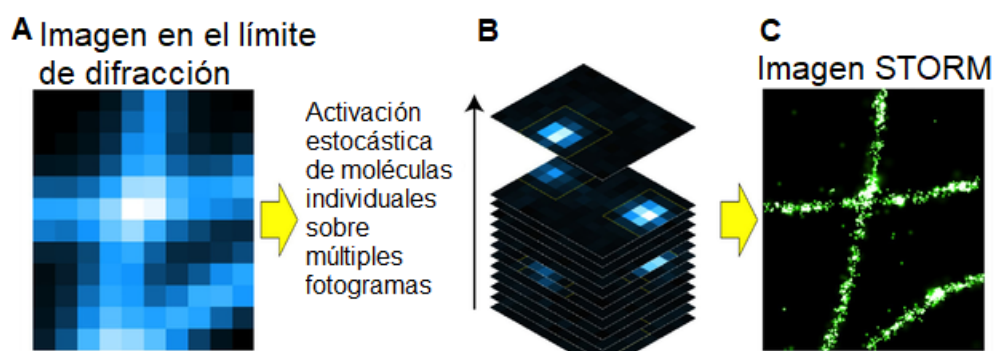


Figura 9: Diagrama del proceso de obtención de imágenes con microscopía STORM. **A)** Imagen de la muestra en microscopía de fluorescencia de campo ancho. **B)** Colección de fotogramas en donde los fluoróforos emiten en momentos distintos, que quedan registrados en sucesivas micrografías, permitiendo obtener las coordenadas espaciales de cada fluoróforo individual con mayor precisión. **C)** Reconstrucción final de la muestra, a partir de las localizaciones obtenidas del conjunto de fotogramas. Adaptación de (Rust, Mark Bates y Zhuang 2006).

1.4. Determinación de las coordenadas espaciales del nA-ChR mediante STORM

Cada fotograma obtenido por el microscopio es examinado con el programa informático ImageJ (Health. s.f.), y su complemento ThunderSTORM (Ovesný y col. 2014), con el fin de obtener las localizaciones del nAChR, es decir, sus coordenadas espaciales en el plano. Dicho programa se encarga de ajustar, mediante cuadrados mínimos, una distribución gaussiana bidimensional al perfil de intensidad de cada imagen (convolucionada por la PSF) de fluorescencia. Como la fluorescencia es estocástica, es posible ajustar las imágenes que de otro modo se superpondrían. Si dicho ajuste resulta exitoso, y sus parámetros pertenecen a un cierto rango ya definido para el sistema, entonces se determina que es una localización del receptor. Por otro lado, el ajuste gaussiano permite tener en cuenta la naturaleza discreta de los píxeles en una cámara digital, y lograr una resolución subpíxel. En la figura 10 se observa un fotograma, con sus localizaciones, a modo de ejemplo.

La precisión de las localizaciones es estimada según la ecuación 2 (Thompson,

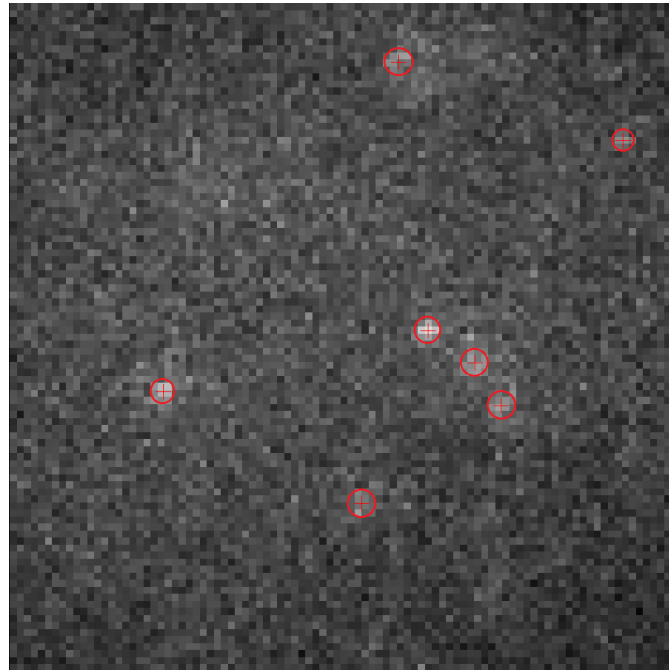


Figura 10: Fotograma capturado por el microscopio, con las localizaciones (rojo) halladas por el ThunderSTORM. El marcador utilizado es BTX con AlexaFluor555.

Larson y Webb 2002):

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{2\sigma^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi\sigma^4 b^2}{a^2 N^2} \quad (2)$$

Donde σ es la desviación estándar de la función de dispersión de punto (PSF), a es el tamaño del píxel en nanómetros, N es la intensidad expresada en número de fotones y, por último, b es el ruido de fondo en unidades de fotones. En este trabajo, la precisión promedio de las localizaciones es de $(37,58 \pm 0,02)nm$ (Ver figura 11a).

Para compensar el efecto de la deriva lateral, la misma fue estimada experimentalmente utilizando marcadores fluorescentes de referencia, para luego ser corregida mediante el software. Además, las herramientas y filtros configurables del ThunderSTORM permiten prevenir errores típicos de localización de partículas, como las localizaciones duplicadas (Huang y col. 2011).

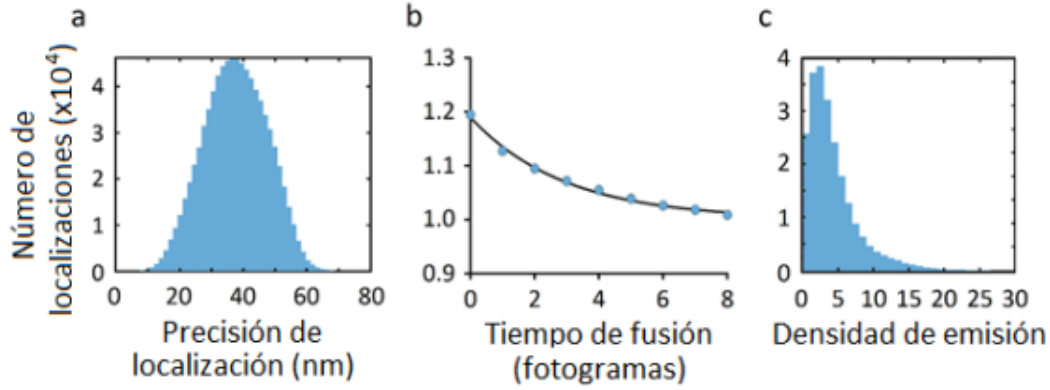


Figura 11: Precisión de localizaciones, tiempo máximo de apagado e intensidad de emisión, del nAChR marcado con BTX en un experimento sobre células CHO-K1/A5. **a)** Histograma de la precisión de las localizaciones utilizando la ecuación 2. **b)** Gráfico del número total de localizaciones en función de distintos tiempos, con el ajuste de la ecuación 3, para estimar el tiempo máximo que el fluoróforo puede estar apagado. **c)** Histograma de la densidad de emisión de cada localización.

1.5. Reconstrucción de las trayectorias a partir de las localizaciones

Una vez obtenidas las localizaciones de cada fotograma, el siguiente paso consiste en unir las temporalmente para reconstruir las trayectorias de los nAChR. Para eso, se utilizó el software Localizer (Dedecker y col. 2012), implementado en el entorno Igor Pro (WaveMetrics. s.f.), que requiere de dos importantes parámetros: el número máximo de fotogramas consecutivos (se estableció el máximo en tres fotogramas que abarcan una duración total de 30 ms) que un fluoróforo puede estar apagado, y la máxima distancia que puede haber entre dos localizaciones para que sean consideradas parte de una misma trayectoria.

El número máximo de fotogramas consecutivos que el fluoróforo puede estar apagado $t_{apagado}$ fue estimado mediante la ecuación semi empírica 3 (Annibale y col. 2011). La misma indica que el número total de fluoróforos en la muestra N , puede ser estimado mediante el número de localizaciones (fluoróforo emitiendo) para diferentes fotogramas td (Ver figura 11b).

$$N(t_d) = N(1 + n_{\text{parpadeo}} e^{1-t_d/t_{\text{apagado}}}) \quad (3)$$

La distancia máxima para considerar dos localizaciones como parte de una misma trayectoria se determina a partir del tamaño de los píxeles de la cámara y del criterio establecido por (Lu y col. 2014). Básicamente, consiste en que la molécula que reaparece en fotogramas consecutivos es considerada la misma si la diferencia entre ambas localizaciones es menor a 106 nm. Esto permite detectar velocidades de hasta $1,33\mu\text{m}^2/\text{s}$, valor mayor al límite de difusión estimado a partir de los experimentos realizados en el laboratorio sobre el receptor de nAChR (Almarza, Sanchez y F. J. Barrantes 2014).

En la figura 11.c se observa un histograma con el número de localizaciones por fotograma, siendo su media de $(3,78 \pm 0,01)$ *localizaciones/fotogramas*. Este nivel de densidad permite un bajo riesgo de intersecciones entre las trayectorias de los fluoróforos.

En el capítulo 3.1.4, se estudia el efecto que, los fotogramas en los que no se registra localización, tiene sobre la validez de las herramientas de análisis propuestas a la hora de determinar la dinámica del nAChR.

1.6. Distinción entre partículas móviles e inmóviles

Uno de los primeros fenómenos que se pueden observar es la presencia de una gran heterogeneidad de las trayectorias: partículas en movimiento junto a otras aparentemente inmóviles o confinadas (figura 12). Como el peso de estas partículas inmóviles podría afectar el resultado de los análisis sobre la población de trayectorias móviles, es necesario poder distinguir entre ambas, y lograr separar a las trayectorias poco difusivas, pero móviles, de las partículas puramente inmóviles.

Con este propósito se aplica un procedimiento (Golan y Sherman 2017) que com-

bina el desplazamiento medio de la partícula $\langle |\Delta \mathbf{r}| \rangle$ con el radio de giro R_g . Así definido, R_g es una estimación del tamaño de una trayectoria (ecuación 4).

$$R_g^2 = \frac{1}{N} \sum_{t=1}^N (\mathbf{r}(t) - \langle \mathbf{r}(t) \rangle)^2 \quad (4)$$

Para las partículas inmóviles, donde gran parte del movimiento aparente se debe a errores de localización, sus localizaciones siguen una distribución gaussiana 2D alrededor de su localización real. Como resultado, las partículas inmóviles deben exhibir un cociente constante entre el radio de giro y el paso medio. Mientras que para las trayectorias móviles, dicho cociente debería incrementarse a lo largo del tiempo. Llamaremos a este procedimiento criterio de Golam-Sherman en referencia a los autores del trabajo citado (Golan y Sherman 2017).

La relación de la ecuación 5, obtenida de experimentos anteriores con células fijadas, es una constante independiente del error de localización o del coeficiente de difusión (Golan y Sherman 2017). Usando este valor como umbral, se examina el cociente entre el radio de giro R_g y el paso medio $\langle |\Delta \mathbf{r}| \rangle$ (entendido como el la media de los desplazamientos) para cada trayectoria y se determina si pertenece a la población móvil o inmóvil. Sólo si lo supera se considera a la partícula como móvil.

$$\sqrt{\frac{\pi}{2}} \frac{R_g}{\langle \Delta \mathbf{r} \rangle} = \text{cte.} \quad (5)$$

1.7. Materiales y métodos para obtener las trayectorias del nAChR

Es este trabajo, hemos estudiado las células CHO-K1/A5 vivas, marcadas con el ligando monovalente α -bungarotoxina fluorescente (BTX) conjugado con AlexaFluor555, cultivadas según el protocolo de Roccamo (Roccamo y col. 1999). La concentración de colesterol de las células fue modificado mediante el protocolo del laboratorio (V. Borroni y col. 2007) (Kellner y col. 2007) (Almarza, Sánchez y F. J. Barrantes 2014) (Mosqueira, Camino y F. J. Barrantes 2018).

Se utilizó microscopía de molécula única (SMLM, *single-molecule localization microscopy*) en la forma de microscopía STORM como se presentó en el capítulo 1.3. Para la localización de las coordenadas espaciales y reconstrucción de las trayectorias, se emplearon los programas ThunderSTORM y Localizer respectivamente, ambos presentados en las subsecciones 1.4 y 1.5.

Los análisis estadísticos de los siguientes capítulos, que son el cuerpo de este trabajo, fueron programados por el autor en los lenguajes MATLAB y Python.

1.8. Trayectorias del nAChR y organización del trabajo

En la figura 12 se pueden observar ejemplos de las trayectorias reconstruidas para el nAChR. Una primera observación es que las trayectorias no están distribuidas de forma homogénea en el espacio, sino que se agrupan en lo que se denominan acúmulos (“clusters” en inglés). El capítulo 2 de este trabajo propone el uso de diagramas de Voronoi para analizar la distribución espacial de un conjunto de puntos en el espacio para, en última instancia, estudiar la distribución espacial del nAChR.

Una segunda observación que se destaca a partir de la figura 12 es la diferente dinámica de las trayectorias. Se puede ver que algunas parecen estar completamente inmóviles, mientras que otras realizan recorridos espaciales de diferentes extensiones. El capítulo 3 de este trabajo propone utilizar el MSD (del inglés, *mean squared displacement*) con el fin de estudiar las propiedades dinámicas del transporte, mientras que en el capítulo 4 se exploran las propiedades mecánicas del entorno de partículas confinadas.

Por último, en el capítulo 5 se pone a prueba un método bayesiano para contemplar posibles cambios de dinámica en una misma trayectoria, fenómeno que escapa a los análisis anteriores. Con este método, sería posible interrogar si la dinámica de un único nAChR va cambiando a lo largo del tiempo.

Finalmente, en el capítulo 6 se revisan y discuten los resultados obtenidos en los diferentes análisis, en diálogo con la bibliografía actual.

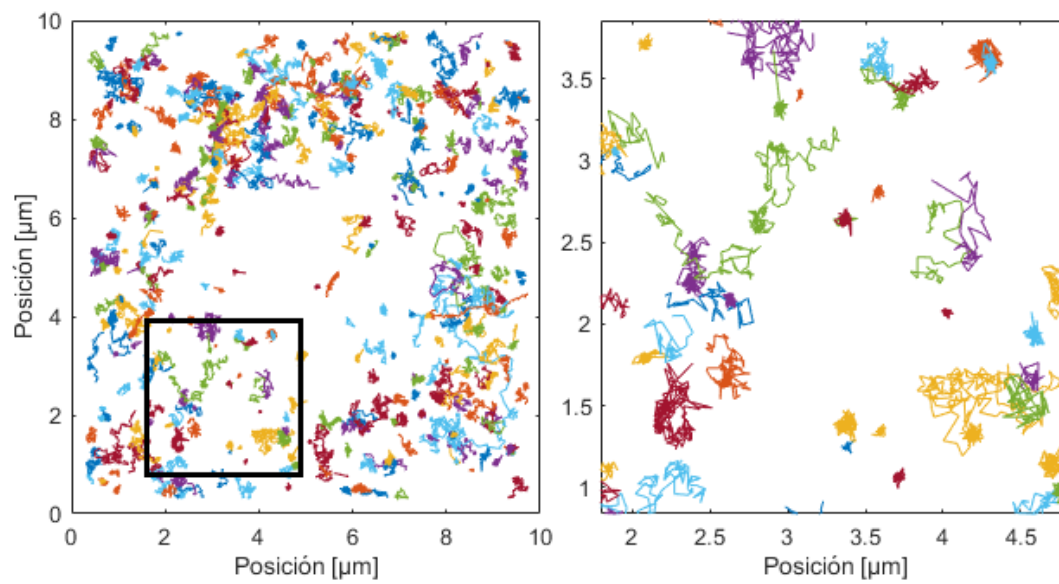


Figura 12: Reconstrucción de trayectorias de nAChR marcado con BTX, obtenidas a partir de microscopía STORM. El tamaño del nAChR es del orden de $0,01\mu m$ **Izquierda)** Conjunto total de las trayectorias que tuvieron una duración mayor a 0,6 segundos. **Derecha)** Detalle magnificado de la imagen anterior. Se puede observar una gran heterogeneidad en la dinámica de las trayectorias; algunas parecen estar en una posición fija, mientras que otras difunden por el espacio recorriendo extensiones espaciales notablemente mayores.

2. Estudio del agrupamiento de los receptores mediante diagramas de Voronoi

2.1. Introducción

Como ya se explicó anteriormente (subcapítulo 1.4), a partir de la reconstrucción de una trayectoria experimental se puede obtener un punto en el plano que represente la posición de la partícula en un dado instante. Si se consideran las posiciones de muchos receptores, es posible estudiar su agrupamiento con diferentes enfoques. Uno de esos posibles enfoques es usando un diagrama de Voronoi, que ha sido utilizado para estudiar la cartografía en proteínas de membrana y su agrupamiento en acúmulos. (Andronov y col. 2016) (Levet y col. 2015) (Nieves y Owen 2020).

El diagrama de Voronoi de un conjunto de N puntos es una forma de particionar el plano en N polígonos convexos, de tal forma que a cada punto inicial se le asigna la región formada por el área más cercana a éste. El límite de esta región se halla en los puntos en los que las áreas de los vecinos más cercanos al punto original se encuentran con la zona correspondiente a este último.

Formalmente, cada polígono de Voronoi se construye a partir de las intersecciones de los semiplanos formados al trazar los bisectores de ese punto inicial con el resto de los puntos iniciales. Cada punto inicial genera exactamente un polígono (Figura 13).

El objetivo de este capítulo consiste en determinar cómo están distribuidos los receptores en la membrana, y en particular cómo varía su grado de confinamiento respecto al de una distribución aleatoria. Para esto, se comparan los diagramas de Voronoi generados a partir de puntos aleatorios, con los generados a partir de los puntos que representan las coordenadas espaciales los receptores.

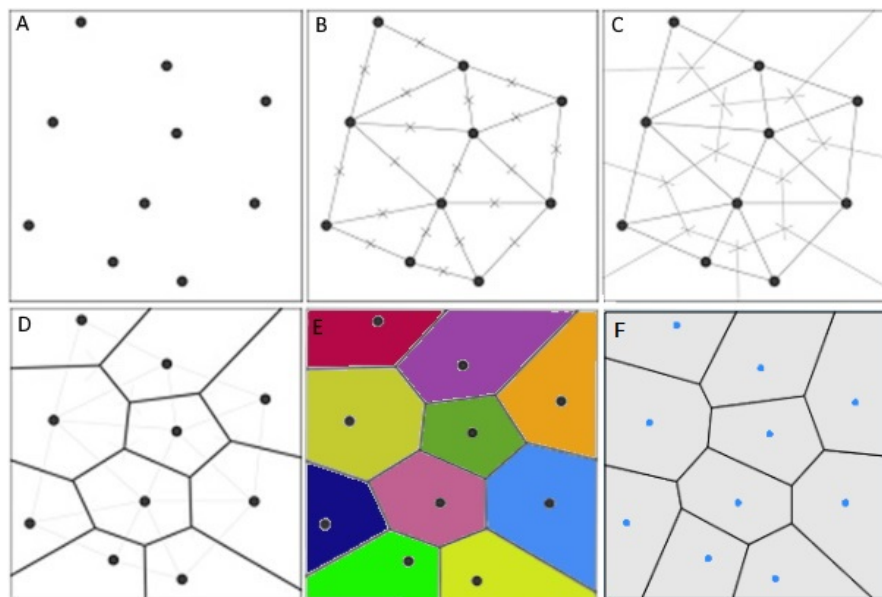


Figura 13: Ilustración de la construcción de un diagrama de Voronoi de diez puntos iniciales. **A)** Puntos iniciales en el plano. **B)** Rectas que unen los puntos iniciales, con el punto equidistante marcado con una cruz. **C)** Mediatrices entre los puntos iniciales, que serán las aristas de los polígonos de Voronoi. **D)** Diagrama de Voronoi con diez polígonos. **D)** Diagrama de Voronoi coloreado para diferenciar fácilmente los diferentes polígonos. **F)** Diagrama de Voronoi en el formato usado en este trabajo.

2.2. Desarrollo

2.2.1. Construcción del diagrama de Voronoi a partir de las trayectorias

Para construir un diagrama de Voronoi es necesario contar con los puntos iniciales. Se toma un único punto inicial por cada trayectoria reconstruida. Como punto inicial se prueban diferentes elecciones: la primera localización de la trayectoria, la vigésima localización, la localización promedio, etc., con el fin de estudiar si existen diferencias significativas al cambiar el punto de localización que se utiliza como punto inicial.

Teniendo en cuenta que sólo se analizan las trayectorias que tengan una longitud mayor a 50 pasos (0,5 segundos), para cada diagrama hay una cantidad total de puntos iniciales que oscila entre 10 a 150 por campo. Como se mencionó en el capítulo introductorio (Ver subcapítulo 1.4), cada campo tiene un área de $10\mu m$ por $10\mu m$ observada durante 70 segundos. Los datos constan de diez campos por cada condición de colesterol, haciendo un total de treinta campos. Por lo tanto, se tendrán en total treinta diagramas de Voronoi para analizar.

Como el interés radica en estudiar la distribución espacial de los receptores, se obviará el hecho de que las trayectorias no son exactamente simultáneas. Es decir, que si bien fueron obtenidas en el mismo campo podría haber una diferencia de algunos segundos entre la observación de las diferentes trayectorias. Cabe recordar que las trayectorias distintas pertenecen a receptores distintos.

Para cada campo se hacen tres análisis: el primero abarca solamente a las trayectorias móviles, el segundo solamente a las partículas inmóviles (véase la distinción entre partículas móviles y inmóviles en el subcapítulo 1.6), y el tercero contempla la suma de ambos grupos sin discriminar por movilidad (Figura 14).

2.2.2. Análisis de las áreas de un diagrama de Voronoi

A partir del diagrama de Voronoi es posible obtener el área de cada uno de sus polígonos y analizar su distribución de áreas mediante la densidad estimada

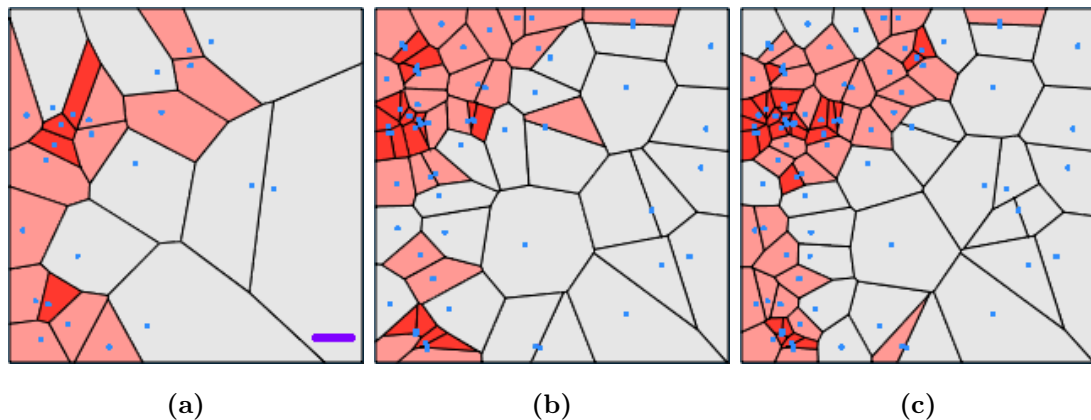


Figura 14: Ejemplo de diagramas de Voronoi construidos para un mismo campo experimental (BTX CDx), utilizando la primera localización de cada trayectoria como puntos iniciales. Los polígonos se pintan de diferentes colores (gris, rosa o rojo) según el área de los mismos, con el fin de favorecer la visualización de los acúmulos. La línea violeta mide $1\mu\text{m}$ de longitud. **a)** Diagrama construido sólo utilizando las trayectorias móviles como puntos iniciales (24 puntos). **b)** Diagrama construido sólo con las partículas inmóviles como puntos iniciales (65 puntos). **c)** Diagrama utilizando todas las trayectorias como puntos iniciales, sin discriminar por movilidad (89 puntos).

