



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

MODELOS SIMPLES PARA LA SECRECIÓN  
SOMÁTICA DE SEROTONINA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

FÍSICO

PRESENTA:

ALDO LEDESMA DURÁN

TUTOR:

IVÁN SANTAMARÍA HOLEK



2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A mis padres*

# Agradecimientos

Debo agradecer a Iván Santamaría Holec por su ayuda en la gestación, desarrollo y discusión de las ideas de este trabajo. Cualquier virtud de los modelos físicos aquí presentados se debe a él.

Además, deseo dar un agradecimiento a Felipe de Castillo, Jaqueline Quintana y Karo Michaelian por sus valiosos comentarios. De manera especial, debo mi eterna gratitud a Hortensia González Gómez y al Profesor Rosalío Rodríguez Zepeda por el gran enriquecimiento que dieron a esta tesis.

Este trabajo fue llevado con el patrocinio del proyecto PAPIT-IN108006 del CONACYT y la UNAM.

*Aldo Ledesma Durán*  
Ciudad de México, primavera del 2008.

# Índice general

<b>I</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>Evidencia experimental</b>	<b>3</b>
1.1.	Experimentos de secreción de serotonina en células Retzius . . .	3
1.1.1.	La serotonina en neuronas de Retzius . . . . .	3
1.1.2.	Experimentos basados en fluorescencia . . . . .	5
1.2.	Los motores moleculares . . . . .	9
1.2.1.	Características principales . . . . .	9
1.2.2.	Funcionamiento de la quinesina . . . . .	10
1.3.	Difusión en presencia de motores moleculares y microtúbulos .	12
1.3.1.	Difusión y movimiento browniano . . . . .	12
1.3.2.	Motores moleculares como trinquetes . . . . .	14
1.3.3.	Difusión en presencia de redes poliméricas similares a microtúbulos . . . . .	16
<b>2.</b>	<b>Procesos estocásticos</b>	<b>19</b>
2.1.	Planteamiento de Langevin . . . . .	19
2.1.1.	Supuestos del planteamiento . . . . .	19
2.1.2.	Teoremas de Fluctuación-Disipación . . . . .	21
2.2.	Ecuación de Fokker-Planck . . . . .	23
2.2.1.	La ecuación de FP y su relación con la ecuación de Langevin . . . . .	23
2.2.2.	La partícula libre. . . . .	24
2.3.	Carácter no markoviano . . . . .	26
2.3.1.	El oscilador armónico . . . . .	26
2.3.2.	Procesos con memoria . . . . .	28

<b>II</b>	<b>Desarrollo</b>	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>Modelo 1: Balance de fuerzas armónicas</b>	<b>33</b>
3.1.	Introducción. . . . .	33
3.2.	Hipótesis en las que se fundamenta el modelo . . . . .	35
3.2.1.	Necesidad de una ecuación de FP . . . . .	35
3.2.2.	Carácter no markoviano y el coeficiente de arrastre efectivo $\beta(t)$ . . . . .	36
3.2.3.	Fuerzas armónicas a las que está sujeta la vesícula . . . . .	37
3.2.4.	El parámetro $\epsilon$ . . . . .	38
3.3.	Solución de la ecuación de FP. . . . .	38
3.4.	Aproximación a tiempos cortos. . . . .	41
3.5.	Incremento de la fluorescencia . . . . .	42
3.6.	Comparación con experimentos . . . . .	44
3.6.1.	Modelo 1 aplicado a las células control . . . . .	44
3.6.2.	Modelo 1 aplicado a las células dopadas con colchicina . . . . .	46
<b>4.</b>	<b>Modelo 2: Motores como resortes que se trasladan</b>	<b>51</b>
4.1.	Hipótesis del modelo 2 y solución de la ecuación de FP . . . . .	51
4.2.	Comparación con los experimentos . . . . .	54
<b>III</b>	<b>Análisis</b>	<b>57</b>
<b>5.</b>	<b>Discusión de los Resultados</b>	<b>59</b>
5.1.	Comparación entre ambos modelos . . . . .	59
5.2.	Relación con otros modelos . . . . .	68
5.3.	Perspectivas . . . . .	71
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>73</b>

# Resumen de la tesis

Se propusieron y analizaron dos modelos para explicar la cinética de los cambios de la intensidad de fluorescencia en experimentos llevados a cabo con células Retzius. Experimentos biológicos han mostrado que la exocitosis de serotonina en estas neuronas está mediada por motores moleculares. La esencia de nuestros modelos es acoplar el movimiento aleatorio realizado por las vesículas al difundirse en la célula, con la fuerza ejercida por los motores moleculares. La descripción de la dinámica de las vesículas de serotonina se realiza usando una ecuación de Fokker-Planck que contiene un término de arrastre; éste contiene la fuerza que los motores ejercen sobre las vesículas. La fuerza es modelada de dos maneras: en un primer modelo suponemos que la acción del motor es semejante a la de un campo de fuerzas armónicas, mientras que en el segundo caso, hemos modelado al motor como un resorte en traslación que jala a las vesículas hacia la membrana. Ambos modelos permiten describir la cinética de la exocitosis de serotonina con el ajuste de un sólo parámetro que mide la intensidad de la fuerza ejercida por el motor: la frecuencia. Se relaciona este trabajo con otros modelos que le permitan asentar los valores obtenidos para dicho parámetro para futuros trabajos.

## Disposición de la tesis

La tesis está organizada de la manera siguiente:

La primera parte está dedicada a poner en contexto el problema de nuestro interés. El capítulo 1 resume toda la evidencia experimental relacionada con la secreción somática de serotonina. En la sección (1.1) se presentan los experimentos en células Retzius que pretendemos modelar y el papel que juegan los motores moleculares. En la sección (1.2) se explica cómo funciona un motor molecular con base en la evidencia existente, y por último, la sección (1.3) sirve de transición con el siguiente capítulo: presenta la relación entre los motores moleculares y el citoesqueleto, con el movimiento browniano y los procesos difusivos. El segundo capítulo de la tesis bosqueja la teoría de procesos estocásticos necesaria para plantear las ecuaciones de Fokker-Planck. En la sección (2.1) se presenta la teoría de procesos estocásticos desde el enfoque de Langevin. En la sección (2.2) se plantea la ecuación de Fokker-Planck y su relación con la ecuación de Langevin. Finalmente, en la sección (2.3) se estudia la propiedad de Markov para un proceso estocástico y se presenta la ecuación de Fokker-Planck no markoviana.

La segunda parte de la tesis está dedicada a la exposición de nuestros dos modelos usados para describir la secreción somática de serotonina. En los capítulos 3 y 4 se exponen el primer y segundo modelo, respectivamente, las hipótesis de cada planteamiento, la solución analítica de la ecuación de Fokker-Planck correspondiente y sus resultados.

La tercera parte analiza los resultados obtenidos de ambos modelos. El capítulo 5 discute y compara ambos modelos, además de la relación de éstos con otros experimentos. Finalmente, el capítulo 6, presenta las conclusiones.



# Parte I

## Introducción

# Capítulo 1

## Evidencia experimental

### 1.1. Experimentos de secreción de serotonina en células Retzius

#### 1.1.1. La serotonina en neuronas de Retzius

La **serotonina** es una sustancia que participa en la comunicación nerviosa entre muchos tipos neuronales, sirviendo ya como **neurotransmisor**<sup>1</sup>, o como neuromodulador<sup>2</sup>. En diversas especies animales, la serotonina juega un papel importante en múltiples funciones fisiológicas y conductuales, como por ejemplo el sueño, la alimentación, la regulación de ritmos biológicos, trastornos conductuales, etc.. A pesar de esto, sorprende que la proporción de neuronas que la contienen en el sistema nervioso es muy baja, al igual que las conexiones sinápticas que la utilizan como mensajero.

En organismos como la sanguijuela, a diferencia de la **sinapsis**, donde los neurotransmisores se liberan ante la estimulación eléctrica, se ha descubierto que la serotonina puede ser secretada del soma celular. La secreción somática a diferencia de la sináptica ocurre más lentamente y libera mayor cantidad de neurotransmisor.

Estas observaciones han motivado la realización de experimentos que revelen la dinámica de la serotonina en el interior de una neurona [1]. Estos experimentos se realizan en **neuronas de Retzius**, que son células que contienen más del 50% de la dopamina presente en especies como la san-

---

<sup>1</sup>Mensajero químico entre neuronas

<sup>2</sup>Regulador de la integración sináptica cuando se encuentra en el medio extracelular.

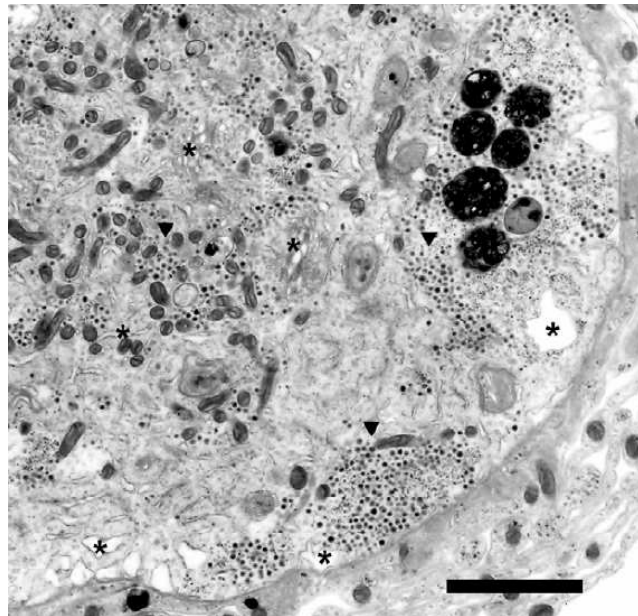


Figura 1.1: Micrografía de una neurona de Retzius. Antes de la estimulación, los cúmulos vesiculares (cabezas de flecha) y el retículo endoplásmico (asterisco) se encuentran a distintas distancias de la membrana. La barra mide  $2\mu\text{m}$ . Tomado de [1].

güijuela. Estas células pueden ser manipuladas en el laboratorio (*in vitro*) para mantenerlas en condiciones similares a las del ganglio (*in vivo*). En estos experimentos se extraen las neuronas Retzius de una sangüijuela y se activa la secreción de serotonina de su interior, ya sea poniendo la célula en presencia de cafeína, o mediante la aplicación de un protocolo de impulsos eléctricos. Los resultados proceden de micrografías de la célula, y de métodos de fluorescencia de la membrana celular que se explicarán en la siguiente sección.

En cuanto a la información de las micrografías se sabe lo siguiente. En reposo (es decir, antes de la aplicación de cafeína o la estimulación eléctrica), las vesículas<sup>3</sup> se encuentran alejadas a distintas distancias de la membrana celular, formando cúmulos plasmáticos de la membrana celular (Figura 1.1). Sin embargo, una vez ocurrido alguno de los procesos de activación, las vesículas aparecen adyacentes a la membrana (Figura 1.2) sugiriendo se ha llevado a cabo la **exocitosis**<sup>4</sup>[5]. La evidencia micrográfica también revela que la movilización de los cúmulos vesiculares depende del citoesqueleto. En particular

<sup>3</sup>Bolsas de membrana donde está contenido el neurotransmisor; en este caso, la serotonina.

<sup>4</sup>Proceso celular por el cual las vesículas situadas en el citoplasma se fusionan con

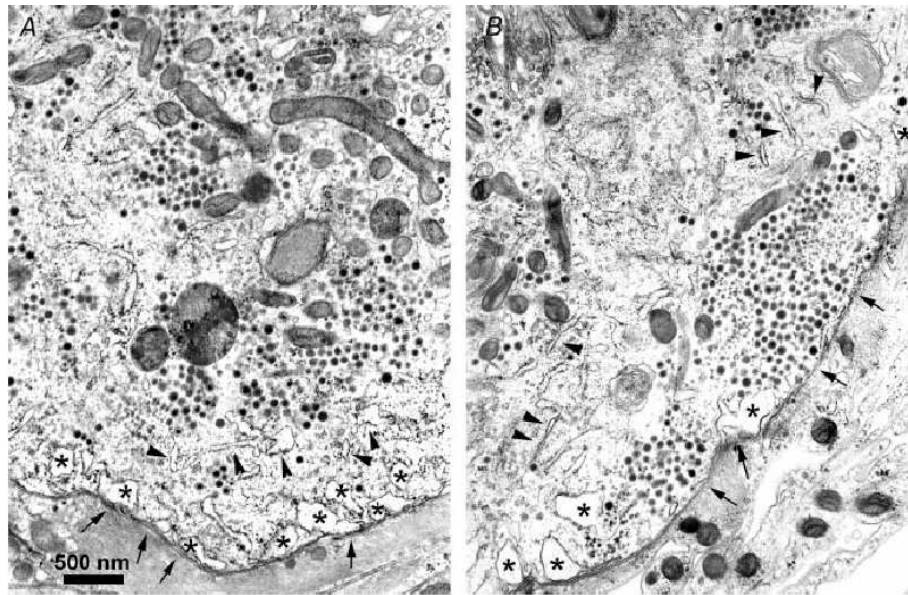


Figura 1.2: Micrografía del soma de una neurona Retzius. A) La disposición de los cúmulos de vesículas sin estimulación eléctrica es lejana a la membrana (flechas); B) Al estimular eléctricamente a 20Hz, aparecen adyacentes a la membrana y rodeados de retículo endoplásmico (asterísco). Tomado de [1].

se observaron vesículas cercanas a manojos de fibras de proteínas de grosor similar al de los **microtúbulos**<sup>5</sup> (Figura 1.3). Lo anterior sugirió la participación de los **motores moleculares**<sup>6</sup> en el transporte de las vesículas, hecho que confirman los experimentos basados en fluorescencia.

### 1.1.2. Experimentos basados en fluorescencia

Esta técnica consiste en incubar durante algún tiempo la célula de Retzius con un colorante que sólo fluoresce en contacto con la membrana celular.

---

la membrana citoplasmática, liberando su contenido. Esto sucede cuando llega una señal extracelular (en nuestro caso particular, cafeína o estimulación eléctrica).

<sup>5</sup>Los microtúbulos son estructuras tubulares de 25 nm de diámetro exterior y unos 12 nm de diámetro interior, con longitudes que varían entre unos pocos nanómetros a micrómetros, que se originan en los centros organizadores de microtúbulos y que se extienden a lo largo de todo el citoplasma. Se hallan en las células eucariotas y están formadas por la polimerización de un dímero de dos proteínas globulares, la alfa y la beta tubulina [4].

<sup>6</sup>De manera preliminar, un motor molecular es una proteína dimérica que “camina” a lo largo de los microtúbulos y que es capaz de transportar organelos en el interior de las células. El siguiente capítulo está dedicado a ellos.

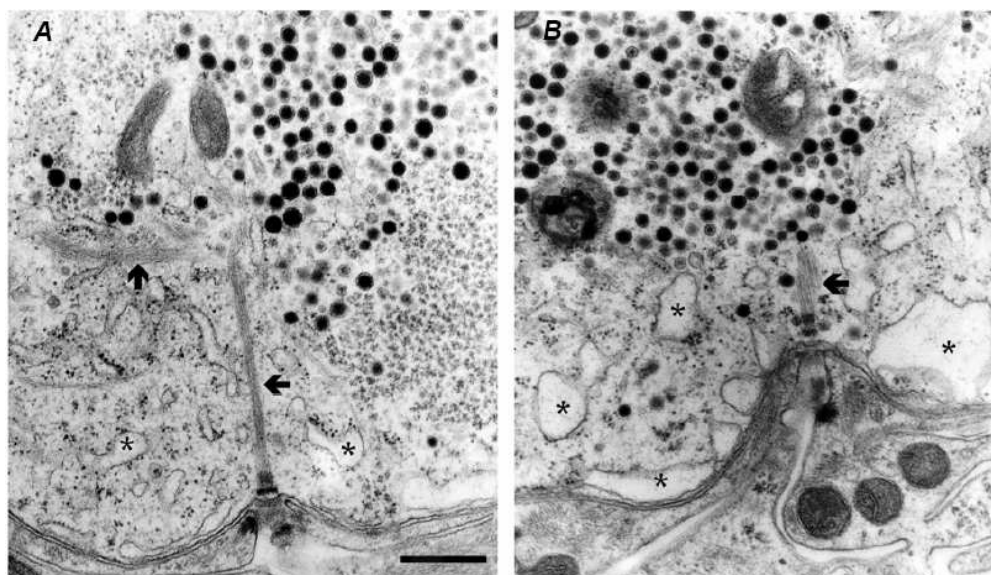


Figura 1.3: Se observan estructuras fibrilantes en neuronas de Retzius estimuladas a 1Hz (A) y a 20Hz (B), formando un sitio activo para la exocitosis. Flechas, microtúbulos; asterisco, Retículo endoplásmico. La barra mide 400nm. Tomado de [1].

Cuando las vesículas que secretan serotonina se fusionan con la superficie de la membrana, aumenta su superficie, y por ende, su fluorescencia  $\phi(t)$  (Figura 1.4). Ésta es cuantificada mediante instrumentos ópticos y registrada como función del tiempo una vez que se activan el proceso de la secreción. Los resultados de éstas pruebas realizadas en los laboratorios del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y sus conclusiones pueden resumirse de la siguiente manera [1]:

1) En 7 células control, donde la activación se realizó aplicando estímulos eléctricos, se encontró que el primer tren de impulsos provocó una ráfaga de potenciales de acción que aumentaron la fluorescencia rápidamente. El resultado de los impulsos eléctricos es abrir los canales iónicos de la célula y permitir la entrada de  $Ca^{+}$  extracelular, activando los motores e iniciando el transporte de vesículas hacia la membrana, y por tanto, el proceso de secreción de la serotonina. Al fusionarse las vesículas a la membrana celular, se incrementa la fluorescencia hasta llegar a un punto de saturación alrededor del cuarto tren de pulsos. Esta saturación se debe a que el número de vesículas es limitado. A diferencia de los procesos con cafeína y colchicina<sup>7</sup>,

<sup>7</sup>De aquí en lo venidero, referiremos al “proceso activado mediante la aplicación de cafeína” simplemente como el “proceso de la cafeína”, y designaremos a “las células donde la activación se hizo mediante la aplicación de cafeína” simplemente como las “células con cafeína”. Lo mismo para el proceso de la colchicina y de impulsos eléctricos. Esto es con el único propósito de facilitar y agilizar la discusión.

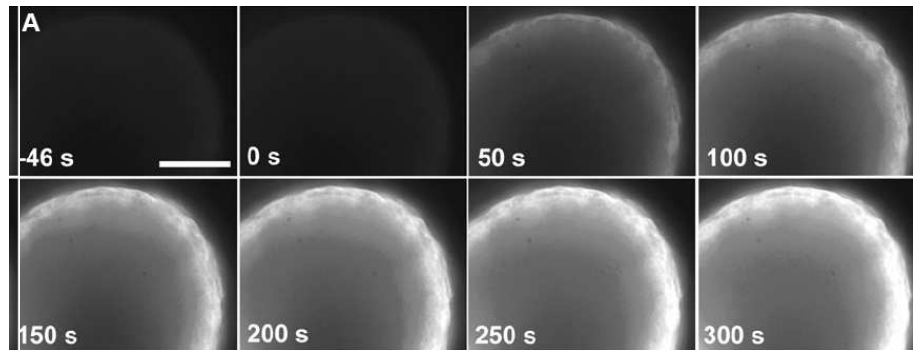


Figura 1.4: Imágenes instantáneas de la cinética de fluorescencia para el caso de la estimulación por cafeína. A partir de que se activa la liberación de calcio ( $t = 0$ ), las vesículas que secretan serotonina arriban a la membrana y se adhieren, aumentando el tamaño de la membrana, y por ende, su fluorescencia. Tomado de [1].

estas muestras exhiben una gran variabilidad unas respecto de otras, revelando una alta sensibilidad de la célula a la forma de la estimulación (Ver Figura(1.5)).

2) En 4 células control donde la activación fue inducida por la aplicación de **cafeína**<sup>8</sup> en el medio extracelular, se encontró que la fluorescencia se incrementaba rápidamente, mostrando entre ellas una respuesta similar. La acción de la cafeína es promover la liberación de  $Ca^{+}$  en el interior de la célula activando así a los motores. Estas pruebas demuestran que hay una gran cantidad de  $Ca^{+}$  en el interior de la célula, pues sólo así se podía esperar respuestas homogéneas.

3) En ocho células que antes de la estimulación eléctrica fueron tratadas con el fármaco colchicina, se encontró que la fluorescencia se incrementaba lentamente respecto a las que no fueron tratadas con el fármaco.

La **colchicina** es un fármaco que inhibe la polimerización de los microtúbulos y disminuye la agregación de más dímeros de tubulina, provocando la desintegración de los microtúbulos. Dado que la actividad de los motores moleculares depende de la presencia de las redes poliméricas formadas por los microtúbulos, la disminución de la fluorescencia cuando éstos se han despolimerizado, revela que son los motores moleculares los que guían a las vesículas en su proceso de secreción. El aumento escaso en la fluores-

<sup>8</sup>La cafeína es un compuesto alcaloide que actúa como estimulante del sistema nervioso central, el cual es capaz de quitar la somnolencia y restaurar el nivel de alerta. La cafeína lleva a cabo estas funciones liberando los neurotransmisores de las células neuronales.

