



Estudio de la fenomenología del  
crecimiento de células transformadas  
mediante el empleo de técnicas de  
escalado dinámico y la aplicación de  
modelos teóricos

**María Ana Cristina Huergo**

Directores:

**Dr. Pedro Horacio González**

**Dr. Agustín Eduardo Bolzán**

Diciembre 2011



*Clouds are not spheres, mountains are not cones, coastlines are not circles,  
and bark is not smooth, nor does lightning travel in a straight line.  
Nature exhibits not simply a higher degree but an altogether different level of  
complexity. The number of distinct scales of length of natural patterns is  
for all practical purposes  
infinite.*

*Las nubes no son esferas, las montañas no son conos, las costas no son  
círculos, y la corteza no es suave, así como la luz no viaja en dirección recta.  
La naturaleza nos muestra no sólo un mayor grado, sino un nivel  
completamente diferente de complejidad. El número de  
diferentes escalas de longitud de los patrones naturales es  
para todos los propósitos prácticos  
infinito.*

Benoit B. Mandelbrot

(The Fractal Geometry of Nature, Freeman, 1982)



a mi madrina



# Agradecimientos

A mis maestros, los Doctores Pedro González, Agustín Bolzán y Alejandro Arvía, por la paciencia y la pasión con que me introdujeron al mundo de la ciencia, y al Doctor Miguel Pasquale, que trabajó al lado mío, como si él fuera un becario más;

a mis padres, que me ayudaron y apoyaron siempre, en cuanto proyecto iniciara. A ellos les debo todo lo que soy;

a mis hermanos, mis compañeros del alma, ellos saben todo sin necesitar palabras;

a mis amigos, por su apoyo incondicional, en las buenas y en las malas;

a mi familia cordobesa, que me abrazó desde el primer día;

a la gente de pato, que estuvo siempre presente para ayudarme en cada etapa;

a las Margaritas, por las oportunidades;

a toda la gente del INIFTA, los “vecinos” del cuarto piso, los compañeros de almuerzos, taller, contaduría, secretaría, biblioteca, mantenimiento, el Director ... todos, todos, que desde hace cuatro años compartimos nuestros días en el Instituto;

y especialmente a Marcos, por compartir su vida conmigo.

Finalmente quisiera agradecer a CONICET por las becas, y a la UNLP y a la Facultad Ciencias Médicas por la posibilidad de seguir la carrera de Doctor en Medicina.





# Prólogo

*La memoria define las experiencias;  
acaso todo ocurre después, cuando lo comprendemos.*

Jorge Luis Borges

*Sur*, Buenos Aires, N<sup>o</sup>: 217-218, 1952.

Cuando en el año 2007 Agustín me “regaló” el famoso discurso que Steve Jobs dió en Stanford en 2005, me di cuenta de que iba por el camino correcto, aunque ciertamente no el más sencillo.

En esos tiempos me encontraba atravesando varias crisis, personales y laborales: estaba alejándome del camino llano y directo para seguir una intuición, un sueño.

La carrera de medicina nos prepara fielmente para ser médicos asistencia- listas. Y lo hace muy bien. Así es como terminé mis estudios, conociendo un único camino: una residencia médica.

En ese entonces no conocía “la investigación”. La CIENCIA era en mi imaginación algo reservado a personas despeinadas y canosas, de esas que hablan de temas difíciles con un lenguaje más difícil aún: la matemática. Pero algo me indicaba que esa era la dirección correcta.

Inmediatamente desistí de la idea de hacer una residencia médica, y mis padres, que siempre me han apoyado en cuanto proyecto haya iniciado, me alentaron a que escuchara mi corazón.

En aquellos años probé hacer investigación en medicina, pero nuevamente me alejaba de mi camino. Finalmente, en ese tormentoso año 2007 dejé de lado todo lo que hacía, y mientras conocía a la persona con quien planeo pasar el resto de mi vida, logré dar, gracias a Margarita, con este excelente grupo de investigadores con quienes trabajo, que no sólo me han incentivado a seguir estudiando física, sino que con ellos he podido armonizar mis dos pasiones, la biología y la física.

# Índice general

	I
	III
Agradecimientos	v
Prólogo	VII
Índice general	VIII
Glosario	XI
Introducción	xv
<b>1 Características de las células transformadas</b>	<b>1</b>
1.1. Los orígenes del cáncer . . . . .	2
1.1.1. Inestabilidad genética y progresión tumoral . . . . .	3
1.1.2. Algunas diferencias entre neoplasias benignas y malignas	5
1.1.3. Cinética de crecimiento . . . . .	8
1.1.4. Neovascularización . . . . .	9
1.2. Cultivos primarios y líneas celulares . . . . .	9
1.2.1. Caracterización de las células neoplásicas en cultivo . .	10
1.3. Adherencia celular . . . . .	11
1.3.1. Moléculas de adhesión celular . . . . .	14
1.3.2. Funciones de la matriz extracelular . . . . .	16
1.3.3. Moléculas de adhesión y matriz extracelular en los tu- mores malignos . . . . .	16
1.3.4. Control extracelular del crecimiento y la división celular	17
1.3.5. Desplazamiento celular . . . . .	17

<i>Índice general</i>	IX
1.3.6. Las fuerzas mecánicas y su implicancia en el desarrollo tumoral . . . . .	20
<b>2 Fractales y escalado dinámico</b>	<b>23</b>
2.1. Fractales . . . . .	24
2.1.1. Dimensión fractal . . . . .	25
2.1.2. Fractales autosimilares y autoafines . . . . .	26
2.2. Escalado dinámico . . . . .	29
2.2.1. Conceptos de escalado . . . . .	31
2.2.2. Análisis de Fourier . . . . .	38
2.2.3. Clases universales y modelos de crecimiento . . . . .	40
<b>3 Antecedentes teóricos y experimentales</b>	<b>55</b>
<b>4 Materiales y métodos</b>	<b>65</b>
4.1. Preparación de células y colonias . . . . .	65
4.1.1. Formación de colonias con frente lineal . . . . .	65
4.1.1.1. Colonias de frentes lineales en presencia de metil celulosa . . . . .	67
4.1.2. Formación de colonias con frente radial . . . . .	69
4.2. Coloración de colonias . . . . .	69
4.3. Adquisición de imágenes . . . . .	71
4.3.1. Seguimiento <i>in situ</i> del crecimiento celular . . . . .	72
4.3.2. Análisis por microscopía de fuerzas atómicas . . . . .	72
4.4. Análisis y procesamiento de datos . . . . .	73
4.4.1. Morfología y distribución celular . . . . .	73
4.4.2. Análisis de los frentes de crecimiento . . . . .	73
4.4.3. Determinación de los errores . . . . .	77
<b>5 Crecimiento de colonias de células Vero</b>	<b>79</b>
5.1. Colonias con frente lineal . . . . .	79
5.1.1. Evolución morfológica de las colonias . . . . .	79
5.1.2. Análisis de los frentes lineales de crecimiento. . . . .	86
5.2. Colonias con frente radial . . . . .	96
5.2.1. Evolución morfológica de las colonias . . . . .	96
5.2.2. Análisis de los frentes radiales de crecimiento. . . . .	101
5.3. Síntesis . . . . .	116
<b>6 Crecimiento de colonias de células HeLa</b>	<b>119</b>

6.1. Evolución morfológica de las colonias . . . . .	119
6.2. Análisis de los frentes de crecimiento. . . . .	123
6.3. Síntesis . . . . .	133
<b>7 Crecimiento de colonias de células Vero en presencia de metil celulosa</b>	<b>137</b>
7.1. Evolución morfológica de las colonias . . . . .	137
7.2. Análisis de los frentes lineales de crecimiento . . . . .	141
7.3. Síntesis . . . . .	144
<b>8 Discusión</b>	<b>147</b>
<b>9 Conclusiones</b>	<b>157</b>
<b>10 Apéndices</b>	<b>161</b>
10.1. Apéndice I: Transformada de Fourier . . . . .	161
10.1.1. Aproximación intuitiva . . . . .	161
10.1.2. Representación de funciones mediante conjuntos ortonormales. Coeficientes de Fourier. . . . .	162
10.1.3. Definición formal . . . . .	163
10.1.4. Representación de señales discretas en el dominio de la frecuencia. . . . .	164
10.2. Apéndice II: Breve desarrollo de las reglas básicas de simetría.	164
10.3. Apéndice III: Microscopía de fuerzas atómicas . . . . .	167
10.3.1. Conformación del microscopio . . . . .	168
10.3.2. Modos operacionales . . . . .	168
10.3.3. Fuerzas . . . . .	171
10.3.4. Curva de fuerza . . . . .	172
<b>Bibliografía</b>	<b>173</b>

# Glosario

- Abscisa:** en el sistema cartesiano, se dice de la coordenada horizontal.
- Aleatorio:** perteneciente o relativo al azar. Dependiente de algún suceso fortuito.
- Anisotropía:** cualidad de un medio, generalmente cristalino, en el que alguna propiedad física depende de la dirección de un agente.
- Clase universal:** el hecho de que diferentes fases de transición provenientes de diferentes sistemas posean el mismo set de **exponentes dinámicos** y puedan ser descritos por la misma ecuación continua, implica que pertenecen a la misma clase universal. Por lo tanto una clase universal queda definida por un **modelo discreto** que posee un set de **exponentes** y una ecuación diferencial continua que lo describen.
- Coloide:** dispersión de partículas o macromoléculas en un medio continuo.
- Correlación:** es la correspondencia o relación recíproca que existe entre dos o más cosas o series de cosas. En términos matemáticos se define como la medida de la dependencia existente entre variantes aleatorias.
- Deposición aleatoria (DA):** modelo de crecimiento por deposición de partículas en el cual las partículas que lo componen no se encuentran **correlacionadas** entre sí. Se caracteriza por poseer un **exponente de crecimiento**  $\beta = 1/2$ . Los **exponentes dinámico y de rugosidad** no se encuentran definidos.
- Deposición balística (DB):** es el modelo de crecimiento por deposición de partículas más sencillo que presenta **correlación** lateral. Se caracteriza por poseer un **exponente de crecimiento**  $\beta = 1/3$  y un **exponente dinámico**  $\alpha = 1/2$ .

**Derivada:** pendiente de la recta tangente a la curva en un punto. Por ejemplo la pendiente de la curva de desplazamiento en un momento dado corresponde al valor de la velocidad instantánea a ese tiempo.

**Dimensión fractal ( $d_f$ ):** es el número real que generaliza el concepto de dimensión ordinaria para objetos geométricos que no admiten espacio tangente. En el caso de las líneas fractales, que son los objetos a los que se aplica este trabajo, indica de qué forma o en que medida una línea fractal llena una porción del plano.

**Ecuación de Edward-Wilkinson (EW):** es la ecuación continua que describe el modelo de crecimiento de **deposición aleatoria** con relajación superficial. Es característica de **interfaces** en equilibrio.

**Epitaxis de un haz de moléculas (MBE):** modelo de crecimiento por deposición de partículas en el cual las partículas superficiales presentan los fenómenos de difusión y desorción superficial.

**Escalado anómalo:** es el escalado dinámico que no satisface las relaciones de escalado de Family-Vicsek.

**Escalado dinámico:** herramienta de la mecánica estadística utilizada para la caracterización del crecimiento de **interfaces** rugosas. Permite calcular los **exponentes críticos** y definir la **clase universal** a la que pertenece el sistema en estudio.

**Estocástica:** teoría estadística de los procesos cuya evolución en el tiempo es **aleatoria**, tal como la secuencia de las tiradas de un dado.

**Exponentes críticos o dinámicos:** son los parámetros que describen el comportamiento de ciertas magnitudes físicas que siguen **leyes de potencias**, en las proximidades de las transiciones de fase. En el contexto de este trabajo los exponentes críticos son 3: el **exponente de crecimiento**  $\beta$ , el **exponente de rugosidad**  $\alpha$  y el **exponente dinámico**  $z$ . La combinación de estos exponentes define la **clase universal** de crecimiento del sistema.

**Exponente de crecimiento o exponente  $\beta$ :** es el **exponente crítico** que caracteriza la dinámica tiempo dependiente del cambio de la **rugosidad** de la **interfaz**.

**Exponente de rugosidad o exponente  $\alpha$ :** es el **exponente crítico** que caracteriza el modo en que cambia la **rugosidad** de la **interfaz** saturada con el tamaño del sistema.

**Exponente dinámico o exponente  $z$ :** es la relación que existe entre los **exponentes críticos**  $\alpha$  y  $\beta$ .

**Fractal:** figura plana o espacial, compuesta de infinitos elementos, que tiene la propiedad de que su aspecto y distribución estadística no cambian, cualquiera que sea la escala con que se la observe.

**Fractal autoafín:** es un **fractal anisotrópico** o invariante ante transformaciones anisotrópicas.

**Fractal autosimilar:** es un **fractal isotrópico** o invariante ante transformaciones isotrópicas.

**Función:** relación entre dos conjuntos que asigna a cada elemento del primero un elemento del segundo o ninguno. Por ejemplo  $\langle h(t) \rangle$  es la función que asigna a cada tiempo el valor de altura media correspondiente.

**Función monovaluada:** relación entre dos conjuntos que asigna a cada elemento del primero un único elemento del segundo.

**Función multivaluada:** relación entre dos conjuntos que asigna a algunos elementos del primero más de un elemento del segundo.

**Interfaz:** conexión física y funcional entre dos sistemas independientes. En el marco de este trabajo, interfaz representa la región que conecta el frente de avance la colonia con el medio líquido de crecimiento.

**Isotropía:** característica de los cuerpos cuyas propiedades físicas no dependen de la dirección.

**Ley de potencias:** es un tipo especial de relación matemática entre dos cantidades que puede expresarse como sigue:

$$f(x) = ax^k \quad (1)$$

donde  $a$  (la constante de proporcionalidad) y  $k$  (el exponente de la potencia) son constantes. El principal interés de las leyes de potencias radica en su invariancia de escala. La función 1 satisface la relación:

$$f(cx) = a(cx)^k = c^k f(x) \propto f(x) \quad (2)$$

para toda constante  $c$ . En este caso se dice que la función  $f(x)$  es invariante ante escala.

**Modelo de Eden:** caso particular del **modelo de deposición balística** en el cual el sistema crece por división de las partículas ya existentes y no por su deposición desde una fuente exterior.

**Modelo de Kardar, Parisi y Zhang (KPZ):** ecuación continua que describe el crecimiento según los **modelos de deposición balística** y de **Eden**, en los cuales existe el crecimiento lateral. Es característica de **interfaces** fuera del equilibrio.

**Modelo de KPZ-apagado (QKPZ):** modelo que describe el crecimiento de un sistema que sigue una dinámica de **KPZ** pero en presencia de obstáculos que generan un fenómeno de frenado o “**pinning**”.

**Modelo discreto:** en el contexto matemático un modelo es un esquema teórico de un sistema o de una realidad compleja, como la evolución dinámica de **interfaces**, que se elabora para facilitar su comprensión y el estudio de su comportamiento. Un modelo discreto es aquél que consta de unidades o partes separadas unas de otras, como por ejemplo las partículas que componen un sistema.

**Ordenada:** en el sistema cartesiano, se dice de la coordenada vertical.

**Pinning:** bloqueo del crecimiento de interfaces por el agregado de factores externos al sistema que actúan como freno.

**Relajación superficial:** es la capacidad de una partícula de difundir una distancia finita a lo largo de la superficie hasta una posición más baja o energéticamente más favorable.

**Rugosidad:** raíz cuadrada de las fluctuaciones de la altura. Desvío estándar de la función  $h(t)$ .

**Tensión superficial:** acción de las fuerzas moleculares en virtud de la cual la capa exterior de los líquidos tiende a contener el volumen de estos dentro de la mínima superficie. En el contexto del crecimiento de interfaces, la tensión superficial tiende a suavizar las superficies distribuyendo las irregularidades pero sin modificar la altura promedio del sistema.



# Introducción

Uno de los objetivos de la ciencia es encontrar, a partir del estudio de sistemas particulares, relaciones que conlleven a establecer leyes universales que, a través de una relación matemática relativamente simple, puedan explicar un comportamiento global. Esto resulta particularmente interesante en el campo biológico teniendo en cuenta la alta complejidad de los sistemas vivos. ¿Es posible que a pesar del gran número de variables que influyen en el comportamiento de un ser vivo, o en sus asociaciones, se pueda explicar su comportamiento a partir de leyes o ecuaciones matemáticas relativamente simples?. Esta pregunta subyace en el creciente avance que en los últimos años se viene desarrollando en el campo de los estudios interdisciplinarios que involucran la tarea conjunta de biólogos, físicos, químicos y matemáticos. En este sentido, el desarrollo de modelos que permitan entender y predecir el crecimiento de tumores por medio de programas especializados, que combinan herramientas matemáticas y datos biológicos, es un área de gran interés y rápido avance en la investigación del cáncer [1].

Un ejemplo de la posibilidad de existencia de *leyes universales* en el desarrollo de organismos vivos se basa en la premisa de que la naturaleza fractal de la angiogénesis limita implícitamente el crecimiento de los tejidos [2, 3]. Suponiendo entonces que existe una tendencia de selección natural de optimizar el transporte de energía, mediante la evolución de redes de distribución tipo fractal en los animales, se propuso un modelo de crecimiento que es independiente de mecanismos biológicos, basado únicamente en un principio fundamental de balance de energía, entre la necesaria para mantener los tejidos existentes y aquella necesaria para generar nueva biomasa. De la comparación de datos correspondientes a distintos animales, desde moluscos, peces, aves a mamíferos, se obtuvo, aplicando un adecuado reescalado de las masas y tiempos de crecimiento de cada especie, una curva universal de crecimiento exponencial [2]. La existencia de un crecimiento fractal del aporte sanguíneo crearía un freno natural a todo crecimiento posterior, de forma tal que el cre-

cimiento de todo organismo vivo encontraría siempre una meseta. Esta línea de pensamiento se extendió para el caso del crecimiento de tumores malignos. Se halló entonces que también era factible ajustar los datos de crecimiento de tumores, desde tumores esféricos cultivados *in vitro*, como glioblastomas humanos o gliosarcomas de rata, hasta tumores humanos extraídos de pacientes con cáncer de próstata y de mama, pasando por tumores de modelos de ratas (fibroadenomas, carcinomas, osteosarcomas, etc.), siguiendo una ley matemática *universal* [4].

El empleo de los conceptos de geometría fractal [5] ha avanzado rápidamente en el campo biológico y médico para interpretar diversos aspectos de la naturaleza, entre ellos la posible relación entre la malignidad de los tumores y su dimensión fractal [6–13]. En este sentido el análisis de la dimensión fractal ha sido recientemente empleado para el estudio de carcinomas de mama, empleando tomografía de coherencia óptica, como método para clasificar neoplasias y como eventual herramienta para poder identificar los márgenes de un tumor en ciertas cirugías de cáncer de mama [14]. Dado que el cáncer está caracterizado por el desorden y la irregularidad que produce en los tejidos, es razonable esperar que el análisis fractal pueda ser útil para su identificación [11]. Sin la métrica adecuada, como es la dimensión fractal, un análisis de textura de tejidos cancerosos podría ser una cuestión subjetiva que produciría distintos resultados dependiendo del observador [15, 16]. De hecho, el análisis fractal ha sido empleado para detectar la presencia de cáncer en mamografías e imágenes microscópicas [16–18] y clasificar a través de mamografías tumores benignos y malignos [19].

Dentro de la idea de universalidad de procesos físicos o biofísicos, surge también el interés por intentar caracterizar la dinámica de crecimiento de tumores a partir de la determinación de ciertos parámetros universales conocidos como exponentes críticos. En la medida en que la superficie de los tumores presente una geometría fractal, es posible entonces aplicar la técnica de escalado dinámico [20, 21]. Esta técnica, de amplia aplicación en el estudio de crecimiento de interfaces, tales como la deposición de plata [22–24], la modificación de superficies por bombardeo con flujos de iones [25], la difusión de gotas de mercurio sobre películas delgadas [26] o el avance de una gota de tinta en un trozo de papel [27], permite establecer modelos universales de crecimiento que son independientes de las características particulares de cada sistema. Dicho en otros términos, la dinámica de crecimiento de las más variadas superficies estaría determinada por la existencia de uno o más procesos comunes que contribuirían al desarrollo de una interfaz fractal. Esto sería posible porque el resultado del crecimiento de una superficie bajo dichas con-

diciones no depende entonces de las propiedades particulares de las entidades que la forman sino del comportamiento colectivo y cooperativo del conjunto de unidades. En 1961 Eden introdujo un simple pero importante modelo teórico de crecimiento estocástico que permitía simular el crecimiento de una colonia de bacterias y eventualmente un tumor [28]. El algoritmo esencialmente suponía una grilla cuadrada donde una de las celdas se marcaba inicialmente como “infectada” y a partir de ella se seleccionaba al azar alguna de las celdas vecinas para ser “infectada”. Continuando con este sistema de sorteo al azar, se llegaba finalmente a la formación de un racimo de celdas que representaban el tumor, encontrándose que mientras el interior era compacto, el contorno resultaba fractal.

Uno de los primeros trabajos experimentales aplicando la técnica de escalado dinámico fue el estudio del crecimiento de colonias de bacterias [29]. Posteriormente, teniendo en cuenta que tanto las colonias celulares como los tumores podían considerarse objetos fractales, se extendió dicha teoría al estudio del crecimiento de líneas celulares *in vitro* y tumores desarrollados *in vivo* [30]. Sin embargo, los resultados obtenidos han sido objeto de crítica en cuanto a lo que respecta a las conclusiones obtenidas en base a la aplicación de ecuaciones matemáticas, desarrolladas para sistemas lineales, a crecimientos de tipo circular [31,32]. De hecho, uno de los problemas que suelen presentarse cuando se aplican algunas teorías a los sistemas reales es que los postulados del modelo teórico no se ajustan bien a la realidad. Este ha sido uno de los objetivos del presente trabajo de tesis: diseñar experimentos, como el desarrollo de colonias celulares con frente lineal de crecimiento, que permitan ajustar lo mejor posible los postulados fundamentales de los modelos teóricos, para poder así aplicar la ecuaciones matemáticas correspondientes en las condiciones que se espera sean aplicadas. El paso siguiente, como es de esperar, busca adaptar las condiciones matemáticas al sistema real, como es la transformación del sistema de coordenadas radiales, para corroborar la aplicabilidad del modelo al modo de crecimiento natural de las colonias de células, que es aproximadamente circular.

El presente trabajo de tesis presenta el estudio del crecimiento de colonias de líneas celulares aplicando las técnicas de escalado dinámico con el objeto de determinar si dicho proceso puede asociarse a una “clase universal” que permita interpretar la dinámica de crecimiento de las colonias a través de un modelo simple. Para ello se emplearon dos tipos de células, una originaria de un tejido no neoplásico, línea Vero, y otra de origen tumoral, línea HeLa, y se diseñaron protocolos originales para poder desarrollar frentes de crecimiento de distinta geometría y validar la aplicación de los modelos teóricos desarro-

llados para sistemas lineales, en sistemas circulares. En el primer capítulo de la tesis se repasan conceptos básicos relacionados con los aspectos biológicos de tumores y líneas celulares [33–36] y en el segundo capítulo se describen brevemente los conceptos relacionados con fractales y escalado dinámico. En el tercer capítulo se presentan los antecedentes bibliográficos del tema en estudio y posteriormente se presenta un capítulo concerniente a los materiales y a la descripción de las metodologías utilizadas para la preparación de las colonias y el análisis de su crecimiento. En los capítulos cinco y seis se muestran y analizan los resultados obtenidos para el caso de células Vero y de células HeLa, respectivamente, con el desarrollo de colonias con frente radial y lineal de crecimiento. En el capítulo siete se analiza el efecto de la adición de metil celulosa al medio de cultivo celular y la influencia de las propiedades físicas del medio sobre la dinámica del crecimiento celular. Finalmente, en el capítulo ocho se discuten los resultados obtenidos y se propone un mecanismo que explique la dinámica de crecimiento de las colonias de líneas celulares en general, presentándose finalmente las conclusiones del trabajo en el capítulo nueve.

---

## Características de las células transformadas

Las células que sufrieron una transformación neoplásicas no siguen las dos premisas básicas de comportamiento que permiten la existencia y mantenimiento de los organismos pluricelulares normales: 1) las células sólo se reproducen en respuesta a las necesidades del organismo; 2) las células sólo ocupan los lugares reservados para ellas dentro del tejido del cual forman parte, es decir que no invaden otros territorios. El cambio en el comportamiento social de las células neoplásicas se produce por fallas en los mecanismos que habitualmente controlan el crecimiento y la diferenciación celular. Durante el crecimiento normal, y posteriormente durante la vida adulta, existen intrincados sistemas genéticos de control que regulan el balance entre la duplicación y la muerte celular en respuesta a señales de crecimiento, a señales inhibitorias de la proliferación y a señales de muerte celular. La habilidad de las células para producir réplicas exactas de sí mismas en respuesta a las necesidades del órgano o tejido al cual pertenecen, es una característica esencial de la vida celular organizada. Este proceso debe realizarse con altísima fidelidad para que los organismos puedan crecer y sobrevivir. A modo de ejemplo, la proliferación celular en algunos tejidos adultos ocurre continuamente como una estrategia de renovación tisular. Las células del epitelio intestinal y algunos glóbulos blancos son ejemplos típicos de células que sólo viven algunos días antes de ser reemplazadas. Sin embargo, las células de muchos tejidos adultos normalmente no proliferan. Por ejemplo los hepatocitos, los miocitos cardíacos o las neuronas permanecen funcionales por períodos muy prolongados o incluso durante la vida completa del organismo. Un concepto que muchas veces es

interpretado erróneamente es que las células neoplásicas se replican más rápidamente de lo que lo hacen las células normales. De hecho, existen muchos casos en los que ocurre lo opuesto. Por el contrario, el comportamiento del cáncer no se debe a su velocidad de crecimiento sino a la falta de respuesta a las señales que normalmente hacen que las células dejen de duplicarse.

## 1.1. Los orígenes del cáncer

Las células que originan los tumores no suelen ser células diferenciadas, sino que generalmente provienen de células precursoras. Esto es así puesto que generalmente las células completamente diferenciadas no se dividen. Por el contrario, cuando mueren son continuamente reemplazadas por proliferación y diferenciación de células madre (o pluripotenciales), y éstas células son capaces de transformarse en tumorales. Las células madre se caracterizan por autoperpetuarse y dar origen a células diferenciadas que pueden regenerar un tejido particular a lo largo de la vida del organismo. Algo similar ocurre en las neoplasias con las células madre tumorales, que poseen la capacidad de dividirse en forma descontrolada y generar nuevos tumores.

Debido a que las células madre pueden dividirse continuamente a lo largo de toda la vida del organismo, las mutaciones oncogénicas pueden acumularse en su ADN transformándolas, finalmente, en células neoplásicas. Las células que han adquirido esas mutaciones presentan una capacidad proliferativa anormal y, generalmente, no pueden llevar adelante los procesos normales de diferenciación. Sin embargo, algunas mutaciones oncogénicas, tales como la inhibición de la apoptosis o la generación inapropiada de señales promotoras, pueden ocurrir también en células progenitoras más diferenciadas, aún replicantes.

Dentro de un tejido neoplásico, la diferenciación se define como la medida relativa en la que las células neoplásicas se parecen a las células originarias, tanto morfológica como funcionalmente. En general, las neoplasias benignas suelen ser bien diferenciadas mientras que las malignas oscilan entre las bien diferenciadas y las completamente indiferenciadas. Las neoplasias malignas compuestas de células indiferenciadas suelen denominarse anaplásicas. De hecho, la falta de diferenciación, o anaplasia, es considerada un signo patognomónico de transformación maligna. Aunque literalmente, anaplasia significa “formar hacia atrás”, actualmente se sabe que la falta de diferenciación no es consecuencia de la des-diferenciación sino de la proliferación de células inmaduras.

### 1.1.1. Inestabilidad genética y progresión tumoral

La inmensa mayoría de los tumores presentan tasas de mutación sumamente elevadas: se dice que las células que los forman son genéticamente inestables. Las fallas en la fidelidad del proceso de reproducción celular crean una situación de inestabilidad que contribuye significativamente al desarrollo de células malignas en los organismos eucariotas superiores. Algunas células tumorales presentan deficiencias en el sistema de reparación local del ADN dañado o en el sistema de corrección de errores de replicación. Estas células acumulan más mutaciones puntuales y cambios localizados de secuencias de ADN que las células normales. Otras células tumorales tienen dificultades para mantener la integridad de sus cromosomas, lo que comporta anomalías en su cariotipo. Es importante recalcar que la inestabilidad genética por sí misma no le proporciona a una célula ninguna ventaja selectiva. En general, esta inestabilidad afecta la salud celular, por lo que la mayoría de las mutaciones producidas al azar son peligrosas para la integridad celular. Pareciera que existiese un nivel “óptimo” de inestabilidad genética para el desarrollo del cáncer, transformando una célula lo suficiente como para que evolucione peligrosamente pero no tanto como para que muera (Fig. 1.1).

Las mutaciones en dos grandes clases de genes, los proto-oncogenes y los anti-oncogenes, han sido implicadas en el desarrollo del cáncer. Los proto-oncogenes, o genes promotores del crecimiento, son activados y transformados en oncogenes a través de mutaciones que hacen que el gen quede excesivamente activo en lo que respecta a la promoción del crecimiento celular. Esto puede ponerse de manifiesto tanto por un incremento en la expresión génica como por la formación de un producto hiperactivo. Por otra parte, los anti-oncogenes, o genes supresores del crecimiento tumoral, normalmente restringen el crecimiento, por lo que cualquier modificación llevaría al crecimiento inapropiado. En ambos casos, la mayoría de estos genes codifican proteínas que ayudan a regular la replicación celular o la muerte celular por apoptosis. Otros genes que también pueden ser afectados, son los que codifican para proteínas que participan en la reparación de los daños del ADN. El cáncer es habitualmente el resultado de mutaciones que aparecen a lo largo de la vida por exposición a carcinógenos, sean estas sustancias químicas o radiaciones (ultravioleta o ionizantes), o por errores en el copiado y la reparación de genes.

Así se llega a que el proceso de formación del cáncer, habitualmente llamado oncogénesis, tumorigénesis o carcinogénesis, es un daño genético no letal resultante del balance entre los genes y el medio ambiente. Incluso si el daño genético ocurriera únicamente en una célula, su división transmitiría el daño

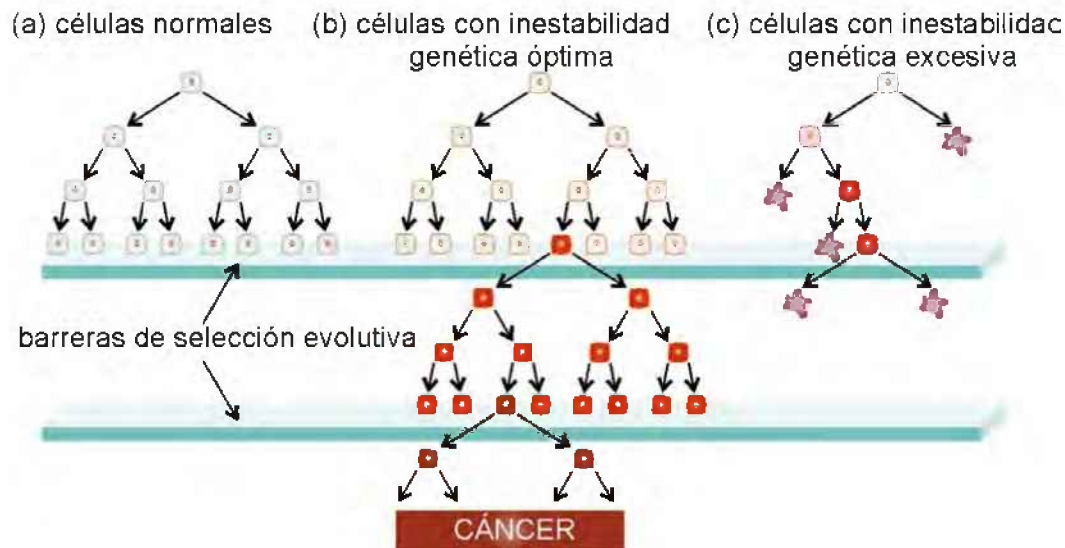


Figura 1.1: Inestabilidad genética y progresión tumoral. a) Células normales: la inestabilidad genética es baja y al enfrentar una barrera de selección (bajo nivel de oxígeno o escasez de señales proliferativas) no siguen proliferando; b) Células precursoras tumorales: frente a una cierta inestabilidad genética aparece al menos una célula con alteraciones genéticas necesarias para pasar la barrera de selección y formar un tumor; c) Inestabilidad genética demasiado alta: las células sufren mutaciones perjudiciales, proliferan poco o mueren con desaparición del linaje.

a las células hijas dando origen a un clon de células alteradas. Sin embargo, es poco probable que la mutación de un solo gen lleve a la formación de un cáncer. En primer lugar, porque los procesos celulares están controlados de forma compleja e interconectada y las células utilizan mecanismos reguladores redundantes para mantener un control preciso de su comportamiento. Por lo tanto, deberían alterarse varios mecanismos distintos para que una célula pudiera salir de sus restricciones normales y comportarse como una célula maligna. Además, durante su expansión y en cada etapa de la evolución del proceso neoplásico, las células cancerosas encuentran nuevas barreras que deberán superar a través de la adquisición de mutaciones adicionales. Típicamente, una serie de mutaciones en múltiples genes deriva en un tipo celular progresivamente más proliferativo que escapa a los controles del crecimiento normal, creando las condiciones apropiadas para la aparición de nuevas muta-



ciones (Fig. 1.2). Finalmente, este clon de células crece formando un tumor. En algunas ocasiones, células originarias del tumor primario migran hacia nuevas localizaciones formando tumores secundarios, que son los que habitualmente tienen el mayor impacto sobre la salud del huésped.

Debido a que las múltiples mutaciones que llevan a la formación de un tumor suelen requerir varios años de acumulación, la mayoría de las neoplasias aparecen tarde en la vida. El hecho de que muchas neoplasias aparezcan luego de la edad reproductiva puede ser una razón por la que la misma evolución no haya desarrollado demasiadas herramientas para suprimirlo.

Los cambios genéticos que conllevan a la oncogénesis alteran varias propiedades fundamentales de las células, permitiéndoles evadir los controles normales de crecimiento y finalmente confiriéndoles el fenotipo completo de cáncer (Fig. 1.1). Las células neoplásicas adquieren la habilidad de proliferar sin requerir una señal externa que las induzca. Estas células fallan al sentir las señales que restringen la división y continúan reproduciéndose cuando no lo deberían hacer. Habitualmente modifican su adhesión a las células vecinas y/o a la matriz extracelular, lo que les permite dividirse más fácilmente. La célula neoplásica puede, hasta cierto punto, asemejarse a un tipo particular de célula normal de división rápida, pero la diferencia radica en que la célula neoplásica, y su progenie, presentan inmortalidad.

Para crecer más allá de un tamaño pequeño, los tumores deben obtener irrigación vascular suplementaria y habitualmente lo logran induciendo, a través de señales, el crecimiento de vasos sanguíneos dentro del tumor. A medida que el cáncer progresa, los tumores se convierten en órganos anormales que se adaptan cada vez mejor al crecimiento y a la invasión de los tejidos vecinos.

### 1.1.2. Algunas diferencias entre neoplasias benignas y malignas

Los tumores aparecen más frecuentemente en individuos longevos, siendo la mayoría de ellos poco riesgosos para su huésped debido a que suelen permanecer bien localizados y ser de pequeño tamaño. Estos tumores son lo que habitualmente se conocen como neoplasias benignas. Las células que los componen se parecen mucho a las células normales, actuando muchas veces como tales. Las moléculas de adhesión celular que mantienen la estructura de los tejidos mantienen a su vez a las células neoplásicas benignas localizadas en el tejido donde se originaron. Debido a su crecimiento expansivo no infiltrativo generalmente existe una cápsula fibrosa que separa el tumor benigno de los

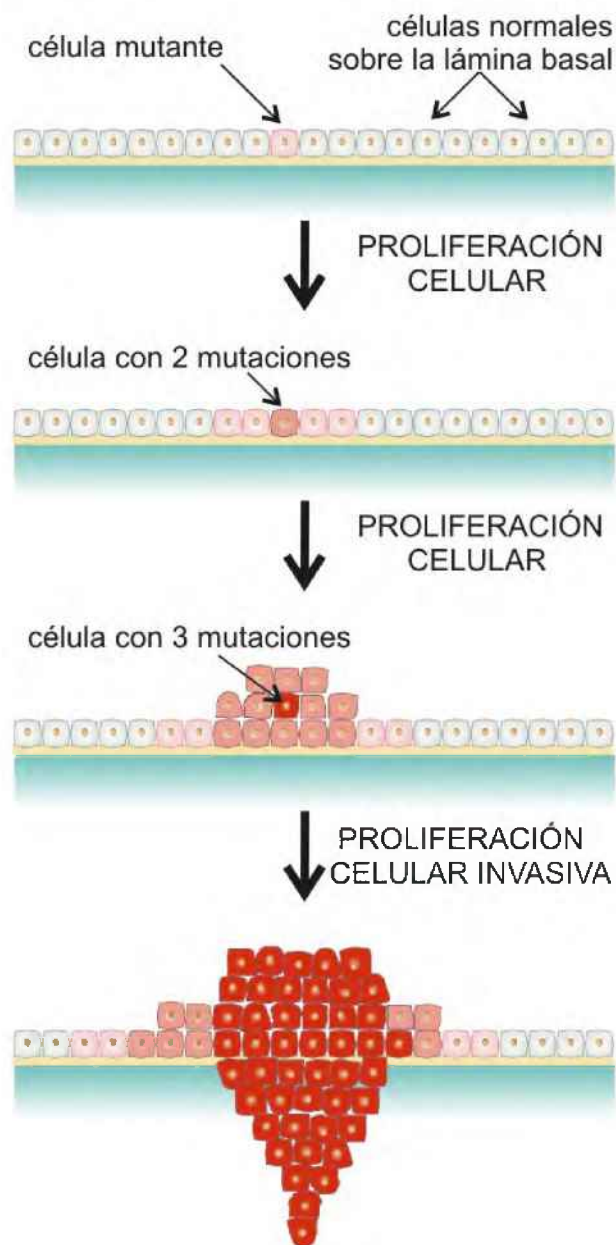


Figura 1.2: Formación de un tumor por evolución clonal: cada etapa muestra un incremento en las mutaciones de una célula y el incremento de la proliferación de las células mutantes, de forma tal que sus descendientes se convierten en el clon dominante del tumor. La proliferación del clon acelera la progresión tumoral e incrementa el tamaño de la población de riesgo que puede sufrir una nueva mutación.

tejidos vecinos no neoplásicos, lo que facilita su extirpación quirúrgica. Los tumores benignos se convierten en problemas serios de salud cuando interfieren con funciones normales del órgano donde se originaron o cuando secretan cantidades excesivas de sustancias biológicamente activas, como por ejemplo hormonas.

Las células que conforman un tumor maligno o cáncer, crecen y se dividen más rápidamente que las normales, no mueren con la frecuencia normal o invaden los tejidos vecinos sin cambios significativos en su tasa de proliferación. Muchas neoplasias malignas permanecen localizadas y encapsuladas por tiempos relativamente prolongados. Pero a diferencia de los tumores benignos, cuando estos tumores progresan, sus células invaden los tejidos vecinos, alcanzan la circulación sanguínea sistémica y establecen áreas secundarias de proliferación, proceso que se conoce como metástasis. La mayoría de las células malignas adquieren la habilidad de formar metástasis. Por lo tanto, es su capacidad para invadir la característica principal que diferencia a los tumores malignos de los benignos.

La falta de diferenciación, o anaplasia, característica de las neoplasias malignas, conlleva la presencia de alteraciones morfológicas y funcionales. Tanto las células como los núcleos muestran pleomorfismo (variabilidad de tamaños y formas) y se pueden entonces encontrar células de tamaño varias veces mayores que sus vecinas mientras que otras llegan a ser extremadamente pequeñas y de aspecto primitivo, siendo una de sus características los núcleos que contienen abundante ADN y se tiñen de un tono oscuro (hipercromáticos). Los núcleos son desproporcionadamente grandes respecto al tamaño de la célula, y la relación de tamaños núcleo:citoplasma puede acercarse a 1:1, comparada con el valor normal de 1:4 a 1:6. La forma nuclear es habitualmente muy variable y la cromatina forma con frecuencia grumos groseros. Habitualmente pueden observarse grandes nucléolos.

Generalmente, las células anaplásicas presentan un gran número de mitosis, reflejando una tasa de proliferación alta, aunque lo más importante a la hora del diagnóstico no es el número de mitosis sino la presencia de figuras mitóticas atípicas que pueden producir husos mitóticos multipolares. Otra característica de la anaplasia es la formación de células tumorales gigantes, algunas con un solo núcleo polimórfico, y otras con dos o más núcleos. Las células gigantes cancerosas, a diferencia de las células inflamatorias de Langhans, presentan un núcleo hipercromático grande.

Las células normales están restringidas a su ubicación dentro del órgano o tejido a través de las uniones de adhesión célula-célula y por la existencia de barreras que determinan dominios biológicos, tales como la lámina basal

que delimita los sustratos de células epiteliales y rodea las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Las células cancerígenas se encuentran notablemente desorganizadas, formando grandes masas que interactúan de manera compleja con la matriz extracelular y con la lámina basal. Las células deben degradar la lámina basal para atravesarla y formar metástasis, aunque en algunos casos deben migrar a lo largo de la misma. Muchos tumores secretan una proteína, el activador del plasminógeno, que convierte el plasminógeno a su forma activa, la proteasa plasmina. El incremento de la actividad de la plasmina promueve las metástasis a través de la digestión de la lámina basal, permitiendo así la penetración por las células neoplásicas. A medida que la lámina basal es desintegrada, algunas células neoplásicas entran al torrente sanguíneo, pero menos de 1 en 10000 logran sobrevivir y colonizar otro tejido formando un tumor secundario metastático. Los múltiples cruces de estratos tisulares que debe atravesar una célula maligna generalmente involucran nuevas proteínas de superficie o algunas variantes creadas por las propias células neoplásicas.

Un crecimiento similar ocurre en la displasia, término que se utiliza para describir una proliferación desordenada pero no neoplásica, que implica la pérdida de uniformidad de las células individuales y de su orientación arquitectónica. Las células displásicas muestran considerable pleomorfismo y con frecuencia presentan núcleos hiper cromáticos anormalmente grandes. Las imágenes de mitosis son más frecuentes de lo habitual, pero casi siempre dentro de patrones normales. Los tejidos que presentan displasia tienen altas probabilidades de convertirse en neoplásicos.

### 1.1.3. Cinética de crecimiento

El ciclo celular de las células tumorales exhibe las mismas cinco fases que se observan en las células normales ( $G_0$ ,  $G_1$ ,  $S$ ,  $G_2$  y  $M$ ) aunque, como se dijo anteriormente, el tiempo del ciclo celular de muchos tumores es igual o más largo que el de las células normales correspondientes. Por tanto, frecuentemente el crecimiento de los tumores no se ve asociado a un acortamiento del ciclo celular. La proporción de células del tumor que forman parte del compartimiento proliferativo se conoce como fracción de crecimiento. Los datos de estudios clínicos y experimentales indican que durante la fase temprana, microscópica, del crecimiento tumoral, la mayoría de las células forman parte del compartimiento replicativo. A medida que el tumor crece, un número de células mayor que las que se diferencian o las que revierten a  $G_0$ , abandonan el compartimiento replicativo debido a que se desprenden o carecen de nutrientes. De hecho, la mayor parte de las células en el interior de las neoplasias perma-

necen en la fase  $G_0$  o  $G_1$ . Así, para el momento en que el tumor es clínicamente detectable, la mayoría de las células no forman parte del compartimento replicativo, pudiendo llegar a ser menos del 20% de las células totales. La tasa de crecimiento de los tumores queda finalmente determinada por el balance entre el exceso de producción celular y la pérdida celular.

#### 1.1.4. Neovascularización

Los tumores, ya sean primarios o secundarios, requieren la formación de nuevos vasos sanguíneos para poder seguir creciendo. En ausencia de este suplemento sanguíneo, un tumor puede crecer hasta formar una masa de  $10^6$  células, alcanzando el tamaño de una esfera de apenas 1 – 2 mm de diámetro. Llegado este punto, la división de células en la parte exterior de la masa tumoral se compensa con la muerte de las células del centro que reciben un inadecuado aporte de nutrientes. Estos tumores, si no crecen y no secretan hormonas, no suelen causar grandes problemas para el huésped. Sin embargo, la mayoría de los tumores induce, por medio de la producción de factores de crecimiento vascular (VEGF, FGF, etc) un proceso llamado angiogénesis, que consiste en el desarrollo de neovascularización que invade el tumor y lo nutre. Este complejo proceso implica varios pasos diferentes: la degradación de la lámina basal que rodea al capilar, la migración de células endoteliales que formarán el vaso dentro del tumor, la división de estas células y la formación de la membrana basal alrededor de los nuevos vasos sanguíneos.

## 1.2. Cultivos primarios y líneas celulares

Para obtener cultivos primarios de células suelen utilizarse tejidos animales normales o incluso embriones completos. En este caso, la mayoría de las células adherentes se dividen un número finito de veces hasta que cesan su crecimiento, proceso conocido como senescencia celular. Pero si un cultivo es cuidadosamente mantenido, aunque su tiempo de vida sea limitado, puede ser estudiado por un número mucho mayor de generaciones. Este linaje de células originarias de un cultivo primario se llama cepa de células (cell strain), la cual puede ser congelada y almacenada en nitrógeno líquido en condiciones tales que pueden ser mantenidas por tiempos prolongados [37].

Para poder trabajar con células que no entren en senescencia se utilizan poblaciones celulares derivadas de tumores, los cuales tienen la capacidad de poder crecer indefinidamente. Incluso dentro de un cultivo primario, algu-

nas veces las células sufren ciertos cambios genéticos espontáneos llamados transformaciones oncogénicas, las cuales les permiten también a ellas crecer indefinidamente. En este caso se dice que las células son oncogénicamente transformadas o simplemente transformadas. Un cultivo de células con un período de vida indefinido se considera inmortal y se llama línea celular [37]. La mayoría de las líneas celulares han perdido algunas o la mayoría de las funciones características de las células diferenciadas de las que derivan.

Sin importar su origen, es decir si es tumoral o por transformación espontánea, las células de las líneas inmortales usualmente presentan cromosomas con estructuras anormales. Además, el número de cromosomas por lo general es diferente del de las células normales de las cuales derivan, aumentando o disminuyendo a medida que las células continúan dividiéndose en el cultivo. Las células con un número aumentado o disminuído de cromosomas se llaman poliploides e hipodiploides respectivamente, mientras que aquellas que no conservan el número múltiplo de cromosomas se denominan aneuploides.

Entre las distintas líneas celulares existentes se encuentran las dos que interesan en el presente trabajo de tesis: la línea Vero y la HeLa. La línea celular Vero fue iniciada a partir del riñón del Mono Verde Africano normal adulto (*Cercopithecus aethiops*) el 27 de marzo de 1962 por Y. Yasumura e Y. Kawakita en la Universidad de Chiba, Japón. Estas células se caracterizan por ser células adherentes, de morfología variable. El análisis citogenético revela que es una línea hipodiploide [38]. Por su parte, la línea celular HeLa fue iniciada a partir de un adenocarcinoma de cervix de una mujer adulta de raza negra. Estas células pertenecen a una línea aneuploide y se caracterizan por ser adherentes, de morfología epitelial. Contienen secuencias del virus de papiloma humano 18 (HPV-18) [39].

### 1.2.1. Caracterización de las células neoplásicas en cultivo

La morfología y muchas de las propiedades de las células tumorales son claramente diferentes de las de las células normales de las que derivan y algunas de estas diferencias se hacen evidentes cuando se las cultiva. Normalmente las células animales crecen únicamente cuando están adheridas a la superficie plástica de una cápsula de cultivo y son mantenidas a baja densidad celular. La mayoría de ellas detienen su crecimiento cuando contactan con otras células, lo que se conoce como inhibición por contacto [37]. Por ello tienden a formar monocapas de células relativamente ordenadas que dejan de proliferar



Figura 1.3: Pérdida de inhibición por contacto en un cultivo celular. Las células normales dejan de crecer cuando han formado una monocapa que recubre toda la superficie de cultivo en tanto que las células cancerosas continúan creciendo y se apilan unas sobre otras.

y se encuentran en estado quiescente o fase  $G_0$  del ciclo celular. Por el contrario, las células neoplásicas son más redondeadas y menos adherentes unas con otras y con la base de la placa de cultivo, formando agregados celulares tridimensionales que pueden reconocerse a través del microscopio (Fig. 1.3). Estas células, que presentan cambios morfológicos variables (pleomorfismo, núcleos hiper cromáticos, etc.), tienen la habilidad de crecer sin estar adheridas a la matriz extracelular, exhiben menor requerimiento de factores de crecimiento, tienen la capacidad de secretar activador del plasminógeno y sufren la pérdida de los microfilamentos de actina.

### 1.3. Adherencia celular

La transición de una célula normal hacia una célula maligna implica muchos cambios genéticos, como han sido descritos anteriormente, y otros tantos epigenéticos. La transformación maligna se acompaña de pérdidas progresivas de la homeostasis de los tejidos y de perturbaciones en la arquitectura tisular, que culmina en la invasión tumoral del parénquima y en el desarrollo de metástasis a distancia. Un componente crítico de esta transformación implica el desarrollo de alteraciones en el fenotipo “mecánico” de la célula y del mi-

croambiente que la rodea. Estas diferencias mecánicas incluyen modificaciones en la estructura celular y tisular, cambios adaptativos del medioambiente inducidos por fuerzas que se deben al crecimiento neoplásico, alteraciones en el procesamiento de decodificación de las señales micromecánicas producidas por la matriz extracelular (MEC), y la remodelación del estroma extracelular. La MEC es una compleja red de proteínas y polisacáridos, secretados por las células en el espacio intercelular, que se interdigitan. Las interacciones mecánicas entre las células neoplásicas y entre estas células y la MEC han sido implicadas en la proliferación, movilidad y señalización celular [40–43].

El ensamblado de los diferentes tejidos y su organización en órganos queda determinado por las interacciones moleculares a nivel celular. Este tipo de estructuras no sería posible de no ser por la expresión, regulada temporal y espacialmente, de un amplio conjunto de moléculas de adhesión. Las células pueden adherirse directamente una a la otra (adhesión célula-célula) a través de proteínas integrales de membrana, llamadas moléculas de adhesión celular (MAC), que habitualmente se agrupan en uniones celulares especializadas. Las células también se adhieren indirectamente (adhesión célula-matriz) a través de la unión de receptores de adhesión en la membrana plasmática a componentes de la MEC que las rodea. Estos dos tipos básicos de interacción permiten no sólo la agrupación de las células en diferentes tejidos sino además la transferencia bidireccional de información entre el exterior y el interior celular. Las adhesiones célula-célula y célula-matriz son responsables de la formación, composición, arquitectura y función de los tejidos animales. Todas estas funciones pueden llevarse a cabo porque las uniones celulares están muy especializadas. Las uniones celulares pueden clasificarse en tres grupos funcionales (Fig. 1.4):

1. Uniones oclusivas o estrechas, que proporcionan un sellado de la región situada entre las células epiteliales limitando el trasiego, incluso de pequeñas moléculas, entre las dos superficies de las células. Son típicas en epitelios, como el intestinal y el renal, que actúan como verdaderas barreras de separación.
2. Uniones de anclaje, que unen mecánicamente las células con sus vecinas o con la MEC, permitiendo formar una estructura sólida que soporta tensiones mecánicas.
3. Uniones de comunicación, que median el paso de señales químicas o eléctricas entre células adyacentes. Los ejemplos típicos los representan las uniones “gap” y las sinapsis químicas.



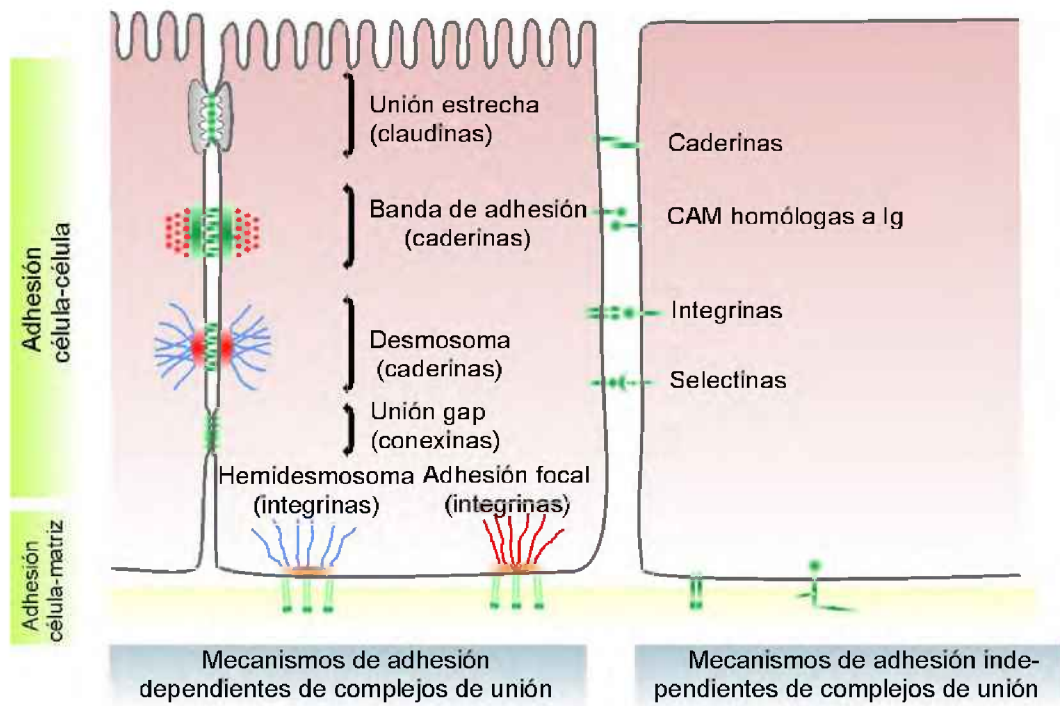


Figura 1.4: Esquema de los mecanismos de adhesión celular de acuerdo a su dependencia con los complejos de unión.

Las uniones de anclaje son las que habitualmente intervienen en la definición tanto de las características de crecimiento neoplásico como de crecimiento en cultivos celulares. Estas uniones se encuentran ampliamente distribuidas en todos los tejidos animales y forman una estructura que se extiende por la membrana, anclando los filamentos del citoesqueleto que son los que definitivamente soportan las tensiones mecánicas, dado que la bicapa lipídica es endeble y no puede transmitir las fuerzas (Fig. 1.5). Las uniones de anclaje cumplen las dos funciones básicas antes mencionadas: mantener las células unidas entre sí y mantenerlas ancladas a la MEC.