(del inglés, *smooth kernel density estimate*). Como la cantidad de puntos iniciales varía entre 10 y 150, el ajuste de esta densidad mediante una expresión analítica no es una opción robusta, por lo que se tomará la posición del máximo (moda), a la que denominaremos Mo_{Exp} (moda experimental) como observable a evaluar. La Mo_{Exp} proporciona información sobre cómo están distribuidas las partículas permitiendo, en particular, distinguir situaciones que difieran de un proceso de Poisson (partículas distribuidas de forma aleatoria) (Tanemura 2003).

2.2.3. Distribución de áreas en un diagrama de Voronoi para un proceso de Poisson

En este contexto un proceso de Poisson significa la distribución aleatoria de una dada cantidad de puntos en un área definida. Esos puntos aleatorios son utilizados como los puntos iniciales del diagrama de Voronoi para un proceso de Poisson lo que permitirá poder comparar las distribuciones experimentales con las distribuciones aleatorias.

La distribución de áreas de un diagrama de Voronoi para un proceso de Poisson se ajusta a una distribución Gamma (Tanemura 2003). Una distribución gamma es la distribución de probabilidad de máxima entropía cuya función de densidad es:

$$f(x) = \lambda e^{-\lambda x} \frac{(\lambda x)^{k-1}}{\Gamma(k)} \quad (6)$$

Finalmente, una vez obtenido el ajuste de la función Gamma se calcula su moda. Dicho valor será llamado Mo_{Teo} (moda teórica) y representa **el valor más frecuente del área para la distribución aleatoria**. Cabe aclarar que el proceso de generación de puntos, distribuidos aleatoriamente, se itera múltiples veces ($1000 \times N_{iniciales}$, donde $N_{iniciales}$ es la cantidad de puntos iniciales del diagrama a estudiar) y la distribución Gamma se ajusta a la distribución global con el objetivo de reducir el error estadístico.

En la figura 15 se pueden observar tres distribuciones muy diferentes pero que poseen la misma cantidad de puntos iniciales $N_{iniciales}$: un arreglo hexagonal ordenado de tal forma que maximiza la distancia entre puntos, una distribución completamente aleatoria, y una distribución aleatoria en donde se agregaron artificialmente dos clústers. Se observa que las distribuciones de las áreas son muy distintas. Como era de esperarse, un valor mayor de la moda representa un menor agrupamiento (caso hexagonal, azul), mientras que un valor menor de la moda significa áreas más pequeñas y mayor agrupamiento (caso clúster, amarillo). Por último, la situación aleatoria (naranja) corresponde a un valor intermedio entre ambos casos.

Finalmente, el valor de interés es la diferencia entre la moda teórica Mo_{Exp} (moda de la distribución gamma del área aleatoria) y la moda experimental Mo_{Teo} (moda de la densidad de área experimental) (ecuación 7):

$$\Delta M = (Mo_{Exp} - Mo_{Teo}) \quad (7)$$

En conclusión, el valor ΔM indica **cuánto y cómo se desvía la distribución experimental de una distribución aleatoria**.

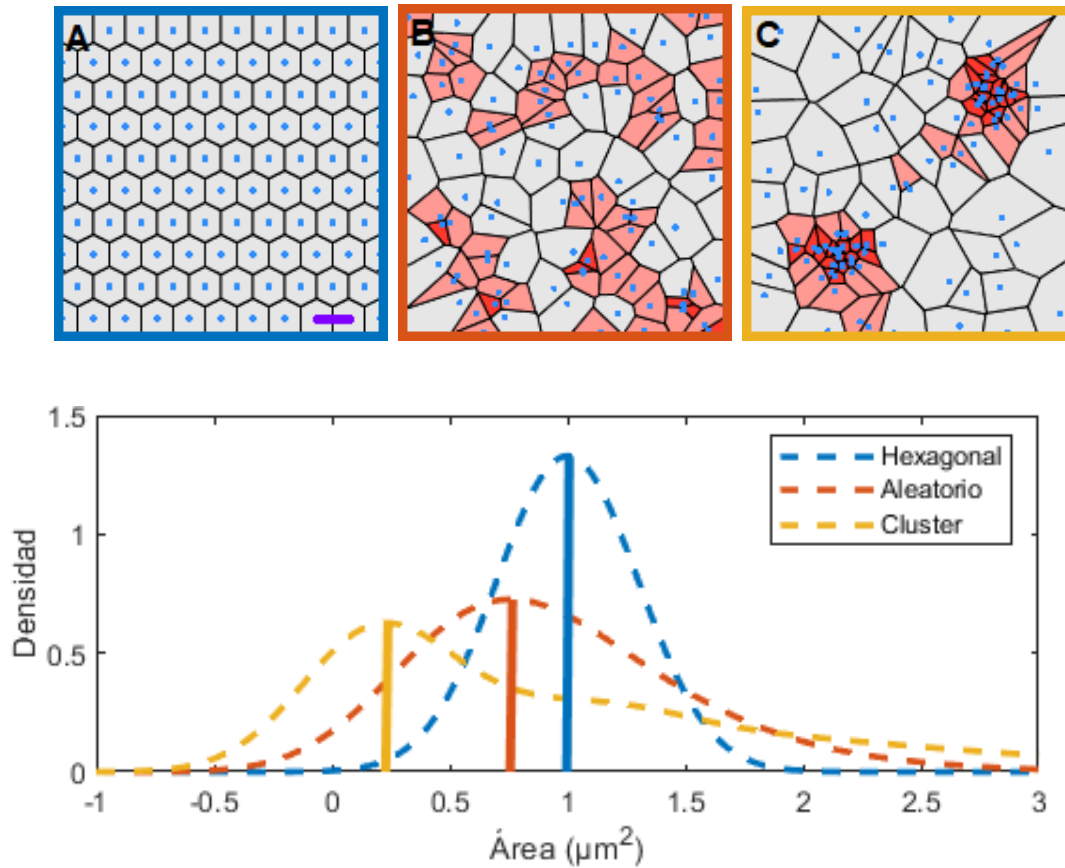


Figura 15: Arriba) Diagramas de Voronoi simulados para tres geometrías distintas, con 100 puntos iniciales en total. La línea violeta mide $1\mu m$ de longitud. **A)** Geometría hexagonal. **B)** Geometría aleatoria. **C)** Geometría con dos *clusters* o acúmulos. Abajo) Densidad de Kernel del área de los polígonos para los tres casos superiores. Respecto al caso aleatorio, la moda se desplaza hacia la izquierda (caso con clústers, color amarillo) o hacia la derecha (caso hexagonal, color azul). A partir de la moda del diagrama de Voronoi experimental se infiere el grado de agrupamiento de los puntos iniciales. Los valores negativos del área se deben al ancho (width) del núcleo (kernel) utilizado en la construcción de los gráficos.

2.2.4. Incerteza de ΔM

A medida que aumenta la cantidad de puntos iniciales, utilizados para construir el diagrama de Voronoi, hay una menor variabilidad en la curva de densidad. Esto da como resultado una moda más precisa y, por ende, un valor de ΔM con menos incerteza. Por lo tanto, es importante determinar las incertezas para diferentes valores de ΔM .

Con ese objetivo, se simularon una gran cantidad de distribuciones aleatorias ($1000 \times N_{iniciales}$) para diferentes cantidades $N_{iniciales}$ de puntos iniciales. Para cada simulación se obtiene su moda teórica, y la distribución de todas esas modas teóricas es normal. Se elige tomar como incerteza $\epsilon_{\Delta M}$ del valor ΔM la mitad de la desviación estándar de esta distribución.

En la figura 16 (curva azul) se observa el valor de la incerteza, en función de la cantidad de puntos iniciales aleatorios al formar el diagrama de Voronoi. Se puede ver cómo, al aumentar la cantidad de puntos iniciales, la incertidumbre va disminuyendo de forma exponencial. Si el campo tiene al menos aproximadamente 30 partículas, se obtienen valores de incerteza aceptables.

Por otro lado, para poder comparar entre diferentes valores de ΔM y evaluar su significancia, es importante darle mayor peso a las magnitudes que tengan menos incerteza. Además, como los campos tienen distintos números de puntos iniciales, se quiere pesar más a los campos más poblados ya que poseen una variabilidad menor.

Por lo tanto, se calcula el promedio ponderado de ΔM utilizando como peso la inversa, al cuadrado, de su incerteza $\epsilon_{\Delta M}$, es decir:

$$w_i = \frac{1}{(\epsilon_{\Delta M_i})^2} \quad (8)$$

Donde $\epsilon_{\Delta M_i}$ es la incerteza de cada ΔM_i y w_i el peso correspondiente.

En la figura 16 (curva roja) se puede ver como el peso relativo aumenta al incrementar la cantidad de puntos de iniciales del campo.

Esos mismos pesos se utilizan nuevamente para calcular la incerteza del promedio ponderado. La ecuación 9 muestra cómo calcular la varianza del valor promedio,

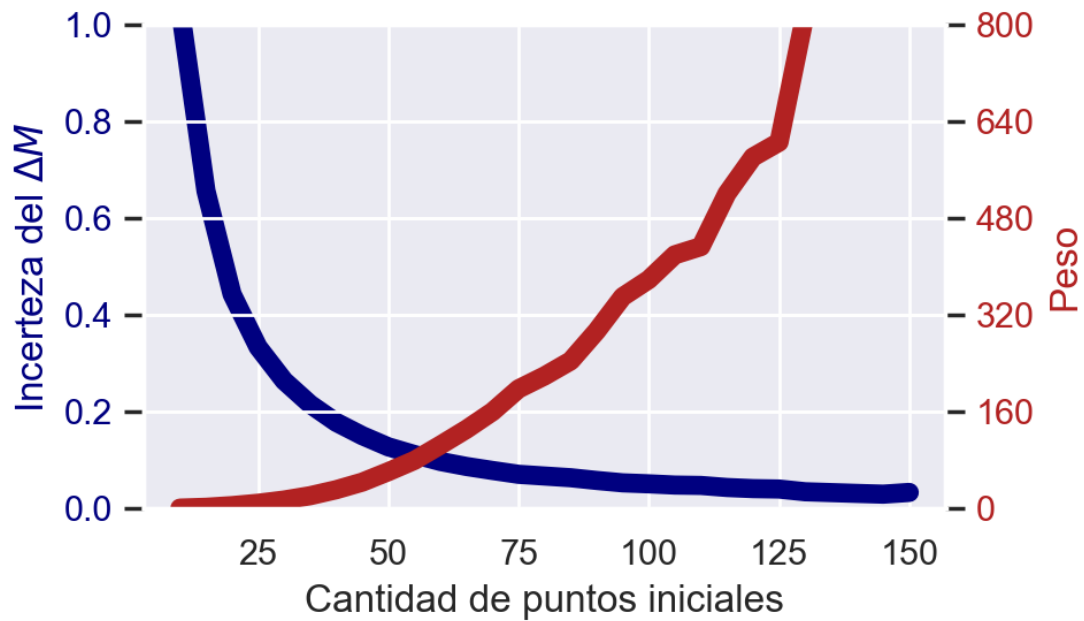


Figura 16: Incerteza y peso del ΔM en función de la cantidad de puntos iniciales del diagrama de Voronoi. Se registra una drástica reducción del error al aumentar la cantidad de puntos iniciales.

usando los mismos pesos ya calculados.

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (\Delta M_i - \overline{\Delta M})^2 w_i}{\sum w_i} \quad (9)$$

Donde σ^2 es la varianza. Luego, el error estándar es $\sqrt{\sigma^2/N}$. Con N la cantidad total de valores ΔM , que en este caso es la cantidad de campos analizados.

2.3. Resultados

En la figura 17 se observan tres diagramas de Voronoi experimentales junto al análisis de sus curvas de densidad.

El primer diagrama de Voronoi de la figura 17.A (marco verde) tiene una ΔM mayor al valor teórico, significando un agrupamiento menor al caso aleatorio. No hay ningún clúster, ni siquiera los que se podrían haberse formado por efecto del azar. Esto es similar a ordenar los puntos de tal forma que maximicen las distancias entre sí, produciendo un diagrama de Voronoi homogéneo.

El segundo diagrama 17.B (marco azul) tiene una ΔM cercano a cero, es decir, que corresponde a un agrupamiento muy similar al caso aleatorio. Existen algunos clústers pero son limitados en tamaño y cantidad de puntos; es la situación que se espera al dispersar, de forma totalmente aleatoria, esa cantidad de puntos y que no exista ningún mecanismo que acerque o aleje a los puntos.

El tercer diagrama 17.C (marco amarillo) corresponde a un agrupamiento mayor que el aleatorio. Se puede ver una región con un clúster muy denso, que no puede explicarse como producto del azar. Al mismo tiempo, otros sectores del diagrama quedan con una muy baja densidad debido a que la gran concentración de puntos en otra región.

Los valores obtenidos se muestran en la tabla 1

Ejemplo:	ΔM	Cantidad de puntos
Verde	$0,39 \pm 0,12$	51
Azul	$0,06 \pm 0,05$	112
Amarillo	$-0,78 \pm 0,07$	73

Tabla 1: Resultados obtenidos para los diagramas de Voronoi de la figura 17. Puede observarse una diferencia notable entre los valores de ΔM .

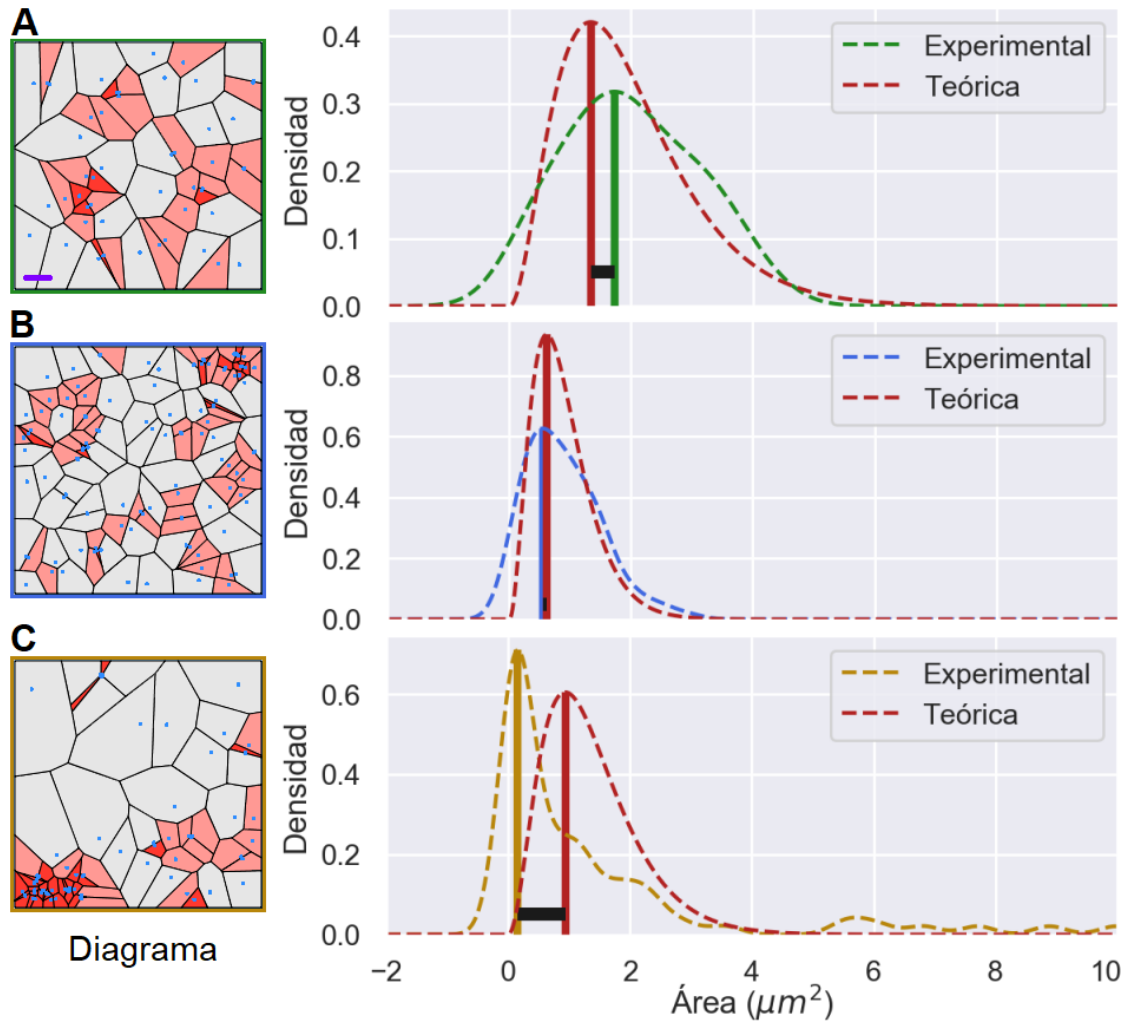


Figura 17: Ejemplos experimentales de diagramas de Voronoi junto a la densidad de área. La curva teórica (rojo) representa la distribución aleatoria más probable. La línea negra horizontal en la curva de densidad del área, es la distancia entre la moda de la curva experimental y la moda de la curva teórica, que denominamos (ΔM). La barra violeta mide $1\mu m$ de longitud. **A)** Situación en donde el diagrama de Voronoi posee un menor agrupamiento en relación a la situación aleatoria ($\Delta M > 0$). **B)** El diagrama de Voronoi posee un agrupamiento muy similar al caso aleatorio ($\Delta M \approx 0$). **C)** Situación en donde el diagrama de Voronoi tiene un mayor agrupamiento en relación a la situación aleatoria ($\Delta M < 0$).

2.3.1. Efecto de la concentración de colesterol y la movilidad en la distribución de los receptores

La figura 18 es un gráfico del valor de ΔM hallado en cada campo, discriminando según las diferentes movilidades observadas tras la modificación de la concentración del colesterol en la membrana celular. Se pueden observar dos fenómenos: El primero es que la condición en la que se ha depletado el nivel de colesterol en la membrana (“CDx”) presenta una menor dispersión de los puntos, indicando una menor variabilidad entre los distintos campos de CDx (lo cual también implica una menor variabilidad a lo largo del tiempo). Segundo, la mayor parte de los puntos están por debajo del cero (línea azul) representando un **leve agrupamiento en comparación al caso aleatorio**. Este fenómeno se presenta en todas las condiciones experimentales estudiadas.

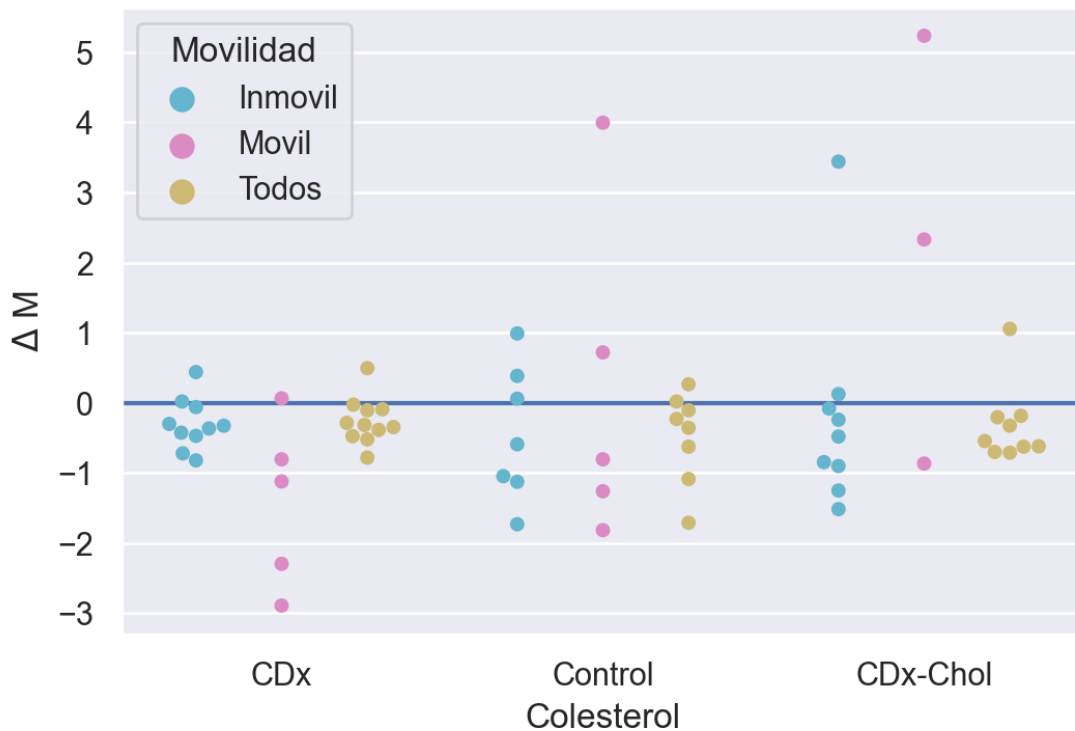


Figura 18: Gráfico de enjambre para la ΔM de los diagramas de Voronoi experimentales. Puede verse como la mayoría de los puntos están por debajo del cero, por lo que hay una tendencia hacia el agrupamiento en acúmulos, independientemente de la condición de colesterol o movilidad.

Se debe tener en cuenta que no todos los valores de ΔM poseen la misma incerteza (que oscila entre 0,03 y 1, con un promedio de 0,3). Esto motiva a calcular un promedio ponderado (figura 19), donde se ve que (exceptuando el régimen móvil que tiene una incerteza muy alta) todos los valores están por debajo del cero indicando un **agrupamiento promedio mayor al caso aleatorio**.

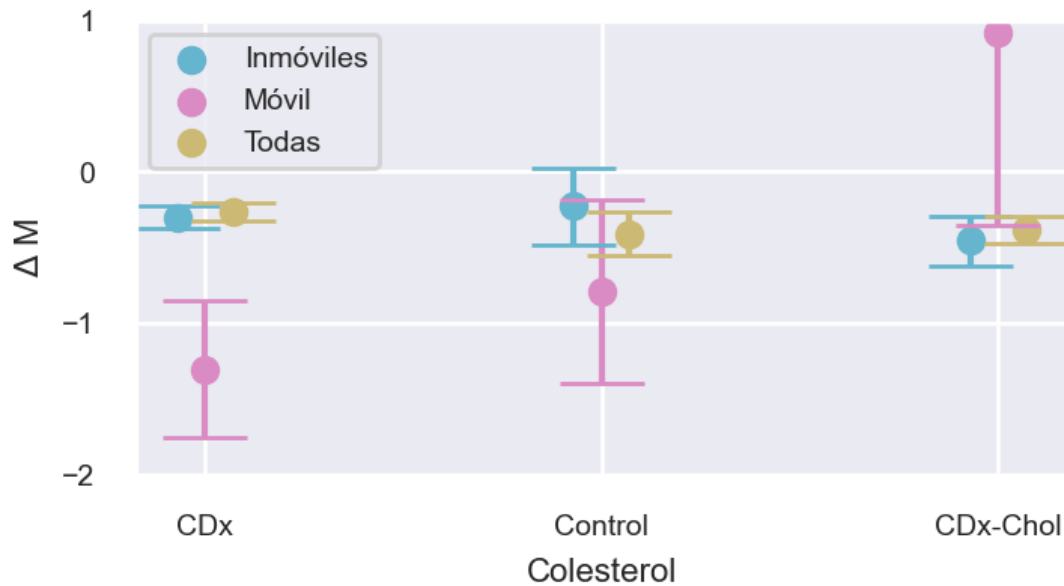


Figura 19: Promedio ponderado de ΔM , con su error estándar. Se observa que los valores están por debajo del cero, señalando una tendencia hacia la formación de clústers. Las trayectorias móviles (rosas) al tener una mala estadística muestran una altos valores de incerteza.