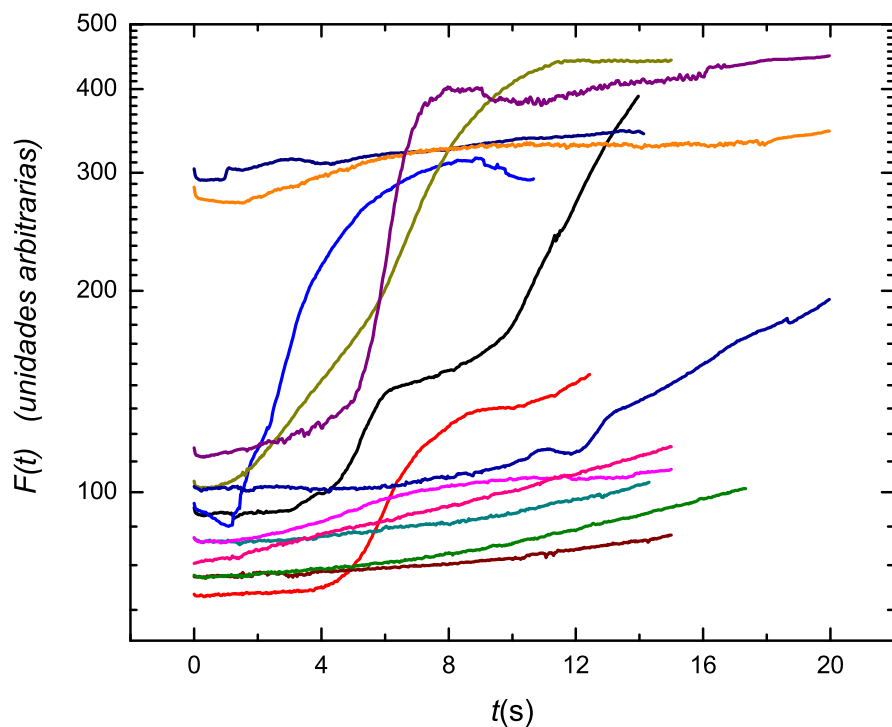


Figura 1.5: Cinética de fluorescencia para las células control. El comportamiento de las muestras es muy distinto entre sí, revelando la alta sensibilidad de las células a la forma de la estimulación. El tiempo está en segundos.

encia se debe a que la despolimerización no es completa, y algunas vesículas logran llegar a la membrana.

En conclusión, los experimentos en células Retzius revelan la importancia de los motores moleculares en la secreción de la serotonina. Por ende, para entender la dinámica de la secreción, es necesario comprender mejor funcionamiento de un motor molecular. Esto se hará en la siguiente sección.

## 1.2. Los motores moleculares

En esta sección hacemos un breve resumen de las características principales de los motores moleculares procesivos para familiarizar al lector con sus características y su funcionamiento.

### 1.2.1. Características principales

Un motor molecular es una molécula capaz de transportar organelos y vesículas en el interior de la célula desplazándose a lo largo de largas cadenas proteínicas<sup>9</sup>. Los motores citoesqueléticos constan de dos subunidades protéicas que se sujetan alternadamente al citoesqueleto (llamadas *cabezas*), una cadena capaz de cambiar de configuración para optimizar la caminata (*cuello enlazador*) y una cadena más larga en forma de espiral que une a las cabezas con la carga que transporta, conocida como *tronco* (Figura 1.6). En presencia de ATP y de calcio, los motores moleculares son capaces de transportar su carga durante varios nanómetros con una alta **procesividad** [4]<sup>10</sup>.

Un ejemplo de motor molecular es la **miosina V**. La miosina es una proteína alargada que puede desplazarse a través de filamentos de actina. Experimentalmente, en pruebas de **motilidad molecular**, se observa que un solo par de moléculas de miosina y actina son capaces de generar una fuerza y desplazarse. Dicho experimento consiste en colocar una esfera adherida a una lámina de vidrio y rodearla de una solución que contiene moléculas de miosina separadas periódicamente. Por encima de la esfera hay un filamento de actina cuyas puntas penden de pinzas ópticas. Al agregar ATP, el filamento de actina es jalado por las moléculas de miosina, y dado que éstas están fijas, el filamento es jalado en pasos discretos en una dirección definida, y se aleja de la posición inicial definida por las trampas ópticas (Figura 1.7). La fuerza

---

<sup>9</sup>En la actualidad ya se conocen varios tipos de motores moleculares con movimientos muy diferentes a la procesividad lineal de los motores presentados en esta sección conocidos como motores **citoesqueléticos**, por su relación con los microtúbulos. Así por ejemplo, existen los motores de **polimerización** que no se impulsan sobre riel alguno y que en vez de caminar, se encogen y extienden alternadamente. También existen motores **rotatorios** que sirven para la propulsión de la célula y **proteínas G** que utilizan el ribosoma como brazo de palanca en el desplazamiento de RNA's [4]. En este trabajo nos concentraremos en el entendimiento de los motores lineales (citoesqueléticos) como la quinesina.

<sup>10</sup>Esto significa que son capaces de dar muchos pasos (alrededor de 100) antes de desprenderse del citoesqueleto.



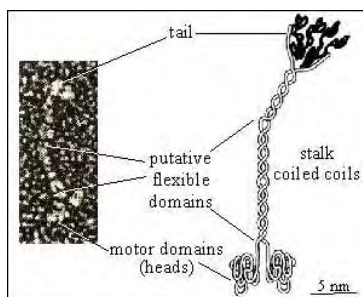


Figura 1.6: Estructura básica de un motor molecular: tallo (con el que sujeta al organelo); tronco (enredado en forma de espiral); el cuello enlazador (estructuras que conectan el tronco con las cabezas y que cambian de configuración para facilitar la caminata), y las cabezas de motor (con las que se enlaza el motor al microtúbulo).

macroscópica ejercida por los músculos tiene origen en este motor molecular.

Los motores moleculares resultan sumamente importantes en el comportamiento celular. Por ejemplo, se sabe que mutaciones en este tipo de proteínas están relacionadas con enfermedades neurológicas y sordera. Además, estudios genómicos y funcionales revelan que toda la complejidad de los motores moleculares de organismos más elevados procede de combinaciones y ligeras alteraciones genéticas de los sólo 5 motores moleculares de eucariotes primitivos, por lo que su estudio podría revelar nuevas estrategias de evolución [3].

### 1.2.2. Funcionamiento de la quinesina

Otro ejemplo importantísimo de motor molecular es el de la **quinesina**. La quinesina convencional (o bicéfala) es un homodímero <sup>11</sup> cuya estructura le permite desplazarse a lo largo de microtúbulos con una alta eficacia. Para ello, la quinesina desengancha alternadamente a una de sus cabezas mientras la otra efectúa un paso. Mediante técnicas de interferometría, se ha logrado determinar que la longitud del paso de la quinesina es de 8.3nm. Ésta es justamente la distancia que existe entre los centros de unión consecutivos entre quinesina y microtúbulo [2] <sup>12</sup>. La velocidad promedio de un motor como estos es de  $800nm\ s^{-1}$ .

Otros experimentos muestran que esta “caminata” raramente retrocede.

<sup>11</sup>Es decir, una asociación de dos subunidades proteicas idénticas o dímeros.

<sup>12</sup>Estos sitios de unión son los únicos lugares donde ambas estructuras se pueden enlazar.

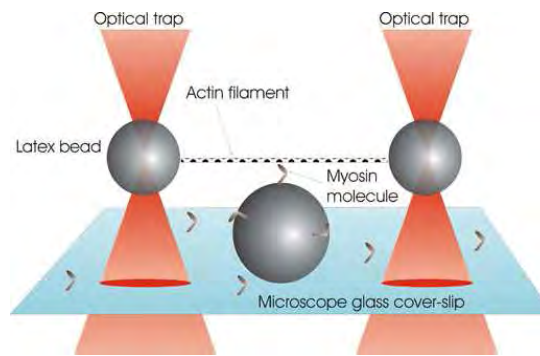


Figura 1.7: En pruebas de motilidad molecular es posible determinar la fuerza que ejerce un motor molecular como función del desplazamiento del filamento de actina.

Por cada molécula de ATP, la quinesina da un paso hacia adelante<sup>13</sup>, y éste es prácticamente independiente de la carga que transporta. La dirección de avance es determinada por la polaridad de los microtúbulos. Estos están formados por dos tipos diferentes de subunidades alternadas y orientadas en una sola dirección: la quinesina se mueve hacia el polo positivo. Otro motor molecular llamado dineína se mueve hacia el lado opuesto.

Estos elementos dan pie al modelo más aceptado sobre el funcionamiento de la quinesina (Figura 1.8). Inicialmente, la quinesina tiene sujeto al organelo, pero al no estar ligada al microtúbulo su movimiento es guiado puramente por movimiento browniano. En este estado, ambas cabezas del motor tienen ADP fuertemente ligado a ellas. Cuando alguna de las cabezas alcanza el sitio correcto de unión con el microtúbulo, se liga fuertemente liberando su ADP y casi de inmediato una molécula de ATP entra al sitio de unión entre el microtúbulo y la cabeza anclada. El ATP produce el golpe de potencia entre el cuello enlazador que jala del tallo del motor de tal manera que éste impulsa a la otra cabeza a moverse hacia adelante, cerca del siguiente punto de unión. Esto cuesta a la cabeza (ahora) posterior un fosfato que la deja de nuevo ligada a ADP. Mientras la cabeza posterior se separa lentamente del microtúbulo, la (nueva) cabeza delantera se liga al microtúbulo liberando su ADP, y recibiendo instantáneamente ATP y el ciclo se repite [3].

De este modo, la quinesina (el motor) logra avanzar procesivamente sobre el microtúbulo utilizando la energía disponible en forma de ATP transportando un organelo sobre él (la carga).

<sup>13</sup>A esto se le llama acoplamiento fuerte

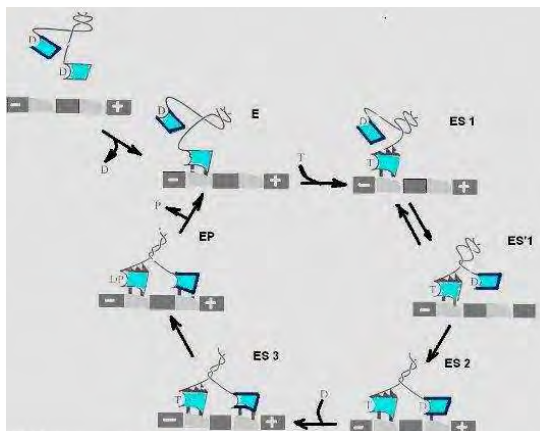


Figura 1.8: Modelo plausible para el movimiento dirigido de la quinesina bicéfala: el esquema de pasos sucesivos. Una vez anclada una de las cabezas al microtúbulo, ésta jala a la otra mediante el cuello enlazador hasta que puede alcanzar el siguiente punto de unión. Una vez que esto se logra, se intercambian los papeles. Estos procesos son llevados mediante la absorción y liberación sucesiva de fosfatos.

## 1.3. Difusión en presencia de motores moleculares y microtúbulos

### 1.3.1. Difusión y movimiento browniano

La **difusión** es un proceso espontáneo que consiste en el transporte de partículas de regiones de alta concentración hacia regiones de menor concentración.

Desde el punto de vista de la Física Estadística, la difusión es el resultado del **movimiento browniano**<sup>14</sup>. Este consiste en el movimiento aleatorio de una partícula **mesoscópica**<sup>15</sup> inmersa en un fluido. Para entender su mecanismo, hay que considerar que una molécula de un coloide experimenta alrededor de  $10^{11}$  colisiones por segundo por parte de las partículas del medio [12]. Por tanto, a la partícula se le transfiere impulso sobre su superficie; las

<sup>14</sup>Es necesario aclarar que en este trabajo usaremos el concepto de “movimiento browniano” de una manera más general que la que se le dió inicialmente para referir a los experimentos de Brown de 1827 y que fueron explicados por Einstein en 1905. Lo usamos como sinónimo de movimiento aleatorio de una partícula mesoscópica.

<sup>15</sup>La escala mesoscópica refiere a la escala en que uno puede estudiar un fenómeno o un material sin preocuparse por el movimiento detallado de los átomos individuales que lo conforman, pero teniendo en cuenta el efecto que las fluctuaciones térmicas tienen sobre él. Como tal, recae entre la escala macroscópica y la atómica, y su determinación depende del problema específico. Para fines prácticos, para la mayoría de los sólidos y líquidos, la escala es cercana a los nanómetros.

### 1.3 Difusión en presencia de motores moleculares y microtúbulos

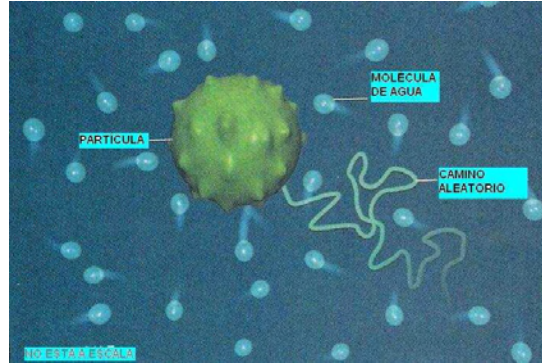


Figura 1.9: Imagen pictórica del movimiento browniano.

fluctuaciones térmicas del fluido que está en equilibrio térmico provocan que el golpeteo sobre la superficie de la partícula browniana no sea uniforme, lo que produce un desplazamiento neto que es posible detectar con ayuda de un microscopio (Figura 1.9).

Según esto, la explicación de la difusión es la siguiente: las moléculas que se difunden se moverán aleatoriamente entre áreas de alta y baja concentración, pero como hay más moléculas en la región de alta concentración (y por ende, mayor número de colisiones), más moléculas abandonarán esta región que las que abandonan la región de baja concentración. La consecuencia de esto es que habrá un movimiento neto de partículas a la región de baja concentración.

Si el fluido está en equilibrio termodinámico, la movilidad de las partículas está relacionada con las características del fluido a través del **coeficiente de difusión**  $D$  determinado mediante la **relación de Einstein**<sup>16</sup>

$$\langle(\Delta x)^2\rangle_x = 2D\tau \quad (1.1)$$

donde  $\langle(\Delta x)^2\rangle_x$  es el **desplazamiento cuadrático medio** (*MSD* por sus siglas en inglés) y  $\tau$  el tiempo que lleva la partícula difundiéndose. Este es un promedio sobre un ensemble de partículas brownianas inmersas en el mismo fluido y sujetas a las mismas condiciones iniciales. El coeficiente de difusión puede estimarse en términos de la temperatura  $T$  del fluido, la constante de Boltzmann  $k$ , su viscosidad  $\eta$  y el radio de la partícula  $a$  como

$$D = \frac{kT}{6\pi a\eta} \quad (1.2)$$

<sup>16</sup>El subíndice  $x$  representa a un promedio sobre el ensemble.

lo que indica que el desplazamiento promedio de las partículas será mayor cuanto más grande sea la temperatura, y se reducirá cuanto más viscoso sea el fluido y más grande sea la partícula [12].

### 1.3.2. Motores moleculares como trinquetes

En sistemas biológicos, la difusión es el mecanismo básico para el transporte pasivo de moléculas en el interior y exterior de una célula. Sin embargo, una gran parte del transporte molecular en sistemas biológicos no sólo ocurre por difusión sino también por el transporte activo de biomotores. Este tipo de **difusión activa** funciona a grandes rasgos como sigue. La carga transportada por el biomotor se encuentra en un medio fluido, por ello, sobre su superficie habrá un gran número de colisiones por parte de las moléculas del medio acuoso intracelular. Entonces, si la partícula cargada es de escala mesoscópica, llevará a cabo movimiento aleatorio. Sin embargo, a diferencia de un proceso difusivo libre (en el cual la partícula browniana no está sujeta a **fuerzas externas**<sup>17</sup>), la carga se encuentra ligada a un motor molecular. Por ello, podemos esperar que las partículas “carga” tienen además del movimiento aleatorio, un movimiento dirigido y una velocidad relacionada con la velocidad promedio del motor molecular.

Para considerar tanto el movimiento difusivo como el del arrastre, se ha propuesto que un biomotor funciona de manera similar a un dispositivo mecánico conocido como *ratchet* o trinquete molecular [4][8].

Un **trinquete** es un dispositivo microscópico (del orden de nm- $\mu$ m) que consiste de una varilla con una serie de clavijas a su alrededor (Figura 1.10). Cuando está inmerso en un medio fluido en condiciones de equilibrio térmico, el trinquete desarrollará movimiento browniano. Sin embargo, a diferencia de un ensemble de partículas brownianas cuya posición promedio es la posición original, ciertas condiciones pueden hacer que el trinquete avance de manera dirigida en una sola dirección. Por ejemplo, si las clavijas del trinquete tiene una cierta asimetría, habrá más colisiones y por ende, mayor desplazamiento hacia el lado de las clavijas que exhiban mayor superficie, produciendo un movimiento preferencial en una de las direcciones.

En realidad, la explicación detallada del funcionamiento de un trinquete es más complicada. La estructura asimétrica no es suficiente para convertir

---

<sup>17</sup>Con este término se enmarcan a cualquier fuerza que no provenga del movimiento *aleatorio* de las moléculas del medio fluido.

### 1.3 Difusión en presencia de motores moleculares y microtúbulos<sup>5</sup>

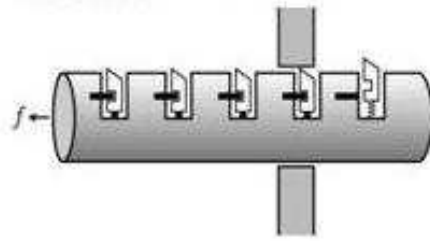


Figura 1.10: Un trinquete molecular supone un paisaje de energía periódico y asimétrico. La asimetría y la energía disponible les dan las condiciones para un movimiento aleatorio y dirigido. Esto sugiere que los motores moleculares funcionan de un modo similar.

energía interna almacenada en un movimiento unidireccional: la máquina no avanza si no tiene energía necesaria para hacerlo<sup>18</sup>. Para obtener trabajo útil a partir de una de estas máquinas hay que llevarla fuera del equilibrio termodinámico. Sólo basta decir que en el caso de los biomotores, la asimetría espacial necesaria está dada por la polaridad de los microtúbulos y la energía “externa” (no-térmica) proviene del ATP disponible en la célula [4].

A pesar de que en nuestro trabajo no usaremos el modelo de trinquete para describir un motor molecular, éste nos ayuda a entender los elementos básicos del modelo probabilístico necesario para su estudio. Uno puede pensar al organelo-carga como una partícula desarrollando movimiento browniano en presencia de un **paisaje de energía libre**<sup>19</sup> que favorece el movimiento hacia la región positiva del microtúbulo. Sin embargo, las fluctuaciones térmicas pueden dar lugar a movimientos retrógrados, haciendo que después de varios pasos hacia adelante, el organelo dé algunos pasos hacia atrás. Dada esta aleatoriedad de la trayectoria de cada organelo, es necesario considerar un **ensemble**<sup>20</sup> de ellos. Si uno coloca al tiempo inicial todas las partículas en la misma posición  $x_0$ , uno puede medir después de un cierto tiempo  $t$  el número de ellas que arriban a una posición alrededor de  $x$ . Dividiendo entre el número

---

<sup>18</sup>Si sólo bastara la asimetría espacial, uno podría doblar el trinquete sobre sí y conectar sus dos puntas convirtiéndolo en una máquina de movimiento perpetuo; en un sistema cerrado, ésta realizará trabajo sólo a partir de la energía térmica, enfriando por completo el sistema y disminuyendo la entropía del universo, lo cual viola la segunda ley de la termodinámica.

<sup>19</sup>Un paisaje de energía libre es una gráfica donde se muestra la energía potencial de la partícula browniana como función de la posición. Sin embargo, a diferencia de un proceso determinista donde la trayectoria de la partícula está determinada por la fuerza externa, en un paisaje de energía la partícula puede “deslizarse” sobre las barreras de potencial debido a la energía extra proporcionada por las fluctuaciones térmicas. Cuanto mayor sea la energía térmica del fluido y más pequeña sea la barrera de potencial, mayor probabilidad existe de que la partícula lo sobrepase, y viceversa.

<sup>20</sup>Un ensemble es un conjunto de muestras preparadas de igual manera, o en caso de un proceso estacionario, una muestra seguida en distintos tiempos.

total de partículas, uno encuentra la **distribución de probabilidad**  $P(x, t)$ . Esta función, como su nombre lo dice, cuantifica la distribución espacial más probable de las partículas como función del tiempo. Con ellas se puede obtener el comportamiento mayoritario (promedio) de las partículas y borra la información inútil de considerar todas las trayectorias al promediar sobre todas las muestras. Los métodos para buscar esta función son el objetivo del segundo capítulo de este trabajo.

### 1.3.3. Difusión en presencia de redes poliméricas similares a microtúbulos

Antes de plantear los métodos para arribar a la distribución de probabilidad (Capítulo 2), es necesario describir cómo la presencia de los microtúbulos afecta el proceso de difusión. Dada la importancia del citoesqueleto para muchos procesos intracelulares, aunada a la dificultad para hacer mediciones *in vivo* del mismo, se ha intentado elucidar las propiedades mecánicas del citoesqueleto en procesos difusivos estudiando movimiento browniano en redes de actina F <sup>21</sup> *in vitro*. En experimentos típicos [6], se estudia el proceso de difusión bajo los distintos casos posibles entre el radio  $a$  de la partícula browniana y el tamaño característico  $\xi$  de la red polimérica. Para ello, se forman redes a partir de la polimerización de actina G <sup>22</sup> con una longitud característica determinada por la concentración de actina<sup>23</sup>. La red se coloca en un medio acuoso donde es posible registrar las trayectorias de las partículas por métodos de videgrabación acoplados a un microscopio.