Las uniones intercelulares se clasifican en uniones adherentes y desmosomas y se encuentran formadas por proteínas transmembrana de adhesión pertenecientes a la familia de las caderinas. Las uniones célula-MEC se clasifican en contactos focales y hemidesmosomas y están formadas por proteínas de la familia de las integrinas (Fig. 1.4). En particular, los contactos focales son sectores de adhesión muy especializados entre filamentos de actina del citoesqueleto y la MEC, que permiten a la célula extenderse sobre el sustrato al

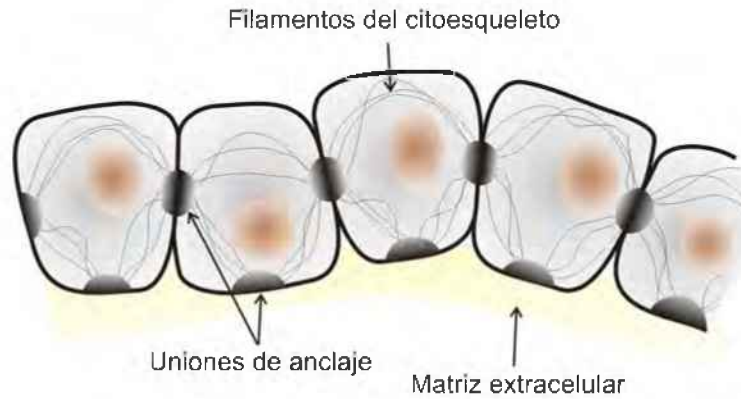


Figura 1.5: Esquema de un epitelio en el cual las uniones de anclaje unen los filamentos del citoesqueleto de diversas células entre sí, y entre las células y la matriz extracelular.

cual está adherida. Pueden observarse como regiones en las que los espacios normales de 50 nm entre la parte basal de la célula y el sustrato se reducen a sólo 10–15 nm. Aquí, las fibras de estrés (haces contráctiles de actina y miosina II) finalizan en la membrana plasmática donde se localizan las integrinas. Además de la función de anclaje que cumplen los contactos focales, también pueden transmitir señales desde la MEC al interior de la célula regulando la supervivencia, el crecimiento, la proliferación, la morfología, el movimiento y la diferenciación de las células en respuesta al ambiente extracelular. El gen supresor de tumores, o anti-oncogén DCC (del inglés Deleted in Colon Cancer), codifica una proteína transmembrana de similitud estructural con las MAC. Por tanto, se cree que el gen DCC está implicado en la transmisión de señales responsables de fenómenos como la inhibición por contacto, una propiedad que se pierde en la transformación maligna.

### 1.3.1. Moléculas de adhesión celular

Este gran grupo de proteínas se clasifica en cuatro grandes familias: las caderinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), las integrinas y las selectinas. Algunas otras proteínas de membrana, cuyas estructuras no perte-

necen a ninguna de las grandes familias de las MAC, también participan en la adhesión célula-célula en varios tejidos.

Las MAC median, a través de sus dominios extracelulares, las interacciones adhesivas entre células del mismo tipo (adhesión homotípica) o entre células de diferente tipo (adhesión heterotípica). Una MAC presente en una célula puede adherirse directamente al mismo tipo de MAC (unión homofílica) o a otra clase de MAC (unión heterofílica). Las uniones célula-célula pueden ser firmes y duraderas, por ejemplo, entre células nerviosas de la médula espinal, o relativamente débiles y transitorias, como ocurre en las células del sistema inmune que deben atravesar los vasos sanguíneos y desplazarse.

Los dominios citosólicos de las MAC actúan como proteínas adaptativas multifuncionales que pueden unir a las MAC, directa o indirectamente, con elementos específicos del citoesqueleto, o pueden, incluso, reclutar moléculas intracelulares con función señalizadora para controlar otras proteínas o la expresión génica. Dado que las adhesiones célula-célula están íntimamente asociadas con el citoesqueleto y con las vías de señalización, el entorno celular influye en la forma y las propiedades funcionales de la misma. Por otra parte, la forma y las funciones celulares influyen a su vez sobre el entorno. Por lo tanto, conectividad y comunicación son propiedades celulares íntimamente relacionadas.

Las interacciones adhesivas entre células varían considerablemente dependiendo del tipo particular de MAC que participe y del tejido al que pertenezcan. Pueden lograrse adhesiones bien firmes al combinar muchas interacciones débiles en un área pequeña y bien definida. Algunas de las variables que pueden determinar la naturaleza de la adhesión entre dos células son: i) la afinidad de unión entre las moléculas interactuantes, es decir las propiedades termodinámicas [44]; ii) la tasa de asociación/disociación de cada molécula, es decir las propiedades cinéticas; iii) la distribución espacial (agrupación a alta o baja densidad) de las moléculas de adhesión, es decir las propiedades geométricas; iv) los estados activos e inactivos de las MACs con respecto a la adhesión, es decir las propiedades bioquímicas; v) las fuerzas externas tales como los flujos laminares o turbulentos de células en el sistema circulatorio, es decir las propiedades mecánicas.

En la mayoría de las ocasiones existen contactos adhesivos intercelulares (Fig. 1.4) que no implican la formación de uniones intercelulares organizadas. Las membranas plasmáticas que interactúan simplemente se sitúan muy próximas y siguen trayectos paralelos, dejando un espacio de tan solo 10–20 nm entre ellas. Este tipo de contacto, que no forma uniones, puede resultar óptimo para la migración celular, ya que es suficientemente fuerte para

soportar la tracción y facilitar la interacción de las proteínas adhesivas de transmembrana de adhesión, pero no tanto como para inmovilizar la célula.

### **1.3.2. Funciones de la matriz extracelular**

Algunos receptores de superficie, entre los que se incluyen las integrinas, tienen la capacidad de unirse a componentes de la MEC adhiriendo células entre sí de forma indirecta, a través de sus interacciones con la matriz. Los tres componentes más abundantes de la MEC son los proteoglicanos, un tipo específico de glicoproteína, el colágeno, formado por proteínas fibrilares y las proteínas solubles multiadherentes, como la fibronectina. La proporción entre células y matriz varía enormemente dependiendo del tejido. Las diferencias en la composición de la matriz le permiten a la célula saber en qué tejido se encuentra y qué actividad debe realizar. La matriz sirve también como reservorio de muchas moléculas de señalización extracelular, que controlan el crecimiento y la duplicación celular, y provee una red a través del cual las células pueden moverse.

### **1.3.3. Moléculas de adhesión y matriz extracelular en los tumores malignos**

La invasión y metástasis son el sello biológico de los tumores malignos. Son la principal causa de la morbilidad relacionada con el cáncer. Para que las células tumorales se suelten de la masa primaria, penetren en los vasos sanguíneos o linfáticos y crezcan secundariamente en un lugar distante, deben seguir una serie de pasos. Las células normales están pegadas entre sí y a sus alrededores mediante las moléculas de adhesión ya descritas. En particular, las caderinas epiteliales son las mediadoras de la adherencia homotípica en el tejido epitelial, sirviendo para mantener juntas a las células epiteliales. En varios tumores existe una regulación negativa (disminución) de la expresión de esta caderina. Presumiblemente, esto reduce la capacidad de las células neoplásicas de adherirse entre sí y facilita que se desprendan del tumor primario y avancen en los tejidos vecinos [45].

Para penetrar en la MEC, las células tumorales se adhieren antes a sus componentes, como laminina y fibronectina, mediadas por receptor. Las células epiteliales normales expresan receptores de alta afinidad para la laminina de la membrana basal, que están polarizados en su superficie basal. Por el contrario, las células carcinomatosas poseen muchos más receptores, y se distribuyen en todo el perímetro de la membrana celular, pareciendo haber una

correlación entre la densidad de receptores de laminina y la capacidad de invasión de ciertos tumores.

#### **1.3.4. Control extracelular del crecimiento y la división celular**

La morfología de una célula cambia a medida que esta se desliza y avanza sobre un sustrato para ocupar un espacio vacante y esto puede tener un impacto importante sobre el crecimiento, la división y la supervivencia celular. Cuando se cultivan en suspensión fibroblastos o células epiteliales, estas se muestran redondeadas y rara vez se dividen. Pero cuando estas células logran adherirse a un sustrato, rápidamente forman adhesiones focales en los sitios de unión y comienzan a crecer y proliferarse, lo que se conoce como división celular anclaje dependiente.

La adhesión celular genera señales de proliferación y crecimiento a partir de las adhesiones focales. La unión de moléculas provenientes de la matriz extracelular, como la laminina y la fibronectina, a las integrinas, desencadena la activación local de proteínas quinasas, entre ellas la quinasa de adhesiones focales (FAK), las cuales activan las cascadas intracelulares de señalización que promueven la supervivencia, el crecimiento y la división celular.

#### **1.3.5. Desplazamiento celular**

La migración celular es una característica esencial, tanto de procesos fisiológicos como patológicos, de los organismos superiores. En el caso particular del cáncer, tiene un rol prioritario en la invasión de tejidos circundantes y distantes, dado que las células neoplásicas se desplazan hacia los vasos sanguíneos y linfáticos, y son transportadas hacia otros lugares del organismo donde producen metástasis.

El movimiento de las células es un proceso complejo altamente integrado dependiente del cortex de actina situado bajo la membrana plasmática. En él están implicadas tres actividades distintas: i) la protrusión, mediante la cual las estructuras ricas en actina son empujadas hacia el frente celular; ii) la adhesión, mediante la cual el citoesqueleto de actina conecta la membrana plasmática con el sustrato; iii) la tracción, mediante la cual la mayor parte del citoplasma es dirigido hacia adelante (Fig. 1.6).

En la etapa de protrusión aparecen fuerzas generadas por la polimerización de actina que impulsan la membrana plasmática hacia adelante. Distintos

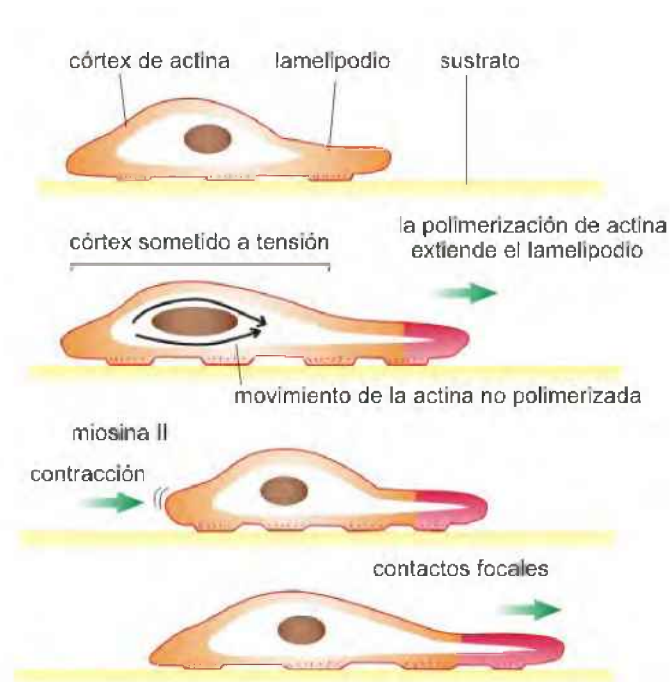


Figura 1.6: Esquema de cómo las fuerzas generadas en el córtex rico en actina (zona roja) pueden desplazar la célula hacia adelante. Mientras la célula se desplaza hacia adelante se forman nuevos contactos focales en el frente y se desensamblan los existentes en la parte posterior.

tipos celulares generan distintos tipos de estructuras de protrusión, como filopodios o microespinas, lamelipodios y pseudópodos, todos formados por un núcleo denso de filamentos de actina que excluye los orgánulos rodeados de membrana. Los filopodios que se forman en algunos tipos de fibroblastos son esencialmente unidimensionales. Contienen un núcleo de haces de actina parecidos a las microvellosidades, pero más largos, delgados y dinámicos. Los lamelipodios, que se forman en células epiteliales y fibroblastos, son estructuras laminares bidimensionales y están formados por una red ortogonal de filamentos de actina entrecruzados que descansan, en su mayoría, en un plano paralelo al del sustrato sólido. Finalmente, los pseudópodos, que se forman en amebas y neutrófilos, son pequeñas proyecciones tridimensionales formadas por un gel filamentoso de actina.

Un aspecto muy importante de la locomoción es la íntima relación entre el

citoesqueleto y la adhesión celular. Aunque cualquier tipo de arrastre requiere cierto grado de adhesión al sustrato, parece que las vellosidades de adhesión y locomoción están relacionadas de forma inversa, de manera que las células altamente adhesivas se desplazan más lentamente que las células con adhesión débil. Existen células débilmente adheridas al sustrato de manera que la fuerza de polimerización de actina empuja el frente de avance en forma muy rápida. En el otro extremo existen células que, cuando se cultivan sobre un sustrato, forman grandes lamelipodios que se adhieren suficientemente fuerte como para permitir el avance. En estos lamelipodios continúan funcionando el ciclo de nucleación localizada de nuevos filamentos de actina, la despolimerización de los filamentos viejos y la contracción dependiente de miosina. Sin embargo, como el frente de avance tiene un impedimento físico para desplazarse, es la red entera de actina la que retrocede hacia el cuerpo celular. Habitualmente, el grado de adhesión de la mayoría de las células se encuentra entre estos dos extremos y la mayoría de los lamelipodios presentan algún tipo de combinación de protrusiones de filamentos de actina en avance o flujos inversos de actina.

Como los lamelipodios, los filopodios y los pseudópodos se desplazan sobre un sustrato generando nuevas zonas de unión. Estas zonas se observan como regiones en las cuales la membrana plasmática está extremadamente relacionada con el sustrato y en el caso de las células que se arrastran, los lugares de unión, que disponen de la misma maquinaria que se encuentra en los contactos focales, se forman generalmente en el frente y permanecen estacionarios hasta que la célula se desplaza. Cuando los lamelipodios dejan de estar unidos al sustrato, se sitúan en la superficie dorsal de la célula y son transportados hacia atrás como un rizo.

Los lugares de adhesión establecidos en el frente de avance, actúan como puntos de anclaje que permiten a las células generar tracción con el sustrato y empujar el cuerpo celular hacia adelante. Las fuerzas de tracción se generan mediante las proteínas motoras de miosina II.

Por otra parte, el desplazamiento direccional en las células implica que ellas se encuentren polarizadas, pero el movimiento celular polarizado resulta poco útil a menos que responda a cambios físicos o químicos en el ambiente. La quimiotaxis es un desplazamiento celular en una dirección, controlado por un gradiente de una sustancia química que difunde. La dirección de la migración celular también puede estar influenciada por sustancias químicas no difusibles, unidas a la matriz extracelular o a la superficie de las células. La activación de receptores por estas señales puede provocar, además de una polimerización dirigida de actina, un incremento de la adhesión celular. En el caso de los tumores invasivos, el desplazamiento celular se ve favorecido por la sobre-

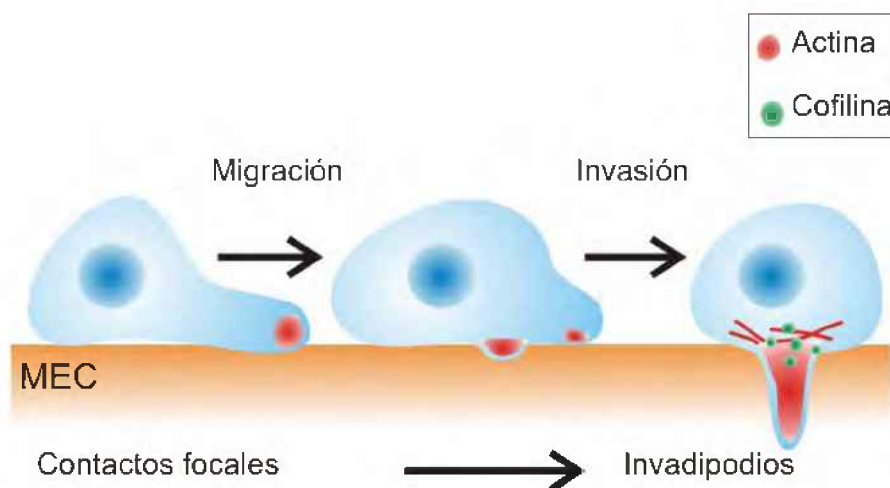


Figura 1.7: Modelo de la migración celular sobre y a través de la matriz extracelular (MEC) de un carcinoma. Las células utilizan contactos focales como moléculas dinámicas de adhesión, pero en respuesta a señales invasivas, estas estructuras maduran invadipodios estables, cuando las células migran a través de la MEC rígida [46]

regulación de los genes que codifican para la cofilina, una proteína relacionada directamente con la capacidad de las células carcinomatosas de censar en forma direccional (quimiotaxis) el factor de crecimiento epitelial (EGF) [46].

Para atravesar una barrera de MEC densa, las células neoplásicas necesitan extender protrusiones con la habilidad de remodelar y degradar la MEC. Este tipo de protrusión es particularmente importante para atravesar la membrana basal que cubre los vasos sanguíneos. Las células neoplásicas invasivas, cultivadas sobre sustratos fisiológicos, forman protrusiones de la membrana ricas en actina que se extienden verticalmente desde la membrana ventral. Estas estructuras han sido denominadas invadipodios por poseer la capacidad (proteolítica) de degradar la MEC (Fig. 1.7) [40, 46, 47].

### 1.3.6. Las fuerzas mecánicas y su implicancia en el desarrollo tumoral

La relación dinámica que existe entre las propiedades biofísicas de las células y la MEC, establece una reciprocidad dinámica y mecánica en la cual, la



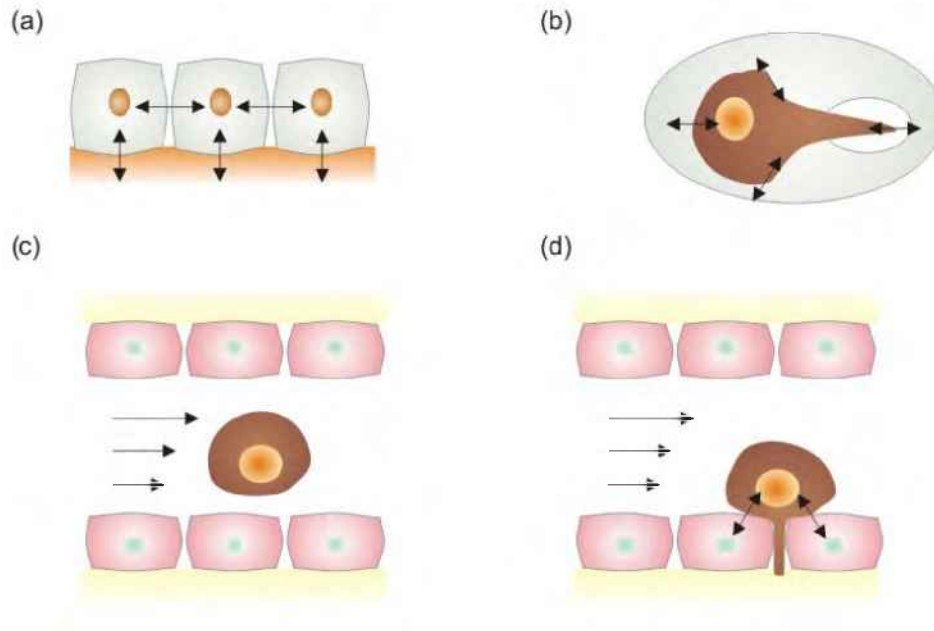


Figura 1.8: Esquema de posibles fuerzas mecánicas que afectan a las células. a) Fuerzas mecánicas de una célula normal con sus vecinas y la MEC; b) célula tumoral dentro del parénquima circundante intercambiando fuerzas mecánicas con el entorno (de tracción, protrusivas, etc.); c) fuerzas de cizalla en una célula tumoral en la vasculatura; d) fuerzas sobre una célula tumoral atravesando la pared endotelial.

capacidad de las células para ejercer fuerzas contráctiles contra el medioambiente extracelular, se equilibra con la resistencia elástica de la MEC a la deformación (rigidez o elasticidad de la MEC). Actualmente se sabe que este balance de fuerzas puede regular un amplio rango de propiedades celulares que son críticas para la génesis tumoral, entre las que se incluyen la estructura, la motilidad, la proliferación y la diferenciación celular. En otras palabras, las señales micro-mecánicas de la MEC y el control estructural celular se encuentran íntimamente relacionados con las redes de traducción de señales, para controlar los comportamientos fundamentales de un tumor, como son su transformación, invasión y metástasis.

En todos los tejidos, incluso en aquellos que parecen estáticos, las células encuentran constantemente una variedad de fuerzas mecánicas a las cuales responden activamente con otras fuerzas mecánicas [Fig. 1.8(a)]. Estas fuerzas

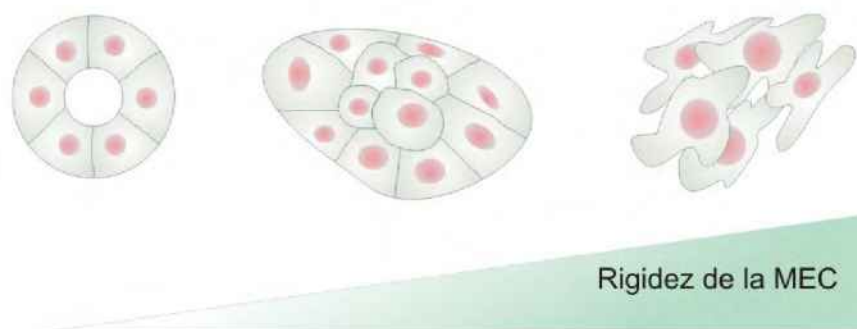


Figura 1.9: Esquema del efecto del incremento de la rigidez de la MEC sobre la morfogénesis epitelial [40].

pueden originarse de células vecinas o de la MEC, y se canalizan a través de los receptores específicos de adhesión descritos anteriormente, como así también a través de fuerzas mecánicas aplicadas de manera no específica al tejido completo, entre las que se incluyen fuerzas intersticiales y flujos de rozamiento (Fig. 1.8).

Las alteraciones en las interacciones mecánicas, tanto específicas como inespecíficas, contribuyen a la displasia de los tejidos asociada habitualmente con la iniciación tumoral. Por ejemplo, las células epiteliales transformadas exhiben diferencias significativas con respecto a su contraparte normal en cuanto a los perfiles de filamentos intermedios y a la arquitectura del citoesqueleto, tal como ocurre típicamente en la transición epitelio–mesenquimatoso [48–50]. Más aún, la modulación de la rigidez de la MEC y de la contractilidad celular dependiente de la rigidez, es suficiente para inducir la transformación de células epiteliales en cultivo. Por ejemplo, el uso de geles de MEC de alta rigidez altera la expresión de integrinas, incrementa el ensamblado de adhesiones focales, distorsiona la arquitectura tisular y promueve la invasión (Fig. 1.9) [51]. Las alteraciones en la estructura de las células neoplásicas cuando se despegan e invaden se acompaña de cambios recíprocos en topología y propiedades mecánicas de la MEC. La formación tumoral in vivo se acompaña habitualmente por un endurecimiento progresivo de los tejidos y de la MEC.

## Fractales y escalado dinámico

Las metodologías de estudio de superficies, como el análisis de la dimensión fractal de un objeto y la determinación de la dinámica de su rugosidad, constituyen una herramienta robusta que permite la caracterización morfológica y dinámica de sistemas biológicos complejos, como pueden ser el árbol dendrítico neuronal, el árbol bronquial y la expansión tumoral, difíciles de ser evaluados por otros métodos (Fig. 2.1) [11, 13, 54].

Desde esta perspectiva, la teoría de escalado dinámico es una herramienta que permite estudiar el desarrollo de la rugosidad de una superficie como,

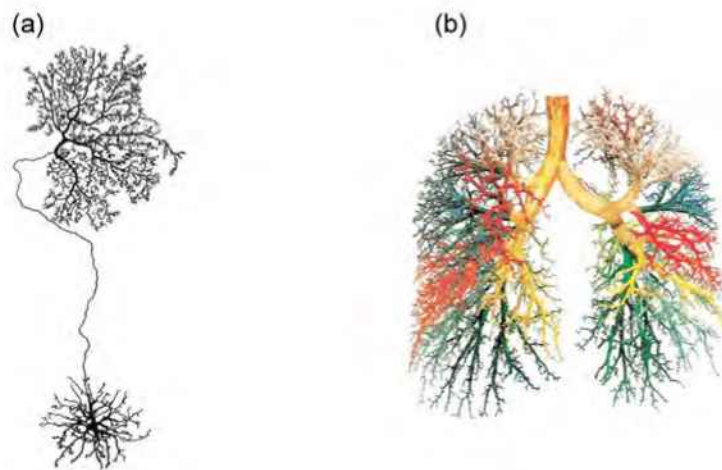


Figura 2.1: Ejemplos de fractales en la naturaleza: a) una neurona y b) el árbol bronquial

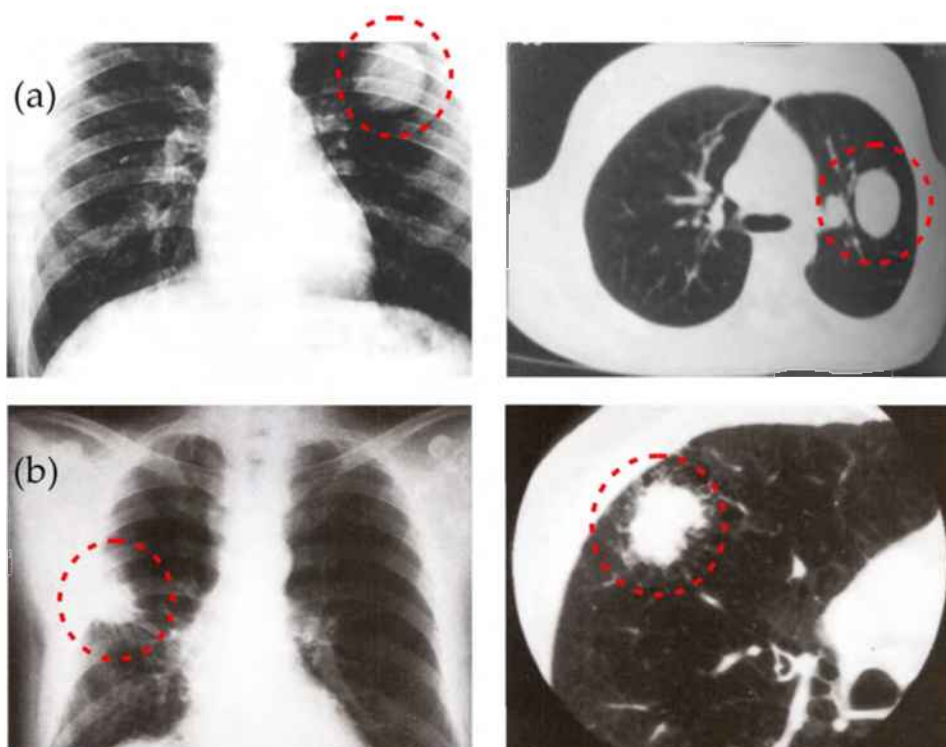


Figura 2.2: Imágenes tomadas por Radiografía de rayos X y Tomografía Axial Computada: a) nódulo solitario pulmonar de bordes bien definidos, correspondiente a un granuloma de células plasmáticas; b) nódulo único de contornos espiculados en el pulmón derecho, correspondiente a un carcinoma de pulmón [52, 53].

por ejemplo, la de una masa tumoral, y su interacción con el entorno. Es sabido desde hace muchos años que una masa espiculada no presenta el mismo pronóstico para un paciente que una masa de bordes lisos (Fig. 2.2). Las técnicas mencionadas han sido especialmente desarrolladas para determinar, a partir de la evolución de los contornos de un sistema, cual será su dinámica.

## 2.1. Fractales

Un fractal es una forma geoméricamente rugosa o fragmentada que puede ser separada en partes, cada una de las cuales es una copia reducida de la forma original [5]. El término fractal fue establecido por Benoît Mandelbrot

en 1975 y deriva del latín *fractus*, que significa roto o fracturado. Un ejemplo clásico es la costa de un continente. Si se estudian dos mapas con diferentes escalas, que representen una línea de costa típica, lucen similares, es decir que no existe forma de distinguirlos si no se está particularmente familiarizado con la costa. De hecho, no es posible distinguir siquiera cual es el mapa con la mayor ampliación. Estos mapas con las dos ampliaciones diferentes no se superponen exactamente, pero sus propiedades estadísticas son iguales.

### 2.1.1. Dimensión fractal

Para caracterizar cuantitativamente a un sistema fractal se debe definir en primer instancia lo que se denomina la *dimensión de contención* (del inglés embedding dimension),  $d_C$ , del objeto que es la menor *dimensión euclidiana*,  $d_E$ , o del espacio clásico, en la que un objeto dado puede ser contenido [5]. Por ejemplo, una línea se dice que tiene una dimensión euclidiana 1, un plano una dimensión 2 y un objeto sólido una dimensión 3. Pero si se tiene una línea curvada, como la de la figura 2.3, se dice que esta línea está contenida en un plano, por lo tanto su dimensión de contención será 2. Una vez determinada la dimensión de contención del fractal es posible medir su *dimensión fractal*  $d_f$  propiamente dicha, también conocida como dimensión de Hausdorff.

Una forma de medir la  $d_f$ , entre varias posibles, es la siguiente: consideremos un objeto arbitrario de superficie  $S(l)$ , la cual puede medirse cubriéndola con cajas de tamaño  $l \times l$  y superficie  $l^{d_C}$  como se muestra en la figura 2.3. Considerando que se necesitan  $N(l)$  cajas para cubrirlo, se puede entonces escribir:

$$S(l) = N(l)l^{d_C} \quad (2.1)$$

de lo cual se desprende que  $N(l) \propto l^{-d_C}$ , dado que la superficie de un objeto no cambia, si se modifica la unidad de medida  $l$ . Por ejemplo, considerando objetos euclidianos tradicionales, tenemos que la superficie del círculo es proporcional al cuadrado de su radio ( $S \propto r^2$ ) y que la superficie de un cuadrado es proporcional a su lado al cuadrado ( $S \propto l^2$ ), donde el número 2 corresponde al valor de la dimensión euclidiana de estos elementos. Sin embargo para los objetos fractales se observa que

$$N(l) \propto l^{-d_f} \quad (2.2)$$

donde  $d_f$  es un número no entero o *fraccionario*.

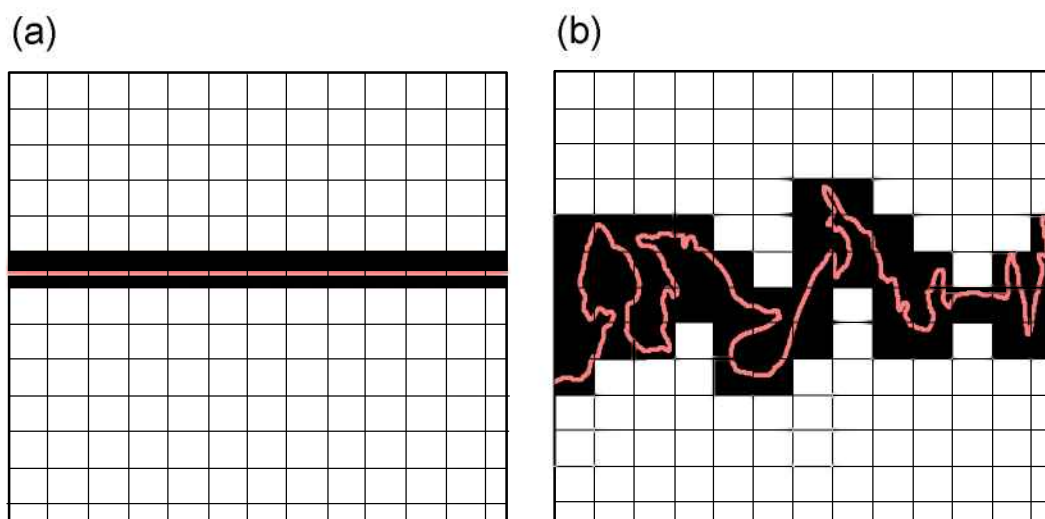


Figura 2.3: Ejemplo de dos líneas a las que se les aplica el método del conteo de cajas para calcular su dimensión fractal. Para la línea de la figura (a) la ecuación 2.3 corresponde al valor entero 1. Para el caso de la línea (b) arroja el valor fraccionario  $d_f = 1,2$ .

Los objetos que tienen  $d_f > d_E$  se llaman *fractales* [5], donde  $d_f$  es la *dimensión fractal*<sup>1</sup>. De la ecuación 2.2 se obtiene

$$d_f = \lim_{l \rightarrow 0} \frac{\ln N(l)}{\ln(1/l)} \quad (2.3)$$

Existen muchos métodos para medir la dimensión fractal de un fractal aleatorio. Las más conocidas son el método de conteo de cajas (del inglés box counting method) que se muestra en la figura 2.3 y la medida de la función de correlación. La elección del mejor método generalmente se determina según la situación experimental o numérica particular, o según la naturaleza de los datos.

### 2.1.2. Fractales autosimilares y autoafines

Un fractal puede ser autosimilar si está formado por partes que son “similares” al todo. Un ejemplo típico de fractal autosimilar es la serie que forma el

<sup>1</sup>Estrictamente, un fractal se define por  $d_f > d_T$ , donde  $d_T$  es la *dimensión topológica* del objeto estudiado.  $d_T = 0$  para una serie de puntos discontinuos,  $d_T = 1$ , para una curva,  $d_T = 2$  para una superficie y  $d_T = 3$  para un sólido.

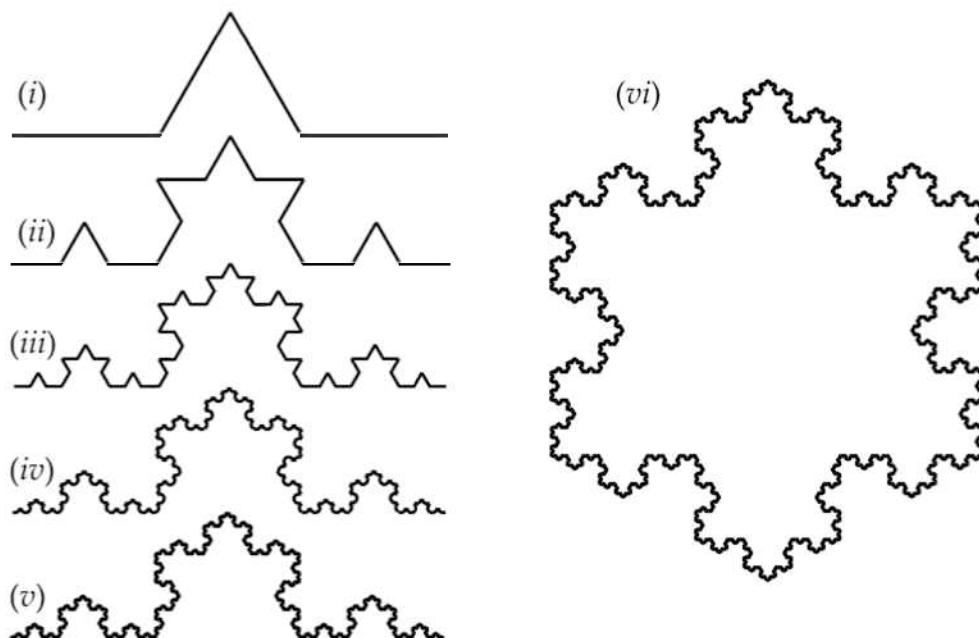


Figura 2.4: Construcción de un fractal autosimilar determinista según la serie de Koch. En cada etapa sucesiva se utiliza la formación anterior para construir el fractal.

copo de nieve de Koch que se ilustra en la figura 2.4. En este caso, las diferentes figuras que se obtienen pueden superponerse perfectamente aplicando el factor de escala correspondiente, conformando un *fractal determinista*. Para la construcción se opera de la siguiente manera: (i) se acomodan cuatro segmentos iguales y se forma un ángulo de 60 grados entre los segmentos del medio; (ii) se repite el proceso pero utilizando la figura formada en (i) en lugar de los segmentos originales; (iii), (iv) y (v) se forman por iteración del proceso anterior; en (vi) se muestra el copo de nieve de Koch ya formado. Es también lo que se conoce como un fractal *autosimilar* puesto que la transformación isotrópica. La dimensión del copo de nieve de Koch tiene una dimensión topológica de uno, pero no puede ser tratada como una curva; la longitud entre cualesquiera dos puntos en el fractal es infinita. Ningún segmento del fractal tiene parecido a una línea, pero tampoco tiene parecido a una parte de un plano. Esto lleva a la conclusión de que su dimensión se encuentra entre uno y dos.

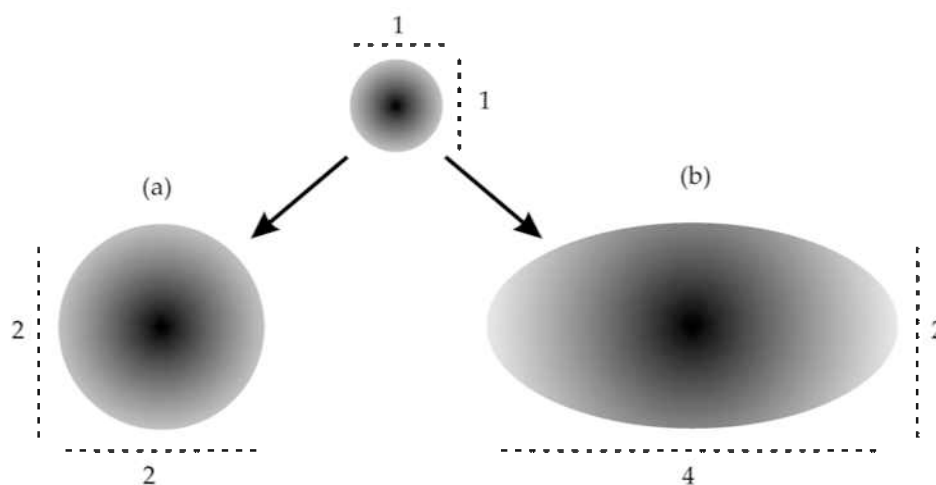


Figura 2.5: Efectos del reescalado isotrópico y anisotrópico, sobre el mismo objeto. a) El diámetro se agranda en un factor dos en el caso del cambio de escala isotrópico. b) En el caso del re-escalado anisotrópico, el diámetro en la dirección Este–Oeste se agranda en un factor cuatro, mientras que el diámetro en la dirección Norte–Sur, se agranda en un factor dos, resultando una elipse. Mientras que los objetos autosimilares son invariantes ante transformaciones isotrópicas, para los objetos autoafines es necesario realizar una transformación anisotrópica.

Sin embargo, muchos objetos que existen en la naturaleza tienen conformaciones al azar. A pesar de esta aleatoriedad, estos objetos pueden ser autosimilares en un sentido *estadístico*. A estos objetos, con aleatoriedad intrínseca, que son autosimilares pero sólo en el sentido estadístico, se los llama *fractales estadísticos*.

La transformación de escala descrita para los fractales autosimilares es isotrópica, lo que significa que la dilatación incrementa el tamaño del sistema uniformemente en todas las direcciones espaciales. Otra posibilidad es que los objetos fractales deban ser re-escalados utilizando una transformación anisotrópica, a estos fractales se los llama *autoafines*. En la figura 2.5 se muestra el concepto de re-escalado anisotrópico. En la figura 2.6 se muestra un esquema de la construcción de un fractal autoafín determinista según el siguiente orden: la diagonal en (a) es dividida en cuatro partes iguales horizontalmente y reubicada formando la figura que se muestra en (b). En la siguiente iteración, se repite el mismo procedimiento para los cuatro segmentos y se llega a la es-



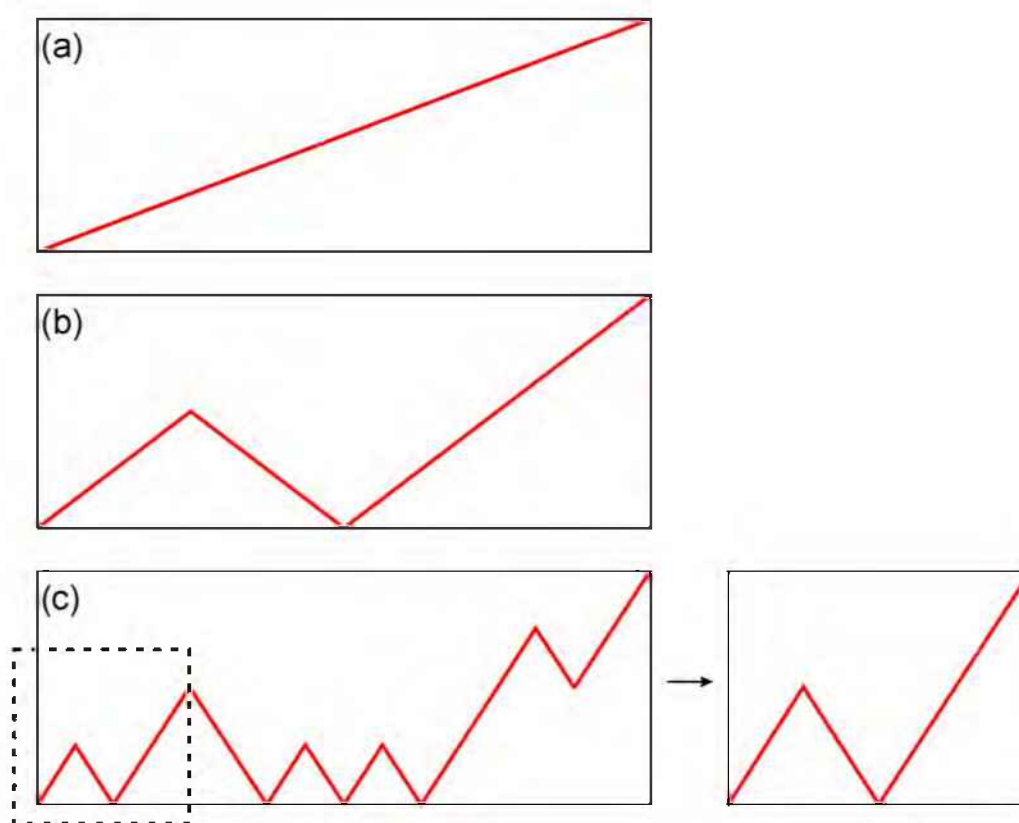


Figura 2.6: Construcción de un objeto autoafín determinista. Obsérvese en (c) que el objeto encerrado en la caja punteada es diferente del objeto formado. Esto se debe a la aplicación de un re-escalado isotrópico.

estructura (c). Es importante remarcar que si se re-escalara isotrópicamente el objeto encerrado en la caja punteada, se obtendría el objeto que se muestra a la derecha, que es diferente del objeto que se obtuvo en las iteraciones previas.

## 2.2. Escalado dinámico

Nuestra vida transcurre en interacción con las interfaces. Aún cuando nos interesamos en el interior de algo, no es posible alcanzarlo sin cruzar primero una superficie. En el caso particular de una célula, la membrana plasmática actúa no sólo como una barrera altamente selectiva, sino que muchos procesos ocurren directamente en la superficie misma. Por ejemplo, la primer interac-

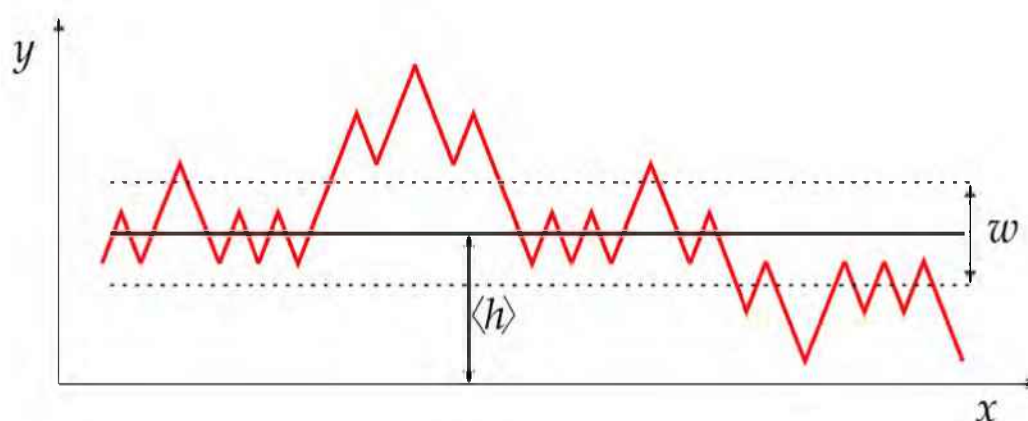


Figura 2.7: Esquema del valor medio  $\langle h(x) \rangle$  y la rugosidad  $w(x)$  o desvío estándar de la función  $h(x)$  introducida en la figura 2.6.

ción que tiene el médico con el tumor de un paciente suele ser la imagen de la superficie de la masa tumoral, a través de los métodos complementarios de diagnóstico. Sin embargo, la morfología de las superficies puede ser muy diferente dependiendo de la escala con la que se las observa. Un epitelio puede ser suave a simple vista y sin embargo puede ser rugoso cuando se lo observa con un microscopio.

En una amplia variedad de procesos naturales e industriales, tales como la formación de cristales, deposición de vapor, corrosión, erosión y crecimientos biológicos de los más diversos, la superficie o interfaz que se forma fluctúa y cambia su morfología con el tiempo [55]. En general, en tales procesos existe una competencia entre las fluctuaciones aleatorias, o al azar, que tienden a incrementar la rugosidad de la superficie, y los procesos de relajación, que tienden a suavizarla. El estudio de superficies utilizando el escalado dinámico se basa en los conceptos de escala y fractalidad, y se ha convertido en una poderosa herramienta para el estudio de superficies en crecimiento [56].

Las superficies rugosas pueden cuantificarse utilizando funciones autoafines. Un ejemplo es el modelo de la figura 2.7 que introduce una de estas funciones, donde el perfil mostrado representa una función  $h$  que depende de una variable independiente  $x$ . Este tipo de funciones,  $h(x)$ , permite calcular el valor medio,  $\langle h(x) \rangle$ , y la *rugosidad* de la misma,  $w = f(h)$ , o el desvío estándar de  $h(x)$ .

La ecuación correspondiente a una función fractal autoafín, como es la

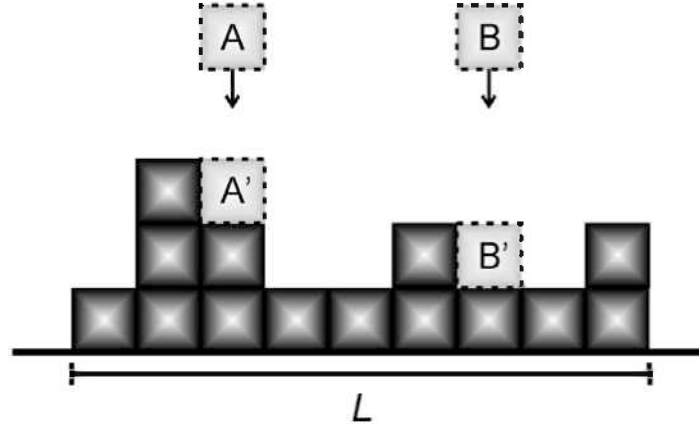


Figura 2.8: Esquema de un sistema de múltiples partículas en formación. El modo más sencillo de plantearlo es utilizando una retícula de ancho  $L$  sobre la que se suman partículas de igual forma y tamaño.

función  $h(x)$ , se formula de la siguiente manera:

$$h(x) \sim b^{-\alpha} h(bx) \quad (2.4)$$

donde  $\alpha$  es el denominado exponente de Hölder o exponente de rugosidad. La relación 2.4 muestra que una función autosimilar debe ser *reescalada* de diferente manera horizontal y verticalmente para que el objeto resultante se superponga con el objeto que se obtuvo en la generación previa, esto significa que si se incrementa la función horizontalmente en un factor  $b$  ( $x \rightarrow bx$ ), se debe incrementar en un factor  $b^\alpha$  verticalmente [ $h \rightarrow b^\alpha h$ ]. Para el caso especial de  $\alpha = 1$ , la transformación es isotrópica y el objeto es autosimilar.

La formación de superficies e interfaces está influenciada por un gran número de factores siendo prácticamente imposible distinguirlos a todos ellos. Sin embargo, muchas veces es posible explicar mediante un pequeño número de leyes básicas, independientes de las características particulares de cada sistema, la morfología y la dinámica de crecimiento de diferentes sistemas. Este es el fundamento de la teoría del escalado dinámico.

### 2.2.1. Conceptos de escalado

El modo más sencillo de definir un sistema formado de múltiples partículas es hacerlo sobre una retícula, donde partículas de idéntica geometría se van

incorporando gradualmente, tal como se ejemplifica en la figura 2.8. En este sistema, las partículas llegan desde afuera y caen en línea recta desde una posición escogida al azar. Al contactar el sistema, la partícula queda posicionada y una nueva partícula es sorteada para caer. De este modo se va conformando la superficie, que se define como el conjunto de las partículas más altas en cada columna.

En consecuencia, estableciendo un punto o línea inicial de referencia para cualquier superficie se la puede caracterizar básicamente con dos parámetros:

- La altura media de la superficie,  $\langle h \rangle$ , definida como

$$\langle h(t) \rangle \equiv \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L h(i, t) \quad (2.5)$$

donde  $h(i, t)$  es la altura de la columna  $i$  al tiempo  $t$  y  $L$  es el ancho del sistema. Si la tasa de deposición es constante, la altura media aumenta linealmente con el tiempo según

$$\langle h(t) \rangle \propto t \quad (2.6)$$

- La rugosidad  $[w(L, t)]$  de la interfaz, definida como la raíz cuadrada de las fluctuaciones de la altura, es la dispersión de las alturas alrededor de  $\langle h \rangle$

$$w(L, t) \equiv \sqrt{\frac{1}{L} \sum_{i=1}^L [h(i, t) - \langle h(t) \rangle]^2} \quad (2.7)$$

Para analizar cuantitativamente la rugosidad, se mide entonces la desviación estándar de la interfaz como función del tiempo. Por definición, el crecimiento comienza a partir de una línea horizontal por lo que la interfaz a tiempo cero es una línea y su rugosidad es cero (sistema liso). A medida que la deposición transcurre, la interfaz se vuelve progresivamente más rugosa.

Un ajuste típico de la evolución temporal del ancho de una superficie tiene dos regiones separadas por un tiempo de saturación característico,  $t_{sat}$ : inicialmente la rugosidad crece como una potencia del tiempo,

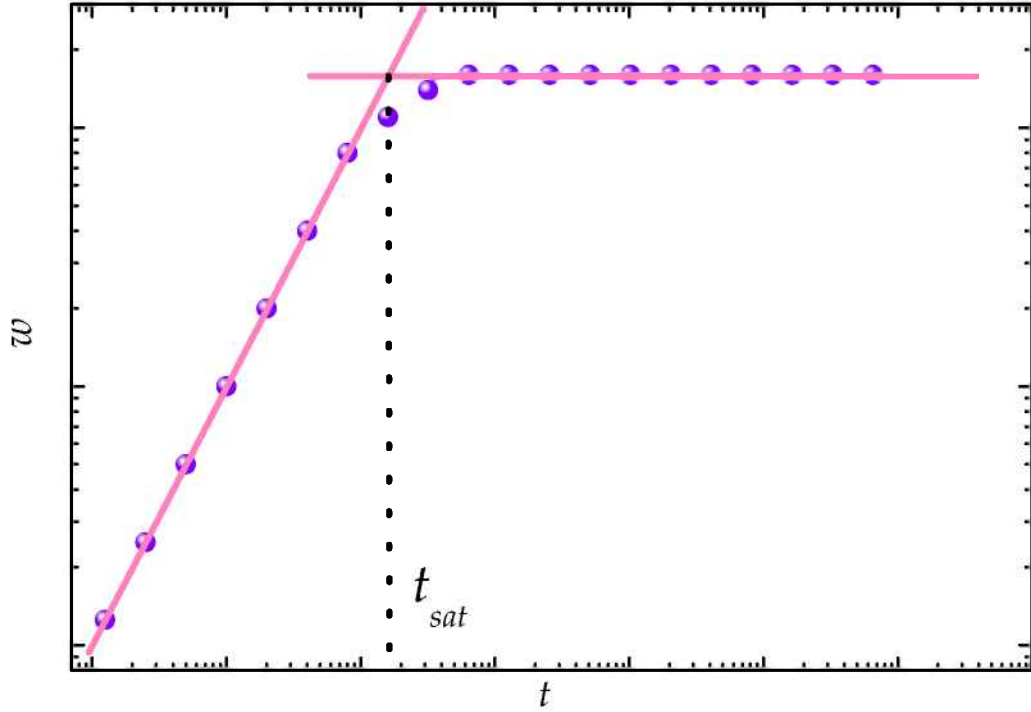


Figura 2.9: Crecimiento de la rugosidad de la interfaz ( $w$ ) con el tiempo  $t$  de un sistema genérico. Se pueden diferenciar dos regímenes característicos: (i) crecimiento como ley de potencias, que aparece como una línea recta en el ajuste log-log, y (ii) saturación.

$$w(L, t) \propto t^\beta \quad [t \ll t_{sat}] \quad (2.8)$$

donde el *exponente de crecimiento*  $\beta$  caracteriza la dinámica tiempo-dependiente del proceso de rugosidad (Fig. 2.9). El incremento como ley de potencias de la rugosidad no continúa indefinidamente, sino que es seguido por un régimen de saturación (la región horizontal de la figura 2.9) durante el cual la rugosidad alcanza su valor de saturación,  $w_{sat}$ . En la figura 2.10 se muestran cuatro curvas diferentes correspondientes a la evolución temporal de la rugosidad para cuatro sistemas de diferente tamaño inicial  $L$ . A medida que  $L$  aumenta,  $w_{sat}$  también aumenta, y la dependencia también sigue una ley de potencias

$$w_{sat}(L) \sim L^\alpha \quad [t \gg t_{sat}] \quad (2.9)$$

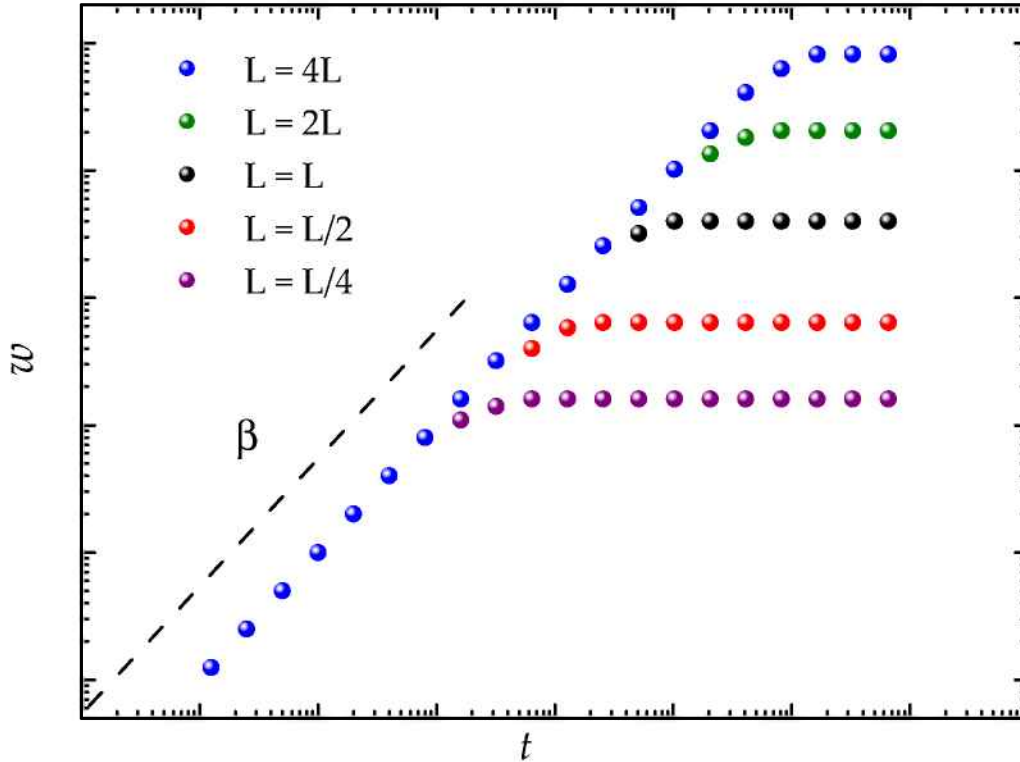


Figura 2.10: Evolución temporal de la rugosidad de la interfaz. Se utilizan escalas logarítmicas de modo tal que la dependencia como ley de potencias pueda ser observada como una línea recta. Las diferentes curvas corresponden a simulaciones de diferentes tamaños. La línea punteada tiene pendiente  $\beta$

El *exponente de rugosidad*  $\alpha$  es el segundo exponente crítico y caracteriza la rugosidad de la interfaz saturada. Es importante remarcar que el exponente  $\alpha$  no es una medida de la rugosidad de la interfaz, sino de como cambia ésta con el tamaño del sistema (Fig. 2.11). Así por ejemplo se puede tener una interfaz muy rugosa, pero que no difiere si se analiza una fracción grande o chica del frente. En este caso el valor de  $\alpha$  será bajo. Por el contrario, una superficie poco rugosa, pero que difiere mucho de principio a fin, por ejemplo si tiene picos esporádicos, tendrá valores diferentes de rugosidad dependiendo de la fracción de la superficie considerada, y su exponente  $\alpha$  será elevado [57].