2.3.2. Fracción de campos con mayor agrupamiento a la situación aleatoria

A partir de la figura 18 es posible separar los puntos según si están por encima ó por debajo del cero, es decir, si presentan menor o mayor agrupamiento en comparación al caso aleatorio. De esta forma se obtiene el porcentaje de campos que tienen un mayor agrupamiento respecto al caso aleatorio (figura 20). Los campos cuyo valor absoluto de ΔM , es decir $|\Delta M|$, fue menor que su incerteza no fueron considerados por no ser concluyentes.

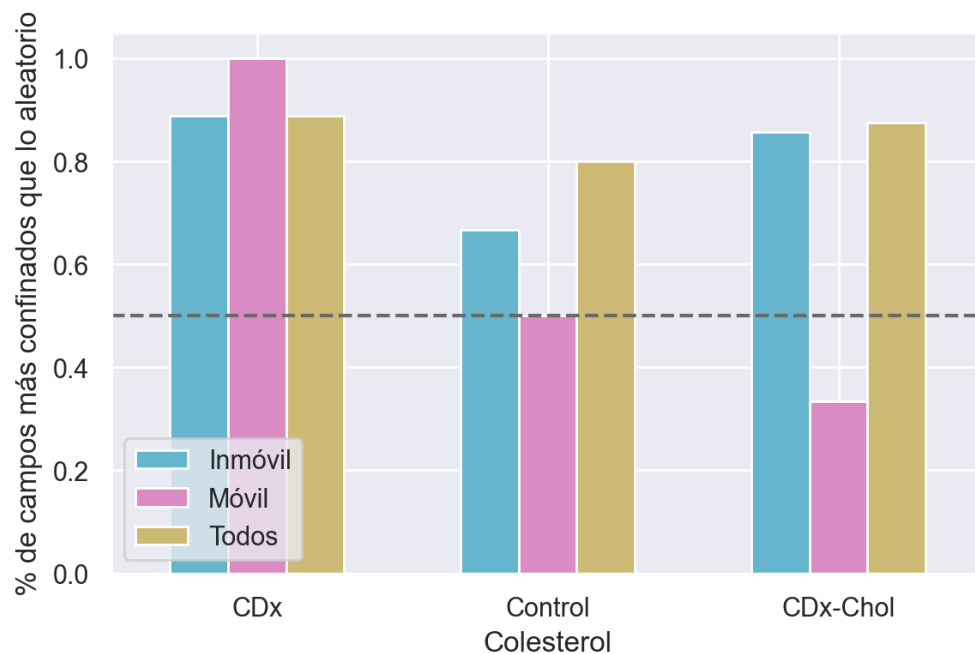


Figura 20: Fracción de campos experimentales que tuvieron un agrupamiento mayor respecto al caso aleatorio. Se puede observar que en todos los casos (exceptuando el caso móvil debido a su pobre estadística) el porcentaje es mayor a 0,5 (línea punteada). Esto implica que los campos experimentales poseen un agrupamiento mayor al que tendrían si hubiesen sido generados por una distribución aleatoria de puntos.

Si la distribución de los puntos del sistema experimental fuese totalmente aleatorio, se esperaría que los valores de porcentaje fuesen constantes y cercanos a 0,5. Sin embargo esto no es así, ya que se observa un alto porcentaje de campos agrupados, indicando la presencia de clústers, en concordancia con la figura 19.

Por último, en las tres condiciones de colesterol se sigue la misma tendencia, indicando que el fenómeno de formación de clústers está presente (aunque tal vez en diferente medida) independientemente de la concentración de colesterol.

2.3.3. Efecto del tiempo en los diagramas de Voronoi experimentales

En el subcapítulo 2.2.1 se mencionó que los puntos iniciales son las localizaciones elegidas para representar la posición de la trayectoria en el diagrama de Voronoi. Con el fin de estudiar si hay relevancia al elegir esas localizaciones, se procedió a realizar los diagramas de Voronoi para diferentes elecciones.

En la figura 21, que sigue la misma forma de representación que la figura 19, se muestra cómo cambia el ΔM de los resultados entre usar una u otra otra elección de los puntos iniciales.

Se puede observar que la elección de los puntos iniciales no afectan de manera significativa los resultados del diagrama de Voronoi para partículas consideradas inmóviles. Esto se debe porque el desplazamientos de cada partícula es muy pequeño con respecto a las distancias entre ellas.

Respecto a las trayectorias móviles, sí se pueden observar diferencias al elegir distintos puntos iniciales. Pero, debido al alto grado de incerteza, se descartan los análisis de las trayectorias móviles.

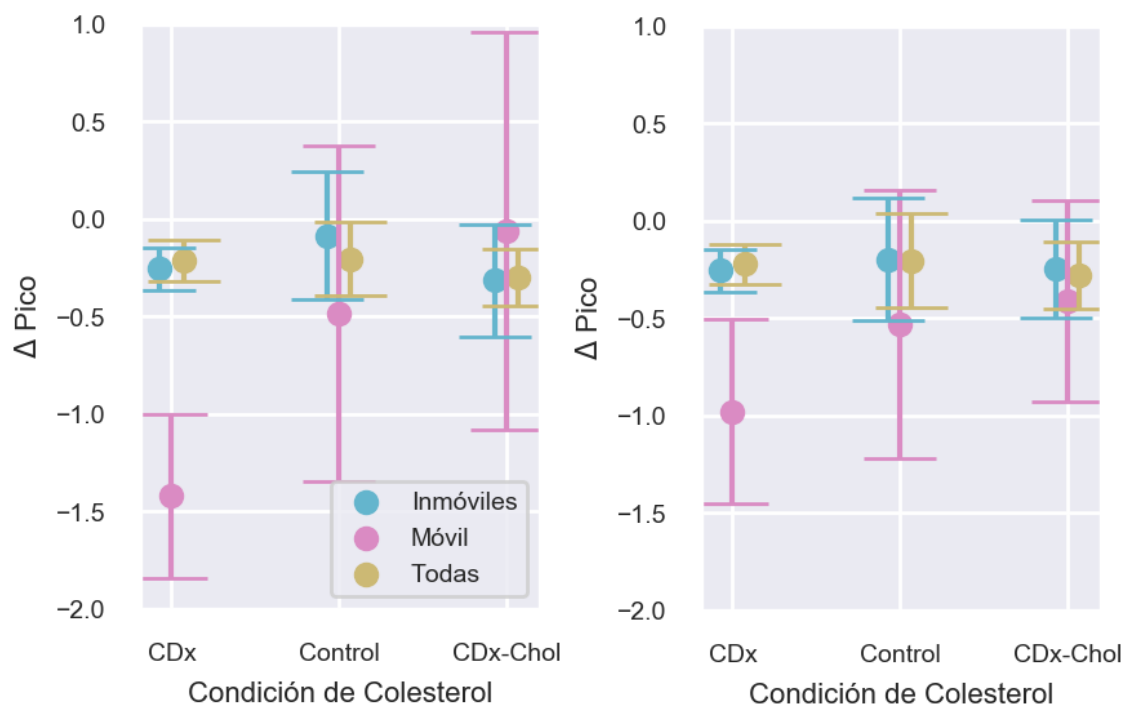


Figura 21: Promedio ponderado de los valores de ΔM para las distribuciones de las densidades de Voronoi, usando dos elecciones de puntos iniciales. **Izquierda)** Se utilizó la primera localización como punto inicial. **Derecha)** Se utilizó la vigésima localización (0,2 s) como punto inicial.

2.3.4. Agrupamiento en diferentes regiones de células fijadas

Los siguientes resultados corresponden al estudio de los nAChR en la superficie celular, pero con una diferencia: la célula se encuentra fijada químicamente con paraformaldehído. Sus localizaciones fueron reconstruidas mediante microscopía STORM, al igual que el resto de las muestras biológicas, como se describe en el subcapítulo 1.3.

Se seleccionaron, como regiones de interés (ROIs), cuadrados de $0,8\mu m$ de lado que cubrieran las diferentes zonas de estudio (periferia celular, interior celular y perinúcleo). La elección del tamaño del ROI responde a dos necesidades: por un lado, tener la mayor cantidad posible de ROIs y, por otro lado, exigir una cantidad mínima de partículas por ROI, lo cual impone un tamaño mínimo de ROI. Se registraron entre 100 y 500 partículas por ROI. Un mínimo de 100 partículas por campo asegura una baja incerteza en el valor de ΔM (figura 16).

En la figura 24.A se observan las localizaciones obtenidas para los nAChR. La primera observación es que se pueden apreciar los bordes de la célula con el entorno (delimitado con línea negra). La segunda observación es la presencia del núcleo celular (delimitado con línea amarilla), fácilmente identificable por la ausencia de localizaciones y su posición central.

En las figuras 24 (B, C y D) se observan nuevamente las localizaciones del nAChR, pero esta vez se señalan las regiones de interés, en forma de pequeños cuadrados, seleccionadas para las diferentes zonas de la célula: periferia (naranja), interior (verde) y perinúcleo (rojo).

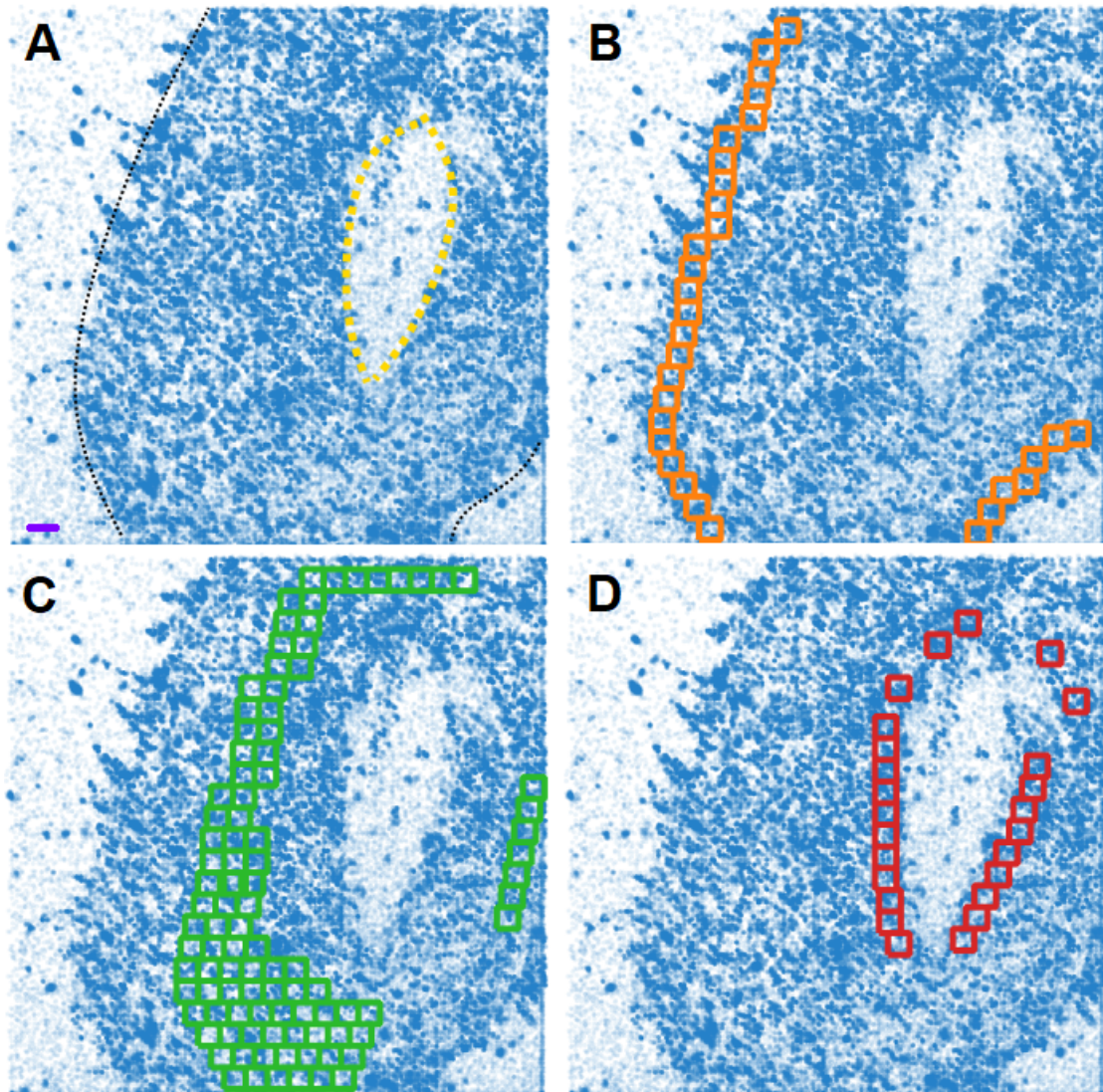


Figura 22: **A)** Reconstrucción de las localizaciones del nAChR en una célula fijada y marcada con BTX. Puede observarse el contorno de la célula (línea negra) y el núcleo (línea amarilla). La línea violeta representa $1\mu m$ de longitud. **B)** Regiones de interés (en naranja, 30 ROIs en total) sobre la periferia de la célula, seleccionadas para realizar el análisis de Voronoi. **C)** Regiones de interés (en verde, 97 ROIs) sobre el interior de la célula. **D)** Regiones de interés (en rojo, 25 ROIs) sobre el perinúcleo.

Los resultados obtenidos se observan en la figura 23 donde se muestra el valor ΔM calculado para cada una de las regiones de interés. La primera cualidad que se observa es que, para todos los casos, los valores de ΔM son negativos, indicando la presencia de acúmulos. La segunda cualidad es que la media de los valores de ΔM es muy similar entre las diferentes zonas de la célula estudiada.

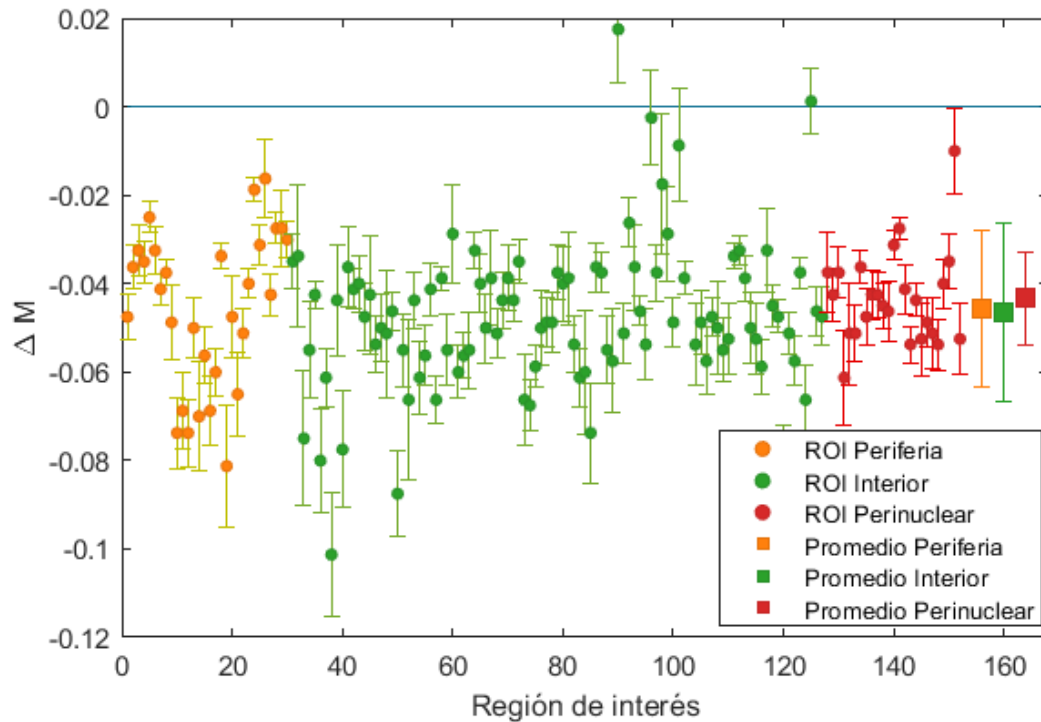


Figura 23: Resultados del análisis de Voronoi sobre las regiones de interés en la célula fijada, diferenciado según la zona interior (verde), periférica (naranja) o perinuclear (rojo). El eje vertical representa el valor ΔM obtenido para cada una de las regiones de interés analizadas. En el extremo derecho se presentan los valores medios de ΔM . Se observa que los valores son inferiores a cero, indicando la presencia de acúmulos en todas las regiones analizadas de la célula.

En la figura 24 se tienen nuevamente los resultados obtenidos por el método de Voronoi, pero representados de forma que sea más visible su distribución. Puede verse que existen leves diferencias, pero que no son estadísticamente significativas de acuerdo a los tests de Kolmogorov–Smirnov y Kruskal–Wallis.

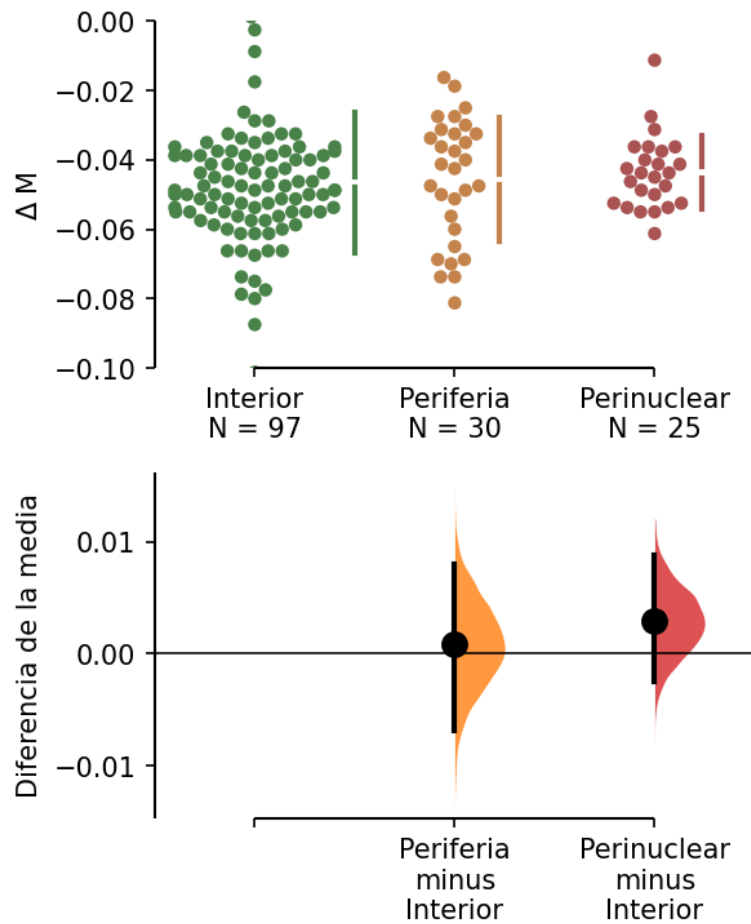


Figura 24: Análisis de los resultados del método de Voronoi. **Superior)** Valor ΔM obtenido en cada región de interés. Puede verse que son valores negativos, indicando la presencia de acúmulos para las tres zonas. **Inferior)** Diferencia de la media entre las tres distribuciones de los valores ΔM . No logran determinarse diferencias significativas entre las diferentes zonas de la célula.

2.4. Conclusiones

Ante todo, se puede concluir que el análisis de las áreas de los polígonos de Voronoi resultó exitoso para cuantificar el agrupamiento de los receptores de nAChR en la membrana de las células CHO-K1/A5. Se obtuvo una métrica que permite medir el grado de disimilitud entre una distribución espacial dada y la distribución espacial aleatoria. También, permite distinguir si dicha disimilitud es en dirección hacia áreas menores de los polígonos de Voronoi (indicando una distribución de puntos más agrupada), o bien, hacia áreas de mayor tamaño (indicando una distribución de puntos más esparcida).

El método se comprobó con simulaciones, con parámetros similares a los de las situaciones experimentales. Luego, al analizar datos experimentales, se logró determinar con éxito si un conjunto dado de partículas en la membrana presentaba una distribución con mayor o menor agrupamiento respecto al caso aleatorio. Además, se observó que si el campo estudiado presenta al menos 30 partículas, se obtienen valores de incerteza aceptables. **En consecuencia, se concluye que el estudio mediante polígonos de Voronoi es una herramienta útil para estudiar el agrupamiento de los receptores.**

En cuanto a los resultados experimentales, fue posible llegar a tres conclusiones. En primer lugar, debido a la escasa cantidad de trayectorias móviles del nAChR en algunos campos observados, los resultados del análisis de Voronoi sobre esas trayectorias tienen una incerteza relativamente grande. Esto hace que no se puedan obtener conclusiones contundentes sobre las trayectorias móviles. Sin embargo, sí es posible indicar una tendencia de los resultados: la fracción de agrupamiento parece disminuir al aumentar el colesterol (figura 20).

En segundo lugar, y no obstante la situación anterior, sobre las partículas inmóviles, que eran la principal motivación del estudio, sí se lograron obtener resultados concluyentes. Cuando se considera el agrupamiento utilizando los promedios ponderados, **puede observarse la presencia de acúmulos para todas las**

condiciones de colesterol. No obstante, no se logró determinar una diferencia significativa para los diferentes tratamientos que modifican la concentración de colesterol en la membrana plasmática. La presencia de estos acúmulos coincide con los resultados de la bibliografía estudiada (F. J. Barrantes 2007) .

Siguiendo con las partículas inmóviles, si se estudia el agrupamiento de las moléculas del nAChR observando cada campo de forma individual, también puede concluirse con certeza que existe un fenómeno de agrupamiento para todas las condiciones de colesterol experimental. A partir del estudio de las fracciones de campos confinados, se observa que el agrupamiento del caso control, aún existiendo, es relativamente menor al agrupamiento en los otros dos casos de colesterol (CDx y CDx-Chol).

Luego, los resultados del análisis para partículas inmóviles no se ven afectados por la elección de los puntos iniciales para realizar el diagrama de Voronoi.

En tercer lugar, sobre las células fijadas se halló que el nAChR se encuentra agrupado en acúmulos en todas las regiones estudiadas (perinuclear, periferia cercana a la membrana plasmática e interior de la célula). Sin embargo, no se pudo determinar de forma concluyente que el grado de agrupamiento en las distintas regiones sea diferente entre sí. Si bien al observar los resultados hay indicios de que existen leves diferencias, es necesaria una exploración más profunda para que esto pueda ser determinado decisivamente.

3. Regímenes de Transporte

3.1. Introducción

El desplazamiento cuadrático medio o MSD (del inglés, *Mean squared displacement*) de una trayectoria se obtiene a partir de las coordenadas halladas para los diferentes instantes de tiempo como define la ecuación 10:

$$\text{MSD}(\tau) \equiv \langle |\Delta \mathbf{r}(t)|^2 \rangle = \frac{1}{N(\tau)} \sum_{t=1}^N |\mathbf{r}(t + \tau) - \mathbf{r}(t)|^2 \quad (10)$$

donde \mathbf{r} es la posición de la partícula, y τ es el paso temporal elegido entre dos posiciones dadas; dicho paso es un múltiplo del tiempo de muestreo, i.e. $\tau_1 = dt, \tau_2 = 2dt, \text{etc.}$ A los desplazamientos cuadráticos obtenidos para el τ elegido, se les toma el promedio respecto de t , y así queda definido el valor del MSD para un paso temporal particular. $N(\tau)$ es la cantidad total de pares de localizaciones que se pueden obtener para un paso temporal particular. Por construcción, $N(\tau)$ disminuye a medida que aumenta el intervalo entre posiciones. Si M es el número total de puntos en una trayectoria, entonces se tiene: $N(\tau_1) = M - 1, N(\tau_2) = M - 2, \dots, N(\tau_{M-1}) = 1$. Como consecuencia, la determinación del MSD tiene un error estadístico menor para los valores de τ más chicos, por lo que generalmente se toma $N(\tau) > 20$ como la cantidad mínima de puntos a promediar. Un esquema de la construcción del MSD puede verse en la figura 25.