Los resultados experimentales muestran diferencias significativas en la dependencia temporal del MSD cuando se cambia el cociente  $a/\xi$ . En particular, se encontró que cuando  $a$  es menor o del orden de  $\xi$  (relación más común entre los organelos transportados y el citoesqueleto), el desplazamiento cuadrático promedio sigue una ley de potencias de la forma

$$\langle x^2(\tau) \rangle_x = D_{eff} \tau^\gamma \quad (1.3)$$

donde  $D_{eff}$  es un coeficiente de difusión efectivo y  $\gamma$  es el exponente que caracteriza la **subdifusión**. Además, se obtuvo que este exponente es una

---

<sup>21</sup>Actina filamentosa

<sup>22</sup>Actina globular.

<sup>23</sup>La longitud en micras está dada por  $\xi = 0.3/\sqrt{c_k}$ , donde  $c_k$  es la concentración de actina.

### 1.3 Difusión en presencia de motores moleculares y microtúbulos

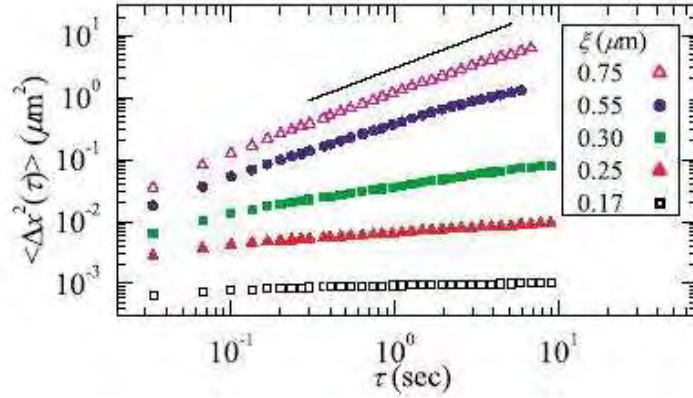


Figura 1.11: MSD de esferas de actina de  $a = 0.25\mu\text{m}$  para distintos parámetros de red  $\xi$ . La línea sólida indica el ajuste lineal. Imagen tomada de [6]

función de la razón  $a/\xi$ , y que su rango es de  $0 < \gamma < 1^{24}$  (Figura 1.11).

La figura (1.11) muestra los resultados experimentales para el MSD como función del tiempo. Es importante notar que la magnitud del MSD también cambia al cambiar el cociente  $a/\xi$ . Este resultado puede comprenderse si tenemos en cuenta que al difundirse en presencia de la red polimérica y de otras partículas, el coeficiente de difusión dado por (1.2) cambia debido a los efectos partícula-partícula, y partícula-pared [7]. Para una partícula esférica que se difunde alejada de dos paredes a distancias  $x_1$  y  $x_2$  el coeficiente de difusión se modifica como:

$$D' = D \left[ 1 - \frac{9a}{16} \left( \frac{1}{x_1} - \frac{1}{x_2} \right) \right],$$

mientras que para considerar la influencia de las otras partículas, el coeficiente de autodifusión se modifica como:

$$D'' = D \left( 1 - \frac{15}{4} \left( \frac{a}{r} \right)^4 + O(\rho^{-6}) \right),$$

donde  $r$  es la distancia de separación entre esferas.

La conclusión importante de esta sección es que el proceso difusivo de las partículas en la célula resulta del balance entre la fuerza ejercida por los motores, y la subdifusión debida a la presencia de los microtúbulos.

<sup>24</sup>En contraste a la difusión *normal* ( $\gamma = 1$ ) y la superdifusión dada por  $\gamma > 1$ .





# Capítulo 2

## Procesos estocásticos

### 2.1. Planteamiento de Langevin

#### 2.1.1. Supuestos del planteamiento

La ecuación de Langevin es una ecuación diferencial estocástica utilizada para describir la dinámica colectiva de un ensemble de partículas brownianas sujetas a una fuerza externa [13].

La primera hipótesis del planteamiento de Langevin es que se puede escribir la siguiente ecuación de movimiento (tipo Newton) para la partícula browniana

$$\frac{dv}{dt} = -\beta v + F(t), \quad (2.1)$$

donde el lado derecho de la ecuación contiene la fuerza ejercida por el fluido al ser considerado como medio continuo (ley de frenado de Stokes), y una fuerza instantánea<sup>1</sup>  $F(t)$  resultante de las colisiones de las moléculas del medio con la partícula browniana. Si se quisiese tratar el problema de manera exacta (al estilo de la dinámica clásica), se tendría que conocer con precisión la forma de esta fuerza neta  $F(t)$  en cada instante de tiempo. Para ello, no sólo sería necesario acoplar esta ecuación con cada una de las ecuaciones de movimiento de todas las moléculas del medio (del orden de  $\sim 10^{23}$  moléculas), sino que además sería necesario resolver para cada conjunto de condiciones iniciales separadamente. Dado que esto es impracticable, en lugar de tomar un sólo sistema e intentar resolverlo de manera *exacta*, en el enfoque de Langevin se

---

<sup>1</sup>Por conveniencia, todas las fuerzas consideradas en este trabajo se escriben por unidad de masa.

opta por considerar un ensemble de sistemas y tratar de encontrar resultados a partir de características promedio de la **fuerza estocástica de Langevin**  $F(t)$ .

En este sentido, la segunda hipótesis consiste en considerar que la fuerza neta ejercida en la partícula browniana por todas las moléculas del medio tiene, en cada tiempo, magnitudes y direcciones completamente aleatorias. Es decir, si promediamos sobre las realizaciones del ruido, entonces <sup>2</sup>

$$\langle F(t) \rangle_F = 0. \quad (2.2)$$

La tercera hipótesis en el planteamiento es que el promedio <sup>3</sup> de la fuerza estocástica a un tiempo no guarda ninguna relación con su valor a otros tiempos (se dice que no guardan ninguna **correlación**). Esto parece razonable en tanto las colisiones de la partícula con las moléculas del fluido son aproximadamente independientes unas de otras en tiempos distintos<sup>4</sup>. Así entonces, promediando sobre las realizaciones del ruido

$$\langle F(t)F(t') \rangle_F = q\delta(t - t'), \quad (2.3)$$

donde  $q$  es un coeficiente a determinar, y dependerá de las propiedades del sistema en equilibrio termodinámico y  $\delta$  es la función delta de Dirac. Esta hipótesis será buena en tanto el tiempo de relajación  $\tau = \beta^{-1}$  (es decir, el tiempo que le toma a la partícula perder la mayor parte de su velocidad inicial) sea mucho mayor al tiempo que duran las colisiones  $\tau_0$  <sup>5</sup>.

Si a las propiedades (2.2) y (2.3), le agregamos la condición de que el ruido  $F(t)$  es gaussiano, entonces se le llama **ruido blanco** o markoviano.

<sup>2</sup>El subíndice  $F$  representa al promedio sobre las realizaciones del ruido.

<sup>3</sup>Sobre las realizaciones del ruido.

<sup>4</sup>Esto significa a su vez que los momentos de las partículas del fluido en un instante  $t'$  están descorrelacionados de sus valores en  $t$  ( $t > t'$ ). Esto es válido sólo si los instantes "sucesivos" son suficientemente largos.

<sup>5</sup>De hecho, una mejor aproximación consistiría en asumir que el promedio de la fuerza a dos tiempos (su *correlación*) es nula para tiempos mayores al tiempo que dura la colisión  $\tau_0$

$$\langle F(t)F(t') \rangle_F = 0 \quad \text{para } |t - t'| \geq \tau_0$$

### 2.1.2. Teoremas de Fluctuación-Disipación

Para determinar el coeficiente  $q$  de la ecuación (2.3), se despeja  $v(t)$  de la ecuación (2.1) como si fuera una ecuación tipo Newton:

$$v(t) = v_0 e^{-\beta t} + \int_0^t F(t') e^{-\beta(t-t')} dt'. \quad (2.4)$$

Promediando sobre el ruido y sobre condiciones iniciales, se tiene que <sup>6</sup>

$$\langle v(t) \rangle_{F, v_0} = v_0 e^{-\beta t},$$

puesto que el promedio de  $F(t)$  es cero. Esto significa que, en promedio, las partículas brownianas siguen el resultado macroscópico esperado por la **ley de frenado de Stokes**:  $\langle \dot{v}(t) \rangle_F = -\beta \langle v(t) \rangle$ .

Por otro lado, elevando al cuadrado la ecuación (2.4) y tomando el promedio sobre el ruido y sobre las condiciones iniciales, se obtiene

$$\langle v^2(t) \rangle = v_0 e^{-2\beta t} + e^{-2\beta t} \int_0^t \int_0^t \langle F(t') F(t'') \rangle e^{\beta(t'+t'')} dt' dt'',$$

donde se han suprimido los términos proporcionales a  $F(t)$  cuyo promedio es cero. Sustituyendo la expresión de la correlación, ecuación (2.3), se obtiene

$$\langle v^2(t) \rangle_{F, v_0} = v_0 e^{-2\beta t} + \frac{q}{2\beta} (1 - e^{-2\beta t}).$$

La constante hasta ahora desconocida, puede determinarse a partir de las condiciones de equilibrio termodinámico [17]. Para  $t \gg \tau = \beta^{-1}$  el efecto de la velocidad inicial ha desaparecido, la partícula macroscópicamente se ha frenado y el promedio del cuadrado de la velocidad debe llegar a su valor de equilibrio dictado por el **teorema de equipartición**, según el cual<sup>7</sup>  $\langle v^2(t) \rangle_v = \frac{kT}{m}$ :

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \langle v^2(t) \rangle_v = \frac{q}{2\beta} = \frac{kT}{m},$$

lo cual resulta en

$$q = \frac{2\beta kT}{m}. \quad (2.5)$$

<sup>6</sup>El subíndice  $v_0$  representa el promedio sobre las condiciones iniciales para la velocidad.

<sup>7</sup>El subíndice  $v$  representa el promedio sobre todos los valores de la velocidad del ensemble.

Por tanto, según (2.3), la correlación para las fuerzas está determinada por las propiedades estadísticas del ensemble en equilibrio

$$\langle F(t)F(t') \rangle_F = \frac{2\beta kT}{m} \delta(t - t'). \quad (2.6)$$

A esta relación se le conoce como el **primer teorema de Fluctuación-Disipación**, el cual relaciona la magnitud de las fluctuaciones térmicas  $kT/m$  que dan origen a la fuerza estocástica y la constante de amortiguamiento  $\beta$ .

Una aplicación importante de la ecuación de Langevin es encontrar el desplazamiento cuadrático medio de la partícula browniana [14]. El desplazamiento viene dado por

$$\Delta x(t) = \int_0^t v(t') dt'.$$

Sustituyendo la ecuación (2.4), elevando al cuadrado y tomando el promedio sobre el ensemble, uno obtiene

$$\langle \Delta x^2(t) \rangle_x = \frac{2kT}{m\beta} \left[ t + \beta^{-1} e^{-\beta t} \right].$$

Para tiempos mayores al **tiempo de relajación** de la velocidad  $\beta^{-1}$ , el segundo término del lado derecho es despreciablemente pequeño y resulta que

$$\langle \Delta x^2(t) \rangle_x = 2 \left( \frac{kT}{m\beta} \right) t. \quad (2.7)$$

Como vimos en la sección (1.3.1), la fórmula de Einstein para el desplazamiento cuadrático de una partícula difundiéndose es  $2Dt$ , donde  $D$  es el coeficiente de autodifusión de la partícula browniana. Por lo tanto, al comparar (1.2) con (2.7), y recordando que

$$\beta = \frac{6\pi a\eta}{m} \quad (2.8)$$

se obtiene una relación entre el coeficiente de difusión  $D$ , el coeficiente de fricción  $\beta$  y la energía térmica específica  $kT/m$ :

$$D = \frac{kT}{m\beta}. \quad (2.9)$$

Esta última relación se conoce como la relación de Stokes-Einstein y constituye el **segundo teorema de Fluctuación-Disipación**.

## 2.2. Ecuación de Fokker-Planck

### 2.2.1. La ecuación de FP y su relación con la ecuación de Langevin

La ecuación de Fokker Planck (FP<sup>8</sup>) es una ecuación para la **función de distribución de la probabilidad** (PDF, por sus siglas en inglés). En el caso del movimiento browniano,  $(P(x, t))$  representa la densidad de probabilidad de encontrar a la partícula alrededor de la posición<sup>9</sup>  $x$  después de un cierto tiempo  $t$  y su evolución está determinada por la ecuación de FP general [15]

$$\frac{\partial P}{\partial t}(x, t) = \left[ -\frac{\partial}{\partial x}A(x) + \frac{1}{2}\frac{\partial^2}{\partial x^2}B(x) \right]P(x, t) \quad (2.10)$$

El rango de  $x$  es necesariamente continuo y para la presente discusión es  $(-\infty, +\infty)$ . El primer miembro del lado derecho se le conoce como **término de transporte** (convectivo o de arrastre), mientras el segundo es el **término difusivo**. Al representar una densidad de probabilidad, la PDF debe cumplir la condición de normalización

$$\int_x P(x, t) = 1, \quad (2.11)$$

donde el subíndice  $x$  significa que se promedia sobre todos los valores posibles de  $x$ .

Los coeficientes  $A(x)$  y  $B(x)$  coinciden con los primeros dos momentos de la distribución, y pueden determinarse con un mínimo de conocimientos del sistema en cuestión. Los **momentos** de la PDF se calculan como cualquier otra cantidad promedio

$$\langle (\Delta x)^n \rangle_x = \int (y - y_0)^n P(x, t) dy. \quad (2.12)$$

Si  $P(x, t)$  es solución de la ecuación (2.10), para un intervalo pequeño, podemos reescribir esta ecuación en término de diferencias finitas, usando

---

<sup>8</sup>En este trabajos, de aquí en adelante se designa así a la ecuación de Fokker-Planck.

<sup>9</sup>Para el desarrollo de este capítulo, la discusión se lleva a cabo en términos de otra variable estocástica: la posición (a diferencia de la sección anterior donde planteamos la ecuación de Langevin en término de la velocidad). La razón de ello es que nuestros modelos se desarrollan en términos de la posición y no de la velocidad.

$\Delta t = t - t_0$  y  $\Delta y = y - y_0$ . Sustituyendo en la ecuación de FP y tomando el límite cuando  $\Delta t \rightarrow 0$ , uno puede deducir que [13]

$$\frac{\langle \Delta x \rangle_x}{\Delta t} = A(x_0), \quad \frac{\langle (\Delta x)^2 \rangle_x}{\Delta t} = B(x_0), \quad \frac{\langle (\Delta x)^\nu \rangle_x}{\Delta t} = 0 \quad \nu \geq 3 \quad (2.13)$$

Una vez hecha esta identificación, la ecuación de FP sirve para encontrar el comportamiento a tiempos largos (comparados con el tiempo de relajación de la velocidad  $\beta^{-1}$ ). Los promedios de las ecuaciones (2.13) son sencillos de evaluar con las ecuaciones de Langevin, y dado que resolver esta últimas no es sencillo [14], es preferible convertirlas a sus respectivas ecuaciones de FP. A continuación ejemplificaremos esta equiparación entre ambas ecuaciones.

### 2.2.2. La partícula libre.

En la descripción de Langevin del movimiento browniano descubrimos que la dinámica de la partícula evoluciona de acuerdo a (2.1)

$$\frac{\partial v}{\partial t} = -\beta v + F(t), \quad \beta = cte.$$

donde  $v$  es la velocidad de la molécula,  $F(t)$  es el ruido “blanco” y  $\beta$  es el coeficiente de fricción relacionado con el coeficiente de difusión del fluido de acuerdo con la relación de Stokes-Einstein

$$D = \frac{kT}{\beta m}.$$

De la aleatoriedad de la fuerza estocástica uno puede derivar a partir de la ecuación de Langevin que  $\langle x(t) \rangle_x = 0$ , y que a tiempos largos  $\langle x^2(t) \rangle_x = 2Dt$ , por lo que sustituyendo en (2.13) y luego en (2.10), uno obtiene que la **ecuación de difusión** para la partícula browniana es

$$\frac{\partial P}{\partial t} = D \frac{\partial^2 P}{\partial x^2}, \quad D = cte. \quad (2.14)$$

donde  $P$  es la función de distribución de probabilidad.

Una vez advertido esto, procedamos a resolver la ecuación de FP para la partícula libre en el caso unidimensional. Considérese (sin pérdida de generalidad) un ensemble de partículas que al tiempo  $t_0$  están en el origen. Esto quiere decir que nuestra condición inicial para la probabilidad de transición

es  $P(x, t = 0) = \delta(x)$  con  $\delta$  la función delta de Dirac. Uno puede comprobar con algo de álgebra que la solución a  $t \geq 0$  que cumple la condición inicial está dada por <sup>10</sup>

$$P(x, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right). \quad (2.15)$$

Esto dice que las partículas del ensemble, inicialmente en la misma posición, paulatinamente se van alejando del origen conforme avanza el tiempo. De aquí puede obtenerse que, conforme pasa el tiempo, cada partícula se aleja del origen de manera tal que al tomar el promedio de este desplazamiento sobre el ensemble, se obtiene  $\langle x(t) \rangle_x = 0$ . Sin embargo, la distribución se ensancha con el tiempo. El ancho de la distribución está dado por  $\langle \Delta x^2(t) \rangle_x$ , el cual crece linealmente con el tiempo.

En esta etapa conviene traer a cuenta un concepto que más adelante será de mucha utilidad: el concepto de flujo de probabilidad. La ecuación de Fokker-Planck se puede escribir como una ecuación de continuidad para  $P$  de la forma

$$\frac{\partial P}{\partial t}(x, t) = -\nabla \cdot \vec{J}(x, t), \quad (2.16)$$

donde  $\vec{J}$  representa el **flujo de probabilidad**. Para entender su significado, considérese una superficie cerrada  $\mathcal{S}$  en el dominio del proceso estocástico. Integrando la ecuación anterior en el volumen  $\mathcal{V}$  encerrado por  $\mathcal{S}$ , según el teorema de Gauss, se tiene que

$$\int_{\mathcal{V}} \frac{\partial P}{\partial t} dV = - \int_{\mathcal{S}} \vec{J} \cdot \hat{n} dA.$$

Por tanto, la disminución o aumento de probabilidad de que la partícula esté dentro de  $\mathcal{V}$  dependerá del flujo de probabilidad  $\vec{J}$  a través de la superficie  $\mathcal{S}$ .

---

<sup>10</sup>La condición inicial sugiere la forma de la solución para la probabilidad de transición  $P$ . Uno propone una solución de la forma

$$P = P_0 f(t) \exp\left(-\frac{x^2}{A(t)}\right)$$

con  $A$  y  $f$  una función sólo del tiempo. Sustituyendo en la ecuación (2.14) resulta en una ecuación que relaciona  $A$  y  $f$ .  $P_0$  se obtiene por la condición de normalización. Es este el método usado en la solución de todas las ecuaciones de este trabajo. Además, existe una razón física para sugerir este tipo de solución: el Teorema de límite central, según el cual, cualquier distribución cercana al equilibrio debe ser una gaussiana [15].



Esta afirmación abstracta puede concretarse con el ejemplo de la partícula browniana libre. Tomemos como frontera imaginaria un círculo centrado en cero de radio  $x_0$ . De la ecuación (2.14) y (2.16) es claro que en el caso unidimensional de la partícula libre

$$J(x, t) = -D \frac{\partial P}{\partial x}(x, t).$$

De la ecuación (2.15) se deduce que

$$J(x_0, t) = \frac{x_0}{\sqrt{16\pi Dt^3}} \exp\left(-\frac{x_0^2}{4Dt}\right),$$

y representa el flujo de partículas brownianas del ensemble a través de  $x_0$  como función del tiempo.

## 2.3. Carácter no markoviano

Hasta ahora hemos estudiado la difusión de una partícula browniana en el caso en que la fuerza estocástica en (2.1) constituye un ruido blanco gaussiano, o de manera equivalente, a través de una ecuación de FP con coeficientes independientes del tiempo. Esta descripción resulta adecuada cuando la partícula se difunde en un fluido simple. Sin embargo, el medio intracelular es un fluido complejo compuesto de una multitud de polímeros y partículas (sección 1.1.1). Para describir la difusión en un fluido complejo, es necesario tener en cuenta el carácter **no-markoviano** del proceso, es decir, que el ruido estocástico no es blanco en el caso del planteamiento de Langevin, o que los coeficientes de la ecuación de FP dependen del tiempo. En esta sección se profundizará en el estudio de la propiedad de Markov.