El tiempo de saturación  $t_{sat}$  al cual la interfaz cambia del comportamiento que se presenta en la ecuación 2.8 al comportamiento de la ecuación 2.9

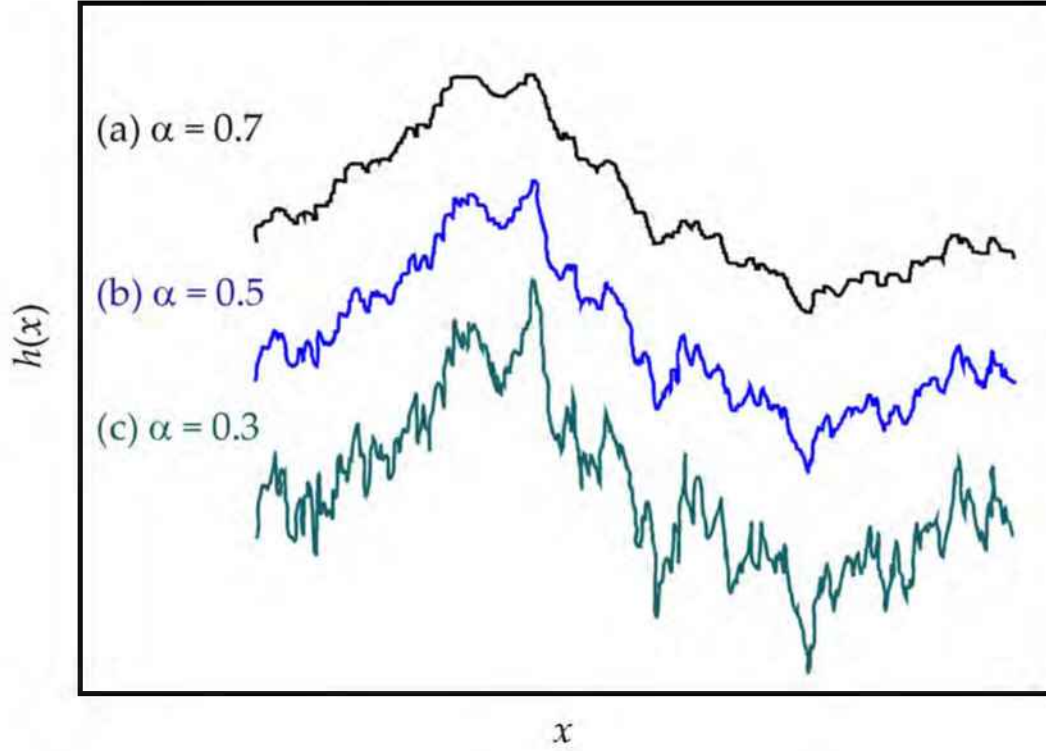


Figura 2.11: Los perfiles autoafines (a), (b) y (c) presentan exponentes de rugosidad  $\alpha$  que varían entre 0,3 y 0,7. Todos los perfiles presentan el mismo valor de  $w = 1,1 \pm 0,1$  [57,58].

depende del tamaño del sistema

$$t_{sat} \propto L^z \quad (2.10)$$

donde  $z$  se denomina *exponente dinámico*.

Los exponentes  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $z$  no son independientes, sino que guardan una relación entre sí. Por otra parte, estos exponentes presentan propiedades *universales*, esto es, son independientes de los detalles del sistema y se encuentran determinados solamente por aspectos físicos básicos del mismo. A partir de las relaciones 2.8–2.10 es posible “normalizar” las curvas de la figura 2.10. Esto es:

1. si se grafica  $w(L, t)/w_{sat}$  como función del tiempo, se obtienen curvas que saturan al mismo valor de rugosidad, independientemente de  $L$  [Fig. 2.12 (a) y (b)].

2. si se grafica la rugosidad como función de  $t/t_{sat}$  se logra que las curvas saturen al mismo tiempo característico [Fig. 2.12 (b) y (c)].

Estas dos observaciones sugieren que  $w(L, t)/w_{sat}$  es función de  $t/t_{sat}$  sólo si

$$\frac{w(L, t)}{w_{sat}(L)} \propto f\left(\frac{t}{t_{sat}}\right) \quad (2.11)$$

donde  $u = t/t_{sat}$  es el argumento de la función  $f(u)$ , la denominada *función de escalado*.

Reemplazando  $w_{sat}$  y  $t_{sat}$  en la ecuación 2.11 por sus expresiones en las ecuaciones 2.9 y 2.10, se obtiene la *relación de escalado* o *hipótesis de escalado dinámico de Family-Vicsek*.

$$w(L, t) \propto L^\alpha f\left(\frac{t}{L^z}\right) \quad (2.12)$$

Existen dos regímenes que puede cumplir la función de escala, dependiendo del argumento

1. Para valores pequeños de  $u$ , la función de escalado aumenta como una ley de potencias,

$$f(u) \propto u^\beta \quad [u \ll 1] \quad (2.13)$$

2. Cuando  $t \rightarrow \infty$  la rugosidad satura. La saturación se obtiene para  $t \gg t_{sat}$ , es decir que el argumento de la función de escalado  $u \gg 1$  y

$$f(u) = \text{constante} \quad [u \gg 1] \quad (2.14)$$

De la figura 2.9 se desprende que si uno se acerca al punto de quiebre  $(t_{sat}, w_{sat})$  desde la izquierda, se encuentra, de acuerdo a la ecuación 2.8, que  $w t_{sat} \approx t_{sat}^\beta$ . Sin embargo si uno se acerca al mismo punto desde la derecha, se obtiene de la ecuación 2.9 que  $w(t_{sat}) \approx L^\alpha$ . De estas relaciones se desprende que  $t_{sat}^\beta \approx L^\alpha$ , que de acuerdo a la ecuación 2.10 implica que

$$z = \frac{\alpha}{\beta} \quad (2.15)$$

En resumen, la función de escalado  $f(u)$  depende de  $u$  según



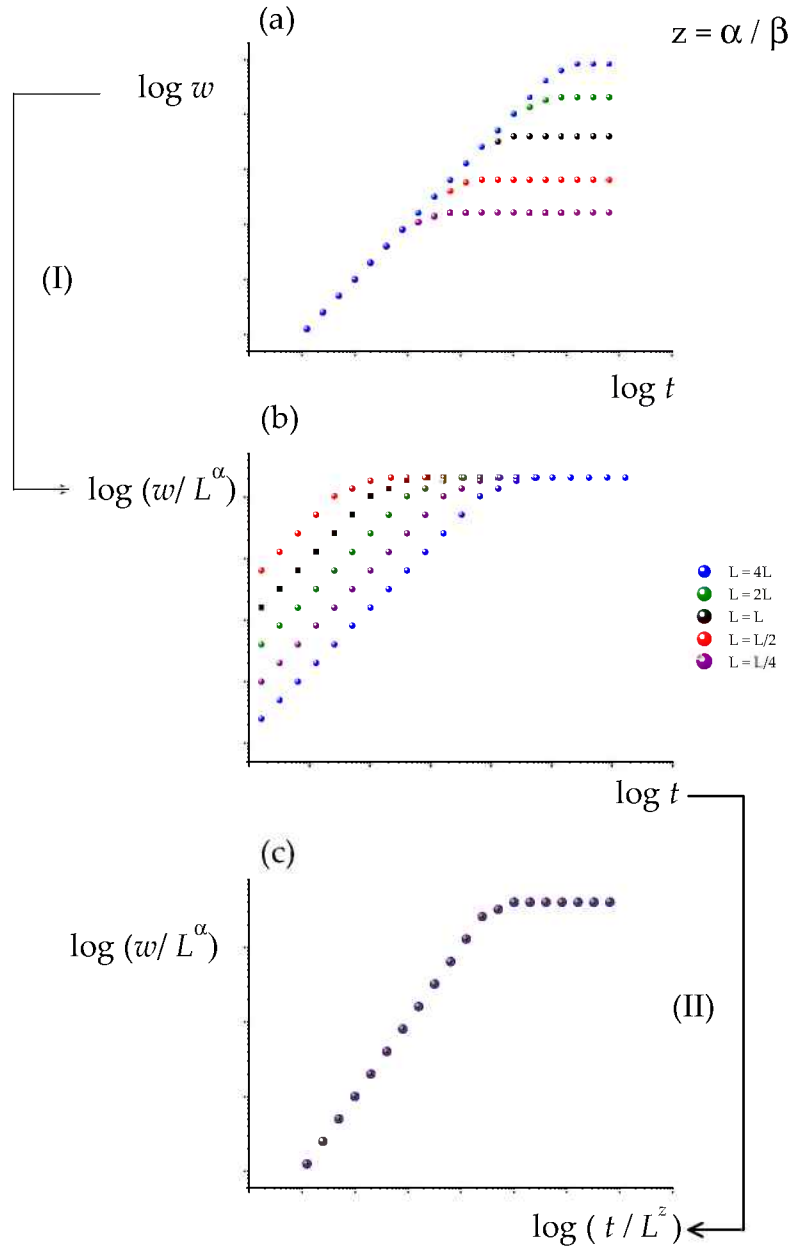


Figura 2.12: Esquema del reescalado de las curvas de rugosidad para un sistema, considerando cinco tamaños ( $L$ ) diferentes. En el paso (I) se divide la rugosidad de las curvas mostradas en (a) por  $L^\alpha$ , [figura (b)]. De acuerdo con la ecuación 2.9, las nuevas curvas saturan al mismo valor de la ordenada  $w/L^\alpha$ , pero sus tiempos de saturación son diferentes. En el paso (II) se reescala el tiempo, como  $t/L^z$ , [figura (c)]. De acuerdo con la ecuación 2.10, las curvas saturan al mismo valor de la abscisa,  $t/L^z$ .

$$f(u) = \begin{cases} \text{const} & \text{si } u \gg 1; \\ u^\beta & \text{si } u \ll 1 \end{cases} \quad (2.16)$$

Una característica importante a tener en cuenta en los procesos de crecimiento es que a lo largo de la superficie aparece correlación entre las partículas. Esto significa que las diferentes posiciones de la superficie no son completamente independientes sino que dependen de las posiciones vecinas. La nueva partícula que llega interactúa y se pega a sus vecinas más cercanas. De este modo, la altura de la nueva partícula se encontrará relacionada con la de sus vecinas. La altura de la fluctuación se moverá lateralmente y la próxima partícula que se deposite interactuará con sus vecinas, y así sucesivamente. A través de este crecimiento lateral la información sobre la altura de cada una de las vecinas se “transmite” globalmente. La distancia típica a lo largo de la cual las alturas “saben” sobre cada una de las otras, es decir la distancia característica de correlación, se denota  $\xi_{\parallel}$ .

A tiempos iniciales los sitios no se encuentran correlacionados y las partículas pueden adicionarse sin condiciones. Durante el crecimiento de la superficie  $\xi_{\parallel}$  va creciendo y la ubicación de una partícula nueva sobre la superficie estará condicionada por su entorno. Para un sistema finito,  $\xi_{\parallel}$  puede crecer hasta alcanzar el valor de  $L$ , momento en que la superficie entera se correlaciona, alcanzándose la saturación de la rugosidad de la interfaz. Entonces una vez alcanzada la saturación se cumple que

$$\xi_{\parallel} \propto L \quad [t \gg t_{sat}] \quad (2.17)$$

De acuerdo a la ecuación 2.12 la saturación ocurre al tiempo  $t_{sat}$  dado por la ecuación 2.10. Reemplazando  $L$  por  $\xi_{\parallel}$  se obtiene  $\xi_{\parallel} \approx t_{sat}^{1/z}$ , lo que para  $t < t_{sat}$  implica

$$\xi_{\parallel} \propto t^{1/z} \quad [t \ll t_{sat}] \quad (2.18)$$

Una longitud de correlación perpendicular,  $\xi_{\perp}$ , caracteriza las fluctuaciones en la dirección de crecimiento y juega el mismo comportamiento de escalado que la rugosidad de la interfaz  $w(L, t)$ .

### 2.2.2. Análisis de Fourier

El análisis de datos temporales complejos se realiza comúnmente en el espacio de las frecuencias, utilizando la transformada de Fourier [59, 60]. El

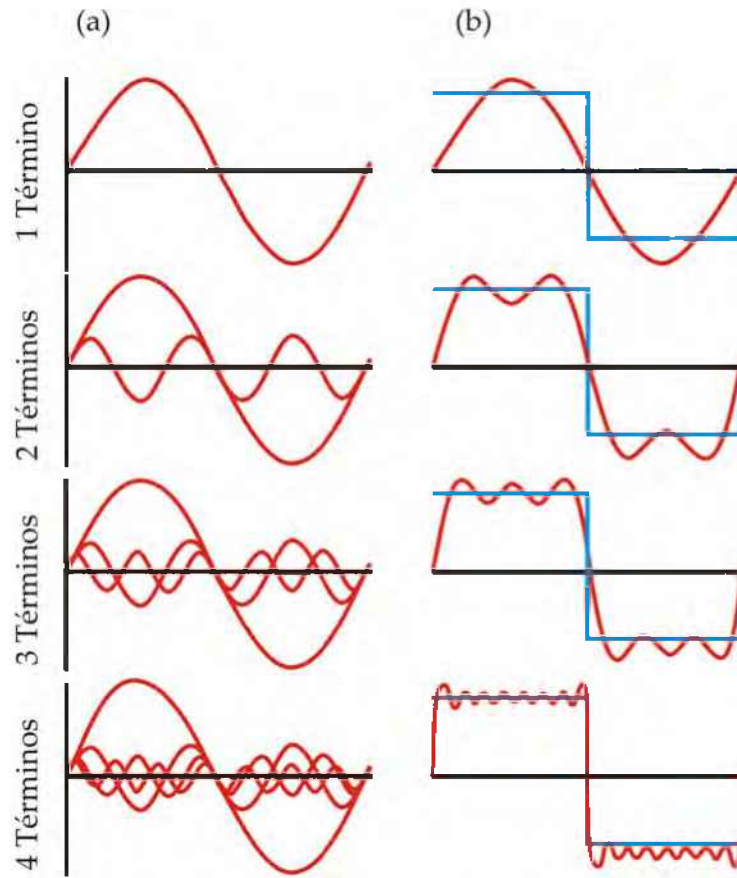


Figura 2.13: Transformada de Fourier de una onda cuadrada. En (a) se muestran los términos de frecuencia individuales y en (b) se muestra la suma de los términos de frecuencia para ajustar la función escalón u onda cuadrada.

teorema de Joseph Fourier demuestra que cualquier movimiento complejo puede ser subdividido en una serie de funciones trigonométricas de senos o cosenos superpuestos, como se muestra en la figura 2.13. La serie es infinita, pero en la práctica la frecuencia más alta corresponde al tamaño del pixelado en la imagen o a la resolución lateral de la técnica de medición. Del mismo modo, la frecuencia más baja se elige como el ancho de la imagen o longitud del perfil. Para una función temporal, la serie de Fourier corresponde a

$$f(t) = \sum_{k=\min}^{\max} a_k \text{sen}(-\theta_k) = \sum_{k=\min}^{\max} a_k e^{i\pi kt} \quad (2.19)$$

De esta manera, es posible estudiar el comportamiento dinámico de una superficie en el espacio de Fourier para lo cual hay que expresar la relación de escalado 2.12 en términos del *factor de estructura* de la interfaz [61–63]. El factor de estructura,  $S(k, t)$ , viene expresado por:

$$S(k, t) = \langle \hat{h}(k, t) \hat{h}(-k, t) \rangle \quad (2.20)$$

donde

$$\hat{h}(k, t) = \frac{1}{\sqrt{L}} \sum_x [h(x, t) - \langle h \rangle] e^{ikx} \quad (2.21)$$

es el modo  $k$ -ésimo de la altura del perfil alrededor de su valor promedio al tiempo  $t$ .

La relación de Family-Vicsek en el espacio de Fourier puede expresarse entonces como

$$S(k, t) = k^{-(2\alpha_s+1)} f(tk^{1/z}) \quad (2.22)$$

donde  $f(u)$  [ $u = tk^{1/z}$ ], es nuevamente la denominada función de escalado, que en este caso depende de  $u$  según [61, 62, 64, 65].

$$f(u) = \begin{cases} \text{const} & \text{for } u \gg 1; \\ u^{(2\alpha_s+1)} & \text{for } u \ll 1 \end{cases} \quad (2.23)$$

Dadas estas relaciones, la pendiente  $p$  del gráfico logarítmico de  $S(k, t)$  versus  $k$  permite obtener el valor del exponente crítico de rugosidad según

$$\alpha = -\frac{1}{2}(p + 1) \quad (2.24)$$

Este método para calcular el valor del exponente de rugosidad es que el ofrece resultados de mayor exactitud y precisión [61–63].

En el Apéndice I puede hallarse un desarrollo más acabado de la teoría de Fourier y sus aplicaciones.

### 2.2.3. Clases universales y modelos de crecimiento

El concepto de clase universal es un producto de la mecánica estadística moderna, que sostiene la idea de que hay sólo unos pocos factores esenciales que determinan los exponentes que caracterizan la dinámica de crecimiento de

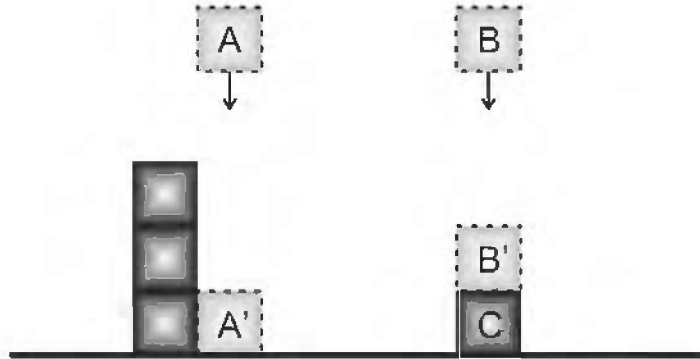


Figura 2.14: Modelo de deposición aleatoria (DA). Las partículas  $A$  y  $B$  se dejan caer desde posiciones aleatorias sobre la superficie y se depositan en la punta de la columna bajo ellas. En contraste con el modelo de DB, en el modelo de DA la altura máxima de la interfaz en un punto dado no depende de la altura de las columnas vecinas.

una superficie. Así, se encuentra que diferentes sistemas, que *a priori* parecen no tener conexión alguna, presentan comportamientos muy similares.

Las *clases universales* quedan definidas cuando un modelo discreto puede ser descrito por una ecuación continua. Es decir que los exponentes críticos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $z$  obtenidos a partir del modelo deben coincidir con los exponentes que se obtienen al resolver la ecuación correspondiente. En general se dice que la ecuación continua define la clase universal, por ser ésta más general que el modelo discreto.

Como modelos de crecimiento clásicos pueden mencionarse:

### 1. Deposición aleatoria

El modelo de deposición aleatoria (DA) es el más simple de los modelos de crecimiento. A partir de una posición sobre la superficie escogida al azar, la partícula sigue una trayectoria recta vertical hasta que contacta la parte más alta de la columna que se encuentra debajo de ella, donde queda depositada (Fig. 2.14). De este modo, se elige al azar una columna  $i$  y se incrementa su altura  $h(i, t)$  de a una partícula a la vez.

La diferencia más importante con los conceptos básicos de escalado mencionados anteriormente, es que la interfaz de DA no correlaciona. Las columnas crecen independientemente, ya que no hay un mecanismo que genere correlaciones a lo largo de la interfaz: todas las partículas caen y

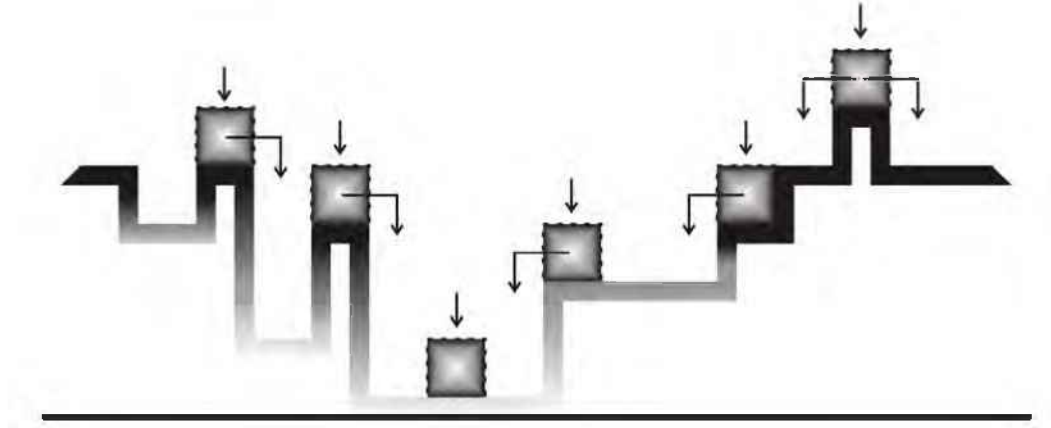


Figura 2.15: Deposición aleatoria con relajación. Las nuevas partículas depositadas se adhieren en forma reversible al sitio donde cayeron, pudiendo “relajar” hasta la posición vecina más cercana, si es que esta tiene una menor altura.

se colocan sobre la partícula inmediata anterior, sin generar huecos en las columnas. Este modelo permite a la rugosidad crecer indefinidamente en el tiempo sin saturar. Desde el momento en que no hay correlación en el modelo de DA,  $\xi_{\parallel}$  siempre vale cero, la interfaz no satura, y el exponente de rugosidad  $\alpha$  no está definido. Más aún, la superficie no es autoafín. Este proceso de crecimiento define en sí mismo una clase universal.

## 2. Deposición aleatoria con relajación superficial

En el modelo de DA cada partícula cae a lo largo de una columna hacia la superficie, hasta que alcanza el punto más alto de la interfaz donde se pega en forma irreversible. En el caso de haber relajación superficial, se permite a la partícula difundir a lo largo de la superficie hasta una cierta distancia, deteniéndose cuando encuentra la posición más baja (Fig. 2.15). Como resultado del proceso de relajación, la superficie final será suave, comparada a la del modelo sin relajación.

De este modo, la nueva partícula “compara” las alturas de las columnas cercanas antes de “decidir” donde pegarse. Este proceso genera correlaciones entre las alturas vecinas, es decir el movimiento lateral de una partícula dependerá de las alturas de sus vecinas, lo que lleva a que la

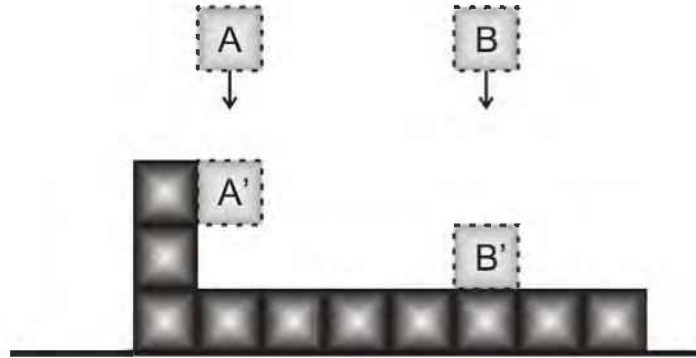


Figura 2.16: Modelo de deposición balística (DB). Las partículas nuevas caen desde una posición aleatoria sobre la superficie. La partícula se adhiere sobre el primer sitio, a lo largo de su trayectoria, que tenga un vecino ocupado.

interfaz completa correlacione y finalmente sature.

### 3. Deposición balística

La deposición balística (DB) fue introducida como un modelo de agregación de coloides. La forma más sencilla de definir el modelo de DB es hacerlo sobre una retícula, como se muestra en la figura 2.16 donde las partículas caen sobre la superficie desde una posición escogida aleatoriamente. Las partículas siguen una trayectoria recta vertical hasta que contactan con la superficie, donde quedan adheridas. Según esta regla de deposición, la primer posición de la partícula  $A$  para adherirse es  $A'$ . Luego de la deposición,  $A'$  se convierte en parte del agregado. De la misma forma, la partícula  $B$  se adhiere en la posición  $B'$ . Las partículas depositadas forman un "cluster" o agregado con una geometría muy característica.

En la DB, el hecho de que las partículas sean capaces de pegarse en el borde de las columnas vecinas lleva al crecimiento lateral, permitiendo la progresión de las correlaciones a lo largo de la superficie: la nueva partícula que llega se pega al primer vecino más cercano que encuentra. De este modo, la altura de la nueva partícula será igual o mayor que la de sus vecinas.

#### 4. Modelo de Eden

Este modelo clásico fue introducido en 1961 por M. Eden [28] para representar la formación de colonias celulares, como bacterias y cultivos tisulares. El modelo se define de la siguiente manera: se realiza una siembra de una partícula en el centro de la retícula. Una nueva partícula se adhiere en forma aleatoria a cualquier parte del perímetro de la semilla, formando un agregado (cluster) de dos lugares. Con las subsiguientes iteraciones, el modelo de Eden genera una colonia de forma compacta, pero de perímetro rugoso. Este modelo es similar al modelo de DB, es decir que sigue las mismas leyes de adhesiones entre vecinos, con la diferencia de que el sistema crece por división de las partículas ya existentes y no lo hace por el agregado de partículas nuevas. [66]

#### 5. Epitaxis de un haz de moléculas

En el modelo de epitaxis de un haz de moléculas o MBE (del inglés Molecular Beam Epitaxis) una superficie se forma y crece por la deposición de partículas que difunden sobre la superficie en busca de la posición energéticamente más favorable (Fig. 2.17). La longitud de difusión puede ser muy larga, dependiendo de la temperatura y las energías de interacción.

Los primeros modelos de crecimiento incluyendo deposición y difusión superficial fueron introducidos independientemente por Wolf y Villain [67] y por Das Sarma y Tamborenea [68]. En cada ciclo, una partícula se adhiere en forma aleatoria a alguna posición. Luego la partícula tiene tres opciones que son permanecer en el lugar donde fue depositada, o moverse para uno u otro lado. La partícula deberá elegir entre uno de estos tres lugares basada en el siguiente criterio: a) en el modelo de Wolf-Villain, la partícula se mueve hacia el lugar que ofrece la unión más fuerte a la superficie, es decir la posición con mayor número de vecinos; b) en el modelo de Das Sarma-Tamborenea la partícula difunde sólo para incrementar el número de vecinos, hacia el sitio más cercano, aunque tal vez no sea el sitio que le ofrezca el mayor número de contactos. Ambas reglas contienen el principio esencial de la relajación superficial: las partículas difunden para maximizar el número de vecinos (Fig. 2.18).

El seguimiento de una superficie a través de su rugosidad, implica necesariamente establecer las ecuaciones matemáticas de  $h$  en función de  $t$  en



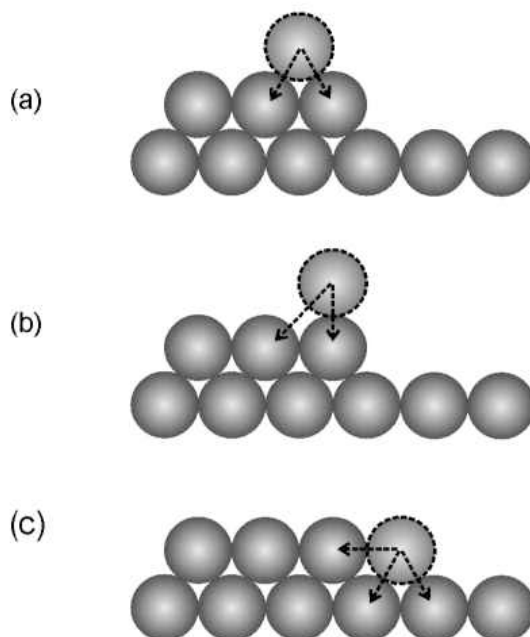


Figura 2.17: Esquema de la sección transversal de una superficie. Dos modificaciones principales pueden ocurrir sobre la energía de interacción cerca del escalón: la partícula punteada puede difundir hacia la derecha o hacia la izquierda, como se muestra en (a). Si difunde hacia la derecha como en (b), la partícula tiene dos uniones, pero hay una tercer unión que se pierde a la derecha. La ausencia de esta unión desestabiliza esta posición. En la posición (c) la partícula forma tres uniones con los vecinos, lo que corresponde a un máximo de interacciones, quedando estabilizada.

forma de ecuaciones diferenciales estocásticas. El mecanismo más simple para desarrollar las ecuaciones diferenciales que representen modelos cada vez más complejos es ir agregando nuevos términos que respondan a las nuevas variables en juego. Es por ello que para el comprender las ecuaciones continuas que los describen es preferible comenzar por el modelo de DA, por ser el más sencillo, y en consecuencia, el que menos términos presenta en su ecuación diferencial equivalente.

### 1. Deposición aleatoria

La forma más simple de comenzar a desarrollar una ecuación diferencial que represente el crecimiento de un sistema, es encontrar la variación de la altura  $h(x, t)$  de la interfaz con el tiempo para todas las posiciones

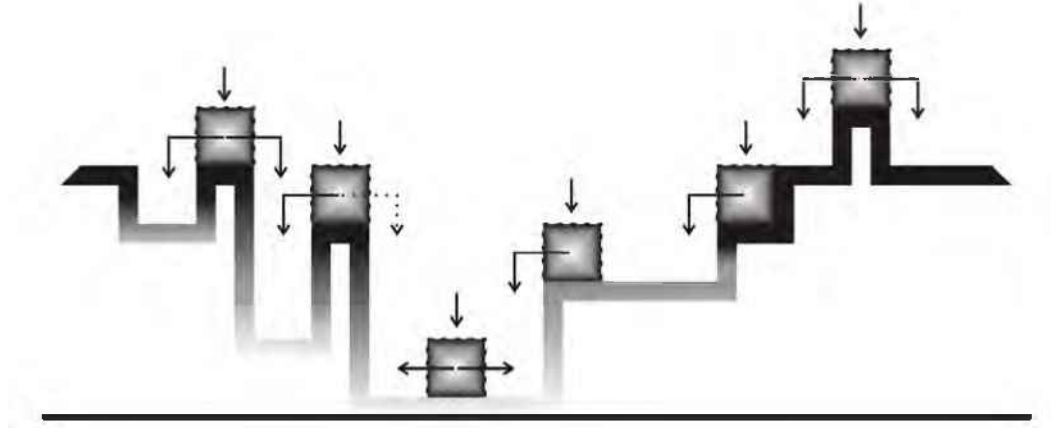


Figura 2.18: Mecanismos de relajación según los modelos propuestos por Das Sarma–Tamborenea y Wolf–Villain. La única diferencia entre ambos modelos es que el primero incluye la posibilidad de que las partículas relajen en todas las direcciones marcadas con flechas, mientras que el segundo no admite la dirección que se representa con una flecha punteada, ya que el número de contactos sería menor que si la partícula se moviera en la dirección opuesta admitida.

$x$ , donde  $x$  pertenece a un sustrato unidimensional, para el caso más sencillo que es el que se analiza aquí. En líneas generales el crecimiento puede ser descrito por

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = \Phi(x, t) \quad (2.25)$$

donde  $\Phi(x, t)$  es el número de partículas por unidad de tiempo que llegan a la superficie a la posición  $x$  en el tiempo  $t$ . El flujo de partículas no es uniforme, desde el momento en que estas son depositadas en posiciones aleatorias. El azar puede ser incorporado a la teoría descomponiendo a  $\Phi$  en dos términos, de modo tal que la ecuación 2.25 se convierta en

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = N + \eta(x, t) \quad (2.26)$$

donde el primer término,  $N$ , es el número promedio de partículas por unidad de tiempo que alcanzan la posición  $x$ . El segundo término,  $\eta(x, t)$ ,

refleja las fluctuaciones aleatorias del proceso de deposición, y es un número no correlacionado que presenta una configuración promedio de cero. Es decir que el sorteo de cada partícula es independiente del de las anteriores, pero con la característica fundamental de que los sorteos en conjunto son balanceados, o lo que es lo mismo, todas las posiciones son igualmente probables, de modo tal que en promedio este término no favorece a ninguna posición.

$$\langle \eta(x, t) \rangle = 0 \quad (2.27)$$

Si se traduce esto en términos de simetría se encuentra que, respecto a un eje trazado perpendicularmente a la interfaz, las fluctuaciones de la misma son equivalentes a ambos lados del eje. Las propiedades estadísticas de una interfaz descrita por la ecuación 2.26 son las mismas que las que presenta una interfaz en el modelo de DA. Integrando sobre el tiempo la ecuación 2.26 se obtiene

$$h(x, t) = Nt + \int_0^t \eta(x, t') dt' \quad (2.28)$$

Al resolver esta ecuación para el caso de dimensión 1, se obtiene el exponente  $\beta = 1/2$

## 2. Deposición aleatoria con relajación superficial

Para poder representar modelos más complejos de crecimiento de superficies, tales como la DA con relajación superficial, se introduce un método más sistemático para derivar las ecuaciones continuas. Específicamente se busca que la ecuación de movimiento sea la ecuación más simple posible compatible con los principios de simetría del problema. En este caso, se utilizan estos principios para derivar en una ecuación de equilibrio de la interfaz, donde equilibrio significa que la interfaz no está siendo afectada por una fuerza exterior. Así, una interfaz en equilibrio separa dos dominios que se encuentran en equilibrio desde el punto de vista de que un dominio no crece a expensas del otro.

Para buscar los principios de simetría se debe comenzar por definir la interfaz. Si se considera una interfaz caracterizada por su altura  $h(x, t)$ , donde  $h$  es una función monovaluada, es decir que para cada posición  $x$  sólo existe un valor de  $h$ , o lo que es lo mismo, la interfaz no presenta salientes laterales (Fig. 2.19), que se conocen como “overhangs”, es posible

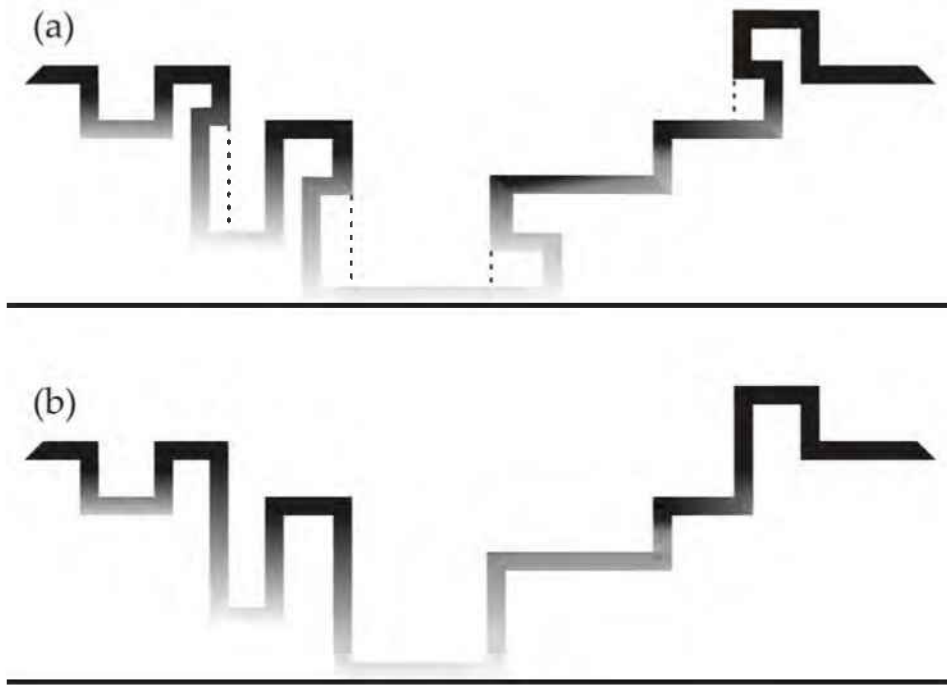


Figura 2.19: Modelo de una interfaz con multivaluaciones: antes (a) y después (b) de ser corregidas.

generalizar la ecuación 2.26 y derivar una ecuación de crecimiento para interfaces correlacionadas. Se espera entonces que la ecuación presente un forma como la siguiente

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = G(h, x, t) + \eta(x, t) \quad (2.29)$$

En este caso  $G(h, x, t)$  es una función general que depende de la altura de la interfaz, de la posición y del tiempo. El método más sencillo para obtener una función de esta clase es ir descartando términos que no satisfagan las reglas básicas de simetría que deben cumplirse. Dentro de estas reglas pueden hallarse algunas que deben ser satisfechas por todos los modelos, y otras que su cumplimiento (o no) determinan la ley de crecimiento del modelo estudiado. A continuación se mencionan brevemente estas reglas y se deja una explicación matemática más detallada para el Apéndice II.

- a) Invarianza ante traslaciones en el tiempo.

La ecuación de crecimiento buscada no debería depender de la definición del origen del tiempo. Por tal motivo se dice que la ecuación debe ser invariante ante una transformación de tipo  $t \rightarrow t + \Delta t$ . De este modo términos del tipo  $t^n$ , para  $n > 1$ , quedan excluidos de esta ecuación.

- b) Invarianza de traslación en la dirección de crecimiento.

La ecuación de crecimiento del sistema no debería depender del sitio donde se define  $h = 0$ . De este modo, la ecuación debería ser invariante ante la traslación  $h \rightarrow h + \Delta h$ . Según esta regla de simetría la ecuación de crecimiento no puede contener términos del tipo  $h^n$ , para  $n > 1$ .

- c) Invarianza de traslación en la dirección perpendicular a la dirección de crecimiento.

La ecuación no debería depender del valor de  $x$ . Así, se obtiene la simetría  $x \rightarrow x + \Delta x$ . Esto excluye explícitamente la dependencia de  $G$  con términos del tipo  $x^n$ , para  $n > 1$ .

Estas primeras tres reglas, que se satisfacen en todos los modelos, permiten la permanencia de términos de tipo diferenciales únicamente, que pueden simbolizarse con derivadas parciales o con el operador  $\nabla$ .

- d) Simetría de rotación e inversión sobre la dirección de crecimiento normal (o perpendicular).

Estas reglas descartan las derivadas de orden impar en las coordenadas. Esto deriva del hecho de que las derivadas de orden impar son antisimétricas respecto del eje de las ordenadas, no admitiendo invarianzas ante rotaciones e inversiones.

- e) Simetría superior e inferior para  $h$ .

Las fluctuaciones de la interfaz son similares con respecto a la altura media. Esto descarta términos no lineales como  $(\nabla h)^{2n}$ , para  $n > 1$ . Esta simetría está conectada íntimamente a la naturaleza de equilibrio de la interfaz, por consiguiente esta regla debe romperse cuando se trata de problemas fuera de equilibrio.

El cumplimiento de las últimas dos reglas es característico del modelo de deposición aleatoria con relajación superficial.

Así, se llega a la ecuación de Edwards–Wilkinson (EW), que corresponde a la ecuación más simple que describe las fluctuaciones de una interfaz en equilibrio:

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = \nu \nabla^2 h + \eta(x, t) \quad (2.30)$$

El término  $\eta(x, t)$  incorpora el carácter estocástico del proceso de fluctuación. Este término cumple con la propiedad de no estar correlacionado, como se mostró en la ecuación 2.27. El factor  $\nu$  es llamado habitualmente tensión superficial, ya que el término  $\nu \nabla^2 h$  tiende a suavizar la interfaz. La propiedad más importante es que suaviza redistribuyendo las irregularidades sobre la superficie, mientras que mantiene la altura promedio sin ser modificada. Si la interfaz avanza con velocidad no nula, se puede adicionar un término de velocidad a la ecuación sin modificar las propiedades de escalado de la misma

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = v + \nu \nabla^2 h + \eta(x, t) \quad (2.31)$$

### 3. Deposición balística

La primer extensión de la ecuación de EW para incluir términos no lineales fue propuesta por Kadar, Parisi y Zhang (KPZ) [69]. De la misma forma que para la ecuación de EW, es posible derivar esta ecuación utilizando los principios de simetría. La diferencia entre el modelo de DA con relajación superficial y el modelo de DB (o el modelo de Eden), radica en que en el primero las partículas llegan y se adhieren a la superficie y luego relajan, mientras para el segundo éstas se pegan a la primer partícula que encuentran generando crecimiento lateral. Esto implica necesariamente que la ecuación de KPZ satisface las reglas de simetría (a)–(d) de la ecuación de EW pero no la regla de simetría superior e inferior de la altura de la interfaz [regla (e)]. La razón de que no se cumpla esta regla de simetría es la existencia de una fuerza impulsora  $F$ , perpendicular a la interfaz, que marca la dirección de crecimiento de la interfaz (Fig. 2.20). En el modelo de DB esta regla se rompe debido a la propiedad de crecimiento lateral del modelo. Romper esta regla significa que la interfaz no es invariante ante la transformación  $h \rightarrow -h$ <sup>2</sup>. El término de

---

<sup>2</sup>En la teoría lineal la simetría superior/inferior excluye los términos de la forma  $(\nabla h)^{2n}$  de la ecuación de crecimiento

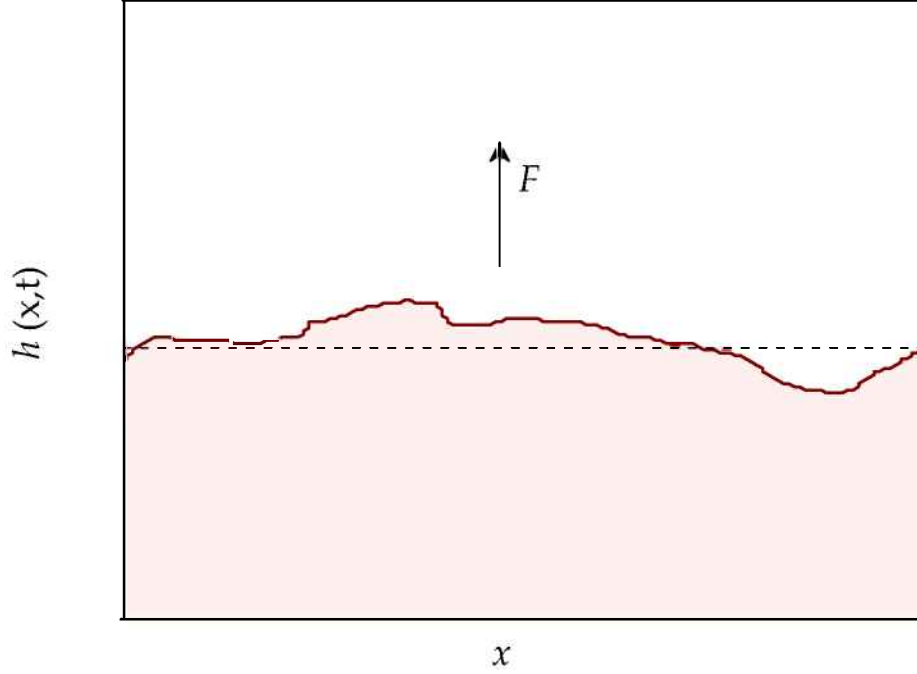


Figura 2.20: Esquema de una interfaz típica  $h(x,t)$  afectada por una fuerza impulsora externa  $F$ .

menor orden de este tipo es  $(\nabla h)^2$ , que al ser añadido a la ecuación de EW resulta en la ecuación de KPZ

$$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = \nu \nabla^2 h + \frac{\lambda}{2} (\nabla h)^2 + \eta(x,t) \quad (2.32)$$

En general, la existencia de una fuerza impulsora es una condición necesaria pero no suficiente para romper la simetría superior/inferior en  $h$ , y por lo tanto para la aparición de un término no lineal. Por ejemplo, la deposición de partículas podría considerarse una fuerza impulsora que hace que la interfaz crezca en el modelo de DA con relajación superficial, sin embargo el modelo queda descrito por la ecuación de EW, lo que significa que no se está rompiendo la simetría. Es el crecimiento lateral el que implica la presencia de términos no lineales, es por eso que el crecimiento por DB queda descrito por la ecuación de KPZ [70].

## 4. MBE

Los dos mecanismos físicos que distinguen al MBE de los procesos de crecimiento discutidos anteriormente son la difusión superficial y la desorción de las partículas depositadas.

La difusión superficial es un proceso activo. El movimiento de las partículas no depende de la altura local de la interfaz, sino del número de uniones que debe romper para poder difundir. El número de uniones que forma una partícula depende de la curvatura de la interfaz en ese punto. Por lo tanto la probabilidad de difusión es inversamente proporcional al radio de curvatura, que de por sí es proporcional a  $\nabla^2 h(x, t)$ .

Para determinar la probabilidad de difusión local se utilizan los principios de simetría. La probabilidad de difusión de una partícula no debería depender explícitamente de la altura  $h$  de la interfaz, ya que no depende de donde fue definido el origen. Del mismo modo, si la probabilidad dependiera de una potencia de  $\nabla h$ , entonces las probabilidades de pegado serían diferentes si se modificara el sistema de coordenadas. Teniendo en cuenta estos principios, la presencia de corrientes macroscópicas y las diferencias de potencial químico (que escapan a los alcances de esta tesis) es posible llegar a la ecuación que describe la relajación por difusión superficial

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = -K\nabla^4 h \quad (2.33)$$

Si se incorporan un término estocástico, como en los casos anteriores, y una fuerza  $F(x, t)$ , que describe el flujo de partículas que llegan a la superficie por unidad de tiempo, se obtiene

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = -K\nabla^4 h + F + \eta(x, t) \quad (2.34)$$

Esta ecuación fue introducida en forma independiente por Wolf y Villain [67] y por Das Sarma y Tamborenea [68].

El proceso de crecimiento dominado por la deposición con desorción incluye un término que depende de la diferencia entre los potenciales químicos que dominan el sistema. Por lo tanto al incorporar todos los términos lineales de la ecuación de crecimiento del MBE, se obtiene



Clase universal	Ecuación	Exponentes
<b>DA</b>	$\frac{\partial h}{\partial t} = F + \eta$	$\beta = 1/2$
<b>EW</b>	$\frac{\partial h}{\partial t} = \nu \nabla^2 h + \eta$	$\alpha = 1/2 ; \beta = 1/4$
<b>KPZ</b>	$\frac{\partial h}{\partial t} = \nu \nabla^2 h + \frac{\lambda}{2} (\nabla h)^2 + \eta$	$\alpha = 1/2 ; \beta = 1/3$
<b>MBE</b>	$\frac{\partial h}{\partial t} = \nu \nabla^2 h - K \nabla^4 h + B \bar{\mu} + F + \eta$	$\alpha = 1 ; \beta = 3/8$

Cuadro 2.1: Resumen de los modelos explicados. Se muestra la clase universal, la ecuación continua que la representa y los exponentes críticos que las caracterizan.

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = \nu \nabla^2 h - K \nabla^4 h + B \bar{\mu} + F + \eta(x, t) \quad (2.35)$$

En base a los modelos discretos presentados, y las ecuaciones continuas derivadas a partir de las reglas de simetría de los mismos, quedan definidas las cuatro clases universales clásicas del escalado dinámico: DA, EW, KPZ y MBE. Existen variantes de estas clases universales e incluso algunas clases universales más, aparte de las mencionadas, pero que escapan al alcance de este trabajo. En el cuadro 2.1 se resumen las ecuaciones matemáticas y los valores de los exponentes críticos de las principales clases universales para el caso bidimensional, que es la dimensión de interés para este trabajo de tesis.



---

## Antecedentes teóricos y experimentales

La búsqueda de modelos que representen el crecimiento tumoral, tanto desde lo experimental como desde las simulaciones computacionales, ha atraído mucho interés por parte de científicos de diferentes áreas. Un hecho importante sobre el que se busca contribuir, es la clasificación de los patrones de crecimiento tumoral a través de mecanismos genéricos, a nivel de acción de las células individuales, tales como migración, división, adhesión, etc. Estas acciones responden a los efectos regulatorios moleculares intra e intercelulares. Los modelos pueden servir para identificar aquellas actividades celulares cuya modificación podría resultar en una inhibición del crecimiento multicelular e invasión tisular, y de este modo señalar posibles objetivos para ser atacados terapéuticamente.

Uno de los trabajos pioneros en la aplicación de las bases matemáticas de modelos estocásticos al estudio de sistemas biológicos, fue desarrollado por Vicsek y colaboradores en la década de los 90. Aunque varios investigadores experimentales ya habían observado la naturaleza fractal de diferentes estructuras biológicas, como la vasculatura del corazón humano [71] y de la retina [72], la estructura del árbol bronquial [73] o del árbol dendrítico neuronal [74], es en este trabajo donde se aporta la primera evidencia experimental de la naturaleza auto-afín de sistemas biológicos en crecimiento [29]. Para tal fin se analizó el crecimiento de colonias de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* formadas a partir de un hilo estéril embebido en bacterias, colocado formando una línea recta sobre un sustrato semisólido de agarosa. En estos experimentos, en los que los microorganismos se encontraban en exceso de nutrientes, el

proceso estocástico de multiplicación celular determinaba el desarrollo de la superficie de la colonia. De este modo se logró demostrar que el crecimiento de las colonias bacterianas se podía explicar por la teoría del escalado dinámico, es decir que la rugosidad de su contorno crecía siguiendo leyes de potencias, y que las colonias presentaban una morfología fractal, particularmente fractales autoafines, de dimensión  $d_f = 1,22$ . El crecimiento de las colonias podía describirse entonces según el modelo de Eden, correspondiendo a la clase universal propuesta por Kardar, Parisi y Zhang (KPZ), destacándose que la formación de colonias bacterianas constituye un fenómeno mucho más complejo que cualquier proceso realizado por simulaciones computacionales.

Teniendo consideración que el crecimiento de colonias bacterianas podía ser explicado a través del modelo de Eden, Brú y colaboradores se abocaron a analizar la naturaleza fractal y la dinámica de crecimiento de 15 líneas celulares en cultivo y de 16 tipos de tumores *in vivo* en la búsqueda de un modelo universal para el desarrollo de tumores [30, 75]. A diferencia del trabajo sobre las bacterias, se aplicó directamente la técnica de escalado dinámico a sistemas que crecían siguiendo una geometría radial. Los estudios realizados se basaron en el seguimiento diario de las colonias celulares mediante su registro fotográfico. Los tumores estudiados, resecaados de pacientes, fueron fijados con parafina y cortados con micrótopo a un espesor de 4 micrones. Ambos sistemas, *in vitro* e *in vivo*, presentaron geometría fractal autoafín de dimensión  $d_f = 1,18$  invariante en el tiempo e independiente del tipo celular [30, 75]. También se observó que el radio de todas las colonias celulares estudiadas crecía siguiendo un régimen de velocidad constante, a diferencia de la cinética gomperziana, ampliamente aceptada para describir el crecimiento de estos sistemas [76, 77]. En cuanto a la dinámica de crecimiento se mostró que todas las líneas exhibían un exponente de crecimiento  $\beta = 0,38$  y un exponente de rugosidad  $\alpha = 1,5$ , de lo que se calculó el valor del exponente dinámico  $z = 4$ . Estos valores indicaban que la interfaz de las colonias era *super-rugosa* y que la dinámica de crecimiento correspondía a la clase universal MBE (Cuadro 2.1) [78]. Para el caso de los tumores estudiados, se obtuvieron los mismos valores para los exponentes de rugosidad, aunque no se calculó el resto de los exponentes por no ser sistemas que pudieran ser seguidos en el tiempo. Finalmente, se definieron las tres características que describían la dinámica de crecimiento de los sistemas estudiados: el crecimiento de las colonias a velocidad constante, la restricción de la proliferación celular al borde de la colonia o tumor, y la difusión celular en la interfaz de crecimiento, es decir el movimiento celular a lo largo del borde de la colonia, específicamente hacia las entrantes de los contornos. Lejos de las descripciones hasta ese momento planteadas, se pro-

puso que la dinámica de crecimiento celular exhibe super-rugosidad ( $\alpha > 1$ ), como efecto de la difusión superficial, proceso que tendía a suavizar los bordes del tumor o de la colonia. La denominada super-rugosidad puede describirse a partir del concepto de *escalado anómalo*. Este tipo de escalado tiene su origen en el crecimiento inestable, donde se producen distribuciones no conservativas de la masa, llevando al desarrollo de superficies con la presencia de salientes laterales [79]. De este modo el crecimiento tumoral se podría pensar como una competencia por el espacio entre el tumor y el huésped, y la difusión celular en el borde como una estrategia óptima para minimizar la presión y ayudar al tumor a crecer. La dinámica de crecimiento tumoral se encontraría constreñida a la periferia, proponiéndose que lo que ocurre en el núcleo del tumor tendría muy poca influencia, mientras que la difusión superficial de las células hacia las concavidades cobraría marcada importancia. Como consecuencia se propuso como estrategia para frenar el crecimiento tumoral el bloqueo de la difusión de las células de la interfaz hacia las entrantes [80, 81]. Para ello se estudiaron dos fenómenos: el efecto de la presión ejercida por el sistema inmune, a través de la estimulación de los neutrófilos, que se ubicarían en las concavidades de la superficie tumoral; y el efecto directo de altas presiones atmosféricas sobre tumores, buscando un cambio de la dinámica de crecimiento, para desacelerar o eventualmente detener el crecimiento tumoral. Estos efectos de frenado en la interfaz, o “pinning”, resultaban en un cambio de mecanismo en el desarrollo de la misma. La dinámica cambiaba entonces de MBE hasta otra mucho más lenta como es la dinámica de EW-frenada (QEW), caracterizada por los exponentes de crecimiento  $\beta = 0,85$  y de rugosidad  $\alpha = 1,25$ . El efecto de modificar la dinámica de crecimiento de un sistema, haciendo que pase desde una clase universal a otra diferente, ha sido ampliamente aplicado a la caracterización de interfaces según la teoría de escalado dinámico y se lo ha denominado tradicionalmente “pinning”, refiriéndose al bloqueo del crecimiento de interfaces [21, 24, 82–85].