3.1.1. Regímenes de movimiento

El MSD permite caracterizar las propiedades del medio en el que se encuentra una partícula y las fuerzas que operan sobre ella. En el caso de un fluido viscoso sin obstáculos ni fuerzas externas, se tiene un régimen de difusión normal dado por (Martin, Forstner y Käs 2002):

$$\text{MSD}(\tau) = 2dD\tau \quad (11)$$

donde d es la dimensionalidad (dos en este trabajo) y D es el coeficiente de

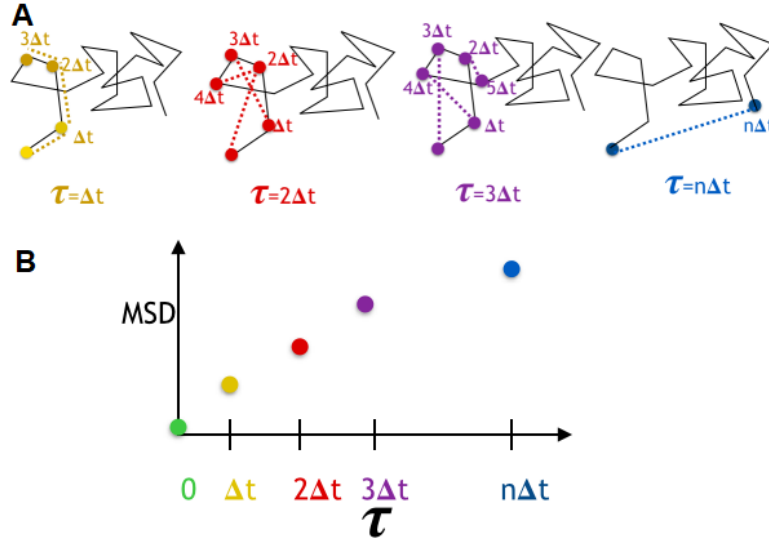


Figura 25: **A)** Ejemplos de trayectorias, con algunos desplazamientos representativos (unidos por una línea punteada) para diferentes valores de τ . **B)** MSD en función de τ . Los colores corresponden a los casos ilustrados en **A**.

difusión. Según la ecuación de Stokes–Einstein el coeficiente depende de la temperatura y la viscosidad del medio, y del tamaño y forma de la partícula. Para partículas esféricas de radio r se tiene la siguiente expresión: $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$ (Metzler y col. 2014).

Para el caso más general, donde se observa una relación no lineal entre el MSD y el paso temporal se obtienen los llamados regímenes de difusión anómala, que pueden ajustar mediante la siguiente expresión heurística (Martin, Forstner y Käs 2002):

$$\text{MSD}(\tau) = 2dD^*\tau^\beta \quad (12)$$

Donde D^* es el coeficiente de difusión generalizado y el exponente β ($0 < \beta < 2$) es un parámetro que señala el comportamiento difusivo general de la trayectoria.

A partir del valor del exponente β , obtenido con el ajuste del MSD de las localizaciones de una trayectoria, se pueden definir distintos regímenes de transporte. Los regímenes subdifusivos se caracterizan por un exponente β con valor menor a

1, la difusión normal por un exponente igual a 1, y los regímenes superdifusivos por un exponente entre 1 y 2.

En el caso de un exponente β con valor igual a 2, el movimiento es de tipo balístico y el factor de la ecuación 12 corresponde a la velocidad de la partícula al cuadrado. Finalmente, hay casos en los que el MSD no obedece la ecuación 12, como en el caso del régimen de difusión confinada en donde se cumple la ecuación (Metzler y col. 2014) (Weron y col. 2017) (Wilhelm 2008) (Monnier, Guo y col. 2012) :

$$MSD(\tau) = R^2(1 - e^{-2dD^*\tau/R^2}) \quad (13)$$

Donde R representa el tamaño de la región de confinamiento. A modo de ejemplo, en la figura 26 se muestran dos trayectorias simuladas junto a su MSD en escala logarítmica (detalles de la simulación en el anexo 7.1).

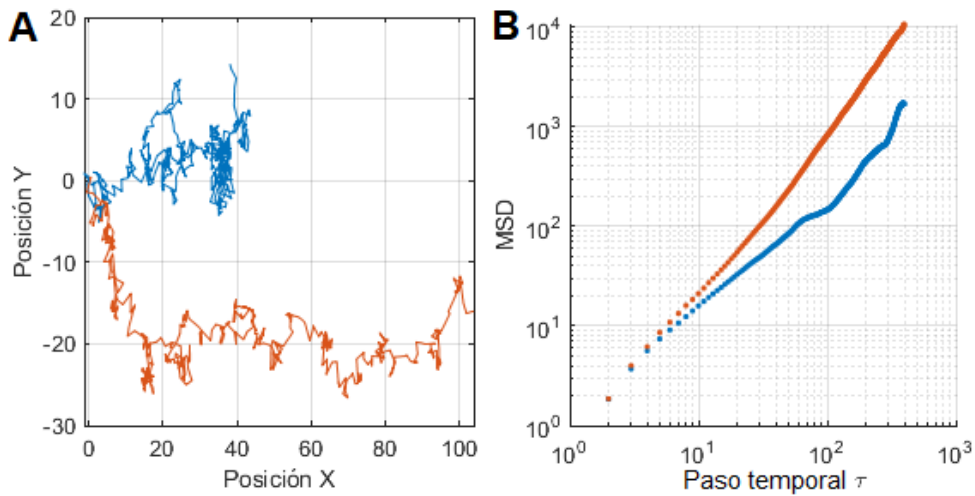


Figura 26: Dos trayectorias simuladas, con diferente movilidad, junto a su MSD en escala logarítmica. Se observa una gran diferencia en la pendiente de la curva del MSD. Los detalles de la simulación se encuentran en el anexo 7.1.

Con el objetivo de linealizar el ajuste, a la ecuación 12 se le puede aplicar el logaritmo a ambos miembros obteniendo así la ecuación 14. De esta forma, se tiene la ventaja de realizar un ajuste lineal sobre la curva del MSD.

$$\log(\text{MSD}(\tau)) = \log(2dD^*\tau^\beta) = \log(2dD^*) + \beta \log(\tau) \quad (14)$$

Estos ajustes permiten obtener una estimación del exponente β , y por ende del régimen de transporte. Por otro lado, también brinda información sobre la tasa de movilidad de la partícula a partir de la determinación del coeficiente D^* .

3.1.2. Método alternativo para calcular el exponente β

El método explicado anteriormente podría no funcionar correctamente en algunas trayectorias, por ejemplo, cuando hay una incerteza de localización o cuando hay transiciones entre regímenes. Una forma alternativa de estimar el exponente β consiste en operar sobre la ecuación 14, derivando respecto del $\log(\tau)$, para llegar a la ecuación (Bruno y col. 2009) (Metzner y col. 2007) :

$$\beta = \frac{\partial \log(\text{MSD})}{\partial \log(\tau)} = \frac{\tau}{\text{MSD}} \frac{\partial(\text{MSD})}{\partial \tau} \quad (15)$$

En el subcapítulo 3.3 se comparan ambos métodos para estudiar su performance.

3.1.3. Error de localización en el MSD

Las trayectorias experimentales tienen un error de localización que es originado por la incerteza en la determinación de las coordenadas de las partículas (ver subcapítulo 1.4). Dicho error es aleatorio y está caracterizado por su desvío estándar σ , por lo que entonces la ecuación del MSD para difusión normal (ecuación 11) es (Martin, Forstner y Käs 2002):

$$\text{MSD}(\tau) = 2dD\tau + 2\sigma^2 \quad (16)$$

Dado que el error de localización está asociado a la ordenada al origen de la curva del $\text{MSD}(\tau)$, el MSD recupera la dependencia con τ dada por la ecuación 13 rápidamente. Si la frecuencia de muestreo es lo suficientemente alta, entonces se puede aproximar por $\text{MSD}(0) \approx \text{MSD}(1)$. Este razonamiento brinda una cota

superior para el error de localización. El mismo razonamiento puede aplicarse para los casos de difusión anómala (ecuaciones 12 y 13)

Por otro lado, la ecuación 14 aproxima el comportamiento para valores de τ suficientemente grandes.

3.1.4. Los parpadeos en las trayectorias no afectan el exponente β

Como se explicó en el capítulo 1.5, debido al parpadeo (el encendido y apagado estocástico) de los fluoróforos no es posible detectar todas las localizaciones de las trayectorias. En este trabajo, se determina que aproximadamente el 1% de los puntos de las trayectorias no son registrados.

Con el fin de evaluar si estas ausencias afectan el exponente β calculado, se simuló 1000 trayectorias con diferentes regímenes de movimiento. Para recrear los parpadeos se eliminó, de forma aleatoria, el 5% de sus localizaciones sobreestimando su fracción real. Así, se puede ver, en la figura 27, una alta correlación entre los exponentes calculados antes y después eliminación de datos. Esto muestra que los parpadeos no tendrían un efecto significativo en la determinación del exponente β .

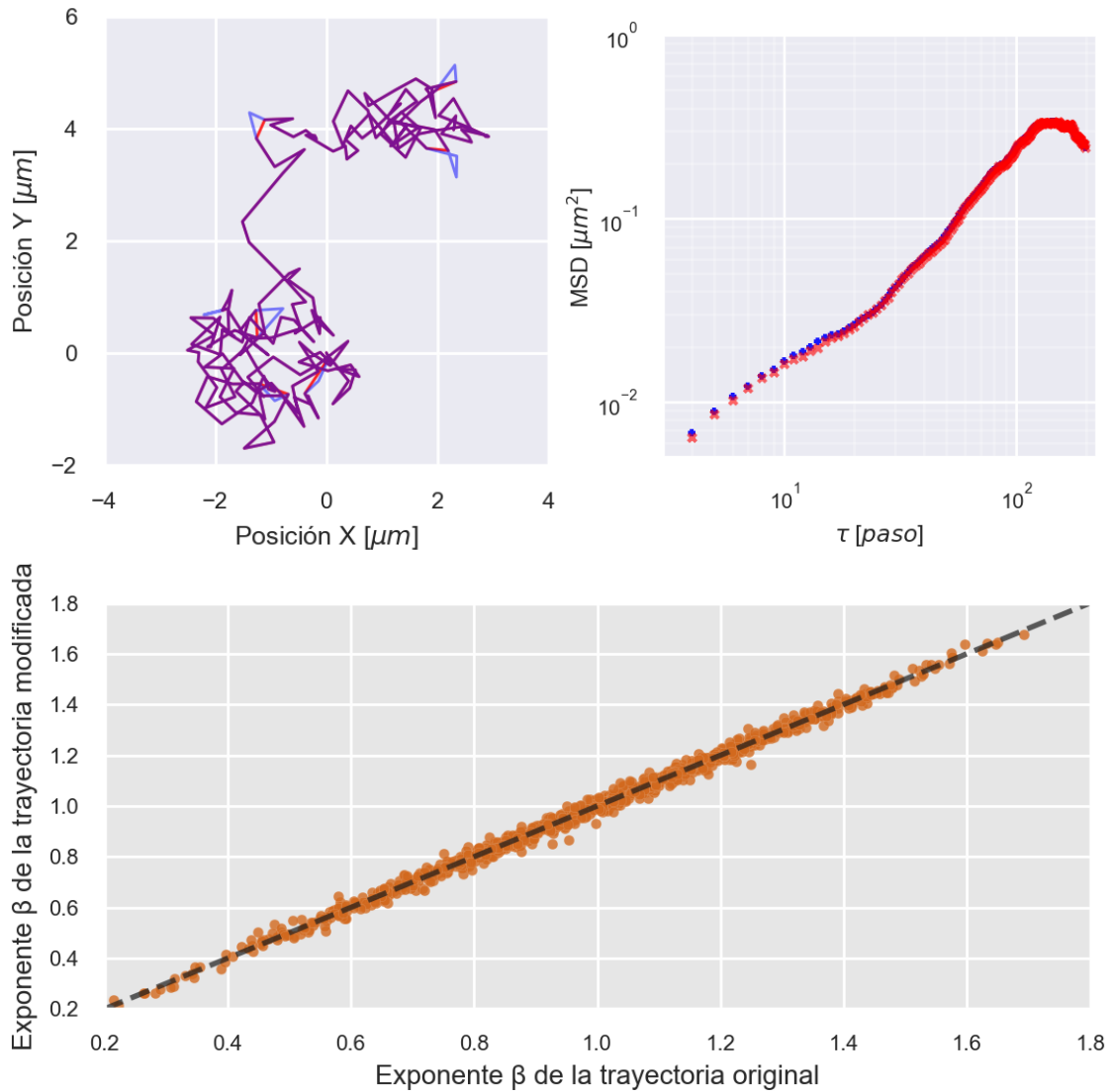


Figura 27: Superior izq. Superposición de la trayectoria original (azul) y la trayectoria después del parpadeo (rojo). El color violeta representa las secciones en donde ambas trayectorias coinciden. **Superior der.** Curva del $MSD(\tau)$ en escala logarítmica para la trayectoria original (rojo) y la trayectoria después del parpadeo (azul). Se observa un alto grado de superposición entre ambas curvas del MSD . **Inferior** Dispersión de los exponentes β antes y después de eliminar el 5% de los puntos. El eje X representa el exponente β obtenido para las trayectorias sin ausencias de localizaciones, mientras el eje Y representa el exponentes β para las trayectorias con ausencias de localizaciones producto del proceso de parpadeo artificial. La densidad de la dispersión es máxima cerca de la recta negra (pendiente uno) mostrando así que el parpadeo no afecta de forma significativa el cálculo del exponente β .

3.2. Análisis de los regímenes de transporte del receptor mediante el MSD

3.2.1. Cálculo del exponente β de la difusión a partir del MSD

Con el objetivo de calcular el exponente β , se determina el MSD de cada trayectoria individual mediante la ecuación 10 y se utilizan los dos métodos descritos previamente. En la figura 28 se muestran trayectorias representativas y los análisis ulteriores.

Por un lado, a la curva en escala logarítmica del MSD se le realiza un ajuste lineal de acuerdo a la ecuación 14 (Figura 28b). Este ajuste debe aplicarse únicamente sobre una parte de los datos, ya que para valores chicos de τ el error de localización introduce desviaciones a la ley de potencia, mientras que para valores grandes de τ el error estadístico vuelve importante. Con el fin de que minimizar el error estadístico (subcapítulo 3.1) en este trabajo los ajustes serán en el rango entre $\tau = 10 dt$ y el τ que corresponde al 35% de la duración de la trayectoria.

Por otro lado, para calcular el exponente β mediante el segundo método debe aplicarse la ecuación 15 como muestra la figura 28c. Al igual que con el método anterior, se considera para el análisis sólo el tramo comprendido entre $\tau = 10 dt$ y el 35% del largo total del MSD. En los ejemplos mostrados en la figura 28 se obtienen los valores de la siguiente tabla.

Régimen recuperado:	Subdifusiva	Difusiva	Superdifusiva
Método 1	$0,55 \pm 0,01$	$1,08 \pm 0,01$	$1,64 \pm 0,01$
Método 2	$0,53 \pm 0,1$	$0,98 \pm 0,03$	$1,64 \pm 0,02$

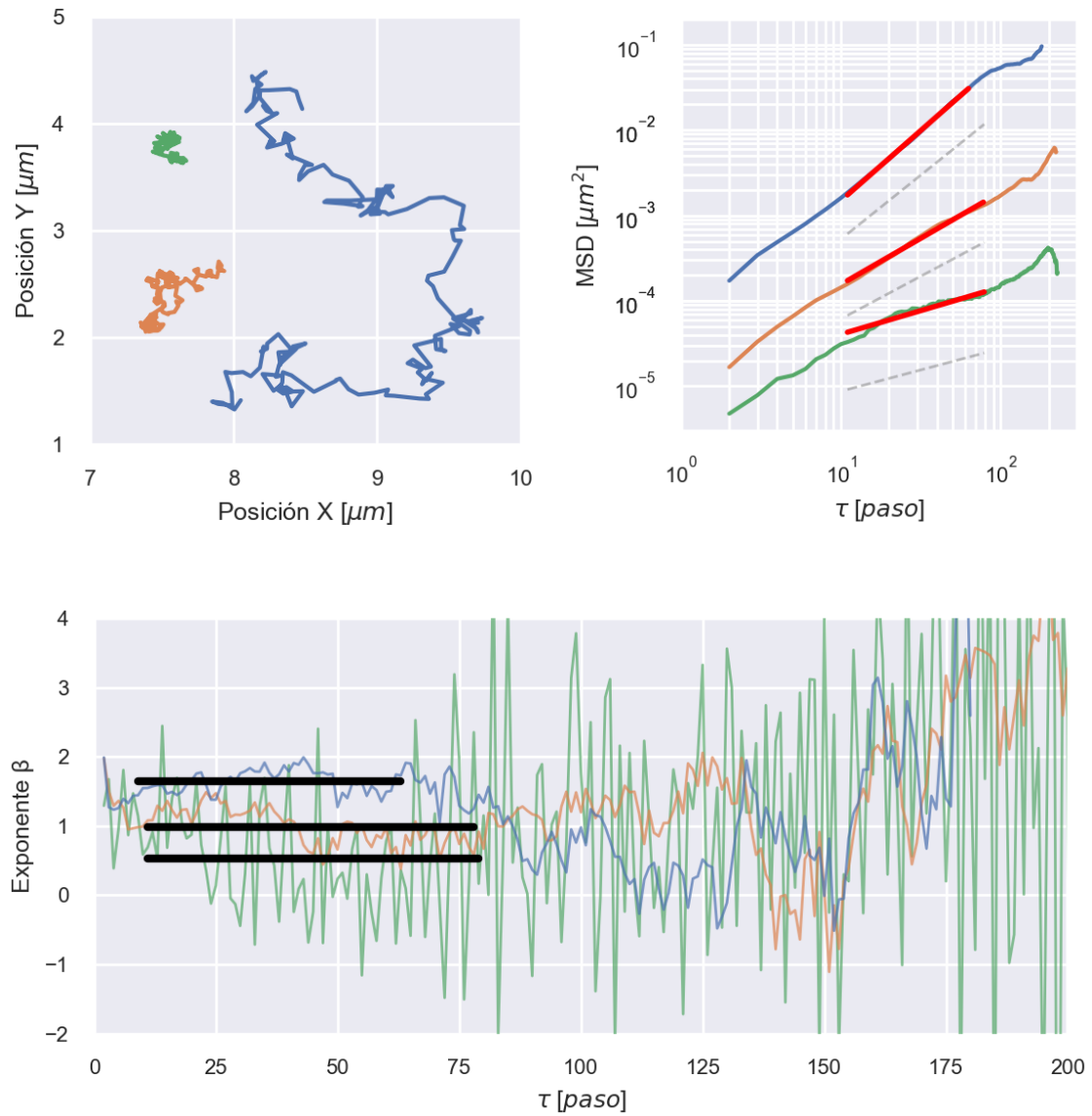


Figura 28: Cálculo del exponente β mediante los dos métodos. **Superior izq.)** Tres trayectorias del nAChR con diferente movilidad. Azul: superdifusiva. Naranja: difusiva. Verde: subdifusiva. **Superior der.)** Método 1: Ajuste lineal al $\log(MSD)$ en función de $\log(\tau)$. Las líneas grises de referencia poseen pendientes de 1,5, 1 y 0,5. **Inferior):** Método 2. Exponentes β obtenidos según la ecuación 15. La línea negra representa el valor medio y el ancho de la zona analizada en cada caso.

3.3. Evaluación de la performance de los métodos para la determinación del exponente β

Considerando que el interés de calcular el exponente β radica en el estudio de diferentes regímenes de movimiento, se aplica primero el criterio de Golan-Sherman (subcapítulo 1.6) con el fin de descartar las partículas inmóviles o confinadas. Luego, se aplican los dos métodos para calcular el exponente β solamente a las trayectorias móviles.

El objetivo en esta parte del trabajo es evaluar la performance de los dos métodos utilizados. Al aplicar cada método se obtiene, junto a un valor absoluto del exponente β , un error cuadrático medio (MSE, *mean-squared error*). Se entenderá por performance a la aptitud de cada método para obtener el menor error cuadrático medio relativo (RMSE) posible.

Se observa que los errores relativos presentan valores similares en la mayoría de los casos (Figure 29). De modo que para lograr la mejor estimación posible del exponente β de una trayectoria, se aplican los dos métodos y se elige el valor de β con menor error relativo.

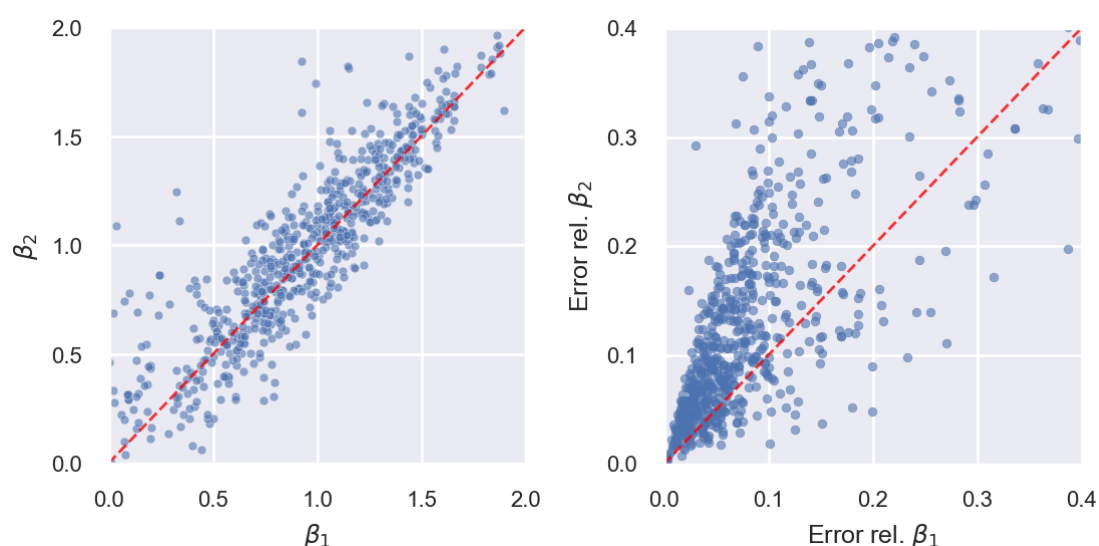


Figura 29: **Izquierda)** Comparación del exponente β obtenido según los dos métodos, para las trayectorias móviles y **Derecha)** la comparación del error relativo de cada método.

3.4. Análisis del exponente β

Se calcularon los exponentes β para las trayectorias móviles mediante el criterio explicado anteriormente (subcapítulo 3.3). Estos exponentes presentan una gran dispersión de valores, indicando una heterogeneidad compleja de las trayectorias como se observa en la figura 30.

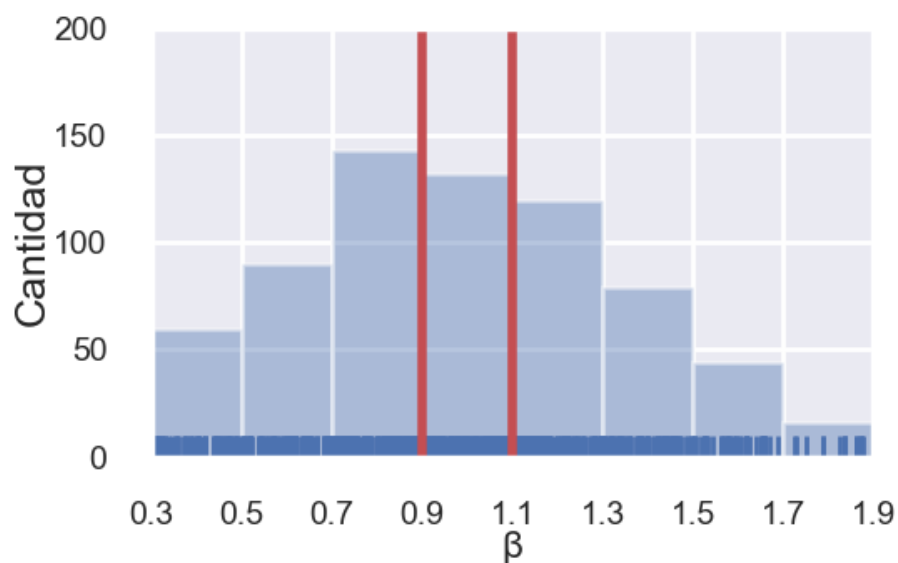


Figura 30: Histograma del exponente β de las trayectorias móviles. Las líneas rojas corresponden a las divisiones entre los tres regímenes de movimiento definidos según la fórmula 17. Se utilizó la regla de Sturges para determinar el número de clases del histograma.