### 2.3.1. El oscilador armónico

Considere a la partícula browniana inmersa en un fluido sujeta a una fuerza restitutiva proporcional al desplazamiento (como por ejemplo, sujeta a un resorte o a un campo de fuerzas tal que se encuentre oscilando alrededor de la posición de equilibrio). La generalización obvia a la ecuación de Langevin está dada por el par de ecuaciones

$$\frac{dx}{dt} = v, \tag{2.17}$$

$$\frac{dv}{dt} = -w^2x - \beta v + F(t), \quad (2.18)$$

donde  $w$  es la frecuencia natural de oscilación del resorte. En el caso en que los efectos viscosos y difusivos sean mucho mayores que los efectos inerciales debidos a la acción del resorte<sup>11</sup>, se cumplirían también

$$\langle F(t) \rangle_F = 0 \quad , \quad y$$

$$\langle F(t)F(t') \rangle_F = 2\frac{\beta kT}{m}\delta(t-t').$$

El Teorema de fluctuación-disipación dictaría la intensidad de la correlación de la fuerza estocástica y el problema se resuelve de manera análoga al de la partícula libre. Además, se puede plantear una ecuación de FP equivalente para la velocidad y la posición, con ayuda de relaciones similares a las de la ecuación (2.13), (2.17) y (2.18). La ecuación es

$$\frac{\partial P}{\partial t} + \frac{\partial P}{\partial x} - \omega^2 x \frac{\partial P}{\partial v} = \beta \left[ \frac{\partial}{\partial v}(Pv) + \frac{kT}{m} \frac{\partial^2 P}{\partial v^2} \right]. \quad (2.19)$$

Esta ecuación tiene solución analítica cuando la condición inicial para este problema es  $P(x, v, t = 0) = \delta(x - x_0)\delta(v - v_0)$  donde  $x_0$  y  $v_0$  son la posición y velocidad iniciales. El cálculo de dicha solución es largo y tedioso [11]. Para nuestros fines, baste con resaltar que en el caso amortiguado  $P$  resulta una distribución gaussiana (en  $2D$ ) para  $v$  y  $x$ , en la cual el centro o pico de la distribución  $\tilde{x}(t)$  se mueve de acuerdo a la ecuación de oscilador armónico amortiguado

$$m \frac{d^2 \tilde{x}}{dt^2} + \beta \frac{d\tilde{x}}{dt} + \omega^2 m \tilde{x} = 0,$$

oscilando con amplitudes pequeñas (comparada con  $x_0$ ) hasta llegar al origen.

En conclusión, tanto el enfoque de Langevin como el de FP markovianos reproduce el comportamiento esperado para el oscilador browniano cuando la frecuencia es pequeña. Planteado en términos probabilísticos, las ecuaciones (2.18) y (2.19) suponen que la posición de la partícula browniana oscilando por un resorte sólo depende de la posición que tenía un momento antes y no considera en absoluto la velocidad que tenía o la historia de la trayectoria de la partícula. Se dice que es un proceso sin **memoria** o **proceso de Markov**.

<sup>11</sup>Es decir, en el régimen  $\omega \rightarrow 0$ .

Esto, por supuesto es una idealización; en la práctica, ningún proceso es del todo markoviano<sup>12</sup>.

También cabe resaltar que el hecho de que un proceso sea o no markoviano depende del tipo y número de variables escogidas para su descripción. Si se enfrenta a un proceso no markoviano (como el del oscilador en la variable posición), uno puede agregar una o más variables (como la velocidad), y entonces el proceso será markoviano en las dos variables.

### 2.3.2. Procesos con memoria

Un proceso estocástico más realista resulta de reconocer que los procesos reales son **no-markovianos** [14]. La posición y velocidad actual de la partícula dependen, en general, de todo lo que le ha sucedido con anterioridad. Por ello, en el caso en que la partícula está sujeta a fuerzas externas, es de esperarse que se modifique la forma en que interactúa con el medio, dado que inevitablemente habrá efectos inerciales presentes en su dinámica. Por ello, en el caso no markoviano, la fricción al tiempo  $t$  depende de la historia de la velocidad  $v(s)$  y de la posición  $x(s)$  para tiempos  $s < t$ . En este caso, la fricción contiene la memoria. El coeficiente de fricción  $\beta$  se reemplaza por una función  $\beta(t)$ , algunas veces llamada **función de memoria** o de efectos retardados. La fuerza de fricción con un coeficiente de arrastre  $\beta$  constante en el tiempo se cambia por

$$-\beta v(t) \longrightarrow \int_{-\infty}^t \beta(t-s)v(s)ds.$$

De este modo, los procesos “no-markovianos” se caracterizan por la aparición de coeficientes dependientes del tiempo. La ecuación de Langevin generalizada para el caso del oscilador browniano es [14]

$$m\ddot{x}(t) + \int_0^t \dot{x}(\tau)\beta(t-\tau)d\tau + m\omega^2x(t) = F(t), \quad (2.20)$$

donde  $F$  es el mismo ruido blanco gaussiano,  $m$  la masa del oscilador y  $\omega$  su frecuencia.  $\beta(t)$  es el kernel de fricción o función de memoria.

La ecuación (2.20) es imprescindible cuando se quiere describir comportamientos de subdifusión, como aquellos descritos en la sección (1.3.3). En

---

<sup>12</sup>En la práctica, la mayoría de las veces la aproximación markoviana suficiente; sin embargo, hay problemas que requieren el otro tipo de aproximación, como por ejemplo, el caso de subdifusión en redes poliméricas [19].

estos casos, la ecuación que los describe puede incorporar tanto las características de medio, como el hecho de que la partícula browniana tiene en realidad un cierto tamaño finito [19]. Este objetivo se logra a través de la fricción efectiva  $\beta(t)$  que aparece en (2.20) como variable fenomenológica y cuya determinación experimental se obtiene a partir de la generalización del primer teorema de fluctuación-disipación (ecuación (2.6)) para la correlación de la fuerza estocástica

$$\langle F(t)F_0 \rangle_F = \frac{2kT}{m}\beta(t). \quad (2.21)$$

Por ende, el teorema de fluctuación-disipación se modifica. Se dice entonces que  $F(t)$  es un **ruido no-blanco** o no-markoviano.

Es posible plantear una ecuación de FP equivalente que reproduzca este carácter no markoviano, sin embargo, su deducción excede el alcance e interés de este trabajo [18]. La ecuación de FP tridimensional generalizada al caso no-markoviano para una partícula browniana sujeta a una fuerza  $\mathbf{F}(\mathbf{x})$  es

$$\frac{\partial P}{\partial t}(\mathbf{x}, t) = D(t)\nabla^2 P - \frac{1}{\beta(t)}\nabla \cdot [P\mathbf{F}(\mathbf{x})], \quad (2.22)$$

donde  $D(t)$  es el coeficiente de difusión efectivo relacionado a la movilidad efectiva  $\beta(t)$  según el segundo teorema generalizado de Fluctuación-Disipación

$$D(t) = \frac{kT}{m} \frac{1}{\beta(t)}. \quad (2.23)$$

Además, con argumentos de autoconsistencia [16], es posible mostrar que al igual que en el caso markoviano de la partícula libre,  $D(t)$  puede obtenerse mediante

$$D(t) = \frac{1}{6} \frac{d}{dt} \langle \mathbf{r}^2(t) \rangle \quad (2.24)$$

Más allá de todo lo que involucra el planteamiento detallado de las últimas tres ecuaciones, nos limitamos a presentarlas como una generalización de aquellas que entendimos antes y a usarlas sin demostración de aquí en adelante para nuestros modelos.

**Parte II**  
**Desarrollo**

# Capítulo 3

## Modelo 1: Balance de fuerzas armónicas

### 3.1. Introducción.

Una vez estudiados la descripción biológica del problema y la metodología básica para describir los procesos difusivos, en esta sección procedemos a conjuntar ambas visiones en un modelo que describa cuantitativamente el fenómeno en cuestión: la difusión de vesículas de serotonina en el interior de células Retzius. El desarrollo de la solución es más bien largo y sinuoso por lo que conviene trazar al lector un mapa general del modelo:

- Hay que reconocer que nuestro problema es un tanto como el de una caja negra: lo que se registra en estos experimentos es únicamente la llegada de las diversas vesículas a la membrana celular. Este hecho incrementa la longitud de la pared celular, y por ende, la fluorescencia registrada como función del tiempo. Para describir esto, necesitamos conocer el número de vesículas por unidad de tiempo que alcanzan la membrana; la fluorescencia en  $t$  es entonces proporcional a la suma de todas las partículas que han alcanzado la frontera en tiempos menores a  $t$ , para lo cual es necesario modelar su dinámica.
- Cuando la neurona es excitada (ya sea por medio de la cafeína o de impulsos eléctricos), se desencadenan una serie de reacciones químicas que provocan el transporte de vesículas que contienen serotonina hacia la membrana. Este transporte se lleva a cabo en el interior de una célula

donde la vesícula viajera interacciona con el medio a través de colisiones aleatorias, por lo que la vesícula desarrolla movimiento aleatorio en su desplazamiento. De este hecho, surge la necesidad de usar la ecuación de FP que incorpora el carácter estocástico de la dinámica.

- Además de los efectos difusivos, durante su desplazamiento, las vesículas interaccionan con el medio a través de fuerzas elásticas debidas al arrastre que ejercen los motores y el medio celular. Son estas fuerzas las que otorgan el carácter no markoviano a su dinámica, por lo que es menester incorporar a la variable tiempo en los coeficientes de difusión y de arrastre. Estos coeficientes puede incorporar no sólo la información proveniente de la historia de la vesícula desde que inició el proceso, sino también el hecho de que la partícula en realidad tiene un cierto tamaño finito.
- La vesícula puede llevar a cabo diferentes formas de difusión dependiendo de su interacción con las redes de microtúbulos del citoesqueleto y de la actividad de los motores moleculares, hechos que a su vez dependen de la forma en que hayan sido estimuladas y de la presencia o no de la colchicina. Mientras que la acción de los motores es incrementar la movilidad de las vesículas, la red polimérica la reduce. Ambos factores son incorporados (en primera aproximación) como fuerzas proporcionales al desplazamiento y que se oponen entre sí.
- Toda esta información se compila en la ecuación de FP no markoviana para la PDF, la cual se resuelve analíticamente cuando la función de memoria se aproxima a tiempos cortos. Una vez obtenida, se obtiene el flujo de partículas como función del tiempo. Al integrar el flujo total de vesículas a través de la membrana con respecto al tiempo, uno obtiene el número total de vesículas que han arribado hasta el tiempo  $t$ , el cual debe ser proporcional a la fluorescencia emitida.

En cuanto a la organización de este capítulo, primero desarrollamos con todo detalle el modelo para el caso de las células control. En el caso en que las células han sido tratadas con colchicina simplemente se presentan los resultados, ya que los supuestos y la manera de realizar los cálculos son idénticos a los de las células control.

## 3.2. Hipótesis en las que se fundamenta el modelo

### 3.2.1. Necesidad de una ecuación de FP

Los cúmulos de vesículas en el interior de la célula de Retzius se encuentran prácticamente fijos antes de la estimulación. La evidencia experimental señala que hasta esta etapa, el único movimiento de los cúmulos vesiculares se debe a la agitación térmica. Así pues, se puede considerar que las vesículas obedecen una dinámica browniana restringida a una región (Ver sección (1.3.1)). Esta aproximación es válida porque el tamaño de las vesículas está en la escala mesoscópica ( $\approx 1\mu m$ ).

Una vez que los estímulos externos inducen la entrada y la liberación de  $Ca^+$  intracelular, se dan las condiciones de no equilibrio necesarias para la activación de los motores moleculares. Debido a una serie de reacciones químicas (entre las que destaca la captura de ATP que proporciona la energía química necesaria), se produce un acoplamiento mecanoquímico entre el microtúbulo y el motor molecular que permite a éste arrastrar al cúmulo de vesículas a lo largo del microtúbulo. Entonces se produce un desplazamiento dirigido hacia fuera de la carga (las vesículas).

De todo esto último resulta clara la necesidad de una ecuación que considere la difusión de partículas brownianas sujetas a fuerzas externas. La ecuación que determina esta dinámica es la ecuación de Fokker-Planck. Para tiempos mucho más largos que el tiempo característico  $\beta_0^{-1} = m/6\pi\eta_0$ , donde  $a$  es el radio de la vesícula,  $m$  su masa y  $\eta_0$  la viscosidad del solvente, la dinámica de esta partícula browniana se describe en términos de la ecuación de FP en la forma

$$\frac{\partial P}{\partial t}(\mathbf{x}, t) = D(t)\nabla^2 P - \beta^{-1}(t)\nabla \cdot [P\mathbf{F}(\mathbf{x})], \quad (3.1)$$

donde el coeficiente de difusión efectivo  $D(t)$  está relacionado a la movilidad de acuerdo a

$$D(t) = \frac{kT}{m} \frac{1}{\beta(t)}, \quad (3.2)$$

donde  $kT$  es la energía térmica. Como antes  $P(\mathbf{x}, t)$  es la distribución de probabilidad y  $\mathbf{F}$  es la fuerza neta que da cuenta de la interacción de la vesícula con el medio intracelular (Ver sección (2.3.2)). Esta ecuación incluye



el carácter no markoviano del proceso, reflejado en la dependencia explícita con el tiempo de los coeficientes de difusión y fricción.

### 3.2.2. Carácter no markoviano y el coeficiente de arrastre efectivo $\beta(t)$ .

Puesto que el medio intracelular está constituido por una variedad de organelos, polímeros y otras partículas, su respuesta a esfuerzos mecánicos será similar a la de ciertos materiales viscoelásticos caracterizados por la dependencia en el tiempo de las propiedades de transporte, como el coeficiente de arrastre  $\beta(t)$  [19].

Debido a que la partícula se mueve en un medio inhomogéneo, se ha observado que la presencia de redes del citoesqueleto provoca transporte anómalo o subdifusión (Ver sección(1.3.3)). Esto se ha cuantificado en experimentos en microreología, que han mostrado que la ley de potencias para el MSD depende del radio entre la longitud característica de las partículas (su radio  $a$ ) y la longitud característica de la red polimérica que forma el citoesqueleto (el tamaño promedio de la red  $\xi$ , sección (1.3.3)). Estas interacciones con la red polimérica introducen correcciones a la movilidad de las partículas, similares a las que surgen en presencia de paredes o de otras partículas brownianas <sup>1</sup>. De acuerdo a la literatura [19], es plausible suponer que la distancia de la partícula a la cavidad formada por la red de microtúbulos es del mismo orden que la longitud característica de la red polimérica  $\xi$ . Entonces, en primera aproximación podemos suponer  $\beta(t) \rightarrow \beta(t, a/\xi)$  es de la forma [19]

$$\beta^{-1}(t) = \beta_0^{-1} \left( 1 - B_1 \frac{a}{\xi} \right) \tilde{\beta}(t) = \beta_0^{-1} \alpha \tilde{\beta}(t) \quad (3.3)$$

donde  $\tilde{\beta}(t)$  es la función de memoria adimensional y  $\alpha$  un coeficiente que introduce los efectos de tamaño finito de la partícula a través del factor  $a/\xi$ . El valor del parámetro  $B_1$  dependerá de la naturaleza de la frontera; en nuestro caso, dependerá del tipo de redes que formen los microtúbulos dentro de la célula.

---

<sup>1</sup>Estas interacciones son de carácter hidrodinámico. Por sencillez en la exposición, no nos detendremos en su justificación. Ver [19].

### 3.2.3. Fuerzas armónicas a las que está sujeta la vesícula

En los experimentos, se observó que, en ausencia de perturbaciones externas (como cafeína o impulsos eléctricos), los cúmulos de vesículas permanecen sujetos al citoesqueleto, probablemente a través de los motores moleculares, que permanecen inactivos. La unión se produce a través del tronco del motor que liga al cúmulo de vesículas con los microtúbulos (Figura (1.6)). Estos cuellos no son rígidos, sino que son capaces de doblarse para permitirle al motor molecular aferrar una de las cabezas al microtúbulo mientras la otra realiza un paso hacia delante (Ver sección (1.2.2)). Bajo esas condiciones, podemos suponer que las proteínas motoras aplican una fuerza elástica de sujeción parecida a la de una cuerda o resorte:  $\mathbf{F}_1 = -\omega_1^2 \mathbf{r}$  donde  $\omega_1$  corresponde a la frecuencia característica que evita al cúmulo difundirse libremente en el medio intracelular. Hemos supuesto también que la fuerza es radial donde  $r = \|\mathbf{x}\|$ .

Sin embargo, una vez que la perturbación ha inducido el incremento en la concentración de iones de  $Ca^+$  dentro de la célula, los motores se activan aplicando fuerzas de arrastre a los cúmulos. Dicha fuerza puede sustituirse por un potencial de energía que disminuya conforme más cercana esté la vesícula a la membrana celular. Se favorecerá el movimiento hacia afuera de las vesículas (Ver sección (1.3.2)). Esto implica que en primera aproximación, la fuerza puede ser modelada por medio de una relación lineal:  $\mathbf{F}_2 = \omega_2^2 \mathbf{r}$ , donde la frecuencia característica  $\omega_2$  mide la intensidad del arrastre del motor.

Así pues, la fuerza resultante sobre el cúmulo de vesículas dependerá del balance entre ambas fuerzas: una fuerza elástica que la mantiene atada al motor por medio del tronco (presente incluso en condiciones de equilibrio), y una fuerza de arrastre cuyo origen se sitúa en la transducción de energía química en mecánica (que se inicia sólo hasta que la célula se perturba). Por tanto, una vez que el proceso se activa, ambas fuerzas contribuyen dando una fuerza resultante

$$\mathbf{F} = \epsilon \omega^2 \mathbf{r} \quad (3.4)$$

donde  $\omega^2 = \omega_2^2 - \omega_1^2$  y  $\epsilon$  es un parámetro cuyo sentido físico se explica a continuación. Por supuesto, el modo de definir  $\omega$  presupone que la fuerza de arrastre sobrepasa a la fuerza de sujeción. En este sentido, este modelo sustituye la acción de los motores con un campo de fuerzas dependiente de la posición.

### 3.2.4. El parámetro $\epsilon$ .

El parámetro  $\epsilon$  incorpora los efectos debidos al tamaño finito de la partícula browniana [19]. En particular, refleja el efecto de los esfuerzos ejercido por el fluido sobre la superficie de la partícula durante su movimiento en el fluido. La explicación detallada de la necesidad de este parámetro escapa a nuestro alcance e interés, por lo que su procedencia sólo se esboza [21].

En las formulaciones anteriores de las ecuaciones de FP y de Langevin, lo único que hemos dicho acerca del tamaño de la partícula browniana es que debe estar en la escala mesoscópica, pero nada hemos dicho de cómo esto afecta su movimiento en un fluido. Para dar una visión más realista del proceso estocástico, es menester considerar también la manera en que el corpúsculo browniano (en nuestro caso, un cúmulo vesicular aproximadamente esférico) se mueve dentro de un fluido. Así pues, cuando una esfera de radio  $a$  se mueve dentro de un fluido con velocidad  $\mathbf{v}$ , se sabe que sufre una fuerza de arrastre dada por el teorema de Faxen :  $\mathbf{F} \propto \mathbf{v} - \bar{\mathbf{v}}_0^S$  donde  $\bar{\mathbf{v}}_0^S \sim \mathbf{v}_0 + (a^2/6)\nabla^2\mathbf{v}_0$  es el promedio de la velocidad del fluido  $\mathbf{v}_0$  sobre la superficie de la esfera.

Al considerar la producción de entropía generada por la esfera al moverse uno puede reconocer que la forma general para este parámetro es  $\vec{\epsilon} = (ma^2/6kT)\vec{\beta} \cdot \vec{\beta}$  donde  $\vec{\beta}$  es la forma más general de la movilidad efectiva. Dado que el tiempo característico de difusión  $\tau_D$  en una distancia  $a$  es  $\tau_D = ma^2\beta(t_0)/6kT$ , y que la vesícula presenta simetría esférica, podemos suponer que el parámetro  $\epsilon$  está dado por  $\epsilon = \tau_D\beta(t_0)$ . Bajo esta condiciones, el parámetro  $\epsilon$  toma la forma

$$\epsilon = \frac{ma^2\beta_0^2}{6kT\alpha^2}. \quad (3.5)$$

Por lo tanto, la forma de la fuerza elástica asume que se origina de partículas con un cierto tamaño y que las partículas puntuales no se ven afectadas por la red en los intervalos de tiempo que estamos considerando.

## 3.3. Solución de la ecuación de FP.

Una vez introducidos los ingredientes básicos del modelo, procedemos a la búsqueda de la distribución de probabilidad. Entonces, consideremos un ensamble de partículas brownianas. Sustituyendo las expresiones (3.2), (3.3),

(3.4) y (3.5) en la ecuación (3.1) de FP resulta

$$\beta(t) \frac{\partial P}{\partial t}(\mathbf{r}, t) = \frac{kT}{m} \nabla^2 P - \epsilon \omega^2 \nabla \cdot [P\mathbf{r}]. \quad (3.6)$$

La solución no estacionaria puede obtenerse introduciendo las variables adimensionales  $\tilde{\mathbf{r}} = a^{-1}\mathbf{r}$  y  $\tilde{t} = t_0^{-1}t$  con  $t_0 = \beta_0^{-1}$ , donde  $\beta_0$  es el tiempo de relajación de la velocidad y  $a$  el radio de la partícula browniana. Adimensionalizando también los operadores, la ecuación de FP deviene

$$\tilde{\beta}(t) \frac{\beta_0^2}{\alpha} \frac{\partial P}{\partial \tilde{t}}(\tilde{\mathbf{r}}, \tilde{t}) = \frac{kT}{ma^2} \tilde{\nabla} P - \epsilon \omega^2 \tilde{\nabla} \cdot [\tilde{\mathbf{r}}P]. \quad (3.7)$$

Ahora, escalamos el tiempo según <sup>2</sup>

$$\tau = \int_0^{\tilde{t}} \tilde{\beta}^{-1}(\tilde{t}') d\tilde{t}', \quad (3.8)$$

Sustituyendo en la ecuación anterior, se tiene que

$$\left( \frac{\beta_0^2}{\alpha} \right) \frac{\partial P}{\partial \tau}(\tilde{\mathbf{r}}, \tau) = \left( \frac{kT}{ma^2} \right) \tilde{\nabla} P - (\epsilon \omega^2) \tilde{\nabla} \cdot [\tilde{\mathbf{r}}P], \quad (3.9)$$

que no es otra cosa que la ecuación (3.1) para las variables  $\tilde{\mathbf{x}}$  y  $\tilde{t}$ . Ahora, sugerimos la forma para la solución como

$$P(\tilde{\mathbf{x}}, \tau) = f(\tau) \exp \left[ - \frac{\tilde{r}^2}{A(\tau)} \right], \quad (3.10)$$

donde  $\tilde{r} = |\tilde{\mathbf{x}}|$ . Primero, sabemos que la distribución de probabilidad  $P(\mathbf{x}, t)$  debe estar normalizada a la unidad, pero evaluada en las variables originales, por lo que para toda  $t$  (y por ende, para toda  $\tau$ ) mayor que cero

$$1 = \int_{V_x} P(\mathbf{x}, t) d\mathbf{x} = a^3 \int_{V_{\tilde{\mathbf{x}}}} P(\tilde{\mathbf{x}}, \tau) d\tilde{\mathbf{x}}. \quad (3.11)$$

Introduciendo la ecuación (3.10) en (3.11), uno puede obtener una relación de la forma  $f(\tau) = \frac{A^{-\frac{3}{2}}(\tau)}{2a^3\sqrt{\pi^3}}$ . Regresando estos valores a la ecuación (3.10) uno obtiene que

$$P(\tilde{\mathbf{r}}, \tau) = \frac{1}{2a^3\sqrt{\pi^3}} A^{-\frac{3}{2}}(\tau) \exp \left[ - \frac{\tilde{r}^2}{A(\tau)} \right]. \quad (3.12)$$

---

<sup>2</sup>Es importante hacer notar que todas estas transformaciones ( $\tilde{\mathbf{r}}, \tilde{t}$  y  $\tau$ ) son lineales. Esto quiere decir que al evaluar en cero o infinito las variables originales, también hacemos lo mismo para las variables transformadas. Esto será de gran ayuda cuando hagamos distintos cambios de variable.