El trabajo de Brú y colaboradores propició muchas y severas críticas. En primer lugar se sostuvo que el análisis de escalado dinámico era inconsistente [86], criticándose fundamentalmente la aplicación del escalado anómalo, ya que si se acepta la hipótesis de la super-rugosidad, y con los exponentes correspondientes al MBE, la pendiente de la función de escalado para  $l/t^{(1/z)} > 1$  corresponde al valor de  $\alpha = 1,5$  [61], valor que no se obtiene de los gráficos mostrados en el trabajo analizado, y por lo tanto el colapso deja de ser autoconsistente. Además, la evidencia experimental utilizada para confirmar el modelo propuesto, no es excluyente de la clase universal MBE.

Finalmente se propuso que la causa de las fallas en la aplicación e inter-

pretación del escalado dinámico se debía a los efectos de la geometría de los tumores, que no habían sido debidamente considerados en el trabajo. Cuando el tamaño del sistema cambia con el tiempo, deberían tenerse en cuenta los efectos de dilatación, lo que explicaría los resultados obtenidos. Aunque había sido demostrado que sería posible la aplicación del escalado dinámico a sistemas de geometría radial, pero que siguen una dinámica de tipo KPZ [70]. De cualquier modo, se arribó a la conclusión de que eran necesarios mayores estudios para determinar los valores correctos de los exponentes y obtener un colapso autoconsistente, proponiéndose que los autores re-analizaran sus datos teniendo en cuenta estas observaciones, hecho que no ocurrió.

El problema de la aplicación del escalado dinámico a sistemas que cambian de tamaño con el tiempo fue estudiado en el caso del crecimiento *in vitro* de los callos de las plantas, tejidos indiferenciados que se desarrollan alrededor de una injuria o corte sobre la superficie de una planta [87]. En este caso se buscó caracterizar las propiedades morfológicas y dinámicas de la evolución de estos sistemas parecidos a tumores a través del seguimiento fotográfico diario de los callos. Se demostró que estos tejidos presentan una estructura autoafín con una dimensión fractal  $d_f = 1,18 \pm 0,02$ , independientemente del tiempo y de la especie estudiada, que en este trabajo fueron dos. Por otra parte, el análisis por escalado dinámico del sistema presenta dos características principales, la primera de ellas es la compleja geometría del sistema, de tipo radial pero con efectos de borde importantes, y la segunda es que el tamaño del sistema cambia en el tiempo. En base a esta geometría, realizaron el cambio de variables de ángulo-radio a arco-radio, pero teniendo en cuenta que el crecimiento del sistema no es isotrópico. Se propuso la utilización de un factor  $a$  para la corrección de la geometría del sistema, encontrando valores de  $a$  entre 0.07 y 0.25, siendo  $a = 1$  el caso extremo de geometría circular. Con estas correcciones se calcularon los exponentes críticos  $\alpha = 0,86$  y  $z = 5$ , para lo cual una nueva clase universal debería ser definida.

En base a las dificultades halladas para el análisis de sistemas de geometría radial, tres años más tarde se realizó un análisis teórico exhaustivo sobre la aplicación del escalado dinámico a sistemas de tamaño creciente, donde la geometría circular representa el caso extremo [88]. En particular se analizó el modelo de Eden, perteneciente a la clase universal KPZ, que representa el paradigma como modelo discreto del crecimiento de agregados compactos, característicos de las colonias celulares [28]. En este marco se desarrolló un modelo en el que se estudia un sistema de geometría lineal, de tamaño  $L_0$  al que se impone que evolucione siguiendo una ley de tipo:  $L = L_0 \times h^a$ , donde  $a$  es el parámetro de control, llamado exponente de tamaño del sistema,

desarrollando así un nexo entre la geometría lineal fija, tradicional del escalado dinámico, y la geometría radial [87]. El sistema lineal estándar corresponde al caso en que  $a = 0$ , mientras que el caso particular de crecimiento circular corresponde al un valor de  $a = 1$ . Se llegó así a la conclusión de que cuando el valor de  $a < 1/z$ , es decir menor a 0,667, los sistemas seguirían las leyes de potencias correspondientes al modelo propuesto y colapsarían perfectamente con los exponentes de KPZ, es decir  $\alpha = 0,5$ ;  $\beta = 0,33$  y  $z = 1,5$ . En cambio, para valores de  $a > 1/z$ , la función de escalado seguiría el comportamiento de una única ley de potencias, dejando el colapso de la función global de escalado sin sentido. Esto se entiende si el sistema crece a mayor velocidad que la función de correlación. La conclusión final es que el comportamiento dinámico de la rugosidad en sistemas que incrementan su tamaño, como en el caso de Brú, no podría ser explicado dentro de las hipótesis clásicas de Family-Vicsek, como debería serlo para el modelo de Eden.

Otros autores del área teórica aceptaron la clase universal MBE como un modelo posible para describir el crecimiento tumoral, pero criticaron fuertemente el hecho de que es un modelo desarrollado para sistemas de geometría lineal, de tamaño fijo, y que no es al menos “trivial” su adaptación a sistemas de tamaño creciente [89, 90]. Con el fin de derivar una ecuación, a partir de la propia ecuación continua que describe al MBE, pero adaptada a la geometría radial, se llevó a cabo un desarrollo puramente matemático, de base estocástica, contenido en el marco del escalado anómalo. Concretamente, tomando como base los datos experimentales aportados por Brú, se derivó la ecuación de crecimiento tumoral conteniendo la física del MBE en una geometría apropiada. Así, se logró adaptar la ecuación a las coordenadas polares, basándose en ángulos, para independizarse de los incrementos de tamaño del sistema. De esta forma, se logró adecuar las ecuaciones de MBE y QEW a la geometría tumoral. Sin embargo, se resalta el hecho de que todos estos modelos, los originales y los nuevos aportes, se basan exclusivamente en superficies que no presentan salientes laterales, algo estrictamente teórico, y se remarca que deberían realizarse más estudios, ya que estos no tienen sentido si se intentan aplicar a superficies con salientes.

Paralelamente, muchos autores presentaron estudios realizados como simulaciones y modelado computacional. La base de esta nueva forma teórico-experimental de trabajo se fundamenta de la siguiente manera. Se sabe que muchos procesos que ocurren a escala subcelular actúan cooperativamente obteniéndose así un efecto resultante sobre algunos parámetros de crecimiento, tanto a nivel celular como a nivel multicelular. Muchos de estos parámetros, como la rigidez celular, el tiempo de duplicación celular, la motilidad, la adhe-

sión célula-célula y célula-sustrato, no pueden ser modificados directamente, y las modificaciones en una propiedad generalmente resulta en la modificación de otras propiedades al mismo tiempo. Este problema requiere así de métodos complementarios que puedan manejar este grado de complejidad. En este punto son muy útiles las simulaciones de crecimiento celular. En ellas es posible proponer ciertas reglas basadas en datos experimentales, e ir modificándolas de a una para evaluar los resultados. La ventaja de estos modelos es que abren la posibilidad de estudiar hipótesis que fueron derivadas de experimentos biológicos, libres de influencias desconocidas o no controladas.

Un grupo de trabajo que ha aportado fuertemente en esta dirección es el de Drasdo. En él, se propone un modelo de simulación basado en la célula como unidad individual (single-cell-based mathematical model), utilizando representaciones explícitas de las células individuales para modelar la organización multicelular. Se distinguen dos clases de modelos. La primera corresponde a los modelos de autómata celular donde cada célula ocupa uno o mas lugares dentro de una retícula. La otra clase consiste en modelos sin retícula (off-lattice), donde las células son modeladas como partículas esféricas, elipsoides deformables o polígonos de Voronoi (Fig. 3.1) [91,92].

Resulta muy interesante la comparación propuesta entre el crecimiento de monocapas tumorales y esferoides, en el contexto del modelo de la célula como unidad individual, con énfasis en el rol de los nutrientes, las fuerzas biomecánicas accionando sobre las células, y las propiedades cinéticas de las mismas [94]. El modelo se basa en células esféricas, tomadas como elementos elásticos, de compresibilidad y deformabilidad limitada, capaces de realizar migración, crecimiento y división. Se propone que dependiendo de la distancia intercelular, las células pueden atraerse e interactuar a través de uniones adherentes, o pueden efectuar interacciones repulsivas. Se establece que el ciclo celular quedaría influenciado por la presencia de nutrientes y el stress al que está sometida la célula, y se propone que el crecimiento de las colonias comenzaría siendo exponencial para luego proseguir en forma subexponencial.

En la misma línea de trabajo se realizó un nuevo análisis de la organización temporal de los sistemas multicelulares [95], proponiéndose 3 mecanismos de control: (i) las células que se encuentran comprimidas detienen su proliferación si su volumen disminuye por debajo de un valor umbral, lo que puede considerarse como un modelo de inhibición por contacto; (ii) las células que pierden contacto con el sustrato dejan de dividirse, lo que correspondería a la proliferación dependiente de anclaje; y (iii) las células que pierden contacto con el sustrato mueren luego de cierto tiempo, lo que corresponde a la apoptosis anclaje-dependiente o anoikis. En líneas generales, a medida que se van



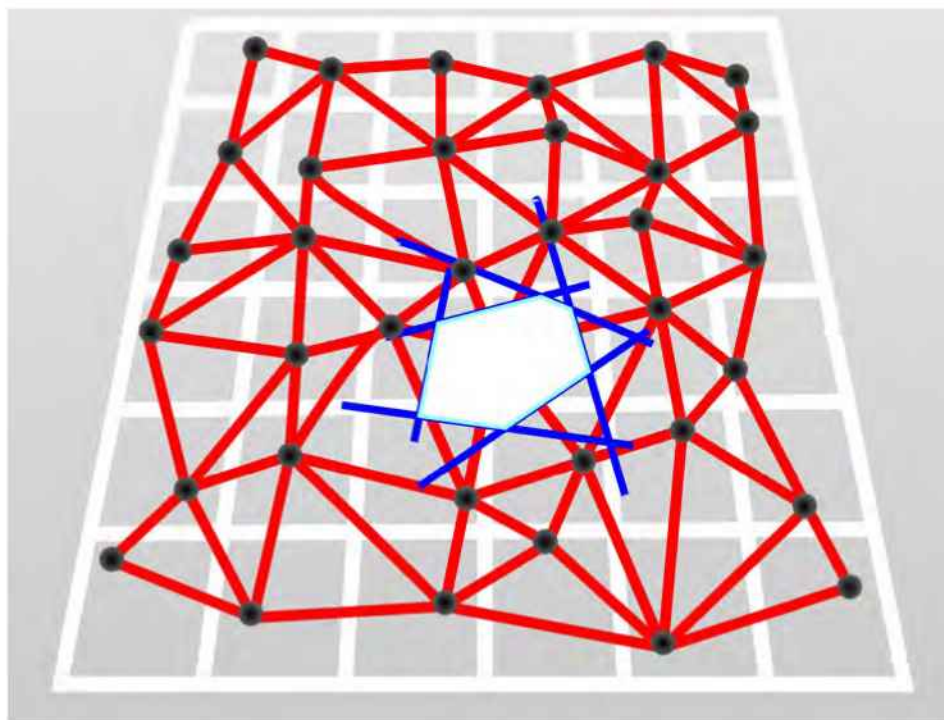


Figura 3.1: Polígonos de Voronoi: sobre la base de una retícula cuadrada (blanca) se muestran los puntos de Voronoi (negro), distribuidos y conectados a través de la triangulación de Delaunay (líneas rojas). Se muestra el polígono de Voronoi (azul) correspondiente a la forma de una célula (blanco) [93].

perdiendo estas reglas, las colonias pasarían de monocapas ideales a formas de agregados tridimensionales. Se concluye que los patrones de crecimiento espacial de las poblaciones celulares se asocian al control y regulación de mecanismos a nivel celular. Se resalta que la anoikis juega un rol fundamental en la formación de las monocapas. De la evaluación del modelo con células de diferentes morfologías, se concluye ésta no tendría influencia sobre los resultados obtenidos. Es de remarcar que muchas de estas hipótesis, de división celular restringida y muerte, se basan en los datos experimentales aportados por Brú [30]. Sin embargo, en el presente trabajo de tesis se expondrá que este no es el caso para los experimentos mostrados, incluso siendo las mismas líneas celulares utilizadas por Brú.

Posteriormente se extendió el análisis basado en un modelo de autómatas celular sobre retículas irregulares [64]. En este modelo bidimensional se pro-

pone un sistema de estructura teselar, es decir donde todas las unidades, o en este caso todas las células, encajan perfectamente sin dejar espacios vacíos, pero no exhiben una forma geométrica repetida, como por ejemplo círculos, rectángulos, polígonos, etc. Más específicamente, se desarrolló una redícula sobre la que distribuyeron los puntos de Voronoi y se los conectó a través de la triangulación de Delaunay 3.1. El modelo reproduce los hallazgos experimentales de Brú de crecimiento en monocapa, pero como en el modelo de Eden, la dinámica de crecimiento crítica sugiere un comportamiento que responde al modelo de KPZ. Se estudia la relación entre el modelo bidimensional ya presentado en [64] y el correspondiente modelo tridimensional [93], ambos basados en células individuales como la unidad elemental del modelo, mostrándose en detalle la coincidencia de las propiedades básicas entre ambos sistemas. Los modelos son comparados con hallazgos experimentales en monocapas (*in vitro*) bidimensionales y con tumores producidos en ratones a partir de la inoculación de células NIH3T3. La simulación comienza por una semilla inicial que se va dividiendo según un sorteo aleatorio entre las sucesivas células. La división celular consiste simplemente en modelar la duración del ciclo celular y su distribución. Una regla importante que es impuesta en este modelo es que en el caso de que deba dividirse una célula que no presenta espacio libre a su alrededor, las restantes células son empujadas a lo largo del trayecto más corto hasta el espacio vacío más cercano, de modo tal que se produce un espacio libre adyacente para las células hijas. Pero esto solo ocurre permitiendo la división de ésta célula, si existe al menos un espacio vacío a una distancia menor que un cierto  $\Delta L$ , o longitud de proliferación, desde la célula en división. Los autores proponen que dado un radio inicial de la colonia o tumor, menor a la longitud de proliferación, al principio se observa un tipo de crecimiento difusional, que responde a  $R \propto t^{1/2}$  (fase I), seguido por una fase exponencial (fase II). La duración de la fase I depende del coeficiente de migración. En el caso extremo de migración libre nula, la fase I no existe. La duración de la fase II depende del valor del  $\Delta L$ . En el límite asintótico el crecimiento se hace lineal, alcanzando una velocidad constante  $v$  (fase III). La explicación analítica es bastante simple, y se encuentra desarrollada en la sección 5.2.

Simultáneamente, se utilizó un modelo matemático para estudiar la influencia de la adhesión celular regulada por E-caderinas y  $\beta$ -cateninas sobre la migración, la transición epitelio-mesenquimatosa y la invasión celular [43]. Se estudiaron los posibles efectos de la regulación positiva de la forma soluble de la  $\beta$ -catenina, que estaría regulando negativamente la adhesión celular durante la transición epitelio-mesenquimatosa. Dado que una masa tumoral

en crecimiento requiere que algunas células de despeguen, ya sea por señales internas o por fuerzas físicas, para disminuir el estrés y para continuar la proliferación, se muestra aquí que la distribución de  $\beta$ -catenina es diferente en el interior y en el exterior tumoral. Las células de la periferia presentarían mayor concentración de  $\beta$ -catenina nuclear, mientras que en el centro del tumor las células regularían negativamente la concentración intracelular de  $\beta$ -catenina. Así, las células de la periferia estarían perdiendo parte de sus uniones intercelulares por E-caderina, regulando positivamente la  $\beta$ -catenina soluble y realizando de este modo la probabilidad de migración e invasión. Estos hallazgos sugieren que la invasión puede ser un proceso gradual producido por diferentes capas de células que se alejan del tumor primario. Es interesante remarcar que en este trabajo de tesis se muestra que en todas las experiencias realizadas algunas células de la periferia presentan un proceso gradual de alejamiento de la colonia, formando nuevos agregados que terminan coalesciendo con la colonia madre.



---

## Materiales y métodos

### 4.1. Preparación de células y colonias

Para el presente trabajo de tesis se utilizaron células de las líneas Vero (pasajes 165-180) y HeLa (pasajes 40-55), las cuales fueron provistas por el laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA).

Las líneas se preservaron en nitrógeno líquido a  $-195,8^{\circ}\text{C}$  en ampollas conteniendo medio de cultivo con glicerina. Una vez descongeladas fueron colocadas en botellas de 25 ml conteniendo medio de crecimiento RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) enriquecido con suero fetal bovino (SFB) 10 % p/v, gentamicina 0,05 % p/v y  $\text{NaHCO}_3$  2 % p/v, cambiándose la mitad del medio cada 48 horas. Las botellas fueron mantenidas en estufa de cultivo en condiciones estándar:  $37^{\circ}\text{C}$  de temperatura y atmósfera con 5 % de  $\text{CO}_2$  y 95 % de humedad. Cada ampolla descongelada fue mantenida a lo largo de 10–15 pasajes para evitar modificaciones genéticas, por mutaciones acumuladas, que pudieran afectar los resultados. Cada repique celular se mantuvo hasta alcanzar el 80 % de confluencia. Una vez alcanzada esta condición, se realizó la proteólisis enzimática de las uniones celulares con tripsina, la dilución pertinente y la resiembra en una nueva botella.

#### 4.1.1. Formación de colonias con frente lineal

Para la preparación de las colonias con frente lineal de crecimiento se utilizaron dos técnicas diferentes, las cuales ofrecen distintas condiciones iniciales de concentración celular en la interfaz, permitiendo entonces estudiar el po-

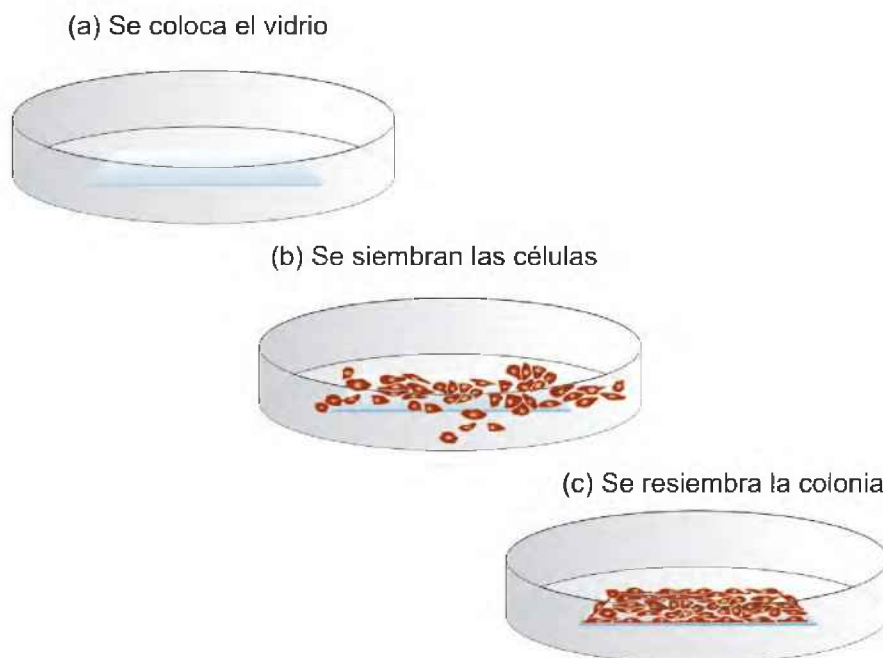


Figura 4.1: Frentes lineales de crecimiento. Procedimiento I: a) se coloca un vidrio rectangular estéril en una cápsula de Petri, b) posteriormente se siembran las células en suspensión y se las deja proliferar. c) Una vez alcanzada la confluencia celular, se retira el vidrio cargado con las células y se lo resiembra en una nueva cápsula de Petri, con medio de cultivo nuevo.

sible efecto de la distribución celular inicial sobre la dinámica de crecimiento de las colonias.

El procedimiento I consiste en la utilización de vidrios estériles, rectangulares, de  $20 \times 5 \text{ mm}^2$  de superficie y  $100 \mu\text{m}$  de espesor, obtenidos a partir de cortes de vidrios cubreobjetos. Los vidrios estériles fueron colocados en cápsulas de Petri de 30 mm de diámetro y sobre ellos se sembraron dos mililitros de células desagregadas a una concentración de 3000–5000 células por ml de medio enriquecido [Fig. 4.1 (a) y (b)]. Cuando las células alcanzaron la confluencia sobre el vidrio, éste se retiró cuidadosamente y se colocó en una segunda cápsula de Petri con medio de cultivo nuevo (procedimiento Ia), dejando a la colonia crecer desde los bordes del vidrio hacia el fondo de la cápsula [Fig. 4.1 (c)]. De esta forma se originaron dos frentes lineales para el crecimiento de la colonia en la dirección perpendicular. Alternativamente, en

algunos experimentos el vidrio confluyente fue colocado con la parte superior, cubierta por células, hacia abajo en la nueva cápsula de Petri (procedimiento Ib), de modo tal que la colonia continuara creciendo desde un frente localizado al mismo nivel que el fondo de la cápsula.

El procedimiento II consistió en realizar la siembra en condiciones de concentración celular similares pero utilizando cápsulas de Petri con la región central de la cápsula enmascarada con una cinta de Teflon de 2,2 cm de ancho y 100  $\mu\text{m}$  de espesor [Fig. 4.2 (a)]. Esta máscara de Teflon, inerte respecto a las células, impide que éstas se adhieran a su superficie de forma tal que el cultivo crece únicamente en las zonas libres. Luego de alcanzada la confluencia del cultivo en la región libre, se retiró cuidadosamente la máscara de Teflon para formar dos frentes lineales de crecimiento de ancho  $L$  [Fig. 4.2 (b)], de manera tal de posibilitar que las colonias crecieran en direcciones opuestas y perpendicular al frente lineal libre [Fig. 4.2 (c)].

En general se observó la existencia de un tiempo de retraso, habitualmente llamado tiempo *lag*, previo a la observación del inicio del desplazamiento de los frentes de crecimiento formados. Para los procedimientos Ib y II el tiempo *lag* resultó de aproximadamente 2 horas, mientras que para las colonias sembradas según el procedimiento Ia, dicho tiempo resultó de aproximadamente 48–72 horas, presumiblemente el tiempo promedio que tardan las células en descender del vidrio hasta el fondo de la cápsula de Petri.

Con ambas técnicas se consiguieron frentes lineales de crecimiento que se propagaban únicamente en la dirección perpendicular al mismo. Es importante remarcar que el ancho del frente de la colonia ( $L$ ) juega un papel fundamental en la dinámica de crecimiento de la interfaz dado que para valores suficientemente pequeños ( $L < 1$  mm) la colonia tiende a crecer radialmente, tal como las colonias lo hacen naturalmente a partir de una siembra puntual.

#### 4.1.1.1. Colonias de frentes lineales en presencia de metil celulosa

Una variante de la técnica II es la utilización de metil celulosa para la preparación de colonias de frentes lineales creciendo en un medio viscoso.

La metil celulosa es un polímero hiro soluble que no afecta la viabilidad celular. La preparación del medio de cultivo con metil celulosa se realizó de la siguiente manera: en una primera etapa se disolvió la metil celulosa de peso molecular  $\approx 1400$  (Sigma Aldrich, número de catálogo M7027) en agua al 5%, alcanzando una viscosidad de 250 cps, correspondiente a la máxima concentración que se puede alcanzar manteniendo la solubilidad de la mezcla. Es importante mencionar que este polímero es apto para cultivos celulares.

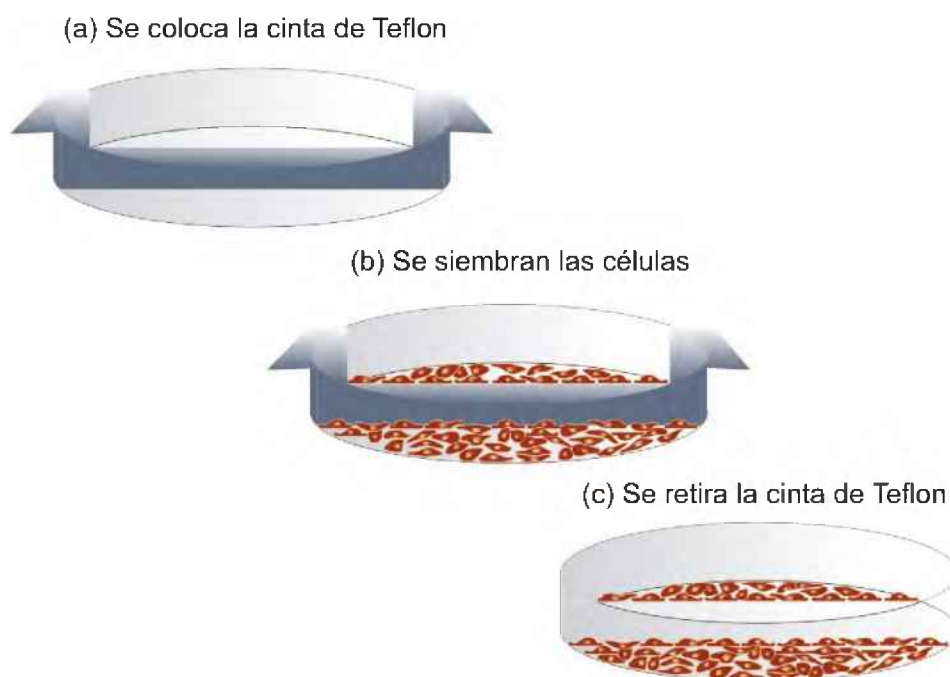


Figura 4.2: Frentes lineales de crecimiento. Procedimiento II: a) se enmascara la región central de una cápsula de Petri con una cinta de Teflon estéril, b) posteriormente se siembran las células en suspensión y se las deja proliferar. c) Una vez alcanzada la confluencia en la región libre de la cápsula, se retira la máscara cuidadosamente obteniéndose 2 frentes lineales de crecimiento enfrentados, separados por una distancia igual al ancho de la cinta utilizada.

En una segunda etapa se preparó el medio de cultivo RPMI 1640 al doble de su concentración habitual (2X) y se lo enriqueció al 20 % con SFB. Posteriormente se mezclaron en partes iguales la metil celulosa (en cada una de sus concentraciones) y el medio enriquecido. El nuevo medio de cultivo presentó finalmente una composición de RPMI a concentración habitual (1X), enriquecido con SFB al 10 % y metil celulosa al 1 % en un caso y al 2,5 % en el otro caso, con viscosidades finales de 5 y 25 centipoise respectivamente.

Las células fueron sembradas en cápsulas de Petri cubiertas centralmente por la cinta de Teflon. En este paso, se utilizó medio de cultivo RPMI enriquecido con SFB al 10 % tal y como se utilizó para los otros experimentos. Posteriormente, al alcanzar las colonias la confluencia, la cinta de Teflon fue retirada y las colonias cubiertas con el medio de cultivo preparado con metil celulosa descrito anteriormente. Es importante remarcar, ya que tiene influen-



cia directa sobre los resultados obtenidos, que las células fueron sembradas en medio líquido y este medio fue reemplazado por la mezcla de medio de cultivo con metil celulosa una vez retirada la cinta de Teflon. Es decir que las colonias se formaron bajo las condiciones estándar, pero que la región sobre la cual las células continuaron su crecimiento se encontraba cubierta por metil celulosa (región de la que se retiró la cinta de Teflon) al momento ocuparla.

#### 4.1.2. Formación de colonias con frente radial

Las colonias con geometría radial se prepararon también de acuerdo a dos procedimientos distintos. En el procedimiento I (colonias radiales tipo I) se sembraron células desagregadas a muy baja concentración (aproximadamente 500 células por ml), en cápsulas de Petri de 30 mm de diámetro. Cuarenta y ocho horas más tarde se seleccionaron al azar 5–6 colonias de cada cápsula sembrada y se siguió su evolución en el tiempo. Este tipo de colonias mostró al principio una geometría muy irregular que progresivamente tendía a una forma cuasi-circular. Estos experimentos permitieron estudiar la dinámica de las colonias en etapas tempranas de crecimiento [Fig. 4.3 (a)].

Este tipo de siembra, en la cual las células se adhieren en forma aleatoria al fondo de la cápsula de Petri, únicamente permite hacer el seguimiento de las colonias durante un período de 7–8 días, ya que posteriormente todas las colonias comienzan a contactarse y el cultivo se vuelve confluyente, perdiéndose los límites de cada colonia. En esta etapa de la evolución comienzan a formarse crecimientos tridimensionales de forma hemiesférica de unos 250-300  $\mu\text{m}$  de radio (Fig.4.3 (b)).

En el procedimiento II, se dejaron crecer colonias de tipo I hasta la formación de los centros tridimensionales, los cuales se extrajeron mediante una micropipeta y se los transfirió a nuevas cápsulas de Petri conteniendo medio de cultivo fresco [Fig.4.3 (c)]. Allí, luego de adherirse, comenzaron a formar una monocapa alrededor del borde del cúmulo tridimensional sembrado. Estas colonias, denominadas tipo II, permitieron estudiar el crecimiento de colonias con frentes circulares de mayor tamaño que las colonias de tipo I.

## 4.2. Coloración de colonias

Se realizaron diferentes tipos de marcaciones celulares con el fin de caracterizar las poblaciones en estudio.

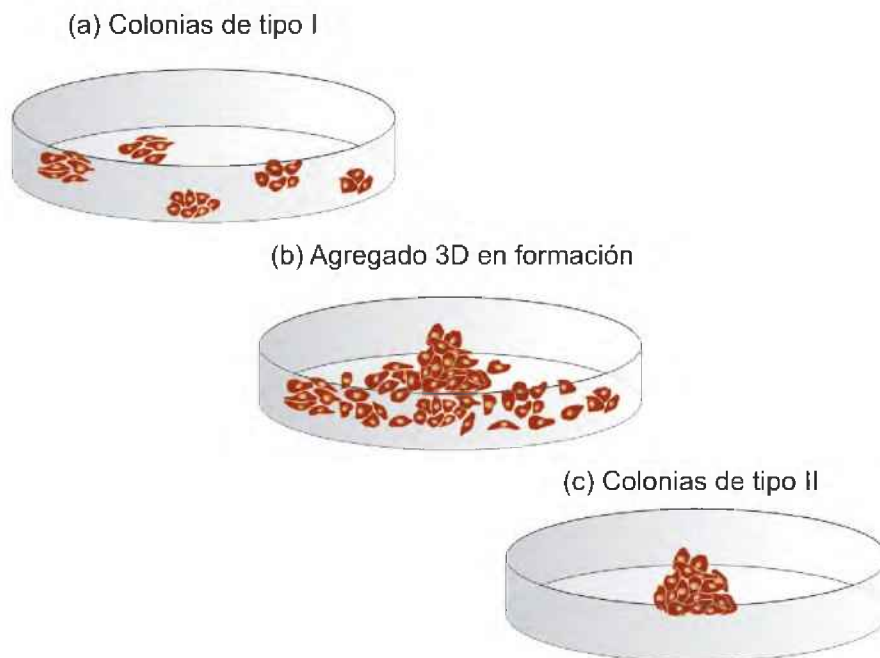


Figura 4.3: Frentes radiales de crecimiento. Procedimientos I y II: a) se siembran células a muy baja densidad y 48 hs más tarde se seleccionan 5–6 colonias pequeñas para su seguimiento, b) si se deja crecer el cultivo descrito en (a) más allá de alcanzado el 100 % de confluencia, se obtienen formaciones tridimensionales. c) Los agregados tridimensionales son removidos con una micropipeta y re-sembrados en una nueva cápsula de Petri.

**Test de exclusión de Tripan Blue:** este test se utilizó rutinariamente para determinar la viabilidad celular, descartándose aquellas poblaciones con viabilidad menor al 80 %. Esta coloración se utilizó particularmente para el análisis de la viabilidad de las células gigantes multinucleadas.

**Fijación y coloración con la técnica de May-Grünwald Giemsa:** la aplicación de esta técnica aporta información adicional que permite resaltar el citoplasma de células individuales, facilitando la detección de células gigantes multinucleadas y de prolongaciones filopódicas. Esto permite reconocer las características morfológicas de las colonias facilitando el análisis estadístico de la distribución de tamaños celulares y su relación de diámetros. El protocolo consiste en preparar grupos de colonias y seleccionar diariamente un grupo de cuatro colonias al que se lo fija y

colorea para su análisis.

**Marcación celular de PCNA:** esta técnica de marcación por inmunohistoquímica del antígeno nuclear de proliferación celular PCNA permite distinguir las células que se encuentran en división. De esta forma se pudo evaluar la distribución espacial de las divisiones celulares para determinar la posible existencia de inhibición por contacto. Para ello se prepararon colonias con frente radial, según el procedimiento I, que fueron fijadas al sexto día de crecimiento con formaldehído al 4%, para ser marcadas 24 horas más tarde por medio del antígeno anti-nuclear PCNA, y contracoloradas con hematoxilina de Meyer.

**Marcación celular con anticuerpos anti-vimentina:** esta técnica de marcación por inmunohistoquímica de los filamentos intermedios de vimentina es una herramienta que se utilizó para determinar el origen de las células, ya que este tipo de filamentos sólo se encuentran presentes en células embrionarias o mesenquimáticas.

### 4.3. Adquisición de imágenes

El seguimiento de los cultivos se realizó tomando fotografías diarias de las colonias, con una cámara digital Canon, acoplada a un microscopio invertido de contraste de fases Nikon TS100, con un objetivo de 10× ADL de campo plano CFI. Debido a que el campo del objetivo del microscopio es más angosto que el tamaño total de las colonias, se debieron tomar fotografías parciales, con una resolución de 0.88  $\mu\text{m}$ / píxel, que luego se compaginaron hasta obtener la imagen completa de la colonia. Para las colonias circulares el número de fotos necesarias por obtener una imagen completa varió entre 1 y 30, mientras que para las colonias de frente lineal el número de fotografías osciló entre 20 y 100, dependiendo del estado de crecimiento de la colonia.

El crecimiento de cada colonia fue seguido en el tiempo hasta que la misma hiciera contacto con alguna colonia vecina, hecho que ocurría habitualmente luego de 5 a 10 días de crecimiento.

El trazado de los perfiles de los frentes de crecimiento se definió considerando como parte del perfil a todas las células que, a través de su citoplasma o de las prolongaciones filopódicas que podían observarse, estaban en contacto con la colonia en estudio. Con el fin de controlar posibles errores en el trazado de los perfiles, se utilizaron comparativamente dos métodos: el tratamiento digital de las imágenes con un software desarrollado en el laboratorio en MatLab

y el trazado manual sobre pantalla empleando una tableta gráfica digital Wacom. Los resultados obtenidos a partir de ambos procedimientos mostraron un excelente acuerdo con una discrepancia del orden del 1 %.

#### 4.3.1. Seguimiento *in situ* del crecimiento celular

Se realizaron cultivos celulares *in situ* para analizar cambios locales de los frentes de crecimiento con el objeto de: i) determinar si durante el crecimiento de las colonias aparecían procesos de relajación con difusión celular; ii) observar las regiones donde se producían las divisiones celulares; iii) observar si había divisiones celulares incompletas o, por el contrario, fusiones celulares; iv) cualquier otra características que necesitara del seguimiento individual de células dentro de la colonia. Para ello se utilizaron colonias con frente lineal de crecimiento (según el procedimiento I) y colonias con frente radial de crecimiento (colonias de tipo I). Estos cultivos, luego de dos días de crecimiento en la estufa de cultivo, se colocaron en una cámara acrílica cilíndrica construida ad-hoc. Esta cámara, hermética, transparente, termostatazada a 37° C por un sistema de circulación externa, y enriquecida con una atmósfera interna controlada de una mezcla de aire y 5 % CO<sub>2</sub> y humedad del 95 %, permitió reproducir las condiciones de incubación estándar (Fig. 4.4), mientras permanecía colocada en el microscopio para poder tomar imágenes de crecimiento de las colonias cada 10 minutos, durante períodos de 72 horas, y realizar el seguimiento individual de las células.

#### 4.3.2. Análisis por microscopía de fuerzas atómicas

La microscopía de fuerzas atómicas (AFM) es un técnica que permite analizar la superficie celular a gran escala. Dadas las características del microscopio utilizado, se prepararon muestras de cultivos celulares, sobre portaobjetos circulares de 1 cm de diámetro y se fijaron y colorearon con la técnica de May-Grünwald Giemsa. La técnica de AFM permite obtener imágenes con gran amplificación, que aportan datos sobre la estructura de filopodios y microvellosidades, el espacio intercelular, la presencia de uno o más núcleos dentro de una misma célula, etc.

Para estas medidas se utilizó un microscopio NanoScope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara, California), que opera en aire a temperatura ambiente en modo de contacto, empleando un cantilever de nitruro de silicio con una constante de resorte de 0.06 N m<sup>-1</sup>. En el Apéndice III se describen brevemente los fundamentos y modo de operación de este microscopio.

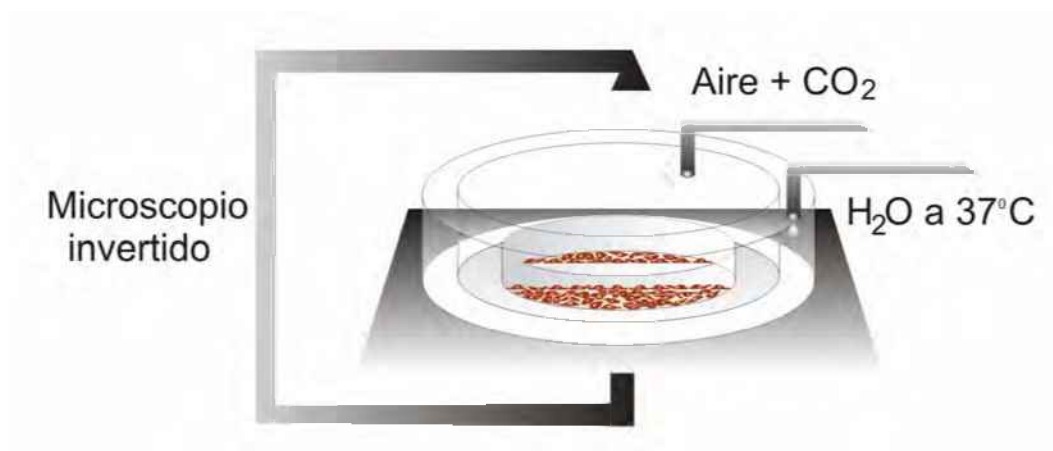


Figura 4.4: Esquema del sistema experimental utilizado para realizar mediciones *in situ*. El microscopio se encuentra representado como una  $C$  que envuelve e ilumina a la celda. Esta última, se esquematiza con una cápsula de Petri en su interior, y se simboliza el aporte de aire enriquecido al 5% con  $\text{CO}_2$  y la termostatación del sistema a  $37^\circ\text{C}$ .

## 4.4. Análisis y procesamiento de datos

### 4.4.1. Morfología y distribución celular

El análisis de distribución morfológica de las células se realizó a partir del trazado de los contornos de las células y la posterior binarización de las imágenes. Para ello se utilizaron principalmente las colonias fijadas y coloreadas con la técnica de May-Grünwald Giemsa. Posteriormente se analizaron las áreas, el diámetros promedio y la relación de diámetros de las células en la colonia y su distribución temporal y espacial.

### 4.4.2. Análisis de los frentes de crecimiento

El análisis de los contornos trazados a partir de las imágenes de las colonias se realizó luego de binarizar los perfiles y procesarlos mediante un programa desarrollado en el laboratorio en lenguaje Fortran 95, con una interfaz gráfica ad-hoc. Este software fue especialmente diseñado para permitió calcular todos los parámetros asociados con la evolución de los contornos de las colonias: la distancia de cada punto del contorno al centro de masa (colonias con frente circular) o al frente inicial de crecimiento (colonias con frente lineal), la ve-

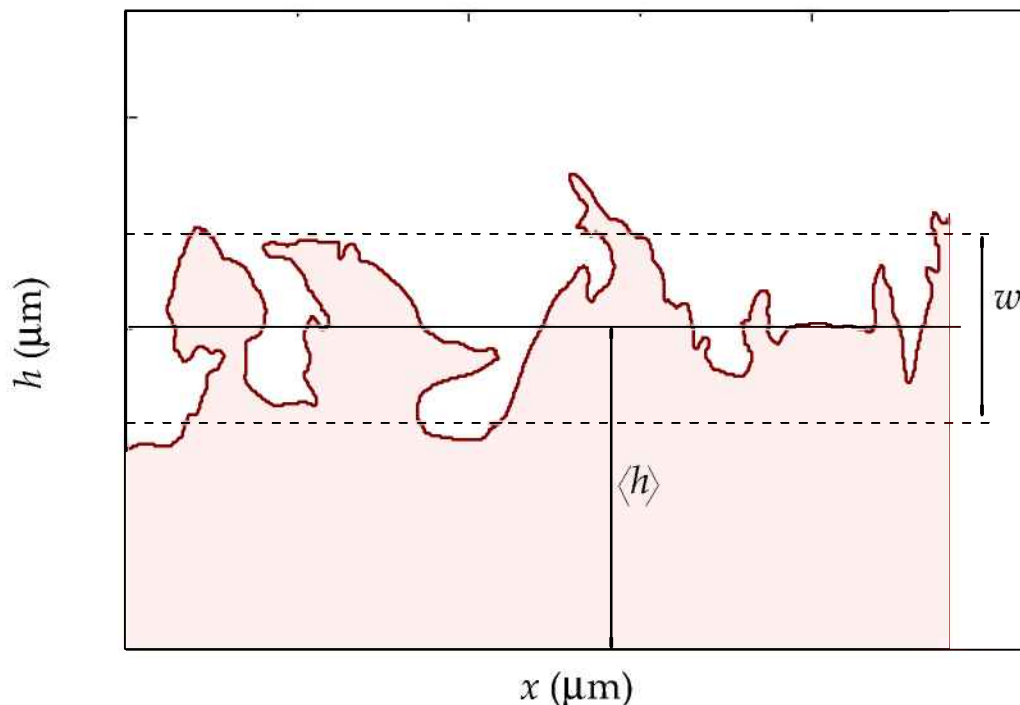


Figura 4.5: Vista parcial del frente de una colonia de células en la que se indica su altura promedio y rugosidad.

localidad promedio de desplazamiento del frente, la rugosidad del perfil de la colonia, la dimensión fractal ( $d_f$ ) del contorno de la colonia y el análisis de Fourier del contorno.

De los perfiles de las colonias con frente lineal de crecimiento se calcularon la altura instantánea ( $h$ ) en cada sitio  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, N$ ) del frente, la altura promedio  $\langle h \rangle$  a tiempo  $t$  y la rugosidad global  $w(L, t)$ , como el desvío estándar de las fluctuaciones de  $h$  alrededor de  $\langle h \rangle$  (Fig. 4.5).

La rugosidad local  $w(l, t)$  se calculó como el desvío estándar de los puntos comprendidos dentro de región del frente de longitud  $l$  ( $l \ll L$ ) para un tiempo de crecimiento determinado. Los valores de rugosidad  $w(L, t)$  y  $w(l, t)$  fueron calculados para el rango  $10 \leq l \leq L \mu\text{m}$ .

Para el análisis de las colonias con frente radial de crecimiento se determinó el centro de masa de la colonia ( $CM$ ) y la distancia  $R_i$  desde el  $CM$  hasta el punto  $i$ -ésimo del frente ( $i = 1, 2, \dots, N$ ). A partir de allí se calculó el radio promedio

$$\langle R(t) \rangle = \frac{1}{N} \sum_i R_i(t) \quad (4.1)$$

y la velocidad promedio de desplazamiento

$$\langle v(t) \rangle = \frac{d\langle R(t) \rangle}{dt} \quad (4.2)$$

En este caso, el análisis de escalado dinámico se realizó luego de transformar el sistema de coordenadas del frente de ángulo-radio a arco-radio [30,87], de modo tal que la localización de cada punto del frente quedara determinada por las coordenadas  $s_i$  y  $R_i$ , donde el arco  $s_i$  es medido a lo largo del círculo de radio  $\langle R \rangle$  (Fig. 4.6).

Una vez linealizado el perfil, se calculó la rugosidad global  $w(L, t)$  como el desvío estándar de las fluctuaciones de la distancia radial

$$w(L, t) = \left\{ \frac{1}{N} \sum_i [R_i(t) - \langle R(t) \rangle]^2 \right\}^{1/2} \quad (4.3)$$

donde  $L = \sum_i s_i$ . La rugosidad local  $w(s, t)$  se determinó en función de arcos de longitudes  $s$  ( $10 \leq s \leq L$ ) al tiempo  $t$ .

El análisis de Fourier de los perfiles de las colonias se realizó tanto para frentes lineales como para frentes radiales, en este último caso luego de la correspondiente transformación de coordenadas.

La dimensión fractal de los frentes de crecimiento fue determinada a partir del método del conteo de cajas (box counting method). El mismo consiste en trazar una cuadrícula sobre el perfil cuya dimensión fractal se desea determinar, y contar el número de cajas, que para diferentes tamaños, son necesarias para contener plenamente el perfil del frente de crecimiento. En el presente caso se emplearon cuadrículas con divisiones de un tamaño mínimo de 4 micrones hasta un máximo de 200 micrones, de modo tal que el lado de cada caja no excediera el valor de la rugosidad.

De acuerdo con la ecuación 2.2

$$\log N(l) \propto -d_f \log l \quad (4.4)$$

donde  $l$  es el tamaño de la cuadrícula, de la pendiente del gráfico logarítmico del número de cajas de lado  $l$  versus el logaritmo de  $l$  se obtuvo  $d_f$ , para cada frente de colonia en estudio (Fig. 4.7).

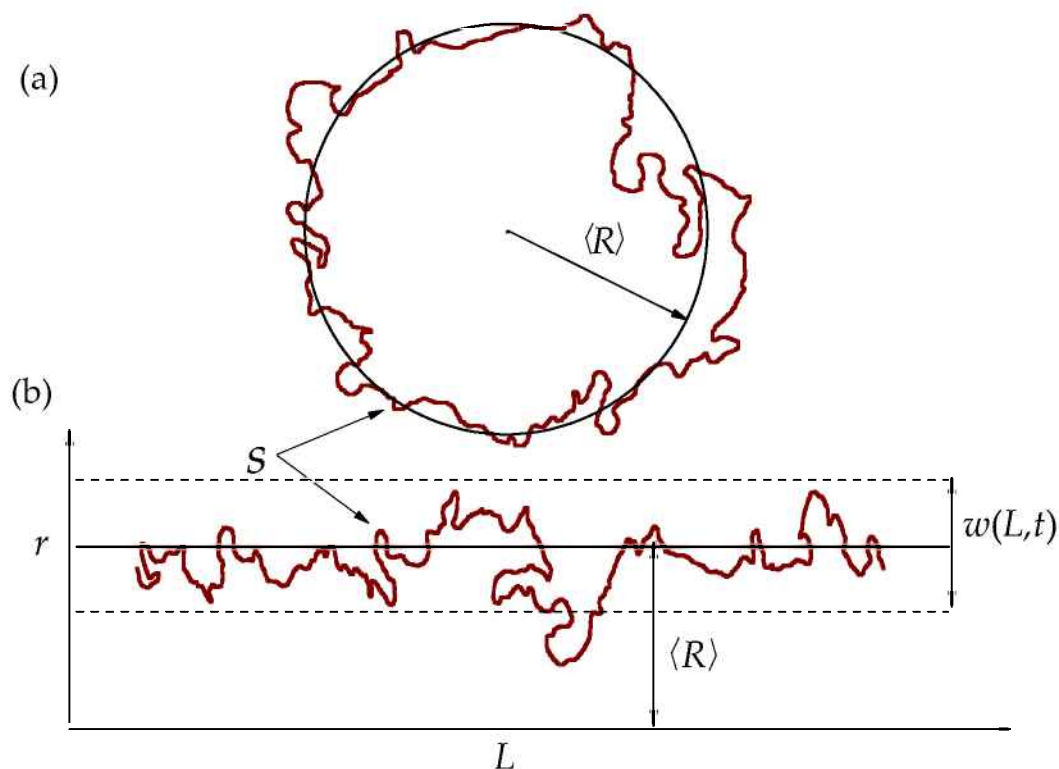


Figura 4.6: a) Contorno de una colonia de frente radial típica, de radio medio  $\langle R \rangle$ , medido con respecto al centro de masa de la colonia; b) contorno linealizado del perfil mostrado en (a), resultado de la transformación de coordenadas de ángulo-radio a arco-radio

Un aspecto importante considerado en los cálculos de rugosidad fue el hecho que los frentes de las colonias presentan espontáneamente *salientes* (“overhangs”), de forma tal que los contornos de las mismas presentan posiciones multivaluadas, esto es, para una misma posición sobre el eje  $x$  hay más de un valor en  $y$ . Esto puede tener consecuencias en la aplicación de los modelos de crecimiento y sus ecuaciones al momento de tratar los datos experimentales. Esto se explica dado que los modelos han sido desarrollados a partir de una ecuación matemática que por definición excluye la posibilidad de que el borde de la colonia pueda tomar dos valores de altura o distancia para una misma posición. Por ello, se determinaron los frentes de crecimiento de las colonias con salientes y sin salientes, para determinar hasta qué punto la rugosidad del



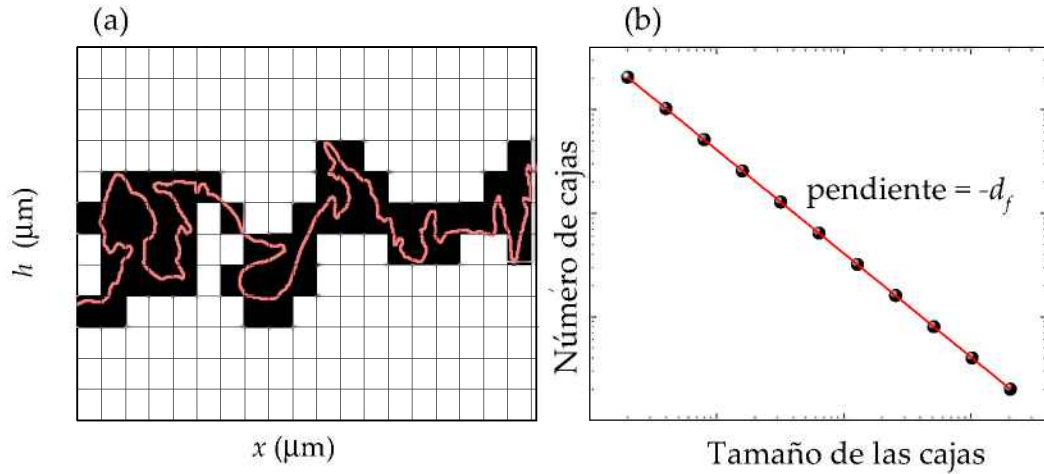


Figura 4.7: a) Esquema del perfil de una colonias graficado sobre una cuadrícula. En negro se marcan las cajas que contienen el contorno. b) Gráfico logarítmico del número de cajas versus el tamaño de las mismas

frente estaba influida por las mismas. Para obtener entonces el perfil sin “salientes laterales”, de cada perfil experimental se tomó únicamente el máximo valor de  $h$  (o  $R$ ) para cada sitio  $i$  (o arco  $s_i$ ) (Fig. 4.8).

Todos los parámetros calculados sobre los datos experimentales fueron recalculados para los contornos monovaluados (datos corregidos) y comparados con los primeros. De este modo pudo determinarse el valor del ancho del frente a partir del cual la influencia de las salientes es prácticamente despreciable y los resultados se acercan al comportamiento del sistema real.

### 4.4.3. Determinación de los errores

La determinación de los errores se realizó por dos métodos:

- cuadrados mínimos: calculando la mejor recta que ajusta un gráfico a partir de la mínima distancia promedio entre los puntos experimentales y la recta trazada [96].
- aproximación teórica: calculando el error como la diferencia entre la pendiente teórica y la mejor pendiente que ajusta los datos experimentales [63].

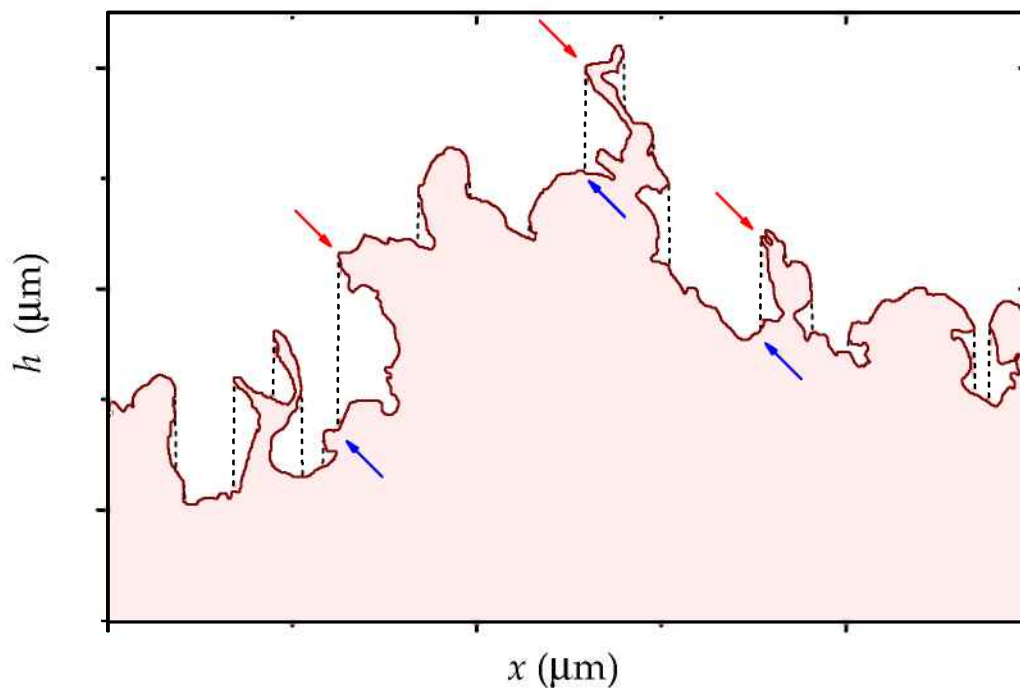


Figura 4.8: Corrección de la multivaluación. Se observa un perfil real experimental (línea continua) y el perfil monovaluado (línea punteada) obtenido a partir de la selección de los puntos máximos en los sectores en que existen dos alturas diferentes para una posición determinada. Las flechas señalan algunos de los puntos de multivaluación

De los resultados obtenidos según estos dos métodos, se eligió el valor de error más grande, de modo tal de evitar sobreestimaciones.