A partir de la inspección de la figura 30 se separan a las trayectorias en tres regímenes según su exponente β :

$$\begin{aligned}
 \beta < 0,9 & \quad \text{Subdifusiva} \\
 0,9 < \beta < 1,1 & \quad \text{Difusión normal} \\
 1,1 < \beta & \quad \text{Superdifusiva}
 \end{aligned} \tag{17}$$

El conjunto formado por las trayectorias subdifusivas y las partículas inmóviles se analizan en el capítulo 4. Las trayectorias superdifusivas se estudian en el capítulo 5. En lo que resta de este capítulo se analiza el efecto del colesterol en la fracción de cada población y en los valores del coeficiente de difusión obtenido

para las trayectorias difusivas.

3.4.1. Influencia del colesterol en los regímenes de movimiento de los receptores

Analizamos la influencia de los distintos tratamientos, que modifican la concentración y distribución del colesterol en la membrana, en los regímenes de movimiento de los receptores.

En la figura 31 se puede observar la relación entre la fracción de trayectorias móviles y partículas inmóviles según la condición de colesterol. Tanto el aumento de colesterol (CDx-Chol) como su disminución (CDx) parecen aumentar la proporción de partículas inmóviles. Dicha proporción es de 69 %, 46 % y 58 % para los casos CDx, Control y CDx-Chol respectivamente. Este cambio de proporciones es estadísticamente significativo según la prueba χ^2 con un $p < 0,001$.

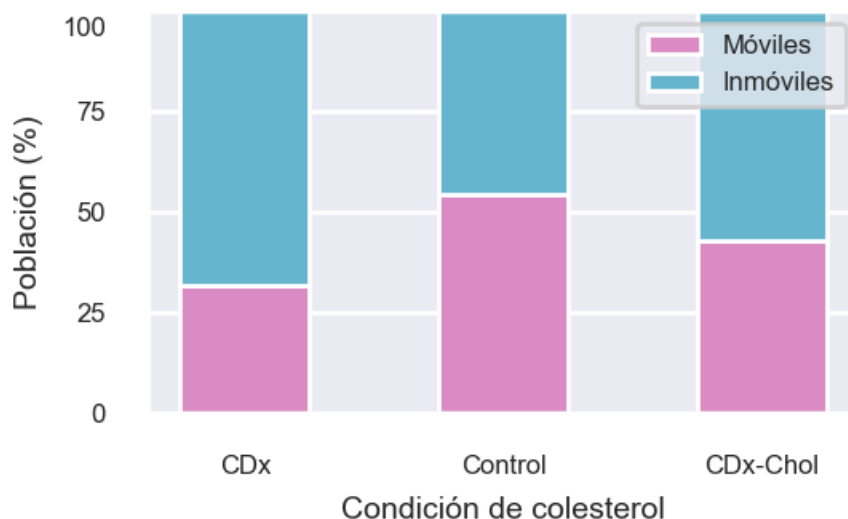


Figura 31: Distribución poblacional, entre trayectoria móvil y partícula fija, según el criterio de Golan y Sherman para los receptores marcados con BTX.

Si se analizan los regímenes subdifusivos, difusivos y superdifusivos para el conjunto de trayectorias móviles (figuras 32 y 33), no se observa un cambio estadísticamente significativo. Es decir, la fracción de trayectorias en cada régimen

es aproximadamente constante a pesar de las variaciones en la concentración de colesterol.

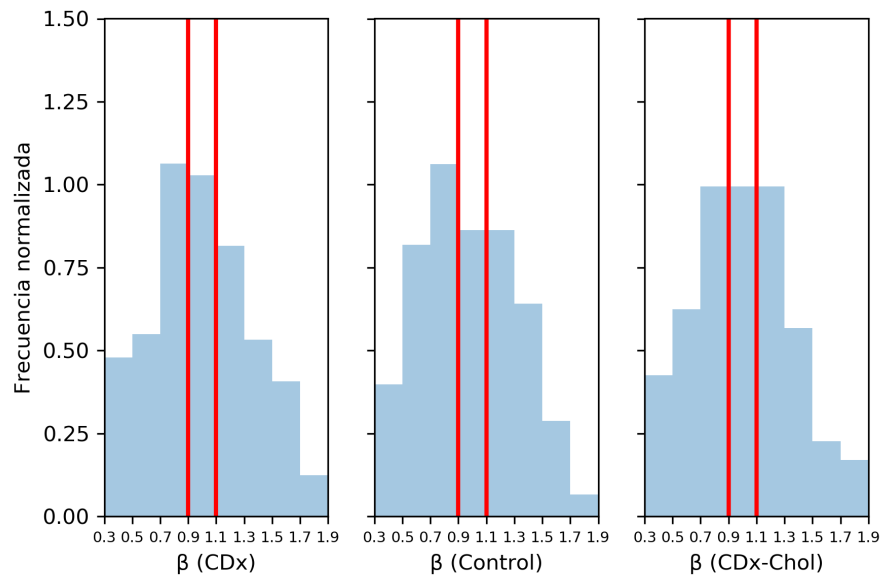


Figura 32: Exponente β para las tres concentraciones de colesterol estudiadas. Las líneas rojas marcan los límites entre los regímenes subdifusivos, difusivos y superdifusivos.

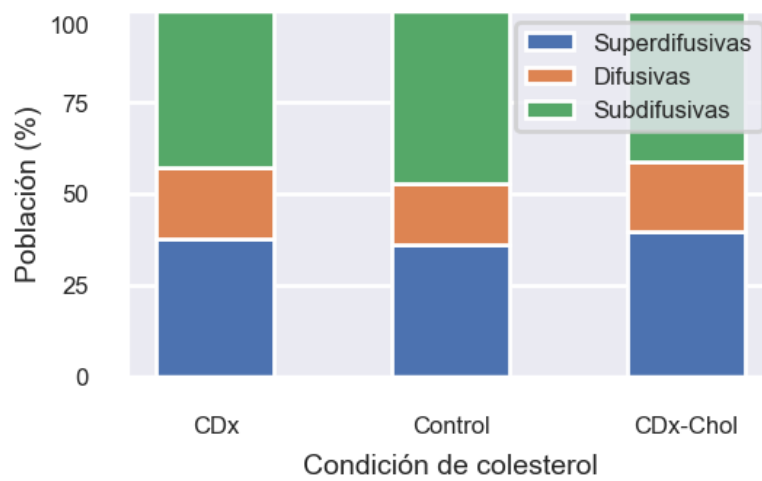


Figura 33: Distribución poblacional de los tres regímenes de movimiento para las trayectorias móviles sin diferencias estadísticamente significativas para las tres condiciones de colesterol analizadas.

3.4.2. Coeficiente de difusión de las trayectorias difusivas

En la figura 34 se observan los coeficientes de difusión obtenidos para las trayectorias difusivas, en las tres condiciones de colesterol. Dichos coeficientes se calculan a partir del ajuste lineal de la ecuación 16 (Michalet 2010).

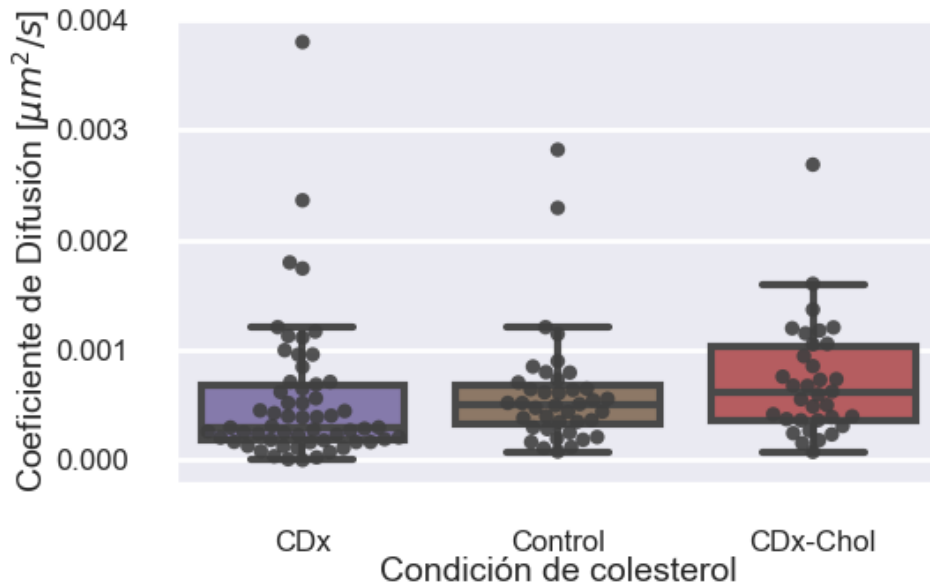


Figura 34: Coeficiente de difusión en las trayectorias difusivas ($0,9 < \beta < 1,1$) para las tres condiciones experimentales de colesterol.

Los valores del coeficiente de difusión hallados se encuentran en concordancia a los reportados en la literatura (orden de magnitud de $10^{-4} \mu m^2/s$) (Baier y col. 2009). Se puede ver que existe un aumento del coeficiente que se correlaciona con la concentración de colesterol (tabla 2). Dichas diferencias, aunque pequeñas, son estadísticamente significativas (prueba de Kruskal-Wallis con $p = 0,017$).

	CDx	Control	CDx-Chol
Coeficiente de difusión ($10^{-4} \mu m^2/s$)	$5,4 \pm 0,8$	$6,1 \pm 0,8$	$7,2 \pm 0,9$

Tabla 2: Media y error estándar de los coeficientes de difusión de las trayectorias difusivas para las tres condiciones de colesterol. Se puede observar un aumento del coeficiente que se correlaciona con la concentración de colesterol.

3.5. Conclusiones

Uno de los objetivos de este capítulo fue clasificar las trayectorias en diferentes regímenes de transporte. Para ello, se presentaron el MSD y dos métodos distintos para obtener el exponente β , que resultaron exitosos para clasificar las trayectorias. El uso de los dos métodos de forma complementaria permitió tener una incerteza menor en los valores obtenidos del exponente β . Por otro lado, se pudo comprobar que las ausencias de localizaciones en las trayectorias, producto del parpadeo de los fluoróforos, no presentaron inconvenientes para la clasificación.

Respecto a los resultados, se observó una gran heterogeneidad de las trayectorias. En primer lugar, se pudieron medir diferencias significativas entre el tamaño de las poblaciones móviles e inmóviles, según el tratamiento de colesterol aplicado. Esto refuerza la idea de que la modificación de la concentración del colesterol en la membrana tiene importantes efectos dinámicos sobre las moléculas en dicha membrana (hasta un 20% de diferencia sobre la fracción de las poblaciones móviles e inmóviles) (Baier y col. 2009).

En segundo lugar, al modificar el colesterol, no se encontraron diferencias relevantes entre las subpoblaciones de los diferentes regímenes (subdifusivas, difusivas y superdifusivas). Esto parece indicar que la modificación de la concentración de colesterol produjo variaciones entre las poblaciones móviles e inmóviles, pero conservó la fracción de trayectorias subdifusivas/difusivas/superdifusivas.

En tercer y último lugar, es interesante resaltar que se encontró una correlación, estadísticamente significativa, entre la concentración de colesterol y el coeficiente de difusión de las trayectorias difusivas. Es decir, que a pesar de que la proporción de trayectorias móviles en un régimen difusivo permanezca constante, **el coeficiente de difusión se incrementa con el aumento en la concentración de colesterol**. Esto coincide con resultados de la bibliografía estudiada (Baier y col. 2009) (Mosqueira, Camino y F. J. Barrantes 2018) (Levitan y Ayee 2016), que indican que el nAChR presenta una mayor movilidad al aumentar la concentración de colesterol en la membrana.

4. Estudio de las propiedades mecánicas en el entorno de partículas con trayectorias confinadas

La difusión confinada de proteínas de membrana puede ser el resultado de diversos mecanismos físicos con diferentes implicancias biológicas, tales como barreras físicas, uniones a elementos inmóviles del citoesqueleto, agregación molecular o percolación en un medio sobrepoblado. El análisis de las trayectorias subdifusivas mediante el MSD (subcapítulo 3.1) revela información acerca de la dinámica de su difusión, pero no señala la naturaleza de su mecanismo de confinamiento. Sin embargo, estas limitaciones podrían ser sorteadas con nuevos métodos como el análisis de la densidad de localizaciones alrededor del centro de masa.

La información acerca de estos mecanismos responsables de las fuerzas que producen el confinamiento debe estar contenida en las trayectorias de las partículas individuales (Jin, Haggie y Verkman 2007). Por ejemplo, el confinamiento producto de barreras físicas podría ser descrito por un pozo de potencial. Por otro lado, otros potenciales describirían un confinamiento producto de una interacción elástica o el movimiento en un medio viscoelástico. La figura 35 ilustra los potenciales estudiados por Jin et al. (Jin, Haggie y Verkman 2007).

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es modelar el confinamiento mediante una función potencial, a partir de la distribución de las localizaciones de cada trayectoria. Este método ha sido utilizado para estudiar la difusión confinada de canales de CFTR Cl⁻ en membrana (Jin, Haggie y Verkman 2007).

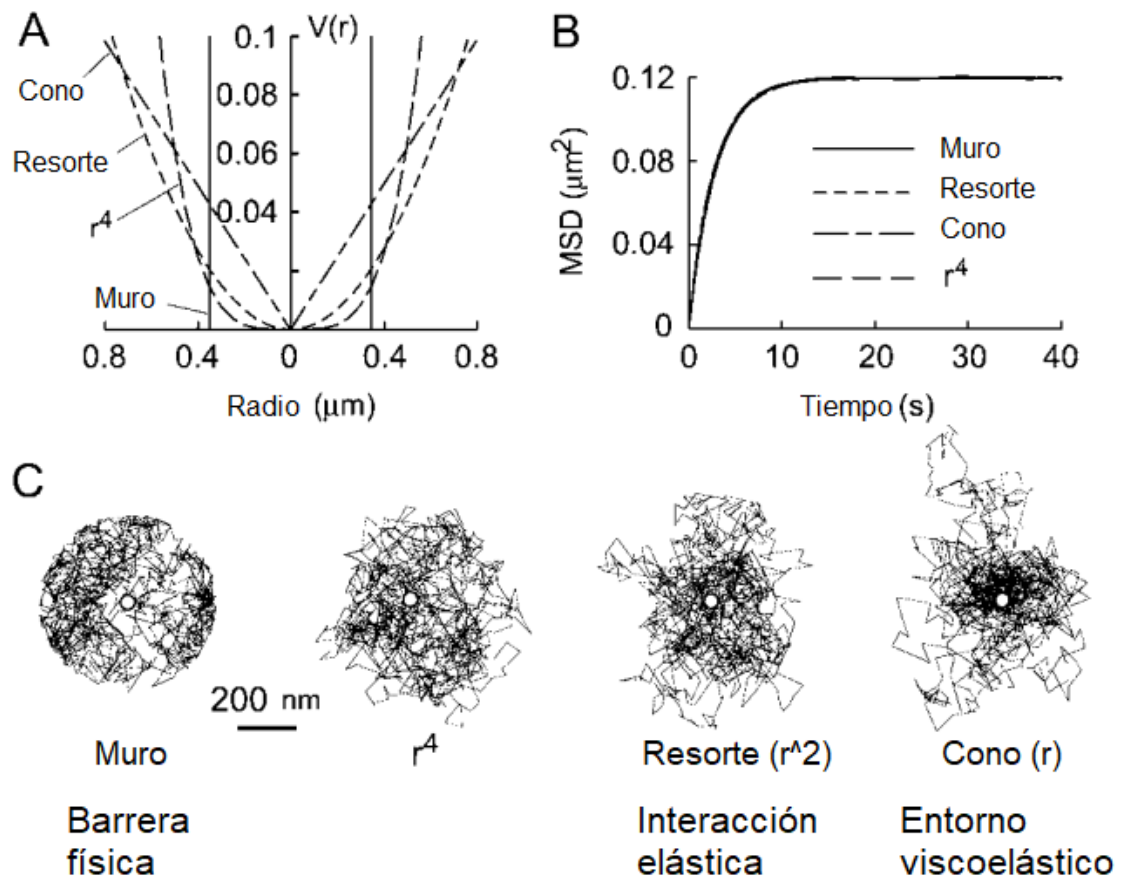


Figura 35: A) Curva del potencial en función de la distancia radial. B) La curva del MSD no permite distinguir entre los posibles potenciales. C) Ejemplos de trayectorias con el modelo de potencial correspondiente. Imagen adaptada de (Jin, Haggie y Verkman 2007).

4.1. Distribución de la densidad radial

Para determinar qué tipo de potencial (y por lo tanto qué tipo de proceso) subyace a una trayectoria confinada, Jin et al. realizan un análisis de la densidad radial de las localizaciones. Para ello, el primer paso es calcular la posición media r_0 a partir de las localizaciones (x, y) . Luego, se mide la distancia radial r de cada localización respecto a r_0 , y se realiza un histograma (figura 36.A). Este histograma cuenta con un ancho de bin de $0,005\mu m$, determinado por el criterio de Sturges, y un límite máximo de $r_c = 0,06\mu m$ ya que la frecuencia más allá de este radio r_c es despreciable. Recordemos que el error de tracking es de aproximadamente $0,03\mu m$.

A continuación, para calcular la densidad se aplica la ecuación 18, que es el cociente del número de localizaciones de cada barra del histograma respecto al área que representa dicha barra. Al estar considerando una distancia radial con paso fijo, el área que representa cada barra es un anillo concéntrico centrado en r_0 , por lo que su área va aumentando a medida que la distancia radial r se incrementa. En la figura 36.B se grafica la densidad en función de la distancia radial.

$$d(r) = \frac{N(r)}{\pi[(r + \Delta r/2)^2 - (r - \Delta r/2)^2]} \quad (18)$$

$N(r)$ es la cantidad de localizaciones en el bin centrado en la distancia radial r , Δr es el ancho del bin.

Con el objetivo de normalizar la densidad para que esta sea comparable entre las diferentes trayectorias, se realiza el cociente entre todos los elementos de $d(r)$ por el del valor $d(r_0)$, como se muestra en la figura 36.C. Las partículas confinadas por un potencial $V(r)$ cumplen con (Jin, Haggie y Verkman 2007):

$$d(r) = d(r_0)e^{-V(r)/\kappa_B T} \quad (19)$$

Donde κ_B es la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta, la cual fue controlada experimentalmente en la platina.

Dada la densidad radial $d(r)$, el ajuste a la siguiente expresión permite determinar $V(r)$:

$$\ln(d(r)/d(r_0)) = -V(r)/k_bT \quad (20)$$

Se analizaron las cuatro formas del potencial presentadas en la figura 35. Las mismas son: 1) pozo de potencial infinito, donde el confinamiento representa una muro impermeable, 2) potencial cuadrático, donde el confinamiento es debido a una fuerza restitutiva que se modela como un resorte, 3) potencial lineal, donde el confinamiento es debido a una fuerza viscoelástica restitutiva, y 4) potencial cuártico.

$$\begin{aligned} V(r) = 0(r < r_c) \text{ y } \infty(r > r_c) & \text{ Muro: Potencial pozo infinito} \\ V(r) = V_0 k^2 & \text{ Resorte: Potencial cuadrático} \\ V(r) = V_0 k & \text{ Cono: Potencial lineal} \\ V(r) = V_0 k^4 & \text{ Potencial cuártico} \end{aligned} \quad (21)$$

En la figura 37 se muestran los dos conjuntos de trayectorias que se utilizaron para los análisis. Se comparan con las trayectorias subdifusivas y las partículas inmóviles. Se realizaron dos tipos de análisis: uno de forma individual y otro de forma colectiva.

En el análisis colectivo el ajuste de la distribución mediante la ecuación 20 se realiza sobre todas las trayectorias de una población. Se entiende por población a todas las trayectorias confinadas que comparten la misma condición de colesterol (CDx, Control ó CDx-Chol). Como consecuencia, se obtiene un único coeficiente $V(r)$ por condición de colesterol y modelo. Para los casos estudiados se tiene un promedio de 20000 localizaciones, por condición de colesterol, que se distribuyen en el histograma de la figura 36.A.

En el análisis individual, se ajusta la densidad de cada partícula al modelo, obteniéndose un coeficiente $V(r)$ por cada trayectoria. Para compensar la menor cantidad de datos en estos ajustes, en el histograma se toma un ancho de $0,01\mu m$ a diferencia de los $0,005\mu m$ tomados en el caso colectivo. Respecto a los múltiples ajustes por trayectoria, se exige que cada ajuste debe tener un R^2 superior 0,9

para ser considerado.

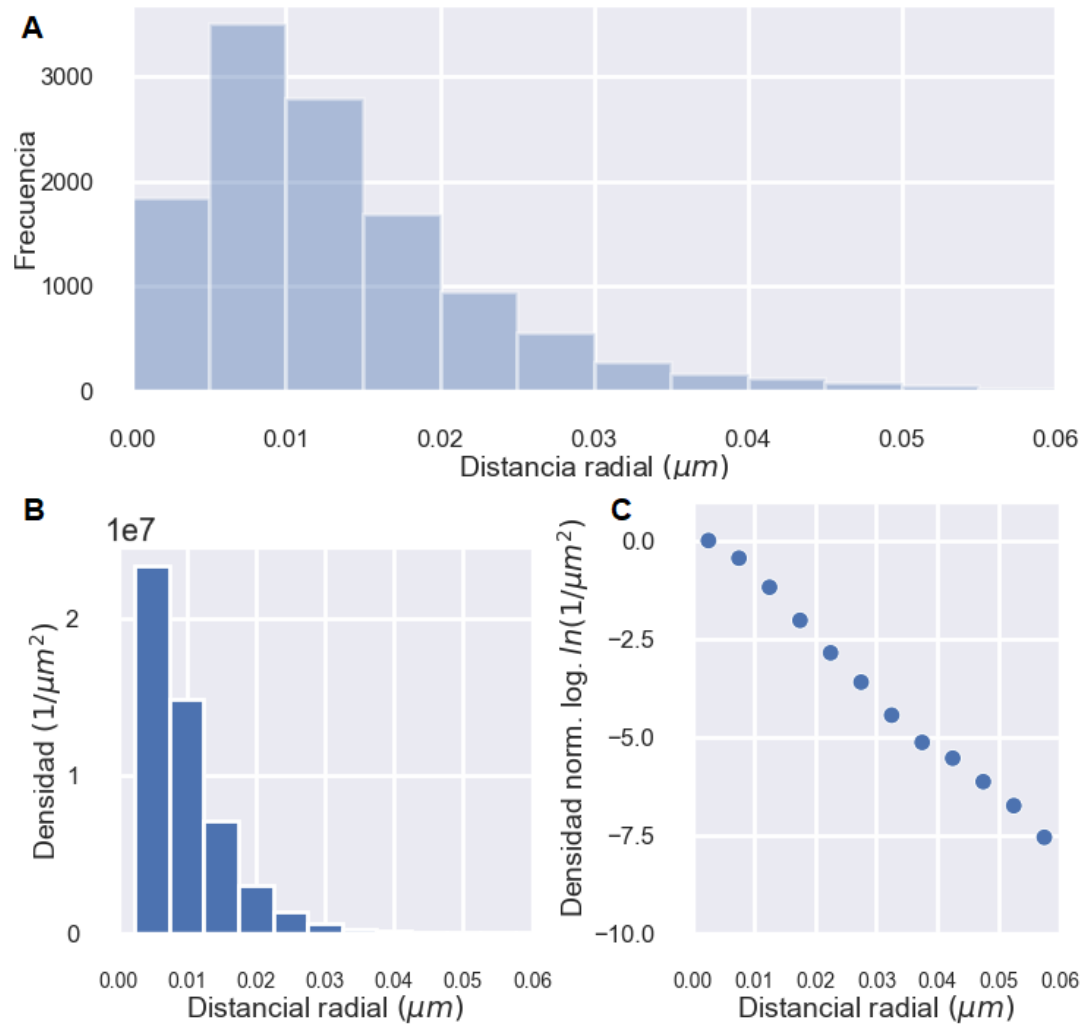


Figura 36: Ejemplo de análisis del conjunto de trayectorias móviles con régimen subdifusivo ($\beta < 0,9$), para la condición control de colesterol y marcadas con BTX. **A)** Histograma de la distancia radial de cada localización, respecto a la posición media de la trayectoria a la cual pertenece. Se utilizó el criterio de Sturges para el ancho de los bins, y se estableció el límite en $0,06\mu\text{m}$. **B)** Densidad de localizaciones en función de la distancia radial. La densidad es la frecuencia del histograma dividida por el área de cada anillo concéntrico de ancho $0,005\mu\text{m}$. **C)** Densidad normalizada y logarítmica.