Sustitución directa de esta expresión en la ecuación de FP (3.9) resulta en una relación para  $A(\tau)$

$$\frac{\beta_0^2}{\alpha} \dot{A}(\tau) + 2(\epsilon\omega)A(\tau) = \frac{4kT}{ma^2},$$

donde el punto significa derivación respecto de  $\tau$ . Ahora, es necesario conocer la condición inicial de  $A(\tau)$  para resolver la ecuación diferencial<sup>3</sup>. Así pues, observando la ecuación (3.12), la condición inicial de delta de Dirac  $P(\mathbf{r}, t = 0) = \delta(r)$ , se expresa como  $A(\tau = 0) = 0$ .

Entonces, si definimos

$$\omega_T^2 = \frac{kT}{ma^2}, \Rightarrow \epsilon = \frac{\beta_0^2}{6\alpha^2\omega_T^2}, \quad (3.13)$$

la solución de la ecuación diferencial para  $A(\tau)$  se lee como

$$A(\tau) = \frac{12\omega_T^2\alpha^2}{\omega^2\beta_0^2} \left[ \exp\left(\frac{\omega^2}{3\alpha\omega_T^2}\tau\right) - 1 \right]. \quad (3.14)$$

Sustituyendo estos valores a la función de distribución (3.12) se obtiene

$$P(\tilde{\mathbf{x}}, \tau) = \frac{1}{2a^3\pi^{3/2}} \left( \frac{\omega^2\beta_0^2}{12\omega_T^4\alpha^2} \right)^{3/2} \frac{\exp\left(-\frac{\omega^2\beta_0^2\tilde{r}^2}{12\omega_T^4\alpha^2[\exp(\omega^2/3\alpha\omega_T^2\tau)-1]}\right)}{[\exp(\omega^2/3\alpha\omega_T^2\tau)-1]^{3/2}}. \quad (3.15)$$

En términos de  $\tau$  es posible calcular el MSD  $\langle r^2(\tau) \rangle$  como  $\int_{V_{\tilde{\mathbf{x}}}} r^2 P(\mathbf{x}, \tau) d\mathbf{x} = \frac{3a^2}{2} A(\tau)$ , de donde uno obtiene

$$\langle r^2(\tau) \rangle = \frac{18a^2\omega_T^4\alpha^2}{\omega^2\beta_0^2} \left[ \exp\left(\frac{\omega^2}{3\alpha\omega_T^2}\tau\right) - 1 \right]. \quad (3.16)$$

La distribución de probabilidad al igual que el MSD para las variables originales se obtiene sustituyendo en (3.15) los valores de  $\tilde{\mathbf{x}}, \tau$  y  $\tilde{t}$  en términos de  $\mathbf{r}$  y  $t$ .

---

<sup>3</sup>Por comodidad supondremos que todas las vesículas se encuentran en el centro de la esfera en el momento en que inicia la perturbación externa. Esto, por supuesto es una aproximación, pues sabemos que las vesículas se encuentran distribuidas a distintas distancias dentro de la célula (Ver sección (1.1.1)). No obstante, esta condición inicial permite resolver analíticamente la ecuación para  $A(\tau)$  y su validez dependerá de los resultados que arroje.

### 3.4. Aproximación a tiempos cortos.

Dado que  $\tau$  está expresada en términos de una integral, conviene hacer una aproximación a tiempos cortos que permita expresar la PDF y el MSD en términos de las variables originales de manera más manejable. Para ello es conveniente analizar la ecuación de evolución para la **función de relajación**  $\chi(\tilde{t})$  definida por

$$\chi(\tilde{t}) = \int_{V_x} \mathbf{x} \cdot \mathbf{x}_0 P(\mathbf{x}, \tilde{t}) d\mathbf{x}. \quad (3.17)$$

Haciendo uso de la ecuación (3.6), uno puede obtener

$$\frac{d}{d\tilde{t}} \chi(\tilde{t}) = -\frac{\omega^2}{6\alpha\omega_T^2} \tilde{\beta}^{-1}(\tilde{t}) \chi(\tilde{t}).$$

Entonces, tomando en cuenta el reescalamiento dado por ecuación (3.8), uno obtiene por integración directa que

$$\tau = \ln \left[ \frac{\chi(\tilde{t}_0)}{\chi(\tilde{t})} \right]^{6\alpha\omega_T^2/\omega^2}. \quad (3.18)$$

Según esto, el escalamiento para  $\tau(\tilde{t})$  depende de la forma explícita de la función de relajación  $\chi(\tilde{t})$ . No obstante, la expresión para  $\tau(\tilde{t})$  a tiempos cortos, en general, puede inferirse expandiendo  $\chi(\tilde{t})$  a primer orden en  $\tilde{t}$ :  $\chi(\tilde{t}) \approx \chi(\tilde{t}_0)(1 - B_2\tilde{t}) + O(\tilde{t}^2)$  con  $B_2$  un parámetro que caracteriza el tipo de relajación [19]. Usando esta expresión y expandiendo alrededor del logaritmo se obtiene

$$\tau \approx B_2 \tilde{t}^{6\alpha\omega_T^2/\omega^2}. \quad (3.19)$$

El MSD puede estimarse ahora, usando por comodidad, la expresión para tiempos cortos de la ecuación anterior. Expandiendo en (3.18) la exponencial  $e^{-(\omega^2/3\alpha\omega_T^2)\tau}$  a primer orden en  $\tau$ , uno obtiene una distribución gaussiana con una varianza que depende linealmente en  $\tau$ .

$$P(\tilde{\mathbf{x}}, \tau) \approx \frac{1}{2\alpha^3\pi^{3/2}} \left( \frac{\beta_0^2}{4\omega_T^2\alpha\tau} \right)^{3/2} \exp \left[ -\frac{\beta_0^2}{3\alpha\omega_T^2} \frac{\tilde{r}^2}{\tau} \right].$$

Regresado a la variable original  $t$ , sustituyendo directamente la expresión para  $\tau$  de la ecuación (3.19) y el valor de  $\omega_T$  de la ecuación (3.13), uno obtiene

$$\langle r^2(t) \rangle \approx 6\alpha\beta_0^{-1} D_0 B_2 \left[ \frac{t}{t_0} \right]^{6\alpha\omega_T^2/\omega^2}, \quad (3.20)$$

donde  $D_0 = \frac{kT}{m\beta_0}$  es la expresión usual para el coeficiente de difusión en términos del coeficiente de fricción  $\beta_0$ . Este resultado muestra que, tal y como era de esperarse, el desplazamiento cuadrático promedio se ve afectado por el factor  $a/\xi$ , es decir, depende de la dimensión relativa entre la partícula browniana y la red (Ver sección (1.3.3)). Esta dependencia del MSD con  $a/\xi$  se da a través del exponente de subdifusión  $\gamma$

$$\gamma = \frac{6\alpha\omega_T^2}{\omega^2} \quad (3.21)$$

(puesto que  $\alpha$  depende de  $a/\xi$ ), y en su magnitud, pues como se verá a continuación,  $B_2$  depende de  $\alpha$  también. Lo interesante de este resultado es que el tipo de subdifusión que lleve a cabo la vesícula dependerá de la temperatura, de la red en presencia de la cual se difunda, y de la actividad de los motores.

Por último, la última expresión descubre que a tiempos cortos, las propiedades viscoelásticas del medio se manifiestan a través del coeficiente efectivo de arrastre  $\beta(t)$ . Este puede obtenerse explícitamente usando las ecuaciones, (3.8) y (3.19):

$$\tilde{\beta}^{-1}(t) = \left[ \frac{t}{t_0} \right]^{6\alpha\omega_T^2/\omega^2 - 1} \quad (3.22)$$

donde hemos identificado  $B_2 = \omega^2/6\alpha\omega_T^2$ . De esta manera, la función adimensional  $\beta^{-1}(t)$  incorpora los efectos de memoria y de tamaño finito que buscábamos (Ver sección (2.3.2)).

### 3.5. Incremento de la fluorescencia

Como explicamos en la sección (1.1.2), la excitación somática de serotonina se estimó por medio de experimentos de fluorescencia. El cambio en la fluorescencia  $\phi(t)$  depende del ritmo en el cual las vesículas arriban a la membrana por unidad de tiempo. Una medida de la cantidad de partículas brownianas (en este caso, las vesículas de serotonina), que arriban hacia una superficie (en este caso, la membrana celular) está dada por el flujo  $\mathbf{J}(\mathbf{x}, t)$  que indica la fracción de las partículas del ensemble que están alrededor de  $\mathbf{x}$  después de un cierto tiempo  $t$  (Ver sección (2.2.2)). Si suponemos que la célula es aproximadamente esférica con radio  $R_{cel}$  (Ver Figura (1.4)), entonces el

flujo total de vesículas por unidad de tiempo está dado por

$$\frac{d\phi(t)}{dt} \propto \int_{S_{cel}} \mathbf{J}(R_{cel}, t) \cdot \hat{\mathbf{n}} dS. \quad (3.23)$$

Es decir, el cambio en la fluorescencia sobre la membrana es proporcional al número de vesículas que alcanzan la membrana en ese instante. Además, puede suponerse que las vesículas se mueven a lo largo de microtúbulos puramente radiales, lo cual simplifica la integral:  $\int \mathbf{J}(R_{cel}, t) \cdot \hat{\mathbf{n}} dS = 4\pi R_{cel}^3 J(R_{cel}, t)$ . Sustituyendo esta expresión en la ecuación (3.23), e integrando en el tiempo, se obtiene la fluorescencia como función del tiempo:

$$\phi(t) = \phi_0 + 4\pi R_{cel}^3 \varphi \int_0^t J(R_{cel}, t') dt', \quad (3.24)$$

donde  $\phi_0$  es el valor basal (el valor de referencia para la intensidad de fluorescencia inicial) y  $\varphi$  es una constante de proporcionalidad entre la fluorescencia y el flujo a través de  $S_{cel}$ .

De este modo, sólo es necesario determinar el valor de  $\mathbf{J}(\mathbf{x}, t)$  a partir de la distribución de probabilidad  $P(\mathbf{x}, t)$  obtenida previamente e integrar respecto al tiempo para conocer la fluorescencia. El flujo de probabilidad está definido según  $\partial P/\partial t = -\nabla \cdot \mathbf{J}$ , por lo que si comparamos con la ecuación de FP (3.1), se tiene que el flujo de probabilidad está dado de forma general para cualquier fuerza  $\mathbf{F}(\mathbf{x})$  por

$$\mathbf{J}(\mathbf{x}, t) = -D(t)\nabla P(\mathbf{x}, t) + \frac{mD(t)}{kT}\mathbf{F}(\mathbf{x})P(\mathbf{x}, t). \quad (3.25)$$

Utilizando la distribución de probabilidad dada (3.15) para el caso de la fuerza armónica  $\mathbf{F}(\mathbf{r}) = \epsilon\omega^2\mathbf{r}$ , se obtiene en las variables transformadas  $\tilde{\mathbf{r}}, \tau$

$$\mathbf{J}(\mathbf{r}, t) = \left[ \frac{2}{A(\tau)} + \frac{m\epsilon\omega^2}{kT} \right] D(\tau)P(\tilde{\mathbf{r}}, \tau)\tilde{\mathbf{r}}.$$

Para determinar la corriente  $\mathbf{J}$  sólo es necesario conocer la forma de el coeficiente efectivo de difusión  $D(t)$ . Éste puede obtenerse de su definición para el caso no markoviano (2.24):  $D(t) = \frac{1}{6} \frac{d}{dt} \langle \mathbf{r}^2(t) \rangle$ . Para la variable  $\tau$ , de las ecuaciones (3.8) y (3.16), se obtiene

$$D(\tau) = \frac{a^2\omega_T}{\beta_0} \tilde{\beta}^{-1}(\tau) \exp\left(\frac{\omega^2}{3a\omega_T^2}\tau\right).$$



Usando ahora la relación con  $\beta^{-1}$  de la ecuación (3.2) y las aproximaciones a tiempos cortos de las ecuaciones (3.19) y (3.22), se obtiene la siguiente expresión para  $D(t)$

$$D(t) = D_0 \left[ \frac{t}{t_0} \right]^{\frac{6\alpha\omega_T^2}{\omega^2} - 1} \exp \left( \frac{\omega^4}{18\alpha^2\omega_T^4} \left[ \frac{t}{t_0} \right]^{6\alpha\omega_T^2/\omega^2} \right). \quad (3.26)$$

Con estas cantidades en mente y una computadora es posible entonces realizar los ajustes para los experimentos en fluorescencia. El procedimiento es el siguiente. Se fijan los valores de las constantes físicas ( $D_0$ ,  $\beta_0$ ,  $kT$ ) con valores característicos de este tipo de experimentos, se recopila la información propia del sistema ( $a$ ,  $R_{cell}$ ,  $\xi$ ,  $m$ ) y se ajusta el valor del único parámetro libre: la frecuencia  $\omega$ . Las otras cantidades dependen de éstas ( $\omega_T$ ,  $\alpha$ ).

## 3.6. Comparación con experimentos

### 3.6.1. Modelo 1 aplicado a las células control

Resulta conveniente hacer una pausa y resumir los resultados más relevantes para no perder la visión de conjunto del primer modelo cuando se aplica a las muestras que no fueron tratadas con colchicina.

Se justificó el uso de una ecuación de FP para las vesículas electrodensas después de la activación llevada a cabo por la cafeína o los impulsos eléctricos. El proceso se modeló mediante dos fuerzas; una atractiva:  $\mathbf{F}(\mathbf{x}) = -\epsilon\omega_1^2\mathbf{x}$  debida a la ligadura que ejerce el lazo del motor, y otra que guía a las vesículas preferencialmente hacia el exterior:  $\mathbf{F}(\mathbf{x}) = \epsilon\omega_2^2\mathbf{x}$ . El resultado es una fuerza neta hacia afuera escrita como  $\mathbf{F}(\mathbf{x}) = \epsilon\omega^2\mathbf{x}$ , con  $\omega^2 = \omega_2^2 - \omega_1^2$ .

Una vez considerados los efectos de memoria a través del coeficiente de arrastre efectivo dependiente del tiempo  $\beta(t)$  y los efectos debidos al tamaño finito de las vesículas (a través del factor  $\epsilon$ ), obtuvimos una ecuación de FP

$$\beta(t) \frac{\partial P}{\partial t}(\mathbf{r}, t) = \frac{kT}{m} \nabla^2 P - \epsilon\omega^2 \nabla \cdot [P\mathbf{r}]. \quad (3.27)$$

Esta ecuación diferencial se resolvió con la condición inicial que las partículas brownianas se encuentran todas en el centro de la célula en el momento de la activación. Usando una aproximación para tiempos cortos para el coeficiente de arrastre efectivo  $\beta^{-1}(t) \approx \beta_0^{-1} [t\beta_0]^{6\alpha\omega_T^2/\omega^2 - 1}$ , se obtuvo una solución

aproximada para la PDF

$$P(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{2a^3\pi^{3/2}} \left( \frac{\omega^2\beta_0^2}{12\omega_T^4\alpha^2} \right)^{3/2} \frac{\exp\left(-\frac{\omega^2\beta_0^2 r^2}{12\omega_T^4\alpha^2 a^2 [\exp(\omega^4/18\alpha^2\omega_T^4 [t\beta_0]^{6\alpha\omega_T^2/\omega^2}) - 1]}\right)}{[\exp(\omega^4/18\alpha^2\omega_T^4 [t\beta_0]^{6\alpha\omega_T^2/\omega^2}) - 1]^{3/2}} \quad (3.28)$$

y un coeficiente de difusión efectivo dado por

$$D(t) = D_0 \left[ \frac{t}{t_0} \right]^{\frac{6\alpha\omega_T^2}{\omega^2} - 1} \exp\left(\frac{\omega^4}{18\alpha^2\omega_T^4} \left[ \frac{t}{t_0} \right]^{6\alpha\omega_T^2/\omega^2}\right), \quad (3.29)$$

donde  $D_0 = \frac{kT}{m\beta_0}$  es la expresión para el coeficiente de difusión cuando el fluido está en equilibrio.

Usando estos resultados, se obtiene que el flujo de partículas está dado por

$$\mathbf{J}(\mathbf{r}, t) = \left[ \frac{\omega^2\beta_0^2}{6a^2\omega_T^2\alpha^2 [1 - \exp(-\frac{\omega^4}{18\alpha^2\omega_T^4} [t\beta_0]^{6\alpha\omega_T^2/\omega^2})]} + \frac{m\epsilon\omega^2}{kT} \right] D(t)P(\mathbf{r}, t)\mathbf{r}. \quad (3.30)$$

Suponiendo que la célula es aproximadamente esférica con radio  $R_{cel}$ , la fluorescencia como función del tiempo es

$$\phi(t) = \phi_0 + 4\pi R_{cel}^3 \varphi \int_0^t \left[ \frac{\omega^2\beta_0^2}{6a^2\omega_T^2\alpha^2 [\exp(\frac{\omega^4}{18\alpha^2\omega_T^4} [t\beta_0]^{6\alpha\omega_T^2/\omega^2}) - 1]} + \frac{m\epsilon\omega^2}{kT} \right] D(t')P(R_{cel}, t') dt' \quad (3.31)$$

donde  $\phi_0$  es el valor basal de la fluorescencia y  $\varphi$  una constante de proporcionalidad entre la fluorescencia medida por el dispositivo experimental particular y el número de partículas arribando a la superficie celular.

Con ayuda de una computadora es posible realizar los ajustes para los resultados dados en los experimentos fijando  $D_0 \sim 10^{-14} m^2 s^{-1}$  ( $D_0 \sim 10^{-2} \mu m^2 s^{-1}$ ),  $\beta_0 \sim 2 \cdot 10^2 s^{-1}$ ,  $kT = 4,14 \times 10^{-21} J$  ( $kT = 4,14 \times 10^{-6} g\mu m^2 s^{-2}$ ). El parámetro  $\alpha$  está determinado por  $a \sim 3.5 \times 10^{-8} m$  ( $a \sim 3.5 \times 10^{-2} \mu m$ ) y por  $\xi \sim 6 \times 10^{-1} \mu m$  (Estas dos medidas provienen de medición directa de la micrografías de la tesis). Usando un valor similar al obtenido en hidrodinámica para  $B_1 \sim 2/3$ , se tiene  $\alpha \sim 0.96$ . El valor de la masa promedio<sup>4</sup> de las

<sup>4</sup>Este valor se estimo usando el volumen esperado para una vesícula de radio  $a$  y una densidad apenas superior a la del agua.

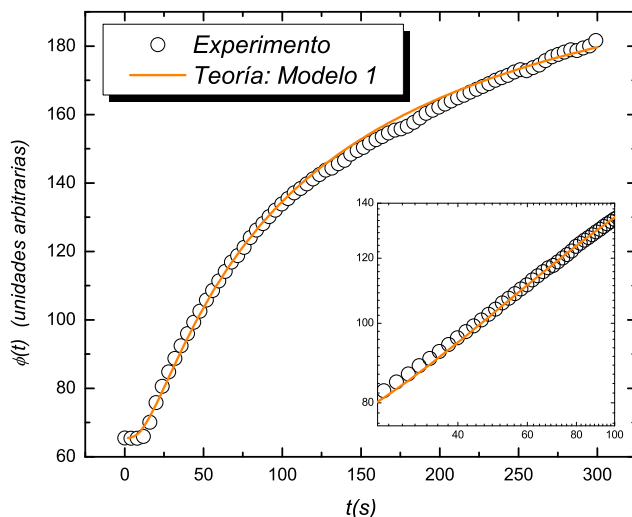


Figura 3.1: Ajuste de la cinética cambio en la fluorescencia para la cafeína utilizando el Modelo 1. Los datos experimentales son el promedio sobre 4 muestras. La frecuencia usada para el ajuste de  $\omega \sim 7.9 \times 10^3 s^{-1}$ ,  $\omega_1 \sim 2.1 \times 10^3 s^{-1}$ ,  $\omega_2 \sim 8.8 \times 10^3 s^{-1}$ , y  $\gamma \sim 0.31$ .

partículas brownianas fue  $m \sim 10^{-9} g$ , resultando en  $\omega_T \sim 1.8 \times 10^3 s^{-1}$ . También a partir de las micrografías,  $R_{cel}$  se estimó de aproximadamente  $37 \mu m$ . Los valores de  $\omega$ ,  $\omega_2$ , y  $\gamma = 6\alpha\omega_T^2/\omega^2$  aparecen en el pie de las Figuras (3.1) y (3.2), para el caso del promedio de las células con cafeína y para cuatro muestras de control eléctrico, respectivamente.