---

## **Crecimiento de colonias de células Vero**

Las células Vero comprenden una línea celular conocida y ampliamente utilizada desde hace alrededor de 50 años, sin embargo aún permanecen algunas dudas sobre su origen. Así por ejemplo, se encuentra que en el catálogo del banco de células norteamericano (ATCC) figuran como células de origen epitelial, mientras que en el banco de células europeo (ECACC) son clasificadas como células fibroblásticas [38, 97]. La bibliografía existente tampoco es precisa, aunque algunos autores han propuesto un origen mesangial.

En base a la falta de datos concluyentes se realizó una marcación por inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-vimentina, encontrándose claramente que las células Vero presentan filamentos intermedios de vimentina (Fig. 5.1). Dado que estas células son originarias del riñón de mono Africano Verde adulto, se descarta un origen embrionario y se arriba a la conclusión de que estas células son de origen mesenquimático.

### **5.1. Colonias con frente lineal**

#### **5.1.1. Evolución morfológica de las colonias**

Los cultivos de células Vero, a pesar de provenir de un tejido originalmente normal, presentan características de anaplasia: puede observarse pleomorfismo celular y nuclear. Algunas células llegan a ser gigantes y otras permanecen muy pequeñas, con núcleos que cubren el citoplasma casi completamente. Los núcleos son hipercromáticos, y la relación núcleo:citoplasma varía sorpren-

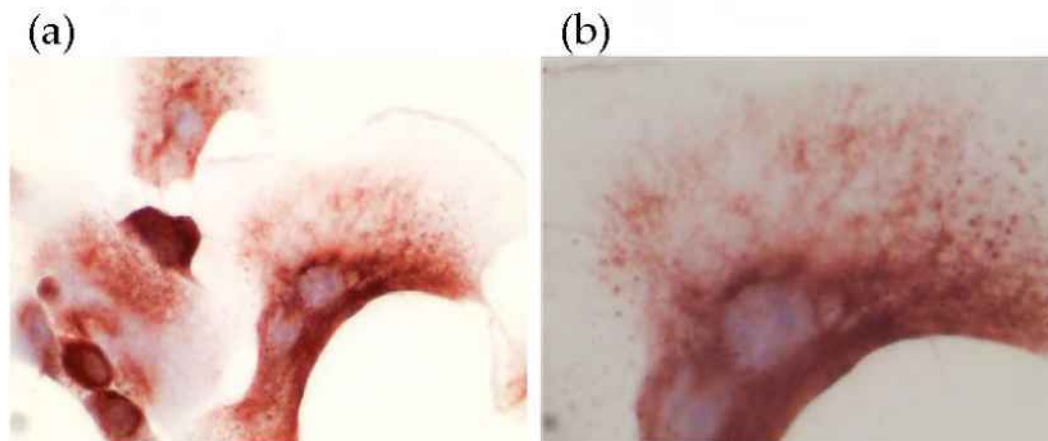


Figura 5.1: Imágenes parciales de células de la línea Vero marcadas con el anticuerpo anti-vimentina y tomadas con distintos aumentos: a) 10 $\times$ ; b) 40 $\times$ .

dentemente de una célula a la siguiente. La cromatina forma con frecuencia grumos groseros y pueden observarse grandes nucléolos. En líneas generales, la morfología de las colonias se caracteriza por un dominio tridimensional irregular, ubicado en el seno de la misma, que se continúa como una monocapa de células con un frente de crecimiento rugoso que forma una interfaz con el medio de cultivo. La expansión del dominio bidimensional se produce esencialmente por duplicación celular, tanto en el seno de la colonia como en el frente, acompañada por cambios en el tamaño y la morfología celular, como se describe más adelante.

En estadios iniciales de crecimiento, se observa que en general las colonias están formadas por células de alrededor de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro, de aspecto similar, de bordes redondeados y suaves, acomodadas en forma compacta, mostrando un aumento de la densidad celular desde el borde hacia el seno de la colonia, que se pone de manifiesto como regiones más fuertemente coloreadas [Figs. 5.2 (a)].

Con el paso del tiempo, las diferencias entre la interfaz y el seno de la colonia se van haciendo más marcadas [Fig. 5.2]. En el frente de la colonia comienzan a verse células más grandes (gigantes) que incluso superan los 200  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 5.3). Algunas de estas células poseen un solo núcleo polimórfico e hipercromático muy grande, mientras que otras son polinucleadas. La presencia de células polinucleadas puede ser observada por microscopía

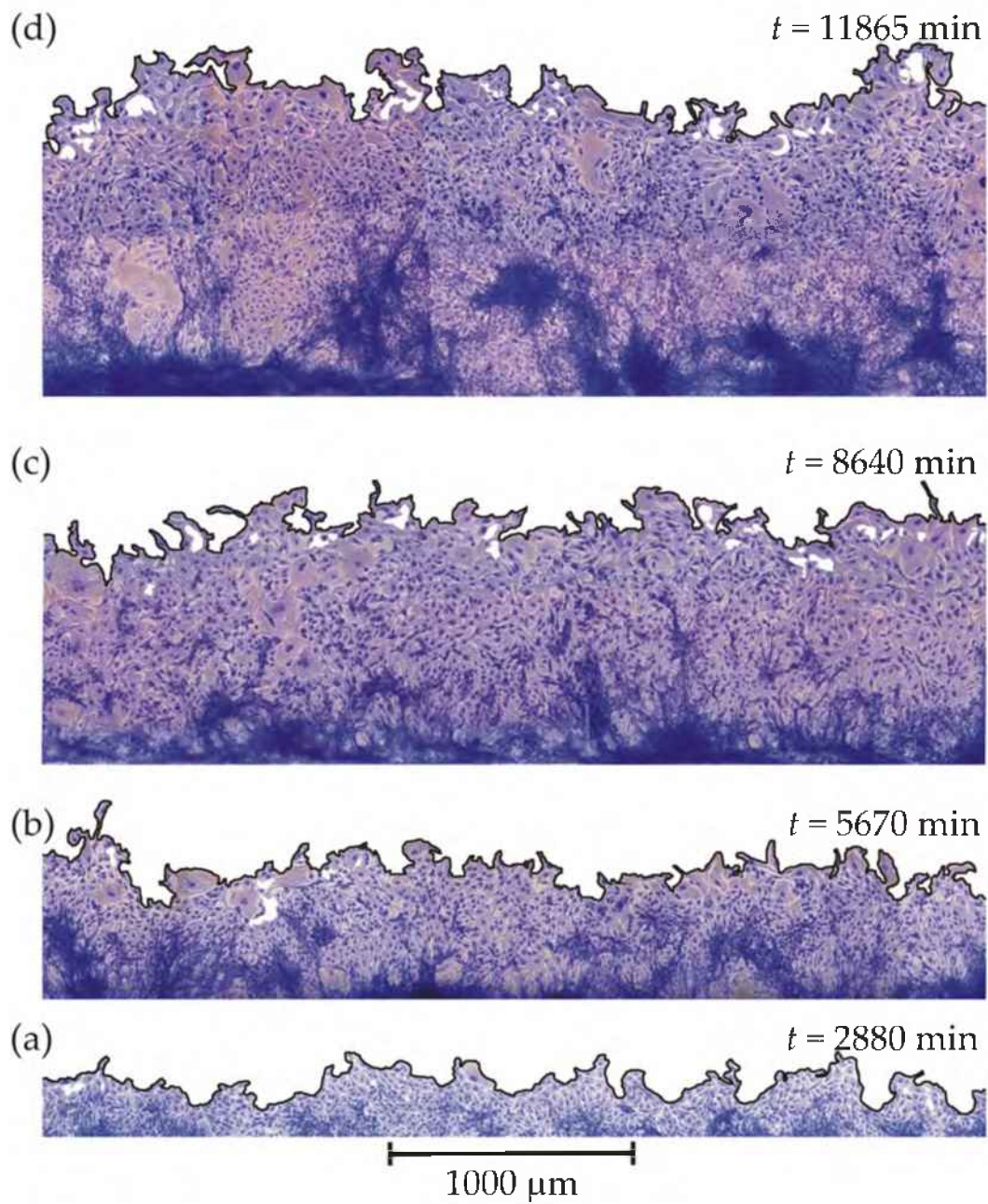


Figura 5.2: Imágenes parciales de colonias de células Vero preparadas según el método de la cinta de teflon, fijadas y coloreadas a diferentes tiempos de crecimiento. Los perfiles de los frentes de crecimiento se encuentran resaltados con un trazo negro.

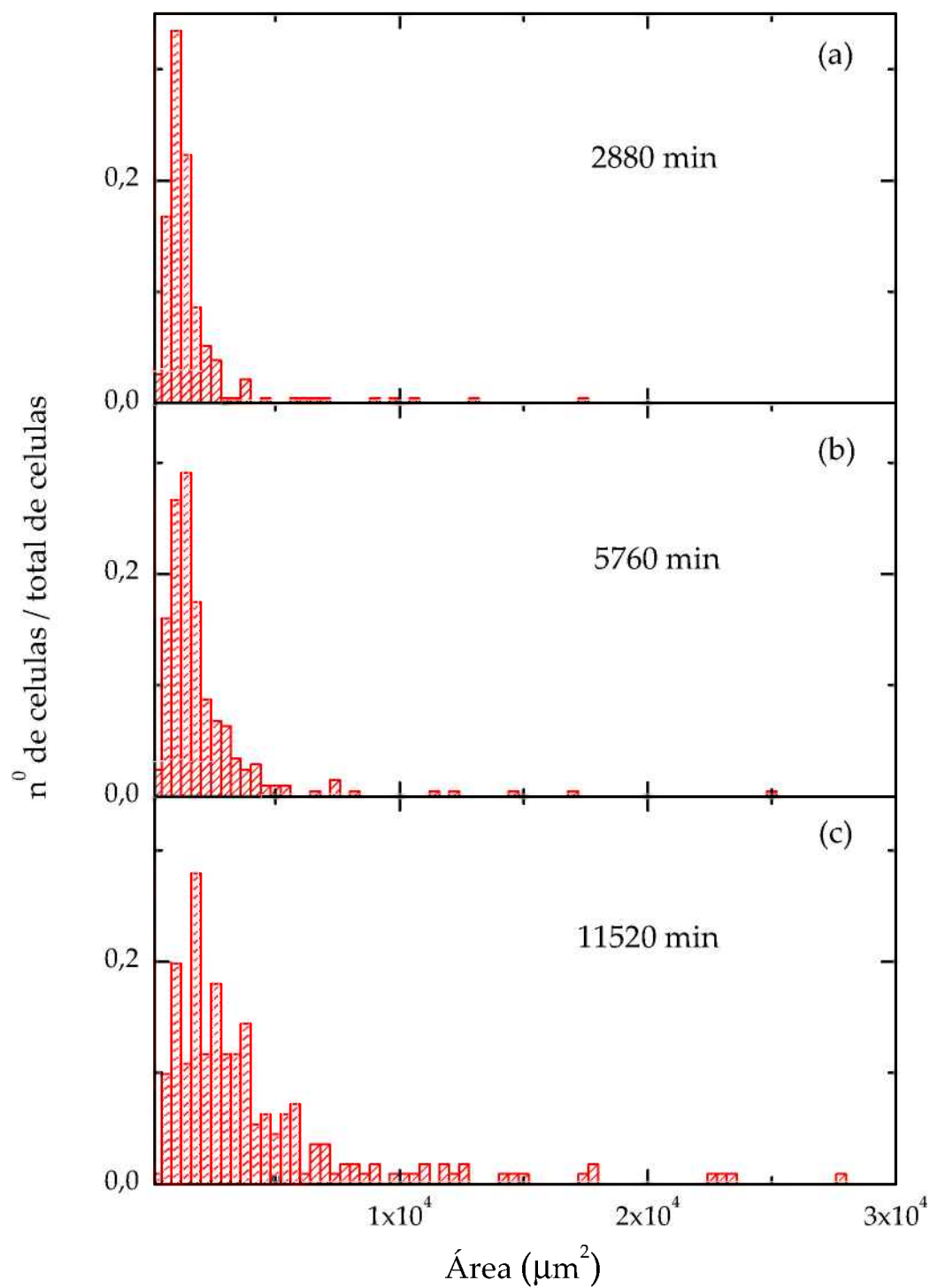


Figura 5.3: Histogramas que muestran la distribución de tamaños celulares en el borde de colonias fijadas y coloreadas a diferentes tiempos de crecimiento. En el eje las ordenadas se muestra el valor normalizado del número de células por el total de células analizadas.

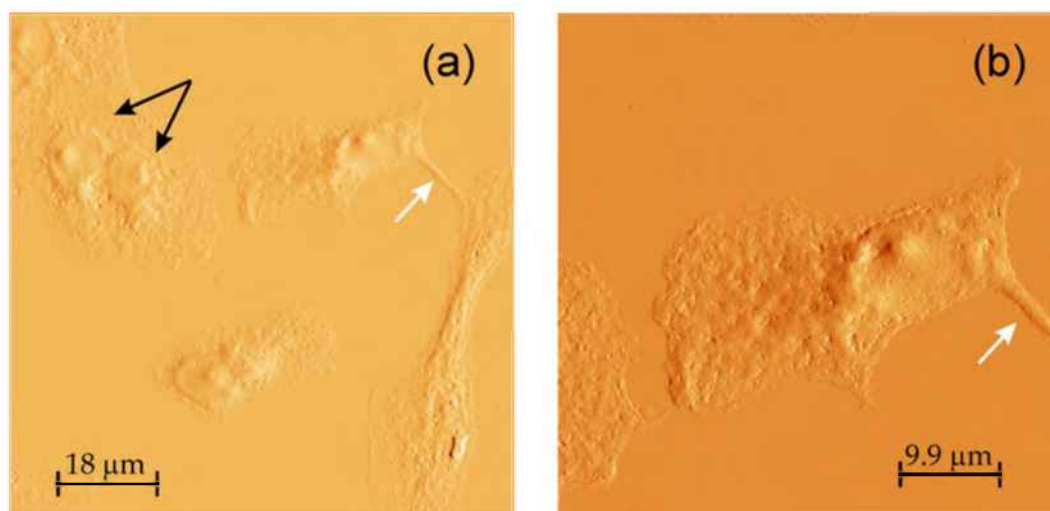


Figura 5.4: Imágenes parciales de células Vero tomadas con el microscopio de fuerzas atómicas (AFM). a) Célula binucleada: las flechas negras indican la presencia de los dos núcleos dentro del citoplasma de una única célula. A la derecha se observa un largo filopodio que conecta dos células (flecha blanca). b) Imagen a mayor aumento donde se resalta la presencia del filopodio

óptica y por microscopía de fuerzas atómicas como se destaca en la figura 5.4 (a).

Estas células pueden formarse por fusión entre células vecinas o también pueden formarse por divisiones incompletas en las que se produciría la duplicación nuclear, con aumento del citoplasma, sin que ocurra la citocinesis, como puede demostrarse con el seguimiento de las colonias *in situ* (Fig. 5.5). Estas células, independientemente del mecanismo de formación, permanecen temporalmente multinucleadas, hasta que se particionan en varias células hijas o mueren luego de varios días. También se observa la formación de prolongaciones filopódicas y la aparición de espacios vacíos entre células, indicando que el crecimiento de la colonia se está desarrollando en múltiples direcciones [Figs. 5.6 (a) y 5.4 (b)]. Las células de la interfaz adquieren diferentes conformaciones, circulares, elípticas, estrelladas, filiformes, de contornos suaves o angulares [Fig. 5.6 (a)]. Los histogramas que se muestran en la figura 5.3, realizados sobre células pertenecientes al borde de la colonia, muestran un ensanchamiento progresivo de la distribución de tamaños celulares, representando en forma cuantitativa lo que se observa de las imágenes. Todo esto

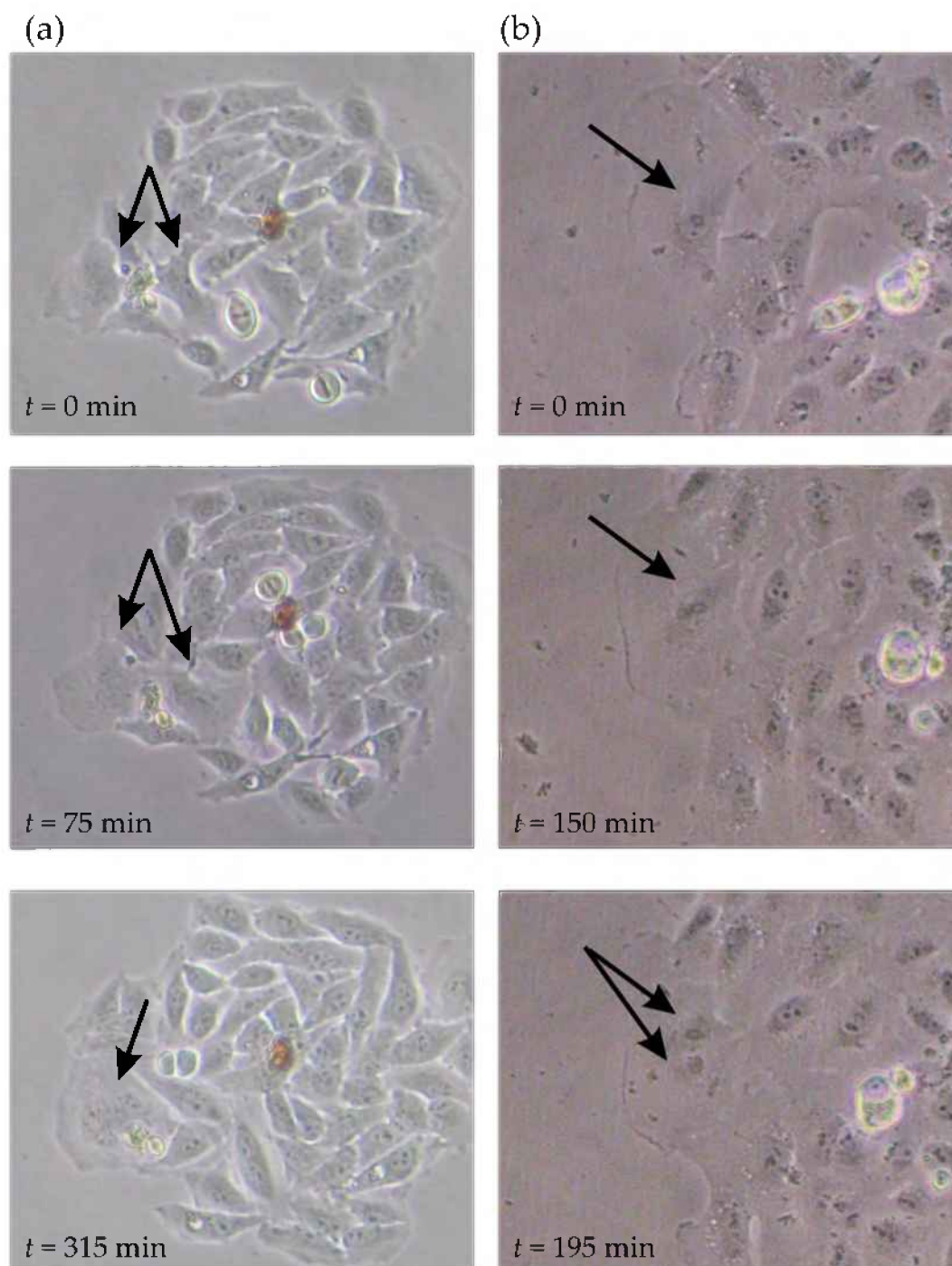


Figura 5.5: Imágenes a diferentes tiempos de colonias de células Vero seguidas *in situ*. a) Se observa la presencia de dos células inicialmente diferentes que se fusionan en un sola; b) las imágenes muestran una división incompleta de una única célula que se convierte en binucleada.



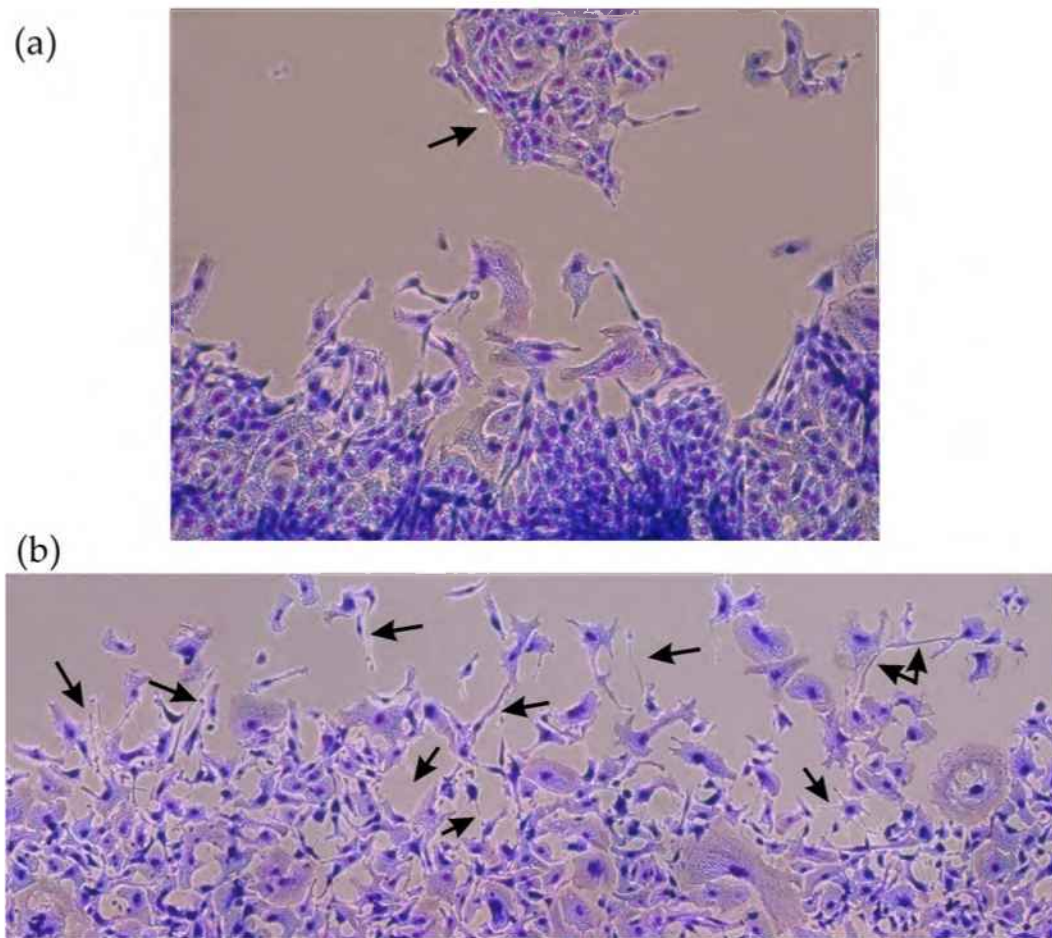


Figura 5.6: Imágenes de frentes de colonias celulares en la etapa final del experimento que muestran: en (a) el inminente contacto entre la colonia principal y la colonia secundaria más pequeña (señalada con una flecha) y en (b) el entramado celular complejo, formado principalmente por prolongaciones filopódicas, algunas de ellas indicadas mediante flechas.

conlleva a una disminución de la densidad celular en esta región. Por el contrario, en el seno de la colonia la densidad celular va aumentando debido a que este tipo de células carece de inhibición por contacto, al menos completa [98]. Debido a la compresión lateral, las células se van haciendo cada vez más pequeñas hasta alcanzar diámetros de alrededor de  $15 \mu\text{m}$ , aunque en las regiones donde están muy comprimidas o creciendo en forma tridimensional, resulta imposible medir sus tamaños.

Finalmente, para tiempos muy prolongados, la morfología del frente se distorsiona debido a la separación de células de la colonia original y a la formación de redes muy complejas entre las prolongaciones filopódicas [Figs. 5.4 (b) y 5.6]. Estas células, separadas del frente de la colonia, tienden a formar colonias circulares aisladas a una cierta distancia de la colonia principal. A medida que esta última crece, puede eventualmente alcanzar esas nuevas colonias e incorporarlas, poniendo final al experimento dado que la definición del perfil de la colonia se hace incierta.

### 5.1.2. Análisis de los frentes lineales de crecimiento.

La aplicación de escalado dinámico, al menos en el marco de las clases universales que podrían regir el crecimiento de una colonia celular, implica necesariamente que el desplazamiento del frente responda a un movimiento uniforme, es decir que la altura de la colonia aumente linealmente con el tiempo, a una velocidad promedio constante ( $\langle v \rangle = v_0$ ). Para asegurarnos de estar en tales condiciones de crecimiento lineal, se analizó en primer lugar el desplazamiento de los frentes.

A modo de breve repaso, la velocidad se define como la relación existente entre el desplazamiento ocurrido y el tiempo en que se ha producido el suceso

$$\langle v \rangle = \frac{d\langle h \rangle}{dt} \quad (5.1)$$

donde  $\langle h \rangle$  es la altura promedio de la colonia.

Para los frentes lineales de crecimiento de las células Vero (Fig. 5.7), independientemente del procedimiento de cultivo empleado, se observa que la velocidad de desplazamiento es constante, es decir que el frente del sistema se desplaza distancias iguales a intervalos iguales de tiempo. En la figura 5.8 se muestran los resultados obtenidos a partir de colonias de frentes lineales preparadas según el procedimiento I, donde las células son sembradas sobre vidrios, y según el procedimiento II, donde se aplica una cinta de Teflon central como molde. De los gráficos se desprende que los comportamientos de ambos tipos de colonias son similares.

Otro aspecto que debe satisfacerse para poder aplicar la técnica de escalado dinámico, es que las colonias exhiban una morfología fractal, para lo cual se determinó la dimensión fractal utilizando el método del conteo de cajas como se muestra en la figura 5.9. Teniendo en cuenta el ancho del frente y los valores de rugosidad que representan las protrusiones y valles del frente, se calculó el valor de la dimensión fractal para un tamaño de cajas de 10 a 200

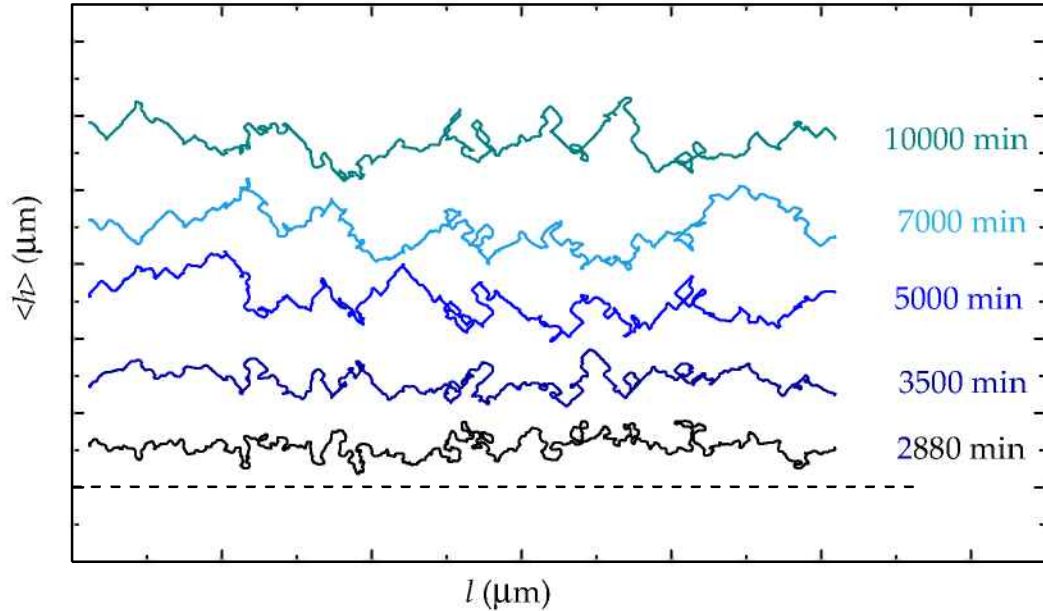


Figura 5.7: Contornos del frente de crecimiento de una colonia de células Vero, preparada según el procedimiento I (a).

$\mu\text{m}$ , obteniéndose un valor de  $d_f = 1,25 \pm 0,05$ , independientemente del tiempo y del procedimiento experimental utilizado.

Una vez confirmadas la linealidad de la cinética de desplazamiento y la característica fractal del sistema en estudio, es posible avanzar en la aplicación del escalado dinámico. Para el cálculo de los exponentes críticos se graficaron en primer lugar los datos del logaritmo de la rugosidad versus el logaritmo del tiempo, en el intervalo de tiempo que va de 200 a 15000 minutos [Fig. 5.10]. Del ajuste lineal se obtuvo una pendiente de  $0,33 \pm 0,02$ , que de acuerdo a la ecuación 2.8 corresponde al exponente de crecimiento  $\beta$ . Puede observarse que los datos de la rugosidad no muestran una región de saturación.

Por otra parte, del gráfico logarítmico de la rugosidad de los frentes versus la fracción del frente ( $l$ ) se obtienen curvas sigmoideas [Fig. 5.11]. De estas curvas no es posible determinar un valor del coeficiente de rugosidad  $\alpha$ .

A partir de estos datos podría concluirse que la dinámica de crecimiento de las colonias producidas según los procedimientos I y II son idénticas, con la única diferencia de que las primeras parten de valores absolutos de rugosidad menores que las segundas. Esto puede deberse a que en un caso las células deben descender unos  $100 \mu\text{m}$ , cada una a su velocidad, para comenzar a

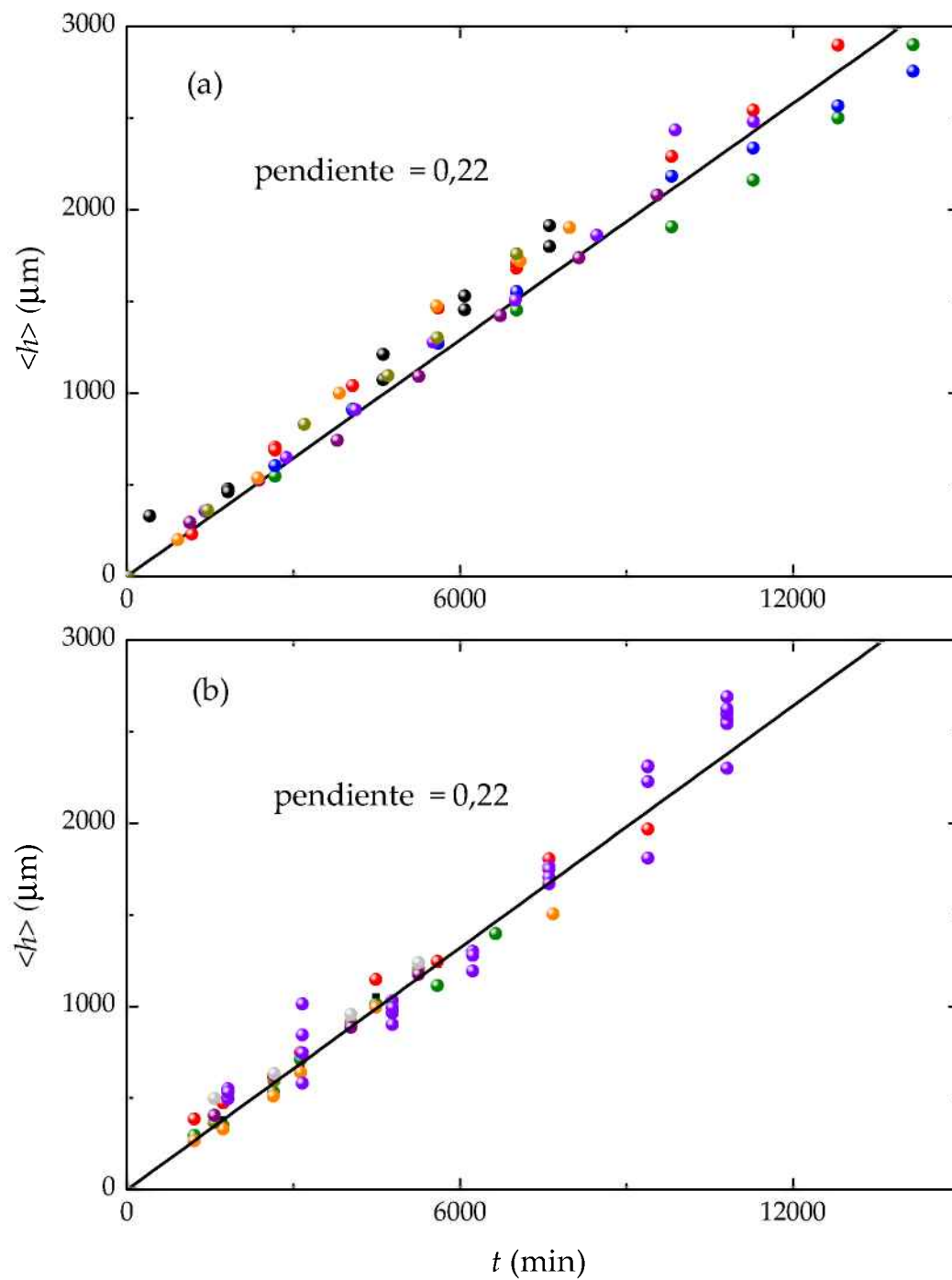


Figura 5.8: Variación de la altura media de los perfiles con el tiempo de crecimiento: a) datos obtenidos según el procedimiento I; b) según el procedimiento II. Cada color corresponde a un experimento diferente.

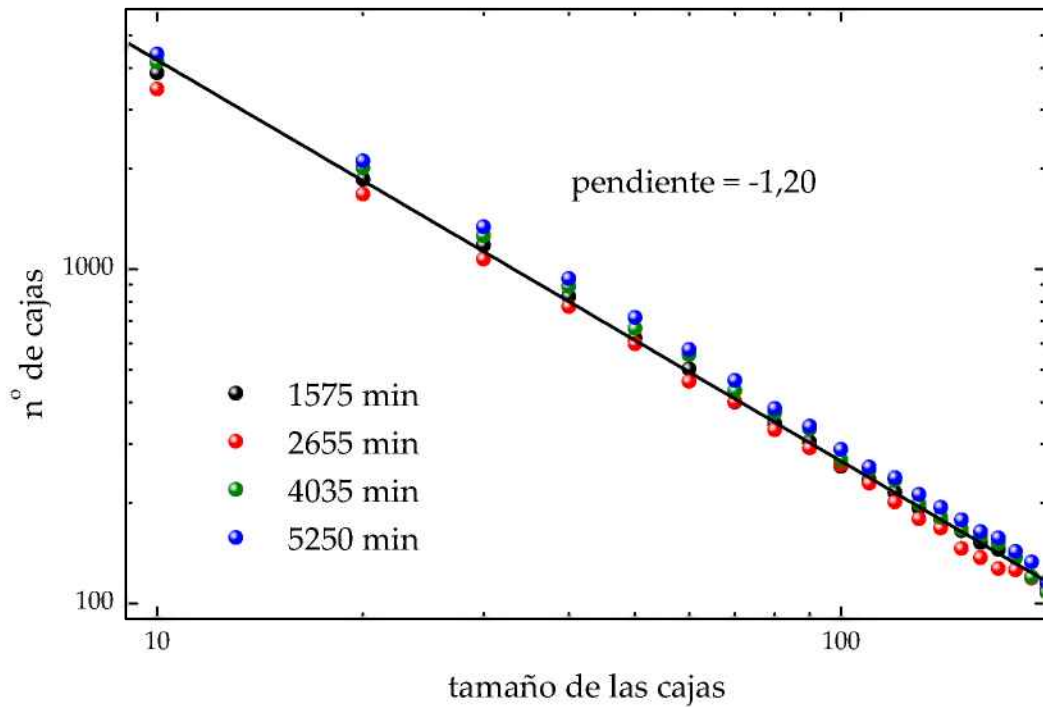


Figura 5.9: Dimensión fractal del frente de una colonia, calculada según el método del conteo de cajas a diferentes tiempos.

expandir la colonia (procedimiento I), mientras que las otras se encuentran contenidas por un molde hasta el tiempo inicial en que se lo retira y la colonia reanuda su crecimiento (procedimiento II).

Ahora bien, cuando se corrigen los perfiles experimentales, de modo tal de transformar el perfil con salientes laterales en uno sin ellas, o monovaluado, se observa en primer lugar que las curvas de rugosidad en el tiempo no sufren ninguna modificación significativa, y la pendiente continúa siendo la misma (Fig. 5.10). Sin embargo, la comparación de las curvas de rugosidad versus la fracción  $l$  del frente, que resultan de la superposición de los datos experimentales y de los datos corregidos, muestra que son coincidentes para valores de  $l$  que superan un cierto valor crítico  $l_c$  (Fig. 5.12). Este valor crítico, que se incrementa con el tiempo, determina el ancho de la colonia a partir del cual la dinámica se vuelve prácticamente insensible a la presencia de salientes laterales. Lo opuesto ocurre para  $l < l_c$ . Por lo tanto, la influencia de las salientes sobre la rugosidad del frente completo de la colonia disminuye a medida que el tamaño del frente considerado aumenta, y la rugosidad de los frentes expe-

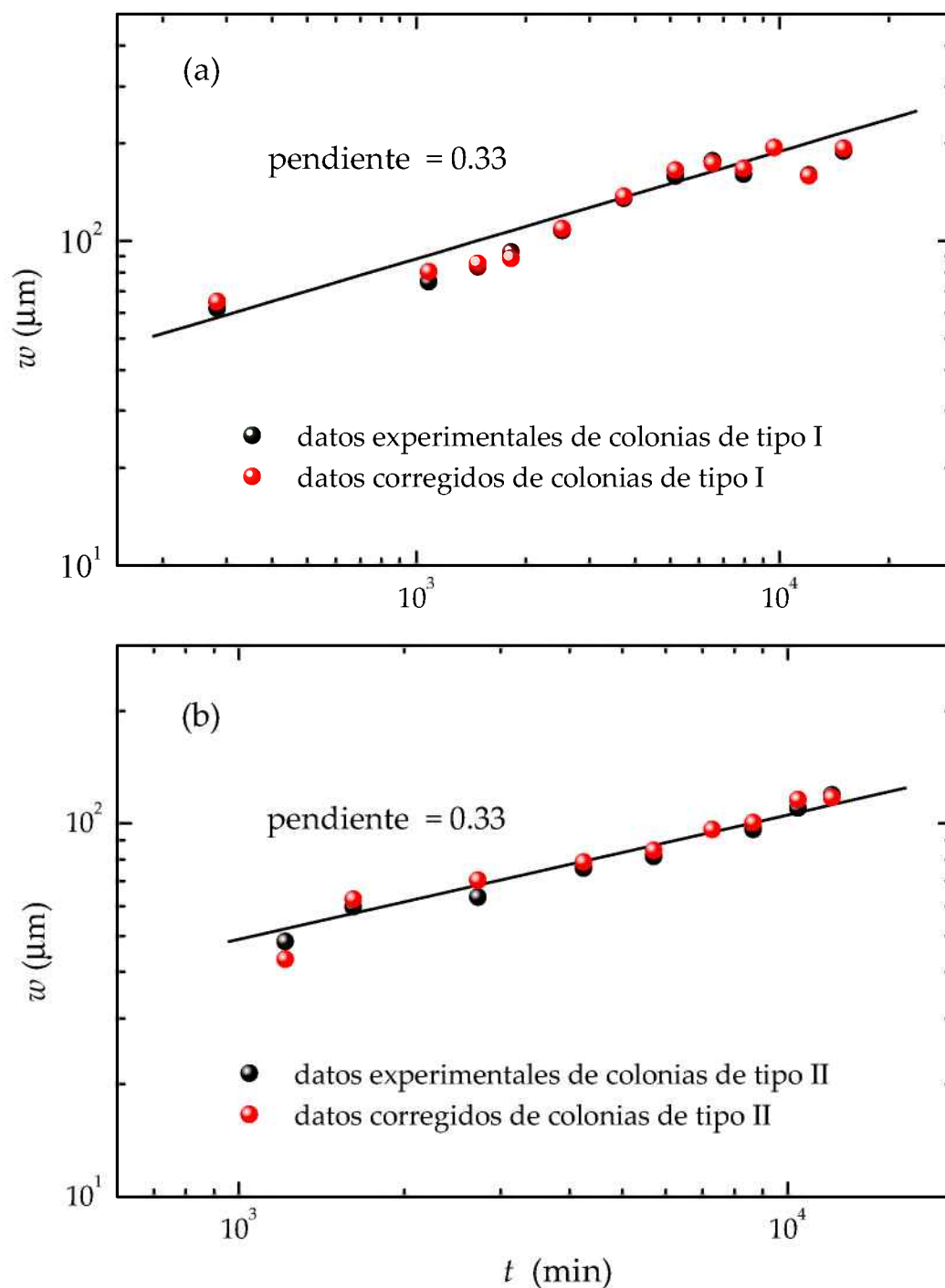


Figura 5.10: Variación de la rugosidad con el tiempo de crecimiento de los datos experimentales y de los datos corregidos de colonias preparadas según los procedimientos I (a) y II (b). Se observa el solapamiento entre los datos experimentales originales y los datos corregidos, para ambos procedimientos. Los datos corresponden al valor promediado de todos los experimentos realizados.

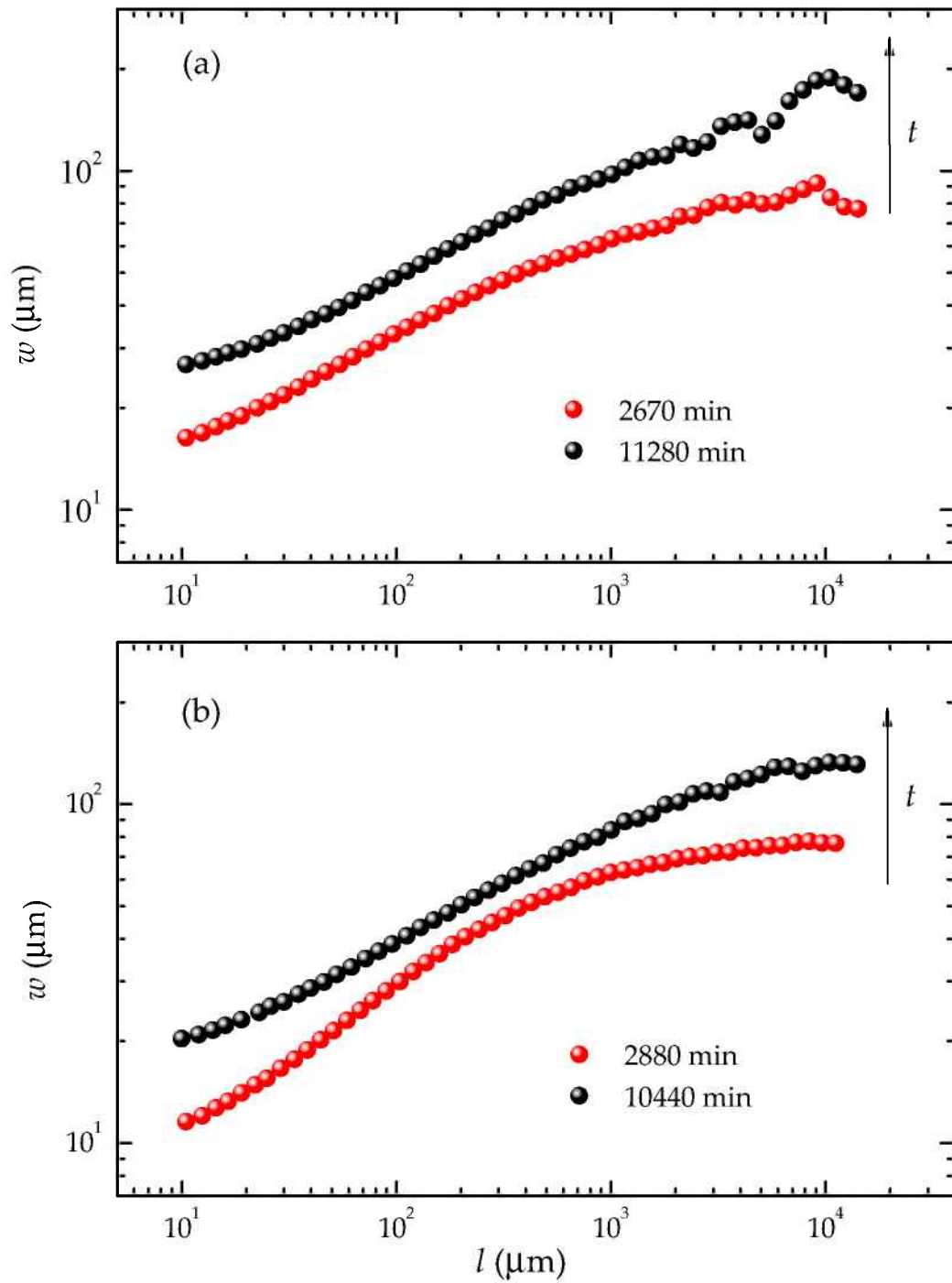


Figura 5.11: Curvas de rugosidad versus la fracción del frente según los procedimientos I (a) y II (b). La flecha indica el sentido de la evolución temporal.

rimentales y corregidos de la colonia se superponen y tienden al mismo valor. El corrimiento de esta longitud crítica con el tiempo puede ser adjudicado al incremento en la densidad de salientes a medida que la rugosidad aumenta con el tiempo.

Las curvas que resultan de los datos corregidos muestran un crecimiento lineal inicial, en el rango del tamaño del frente que va de 10 a 100  $\mu\text{m}$ , que aumenta con una pendiente de 0,85, independientemente del tiempo y del tipo de procedimiento experimental (Fig. 5.12). De acuerdo con la ecuación 2.9 esta pendiente correspondería a un exponente de rugosidad  $\alpha$ . Este exponente de rugosidad, relacionado con  $l < l_c$ , podría asociarse a las deformaciones celulares, que se espera que fluctúen a frecuencias más altas, con ciclos de duración menor que el ciclo celular.

Para valores de  $l > l_c$ , es decir para frentes del orden del dominio de la colonia y no de la membrana celular, el gráfico muestra una curva suave que tiende a un valor límite de rugosidad. Esta tendencia confirma que la rugosidad del frente de crecimiento de la colonia no alcanza la saturación durante el tiempo de la experiencia. Sin embargo, para frentes de tamaños que van de 150 a 1100  $\mu\text{m}$ , la curva tiende a presentar una pendiente muy próxima a 0.5 a medida que el tiempo avanza, independientemente del procedimiento experimental empleado (Fig. 5.12).

El solapamiento de las curvas de rugosidad para diferentes tamaños del frente permiten entonces concluir que es posible aplicar correctamente la técnica de escalado dinámico a los perfiles de colonias de frentes lineales dentro del rango del dominio de la colonia ( $l > 100 \mu\text{m}$ ).

Para confirmar este valor del exponente de rugosidad, se lo evaluó complementariamente a partir del factor de estructura puesto que, de acuerdo a las ecuaciones 2.22 y 2.24, de la dependencia del factor de estructura  $S$  con la frecuencia se obtiene el exponente de rugosidad  $\alpha$ .

Los gráficos logarítmicos del factor de estructura para los perfiles corregidos de diferentes colonias resultan bastante ruidosos, como es habitual encontrar en gráficos de este tipo [30]. Sin embargo, se observa claramente que el factor de estructura en el rango de frecuencias que va de 0.02 a 1 decrece con una pendiente cercana a  $-2$ , correspondiente a un valor de  $\alpha = 0,50 \pm 0,05$ , independientemente del tiempo y del procedimiento experimental (Fig. 5.13).

A pesar del ruido propio del sistema, se puede observar que no hay mayor desplazamiento del espectro como sería de esperar si existiese algún efecto de escalado anómalo [61].

Para corroborar la validez de los exponentes calculados se procedió a la normalización de los datos según las ecuaciones 2.12 y 2.22 y la figura 2.12. Como



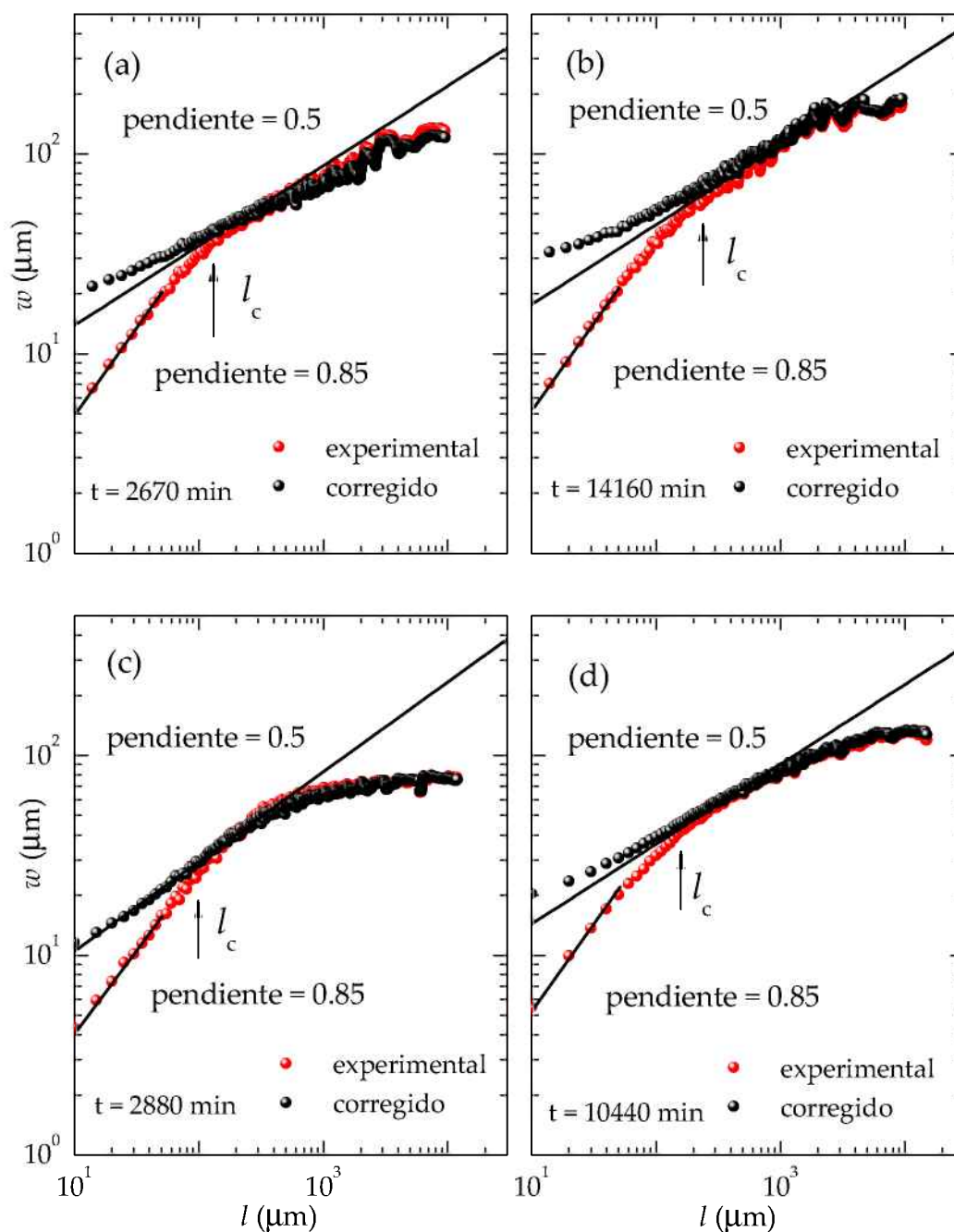


Figura 5.12: Comparación de las curvas de rugosidad en función del tamaño del frente. Datos experimentales (símbolos negros) y corregidos (símbolos rojos). Los datos corresponden a los procedimientos I [figuras (a) y (b)] y II [figuras (c) y (d)]. A cada tiempo se indica el valor de la longitud crítica,  $l_c$ . Se observa que para tamaños del frente mayores a la longitud crítica, los datos experimentales y los datos corregidos tienden a solaparse.

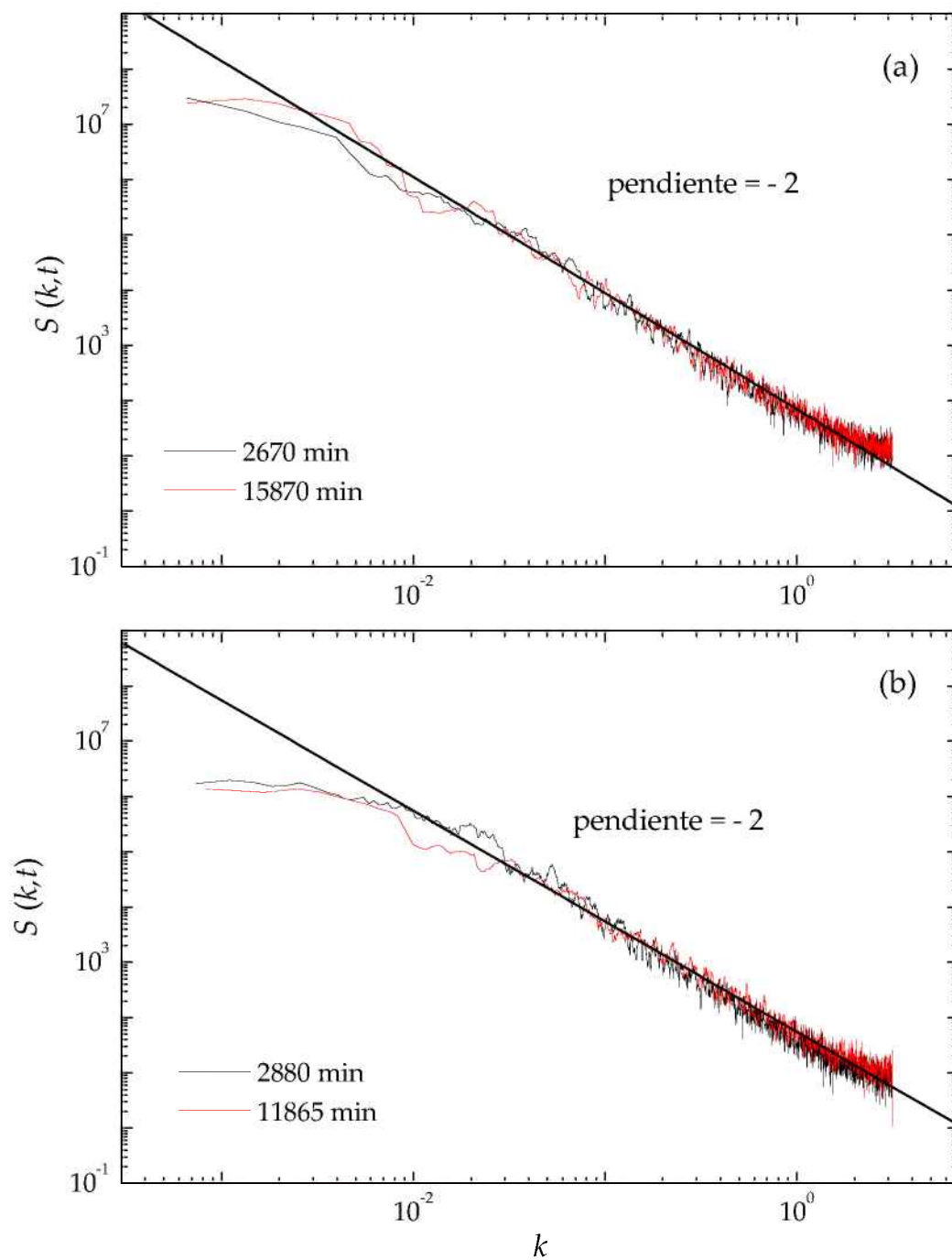


Figura 5.13: Variación del factor de estructura,  $S(k,t)$  con la frecuencia  $k$ , para frentes de colonias Vero formadas según los procedimientos I(a) y II (b). Para mayor claridad sólo se muestra el espectro de Fourier de algunas etapas de crecimiento de las colonias. Las líneas rectas presentan una pendiente de  $-2$  correspondiente a un valor de  $\alpha = 0,5$ .