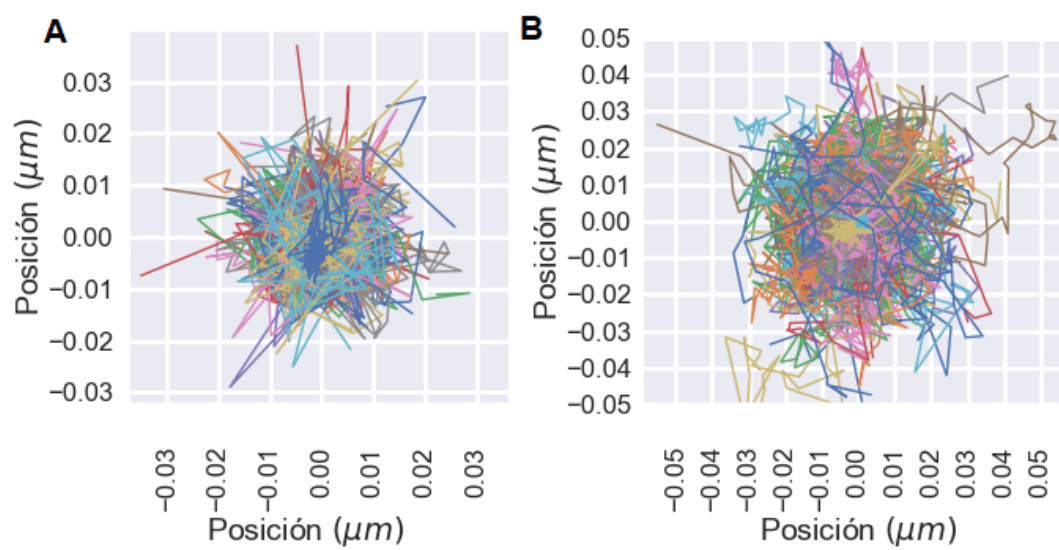


Figura 37: Ejemplo de los dos conjuntos de trayectorias que se utilizarán en el análisis. Las mismas pertenecen a moléculas de nAChR, marcadas con BTX y en la condición control, graficadas desde su posición media. **A)** Primer conjunto compuesto por partículas inmóviles. **B)** Segundo conjunto compuesto por trayectorias subdifusivas. Se puede observar que las trayectorias subdifusivas presentan un recorrido mayor.

4.2. Resultados

4.2.1. Ajustes de los diferentes ansatz

En la figura 38 se observa un ejemplo sobre cómo ajustan los cuatro modelos de potencial a la curva de densidad de localizaciones. Esta curva de densidad, fue obtenida a partir de las trayectorias experimentales de control marcadas con BTX y que posean una movilidad subdifusiva (exponente $\beta < 0,7$).

El modelo de potencial que mejor ajustó los datos en todos los casos fue el modelo lineal. Es decir que independientemente de la tres condiciones de colesterol (CDx, Control y CDx-Chol), de la movilidad (inmóvil y móvil subdifusiva) ó del marcador (BTX y mAb) el modelo que siempre aproximó mejor los datos fue el modelo lineal.

Esto indica que se podría modelar a estas partículas con un potencial lineal de la forma:

$$V(r) = kr \tag{22}$$

Indicando que el mecanismo subyacente sería el efecto de un entorno viscoelástico.

Por lo tanto, en los siguientes subcapítulos de resultados, es estudiado cómo se modifica el coeficiente k , del modelo lineal, para las diferentes condiciones experimentales.

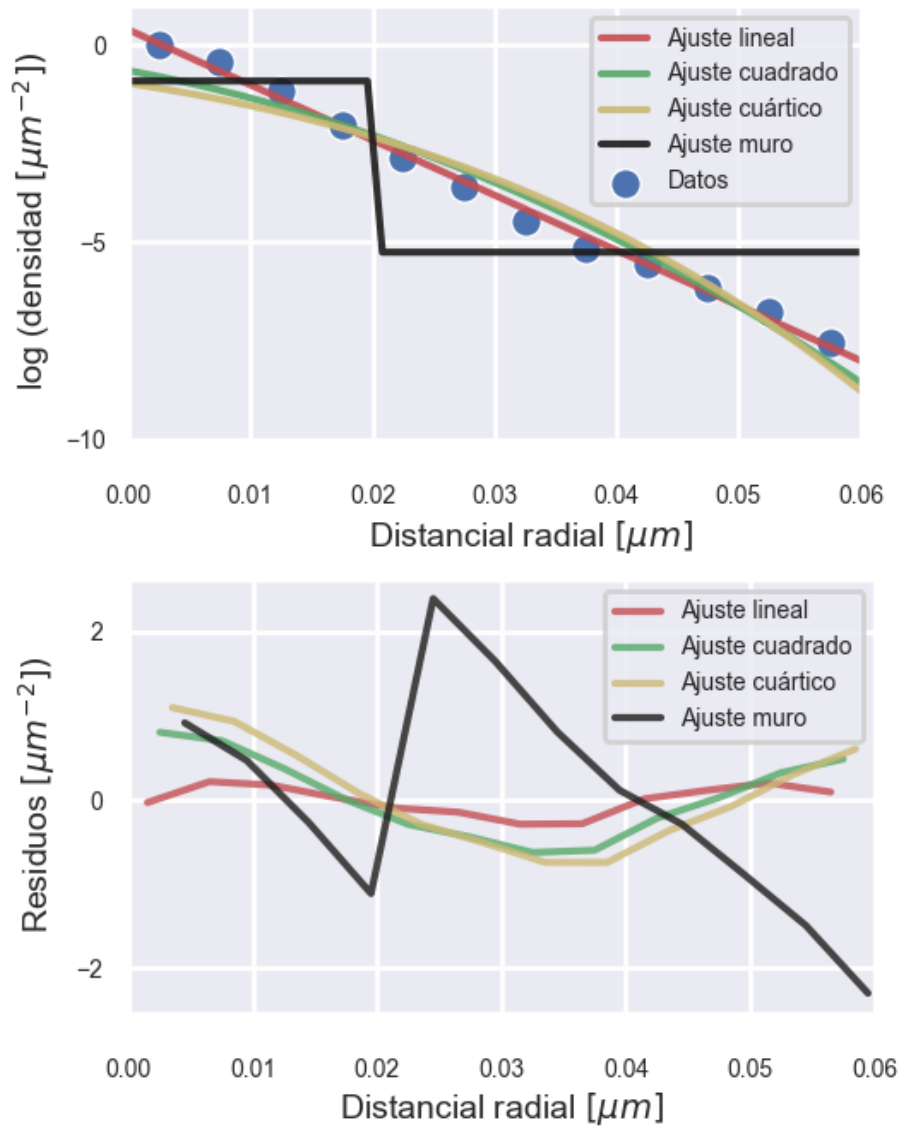


Figura 38: Ejemplo de ajustes para los diferentes modelos de potencial sobre la densidad de localizaciones, en trayectorias experimentales en la condición control y marcadas con BTX, con movilidad subdifusiva. **Superior)** Ajuste de cuadrados mínimos para los cuatro modelos de potencial. El ajuste lineal (rojo) es el que mejor aproxima a los datos. **Inferior)** Residuos en función de la distancia radial, para los cuatro ajustes. El ajuste lineal (rojo) obtiene los menores valores residuales.

4.2.2. Ajustes individuales a las partículas marcadas con BTX

A partir del ajuste del modelo lineal sobre las curvas de densidad de las partículas, marcadas con BTX, se obtienen los coeficientes k . Por cada partícula es posible construir una curva de densidad. Por lo tanto, se obtienen múltiples valores del coeficiente k como puede observarse en la figura 39. En ambos casos, hay una disminución de la media del coeficiente k a medida que aumenta la concentración de colesterol. En el contexto del modelo de potencial lineal, se puede interpretar como una disminución de la fuerza restitutiva a medida que aumenta la distancia radial de la partícula.

En la tabla 3 se resumen las medias, y los errores estándares, de los coeficientes calculados, y el valor obtenido para el test de Kruskal-Wallis.

Condición:	CDx	Control	CDx-Chol	Kruskal-Wallis
Inmóvil $k[pN]$	$1,585 \pm 0,001$	$1,499 \pm 0,004$	$1,476 \pm 0,004$	$p = 0,07$
Subdifusiva $k[pN]$	$0,839 \pm 0,004$	$0,733 \pm 0,005$	$0,629 \pm 0,006$	$p = 0,002$

Tabla 3: Ajustes individuales: Media y error estándar de los coeficientes k obtenidos para las partículas inmóviles y móviles subdifusivas ($\beta < 0.75$), en las tres condiciones de colesterol. Se puede observar una disminución del coeficiente k correlacionada con la concentración de colesterol. En la última columna se muestra el resultado del test de Kruskal-Wallis. Se utilizó el modelo de potencial lineal con los ajustes realizados de forma individual a cada curva de densidad.

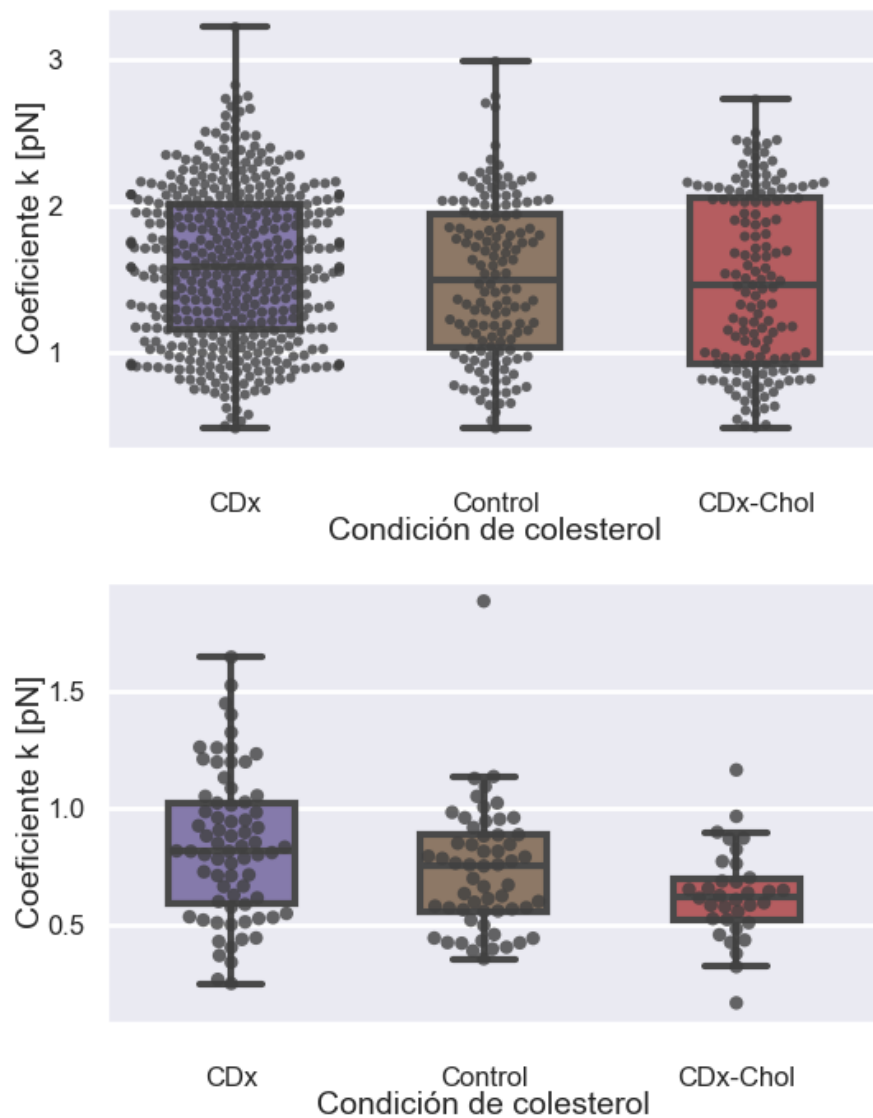


Figura 39: Coeficiente k obtenido para el ajuste del modelo lineal sobre las partículas marcadas con BTX en las tres condiciones de colesterol. Puede observarse como el coeficiente k disminuye a medida que aumenta la concentración de colesterol. **Superior)** Partículas inmóviles marcadas con BTX. **Inferior)** Partículas subdifusivas marcadas con BTX.

4.2.3. Ajustes colectivos a las partículas marcadas con BTX

En la figura 40 se observan los coeficientes k obtenidos a partir del ajuste, de forma colectiva, del modelo lineal sobre las curvas de densidad de las partículas marcadas con BTX. Al igual que con los ajustes individuales del capítulo anterior, se obtiene una correlación entre la disminución del coeficiente k y el aumento de la concentración de colesterol (Tabla 4).

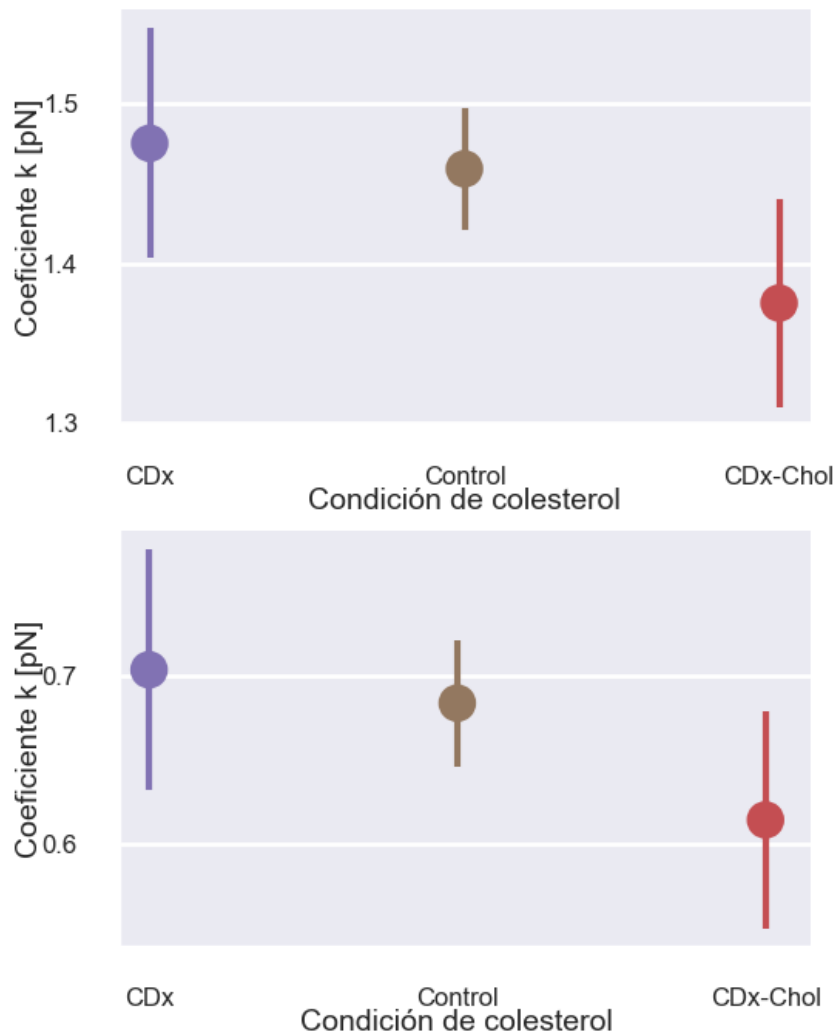


Figura 40: Coeficiente k , obtenido a partir del ajuste global, sobre las partículas para las diferentes condiciones de colesterol. Se observa como el coeficiente k disminuye con el aumento de colesterol. **Superior)** Partículas inmóviles marcadas con BTX. **Inferior)** Partículas subdifusivas $\beta < 0,75$ marcadas con BTX.

Condición:	CDx	Control	CDx-Chol
Inmóvil $k[pN]$	$1,48 \pm 0,07$	$1,46 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,07$
Subdifusiva $k[pN]$	$0,71 \pm 0,02$	$0,68 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,02$

Tabla 4: Ajustes colectivos: Media y error estándar de los coeficientes k obtenidos para las partículas inmóviles y móviles subdifusivas ($\beta < 0.75$), en las tres condiciones de colesterol. Se puede observar una disminución del coeficiente k correlacionada con la concentración de colesterol.

4.2.4. Ajustes a las partículas inmóviles marcadas con mAb

En el análisis sobre las partículas marcadas con mAb se encontró que el coeficiente k aumenta al incrementar la concentración de colesterol (figuras 41 y 42, análisis colectivo e individual respectivamente). Dicho resultado es opuesto al hallado para las partículas marcadas con BTX. Por lo tanto, esto indicaría que el marcador utilizado ejerce un papel fundamental en la determinación de la fuerza restitutiva para el modelo propuesto. Es relevante recordar que ambos marcadores presentan grandes diferencias entre sí, por ejemplo, que el mAb tiene un mayor peso molecular y la posibilidad de hacer “cross-linking”. Probablemente, en estas importantes diferencias biológicas reside el motivo de los desiguales coeficientes obtenidos para el modelo estudiado.



Figura 41: Coeficiente k obtenido para las partículas inmóviles de mAb, mediante el análisis colectivo. Se observa como el coeficiente aumenta al incrementar la concentración de colesterol, indicando una mayor fuerza restitutiva en el modelo estudiado.

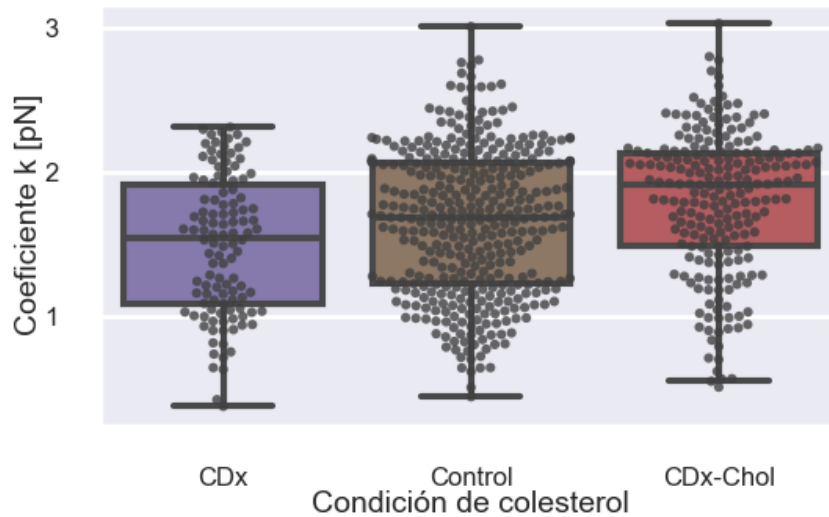


Figura 42: Coeficiente k calculado para las trayectorias subdifusivas marcadas con mAb, utilizando el análisis individual. Se obtuvo un $p < 0,000001$ a partir del test de Kruskal Wallis, indicando diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de colesterol.

4.3. Conclusiones

El objetivo de este capítulo fue modelar las moléculas confinadas como partículas atrapadas en un potencial, con el fin de poder estudiar las propiedades mecánicas del entorno. Para ello, se ajustó la densidad de las localizaciones espaciales a cuatro modelos distintos, y se halló que el mejor ajuste corresponde al modelo lineal (entorno viscoelástico). Esta preferencia por el modelo de potencial lineal se observa independientemente del marcador utilizado (BTX o mAb), de la concentración de colesterol (CDx, Control o CDx-Chol) y del tipo de movilidad (partícula inmóvil o trayectoria subdifusiva). Esto indicaría que **los receptores con baja movilidad se hallan restringidos en su movimiento por un entorno con propiedades viscoelásticas**, lo cual era esperable dada la composición del medio (bicapa lipídica).

Una vez determinado el modelo de potencial, se estudió el coeficiente k de dicho modelo, que representa la magnitud de la fuerza. En cuanto a las moléculas marcadas con BTX (tanto inmóviles como subdifusivas), se obtuvo que, al aumentar la concentración de colesterol, disminuye el coeficiente k , es decir, hay una menor fuerza restitutiva. Considerando los resultados del capítulo sobre el MSD, que indican que al aumentar el colesterol se incrementa el coeficiente de difusión de las trayectorias en un régimen difusivo, se puede concluir que, **al aumentar el colesterol, aumenta la movilidad** de los receptores marcados con BTX, y esto se refleja también en cambios sobre la organización de la membrana. Estos cambios ya se habían insinuado cuando se describió que la fracción de partículas agrupadas disminuía al depletar el colesterol (figura 20, subpoblación móvil).

Sin embargo, al estudiar las moléculas marcadas con mAb se obtuvo el resultado contrario. Es decir, se obtuvo que el coeficiente k aumenta al incrementar la concentración de colesterol. Este resultado indicaría la importancia del efecto sobre el agrupamiento de los receptores inducido por el anticuerpo. Realizar un experimento evitando el crosslinking del mAb permitiría conocer su influencia.

5. Regímenes transitorios de Transporte

Los métodos presentados en el capítulo 3 revelan información acerca de los regímenes de transporte. Sin embargo, fallan al intentar describir la dinámica de una trayectoria que involucre cambios de regímenes; es decir, cuando una partícula alterna su dinámica entre dos regímenes distintos durante una misma trayectoria. Por este motivo, se describe a continuación un método que utiliza un modelo bayesiano para elegir entre distintos modelos de Markov ocultos (HMM, del inglés *hidden markov modeling*), con el objetivo de revelar los diferentes regímenes transitorios que coexisten en una trayectoria.

5.1. Introducción al análisis HMM-Bayes

Considerando que la membrana es una estructura compleja y heterogénea, los análisis sobre trayectorias únicas deberían considerar la posibilidad de que existan cambios en los regímenes de transporte sobre una misma trayectoria.

En contraste con el análisis del MSD presentado anteriormente (capítulo 3), un análisis basado en HMM considera la posibilidad de que existan cambios estocásticos entre diferentes regímenes de transporte sobre una misma trayectoria. Estos métodos han permitido revelar, por ejemplo, el comportamiento difusivo de partículas confinadas dentro de corrales de membrana, o que son afectadas por interacciones temporales con el citoesqueleto (Chung y col. 2010) (Das, Cairo y Coombs 2009) (Cairo y col. 2010) (Persson y col. 2013). Además, la incorporación del modelo de selección bayesiano en este método permite una selección objetiva del modelo de dinámica estocástico más simple para describir una trayectoria dada.

Los métodos actuales de tipo HMM y bayesianos están limitados únicamente a regímenes de difusión. Sin embargo, muchas veces la dinámica es una combinación entre difusión y transporte activo, como en el caso del transporte de mRAN a través de microtúbulos en las dendritas neuronales (Park y col. 2014).