Las figuras (3.1) y (3.2) muestran un ajuste satisfactorio entre la teoría del Modelo 1 con los experimentos para el caso de las células a las que se les aplicó cafeína, y para las células estimuladas eléctricamente respectivamente.

### 3.6.2. Modelo 1 aplicado a las células dopadas con colchicina

La evidencia experimental revela que la colchicina inhibe la polimerización de microtúbulos en la célula, lo que cancela el transporte activo llevado a cabo por los motores moleculares (Ver sección (1.1.2)).

Bajo esta hipótesis, es necesario modificar la ecuación de difusión de Fokker-Planck de tal manera que ya no considere el arrastre de los motores moleculares (es decir, haciendo  $\omega_2 = 0$ . Así pues, la única fuerza ejercida sobre las vesículas es la fuerza de confinamiento realizada por el lazo enlazador del motor molecular,  $\mathbf{F}(\mathbf{x}) = -\epsilon\omega_1^2\mathbf{x}$ . Además, suponemos que la intensidad de la ligadura llevada a cabo por el motor molecular no se ve modificada

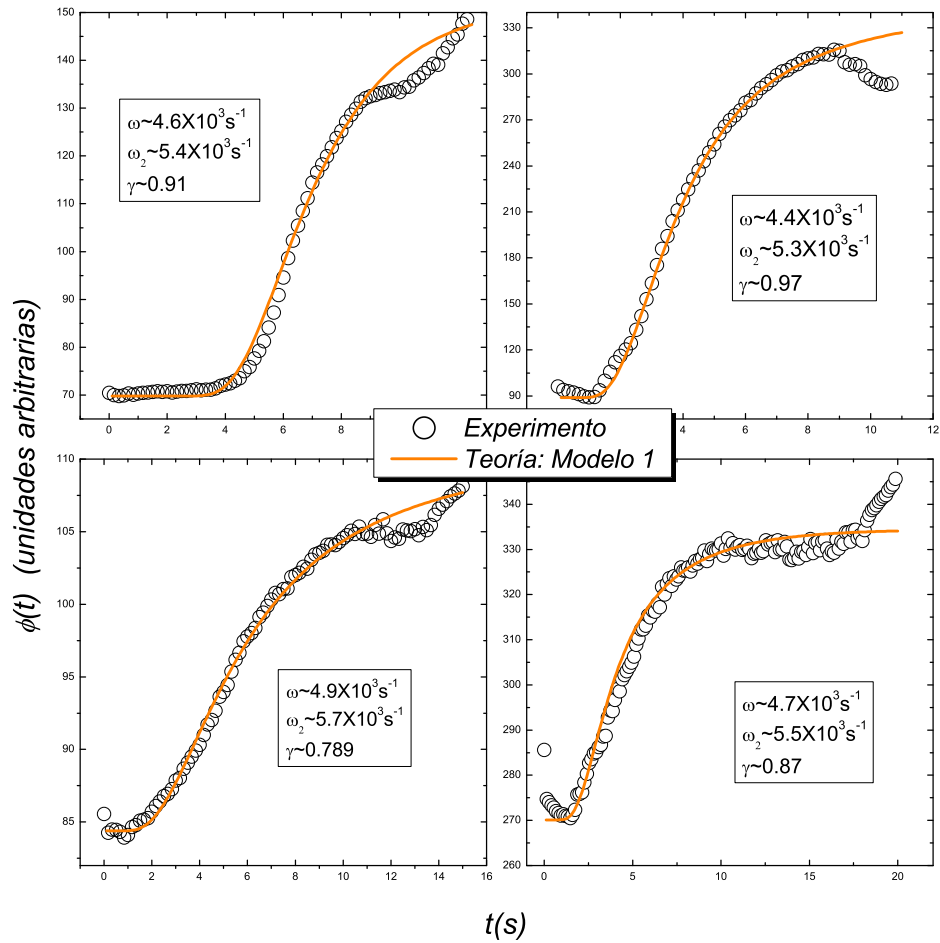


Figura 3.2: Comparación entre experimento y teoría para el caso de 4 muestras estimuladas electricamente utilizando el Modelo 1. El ajuste de la frecuencia se realiza muestra por muestra. Los valores de  $\omega$ ,  $\omega_1$  y  $\gamma$  aparecen en los recuadros. A pesar de la disparidad aparente, nótese que en todos los casos la frecuencia neta de las muestras se desvía poco del valor promedio  $\bar{\omega} \sim 4.6 \times 10^{-3} s^{-1}$ .

por la polimerización o despolimerización de los microtúbulos, por lo que la frecuencia  $\omega_1$  debe tener el mismo valor que en las células estimuladas eléctricamente.

Sin embargo, al igual que el modelo anterior, suponemos que el proceso sigue siendo no markoviano y que es necesario considerar los efectos del tamaño finito de las partículas brownianas a través del parámetro  $\epsilon$ . Con esto en mente, es posible resolver la ecuación de FP para el caso de la colchona de una manera completamente análoga a cómo se ha hecho en la sección anterior, únicamente modificando el signo de la fuerza.

En este caso, la ecuación de difusión de FP es

$$\beta(t) \frac{\partial P}{\partial t}(\mathbf{x}, t) = \frac{kT}{m} \nabla^2 P + \epsilon \omega_1^2 \nabla \cdot [P \mathbf{r}]. \quad (3.32)$$

Suponiendo que la condición inicial para el ensemble de partículas es una delta de Dirac  $P(\mathbf{x}, t) = \delta(\mathbf{x})$ , uno obtiene una distribución de probabilidad para las variables adimensionales  $\tilde{r}, \tau$  dada por

$$P(\tilde{\mathbf{r}}, \tau) = \frac{1}{2a^3 \pi^{3/2}} \left( \frac{\omega_1^2 \beta_0^2}{12\omega_T^4 \alpha^2} \right)^{3/2} \frac{\exp\left(-\frac{\omega_1^2 \beta_0^2 \tilde{r}^2}{12\omega_T^4 \alpha^2 [1 - \exp(-\omega_1^2/3\alpha\omega_T^2 - \tau)]}\right)}{[1 - \exp(\omega_1^2/3\alpha\omega_T^2 - \tau)]^{3/2}}, \quad (3.33)$$

la cual puede leerse en las variables originales  $r, t$  haciendo la aproximación a tiempos cortos de la ecuación (3.19):  $\tau \approx (\omega_1^2/6\alpha\omega_T^2)[t\beta_0]^{6\alpha\omega_T^2/\omega_1^2}$  y resultando en

$$P(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{2a^3 \pi^{3/2}} \left( \frac{\omega_1^2 \beta_0^2}{12\omega_T^4 \alpha^2} \right)^{3/2} \frac{\exp\left(-\frac{\omega_1^2 \beta_0^2 r^2}{12\omega_T^4 \alpha^2 a^2 [1 - \exp(-\omega_1^4/18\alpha^2\omega_T^4 [t\beta_0]^{6\alpha\omega_T^2/\omega_1^2})]}\right)}{[1 - \exp(-\omega_1^4/18\alpha^2\omega_T^4 [t\beta_0]^{6\alpha\omega_T^2/\omega_1^2})]^{3/2}}. \quad (3.34)$$

De la ecuación anterior, uno obtiene que el coeficiente efectivo de difusión es

$$D(t) = D_0 \left[ \frac{t}{t_0} \right]^{\frac{6\alpha\omega_T^2}{\omega_1^2} - 1} \exp\left(-\frac{\omega_1^4}{18\alpha^2\omega_T^4} \left[ \frac{t}{t_0} \right]^{6\alpha\omega_T^2/\omega_1^2}\right). \quad (3.35)$$

Usando la ecuación (3.25), el flujo de partículas está dado según la ecuación (3.25) para el caso de la fuerza  $\mathbf{F}(\mathbf{x}) = -\epsilon\omega_1^2\mathbf{x}$  por

$$\mathbf{J}(\mathbf{r}, t) = \left[ \frac{\omega_1^2 \beta_0^2}{6a^2 \omega_T^2 \alpha^2 [1 - \exp(-\frac{\omega_1^4}{18\alpha^2 \omega_T^4} [t\beta_0]^{6\alpha\omega_T^2/\omega_1^2})]} - \frac{m\epsilon\omega_1^2}{kT} \right] D(t) P(\mathbf{r}, t) \mathbf{r}, \quad (3.36)$$

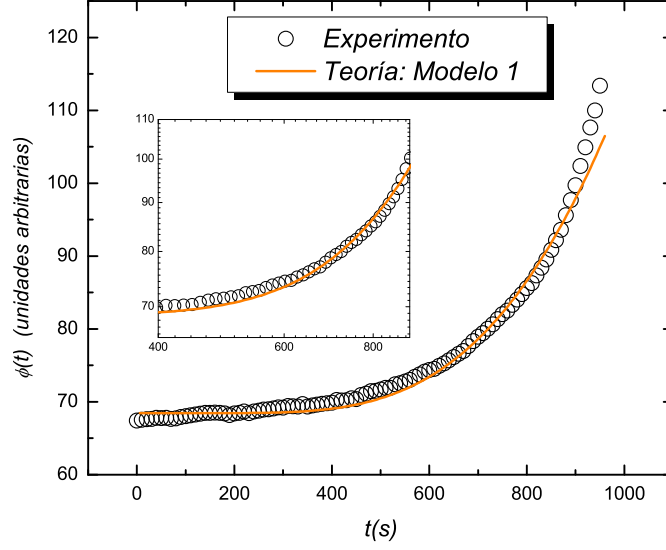


Figura 3.3: Ajuste de la cinética de fluorescencia para el caso de la colchicina utilizando el modelo 1. Los datos experimentales corresponden al promedio de ocho muestras. La frecuencia esperada es  $\omega_1 \sim 2.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ . El coeficiente de subdifusión es  $\gamma \sim 0.4097$ .

y la fluorescencia como función del tiempo es

$$\phi(t) = \phi_0 + 4\pi R_{cel}^2 \varphi \int_0^t \left[ \frac{\omega_1^2 \beta_0^2}{6a^2 \omega_T^2 \alpha^2 [1 - \exp(-\frac{\omega_1^4}{18\alpha^2 \omega_T^4} [t\beta_0]^{6\alpha\omega_T^2/\omega_1^2})]} - \frac{m\epsilon\omega_1^2}{kT} \right] D(t') P(R_{cel}, t') dt'. \quad (3.37)$$

Utilizando los mismos valores utilizados en la sección anterior para los parámetros físicos (con lo cual suponemos que la colchicina no modifica el valor de  $kT$ ,  $D_0$ ,  $a/\xi$ , etc.) se puede ajustar la curva promedio de fluorescencia en las células tratadas con colchicina. En la figura (3.3) se muestra el buen ajuste para las células dopadas con colchicina logrado por el Modelo 1. Los detalles de los parámetros aparecen en el pie de figura.



# Capítulo 4

## Modelo 2: Motores como resortes que se trasladan

Para entender la secreción somática de serotonina en las células control, en esta sección se presenta un modelo radicalmente distinto a los dos anteriores. En este modelo, se considera al motor como un resorte que jala de la vesícula mientras la base del motor mismo se traslada con velocidad constante hacia la membrana de la célula. El modelo 2, a diferencia del primero, es markoviano. Esto se debe a que el problema no markoviano para el modelo 2 es más difícil de resolver, por lo que su solución queda pendiente.

### 4.1. Hipótesis del modelo 2 y solución de la ecuación de FP

Supóngase que situamos un sistema de referencia justo en la base del motor que carga a la vesícula. Podemos suponer que la vesícula, en su proceso difusivo, únicamente ve el lazo del motor que la mantiene atada al microtúbulo y una multitud de organelos y redes que se aproximan y alejan de ella. Desde su perspectiva, la única fuerza que siente es una fuerza atractiva llevada a cabo por el motor y una arrastre “hacia atrás” que arquea el tronco del motor debido al contacto con los otros cuerpos que habitan el interior de la célula.

Este punto de vista supone que el mecanismo que guía a la vesícula durante su camino desde su posición inicial hasta la membrana no cambia de manera significativa en el trayecto, es decir, que situados en el centro de masa



del motor molecular, la vesícula sólo describe un proceso difusivo similar al realizado cuando no ha sido estimulada<sup>1</sup>. Para el caso de la participación activa de motores moleculares, la evidencia experimental señala que estos realizan un movimiento altamente procesivo con una velocidad  $v$  aproximadamente constante (Ver sección 1.2.2), lo cual sugiere una fuerza que se traslada como una perturbación ondulatoria

$$\mathbf{F}(\mathbf{x}, t) \propto \mathbf{x} - \mathbf{v}t. \quad (4.1)$$

La siguiente hipótesis del modelo es que la trayectoria promedio de las vesículas en la exocitosis es preferencialmente radial. Se sabe que en realidad los microtúbulos forman redes complejas en el interior de la célula. Sin embargo, es de suponer que en pro de la eficacia energética, los motores moleculares toman el camino más corto hacia su destino<sup>2</sup>. En el caso de la exocitosis, este camino es radial hacia afuera, por lo que podemos suponer que la velocidad promedio de los motores es también radial:  $v\hat{\mathbf{e}}_r$ , y por ende, la trayectoria de las vesículas es radial en primera aproximación:  $\langle \mathbf{x}(t) \rangle \approx vt\hat{\mathbf{e}}_r$ <sup>3</sup>.

Ahora hay que considerar la dirección de la fuerza. Para ello conviene regresar la discusión en términos de los paisajes de energía. Suponiendo que  $\omega_a^2$  mide la intensidad del arrastre, la fuerza  $\mathbf{F}(\mathbf{x}, t) = -\omega_a^2(\mathbf{x} - \mathbf{v}t)$  sugiere un paisaje de energía en forma de pozo que se desplaza del centro hacia afuera de la célula. En este caso, la vesícula permanecerá confinada en el pozo, moviéndose (en promedio) con velocidad constante  $v$  (Ver sección 1.3.2). Esta fuerza es similar a la fuerza de sujeción del Modelo 1.

Como en los casos anteriores, los efectos de tamaño finito serán considerados a través del parámetro  $\epsilon$ . En conclusión, el segundo modelo markoviano requiere la fuerza externa de la forma

$$\mathbf{F}(\mathbf{x}, t) = -\epsilon\omega_a^2(\mathbf{x} - \mathbf{v}t); \quad \mathbf{v} = v\hat{\mathbf{e}}_r \quad (4.2)$$

<sup>1</sup>Es decir, cuando aún no se han liberado el  $Ca^{2+}$  por cafeína o por impulsos eléctricos.

<sup>2</sup>Esto no es necesariamente el caso. Las vesículas pueden, en principio, llevar a cabo trayectorias que no sea radiales. Sin embargo, uno podría suponer que el movimiento es colectivamente radial si no hay ningún otro tipo de fuerza involucrada aparte de la de los motores, puesto que estos consumen menos energía entre menos distancia “caminen”.

<sup>3</sup>Lo anterior es válido únicamente cuando la velocidad del motor es relativamente pequeña comparada con el movimiento convectivo ejercido por el medio. Cuando esto no es el caso, veremos más adelante que aparece una corrección a la posición promedio que pondera la intensidad del arrastre.

La ecuación de FP correspondiente para la PDF  $P(\mathbf{x}, t)$  es entonces

$$\beta \frac{\partial P}{\partial t}(\mathbf{x}, t) = \frac{kT}{m} \nabla^2 P + \epsilon \omega_a^2 \nabla \cdot [(\mathbf{x} - \mathbf{v}t)P]. \quad (4.3)$$

Haciendo el cambio de variable  $\mathbf{y} = \mathbf{x} - \mathbf{v}t - \frac{\beta \mathbf{v}}{\epsilon \omega_a^2}$ , y recordando que en coordenadas esféricas el vector  $\mathbf{x}$  puede escribirse como  $\mathbf{x} = x \mathbf{e}_r$ , con  $x = \|\mathbf{x}\|$ , uno obtiene una ecuación de FP análoga a la que hemos resuelto antes

$$\beta \frac{\partial P}{\partial t}(\mathbf{y}, t) = \frac{kT}{m} \nabla_y^2 P + \epsilon \omega_a^2 \nabla_y \cdot [\mathbf{y}P]. \quad (4.4)$$

El subíndice  $y$  nos recuerda que los operadores en coordenadas esféricas deben también ajustarse con el cambio de variable.

Como antes, la condición de normalización  $\int_{V_x} P(\mathbf{x}, t) d\mathbf{x} = 1$  requiere una solución de la forma:  $P(\mathbf{y}, t) = \frac{1}{2\sqrt{\pi^3}} A^{-\frac{3}{2}}(t) \exp\left[-\frac{y^2}{A(t)}\right]$ , donde  $y^2 = |\mathbf{y}|^2$ . Usando la condición inicial de delta de Dirac, sustitución directa en la ecuación (4.4), lleva a que

$$A(t) = \frac{2kT}{m\epsilon\omega_a^2} \left[ 1 - \exp\left(-\frac{2\epsilon\omega_a^2}{\beta}t\right) \right]. \quad (4.5)$$

La PDF correspondiente es entonces

$$P(\mathbf{x}, t) = \frac{1}{2\pi^{3/2}} \left( \frac{m\epsilon\omega_a^2}{2kT} \right)^{\frac{3}{2}} \frac{\exp\left[-\frac{m\epsilon\omega_a^2(x-vt+\frac{\beta v}{\epsilon\omega_a^2})^2}{2kT[1-\exp(-\frac{2\epsilon\omega_a^2}{\beta}t)]}\right]}{\left[1 - \exp(-\frac{2\epsilon\omega_a^2}{\beta}t)\right]^{3/2}}. \quad (4.6)$$

Usando la ecuación (3.25) para el flujo en el caso markoviano obtenemos

$$\mathbf{J}(\mathbf{x}, t) = -\frac{kT}{m\beta} \nabla P(\mathbf{x}, t) - \frac{\epsilon\omega_a^2}{\beta} (\mathbf{x} - \mathbf{v}t) P(\mathbf{x}, t). \quad (4.7)$$

Sustitución directa de la ecuación (4.6) en (4.7), lleva a

$$\mathbf{J}(\mathbf{x}, t) = P(\mathbf{x}, t) \frac{\epsilon\omega_a^2}{\beta} \left[ \frac{(x - vt + \frac{\beta v}{\epsilon\omega_a^2})}{1 - \exp(-\frac{2\epsilon\omega_a^2}{\beta}t)} - (x - vt) \right] \hat{\mathbf{e}}_r. \quad (4.8)$$

Por argumentos completamente análogos a los expresados en la sección (3.5); uno puede obtener que la fluorescencia en la membrana celular  $\phi(t)$  evoluciona de acuerdo a (3.24), dando lugar a:

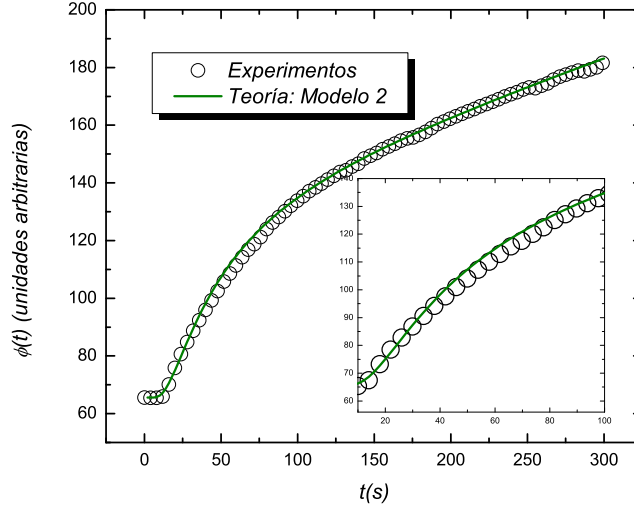


Figura 4.1: Ajustes de la cinética de fluorescencia para el caso de la cafeína utilizando el Modelo 2. La frecuencia utilizada para el ajuste es  $\omega_a \sim 4.28s^{-1}$ .

$$\phi(t) = \phi_0 + \frac{4\pi R_{cel}^3 \epsilon \omega_a^2 \varphi}{\beta} \int_0^t \left[ \frac{(R_{cel} - vt + \frac{\beta v}{\epsilon \omega_a^2})}{1 - \exp(-\frac{2\epsilon \omega_a^2}{\beta} t)} - (R_{cel} - vt) \right] P(R_{cel}, t') dt'. \quad (4.9)$$

## 4.2. Comparación con los experimentos

Para establecer un punto de comparación con el Modelo 1, utilizaremos los valores para todos los parámetros físicos ( $kT$ ,  $D_0$ ,  $\beta_0$ ,  $a$ ,  $m$ ,  $R_{cel}$ ). El único nuevo valor que se necesitó para hacer los ajustes de la frecuencia fue el de la velocidad media de los motores que se estima con ayuda de otros experimentos como  $v \sim 800nm s^{-1}$  ( $v \sim 0,8\mu m s^{-1}$ ) [2]. Con estos valores, es posible ajustar satisfactoriamente las curvas de fluorescencia para el caso de las células estimuladas con cafeína (Figura 4.1), y con impulsos eléctricos (Figura 4.2). Los valores de la frecuencia aparecen al pie de cada figura.