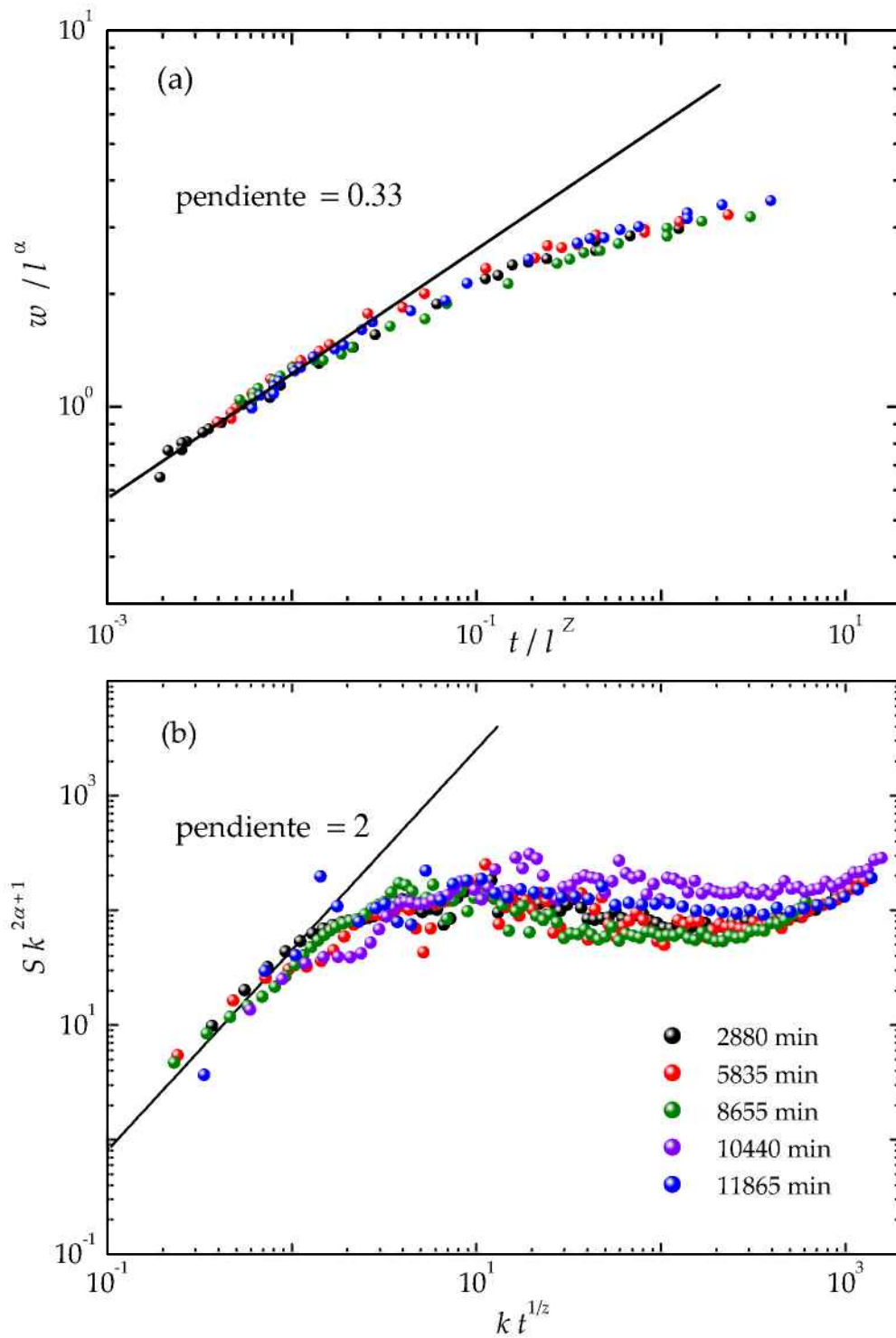


Figura 5.14: Colapsos de las curvas de rugosidad y de factor de estructura según las relaciones de escalado de Family-Vicsek, (ecuaciones 2.12 y 2.22), para  $\alpha = 0,5$  y  $\beta = 0,33$ . Los valores del tiempo de crecimiento de la colonia se indican en (b).



Figura 5.15: Imágenes de colonias de tipo I a etapas tempranas de crecimiento. Para una mejor visualización de las células, las colonias fueron fijadas y coloreadas con May–Grünwald Giemsa.

se mencionó anteriormente, si las curvas colapsan luego de su normalización entonces el set de exponentes calculados a partir de los datos experimentales, corregidos y sin corregir (Figs. 5.10–5.13) satisface la relación de escalado de Family-Vicsek (Fig. 5.14). Estos resultados son consistentes con los valores de los exponentes predichos por el modelo no lineal continuo de crecimiento de superficies, perteneciente a la clase universal de Kadar, Parisi y Zhang (KPZ) que comprende un valor de  $\beta = 0,33$  y un valor de  $\alpha = 0,5$  [99].

## 5.2. Colonias con frente radial

### 5.2.1. Evolución morfológica de las colonias

Como se mencionó anteriormente, una diferencia importante entre los experimentos de colonias de frentes radiales y aquellos de colonias de frentes lineales consiste en que los primeros permiten estudiar la formación de las colonias desde su inicio (colonias de tipo I de menos de 100 células) mientras que los segundos sólo permiten estudiar la evolución de colonias grandes, como ocurre con las colonias radiales de tipo II (colonias formadas a partir de una semilla tridimensional). Es decir que las colonias circulares podrían utilizarse eventualmente como modelo de estudio de crecimiento de colonias durante períodos prolongados, comenzando por las colonias de tipo I y continuando con las de tipo II. Más adelante veremos que desde el punto de vista cinético, es posible evaluar a las experiencias de tipo II como continuación de las de tipo I.

Para el caso de las colonias de tipo I, creciendo a partir de unas pocas células ( $5 \leq n \leq 80$ ) se observa que adquieren formas irregulares, de geometría variable (Fig. 5.15). Sin embargo, a pesar de la forma aleatoria inicial,

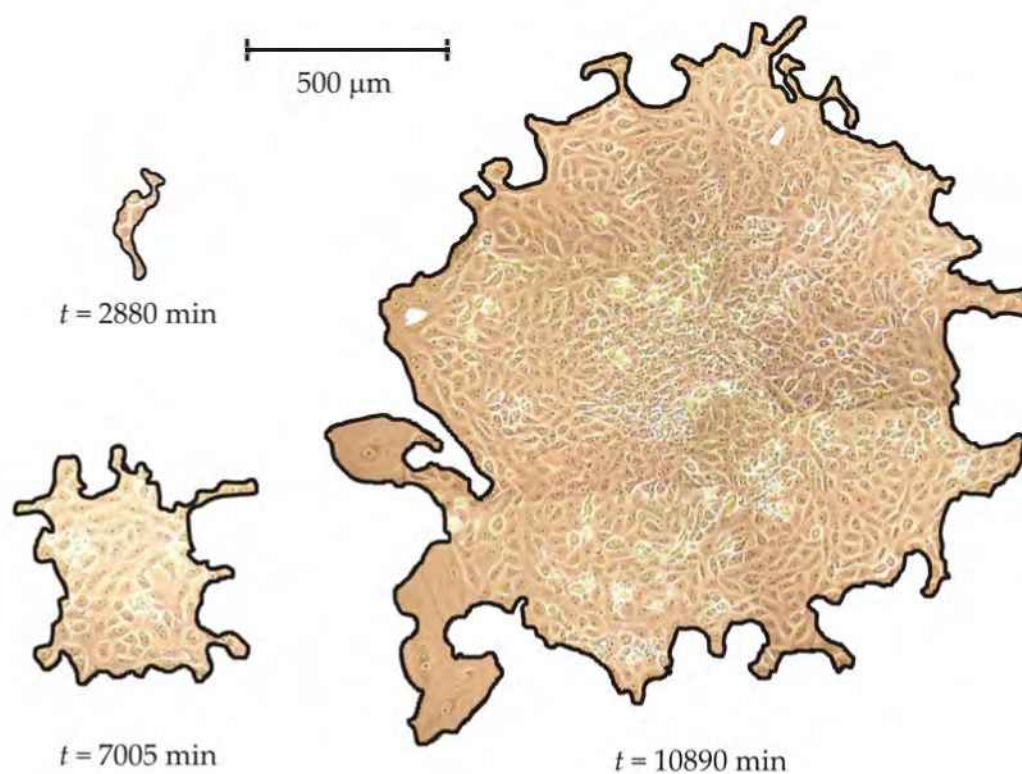


Figura 5.16: Evolución de una colonia de tipo I que comienza con un conjunto de 8 células agrupadas de forma casi lineal ( $t = 2880$  min) y se va convirtiendo en circular ( $t = 10890$  min). Los contornos de las colonias han sido trazados según el método descrito. Se indican los diferentes tiempos de evolución de la colonia.

una vez que la población alcanza alrededor de 250–300 células, las colonias van adquiriendo una geometría circular (Fig. 5.16). La evolución de la forma, de completamente irregular a circular, aparece como consecuencia de la duplicación aleatoria de las células, sin ninguna localización preferencial *a priori* de las células nuevas. La evolución de la forma de las colonias puede ser estudiada a través de la relación de radios, definida como el cociente entre el eje mayor y el eje menor de la menor elipse capaz de contener a la colonia. A medida que el tiempo transcurre el cociente de radios tiende a 1, aunque pueden observarse fluctuaciones en estos ajustes, debido a las ramificaciones temporales producidas por la duplicación celular aleatoria (Fig. 5.17). Por el

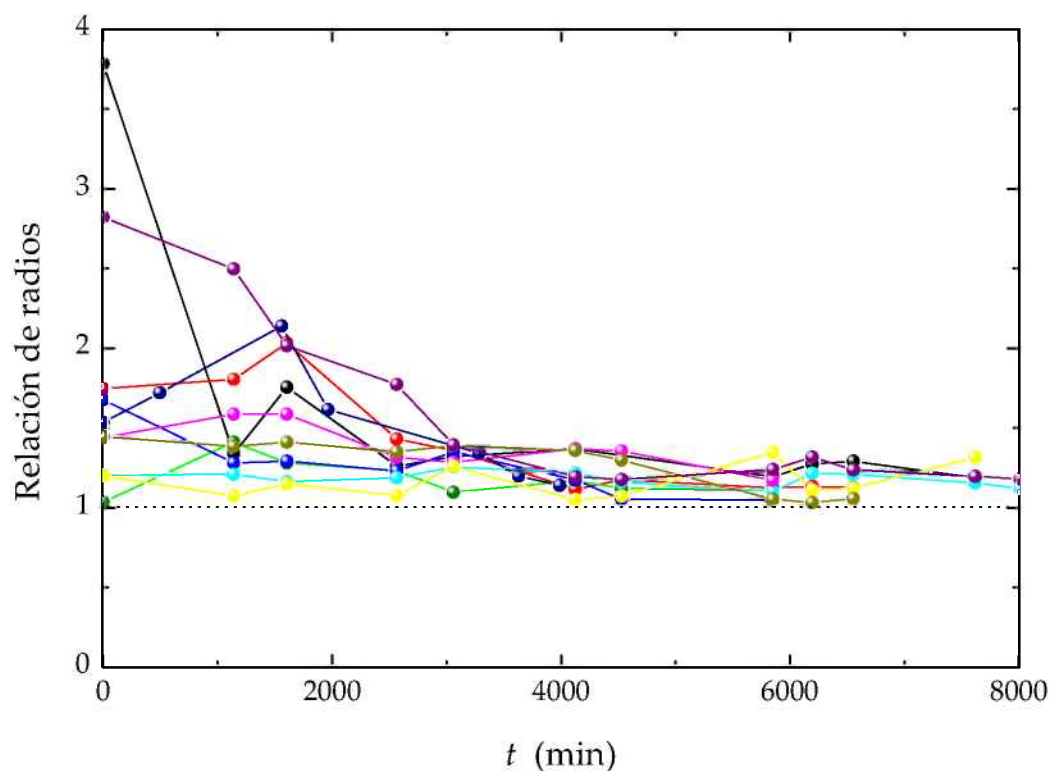


Figura 5.17: Evolución de la relación de radios de colonias de tipo I de diferentes tamaños iniciales. La línea punteada corresponde al cociente de radios de una circunferencia (caso límite).

contrario, las colonias de tipo II muestran una forma radial desde el principio, lo cual no es de extrañar ya que la semilla inicial de crecimiento es aproximadamente circular. En la figura 5.18 se muestra una colonia de tipo I a tiempos avanzados, con una incipiente formación central de un agregado tridimensional, y una colonia de tipo II, formada por un dominio bidimensional que crece alrededor la semilla tridimensional central.

En ambos casos, es decir para colonias de tipo I y de tipo II, se observa también que la morfología de las células exhibe prácticamente las mismas características que se describieron para el crecimiento de colonias lineales: a tiempos cortos las células presentan contornos suaves, tamaños bastante homogéneos que rondan los  $30 \mu\text{m}$  de diámetro, los límites celulares son claros indicando que no están superpuestas unas con otras [Fig. 5.19 (a)]. Con el paso del tiempo se va haciendo más notoria la diferencia en cuanto a la distribución

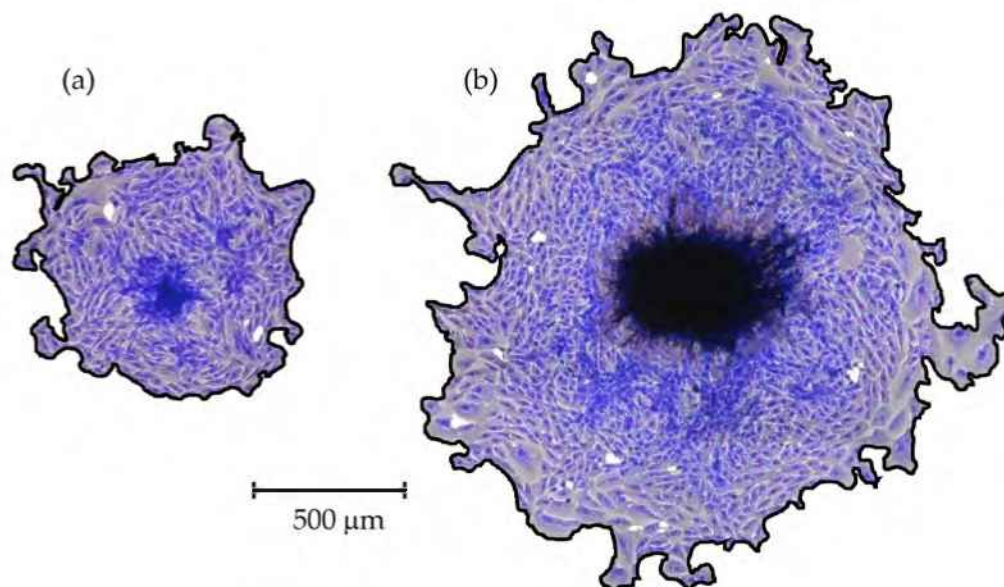


Figura 5.18: Imágenes de una colonia de tipo I (a) y de una de tipo II (b) fijadas y coloreadas. La Colonia de tipo I muestra la formación incipiente del agregado tridimensional como una región más oscura en el centro. La colonia tipo II muestra al agregado tridimensional central, rodeado por un anillo de crecimiento tridimensional más reciente, y un dominio bidimensional más externo y mucho más ancho. Los contornos de las colonias se han marcado en negro.

de tamaños y morfologías, según la ubicación que adopte la célula dentro de la colonia [Fig. 5.19 (b) y (c)]. En la periferia pueden observarse células gigantes, células multinucleadas, prolongaciones filopódicas muy largas, células estrelladas, etc, es decir que hay una gran variabilidad de formas y tamaños. Sin embargo, una diferencia notable es que las colonias de frentes radiales no tienden a formar complejos entramados entre células y filopodios en la interfaz, como sí lo hacen las colonias de frente lineal, tal vez debido a la creación de espacio a medida que la colonia se expande. Desde esta perspectiva, el análisis del perfil de estas colonias sólo se ve afectado cuando contactan con colonias vecinas.

Cuando se analiza el interior de las colonias, las células se muestran más pequeñas y mucho más comprimidas unas con otras, hasta que con el paso del tiempo comienza a formarse en el centro un dominio tridimensional (Fig. 5.18).

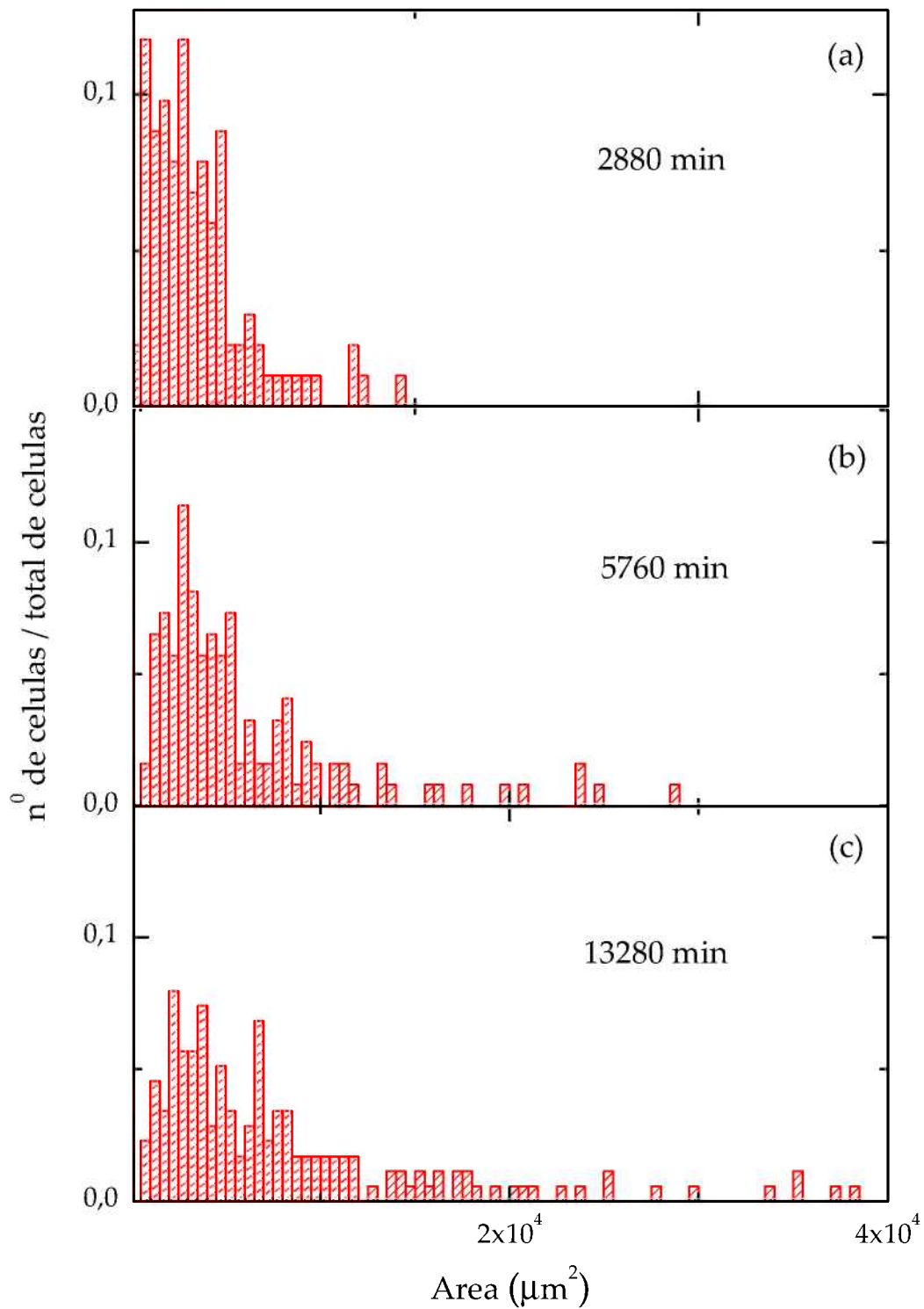


Figura 5.19: Histogramas que muestran la distribución de tamaños celulares en el borde de colonias de tipo II a diferentes tiempos. En el eje las ordenadas se muestra el valor normalizado del número de células por el total de células analizadas.



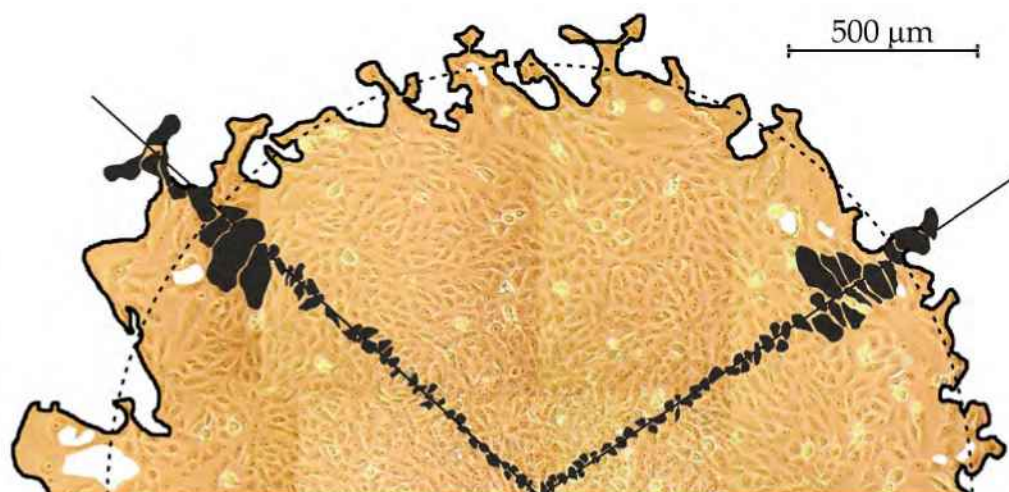


Figura 5.20: Imagen parcial de una colonia de tipo I en la que se observan diagramas binarizados de las células que se ubican a lo largo de diferentes radios de la misma.

Esta distribución heterogénea fue analizada a partir del trazado individual del contorno de células y su posterior binarización, a lo largo de diferentes radios de las colonias de tipo I (Fig. 5.20). La figura 5.21 muestra la distribución de tamaños promedio celulares para una colonia de tipo I, a lo largo del radio de la misma, medida a diferentes tiempos. Es importante remarcar que este tipo de análisis no se puede realizar sobre colonias de tipo II, así como tampoco sobre colonias de frentes lineales, debido a la existencia de dominios tridimensionales, desde etapas tempranas, que impiden el reconocimiento individual de las células.

### 5.2.2. Análisis de los frentes radiales de crecimiento.

Como se mencionó en la sección anterior, la aplicación del escalado dinámico implica necesariamente que la cinética de crecimiento responda a un movimiento uniforme en la dirección radial, es decir que la velocidad promedio de desplazamiento del radio sea constante. Por ello, se analizó también en este caso la cinética de expansión de los frentes radiales, encontrándose importantes diferencias respecto a la cinética de los frentes lineales de crecimiento.

En el caso de los frentes radiales de crecimiento la velocidad media de expansión de la colonia se puede definir como

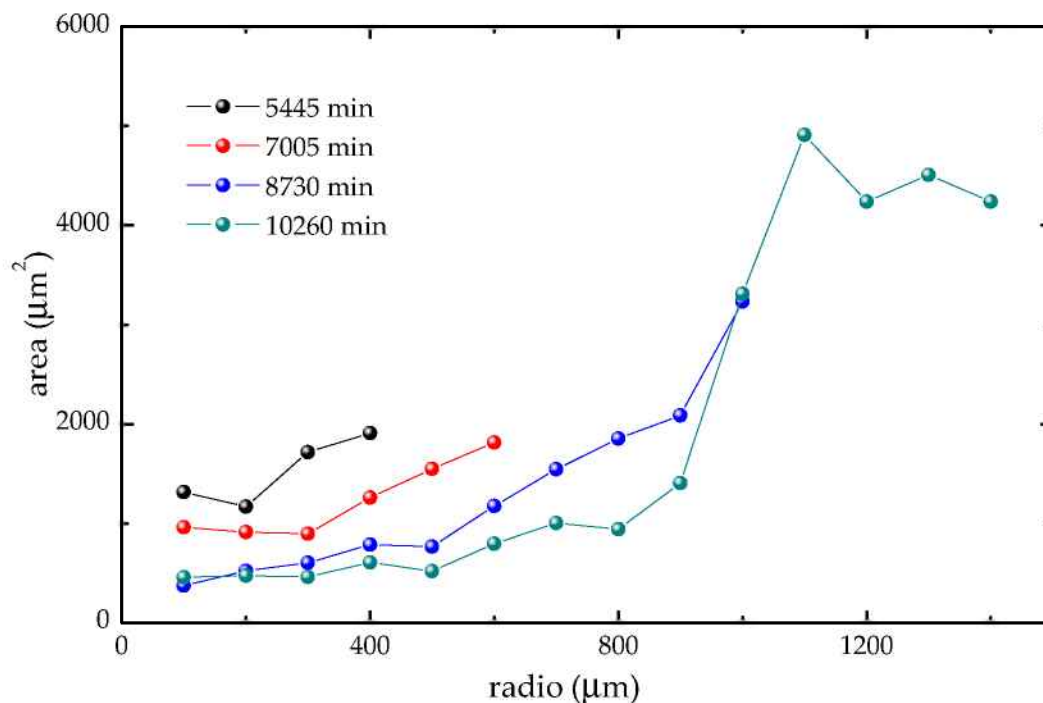


Figura 5.21: Variación del área celular a lo largo del radio, para una colonia de tipo I. Los valores fueron promediados de cuatro radios equidistantes, para cada tiempo. Se indican los tiempos de crecimiento.

$$\langle v \rangle = \frac{d\langle R \rangle}{dt} \quad (5.2)$$

donde  $\langle R \rangle$  es el radio promedio de la colonia (Fig. 5.22).

Al igual que las colonias de frentes lineales, las colonias de frentes radiales de tipo II exhiben un régimen de crecimiento lineal, avanzando a velocidad constante  $\langle v \rangle = (0,20 \pm 0,02) \mu\text{m min}^{-1}$  (Fig. 5.23). Para el cálculo de la velocidad de este grupo de colonias se utilizó la diferencia  $\langle R(t) \rangle - \langle R_0 \rangle$ , donde  $\langle R_0 \rangle$  es el radio inicial de cada agregado tridimensional inicial. Esta corrección no modifica el valor de la pendiente de las gráficas (velocidades calculadas), y facilita su apreciación gráfica y el cálculo estadístico del promedio entre las diferentes experiencias, como se observa en la figura 5.23.

Por otra parte, el radio de las colonias tipo I presenta un crecimiento de tipo exponencial, para  $t < 9000$  min, con una pendiente promedio de  $(1,02 \pm 0,02 \times 10^{-4}) \text{ min}^{-1}$ .

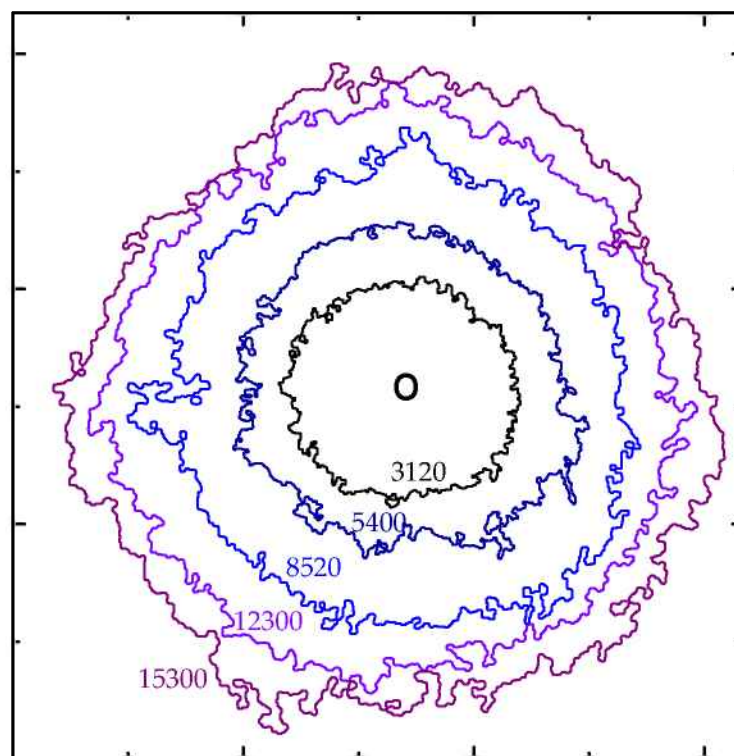


Figura 5.22: Contornos del frente de crecimiento de una colonia de células Vero, preparada según el procedimiento II. Los números indican el tiempo transcurrido en minutos desde la siembra.

Este comportamiento puede expresarse mediante la siguiente ecuación:

$$R = R_0 e^{tk_R} \quad (5.3)$$

donde  $k_R$  es una constante que tiene el valor de la pendiente calculada.

Sin embargo, a tiempos mayores,  $t > 9000$  min, el crecimiento del radio se desvía del comportamiento exponencial, indicando un cambio de régimen de crecimiento (Fig. 5.24).

Con el fin de comprender el cambio en la cinética de desplazamiento de los frentes de las colonias de tipo I se procedió a estudiar la cinética poblacional de las mismas. El seguimiento del crecimiento poblacional de las colonias fue realizado por conteo manual del número de células a diferentes tiempos. Para el caso de las colonias de tipo II y las colonias con frentes lineales de crecimiento esto resulta imposible debido a la presencia de crecimientos tridimensionales.

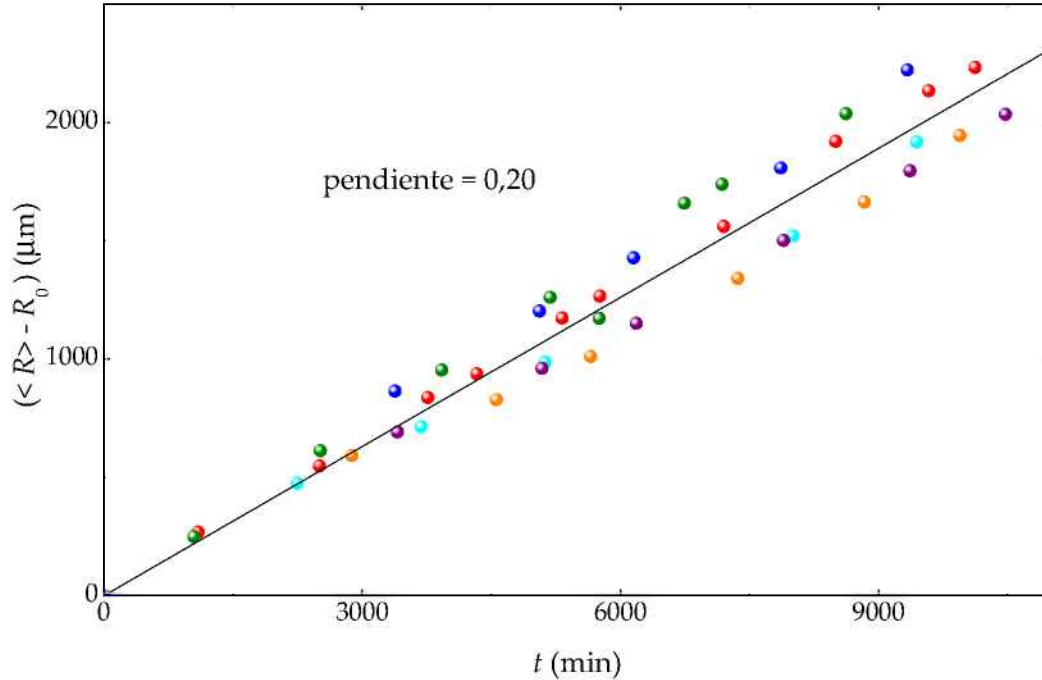


Figura 5.23: Variación del radio de las colonias de tipo II con el tiempo de crecimiento. Para el cálculo de la velocidad  $\langle v \rangle$  se normalizaron los valores del radio de cada colonia, restando el valor del radio al tiempo cero (tamaño de la semilla inicial tridimensional) para una mejor visualización del gráfico.

Para el caso de las colonias de tipo I, el número instantáneo de células  $n(t)$  aumenta exponencialmente con el tiempo. Esto se pone de manifiesto en la figura 5.25, en la que se muestra el gráfico del número normalizado de células, según la cantidad inicial de células que conforman cada colonia,  $n(t)/n_0$ , versus el tiempo. Esta normalización facilita la expresión de los datos en un único gráfico y el cálculo del promedio de los valores. El valor de la pendiente promedio es de  $2,2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  corresponde al valor de la constante poblacional  $k_n$ .

De este modo, el crecimiento logarítmico del incremento poblacional como función del tiempo puede expresarse como

$$n(t) = n_0 e^{tk_n} \quad (5.4)$$

En este caso  $k_n$  es la constante poblacional de primer orden que se relaciona inversamente con  $\tau$ , el tiempo promedio de duplicación celular. Si se pasa  $k_n$

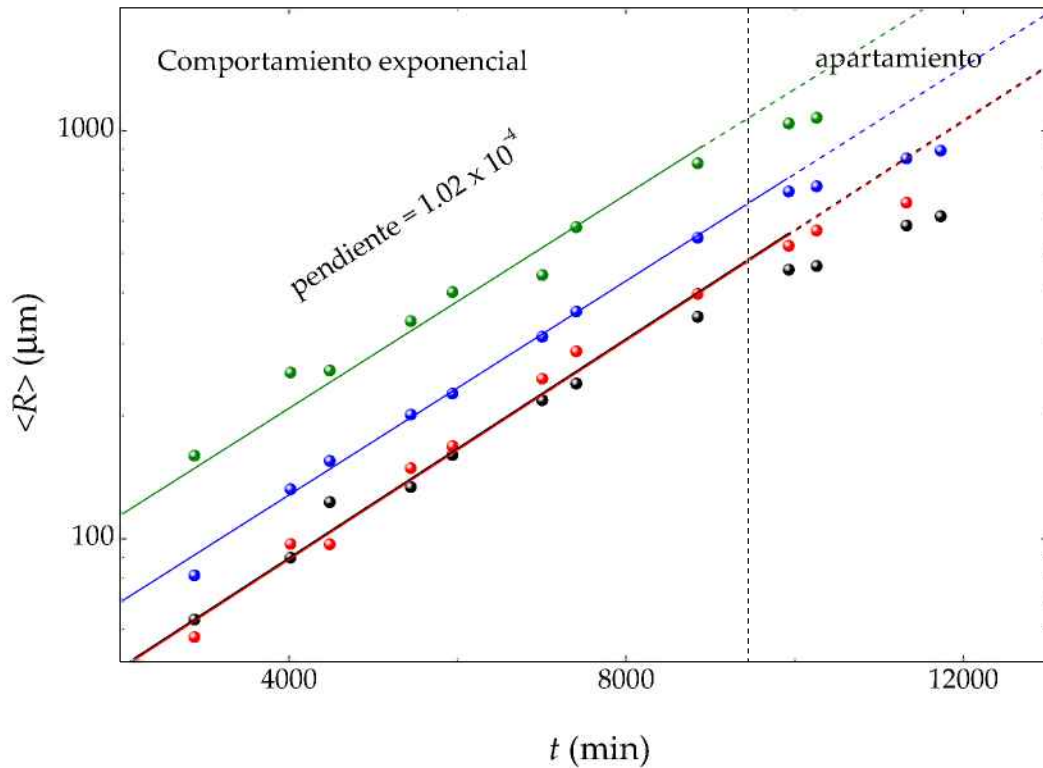


Figura 5.24: Variación del radio de diferentes colonias de tipo I con el tiempo. Se observa que para  $t > 9000$  min los datos se apartan del comportamiento exponencial.

de base decimal a base neperiana, se obtiene un valor de  $\tau$

$$\tau = \frac{1}{k_n} = [\ln 10 \times (2,2 \pm 0,3) \times 10^{-4}]^{-1} = [(5,1 \pm 0,7) \times 10^{-4}]^{-1} \quad (5.5)$$

De este modo se obtiene un promedio de duración del ciclo celular de  $\tau = 2000$  min aproximadamente, que se encuentra dentro de los valores reportados por otros autores para esta línea celular [98]. Es decir que aparentemente la cinética poblacional no se modifica y continúa siendo exponencial, en el intervalo de tiempo de estos experimentos.

Una forma de estudiar el cambio en el régimen de desplazamiento del frente de crecimiento es suponer que las células tienen forma circular, de radio  $r_c$ . Si además aproximamos la geometría de la colonia a la de un círculo de radio  $R$ ,

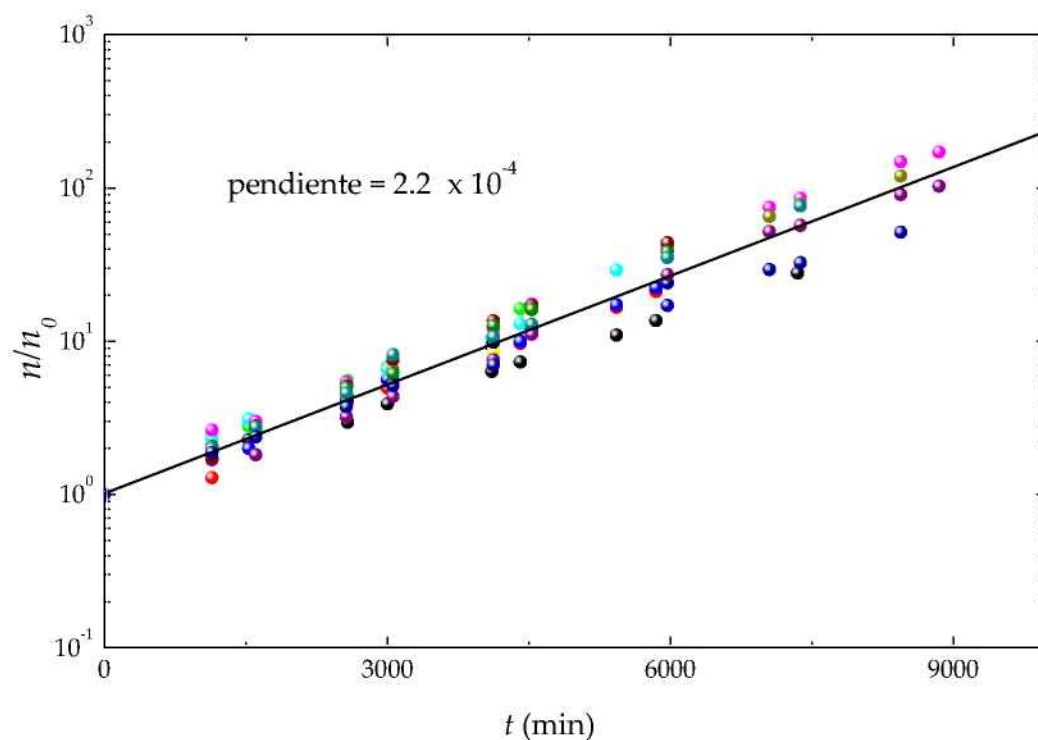


Figura 5.25: Crecimiento del número de células con el tiempo, para las colonias de tipo I. Los datos se encuentran normalizados respecto del número inicial de células en la colonia ( $n_0$ ). Dado que el número de células se encuentra en una escala logarítmica, la regresión lineal implica un comportamiento de tipo exponencial.

entonces puede relacionarse el área de la colonia ( $A = \pi R^2$ ) con el número de células de la misma ( $A = n\pi r_c^2$ ), resultando finalmente

$$\left(\frac{R}{r_c}\right)^2 = n \Rightarrow R \propto n^{1/2} \quad (5.6)$$

La ecuación 5.6 predice una relación lineal entre  $R$  y  $n^{1/2}$  que se observa desde  $n \rightarrow 0$ , es decir desde el tiempo de inicio del crecimiento, hasta un valor de  $n$  de aproximadamente 700 células (Fig. 5.26).

Para  $n > 1000$  células, los datos experimentales muestran un comportamiento que se desvía del predicho por la ecuación 5.6 y la cinética de crecimiento de los frentes radiales cambia de un régimen exponencial a uno lineal (Fig. 5.24). Una explicación posible para el cambio de régimen de desplaza-

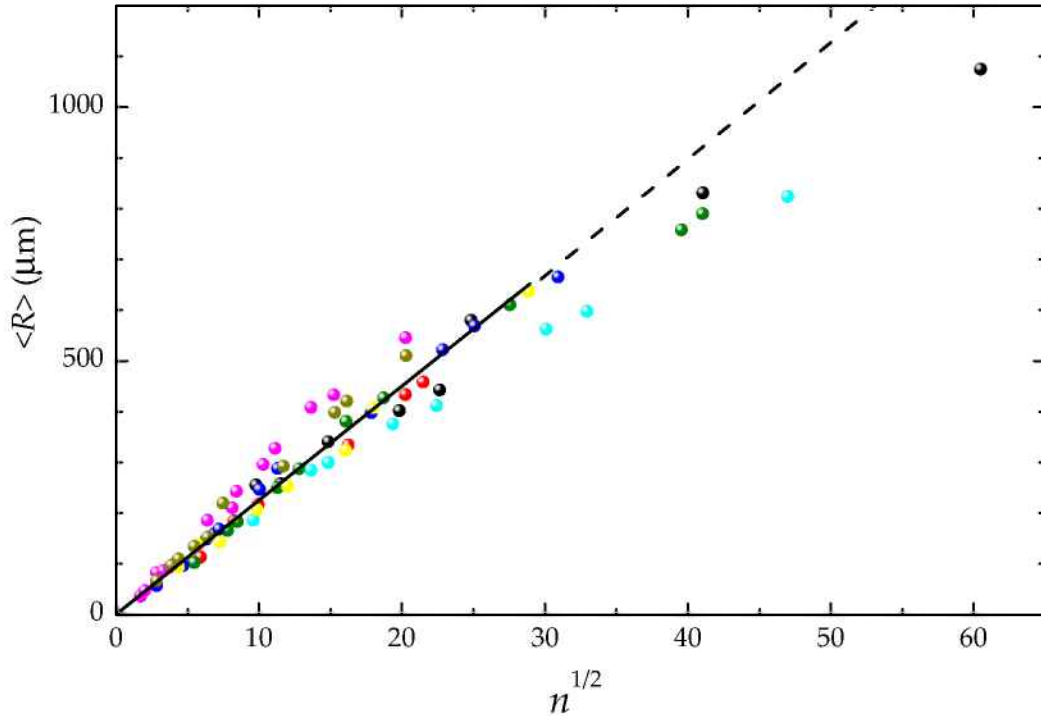


Figura 5.26: Variación del radio medio con la raíz cuadrada del número de células en la colonia. Se puede observar el desvío de la relación lineal cuando  $n$  supera las 900 células.

miento de los frentes, sin un cambio en la cinética poblacional, podría ser el incremento en la compactación de la colonia causada por la duplicación celular en el seno de la misma, sin el incremento de espacio correspondiente. Como se mencionó anteriormente, este hecho lleva al aumento de la densidad celular en el seno de la colonia, con la correspondiente disminución del radio celular promedio, y eventualmente a la formación de agregados tridimensionales, rasgos que se observan casi desde un principio en los otros sistemas experimentales (colonias con frente radial de tipo II y con frente lineal).

Para confirmar el crecimiento poblacional en el centro de la colonia, se realizaron marcaciones celulares del el antígeno nuclear PCNA. Los resultados muestran una distribución homogénea de células en división en toda la distribución espacial de la colonia (Fig. 5.27). Esto descartaría la inhibición, al menos completa, de la división celular por contacto y sería coherente con la formación de agregados tridimensionales espontáneos, como se describió ante-

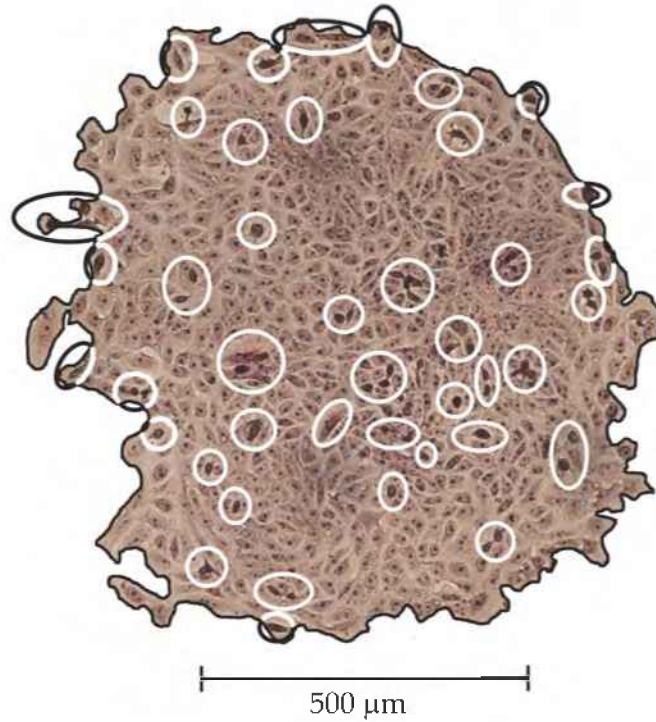


Figura 5.27: Marcación celular del antígeno nuclear PCNA. En blanco se encuentran demarcadas algunas de las células que dieron positivas, indicando que se encuentran en división. Obsérvese que la distribución de células marcadas es aproximadamente homogénea, mostrando que la división celular ocurre tanto en el interior como en la periferia de la colonia.

riormente.

Si se combinan las ecuaciones 5.4 y 5.6 se obtiene una ley exponencial

$$R = \sqrt{n_0} r_c e^{t/2k_n} \quad (5.7)$$

Tomando como radio promedio celular  $\langle r_c \rangle \sim 15 \mu\text{m}$ , la pendiente  $k_n/2$  (Fig. 5.28), está en perfecto acuerdo con los resultados obtenidos en la figura 5.24 ( $k_R = k_n/2$ ).

Del análisis anterior se desprende que las colonias radiales exhiben dos regímenes de crecimiento que dependen del tamaño de la población. Para las colonias de tipo I se encuentra que mientras más bajo es el valor de  $n$ ,



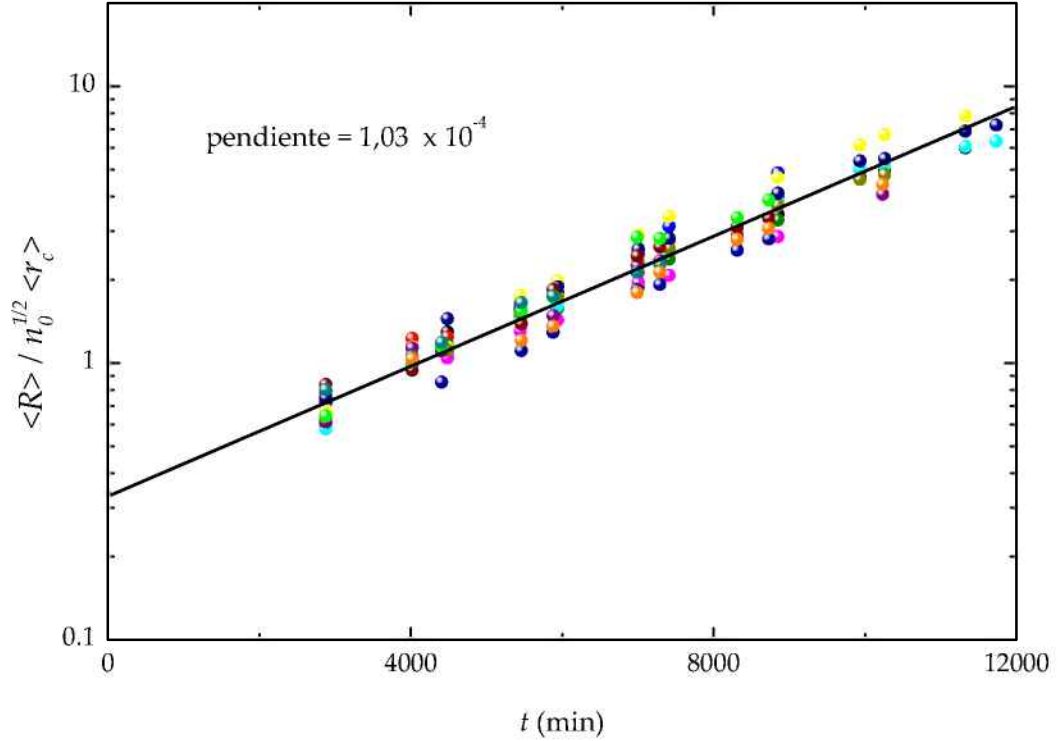


Figura 5.28: Gráfico de la ecuación 5.7, considerando un radio celular promedio  $r_c = 15 \mu\text{m}$ , y una población inicial  $n_0$  entre 5 y 90 células. Los símbolos corresponden a diferentes colonias de tipo I.

más tiempo permanece la colonia creciendo bajo un régimen exponencial. El régimen de crecimiento a velocidad constante se alcanzaría recién cuando  $n$  supera las 700–1000 células, situación que comparten las etapas finales de las colonias de tipo I con las colonias de tipo II.

En la figura 5.29 se combinan tres experiencias radiales diferentes: una colonia tipo I que parte de 8 células, una segunda colonia de tipo I, que presenta 48 células inicialmente y una colonia de tipo II. Los datos fueron desplazados en el eje del tiempo hasta hacer coincidir los tamaños de las colonias, como si se trata de un único experimento muy largo.

Resulta interesante comparar los datos experimentales con el modelo propuesto por Drasdo [93], según el cual el retardo en la velocidad de avance del frente de crecimiento puede cuantificarse, considerando que la colonia se puede dividir en dos regiones: una central, de radio instantáneo  $r_2$ , y un anillo exterior de ancho constante  $\Delta R = \langle R \rangle - r_2$ , siendo  $\langle R \rangle$  el radio medio ins-

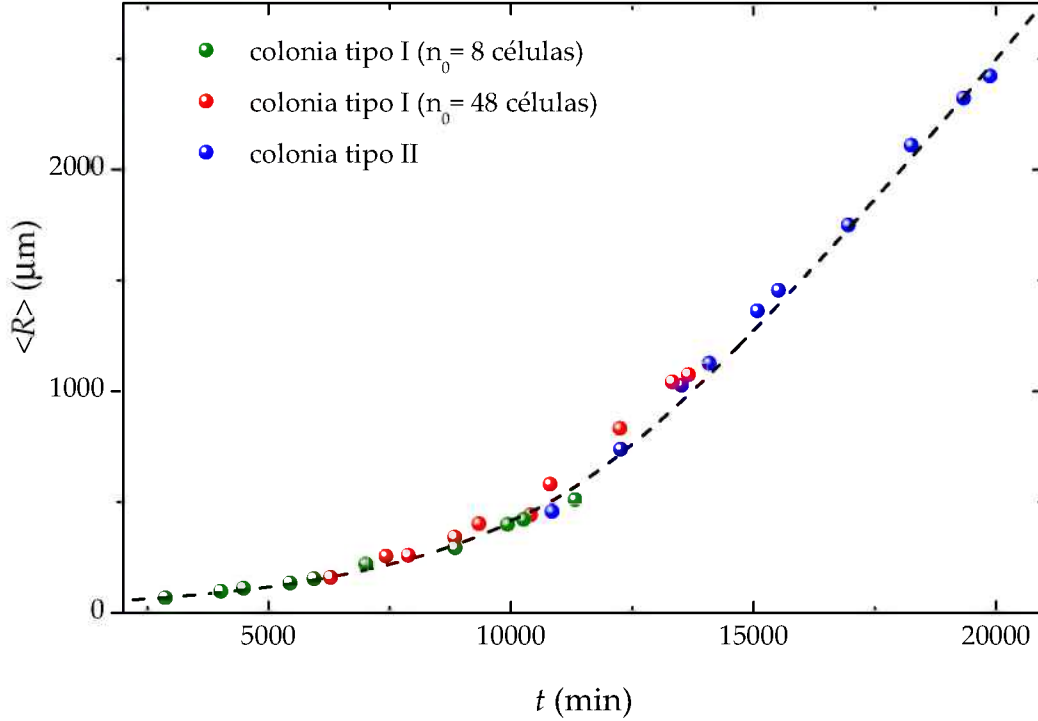


Figura 5.29: Variación del radio medio con el tiempo para tres tipos de colonias Vero: una colonia tipo I con  $n_0 = 8$  células, una colonia de tipo I con  $n_0 = 48$  células y una colonia de tipo II. Los datos experimentales fueron desplazados en el eje del tiempo hasta hacerlos coincidir por el valor del radio. La línea punteada corresponde a la ecuación 5.8, considerando  $r_c = 15 \mu\text{m}$ ,  $n_0 = 8$ ,  $\Delta R = 330 \mu\text{m}$  y  $\tau = 2000$  min.

tantáneo de la colonia. Así, para tiempos por debajo de un valor crítico  $t_c$ , y para pequeñas poblaciones celulares, no se observaría un efecto de retardo y el radio de la colonia crecería exponencialmente con el tiempo. Por el contrario, cuando  $t > t_c$ , aparecería el efecto de retardo. La resolución de las ecuaciones cinética conduce finalmente a:

$$R(t) = \begin{cases} R_0 e^{(t/2\tau)} & t \leq t_c \\ \frac{\pi^{1/2} \Delta R}{2} \left[ 1 + W \left( \frac{r_c^4 n_0^2}{\pi^2 \Delta R^4} e^{(1+2t/\tau)} \right) \right] & t > t_c \end{cases} \quad (5.8)$$

donde  $W(x)$  es la denominada función de Lambert y  $t_c = \tau \ln(\Delta R^2 / r_c^2 n_0)$  [93]. Entonces, como  $\Delta R$  alcanza un valor constante, se obtiene la relación lineal entre  $R$  y  $t$ .