Para superar dichas limitaciones, Monnier et al. (2015) desarrollaron un método, llamado HMM-Bayes, que puede ser aplicado en trayectorias que alternan entre

distintos regímenes, incluyendo transporte activo (Monnier, Barry y col. 2015).

La idea central detrás del análisis HMM-Bayes consiste en modelar los diferentes regímenes de transporte como estados de un modelo oculto de Markov. Como todo proceso de Markov, cada estado tiene una probabilidad de transición a otro estado que únicamente depende de su estado presente, es decir, que carece de memoria. A su vez, dichas probabilidades de transición son desconocidas y deben ser inferidas a partir de las magnitudes observables. En este caso, dichas magnitudes son cada uno de los desplazamientos en la trayectoria (Bertsekas y Tsitsiklis 2002).

Por otro lado, cada estado tiene una distribución de probabilidad normal sobre los posibles desplazamientos que puede efectuar la partícula en cada paso. Los parámetros de esas distribuciones dependen del estado en el que se encuentre el sistema. Una de las novedades del HMM-Bayes es que permite que dichas distribuciones no estén centradas en el cero, representando así un estado con transporte activo. Por lo tanto, por transporte activo se entiende al régimen que consta de un régimen de difusión al que se le agrega un desplazamiento direccional en cada uno de sus pasos.

En la figura 43 se observa un diagrama de un modelo de Markov oculto de dos estados. En el HMM-Bayes, cada estado representa un régimen (que puede ser difusivo o de transporte activo), que produce una distribución de desplazamientos con parámetros únicos. Dichos parámetros son la desviación estándar σ y la media μ de la distribución de probabilidad normal que define a cada régimen.

En este trabajo, dado el sistema biológico y la longitud de las trayectorias (≈ 100 pasos) nos limitamos a aplicar el análisis con un máximo de dos estados. En ese caso hay tres combinaciones posibles de regímenes para cada trayectoria (figura 44). Dos regímenes difusivos, dos regímenes de transporte activo, ó una combinación de un régimen difusivo con un régimen de transporte activo.

El software HMM-Bayes es de código abierto y puede encontrarse en la publicación de los autores (Monnier, Barry y col. 2015).

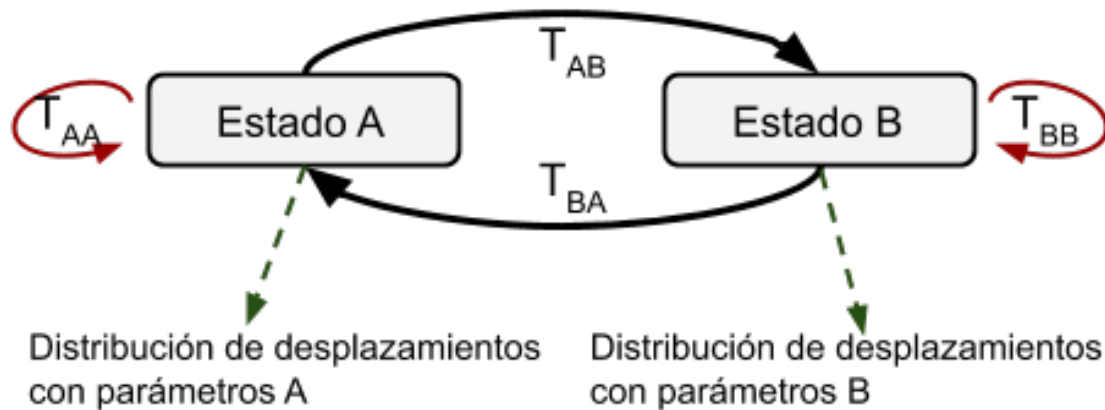


Figura 43: Diagrama de un modelo de Markov oculto de dos estados. Las variables desconocidas T_{XY} son las probabilidades del sistema de transicionar del estado X al estado Y . Las variables T_{XX} (flechas rojas) representan la probabilidad de permanecer en ese estado. Cada estado produce una distribución de desplazamientos con parámetros únicos, en el caso del HMM-Bayes los parámetros son el σ y μ de la distribución normal los desplazamientos posibles de cada régimen.

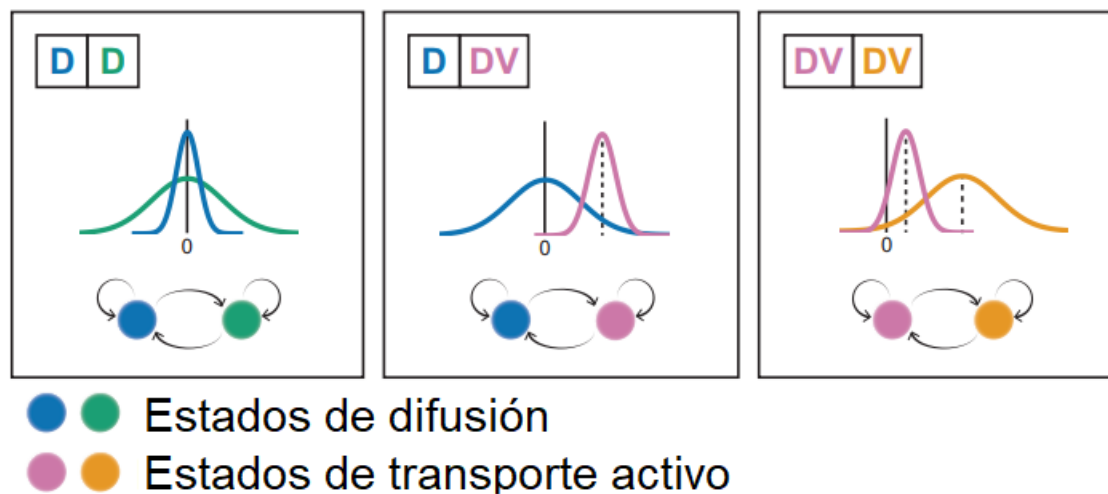


Figura 44: Combinaciones posibles de regímenes en un modelo de dos estados. Cada régimen produce una distribución de probabilidad normal con parámetros σ y μ únicos. Nótese como los regímenes de difusión tienen un valor μ igual cero, mientras que los regímenes de transporte activo no. **Izquierda)** Dos regímenes difusivos. **Centro)** Un régimen difusivo y uno de transporte activo. **Derecha)** Dos regímenes de transporte activo. Adaptación de (Monnier, Barry y col. 2015)

5.1.1. Ejemplo de análisis HMM-Bayes sobre trayectoria simulada con dos regímenes

Con el fin de ilustrar el funcionamiento del HMM-Bayes, a continuación, se muestra el análisis de una trayectoria simulada de 300 pasos. Dicha trayectoria está compuesta por dos regímenes distintos de movimiento. El primero, de tipo difusivo (celeste) con un parámetro $\sigma = 10nm$, abarca el comienzo y el final de la trayectoria. El segundo régimen, de tipo de transporte activo (rosa) con parámetros $\sigma = 10nm$ y $\mu = 10nm$ comprende únicamente los puntos intermedios de la trayectoria, como se puede ver en la figura 45.A .

Al aplicar el HMM-Bayes se llega a una segmentación de la trayectoria en los diferentes regímenes inferidos. Como se puede ver en la figura 45.B, gracias al análisis se encontraron dos regímenes que coinciden correctamente en prácticamente todo (99 %) el largo de la trayectoria.

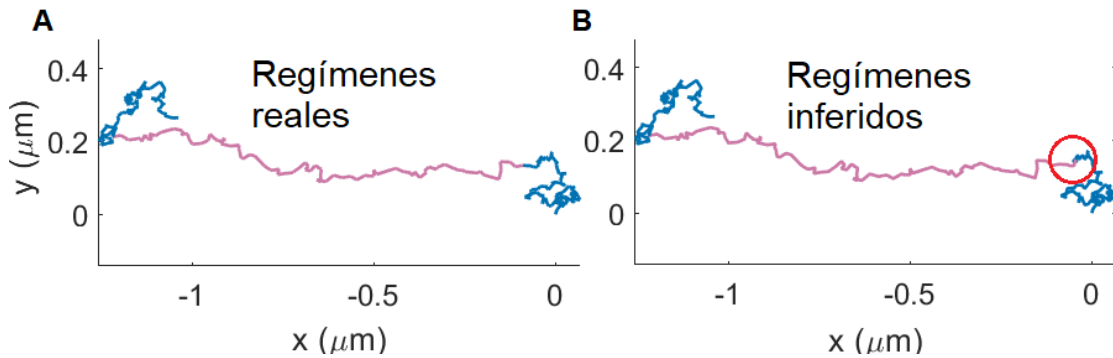


Figura 45: Análisis HMM-Bayes sobre una trayectoria simulada de dos regímenes. El color celeste representa el régimen difusivo mientras que el color rosa el de transporte activo. **A)** Trayectoria con los colores indicando sus regímenes reales. **B)** Trayectoria con los colores según los regímenes inferidos por el HMM-Bayes. Exceptuando la pequeña región marcada con un círculo rojo, el análisis infirió correctamente los regímenes.

Una vez obtenidos los dos regímenes inferidos, es posible calcular los parámetros de su distribución para verificar que su estimación se aproxime a los valores simulados. (Tabla 5)

A partir del análisis del MSD sobre la trayectoria completa, se obtiene un exponente β de $1,88 \pm 0,05$, valor que corresponde a un comportamiento superdifusivo.

Parámetro	Simulada	Inferida
σ (Difusivo)	$1nm$	$(1 \pm 0, 1)nm$
μ (Difusivo)	0	0
σ (Transporte activo)	$1nm$	$(0, 9 \pm 0, 1)nm$
μ (Transporte activo)	$1nm$	$(1, 1 \pm 0, 1)nm$

Tabla 5: Comparación entre los parámetros simulados y los inferidos por el HMM-Bayes. Puede verse que los valores simulados están dentro del intervalo de confianza de los valores inferidos.

Como ya se estudió en el capítulo 3, el análisis del MSD es un estudio sobre la trayectoria completa, que no permite discriminar regímenes transitorios dentro de la misma. Con la trayectoria segmentada por el HMM-Bayes es posible aplicar el análisis del MSD a cada sección de la trayectoria por separado. La sección de la trayectoria que pertenece al régimen de difusión (celeste) tiene un exponente β de $1,18 \pm 0,03$, mientras que la parte que pertenece al régimen de transporte activo (rosa) es de $1,95 \pm 0,01$.

En la figura 46 se pueden observar dos parámetros, relacionados entre sí, que ayudan a entender el análisis HMM-Bayes. El primero es el promedio de los desplazamientos. Un promedio de valor no nulo $\mu \neq 0$, implica que los pasos tienen una dirección privilegiada.

El segundo parámetro, que se complementa con el anterior para determinar si el régimen es de transporte activo, es la distribución del tamaño de los pasos. Los desplazamientos del transporte activo (en color rosa) tienen una distribución normal que no se encuentra centrada en el cero. Por lo tanto, la distribución del valor absoluto de los desplazamientos conserva la forma original. Por otro lado, los desplazamientos del régimen de difusión normal (en color celeste) tienen una distribución normal centrada en el cero. Esto causa que la distribución del valor absoluto de dichos desplazamientos, sea diferente a la distribución original.

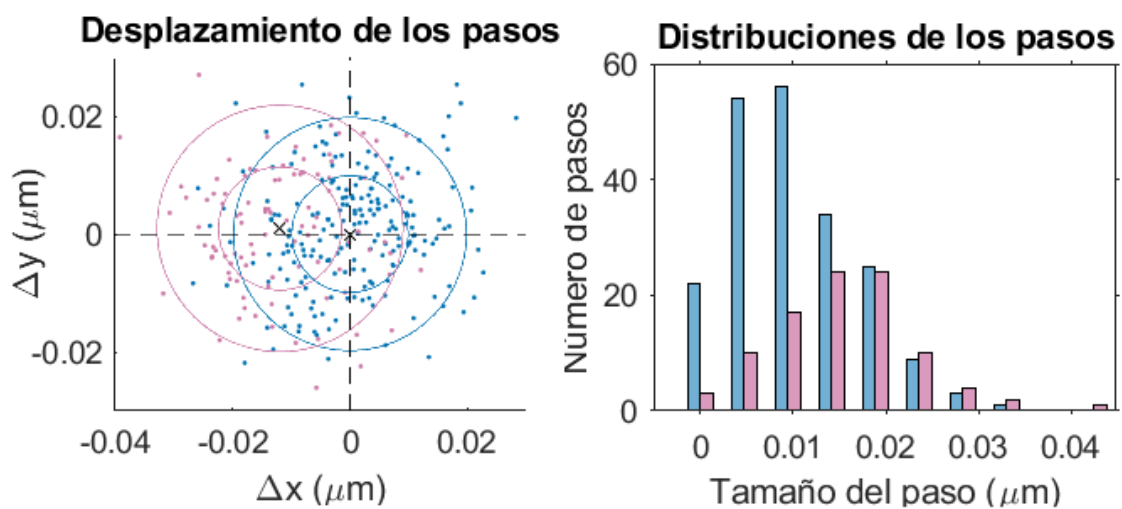


Figura 46: Información sobre los pasos a partir de los regímenes inferidos de la trayectoria simulada. El color celeste representa el régimen difusivo, y el color rosa el régimen de transporte activo. **Izquierda)** Desplazamientos de los pasos. Se observa que la media de los puntos celestes está en el origen, significando un parámetro $\mu = 0$ para el régimen celeste. Mientras que la media de los puntos rosas es diferente a cero, dando a entender un parámetro $\mu \neq 0$, y por lo tanto un transporte activo. **Derecha)** Distribución del tamaño de los pasos.

5.2. Análisis de trayectorias de receptores utilizando el método HMM-Bayes

Se implementaron las rutinas descritas anteriormente a las trayectorias experimentales. El tiempo de cómputo resultó del orden de decenas de minutos. A pesar de lo promisorio de la aplicación del método a trayectorias simuladas, y los casos presentados en el trabajo de los autores (Monnier, Barry y col. 2015), los resultados obtenidos para trayectorias experimentales no fueron los esperados.

A modo de ejemplo, en la figura 47.A se puede observar una trayectoria experimental de nAChR, con 110 pasos de longitud, que muestra un movimiento dirigido. El análisis del MSD recupera un valor de β cercano a 2.

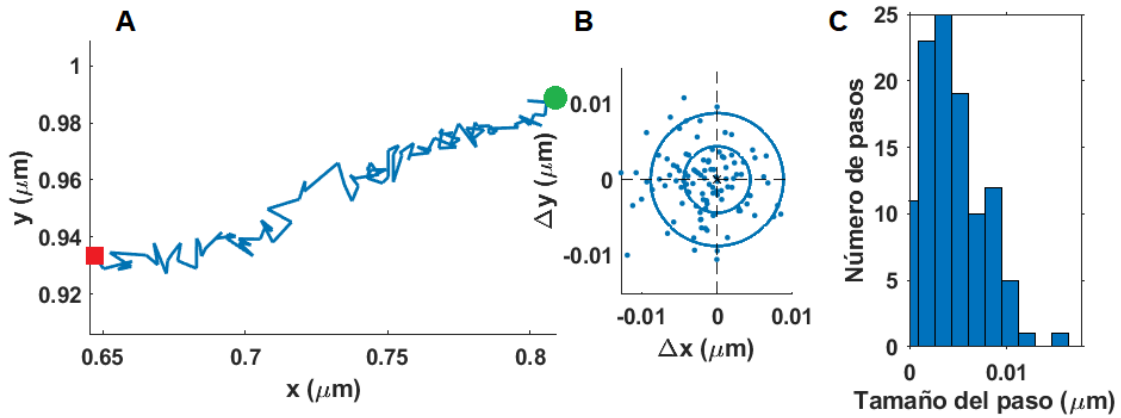


Figura 47: Resultados del método HMM-Bayes **A)** Trayectoria experimental de nAChR, con una longitud de cien pasos, que presenta un movimiento dirigido. El círculo verde representa su punto inicial, y el cuadrado rojo su final. El HMM-Bayes encontró un único régimen de movimiento, el cual es una difusión normal. **B)** Desplazamientos de los pasos. Se observa que la media, si bien es muy cercana a cero, no es exactamente cero. **C)** Distribuciones del tamaño de los pasos.

El análisis de esta trayectoria utilizando el modelo de HMM-Bayes infiere que sólo hay un régimen, y el mismo es de difusión (ver figura 47).

Para intentar comprender las causas del resultado obtenido con el método HMM-Bayes se realiza la siguiente interpretación: Si se estima la velocidad media v_m de la partícula, entendida ésta como la diferencia entre las posiciones inicial y final, dividida por el tiempo, se obtiene el valor de $170\text{nm}/s$. Por otro lado, si

se estima la *jittering* v_j , calculada como $v_j = \frac{\text{Error de localización}}{\text{Frecuencia de muestreo}}$, se obtiene una velocidad del orden de $1500nm/s$. Por lo tanto, la amplitud de las fluctuaciones de la localización de la partícula en cada paso es mucho mayor que el sesgo debido al transporte activo. En otras palabras, el parámetro μ del régimen de transporte activo es chico en comparación con el valor del parámetro σ , para poder ser detectada por el HMM-Bayes en trayectorias con un número de puntos del orden de los obtenidos en los experimentos.

Esto motivó la realización de simulaciones con el fin de analizar la sensibilidad del método de HMM-Bayes en la detección de regímenes transitorios.

5.2.1. Evaluación de la sensibilidad del método HMM-Bayes mediante simulaciones numéricas

El objetivo de este subcapítulo es estudiar la relación que deben cumplir los parámetros μ y σ del movimiento de una trayectoria con un único régimen, para que el HMM-Bayes logre inferirlo correctamente.

Con ese fin, se simularon trayectorias para un rango de parámetros que incluyan los estimados para las trayectorias experimentales. A partir de la velocidad media y la velocidad de *jittering* calculada sobre las trayectorias tanto experimentales como simuladas, se puede conseguir acotar el rango del cociente μ/σ que tienen las trayectorias experimentales. De esta forma, se puede verificar si dicho cociente (junto con el largo de la trayectoria) cumple la relación que requiere el HMM-Bayes para funcionar correctamente. La longitud de las trayectorias simuladas van desde 50 hasta 250 pasos (la longitud promedio de las experimentales es de 100 pasos). Se simularon trayectorias procesivas con distintos valores del cociente μ/σ en el rango que va desde 0,05 hasta 1. En la figura 48) puede verse la fracción de regímenes que son correctamente detectados por el HMM-Bayes, en función del largo de la trayectoria y del cociente μ/σ . A partir de esta figura se concluye que para que el método de HMM-Bayes sea capaz de identificar correctamente los regímenes subyacentes a las trayectorias experimentales, serían necesarias trayectorias al menos cuatro veces más largas que las actuales.

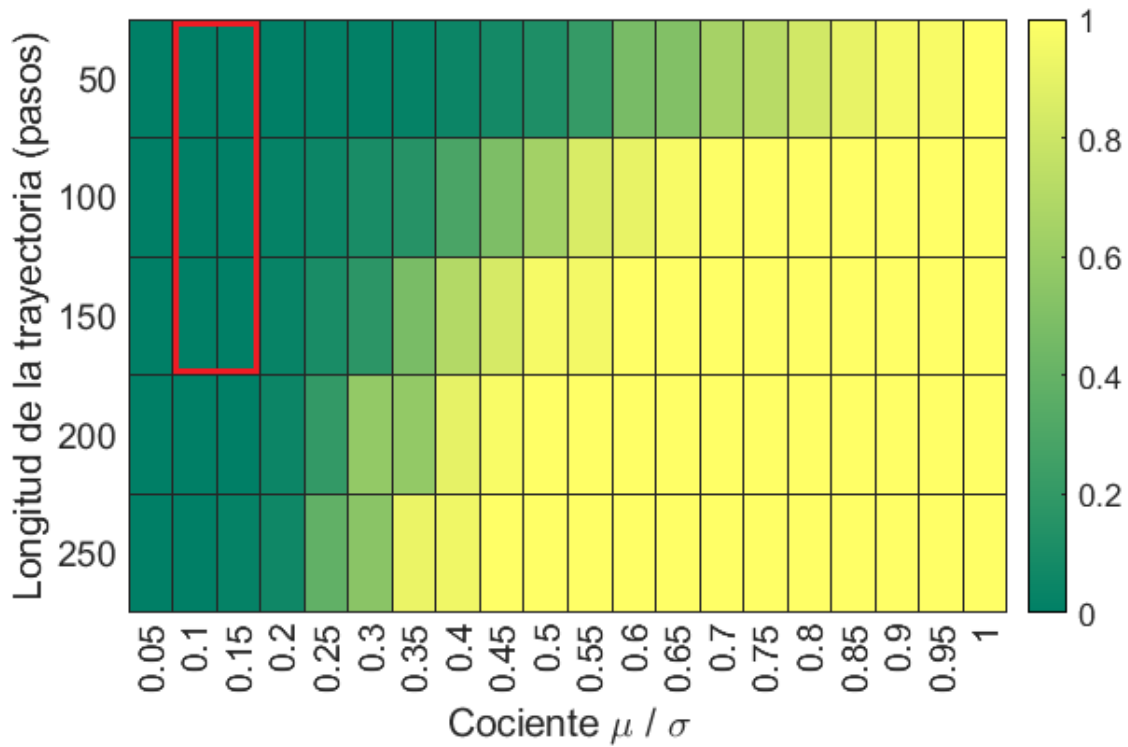


Figura 48: Fracción de regímenes detectados correctamente por HMM-Bayes sobre trayectorias simuladas que poseen un único régimen de tipo transporte activo. El eje vertical representa la longitud de las trayectorias. El eje horizontal representa el cociente μ/σ . Puede verse que existe un umbral tanto para el largo de la trayectoria, como para el cociente, a partir del cual el análisis permite recuperar correctamente el régimen subyacente. En rojo, el área que representa la longitud y los parámetros de las trayectorias experimentales.

5.3. Conclusiones del análisis HMM-Bayes

El análisis HMM-Bayes es una novedosa herramienta que permite inferir los regímenes difusivos y de transporte activo que coexisten en una misma trayectoria. Resultó exitoso en el análisis sobre trayectorias de β -actina mRNP (Monnier, Barry y col. 2015) y sobre trayectorias (de aproximadamente 400 pasos de largo) de cápsidas víricas (Holzwarth y col. 2020).

Sin embargo, el análisis HMM-Bayes tiene requerimientos que pueden ser muy exigentes para algunos sistemas biológicos. El primer requerimiento es que los diferentes regímenes posean parámetros de movimiento considerablemente distintos entre sí.

El segundo requerimiento es el largo exigido a las trayectorias. Si bien es posible modificar las condiciones experimentales para obtener trayectorias más largas, no es un proceso fácilmente asequible.

En conclusión, el análisis HMM-Bayes no resultó útil para las trayectorias experimentales porque no se cumplía con los exigentes requerimientos para funcionar correctamente. Por lo tanto, no permitió revelar si las trayectorias superdifusivas tienen, al menos parcialmente, un movimiento de transporte activo.

Por otro lado, también se puede observar que el análisis HMM-Bayes tiene un elevado costo computacional y que no hace uso de las incertezas de las localizaciones. También, si se desea independizar la direccionalidad del transporte activo, la magnitud de los requerimientos antes mencionados aumentan drásticamente.

Sin embargo, a pesar de esas propiedades negativas, se puede plantear que el HMM-Bayes es una gran base para las futuras herramientas de análisis sobre diferentes regímenes en trayectorias.

6. Conclusiones y Perspectivas

En este trabajo se estudiaron diferentes herramientas cuantitativas para el análisis de trayectorias de partículas individuales. Particularmente, las herramientas fueron evaluadas en el análisis de trayectorias del nAChR, marcado con BTX, sobre la membrana celular. Para ello, se propusieron cuatro métodos con objetivos y metodologías distintos entre sí, que se resumen a continuación.