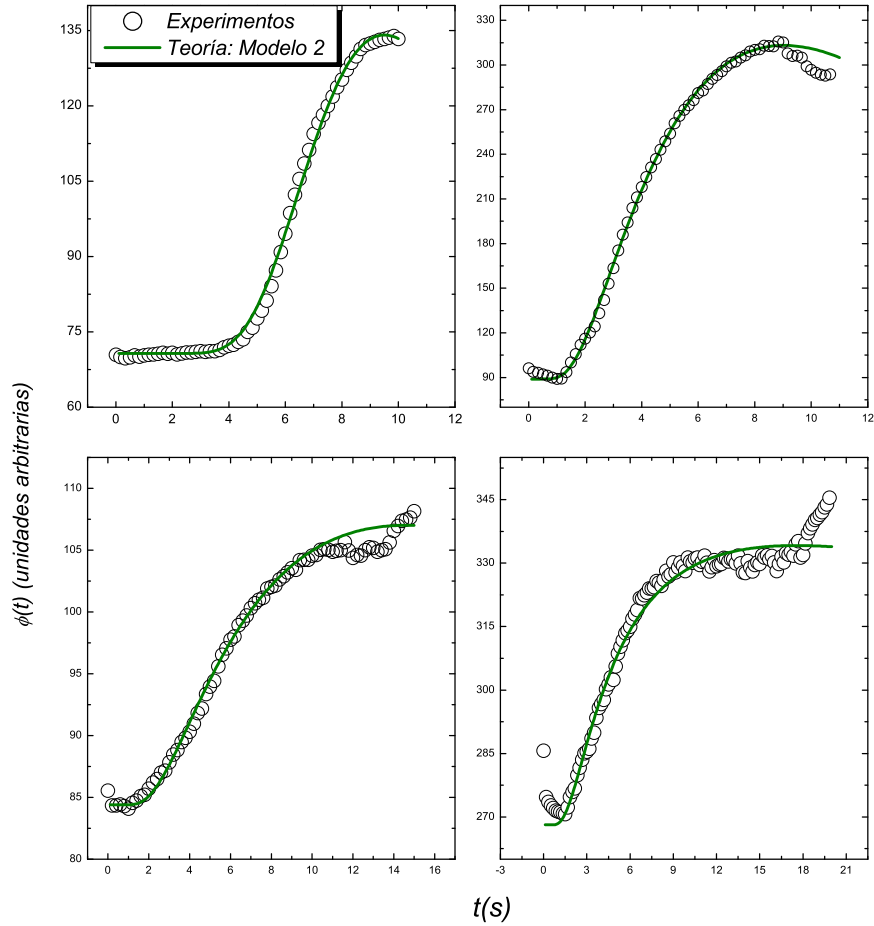


Figura 4.2: Ajuste de la fluorescencia para las células con estimulación eléctrica utilizando el Modelo 2. Los valores de frecuencia  $\omega_a$  obtenidos son: 99.3, 124, 85.7 y 42.6 Hertz respectivamente. El valor promedio es  $\omega_a = 81.9s^{-1}$ .

# Parte III

## Análisis

# Capítulo 5

## Discusión de los Resultados

### 5.1. Comparación entre ambos modelos

#### Ajustes

El ajuste se realizó de la siguiente manera. Se fijaron los valores de las cantidades físicas (como el coeficiente de difusión  $D_0$ , el de arrastre  $\beta_0$ , la energía térmica  $kT$ ) usando valores típicos para el tipo de medio acuoso que es el soma celular. Cantidades como el radio de la vesícula  $a$ , su masa  $m$ , el radio celular  $R_{cel}$  y el parámetro de red, se establecieron directamente a partir de las micrografías disponibles. En el caso del Modelo 2, también se ha usado  $v$ , la velocidad promedio de un motor molecular. Así pues, en ambos modelos el único parámetro a ajustar es la frecuencia<sup>1</sup>. En este sentido, ambos modelos resultan atractivos en tanto que únicamente requieren un parámetro a determinar que, por lo demás, resulta físicamente sencillo de interpretar.

El Modelo 1 presenta un muy buen ajuste de los datos para la colchicina y la cafeína, cuyas dinámicas son relativamente lentas comparadas con las estimuladas eléctricamente. Comparado con el Modelo 2 para el ajuste de la cafeína, las diferencias son mínimas y ambos modelos pueden reproducir su cinética satisfactoriamente (Ver Figura (5.1)). No obstante, en el caso de la estimulación eléctrica, las diferencias entre ambos modelos son más apreciables (Ver Figura (5.2)). Aunque ambos reproducen de manera satisfactoria la dinámica de fluorescencia tanto a tiempos cortos (cuando apenas inicia

---

<sup>1</sup>Ya sea la frecuencia de arrastre efectivo  $\omega$ , la de atrapamiento  $\omega_0$  en el caso de la colchicina, o la frecuencia  $\omega_a$  del modelo 2.

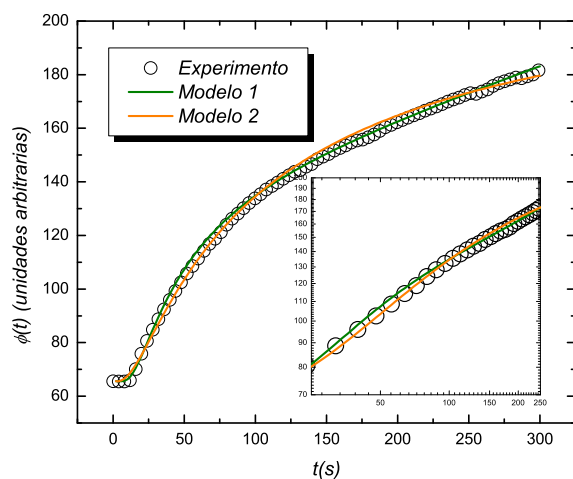


Figura 5.1: Comparación entre ambos modelos para el caso de las muestras con caféina. Recuadro: cinética a tiempos intermedios.

la activación) como largos (cuando generalmente se espera una dinámica de saturación), el modelo (2) resulta mucho más preciso para ajustar el comportamiento a tiempos intermedios (aproximadamente entre 2 y 8 segundos).

Estas observaciones indican un par de cosas. Primero, que una cinética de secreción relativamente lenta no distingue entre ambos modelos, y segundo, que las hipótesis del segundo modelo son más apegadas al funcionamiento real de un motor. Esto puede entenderse en términos de la PDF y cómo difiere en ambos modelos. En la figura (5.3), se observa la evolución de la PDF en el tiempo para ambos modelos. Para el modelo 1, se observa que la PDF es una gaussiana que se va ensanchando: el paquete inicial de vesículas se va esparciendo con el tiempo, pero no se mueve de su posición inicial. En el caso del Modelo 2, el máximo de la PDF se traslada hacia la derecha: no sólo las vesículas separadamente tienen un movimiento neto promedio hacia la membrana celular, sino también el paquete.

En el Modelo 2, el desplazamiento de las partículas se realiza con una velocidad determinada: el paquete es jalado por los motores, y por ello, el paquete puede moverse como grupo. En el primer modelo, las partículas también se mueven hacia afuera, pero lo hacen debido solamente a las fluctuaciones térmicas: lo único que diferencia este comportamiento de la difusión normal es la intensidad con que se mueven hacia afuera, no la forma.

Puesto que el Modelo 2, que es markoviano, reproduce mejor los resultados que el Modelo 1 que es no-markoviano, cabría esperar que la versión no-markoviana del Modelo 2, mejoraría aún más los ajustes logrados.

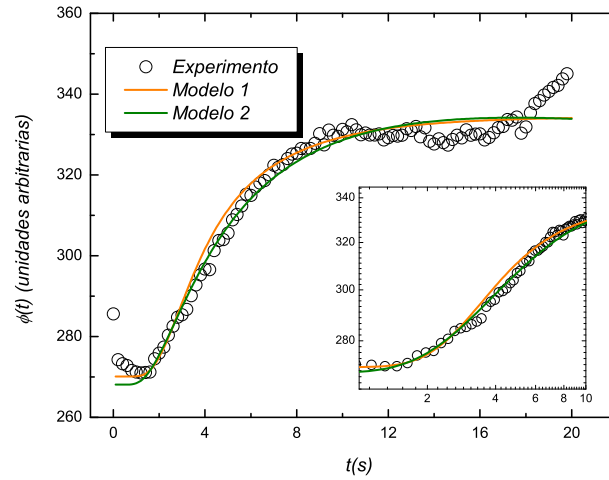


Figura 5.2: Comparación entre ambos modelos para el caso de una de las muestras estimulada eléctricamente.

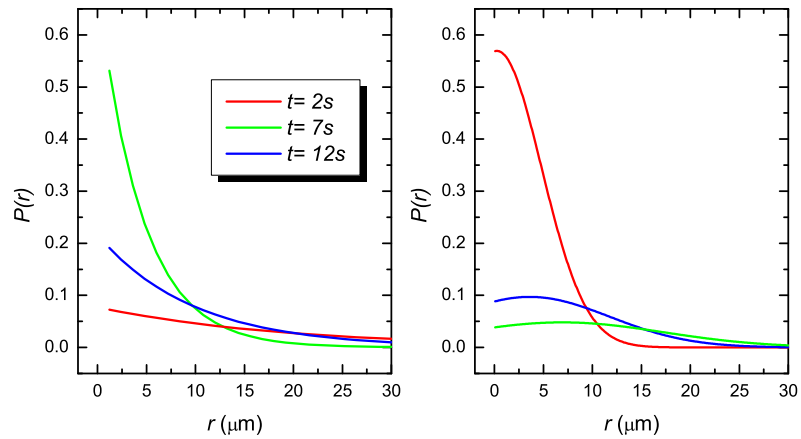


Figura 5.3: Se grafica la PDF como función de la posición para tres distintos tiempos. Se compara el modelo de fuerzas armónicas (izquierda) con el traslacional (derecha) para el caso de una muestra estimulada eléctricamente.



## Relación entre la velocidad de las vesículas y la de los motores

La discusión anterior puede ponerse en términos de la velocidad de las partículas y del paquete. Esto resulta sencillo de cuantificar para el Modelo 2. Uno puede calcular el promedio de la PDF dada por la ecuación (4.6) y encontrar que

$$\langle \mathbf{x}(t) \rangle = \mathbf{v}t - \frac{\beta}{\epsilon\omega_a^2} \mathbf{v} \quad (5.1)$$

En este caso,  $\mathbf{v}$  es la velocidad que asignamos a los motores moleculares y coincide con la velocidad del paquete de vesículas, ya que

$$\frac{d}{dt} \langle \mathbf{x}(t) \rangle = \mathbf{v}. \quad (5.2)$$

El segundo término de la ecuación (5.1) es una constante que mide qué tanto se retrasa la vesícula-cargo por la acción del fluido respecto a la posición del motor  $\mathbf{v}t$ . Contiene en el numerador la fuerza de arrastre  $-\beta\mathbf{v}$ , indicando que un medio muy viscoso dificulta el movimiento a través de él y que, por ende, las partículas brownianas serán frenadas en su movimiento hacia la membrana. En el denominador aparece el coeficiente de la fuerza de arrastre  $\epsilon\omega_a^2$ ; esto indica que a mayor fuerza del motor, menor será la influencia de la fuerza de arrastre debida a la viscosidad del fluido.

Por otro lado, el Modelo 1 no puede dar cuenta de la velocidad de los motores. Con las hipótesis del Modelo 1 se encuentra que la posición promedio de las vesículas es cero:  $\langle \mathbf{x} \rangle = 0$ . Esto implica que la velocidad del paquete mismo es cero. El paquete no se mueve de su posición original y lo único que hace es difundirse. Esto no corresponde a un buen modelo de un proceso donde hay un motor molecular. Uno espera que el paquete mismo se mueva con velocidad constante  $v$  (como lo hace un motor). Este es un defecto del modelo, cuya solución puede radicar en la elección de la posición de equilibrio del potencial armónico y de la condición inicial<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup>Sin embargo, éste modelo resulta un tanto más complicado. En la sección (5.3) se esboza un poco de la posible solución.

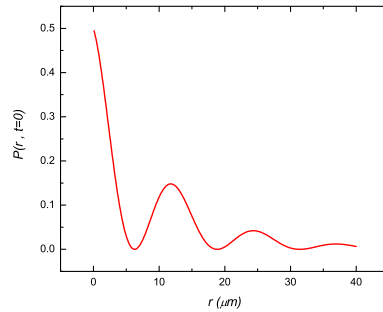


Figura 5.4: Se grafica una condición inicial quizá más apegada a la realidad que la utilizada en nuestro trabajo. Esta en particular tiene la forma  $P(r, t = 0) = P_0 e^{-at} \cos^2(bt)$ ,  $a$  y  $b$  constantes.

## La condición inicial de delta de Dirac

De las aproximaciones hechas para ambos modelos <sup>3</sup>, quizá la hipótesis menos apegada a la realidad sea la condición inicial de la PDF:  $P(\mathbf{x}, t = 0) = \delta(\mathbf{x})$ . Esto significa que en la resolución de la ecuación hemos supuesto que todas las partículas brownianas están en el centro de la célula al momento de iniciarse los procesos de activación.

No obstante, sabemos de la microscopía realizada en neuronas de Retzius que las vesículas se encuentran distribuidas en todo el soma celular. Esto significa que puede haber partículas que arriben a la membrana prácticamente en el momento de la activación, a diferencia de nuestros modelos, donde las vesículas del paquete (que hemos supuesto confinado en el centro) tarda un cierto tiempo en arribar a la membrana. Además, se sabe que la distribución original de vesículas en el interior de las neuronas es aproximadamente esférica en casquetes concéntricos, por lo que sería necesario modificar la condición inicial, por algo más parecido a lo esquematizado en la Figura (5.4).

Sin embargo, es difícil apreciar del diseño experimental utilizado qué tanto afecta la condición inicial a ambos modelos. Por ejemplo, en el caso de las células activadas por impulsos eléctricos, aparece otro factor que impide distinguir lo aproximado de nuestra hipótesis: los trenes de impulsos. En varias muestras, la cinética exhibe crecimiento escalonado (Figura (1.5)) que bien puede deberse a la periodicidad del protocolo de estimulación, o bien, a

<sup>3</sup>Entre las que destacan la aproximación a tiempos cortos del Modelo (1) y el uso de un dominio infinito. Tácitamente, en todas las deducciones, hemos utilizado que el dominio de integración de la PDF es infinito. Sin embargo, el proceso de la secreción somática tiene un dominio finito, a saber, el interior de la célula. Un modelo más preciso de la exocitosis deberá considerar la forma en que la membrana celular afecta la difusión, quizá mediante el uso de paredes absorbentes. Nuestra aproximación parece válida en tanto  $P(R_{cel}, t) \sim 0$  en ambos modelos.

la periodicidad de la distribución de los cúmulos en el interior de la célula. De manera similar, en procesos lentos como en la colchicina y la cafeína, la dificultad estriba en distinguir qué parte de la cinética lenta se debe a la hipótesis de que los cúmulos están lejos de la membrana inicialmente y qué parte se debe a la lentitud propia del proceso, es decir, si lo estamos observando a tiempos muy cortos para que se desarrolle.

A todo esto, hay otro elemento que impide determinar si la aproximación hecha para la condición inicial es determinante o no, y esto es la variabilidad biológica de las muestras originales mismas.

### Variabilidad biológica

En el caso de la colchicina hemos hecho el ajuste al promedio de 8 curvas, mientras que en el de la cafeína, el ajuste se ha hecho sobre el promedio de 4. No así el caso de las células estimuladas eléctricamente (sin colchicina), en donde se ha optado por hacer el ajuste de muestra por muestra. El factor determinante para proceder así es el grado de regularidad de las muestras: en los primeros dos casos (cafeína y colchicina), las muestras son muy parecidas entre sí, mientras que en el caso de las células estimuladas eléctricamente cada una exhibe cinéticas muy distintas una de otras.

La diversidad de comportamiento puede explicarse de dos formas. La primera, sería aceptar que la variabilidad se daría para todos los casos, sin embargo, no se aprecia en los procesos lentos (cafeína y colchicina) porque el tiempo que duró la medición fue muy corto para empezar a notar cambios significativos entre una y otra muestra. La segunda forma, quizá la más acertada, es pensar que la variabilidad es exclusiva de las células control. Esto significaría que la respuesta de la célula a la estimulación eléctrica es muy sensible a las condiciones en que se realice<sup>4</sup>. Esto querría decir también, que las condiciones en el interior de la célula alcanzadas por la colchicina o la cafeína no se modifican mucho en el tiempo de medición.

Dado esto, en el caso de la colchicina y la cafeína hemos graficado el ajuste para el promedio del ensemble; mientras que en el caso de las células control, se ha optado por hacer el ajuste de muestra por muestra. Se han escogido aquellas que presentan cinética de saturación y las que tienen un sólo escalón.

---

<sup>4</sup>Por ejemplo, en qué parte de la célula se coloca el cátodo, al tiempo que ha pasado desde su extracción o tratamiento, a la intensidad o la frecuencia del voltaje recibido, etc.

Otro aspecto a considerar dentro del tema de la diversidad de los resultados es el de cómo afecta la diversidad de las muestras mismas a los resultados. Por ejemplo, es necesario llevar un control acerca del tipo de células que se utilizan para los experimentos, considerando la edad, sexo y *habitat* de las sanguijuelas utilizadas. Esto debido a que diferencias en estos aspectos pueden estar asociadas a reacciones diferentes del sistema nervioso central, y por ende, de la respuesta de cada neurona a la estimulación.

Además, la gran variabilidad que existe entre las muestras estimuladas eléctricamente tiene otra posible fuente: el cambio en la capacitancia de la membrana celular. Cuando un estímulo eléctrico produce la exocitosis, las vesículas alcanzan la membrana, aumentando su tamaño. Esto a su vez afecta la capacitancia eléctrica de la membrana, lo que afecta su respuesta al siguiente tren de estímulos eléctricos. De este modo, la respuesta del segundo tren de impulsos es diferente a la del primero, pero depende sensiblemente de la respuesta a éste. Lo mismo sucede para trenes subsecuentes: dependen de qué tanto respondió la célula al estímulo anterior. Esto hace que la respuesta en el tiempo sea altamente sensible a cómo sucedió el primer impulso.

En cualquier caso, no tenemos que olvidar que las muestras originales, es decir, las neuronas de Retzius de una sanguijuela, exhiben variabilidad biológica. A diferencia de un ensemble realizado *in vitro* con esferas y redes sintetizadas *ex profeso* para un experimento (donde la posición inicial de las partículas brownianas puede controlarse al igual que la distribución y concentración de redes poliméricas), en el caso de muestras celulares, ni las vesículas ni la distribución de organelos es controlable: no porque no se puedan modificar las condiciones originales, sino que el *quid* de la experimentación en Biología es tratar de modificarlas lo menos posible para entender cómo funcionan en la vida real (*literalmente*).

El enfoque de Fokker-Planck como el de la ecuación de Langevin es estocástico, es decir reproducen el comportamiento colectivo de un ensemble de muestras preparadas de la misma manera. Sin embargo, el comportamiento de las muestras control está lejos de parecer un ensemble homogéneo. Desde este punto de vista, en el caso de las células del protocolo eléctrico resulta inútil realizar el ajuste sobre el promedio de las muestras, pues estaríamos promediando no sólo sobre el ensemble, sino también sobre la variabilidad de las condiciones iniciales<sup>5</sup>, de la respuesta al estímulo eléctrico, de la distribu-

---

<sup>5</sup>La variabilidad de las condiciones iniciales sí se toma en cuenta en el enfoque de Langevin, no así en el de Fokker-Planck.

ción de organelos, etc.

No obstante, aún es posible hablar de una propiedad común a estas células y que es ajustable por ambos modelos: la frecuencia que mide la intensidad del amarre o del arrastre. En este aspecto, las muestras control sí presentan regularidad.

## Frecuencias

En ambos modelos, son las distintas frecuencias el único parámetro que se necesitó para reproducir la cinética de fluorescencia, y como tal, es el parámetro físico más relevante en este trabajo.

En todos los casos, las frecuencias aparecen en el contexto de una fuerza:

$$\mathbf{F}(\mathbf{x}) \propto \omega^2 \mathbf{x}, \quad (5.3)$$

y como tal tiene unidades de fuerza por unidad de masa y de distancia<sup>6</sup>. Recordando la relación  $\omega = \sqrt{\frac{k}{m}}$  para un resorte, uno puede ver la acción del tronco del motor molecular como un resorte de constante  $k$ , tirando de la vesícula tanto hacia afuera de la célula ( $\omega_1$ ), como hacia el microtúbulo ( $\omega_0$  en el primer modelo y  $\omega_a$  en el segundo).

Sin embargo, cuando se quiere relacionar la frecuencia con otras cantidades, es más conveniente hablar de la frecuencia efectiva  $\omega_{eff}$ . Esto se debe a que en los dos modelos, en la forma de la fuerza, la frecuencia siempre aparece acompañada del factor  $\epsilon$ , que como se ha explicado, es un parámetro relacionado con otras cantidades físicas ( $a, T, \beta_0, m$ ), y que proviene de considerar el tamaño finito del móvil moviéndose en un medio fluido. El valor encontrado para  $\epsilon$  fue de  $2.2 \times 10^{-3}$ . De aquí se deduce que la acción del medio sobre el movimiento de la vesícula sea disminuir la frecuencia a la que oscilaría la vesícula en el vacío, lo cual parece razonable.