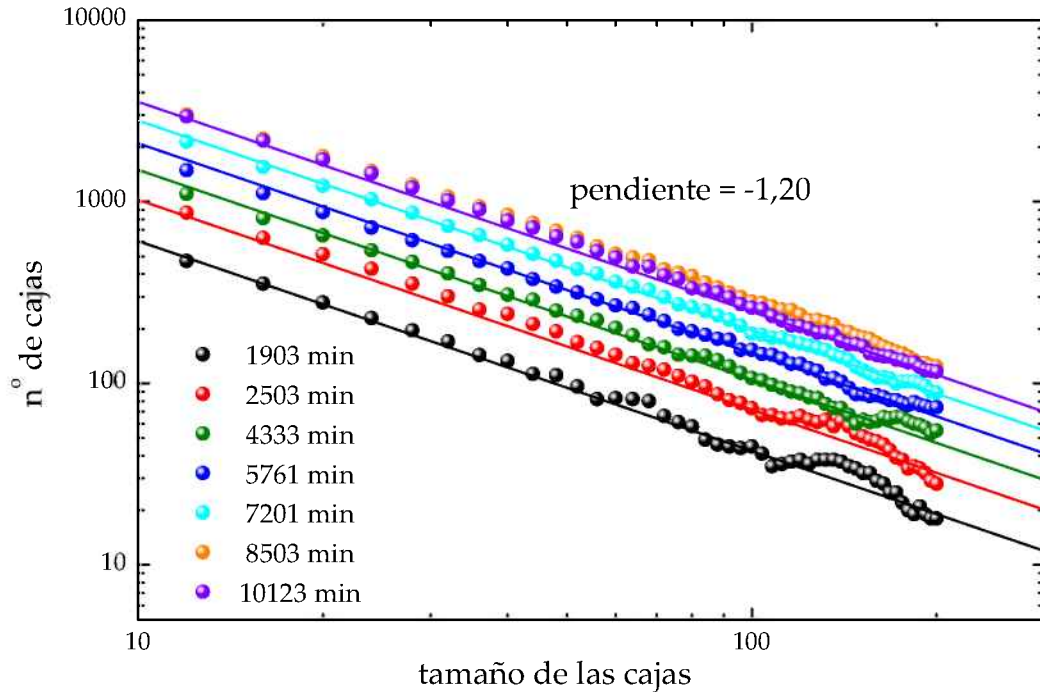


Figura 5.30: Dimensión fractal de una colonia de frente radial a distintos tiempos de crecimiento, calculada según el método del conteo de cajas.

El ajuste de los datos experimentales, considerando  $r_c = 15 \mu\text{m}$ ,  $n_0 = 8$ ,  $\Delta R = 330 \mu\text{m}$  y  $\tau = 2000 \text{ min}$ , de acuerdo a la ecuación 5.8, se muestra en la figura 5.29. Como se puede observar, existe un excelente acuerdo entre el modelo teórico propuesto y los datos experimentales.

El análisis de la dimensión fractal se realizó sobre colonias de más de 700–1000 células, dado que cumplen con las dos condiciones de tener una morfología aproximadamente circular, y una velocidad de desplazamiento del frente constante. El cálculo se realizó en base a los mismos criterios que se aplicaron para las colonias con frentes lineales, es decir teniendo en cuenta los valores de rugosidad para la selección del rango de tamaños de cajas. Así, se obtuvieron valores coincidentes dentro de los errores experimentales, independientemente del tiempo y del tipo de colonia analizada, alcanzándose un valor de  $d_f = 1,20 \pm 0,05$  (Fig. 5.30). Puede observarse que a diferencia de las colonias creciendo como sistemas de tamaño constante, aparecen rectas paralelas que se desplazan hacia un mayor número inicial de cajas. Esto se debe a que el tamaño de la colonia cambia con el tiempo, o sea que para un tamaño

fijo de caja, la proporción que representa del tamaño del sistema cambia, y con ello el número de cajas necesarias para cubrir la longitud completa del frente. Sin embargo, el valor de la pendiente permanece invariante.

El análisis de escalado dinámico de los frentes radiales de crecimiento, se realizó sobre colonias con velocidad constante de desplazamiento tanto de tipo I como de tipo II, transformando las coordenadas de ángulo-radio a arco-radio (ver Fig. 4.6).

El análisis del crecimiento de la rugosidad con el tiempo muestra la existencia de una relación lineal del logaritmo de  $w$  con el logaritmo de  $t$ , con una pendiente promedio de  $0,33 \pm 0,04$  (Fig. 5.31). El valor de esta pendiente cubre una década del logaritmo del tiempo para las colonias de tipo II, y un rango más corto para las colonias de tipo I ya que la evaluación sólo se puede realizar cuando las colonias se encuentran bajo régimen de velocidad constante. Esta pendiente corresponde al valor del exponente de crecimiento  $\beta$  y coincide para ambas colonias con el valor obtenido para las colonias con frente lineal de crecimiento.

Por otra parte el gráfico de la rugosidad versus el tamaño del frente muestra curvas de tipo sigmoideal, tal cual se encontró para las colonias con frente lineal de crecimiento (Fig. 5.32). Hay que destacar que la longitud de los frentes es variable, dado que el perímetro de la colonia cambia con el tiempo. Esto queda de manifiesto en la figura 5.32 en la que se puede observar que dada una misma colonia, la curva de rugosidad es más corta a tiempos iniciales que a tiempos finales, mientras que este efecto no se observaba en la figura 5.11 de los frentes lineales.

El análisis de los perfiles corregidos por sus salientes laterales (perfiles monovaluados) tampoco muestra influencia alguna sobre los gráficos de rugosidad con el tiempo (Fig. 5.31). Por otra parte, las curvas correspondientes de rugosidad versus el tamaño del frente muestran una porción inicial aproximadamente lineal con una pendiente de 0,85 que se extiende en el rango de  $s$  de 10 a 100  $\mu\text{m}$ , que se corresponde con el dominio de la membrana celular y no de la colonia. Tal y como fue descrito para los frentes lineales de crecimiento esta pendiente correspondería a un exponente de rugosidad  $\alpha'$ . Para valores de  $s > 100 \mu\text{m}$  este ajuste muestra una pendiente de 0,5 que se extiende por alrededor de una década antes de que la rugosidad local alcance la saturación, tal y como se espera para un sistema que no muestra saturación global (Fig. 5.33). Este valor, tal cual lo dicho anteriormente, corresponde al exponente de rugosidad  $\alpha$  para el dominio de la colonia. Se observa que los datos experimentales y los datos monovaluados colapsan en una misma curva para longitudes de arco superiores al valor crítico  $s_c$ , que es del orden de 3

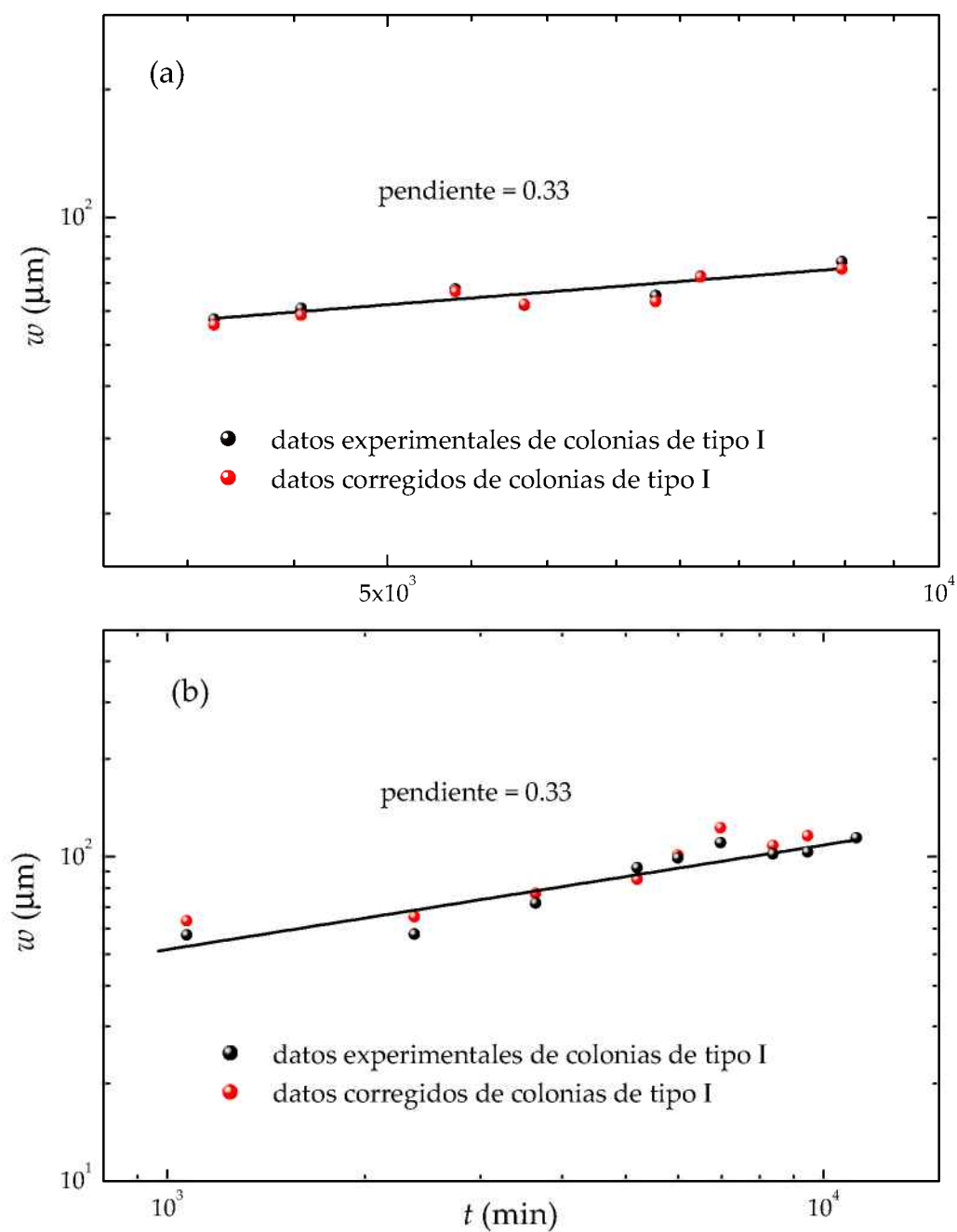


Figura 5.31: Variación de rugosidad del frente con el tiempo para colonias de tipo I (a) y de tipo II(b). Los valores corresponden a promedios de los datos de rugosidad de las colonias.

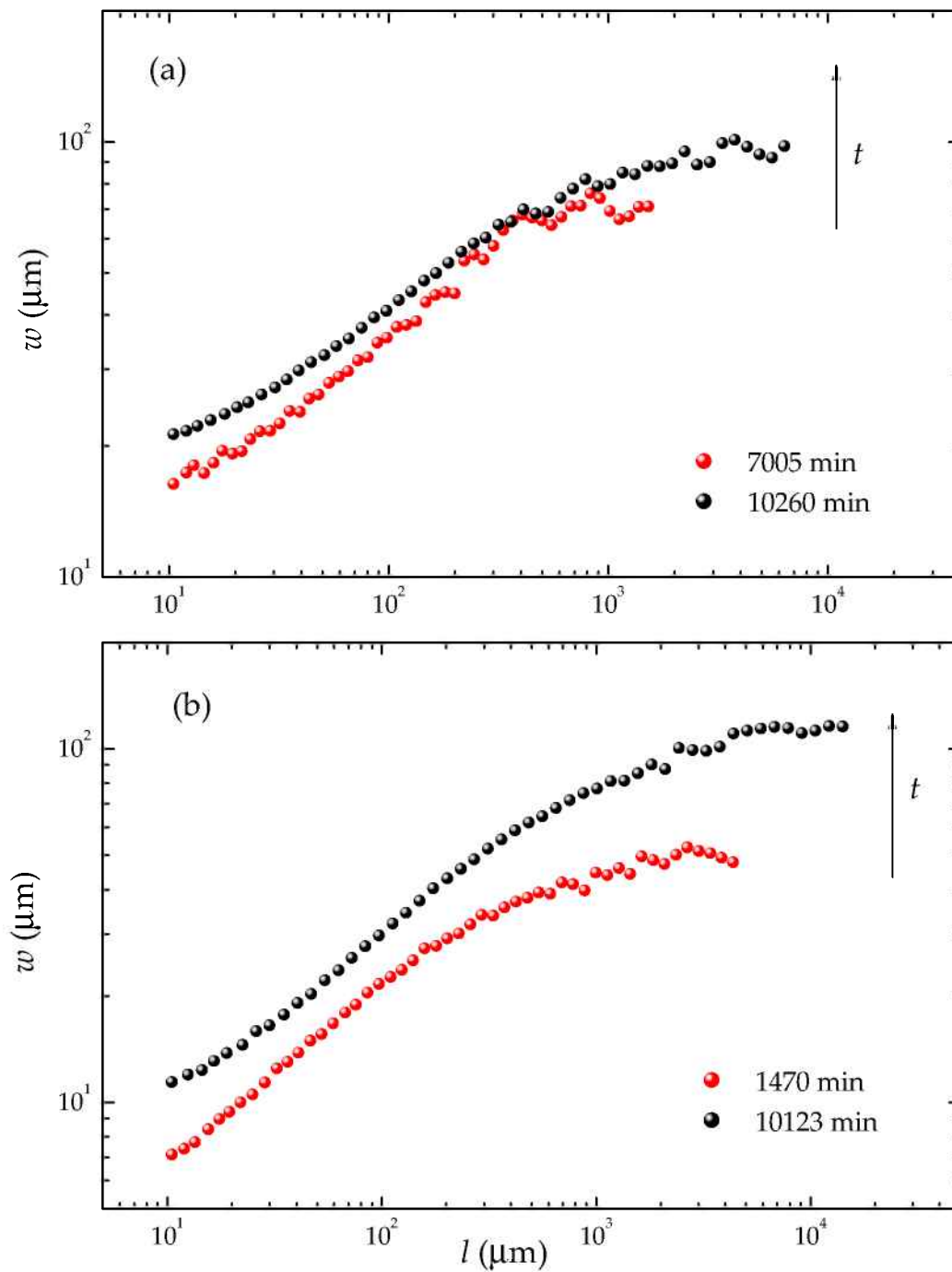


Figura 5.32: Variación de la rugosidad de los frentes con la longitud de arco, de colonias de tipo I (a) y de tipo II (b). La flecha indica el sentido de la evolución temporal.

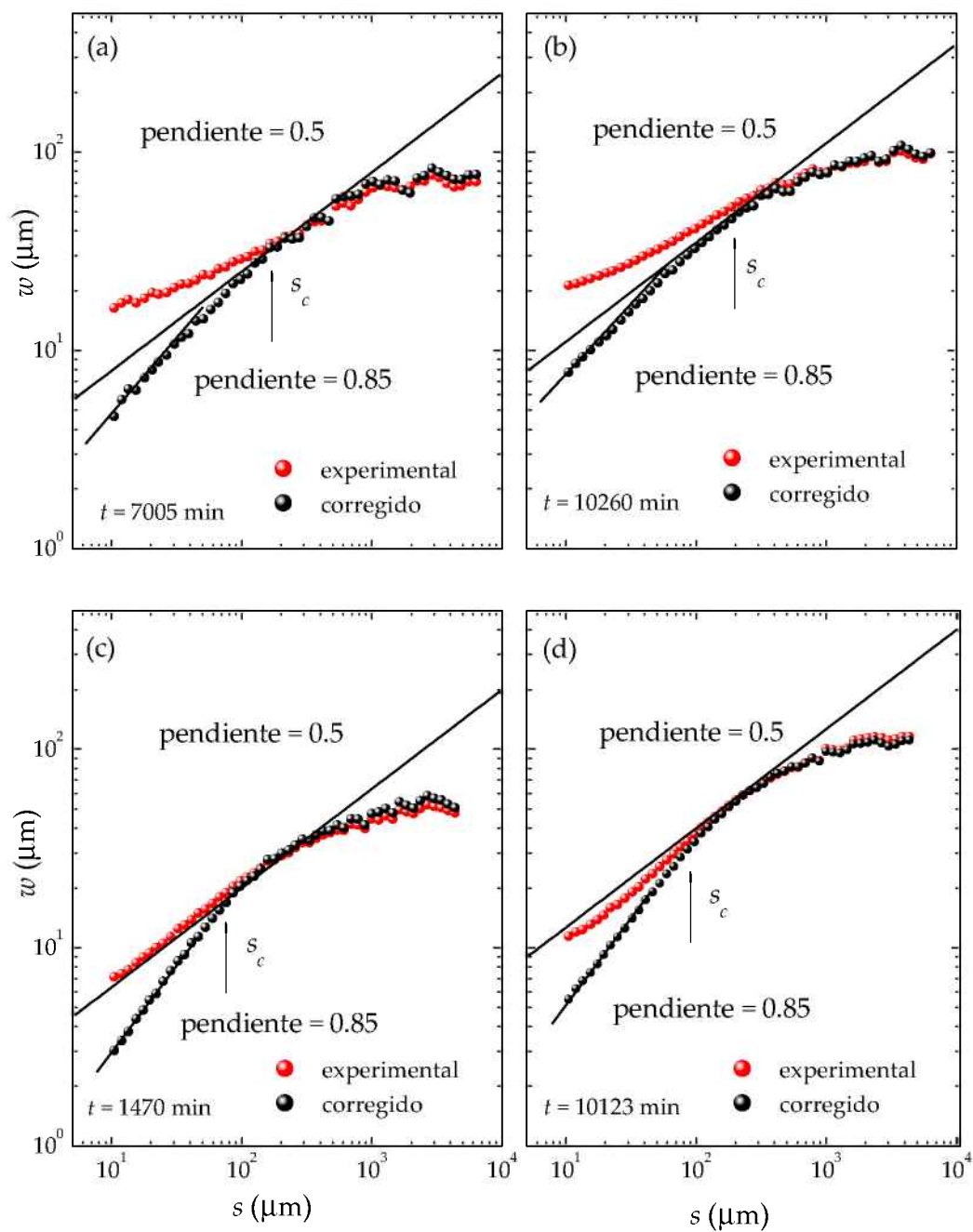


Figura 5.33: Variación de la rugosidad con la longitud de arco. Los datos corresponden a colonias de tipo I [Figuras (a) y (b)] y a colonias de tipo II [Figuras (c) y (d)], para diferentes tiempos de crecimiento.

células de diámetro promedio. El valor de  $s_c$ , al igual que el valor crítico de los sistemas lineales ( $l_c$ ), se incrementa con el tiempo, determinando el arco de la colonia a partir del cual la dinámica se vuelve prácticamente insensible a la presencia de salientes laterales. Sin embargo, la influencia de las salientes sobre el crecimiento radial parece ser menor que la que se observa para el crecimiento lineal, probablemente debido al incremento del espacio libre generado por la propia expansión radial. Por otra parte, las colonias de tipo II muestran una influencia menor de las salientes comparadas con las colonias radiales de tipo I (Fig. 5.33).

Los gráficos del factor de estructura de las colonias tipo I, en los rangos de tiempo en que se desplazan a velocidad constante, y de las colonias de tipo II, muestran que en la zona intermedia se aproximan a un crecimiento lineal con una pendiente cercana a  $-2,0$  (Fig. 5.34), acorde con un valor de  $\alpha = 0,50 \pm 0,05$ , independientemente de tiempo. Al igual que para el caso de los frentes lineales, con los exponentes críticos obtenidos ( $\alpha = 0,5$ ;  $\beta = 0,33$ ) se normalizaron las curvas de escalado, para evaluar el cumplimiento de la relación de escalado de Family-Vicsek (ecuaciones 2.12 y 2.22). Los resultados muestran un colapso relativamente bueno (Fig. 5.35), teniendo cuenta que, a diferencia de los frentes lineales de crecimiento, aquellos que crecen radialmente comienzan a partir de agregados de diferente tamaño, hecho que limita fuertemente la estadística de los datos experimentales.

### 5.3. Síntesis

La morfología que exhiben las células Vero muestra una evolución temporal, desde células prácticamente homogéneas, hacia una distribución de tamaños y formas, donde las células de mayor área se ubican en la periferia para hacerse progresivamente más compactas hacia el seno de la colonia. Por otra parte, las propias colonias exhiben dos tipos de dinámica de crecimiento: cuando la población celular es baja, es decir menos de 700–1000 células, la morfología arbitraria y su desplazamiento sigue una cinética de tipo exponencial, acorde con la cinética de crecimiento poblacional. Cuando superan esa población, la velocidad de desplazamiento se enlentece, pasando a un régimen lineal. Bajo estas condiciones, la dimensión fractal alcanza un valor que ronda 1.20, y el cálculo de los exponentes críticos se hace posible, independientemente de la geometría del sistema. Así se obtienen los exponentes de rugosidad  $\alpha = 0,5$  y de crecimiento  $\beta = 0,33$  correspondientes a la dinámica de crecimiento de Kardar, Parisi y Zhang.



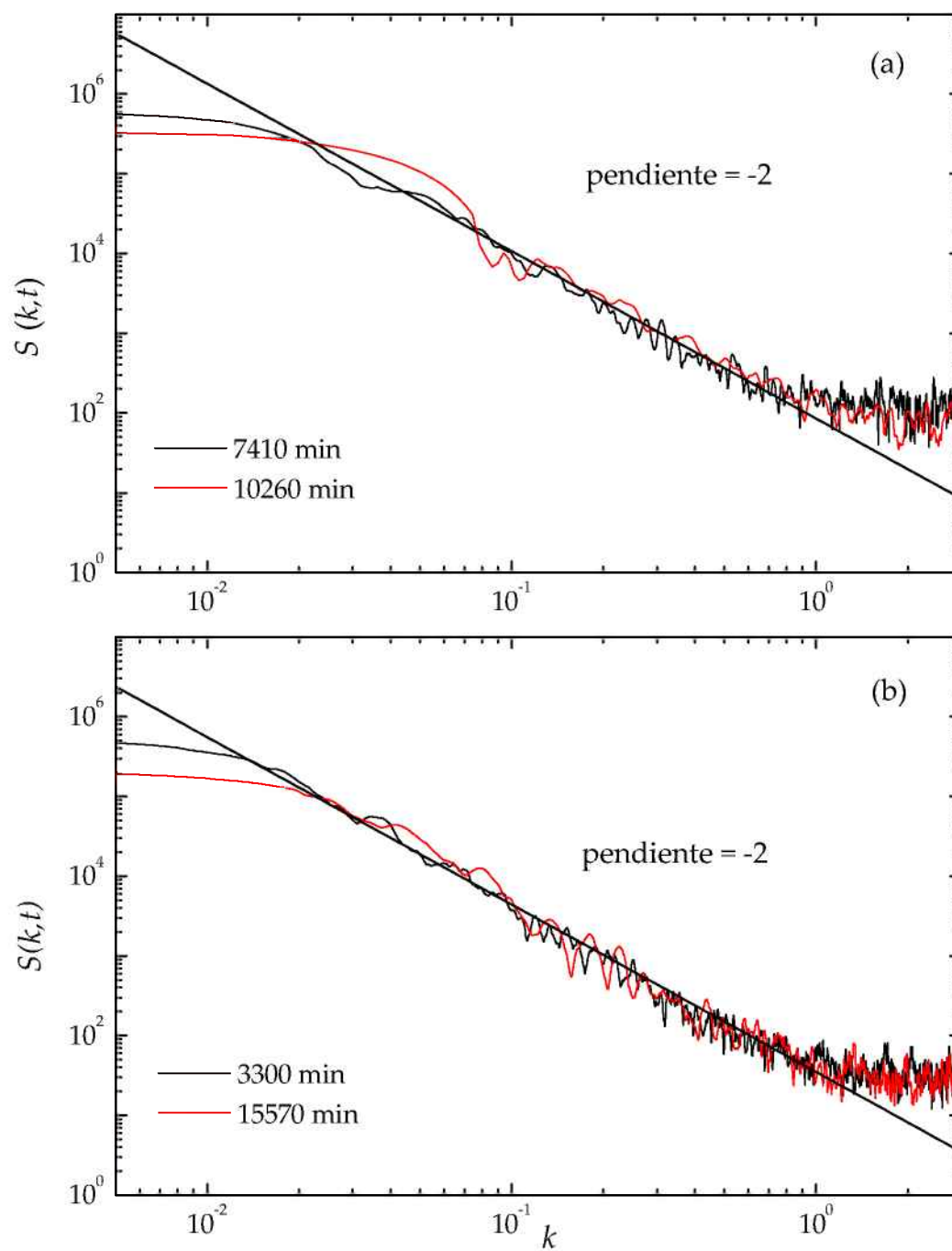


Figura 5.34: Variación del factor de estructura con la frecuencia. a) Colonias de tipo I, y b) colonias de tipo II. Las líneas rectas con pendiente de  $-2$  corresponden a un exponente  $\alpha = 0,5$ .

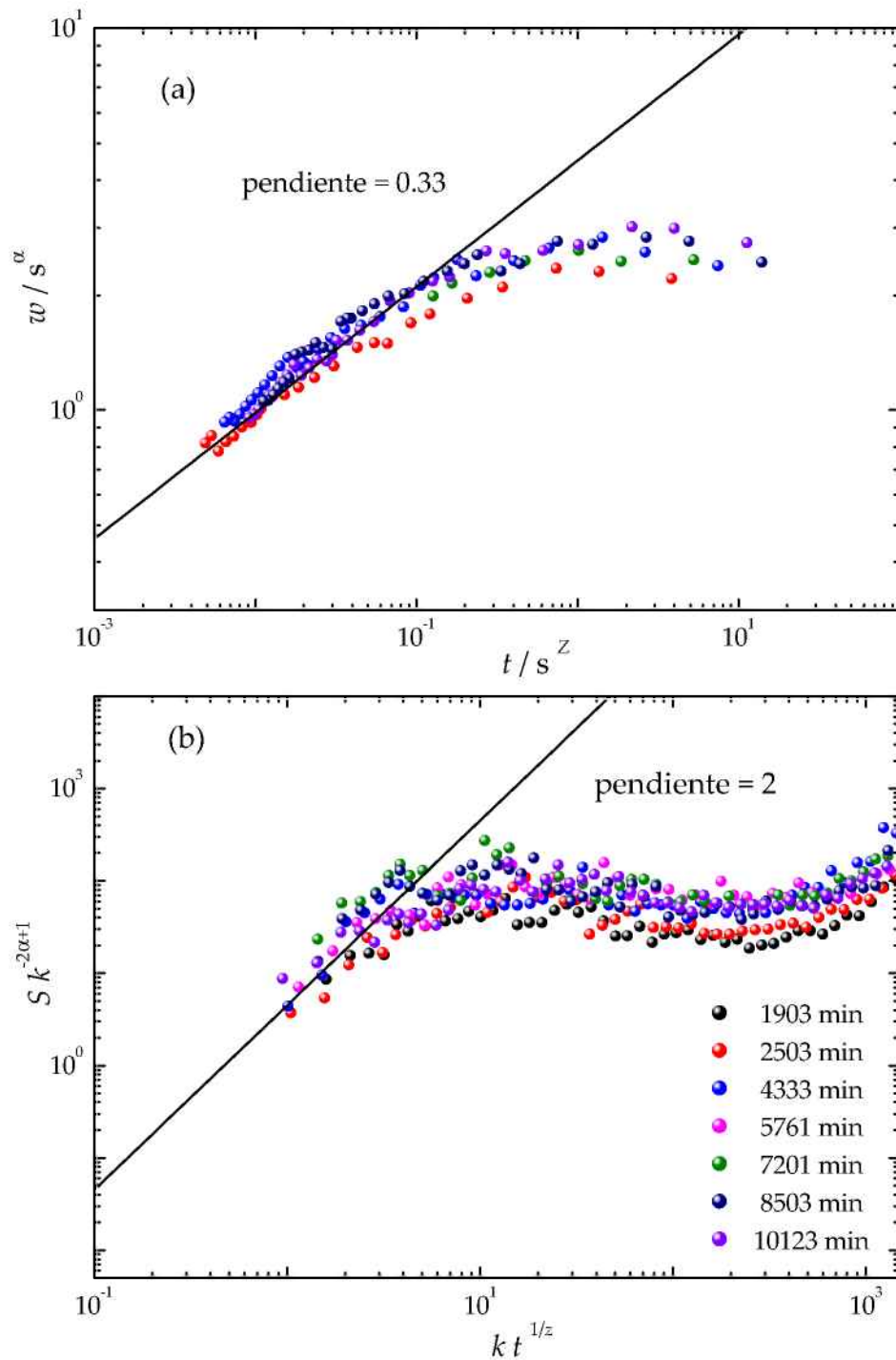


Figura 5.35: Colapsos de las curvas de rugosidad y de factor de estructura, según las relaciones de Family-Vicsek (ecuaciones 2.12 y 2.22), para  $\alpha = 0,5$  y  $\beta = 0,33$ . Los valores de tiempo que se indican son representativos de las diferentes etapas de crecimiento de la colonia analizada.

---

# Crecimiento de colonias de células HeLa

## 6.1. Evolución morfológica de las colonias

Las células HeLa provienen, como se mencionó anteriormente, de tejidos propios de un carcinoma humano. Por tal motivo, es de esperar que las células presenten características típicas de células con modificación neoplásica: pleomorfismo celular y nuclear, presencia de células gigantes y células pequeñas con núcleos muy prominentes. Las células HeLa, en comparación con las células Vero, que provienen de un tejido normal, exhiben una proporción algo menor de células gigantes y multinucleadas, aunque estas últimas pueden presentar más de siete núcleos. En general, los núcleos tienden a ser hipercromáticos, y la relación núcleo:citoplasma es muy variable.

Debido a las limitaciones en cuanto al tamaño y la morfología de las colonias pequeñas, y a la practicidad del método de la cinta de Teflon, los estudios de colonias de células HeLa se realizaron empleando este último método para colonias con frentes lineales, y el crecimiento a partir de un cúmulo tridimensional, para el caso de las colonias con frente radial de crecimiento.

En la figura 6.1 se muestra la secuencia temporal de crecimiento de una colonia de geometría lineal realizada según el método II, y en la figura 6.2 se muestra una colonia radial de tipo II a diferentes tiempos, desde un agregado tridimensional con una incipiente formación en monocapa que lo rodea como un delgado anillo, hasta las etapas avanzadas, donde la monocapa ocupa la mayor superficie de crecimiento.

La morfología de las colonias es similar a la descrita para las células Ve-

ro, observándose dominios tridimensionales en el seno de las colonias que se continúan por monocapas celulares que conforman los frentes de crecimiento. La expansión del dominio bidimensional se produce esencialmente por duplicación celular, tanto en el seno de la colonia como en el frente, acompañada por cambios en el tamaño y la morfología celular.

En ambos casos se observa que las células de la interfaz desarrollan morfologías muy variables lo que conlleva a una menor densidad celular en esta región respecto de la densidad que se observa en el seno de la colonia. Debido a la compresión lateral, las células se van haciendo cada vez más pequeñas, desde la periferia hacia el centro de la colonia, hasta alcanzar diámetros de alrededor de  $15\ \mu\text{m}$ . Esto se debe a la característica falta de inhibición por contacto que muestran estas células y que queda de manifiesto con la marcación del antígeno nuclear PCNA (Fig. 6.3) donde se observan células en división homogéneamente distribuidas en toda la colonia.

Las experiencias con células HeLa presentan una duración similar a las experiencias equivalentes de células Vero. Las razones que llevan a la finalización de las experiencias son mayoritariamente las mismas que para las otras células, aunque los frentes no tienden a formar redes tan complejas de entrecruzamiento celulares, sino que la pérdida de la definición del perfil se produce principalmente por el contacto de la colonia principal con colonias vecinas secundarias, provenientes del desprendimiento ocasional de células. Sin embargo, aunque las redes no generen tanta distorsión, es común observar la extensión de largos filopodios, o delgadas microvellosidades, buscando contactos intercelulares, como puede observarse en la figura 6.4, que muestra a gran escala el desarrollo de estas prolongaciones. La aparición de espacios vacíos entre células, como se mencionó para el caso de las células Vero, estaría dando la pauta de que el crecimiento de la colonia se está desarrollando en múltiples direcciones.

Como se desprende de los histogramas, (Fig. 6.5), los cambios en el tamaño promedio de las células a lo largo de desarrollo de la colonia, son menos notorios que en el caso de las células Vero. Puede observarse la aparición de células gigantes, pero numéricamente parecieran ser menos importantes, como se mencionó anteriormente. En general las células tienden a presentar tamaños más homogéneos, aunque siempre son más pequeñas las células pertenecientes al seno de la colonia.

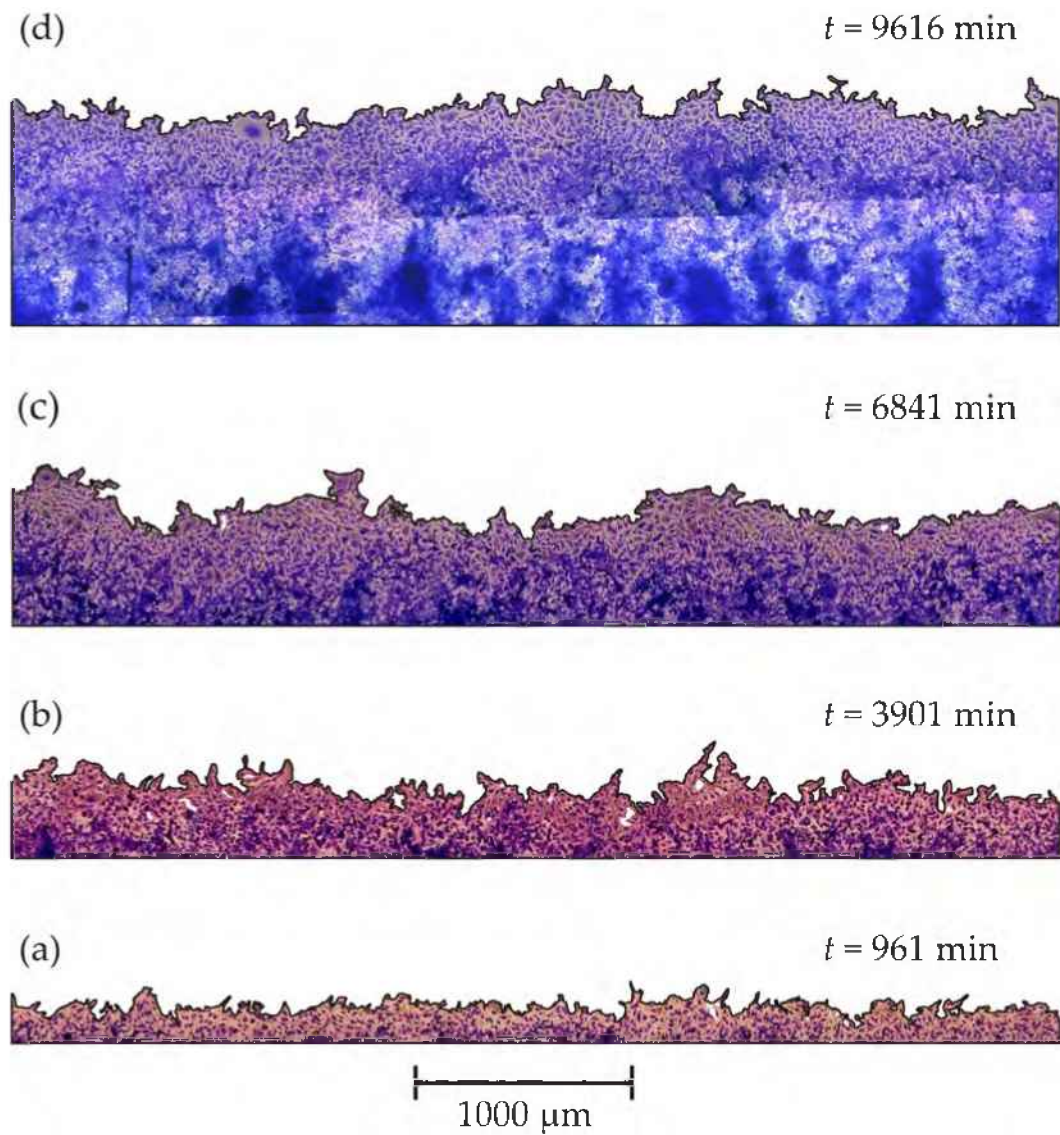


Figura 6.1: Imágenes parciales de colonias de células HeLa a diferentes tiempos. Las regiones más oscuras corresponden a las formaciones tridimensionales y las más claras al crecimiento en monocapa. Para mayor claridad se muestran colonias fijadas y coloreadas y se resaltan los perfiles en negro.

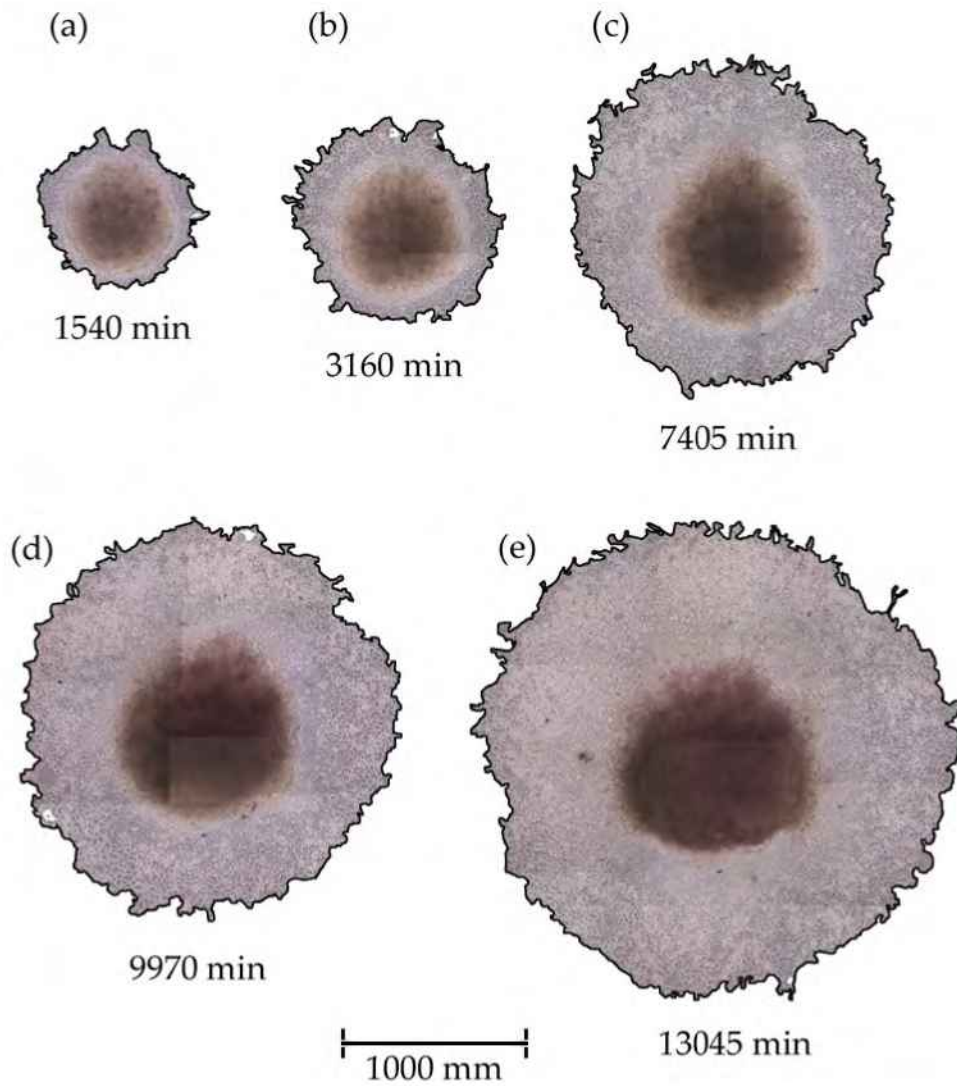


Figura 6.2: Imágenes de la evolución de una colonia de células HeLa de frente radial a diferentes tiempos. Puede observarse el agregado tridimensional de forma casi circular ubicado en el centro de la colonia, como una región más oscura. A su alrededor se desarrolla el dominio bidimensional.

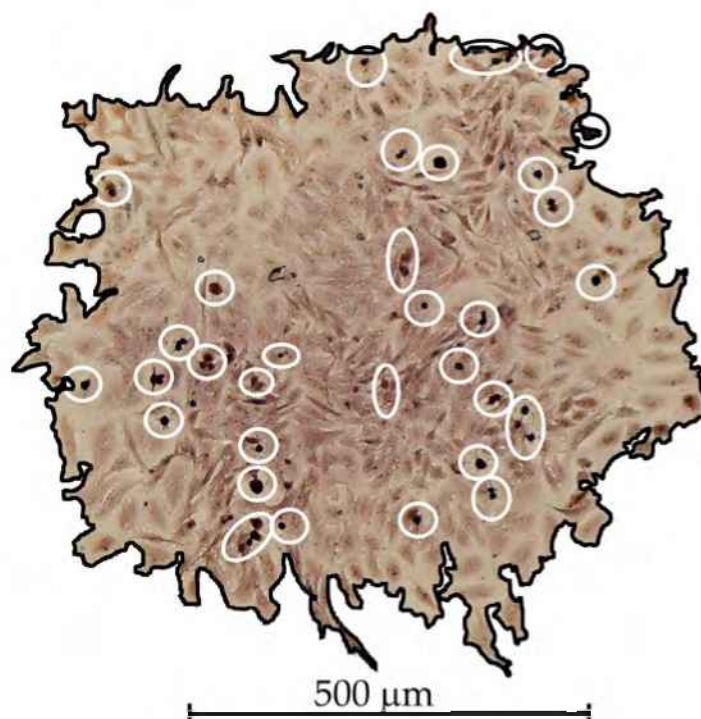


Figura 6.3: Marcación celular del antígeno nuclear PCNA. En blanco se encuentran demarcadas alguna de las células que resultaron positivas para el antígeno, indicando que se encuentran en división. Se observa que la distribución de células marcadas es aproximadamente homogénea, mostrando que la división celular ocurre tanto en el interior como en la periferia de la colonia.

## 6.2. Análisis de los frentes de crecimiento.

El análisis de los frentes de crecimiento se realizó sobre los contornos trazados de los perfiles de las colonias como se muestra en las figuras 6.6 y 6.7.

En la figura 6.8 se observa que la altura y el radio medio de los frentes de crecimiento lineal y radial muestran una dependencia lineal con el tiempo, exhibiendo una pendiente de  $0,09 \pm 0,02$ , indicando que ambos tipos de colonias exhiben un régimen de crecimiento lineal, avanzando con velocidad constante. Para el caso de las colonias con frente de crecimiento radial, el desplazamiento medio se estimó como  $\langle R(t) \rangle - \langle R_0 \rangle$ , donde  $\langle R_0 \rangle$  es el radio de la semilla tridimensional inicial. Es decir, que a pesar del incremento del tamaño del sistema, las colonias de frentes radiales muestran que crecen a velocidades

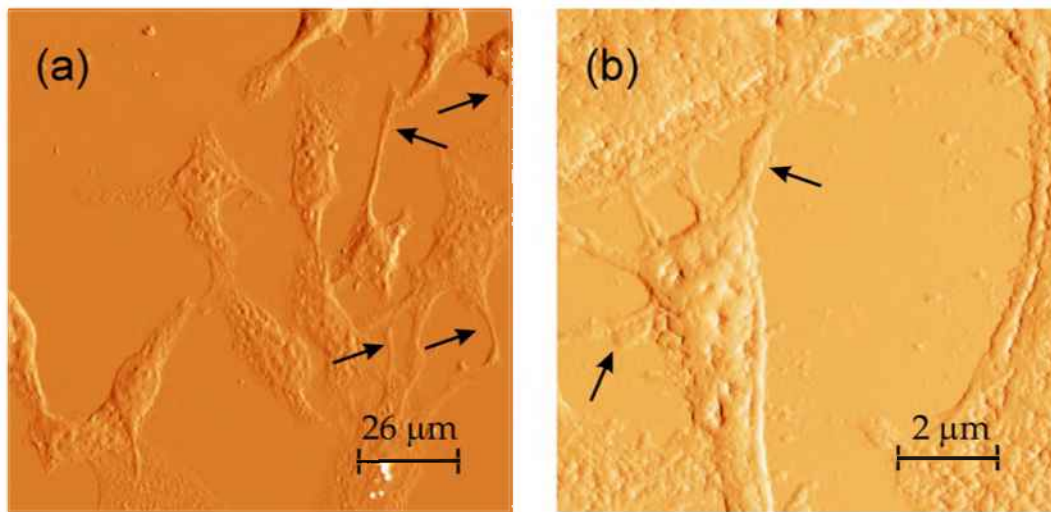


Figura 6.4: Imágenes tomadas con microscopía de fuerzas atómicas a diferentes aumentos. Puede observarse la prolongación de filopodios y microvellosidades, buscando el contacto intercelular.

iguales a sus pares lineales, dentro de los errores experimentales.

Por otra parte, las colonias de frentes radiales de tipo I, con escaso número de células, crecen siguiendo una cinética de tipo exponencial. Por tal motivo en lo sucesivo sólo se examinarán las colonias de frentes lineal y radial de tipo II, que son aquellas a las que se les puede aplicar el análisis de escalado de la rugosidad.

Para el análisis de la fractalidad de las colonias de células HeLa se tuvieron en cuenta los valores de ancho y rugosidad de los frentes y se calculó el valor de la dimensión fractal para un rango de cajas de  $10 - 200 \mu\text{m}$  (Fig. 6.9). De la pendiente del gráfico del número de cajas en función del tamaño de las mismas se obtuvo el valor de  $d_f = 1,20 \pm 0,04$ , independientemente del tiempo y del tipo de colonia considerado.

Nuevamente, como en el caso equivalente de células Vero creciendo en sistemas que cambian de tamaño, se observa que a distintos tiempos, o equivalentemente a diferentes tamaños, las pendientes obtenidas son invariantes y las rectas se desplazan paralelamente.

Una vez determinadas la velocidad de desplazamiento y la dimensión fractal de las colonias se procedió al análisis de la dinámica de crecimiento de los frentes aplicando la técnica de escalado dinámico.

El análisis logarítmico del crecimiento de la rugosidad con el tiempo mues-



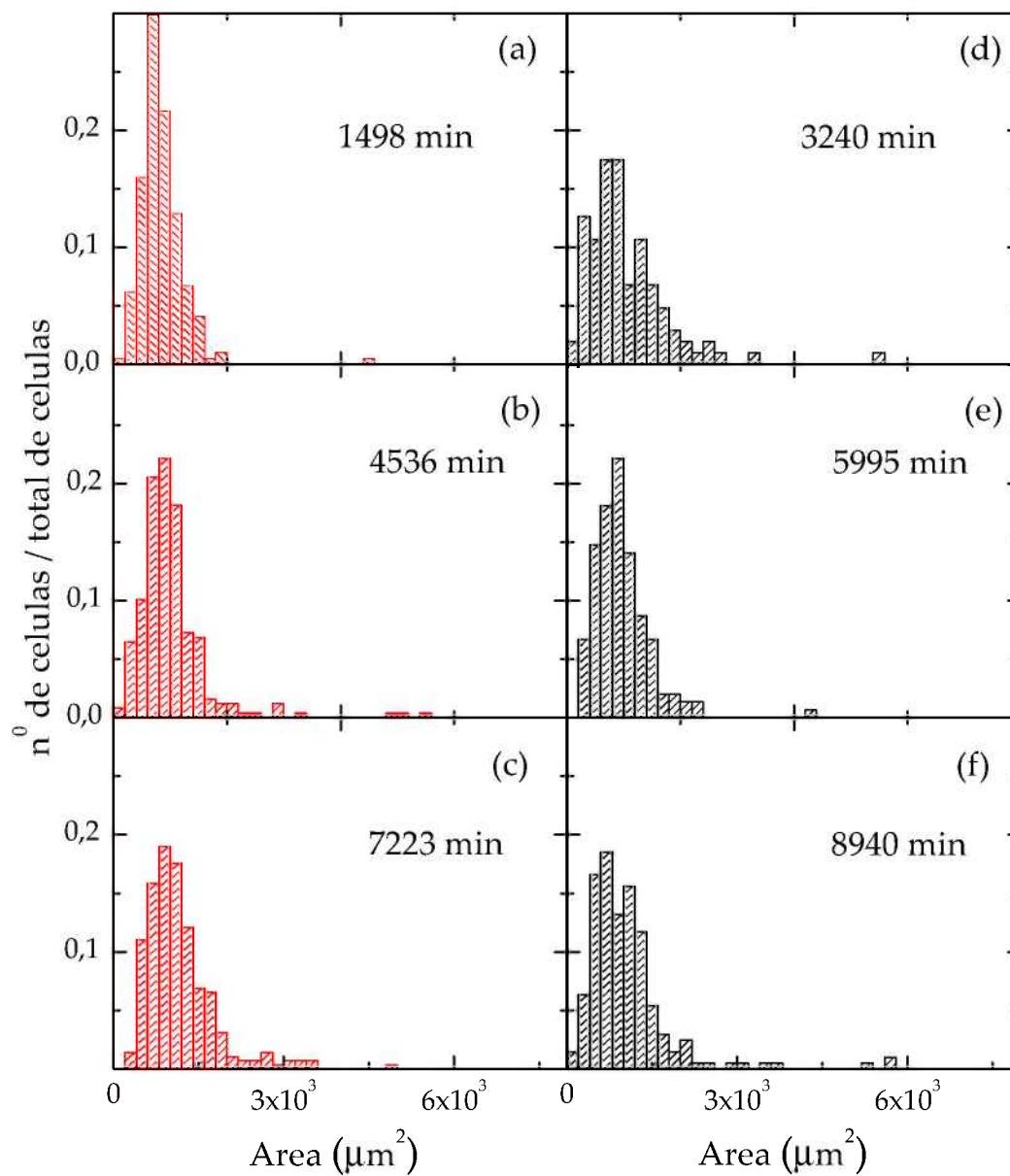


Figura 6.5: Histogramas que muestran la distribución de tamaños celulares en el borde de colonias de frente lineal (a) y de frente radial (b), a diferentes tiempos. En el eje las ordenadas se muestra el valor normalizado del número de células por el total de células analizadas.

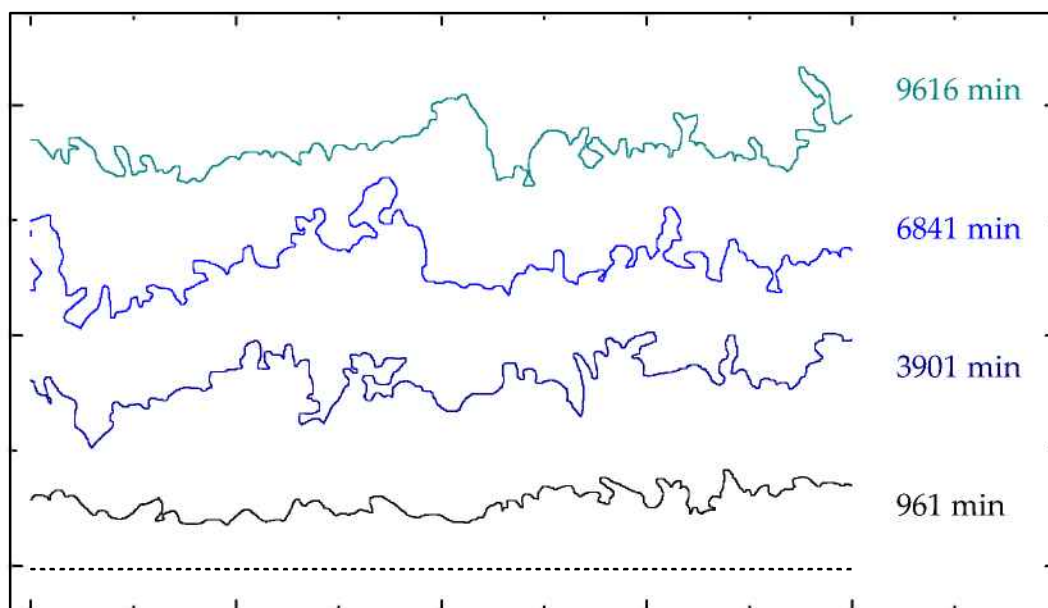


Figura 6.6: Contornos del frente de crecimiento de una colonia de células HeLa. Se indican los tiempos de crecimiento correspondientes.

tra una relación lineal con una pendiente promedio de  $0,33 \pm 0,04$  tanto para los frentes lineales como para los frentes radiales, que se corresponde con el exponente de crecimiento  $\beta$ . Esta relación alcanza a cubrir alrededor de una década del logaritmo del tiempo (Fig. 6.10). Nuevamente puede observarse que las colonias celulares no muestran saturación de la rugosidad dentro de las condiciones de estudio de este trabajo. En base a estos resultados, se puede concluir que el valor del exponente  $\beta$  es coincidente para todos los tipos de experiencias, tanto en células HeLa como Vero.

Por otra parte, los gráficos de rugosidad versus la fracción del tamaño de los frentes muestra curvas sigmoideas del tipo de las que se obtuvieron con las células Vero, aunque de forma más suave que estas últimas (Fig. 6.11). Se puede observar además que también para el caso de las células HeLa la altura de las curvas se incrementa con el tiempo, y que la forma de las mismas no permite determinar una pendiente con seguridad.

La comparación de las curvas de rugosidad para diferentes fracciones del frente de crecimiento, que resultan de la superposición de los datos experimentales y de los datos corregidos por las salientes laterales, muestra que se solapan y tienden a un mismo valor en el rango de fracciones del frente que

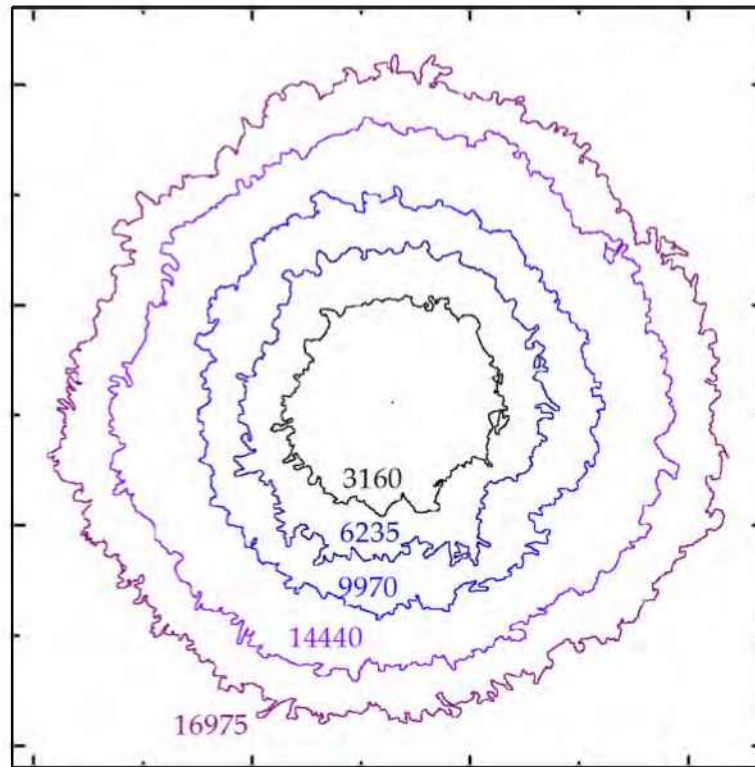


Figura 6.7: Contornos del frente de crecimiento de una colonia de células HeLa. Los números indican el tiempo transcurrido en minutos desde la siembra.

superan el valor crítico  $l_c$  y  $s_c$  respectivamente (Fig. 6.12). Este valor, que es del orden de 3-4 células de diámetro promedio, también se incrementa con el tiempo, como fue observado para el caso de las células Vero.