La primera herramienta, abordada en el capítulo 2, fue el análisis mediante diagramas de Voronoi, que resultó exitoso para estudiar el agrupamiento de una distribución espacial de puntos, en particular, de la distribución de las moléculas del nAChR en el plano de la membrana celular. El principal resultado biofísico obtenido a partir de este análisis es que las moléculas inmóviles de nAChR presentan un agrupamiento mayor que el de una distribución aleatoria, es decir, que **existen acúmulos que no son productos del azar**, tal como lo adelantaba la bibliografía estudiada (Kellner y col. 2007) (Almarza, Sánchez y F. J. Barrantes 2014) (Mosqueira, Camino y F. J. Barrantes 2018). Estos acúmulos se presentan tanto en célula viva como fijada, y para todas las condiciones de colesterol estudiadas.

En particular, **para las trayectorias móviles se observó que la fracción de agrupamiento es mayor al reducir la concentración del colesterol** en la membrana. Resultados similares, i.e. la presencia de acúmulos de proteínas de membrana, también fueron reportados en otros trabajos (Kellner y col. 2007), donde se señalaban las características heterogéneas y complejas de esta estructura, aunque no se había estudiado el efecto del colesterol sobre esta distribución. El resultado obtenido aquí, que muestra que la fracción de receptores agrupados en acúmulos aumenta al reducir el colesterol, podría estar asociado a la disminución en la movilidad de los receptores, en consistencia con los resultados del capítulo 3 y lo reportado en la literatura (Levitan y Aye 2016).

La segunda herramienta, trabajada en el capítulo 3, fue el estudio de los regímenes de transporte a partir del MSD. Si bien es un método ya conocido e

implementado, se propusieron dos formas distintas de obtener el exponente β con el objetivo de disminuir la incerteza, y se corroboró que los parpadeos de los fluóforos no afectarían al método. El resultado biofísico de mayor interés es el **aumento en el coeficiente de difusión al incrementar la concentración de colesterol** en la membrana, tal como anunciaba la bibliografía (Baier y col. 2009). Por otro lado, se encontraron diferencias significativas entre el tamaño de las poblaciones móviles e inmóviles, según el tratamiento de colesterol aplicado.

La tercera herramienta, presentada en el capítulo 4, consistió en modelar las moléculas confinadas mediante un potencial, con el fin de estudiar las propiedades mecánicas del entorno. Se encontró que es posible modelar las partículas confinadas del nAChR mediante un potencial lineal. Es decir, que, según este modelo, **las partículas con baja movilidad se encuentran bajo los efectos de un entorno con propiedades viscoelásticas**. Estos efectos podrían provenir no sólo de las características biofísicas de la membrana, sino que también podrían ser el efecto de las interacciones de los receptores con filamentos del citoesqueleto, en particular, la red de actina (Kwik y col. 2003).

Además, se halló que, para las moléculas marcadas con BTX, **la fuerza restitutiva disminuye al aumentar la concentración de colesterol**, en concordancia con los resultados de los capítulos 2 y 3. Sin embargo, para las moléculas marcadas con el anticuerpo mAb se halló el resultado contrario, es decir, un incremento de la fuerza restitutiva al aumentar la concentración de colesterol. Este resultado destaca la relevancia que tiene el efecto de agrupamiento inducido por el anticuerpo.

El último análisis, realizado en el capítulo 5, consistió en aplicar la herramienta HMM-Bayes con el fin de distinguir regímenes transitorios de transporte. Se analizaron trayectorias simuladas con el objetivo de evaluar la sensibilidad del HMM-Bayes. Se hallaron requerimientos tanto para la longitud de las trayectorias, como para los parámetros de los regímenes a inferir. Dichos requerimientos no eran alcanzados por las trayectorias experimentales de nuestro sistema biofísico.

En conclusión, cada una de las herramientas tiene propiedades únicas: ventajas y desventajas, hipótesis requeridas, y permiten responder diferentes preguntas biofísicas. La especificidad y parcialidad de los resultados ofrecidos por cada herramienta hacen que sea necesaria su complementariedad para lograr una interpretación completa del sistema de estudio.

7. Anexo

7.1. Código MATLAB de simulaciones de ejemplos de trayectorias para calcular el MSD

```
1 largo = 400; % Cantidad de pasos de cada una de las trayectorias
   simuladas.
2 shift_x_2 = 0.15; % Desplazamiento constante, en el eje X, que se
   suma a cada paso.
3 tau = linspace(1, largo, largo); % Vector con la coordenada temporal
   .
4
5 randn(N, 1) % Genera una lista de N numeros aleatorios desde una
   distribucion normal con mu=0 y sigma=1. cumsum() es la suma
   acumulada de sus elementos, para obtener la suma de los
   desplazamientos y reconstruir la trayectoria.
6
7 % Coordenadas de la trayectoria 1
8 x_1 = cumsum(randn(largo, 1)); % Coordenadas X de la trayectoria 1
9 y_1 = cumsum(randn(largo, 1)); % Coordenadas Y de la trayectoria 1
10
11 % Coordenadas de la trayectoria 2
12 x_2 = cumsum(randn(largo, 1) + shift_x_2); % Coordenadas X de la
   trayectoria 2. Notar que se suma un valor constante a cada
   desplazamiento
13 y_2 = cumsum(randn(largo, 1)); % Coordenadas Y de la trayectoria 2
14
15 % A partir de aca se calcula el MSD
```

7.2. Código MATLAB de simulaciones de ejemplos de trayectorias para analizar con el HMM-Bayes

```
1
2 % Parametros
3 cantidad_de_tracks = 1000; % Numero de trayectorias a simular
4 iteracion_min = 1;
5 iteracion_max = 20;
6
7 % Trayectorias
8 largo = 100; % Largo total de cada trayectoria. Este parametro va a
   tomar diferentes valores desde 50 hasta 250
9 drift_base = 0.1; % Drift que se utilizara en el eje X, para probar
   el modo de transporte activo
10 ruido = 0.1;
11
12 for iteracion = iteracion_min :iteracion_max
13     drift = drift_base*iteracion*0.05;
14     for a = 1:cantidad_de_tracks
15
16         % Condiciones iniciales
17         x(1) = 0;
18         y(1) = 0;
19         dx(1) = 0;
20         dy(1) = 0;
21
22         % Cada paso de la trayectoria esta compuesto por un valor
           tomado de una distribucion normal y, en el caso del eje x
           , se le suma un valor constante
23         for i=2:largo
```

```
24         dx(i) = randn*ruido + drift;
25         x(i) = x(i-1) + dx(i);
26         dy(i) = randn*ruido;
27         y(i) = y(i-1) + dy(i);
28     end
29
30     tracks{a,1} = [x ; y];
31     plot(x,y)
32 end
33 end
```

8. Agradecimientos

Agradezco especialmente a mi director, el Dr. Francisco Barrantes, por abrirme las puertas del laboratorio e iniciarme en el mundo de la investigación; por las discusiones y aportes, que han ayudado a afinar las preguntas iniciales y encontrar nuevos problemas. Gracias por la invaluable oportunidad de publicar de forma conjunta.

Agradezco enormemente a mi codirectora, la Dra. Luciana Bruno, por sus pertinentes ideas y la gran dedicación puesta en las correcciones. Las mismas han enriquecido la investigación, y han hecho de esta tesis lo que es. Gracias, también, por introducirme al maravilloso mundo de la estadística, el cálculo y el análisis de datos.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Alejo, por el acompañamiento en el trabajo, la colaboración intelectual y la buena onda en la vida.

Quiero agradecer a todas las personas que me apoyaron durante la carrera: a mis padres, hermanos y Amy, por su ayuda incondicional y amor infinito. A mis amigos sapenses - Eze, Chino, Mai, Luczo, Peque y Sturli - por iluminar mis años de cursada, mi paso por la universidad, y por sobre todo las innumerables aventuras en mundos imaginarios. A mis amigos del colegio, Les Poke-teres, Los Lumina, La Cofradía, Los secuaces del Pancho, Los Caballeros de la Materia Gris, etc.

Finalmente, agradezco a Juana (con su filosofía y elegancia) por ser todo lo que está bien en el mundo, y hacer que el esfuerzo valga la pena. Gracias a ella, la existencia es un lugar/momento/realidad mejor.

Referencias

- [1] Carlo Manzo y Maria F Garcia-Parajo. «A review of progress in single particle tracking: from methods to biophysical insights». En: *Reports on Progress in Physics* 78.12 (oct. de 2015), pág. 124601. DOI: 10.1088/0034-4885/78/12/124601.
- [2] Alejo Mosqueira, Pablo A. Camino y Francisco J. Barrantes. «Cholesterol modulates acetylcholine receptor diffusion by tuning confinement sojourns and nanocluster stability». En: *Scientific Reports* 8.1 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-30384-y.
- [3] Alejo Mosqueira, Pablo A. Camino y Francisco J. Barrantes. «Antibody-induced crosslinking and cholesterol-sensitive, anomalous diffusion of nicotinic acetylcholine receptors». En: *Journal of Neurochemistry* 152.6 (nov. de 2020), págs. 663-674. DOI: 10.1111/jnc.14905.
- [4] Alejo Mosqueira, Pablo A. Camino y Francisco J. Barrantes. *Cholesterol effects on muscle-type nicotinic acetylcholine receptor distribution and dynamics studied with single-molecule STORM microscopy and Bayesian analysis*. Federation of Latin American y Caribbean Neuroscience. 2016.
- [5] Pablo A. Camino, Alejo Mosqueira y Francisco J. Barrantes. *Hidden markov and bayesian inference modeling of acetylcholine receptor diffusion in the membrane*. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. 2017.
- [6] F.j. Barrantes. «Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function». En: *Brain Research Reviews* 47.1-3 (2004), págs. 71-95. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2004.06.008.
- [7] Yi Xia y Ling Peng. «Photoactivatable Lipid Probes for Studying Biomembranes by Photoaffinity Labeling». En: *Chemical Reviews* 113.10 (2013), págs. 7880-7929. DOI: 10.1021/cr300419p.
- [8] N.p. Hirsch. «Neuromuscular junction in health and disease». En: *British Journal of Anaesthesia* 99.1 (2007), págs. 132-138. DOI: 10.1093/bja/aem144.

- [9] Mariela L. Paz y Francisco J. Barrantes. «Autoimmune Attack of the Neuromuscular Junction in Myasthenia Gravis: Nicotinic Acetylcholine Receptors and Other Targets». En: *ACS Chemical Neuroscience* 10.5 (2019), págs. 2186-2194. DOI: 10.1021/acscemneuro.9b00041.
- [10] Francisco J. Barrantes, Virginia Borroni y Sofía Vallés. «Neuronal nicotinic acetylcholine receptor-cholesterol crosstalk in Alzheimers disease». En: *FEBS Letters* 584.9 (2010), págs. 1856-1863. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.11.036.
- [11] Jacques Fantini y Francisco J. Barrantes. «How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains». En: *Frontiers in Physiology* 4 (2013). DOI: 10.3389/fphys.2013.00031.
- [12] K. Simons y J. L. Sampaio. «Membrane Organization and Lipid Rafts». En: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3.10 (mayo de 2011), a004697-a004697. DOI: 10.1101/cshperspect.a004697.
- [13] S. B. Mantipragada y col. «Lipid-Protein Interactions and Effect of Local Anesthetics in Acetylcholine Receptor-Rich Membranes from *Torpedo marmorata* Electric Organ†». En: *Biochemistry* 42.30 (2003), págs. 9167-9175. DOI: 10.1021/bi034485q.
- [14] Francisco J. Barrantes. «Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor». En: *Journal of Neurochemistry* 103.s1 (2007), págs. 72-80. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04719.x.
- [15] Akihiro Kusumi y col. «Dynamic Organizing Principles of the Plasma Membrane that Regulate Signal Transduction: Commemorating the Fortieth Anniversary of Singer and Nicolson's Fluid-Mosaic Model». En: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28.1 (oct. de 2012), págs. 215-250. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100809-151736. URL: <https://www.deepdyve.com/lp/annual-reviews/dynamic-organizing-principles-of-the-plasma-membrane-that-regulate-Kb4CEZ11c6>.

- [16] Takahiro Fujiwara y col. «Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane». En: *Journal of Cell Biology* 157.6 (jun. de 2002), págs. 1071-1082. DOI: 10.1083/jcb.200202050.
- [17] Juan L. Brusés, Norbert Chauvet y Urs Rutishauser. «Membrane Lipid Rafts Are Necessary for the Maintenance of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor in Somatic Spines of Ciliary Neurons». En: *The Journal of Neuroscience* 21.2 (2001), págs. 504-512. DOI: 10.1523/jneurosci.21-02-00504.2001.
- [18] J.a. Campagna y J. Fallon. «Lipid rafts are involved in C95 (4,8) agrin fragment-induced acetylcholine receptor clustering». En: *Neuroscience* 138.1 (2006), págs. 123-132. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.11.019.
- [19] Sophie Marchand y col. «Rapsyn Escorts the Nicotinic Acetylcholine Receptor Along the Exocytic Pathway via Association with Lipid Rafts». En: *The Journal of Neuroscience* 22.20 (2002), págs. 8891-8901. DOI: 10.1523/jneurosci.22-20-08891.2002.
- [20] Virginia Borroni y Francisco J. Barrantes. «Cholesterol Modulates the Rate and Mechanism of Acetylcholine Receptor Internalization». En: *Journal of Biological Chemistry* 286.19 (2011), págs. 17122-17132. DOI: 10.1074/jbc.M110.211870.
- [21] V. Borroni y col. «Cholesterol depletion activates rapid internalization of submicron-sized acetylcholine receptor domains at the cell membrane». En: *Molecular Membrane Biology* 24.1 (2007), págs. 1-15. DOI: 10.1080/09687860600903387.
- [22] Gonzalo Almarza, Francisco Sánchez y Francisco J. Barrantes. «Transient Cholesterol Effects on Nicotinic Acetylcholine Receptor Cell-Surface Mobility». En: *PLoS ONE* 9.6 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0100346.
- [23] *HyperPhysics*. HyperPhysics.
- [24] Steffen J. Sahl, Stefan W. Hell y Stefan Jakobs. «Fluorescence nanoscopy in cell biology». En: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18.11 (sep. de 2017), págs. 685-701. DOI: 10.1038/nrm.2017.71.

- [25] Thomas S. van Zanten y Satyajit Mayor. «Current approaches to studying membrane organization». En: *F1000Research* 4 (nov. de 2015), pág. 1380. DOI: 10.12688/f1000research.6868.1.
- [26] M. Bates y col. «Multicolor Super-Resolution Imaging with Photo-Switchable Fluorescent Probes». En: *Science* 317.5845 (sep. de 2007), págs. 1749-1753. DOI: 10.1126/science.1146598.
- [27] Santosh Adhikari y col. «Single-molecule localization microscopy and tracking with red-shifted states of conventional BODIPY conjugates in living cells». En: *Nature Communications* 10.1 (jul. de 2019), pág. 3400. DOI: 10.1038/s41467-019-11384-6. URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-11384-6>.
- [28] Michael J Rust, Mark Bates y Xiaowei Zhuang. «Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)». En: *Nature Methods* 3.10 (2006), págs. 793-796. DOI: 10.1038/nmeth929.
- [29] Jonas Fölling y col. «Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return». En: *Nature Methods* 5.11 (2008), págs. 943-945. DOI: 10.1038/nmeth.1257.
- [30] Sabine Couturier y col. «A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (α 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by α -BTX». En: *Neuron* 5.6 (1990), págs. 847-856. DOI: 10.1016/0896-6273(90)90344-f.
- [31] C.d. Dellisanti y col. «Crystal structure of the extracellular domain of the nicotinic acetylcholine receptor 1 subunit bound to α -bungarotoxin at 1.9 Å resolution». En: (2007). DOI: 10.2210/pdb2qc1/pdb.
- [32] National Institutes of Health. «ImageJ». En: (). DOI: <https://imagej.nih.gov/ij/>.
- [33] Martin Ovesný y col. «ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging». En: *Bio-*

- informatics* 30.16 (2014), págs. 2389-2390. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu202.
- [34] Russell E. Thompson, Daniel R. Larson y Watt W. Webb. «Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes». En: *Biophysical Journal* 82.5 (2002), págs. 2775-2783. DOI: 10.1016/s0006-3495(02)75618-x.
- [35] Fang Huang y col. «Simultaneous multiple-emitter fitting for single molecule super-resolution imaging». En: *Biomedical Optics Express* 2.5 (2011), pág. 1377. DOI: 10.1364/boe.2.001377.
- [36] Peter Dedecker y col. «Localizer: fast, accurate, open-source, and modular software package for superresolution microscopy». En: *Journal of Biomedical Optics* 17.12 (2012), pág. 126008. DOI: 10.1117/1.jbo.17.12.126008.
- [37] WaveMetrics. «Igor Pro». En: (). DOI: <https://www.wavemetrics.com>.
- [38] Paolo Annibale y col. «Quantitative Photo Activated Localization Microscopy: Unraveling the Effects of Photoblinking». En: *PLoS ONE* 6.7 (2011). DOI: 10.1371/journal.pone.0022678.
- [39] H. E. Lu y col. «Multiple Spatial and Kinetic Subpopulations of CaMKII in Spines and Dendrites as Resolved by Single-Molecule Tracking PALM». En: *Journal of Neuroscience* 34.22 (2014), págs. 7600-7610. DOI: 10.1523/jneurosci.4364-13.2014.
- [40] Gonzalo Almarza, Francisco Sanchez y Francisco J. Barrantes. «Transient Cholesterol Effects on Nicotinic Acetylcholine Receptor Cell-Surface Mobility». En: *PLoS ONE* 9.6 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0100346.
- [41] Yonatan Golan y Eilon Sherman. «Resolving mixed mechanisms of protein subdiffusion at the T cell plasma membrane». En: *Nature Communications* (2017). DOI: 10.1038/ncomms15851.
- [42] A. M. Roccamo y col. «Cells defective in sphingolipids biosynthesis express low amounts of muscle nicotinic acetylcholine receptor». En: *European Jour-*

- nal of Neuroscience* 11.5 (1999), págs. 1615-1623. DOI: 10.1046/j.1460-9568.1999.00574.x.
- [43] R.r. Kellner y col. «Nanoscale organization of nicotinic acetylcholine receptors revealed by stimulated emission depletion microscopy». En: *Neuroscience* 144.1 (2007), págs. 135-143. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.08.071.
- [44] Leonid Andronov y col. «ClusterViSu, a method for clustering of protein complexes by Voronoi tessellation in super-resolution microscopy». En: *Scientific Reports* 6.1 (2016). DOI: 10.1038/srep24084.
- [45] Florian Levet y col. «SR-Tesseler: a method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data». En: *Nature Methods* 12.11 (2015), págs. 1065-1071. DOI: 10.1038/nmeth.3579.
- [46] Daniel J. Nieves y Dylan M. Owen. «Analysis methods for interrogating spatial organisation of single molecule localisation microscopy data». En: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 123 (2020), pág. 105749. DOI: 10.1016/j.biocel.2020.105749.
- [47] Masaharu Tanemura. «Statistical distributions of Poisson Voronoi cells in two and three dimensions». En: *Forma* (2003), págs. 221-247.
- [48] Douglas S. Martin, Martin B. Forstner y Josef A. Käs. «Apparent Subdiffusion Inherent to Single Particle Tracking». En: *Biophysical Journal* 83.4 (2002), págs. 2109-2117. ISSN: 0006-3495. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)73971-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73971-4). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349502739714>.
- [49] Ralf Metzler y col. «Anomalous diffusion models and their properties: non-stationarity, non-ergodicity, and ageing at the centenary of single particle tracking». En: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16.44 (2014), págs. 24128-24164. DOI: 10.1039/c4cp03465a.

- [50] Aleksander Weron y col. «Ergodicity breaking on the neuronal surface emerges from random switching between diffusive states». En: *Scientific Reports* 7.1 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-05911-y.
- [51] Claire Wilhelm. «Out-of-Equilibrium Microrheology inside Living Cells». En: *Phys. Rev. Lett.* 101 (2 jul. de 2008), pág. 028101. DOI: 10.1103/PhysRevLett.101.028101. URL: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.101.028101>.
- [52] Nilah Monnier, Syuan-Ming Guo y col. «Bayesian Approach to MSD-Based Analysis of Particle Motion in Live Cells». En: *Biophysical Journal* 103.3 (2012), págs. 616-626. DOI: 10.1016/j.bpj.2012.06.029.
- [53] Luciana Bruno y col. «Transition to superdiffusive behavior in intracellular actin-based transport mediated by molecular motors». En: *Physical Review E* 80 (ago. de 2009), pág. 011912. DOI: 10.1103/PhysRevE.80.011912.
- [54] C. Metzner y col. «Simple model of cytoskeletal fluctuations». En: *Physical Review E* 76.2 (2007). DOI: 10.1103/physreve.76.021925.
- [55] Xavier Michalet. «Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error: Brownian motion in an isotropic medium». En: *Phys. Rev. E* 82 (4 oct. de 2010), pág. 041914. DOI: 10.1103/PhysRevE.82.041914. URL: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.82.041914>.
- [56] Carlos J. Baier y col. «Cholesterol modulation of nicotinic acetylcholine receptor surface mobility». En: *European Biophysics Journal* 39.2 (2009), págs. 213-227. DOI: 10.1007/s00249-009-0521-2.
- [57] Irena Levitan y Manuela A Ayee. «Paradoxical impact of cholesterol on lipid packing and cell stiffness». En: *Frontiers in Bioscience* 21.6 (2016), págs. 1245-1259. DOI: 10.2741/4454.
- [58] Songwan Jin, Peter M. Haggie y A.s. Verkman. «Single-Particle Tracking of Membrane Protein Diffusion in a Potential: Simulation, Detection, and

- Application to Confined Diffusion of CFTR Cl⁻ Channels». En: *Biophysical Journal* 93.3 (2007), págs. 1079-1088. DOI: 10.1529/biophysj.106.102244.
- [59] Inhee Chung y col. «Spatial control of EGF receptor activation by reversible dimerization on living cells». En: *Nature* 464.7289 (2010), págs. 783-787. DOI: 10.1038/nature08827.
- [60] Raibatak Das, Christopher W. Cairo y Daniel Coombs. «A Hidden Markov Model for Single Particle Tracks Quantifies Dynamic Interactions between LFA-1 and the Actin Cytoskeleton». En: *PLoS Computational Biology* 5.11 (nov. de 2009). Ed. por RamaEditor Ranganathan, e1000556. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000556.
- [61] Christopher W. Cairo y col. «Dynamic Regulation of CD45 Lateral Mobility by the Spectrin-Ankyrin Cytoskeleton of T Cells». En: *Journal of Biological Chemistry* 285.15 (feb. de 2010), págs. 11392-11401. DOI: 10.1074/jbc.M109.075648.
- [62] Fredrik Persson y col. «Extracting intracellular diffusive states and transition rates from single-molecule tracking data». En: *Nature Methods* 10.3 (feb. de 2013), págs. 265-269. DOI: 10.1038/nmeth.2367.
- [63] H. Y. Park y col. «Visualization of Dynamics of Single Endogenous mRNA Labeled in Live Mouse». En: *Science* 343.6169 (2014), págs. 422-424. DOI: 10.1126/science.1239200.
- [64] Nilah Monnier, Zachary Barry y col. «Inferring transient particle transport dynamics in live cells». En: *Nature Methods* 12.9 (jul. de 2015), págs. 838-840. DOI: 10.1038/nmeth.3483.
- [65] Dimitri P Bertsekas y John N Tsitsiklis. *Introduction to probability*. Athena Scientific, Cop, 2002, Chapter 7, Markov Chains. ISBN: 9781886529403.
- [66] George Holzwarth y col. «Vesicular stomatitis virus nucleocapsids diffuse through cytoplasm by hopping from trap to trap in random directions». En: *Scientific Reports* 10.1 (jun. de 2020). DOI: 10.1038/s41598-020-66942-6.

- [67] J. Kwik y col. «Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.24 (nov. de 2003), págs. 13964-13969.
DOI: 10.1073/pnas.2336102100.

Tesis disponible bajo Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial
– Compartir Igual (by-nc-sa) 2.5 Argentina
Buenos Aires, 2021