A continuación presentamos una tabla con el resumen de las frecuencias encontradas en los ajustes. En el caso particular de las células control, se especifica el promedio de las muestras ajustadas.

	Muestras	$\omega(10^3 s^{-1})$	$\omega_{eff}(s^{-1})$
Modelo (1)	Colchicina( $\omega_0$ )	2.5	13.1
	Cafeína ( $\omega$ )	7.9	27.5
	Control <sup>7</sup> ( $\bar{\omega}$ )	4.6	21.7

<sup>6</sup>Recuérdese que la ecuación de FP (2.22) considera la fuerza por unidad de masa y que  $\epsilon$  es un parámetro adimensional

	Muestras	$\omega(s^{-1})$	$\omega_{eff}(s^{-1})$
Modelo (2)	Colchicina( $\omega_0$ )	*	*
	Cafeína ( $\omega_a$ )	4.28	0.201
	Control ( $\overline{\omega_a}$ )	81.9	4.04

Para empezar, es menester decir que no tenemos una forma de comparar directamente estos valores, pues no sabemos de algún otro modelo o experimento similar. En este sentido, los valores presentados en este trabajo pueden sentar base para futuras investigaciones; lo único que podemos hacer de momento es comparar los valores de frecuencias entre sí y entender su significado.

Primero, empecemos con el caso de la colchicina donde sólo tenemos el Modelo 1 a considerar. Se logró un buen ajuste con una frecuencia  $\omega_1$  del mismo orden de magnitud que la frecuencia térmica  $\omega_T \approx 1.8 \times 10^3$ . Como se puede ver en la tabla anterior, todas las frecuencias del Modelo 1 están en este orden de magnitud. En nuestro Modelo 1 para el transporte activo llevado a cabo por la entrada de cafeína y por el protocolo de impulsos eléctricos, hemos supuesto que la frecuencia de amarre es la misma que la frecuencia obtenida para la colchicina. De ahí, dedujimos el valor de  $\omega_2$ , que está relacionada con el arrastre, y por lo tanto, con la fuerza ejercida por los motores. Esto parece una hipótesis plausible en tanto que la colchicina despolimeriza los microtúbulos, lo cual hace imposible a los motores moleculares actúen como transportadores y sólo deja su acción de sujeción.

Observando la tabla anterior, resulta que en el Modelo 1, la fuerza de arrastre neto en las células tratadas con cafeína resulta mayor que en las células control. Esto resulta inesperado, ya que la fluorescencia en las células control fue mayor y más acelerado que en las células con cafeína. La primera hipótesis que explicaría esta contrariedad es que el tiempo para que se desenvuelva por completo la difusión con la cafeína es mucho mayor al tiempo registrado; esto implicaría que estamos ajustando una región donde no hay mucha información y que en realidad puede ser ajustada por otro valor de  $\omega$ . Sin embargo, el segundo modelo parece refutar la idea de que esta contrariedad sea simplemente un fallo práctico. En el caso del segundo modelo, la frecuencia de amarre  $\omega_a$ , es menor en la cafeína, confirmando que el arrastre debe ser mayor que en las células de protocolo eléctrico. Quizá, la solución a este problema sea que la estimulación por cafeína, en realidad, cambia alguna de las otras cantidades físicas involucradas en el interior de la célula (quizá la temperatura, la disposición de las redes de microtúbulos, el

radio de las vesículas, etc.), o quizá simplemente la cinética de fluorescencia para la cafeína funciona de manera completamente distinta a la que hemos supuesto.

Por ello, en el caso del control eléctrico y de la cafeína en el modelo 1, se ha decidido reportar únicamente la frecuencia neta  $\omega$  y no separadamente el amarre ( $\omega_0$ ) o el arrastre ( $\omega_1$ ), dejando pendiente la cuestión de qué tanta información la colchicina puede proporcionar al respecto. En este sentido, también resulta directa la relación entre  $\omega_a$  del segundo modelo y  $\omega_0$  del primero. Aunque ambos miden la fuerza con que sujeta el cuello enlazador a la vesícula, no sabemos qué otra influencia puede tener la colchicina en la célula según lo que se acaba de discutir.

En cuanto a las células control, ambos modelos ajustan bien los datos. Resulta interesante notar que, a pesar de la diversidad de las muestras ajustadas, la frecuencia obtenida para cada uno de ellas es muy parecida a su valor promedio. En el caso del modelo 1 todas las frecuencias oscilan alrededor de  $\bar{\omega} \approx 4.6kHz$ , mientras que para el segundo modelo, las frecuencias están alrededor de  $\bar{\omega}_a \approx 81.6kH$ .

Sólo resta discutir la diferencia de magnitud entre las frecuencias del primer modelo y del segundo. En el primer modelo, todas las frecuencias reportadas son del orden de  $10^3$  Hz, mientras que en el segundo son del orden de 1 o incluso menores. La única razón para ello es que ambos modelos son radicalmente distintos. En el primer modelo, el movimiento preferencial hacia la membrana es logrado con un paisaje de energía descendente; en el caso de segundo modelo, el movimiento se debe a que los motores jalan a las vesículas. No hay punto de comparación.

## 5.2. Relación con otros modelos

Como se ha dicho antes, no tenemos noticia de experimentos similares para establecer una comparación directa. Sin embargo, en la actualidad se realizan experimentos que bien podrían ajustarse para reproducir condiciones parecidas a las modeladas en este trabajo. Para ello analicemos a grandes rasgos cómo hemos modelado la secreción somática de serotonina: esferas pequeñas (vesículas) se mueven tanto por un golpeteo aleatorio de las partículas del medio fluido (movimiento browniano), como por un resorte que jala de ellas hacia la membrana (el motor molecular); el resorte mismo está atado a redes (microtúbulos) que se distribuyen de manera homogénea en el medio

(soma celular) que hemos supuesto también homogéneo. Esta visión simplificada permite establecer para ambos modelos una relación entre los motores y los resortes a través de la constante de Hooke  $k$ , entre los microtúbulos y un medio en forma de red a través del coeficiente de subdifusión  $\gamma$ , y entre la sujeción de las vesículas a los microtúbulos y pruebas de viscoelasticidad a través del modulo de rigidez  $G$ .

En pruebas de motilidad molecular [4], es posible medir la fuerza con que un motor tira de su carga y el desplazamiento que dicha fuerza produce. Entonces se puede asociar la fuerza del motor molecular con una constante de Hooke. De nuestros modelos, se puede determinar la constante del resorte al relacionar la fuerza ejercida por el microtúbulo  $\mathbf{F}(\mathbf{x}) = -k\mathbf{x}$  con la amplitud del desplazamiento en cada paso. En este caso, a la **constante de Hooke** (definida como  $k = m\omega^2$ ) podemos relacionarla con  $\omega_0$  en el caso del modelo 1 y con  $\omega_a$  en el caso del segundo modelo. Por lo que experimentos de motilidad molecular realizados con motores y vesículas similares a las que usamos, podría confirmar nuestras predicciones para la constante de Hooke. Éstas son

Modelo	Muestras	$k(N/m^2)$	
Constante de Hooke	1	Colchicina( $\omega_0$ )	$1,7 \times 10^{-10}$
	2	Cafeína ( $\omega_a$ )	$4,0 \times 10^{-14}$
		Control ( $\bar{\omega}_a$ )	$1,6 \times 10^{-14}$

En todos los casos, es la frecuencia efectiva,  $\omega_{eff} = \sqrt{\epsilon\omega^2}$ , la que puede asociarse a las otras cantidades físicas. En este punto uno podría preguntarse por la aparición del parámetro  $\epsilon$ . Si lo que siente la vesícula es finalmente es la frecuencia efectiva  $\omega_{eff}$ , ¿por qué razón es necesario éste otro parámetro en el modelo? La respuesta es que se busca incluir el modelo en otros contextos de la física. En particular, la inclusión del parámetro  $\epsilon$  (relacionado con otras cantidades como  $\beta, a, T, m$ ), permite entender fenómenos de subdifusión [6] [19].

El primero modelo de nuestro trabajo se ubica en el contexto de los modelos que aspiran a explicar la subdifusión [19]. Como ya se ha dicho, éstos son aquellos en los que el MSD no crece linealmente con el tiempo, sino con alguna potencia de  $t$ :  $\langle r^2(t) \rangle \propto t^\gamma$  con  $0 < \gamma < 1$ . En nuestro modelo 1 (para el caso particular de la colchicina), la aproximación a tiempos cortos para el



MSD puede estimarse directamente de la PDF dada en la ecuación (3.34)

$$\langle r^2(t) \rangle = \frac{\omega^2}{\omega_T^2 \beta_0^{(1+\gamma)}} t^\gamma, \quad (5.4)$$

donde hemos identificado el exponente de subdifusión

$$\gamma = \frac{6\alpha\omega_T^2}{\omega^2}. \quad (5.5)$$

El modelo 1 explica entonces la subdifusión y cómo el exponente de subdifusión  $\gamma$  depende únicamente de la razón  $a/\xi$  (puesto que  $\alpha = \alpha(a/\xi)$ ). Esto hace de esta técnica un modelo confiable para la verificación de nuestro modelo. Además, los materiales utilizados permiten ajustar los valores de  $\xi$  y de  $a$  de manera que sea sencillo reproducir las condiciones del interior de las células Retzius con materiales inorgánicos de manera artificial. Lo que resulta más complicado es encontrar un mecanismo similar al de los motores.

Finalmente, se puede tender un lazo entre nuestro modelo y la medición indirecta del **módulo de rigidez**  $G$ . En experimentos de viscoelasticidad microscópica, se utiliza a las fluctuaciones térmicas para medir  $G$  en muestras que consisten de redes y solvente [25]. Dicha muestra se coloca en un aparato que permite variar la frecuencia con la que oscilan las esferas, las cuales tienen un índice de refracción mayor al de la muestra y están sujetas a las redes. Las fluctuaciones térmicas hacen que las partículas (y la red misma) oscilen. Cuando la frecuencia del instrumento es la misma que la frecuencia de la partícula se produce resonancia, caracterizada por desplazamientos grandes. Al relacionar el desplazamiento de la esfera con las propiedades elásticas de la red, se puede establecer una relación entre el módulo de rigidez  $G$  y la frecuencia aplicada  $\omega$ . En el límite lineal, la relación está dada por [25]

$$G = \omega\eta \left( \frac{a}{\xi} \right)^2 \quad (5.6)$$

donde  $\eta = \frac{m\beta}{6\pi a}$  es la viscosidad del solvente. Los valores obtenidos son

Modelo	Muestras	$G$ (Pa)
1	Colchicina	$1,1 \times 10^{-5}$
	Cafeína	$2,3 \times 10^{-5}$
	Control	$1,8 \times 10^{-5}$
2	Cafeína	$1,6 \times 10^{-7}$
	Control	$3,4 \times 10^{-6}$

De este modo, futuros experimentos en condiciones similares pueden decidir sobre la fiabilidad de cualquiera de ambos modelos.

### 5.3. Perspectivas

Una de las virtudes de los modelos estudiados es su sencillez. Es de pensar que otros proceso difusivo en el que participan los motores moleculares lineales puede ser aproximado por los modelos aquí presentados. Por ello, la mejora del presente trabajo se hace indispensable. En ésta línea, hemos esbozado ya en esta discusión varias maneras de mejorar ambos modelos, como por ejemplo, tomar condiciones iniciales más realistas, avanzar en el nivel de las aproximaciones a tiempos cortos para el Modelo 1, resolver analítica o numéricamente la ecuación de FP del Modelo 2 en el caso no markoviano, considerar paredes absorbentes, etc.

Por otro lado, existen incógnitas que éste trabajo deja pendientes y que pueden ser resueltas con la implementación de experimentos nuevos y más específicos. Así por ejemplo:

1) ¿qué tan buenos pueden ser los experimentos basados en el incremento de la fluorescencia en la membrana celular para conocer la dinámica de los motores? El arreglo experimental sólo nos permiten ver la cinética de difusión “por fuera”. Una manera más directa de conocer el funcionamiento de los motores estaría ligada con el seguimiento de las vesículas mismas, es decir, con la medición directa de  $\langle x(t) \rangle$  y del MSD. Esto puede lograrse con métodos muy similares a los de fluorescencia utilizados en los experimentos, y de hecho, ya hay pruebas preliminares para estos experimentos.

2) ¿Qué hace tan diferentes los resultados entre las células estimuladas por cafeína y aquellas estimuladas eléctricamente? Hemos visto que ambos modelos predicen frecuencias de amarre más bajas de las reportadas para las células control, lo cual es inesperado tomando en cuenta que la cinética de las primeras fue mucho más acelerada. Sería necesario hacer pruebas más específicas con cafeína para tener en cuenta cuáles parámetros se están escapando a los modelos aquí presentados. Quizá se deba cambiar el valor de algunas variables físicas, o quizá, ambos modelos son insuficientes para dar cuenta de la complejidad del proceso activado por la cafeína

3) Mucho más importante aun, es necesario estudiar los resultados de otros procesos llevados a cabo por motores moleculares. Es difícil imaginar un equivalente “artificial” de un motor molecular con el cual puedan lle-

varse a cabo experimentos perfectamente controlados de difusión. Por ello, la generalidad del modelo sólo puede establecerse comparando con otros experimentos llevados a cabo en otro tipo de células donde motores citoesqueléticos participen en la secreción. Ésta es la única piedra de toque de nuestros modelos.

Finalmente, dentro del terreno teórico hay diversos temas que continúan a este trabajo.

Por ejemplo, falta considerar la endocitosis. Hay evidencia de que la endocitosis también es llevada a cabo por motores moleculares; por ello, un modelo similar al de este trabajo debería poder dar cuenta de la cinética. Sin embargo, para resolver el problema también hay que considerar el doble proceso seguido por las vesículas de ida y de vuelta y su entrecruzamiento (*crosswalk*) a lo largo de los microtúbulos; aun más, se debe considerar el hecho de que probablemente tanto la endocitosis como la exocitosis son llevadas a cabo por distintos motores y que éstos pueden interactuar [3]. No obstante, poco se sabe aún de cómo se lleva a cabo la dinámica de entrecruzamiento o de qué motores (en el caso de que tenga verdaderamente alguna participación) llevan a cabo la endocitosis.

Por otro lado, hay pruebas de que la velocidad de los motores moleculares depende a tiempo cortos de la concentración de  $Ca^+$  en el medio (es decir, que la velocidad no siempre es constante). Además, aunque los motores alcanzan una velocidad constante rápidamente, existen pequeñas variaciones de su velocidad promedio dependiendo de la disponibilidad del  $Ca^+$ . A parte de las herramientas utilizadas en este trabajo, sería necesario conectarlas con la cinética química del proceso: es decir, relacionar la procesividad del motor con el consumo ATP y la presencia de  $Ca^+$ .

Otro problema teórico tiene que ver con el defecto encontrado en el Modelo 1, donde la velocidad del paquete no coincidía con la velocidad de los motores moleculares. Probablemente la solución a este problema pueda lograrse cambiando la posición de equilibrio del resorte a la membrana celular. Esta condición haría que el cúmulo de vesículas situado en el centro sea tirado por la fuerza externa hacia la membrana y haría que el paquete se moviera hacia afuera. Esto, a su vez, cambiaría la posición promedio de las vesículas y su velocidad de grupo que coincidirían con la posición y velocidad promedio del resorte.

# Capítulo 6

## Conclusiones

La secreción somática de serotonina puede modelarse como un proceso difusivo acoplado a fuerzas externas. Esto puede llevarse a cabo con ayuda de la ecuación de Fokker-Planck, donde el término de difusión incorpora el movimiento browniano de las vesículas secretoras, y el término de arrastre, la acción de los microtúbulos sobre ellas.

En un proceso de secreción, la acción de los motores puede simplificarse. La compleja caminata del motor es modelable de dos maneras: 1) como un paisaje de energía descendente que favorece el movimiento hacia el exterior de la célula; ó 2) como un resorte que jala a las vesículas mientras él mismo se traslada hacia el exterior.

Cuando la fuerza con que el tronco del motor se sujeta a la vesícula se aproxima por una fuerza armónica, es posible encontrar una frecuencia característica de oscilación de las vesículas. Esta frecuencia puede relacionarse con experimentos en motilidad molecular, subdifusión y viscoelasticidad microscópica.

A pesar de que la acción de los motores moleculares es favorecer la difusión, en procesos en el interior de una célula, la secreción puede ser subdifusiva, debido a la presencia de la red

de microtúbulos. Por ende, cualquier modelo de la difusión guiada por motores debe considerar el tamaño finito de la partícula y su relación con la red del citoesqueleto.

Dada la poca información de este tipo de procesos, es necesario llevar a cabo más experimentos donde la secreción sea inducida por motores para verificar los modelos realizados en este trabajo, al igual que es menester la mejora de éstos.

Finalmente, esta investigación puede sentar las base de nuevas inquisiciones, por ejemplo, en relación a la endocitosis, o a la relación que guarda la velocidad de los motores con la presencia de  $Ca^+$ .

# Índice alfabético

- cafeína, 7
- cochicina, 7
- correlación, 20
- difusión, 12
  - coeficiente de, 13
  - ecuación de, 24
  - activa, 14
- Einstein, relación de, 13
- ensemble, 15
- equipartición, teorema de, 21
- excitosis, 4
- Faxen, teorema de, 38
- fluctuación-disipación
  - primer teorema de, 22
  - segundo teorema de, 22
- flujo de probabilidad, 25
- fuerza externa, 14
- función de memoria, 28
- Hooke, constante de, 68
- Langevin, fuerza de, 20
- memoria, 27
- mesoscópica, 12
- microtúbulo, 4
- miosina, 9
- modulo de rigidez, 69
- motilidad molecular, 9
- motor
  - citoesquelético, 9
  - de polimerización, 9
  - proteína G, 9
  - rotatorio, 9
- motor molecular, 5
- movimiento browniano, 12
- MSD, 13
- neurotransmisor, 3
- paisaje de energía, 15
- parámetro  $\epsilon$ , 37
- PDF, 23
- procesividad, 9
- proceso
  - no markoviano, 28
- quinesina, 10
- relajación, función de, 41
- Retzius, células de, 3
- ruido
  - blanco, 20
  - no-blanco, 28
- serotonina, 3
- sinapsis, 3
- subdifusión, 16
- término FP
  - de transporte, 23

difusivo, 23  
tiempo de relajación, 20  
trinquete, 14

# Bibliografía

- [1] C.E Bustos-Segura, *Transporte vesicular dirigido por microtúbulos en la secreción somática de serotonina*, Tesis de Licenciatura, UNAM, México, 2007.
- [2] A. Yildiz y P.R. Selvin, *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38**, 574-582.
- [3] R.D. Vale, *Cell*, 2003, **112**, 467-480.
- [4] P. Nelson , *Física Biológica*, Reverté, Barcelona, 2005.
- [5] C. Trueta, B. Méndez, F. F. de-Miguel, *J. Physiol.*, 2003, **547**, 403.
- [6] I. Y. Wong, *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, 2004, **92**, 178101.
- [7] P. Nakosis, *et al.*, *Am. J. Phys*, 2003, **71**(6), 568-573.
- [8] V. Romero-Rochín, E. González, *Physica A*, 2006, **372**, 249-262.
- [9] N. Wax, *Selected Papers on Noise and Stochastic Processes*, Dover, New York, 1954. (Los tres siguientes ensayos aparecen compilados aquí.)
- [10] S. Chandrasekhar, *Rev. Mod. Phys.*, 1943,**15**(1), 1-92.
- [11] M.C. Wang y G. E. Uhlenbeck, *Rev. Mod. Phys.*, 1945, **17** (2 y 3), 323-342.
- [12] G.E. Uhlenbeck y L.S. Ornstein, *Phys. Rev.*, 1930, **36**, 823-841.
- [13] N.G. Van Kampen, *Stochastic Processes in Physic and Chemistry*, NH PL, Amsterdam, 1992.
- [14] R. Zwanzig, *Non-equilibrium Statistical Mechanics*, Oxford University Press, 2001.



- 
- [15] H. Risken, *The Fokker-Planck equation: Methods of solution and applications*, 2nd. edition, Springer-Verlag, Berlín, 1968.
- [16] C.W. Gardiner, *Handbook of Stochastic Methods*, Berlin, Springer, 1985.
- [17] S. R. de Groot, P. Mazur, *Non-equilibrium Thermodynamics*, Dover, New York, 1984.
- [18] S. A. Adelman, *J. Chem. Phys.*, 1976, **64**, 124-130.
- [19] I. Santamaría-Holek, J. M. Rubí, *J. Chem. Phys.*, 2006, **125**, 064907.
- [20] I. Santamaría-Holek, J. M. Rubí, A. Gadomski, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 2293.
- [21] I. Santamaría-Holek, J. M. Rubí, *Physica A*, 2003, **326**, 384-399.
- [22] I. Santamaría-Holek, J. M. Rubí y A. Pérez-Madrid *New J. Phys.*, 2005, **7** 35.
- [23] D. Reguera, J. M. G. Vilar, J. M. Rubí, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 21502.
- [24] J. M. G. Vilar and J. M. Rubí, *Proc. Natl. Acad. Sci.* , 2001, **98**, 11081.
- [25] F. Gittes, *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, 1997, **19**, 17.