Es importante remarcar que la influencia de las salientes laterales es menor para las células HeLa, probablemente debido a que estas son de menor tamaño y crecen formando colonias más compactas, con menos ramificaciones (Figs. 6.1 y 6.2).

Las curvas que resultan de los datos corregidos muestran un crecimiento inicial lineal de la rugosidad para distintas fracciones del frente, de 10 a 100  $\mu\text{m}$ , correspondiente a un exponente de rugosidad  $\alpha' = 0,85$ , independientemente del tiempo y del frente de crecimiento (Fig. 6.12).

El exponente de rugosidad  $\alpha'$ , que resulta del análisis de frentes menores a la longitud crítica, es equivalente al exponente hallado para las células Vero, que fue asociado a la rugosidad propia de las deformaciones celulares, que se

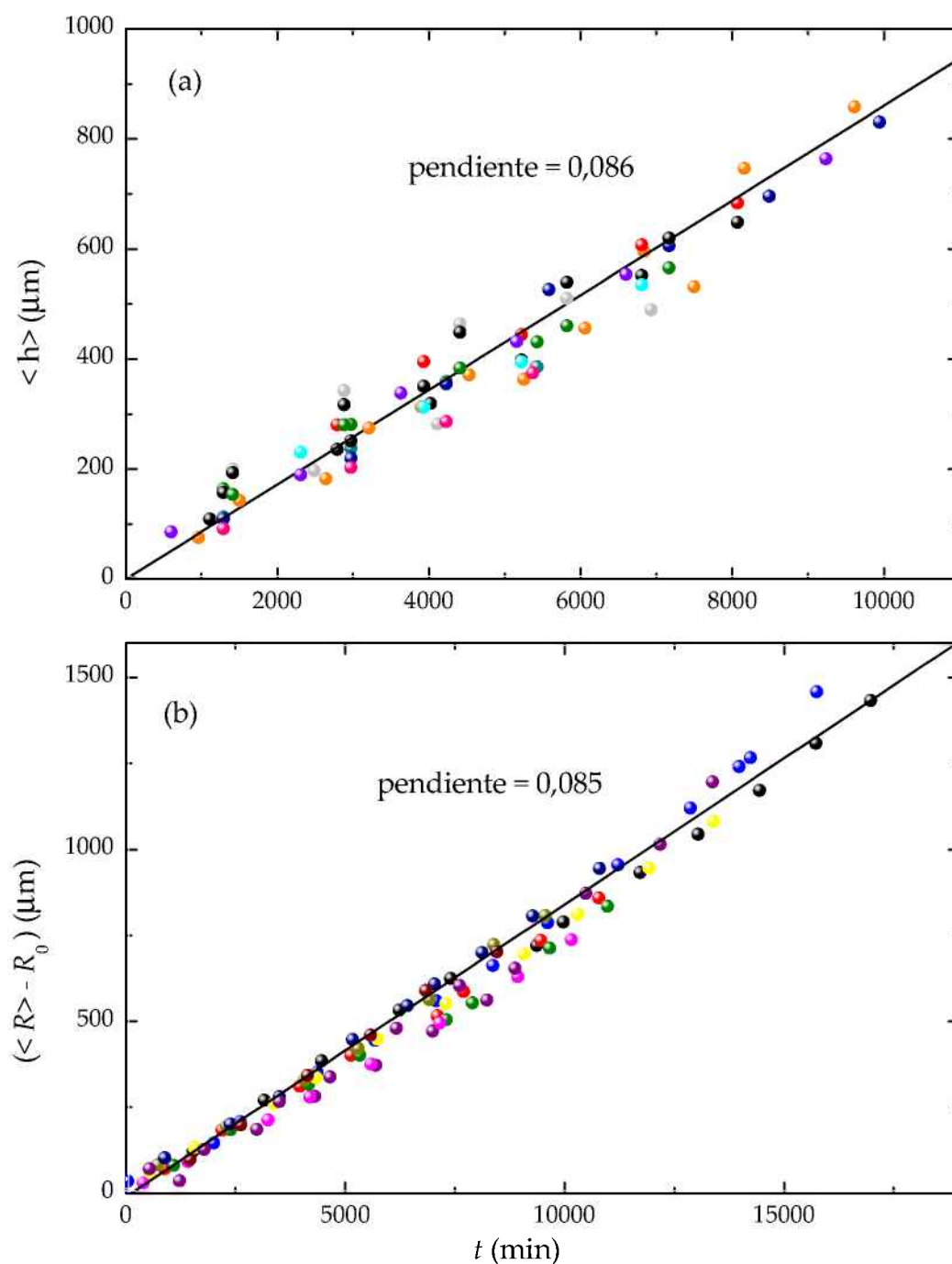


Figura 6.8: (a) Variación de la altura y radio medio en función del tiempo de crecimiento, correspondiente a colonias de células HeLa con frente lineal (a) y radial (b) crecimiento. El radio medio de las colonias se normalizó respecto al correspondiente radio inicial del agregado tridimensional ( $\langle R_0 \rangle$ ). Cada color corresponde a una colonia diferente.

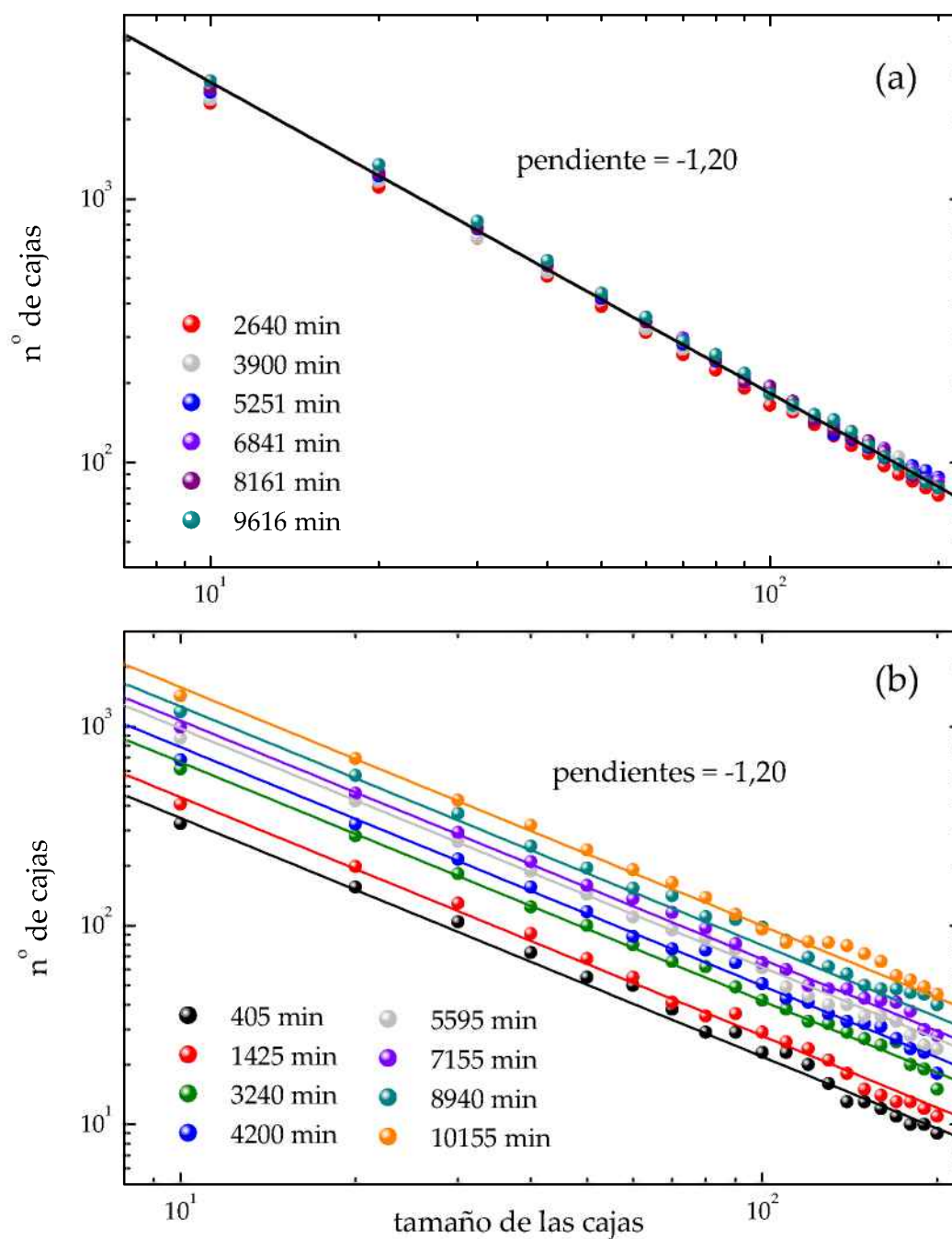


Figura 6.9: Dimensión fractal de una colonia de frente lineal (a) y radial (b) calculadas según el método del conteo de cajas.

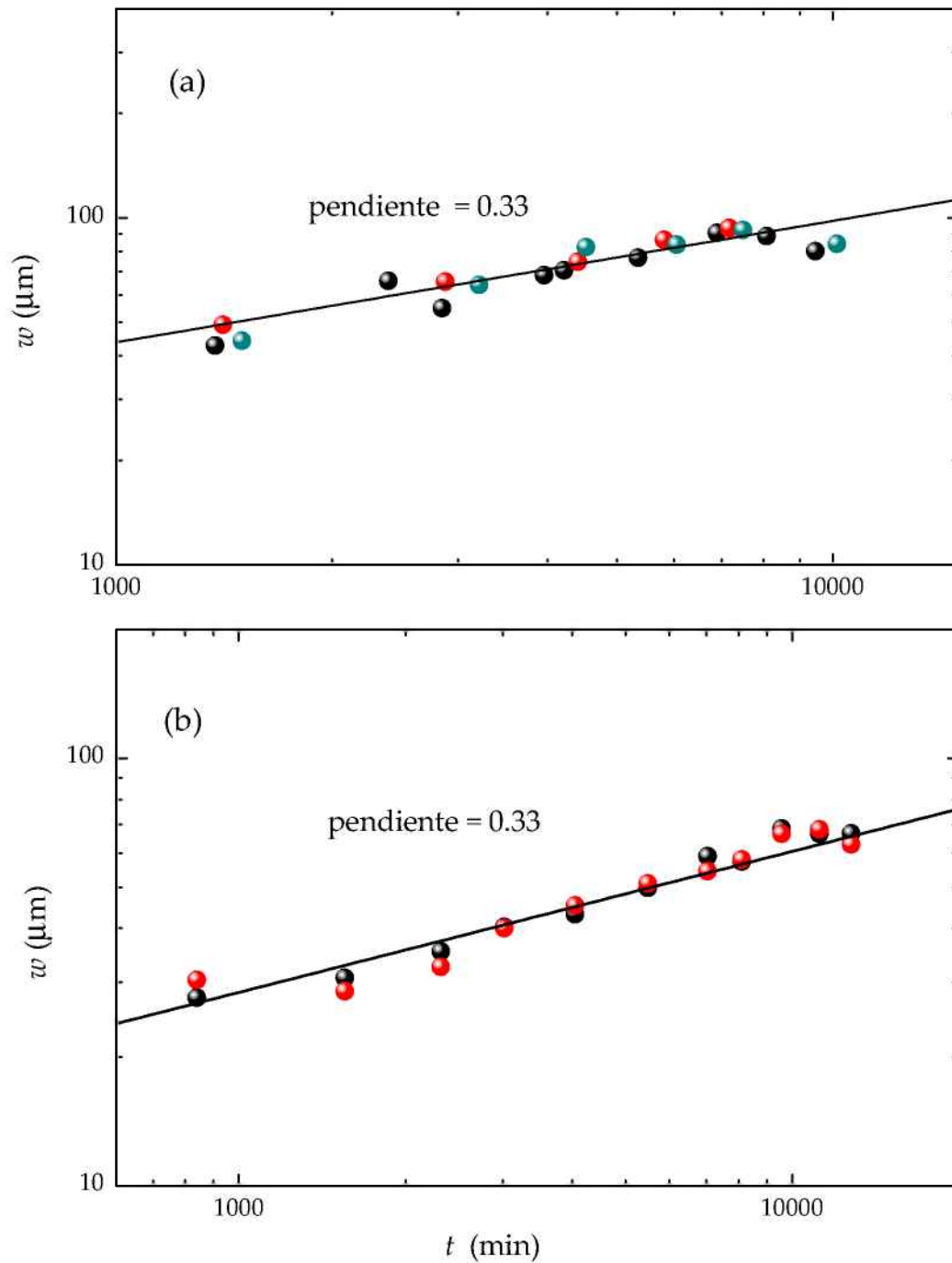


Figura 6.10: Variación de la rugosidad con el tiempo de crecimiento. Los gráficos corresponden al análisis de las colonias de frentes lineales (a) y radiales (b). Cada color corresponde al promedio de los valores de rugosidad de las diferentes colonias sembradas el mismo día.

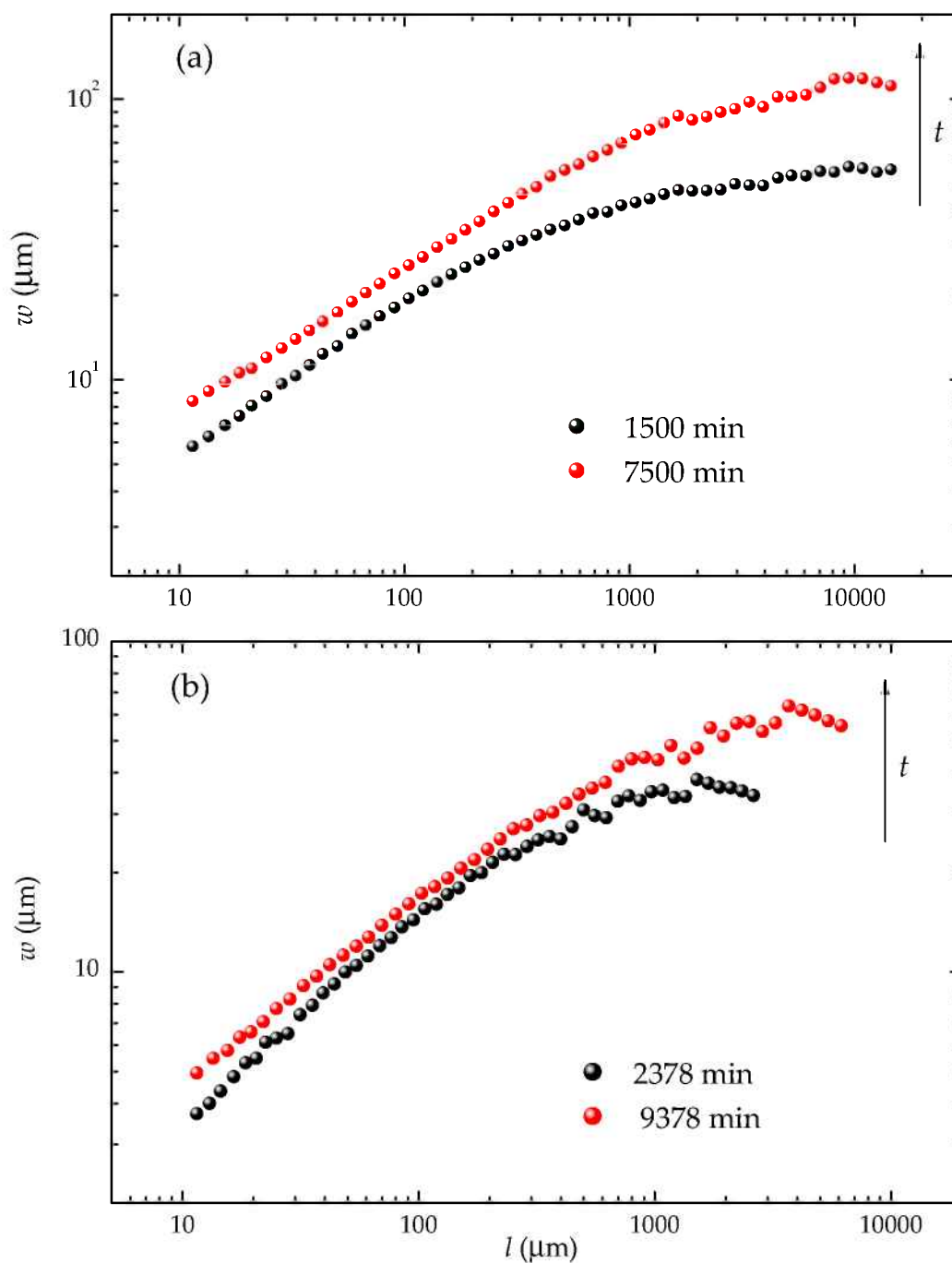


Figura 6.11: Variación de la rugosidad con la fracción del frente de para colonias de crecimiento lineal (a) y radial (b). Los símbolos negros corresponden a tiempos cortos y los símbolos rojos corresponden a tiempos avanzados de crecimiento de una misma colonia. La flecha indica la evolución temporal.

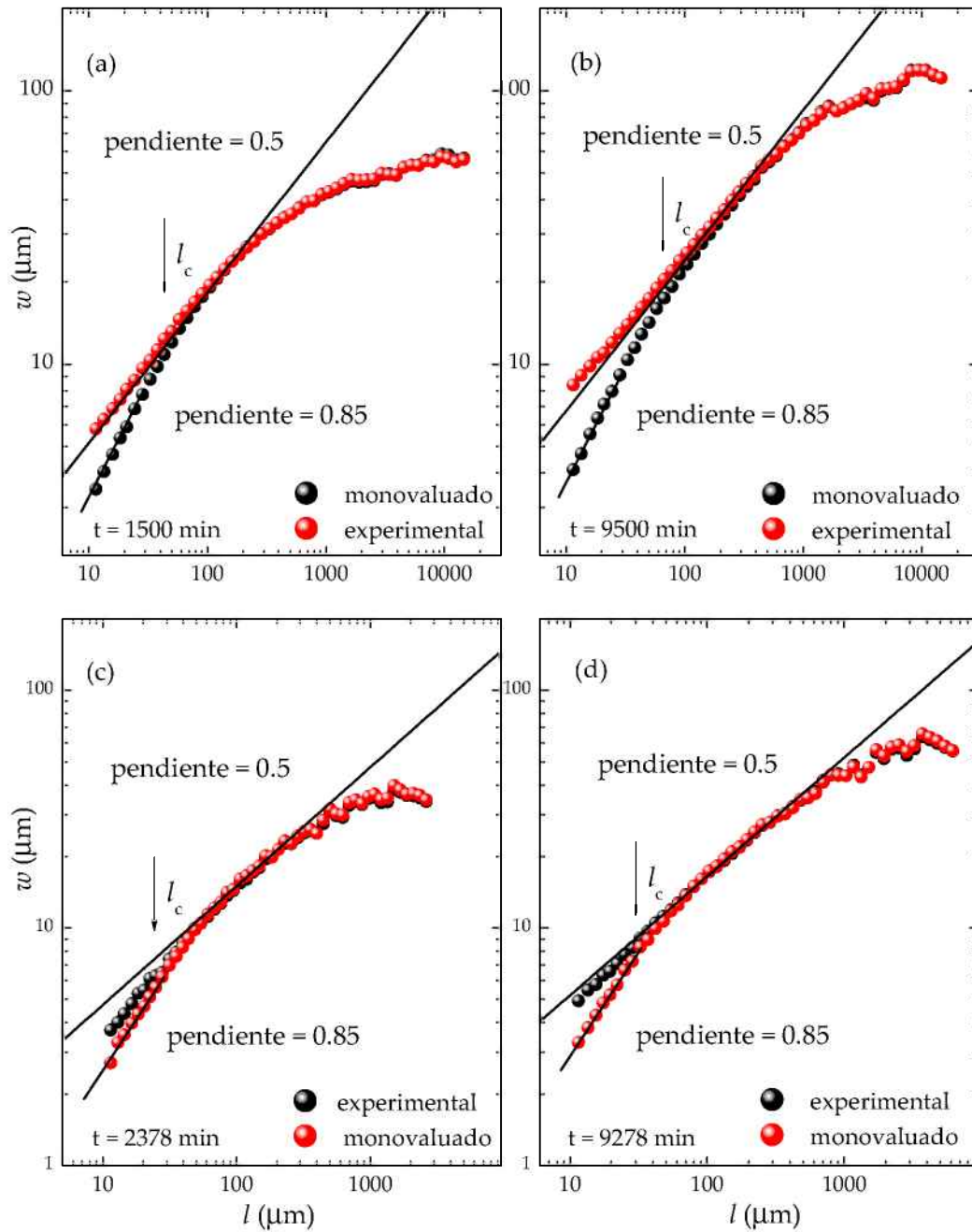


Figura 6.12: Comparación de las curvas de rugosidad para diferentes tamaños de los frentes. Los datos corresponden a colonias de crecimiento lineal [figuras (a) y (b)] y radial [figuras (c) y (d)]. Se indica el valor de la longitud crítica,  $l_c$  o  $s_c$ , para cada tiempo.



espera que fluctúen a frecuencias más altas, con ciclos de duración menor que el propio ciclo celular. Esta coincidencia no es de extrañar, ya que los ciclos celulares de ambas líneas son muy similares (entre 24 y 48 hs) [100]. Para valores mayores a la longitud crítica, es decir valores de longitud correspondiente al dominio de la colonia y no de la membrana celular, el gráfico de rugosidad versus el tamaño del sistema muestra una curva suave que tiende a un valor límite de rugosidad, tal y como se espera para un sistema que no muestra saturación de la rugosidad con el tiempo. La pendiente de 0.5, corresponde al exponente de rugosidad  $\alpha$ , en la región que va de 150 a 1100  $\mu\text{m}$  (Fig. 6.12).

El factor de estructura en función de la frecuencia muestra una región lineal en el rango de frecuencias que va de 0.02 a 1 con una pendiente de  $-2$ . Este valor, correspondiente al exponente de rugosidad  $\alpha = 0,50 \pm 0,05$  parece ser independiente del tiempo y del tipo de colonia estudiada, procedimiento experimental analizado, aunque para los frentes radiales el espectro se muestra más ruidoso que para el caso de los lineales (Fig. 6.13).

Del mismo modo como se validó la relación Family-Vicsek para las experiencias con células Vero, el set de exponentes calculados a partir de los datos experimentales, corregidos y sin corregir, obtenidos de las colonias de células HeLa (Figs. 6.10–6.13) muestra que las curvas de rugosidad (Fig. 6.14), y del factor de estructura (Fig. 6.15) colapsan para distintos tiempos, en ambas condiciones experimentales de crecimiento.

### 6.3. Síntesis

Las células HeLa, al igual que las células Vero, exhiben cambios temporales de su morfología y distribución. Así, nuevamente nos encontramos con colonias homogéneas originalmente que evolucionan hacia una periferia de células de mayor tamaño, que se van haciendo más pequeñas a medida que nos aproximamos al seno de las mismas.

Los frentes de las propias colonias se muestran rugosos, independientemente de su geometría. Tanto la dimensión fractal, como los exponentes críticos presentan los mismos valores que aquellos hallados para las colonias de células Vero, es decir  $d_f = 1,20$ ;  $\alpha = 0,5$  y  $\beta = 0,33$ ; dando la pauta de que la dinámica de expansión de los frentes de crecimiento sigue las mismas leyes de KPZ, mencionadas en el capítulo 5.

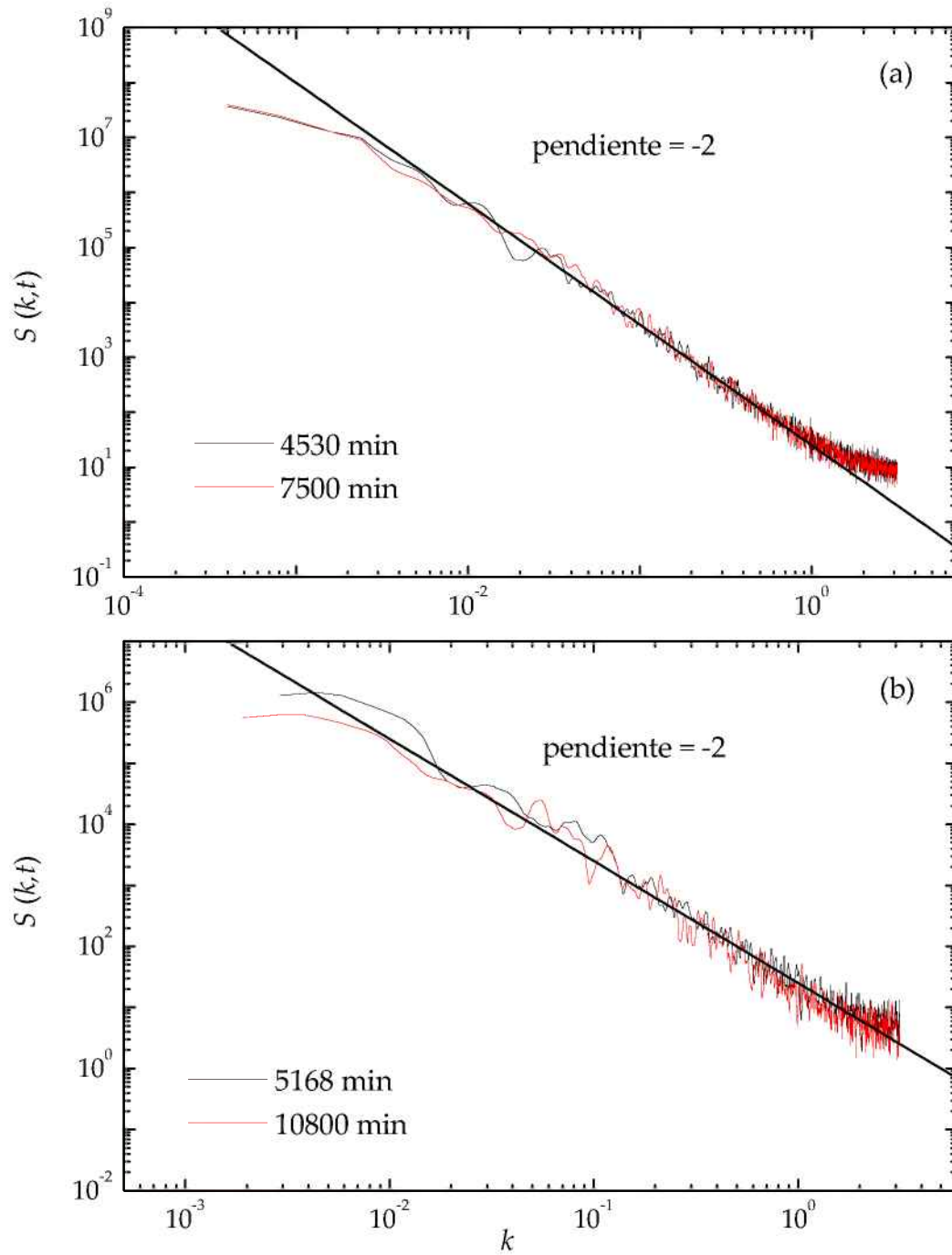


Figura 6.13: Variación con la frecuencia del factor de estructura correspondientes a frentes lineales de crecimiento (a) y a frentes radiales (b) de colonias de células HeLa. La pendiente mostrada de un valor de  $-2$  corresponde a un exponente  $\alpha = 0,5$ .

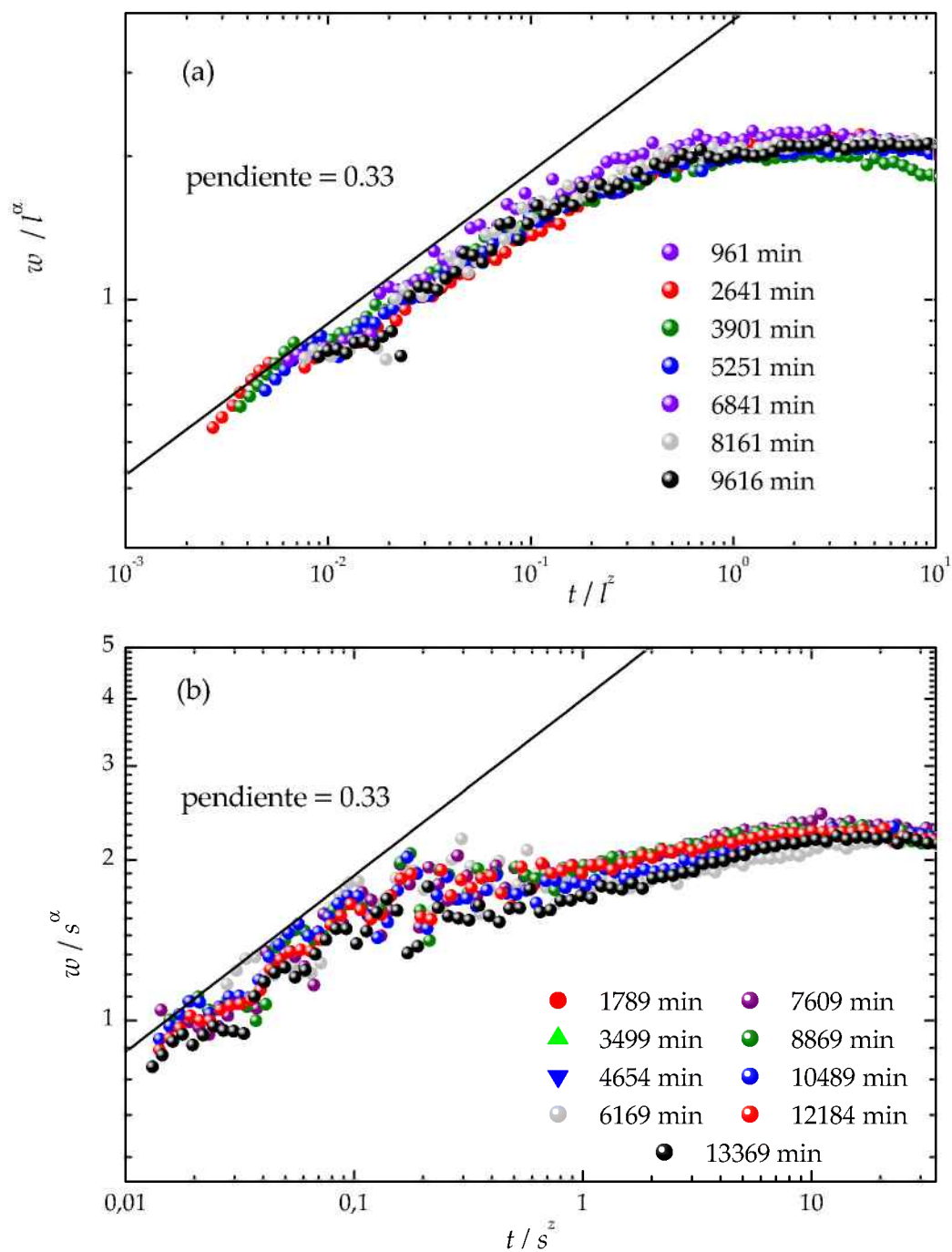


Figura 6.14: Colapsos de las curvas de rugosidad de acuerdo a la relación de escalado de Family-Vicsek, (ecuación 2.12), para un frente lineal (a) y de un frente radial (b) de crecimiento, empleando  $\alpha = 0,5$  y  $\beta = 0,33$ . Se indica el tiempo de evolución de la colonia analizada.

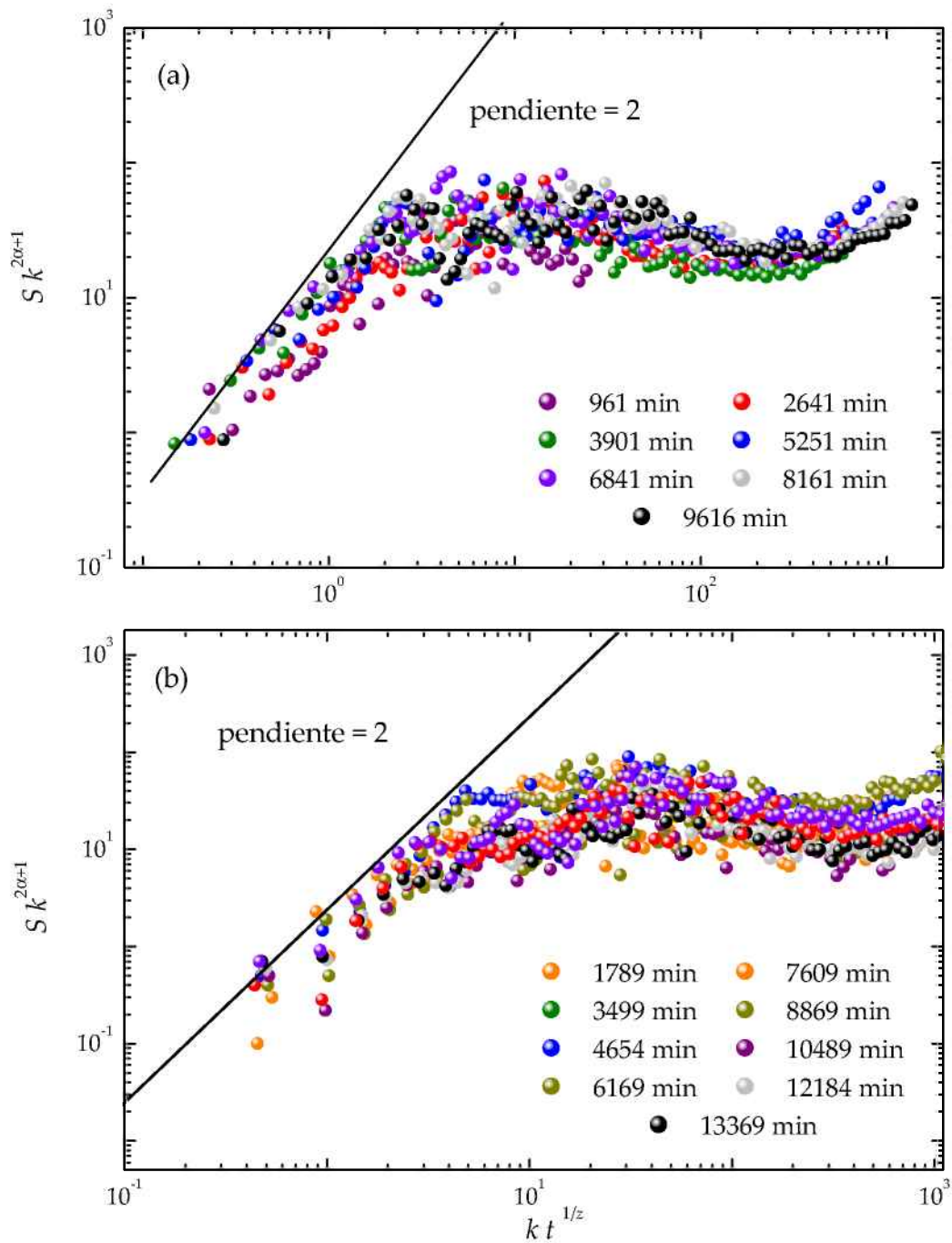


Figura 6.15: Colapso de las curvas del factor de estructura para colonias de células HeLa con frente lineal (a) y radial (b) de crecimiento, según la ecuación 2.22, para los exponentes críticos  $\alpha = 0,5$  y  $\beta = 0,33$ . Se indica el tiempo de evolución de la colonia analizada.

---

## Crecimiento de colonias de células Vero en presencia de metil celulosa

Para el caso particular de los sistemas biológicos, la posibilidad de modificar las condiciones de crecimiento, como herramienta de control de su dinámica, se ve muy restringida. Esto se debe a que cambios en el pH, la concentración de  $O_2$  o  $CO_2$ , o mismo la temperatura, ofrecen rangos muy acotados de variación, antes de transformar el ambiente en inviable para las células. En este contexto se probó la inclusión de metil celulosa, un polímero hidrosoluble que permite incrementar la viscosidad del medio de cultivo, para estudiar las posibles modificaciones en la dinámica del crecimiento de las colonias por efecto de las propiedades del medio.

### 7.1. Evolución morfológica de las colonias

Las colonias de células Vero de frentes lineales de crecimiento, preparadas en medio de cultivo con metil celulosa, presentaron algunas características morfológicas particulares respecto de las mencionadas para los experimentos equivalentes en medio de cultivo convencional.

Tal como se observó en ausencia de metil celulosa (Capítulo 5), aquí también las células tienden a crecer sin dejar huecos libres en el seno de la colonia, salvo algunos espacios temporales ubicados siempre en la región de la interfaz, y además tienden a crecer sin separarse de la colonia, salvo algunas células

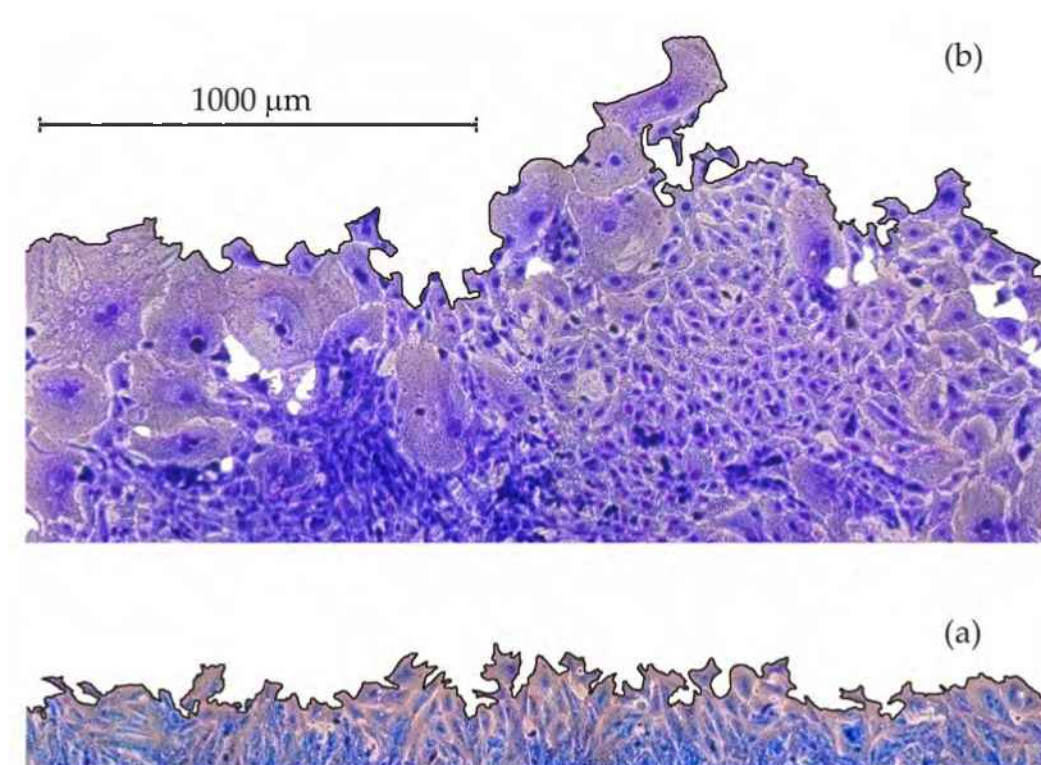


Figura 7.1: Imágenes parciales de los frentes lineales de crecimiento de dos colonias en presencia de metil celulosa al 2,5 %. Los tiempos de crecimiento son 2400 y 19620 minutos. Las colonias se encuentran fijadas y coloreadas. En trazo negro indica el perfil de la colonia.

que lo hacen esporádicamente, a tiempos avanzados. Una sutil diferencia que se observa en los cultivos con metil celulosa es que las células tienden a dispersarse menos debido a la mayor viscosidad del medio, y esto se refleja en la duración de las experiencias, que llega aproximadamente al doble de tiempo, sin que la colonia en estudio colapse con pequeñas colonias vecinas, formadas por células que se separaron del frente, como se describió anteriormente.

Las colonias en medio con metil celulosa también muestran que las células inicialmente son de tamaños y formas muy homogéneas [Fig. 7.1 (a)] y que con el paso del tiempo van apareciendo células gigantes, células multinucleadas, la mayor parte de ellas también gigantes, células que exhiben largos filopodios y microvellosidades [Figs. 7.1 (b) y 7.2]. Pero a diferencia de los cultivos convencionales, en este caso las células tienden a ser notablemente más gran-

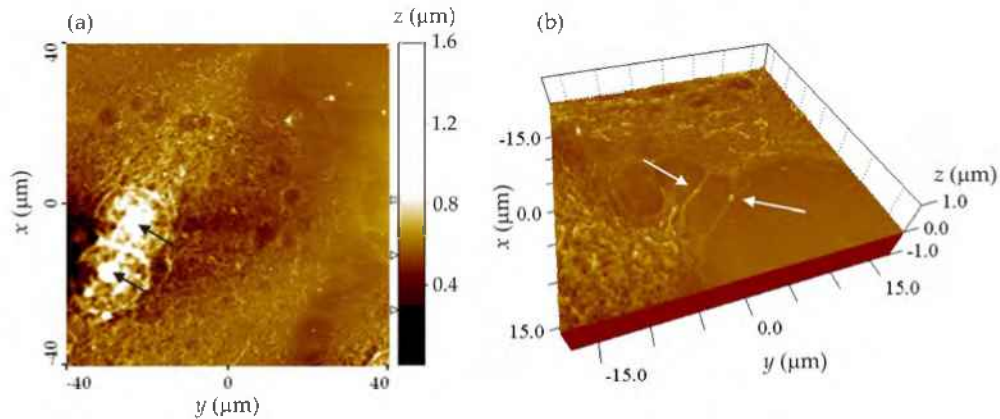


Figura 7.2: Colonias de células Vero cultivadas con metil celulosa al 2,5 %. a) Imagen parcial de una célula gigante tomada con el microscopio de fuerzas atómicas (AFM). Las flechas indican dos núcleos dentro del citoplasma de una única célula, b) Imagen de una célula tomada a mayor aumento. Las flechas señalan contactos intercelulares a través de filopodios o microvellosidades

des. En un principio la diferencia es muy sutil, ya que pasan de un diámetro promedio de alrededor de  $30 \mu\text{m}$  para los cultivos estándar, a un diámetro de unas  $35 \mu\text{m}$  para aquellos con metil celulosa [Figs. 5.3 (a) y 7.3 (a) y (b)]. Pero a tiempos avanzados, muchas células aumentan llamativamente su área, llegando a valores de  $500 \mu\text{m}$  de diámetro (Figs. 5.3 y 7.3). Es destacable que esto no constituye una excepción, sino que la proporción de células gigantes es mucho mayor, incluso duplica o triplica, la proporción de este tipo de células halladas en los cultivos en medio líquido.

La localización de estas células, que como se mencionó anteriormente aparecen en forma relativamente precoz, es típicamente en la interfaz. Incluso las mediciones realizadas indican que estas células avanzan a la misma velocidad que el frente, por lo que es raro verlas ocupando el seno de la colonia.

En cuanto a la formación de crecimientos tridimensionales, se observa un efecto parecido al determinado para los cultivos en medio líquido, pero la formación tridimensional es mucho menos marcada: en forma cualitativa puede decirse que apenas se aprecia como una segunda capa de células sobre la monocapa inicial.

Una diferencia muy importante, incluso tal vez la más llamativa junto al

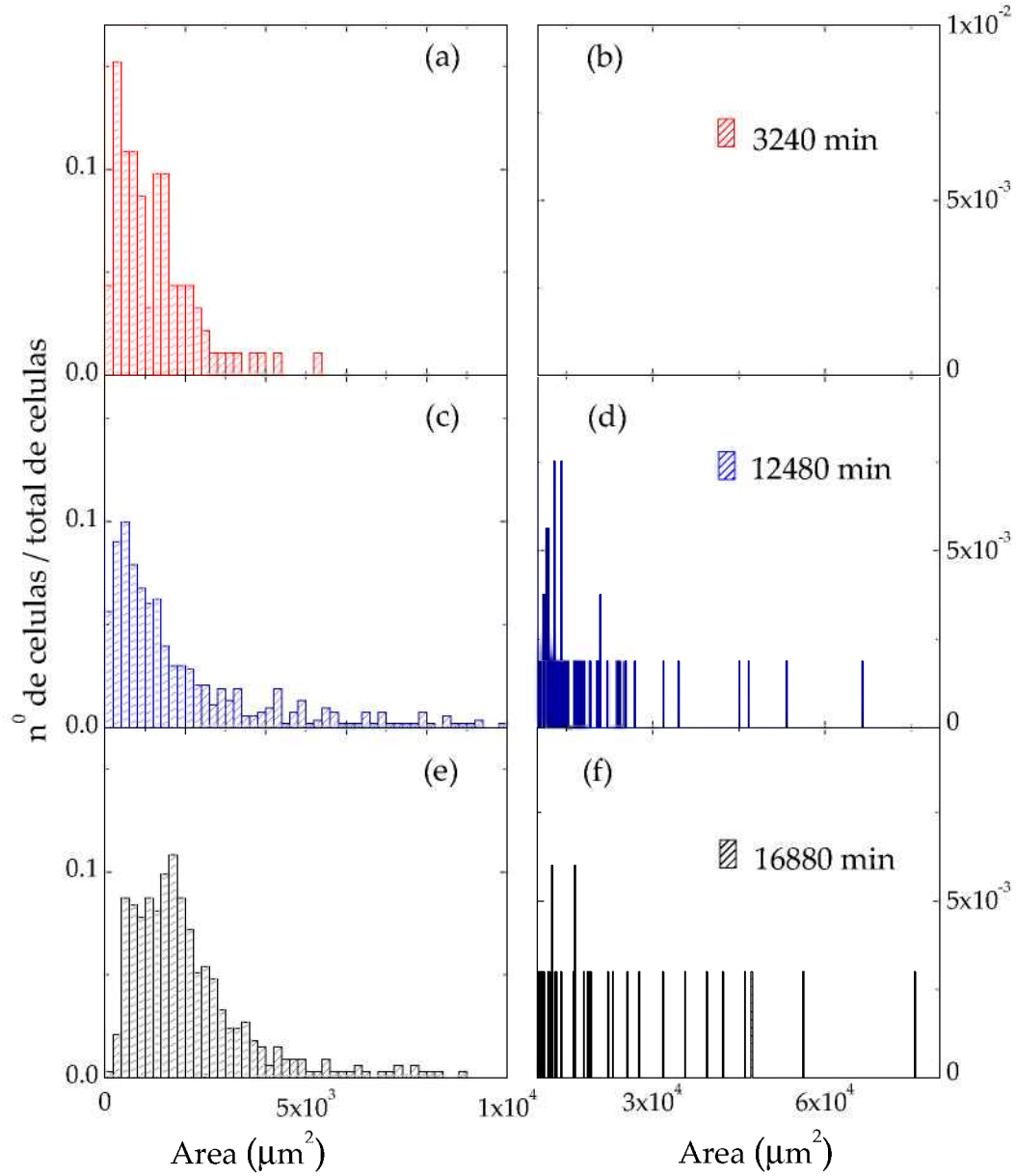


Figura 7.3: Histogramas que muestran la distribución de tamaños de células Vero en presencia de metil celulosa, a distintos tiempos de cultivo. Para una mejor visualización, en la columna de la izquierda se muestra la distribución hasta un valor de  $10^4 \mu m^2$  y en la derecha para tamaños que van de  $10^4$  a  $8 \times 10^4 \mu m^2$ .



desarrollo de células tan grandes, es la distribución relativa de éstas respecto de las células de tamaños más convencionales (no más de  $50 \mu\text{m}$  de diámetro, como valor aproximado). Las células grandes tienden a distribuirse en la interfaz como grandes extensiones que asemejan un bloqueo para las células más pequeñas. Estas sin embargo, tienden también a permanecer agrupadas, alcanzando la interfaz a través de los espacios que quedan ocasionalmente formados entre la masa de células gigantes, dando la impresión de que éstas actuaran como un bloqueo para el avance de las más pequeñas [Fig. 7.1 (b)]. Este fenómeno, aparentemente extraño, ha sido observado en la formación de diversas interfaces no biológicas y se lo conoce como *pinning* [21].

## 7.2. Análisis de los frentes lineales de crecimiento

Las experiencias realizadas en presencia de metil celulosa muestran que el crecimiento de las colonias continúa con la misma cinética de desplazamiento lineal, pero a una velocidad que es aproximadamente la mitad del valor que exhiben las mismas colonias en medio líquido, esto es una velocidad  $\langle v \rangle = (0,13 \pm 0,01) \mu\text{m}/\text{min}$ , como se desprende de la pendiente de la gráfica (Fig. 7.4). Esto implica que la aparición de células gigantes, y en proporciones mucho más elevadas que en condiciones estándar, no se ve reflejada en los valores de  $\langle h \rangle$  ni en su relación con el tiempo, ya que no se manifiestan cambios de cinética, ni quiebres en la curva de velocidad (Fig. 7.4).

La dimensión fractal de estas colonias coincide con la hallada para medios de cultivo estándar mostrando un valor de  $d_f = 1,23 \pm 0,05$  independientemente del tiempo (Fig. 7.5). Esto significa que el agregado de la metil celulosa no modifica la estructura de las ramificaciones que caracterizan al frente de crecimiento.

Una vez corroboradas la fractalidad y la cinética lineal de desplazamiento se prosiguió con el análisis de la rugosidad de los frentes de crecimiento. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente para las células Vero y las células HeLa, el análisis de escalado dinámico se llevó a cabo sobre los contornos experimentales y corregidos, pero la determinación del exponente  $\alpha$  de rugosidad se realizó, por simplicidad, directamente considerando la región de  $l > 100 \mu\text{m}$ , esto es, donde tanto datos experimentales como corregidos se solapan y convergen en una única curva.

Las curvas de rugosidad con el tiempo muestran claramente dos tipos de

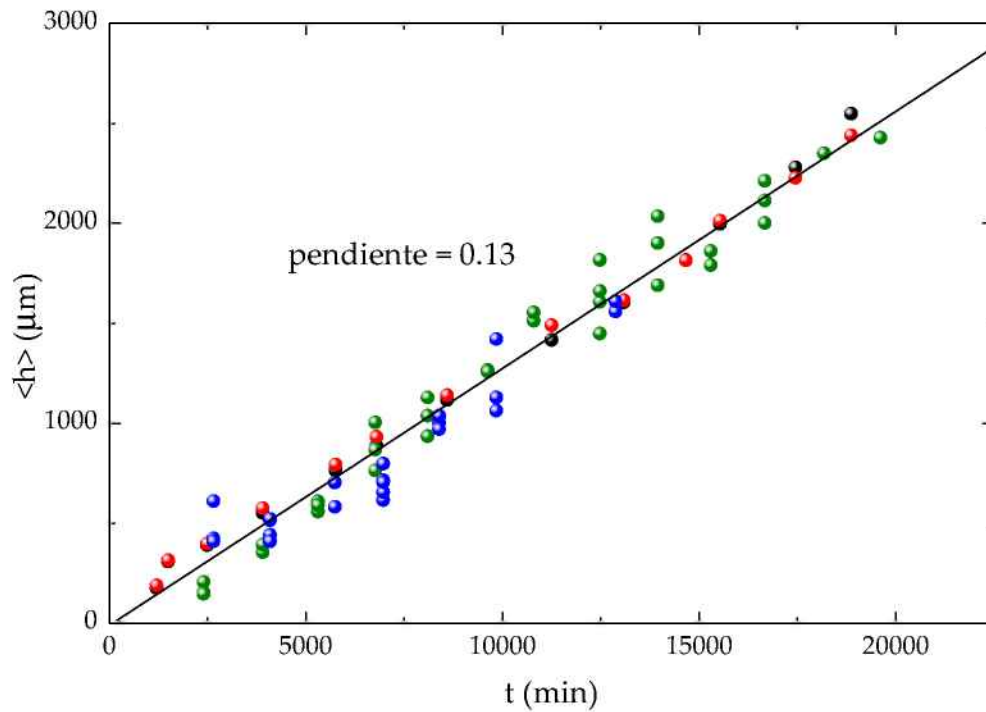


Figura 7.4: Variación de la altura media de desplazamiento del frente con el tiempo de crecimiento, en medio de cultivo con metil celulosa. Cada color corresponde a un experimento diferente.

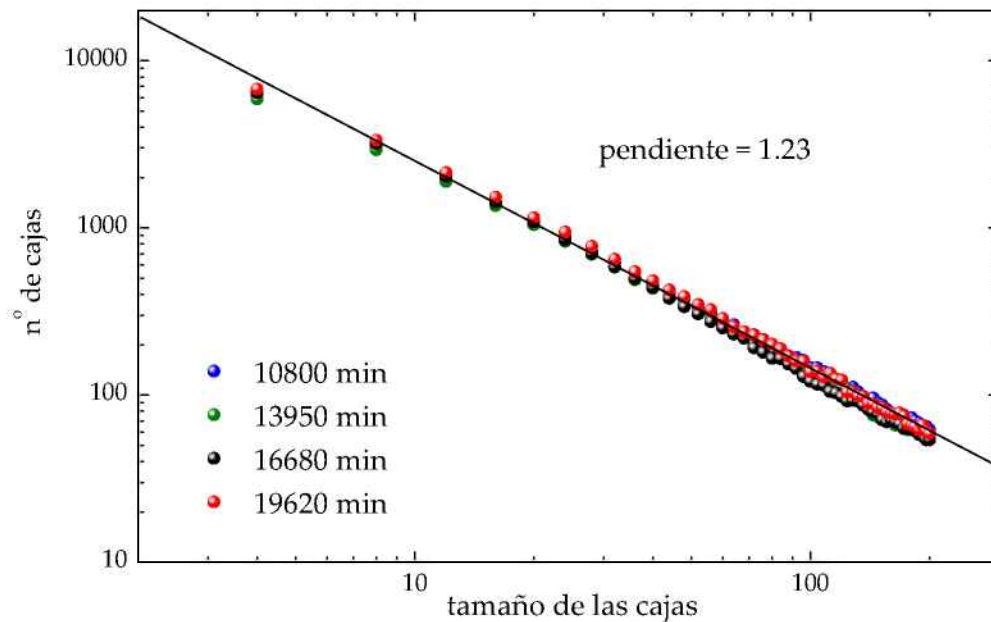


Figura 7.5: Dimensión fractal del frente de una colonia de células Vero, en presencia de metil celulosa, calculada a partir del método del conteo de cajas, a distintos tiempos de crecimiento.

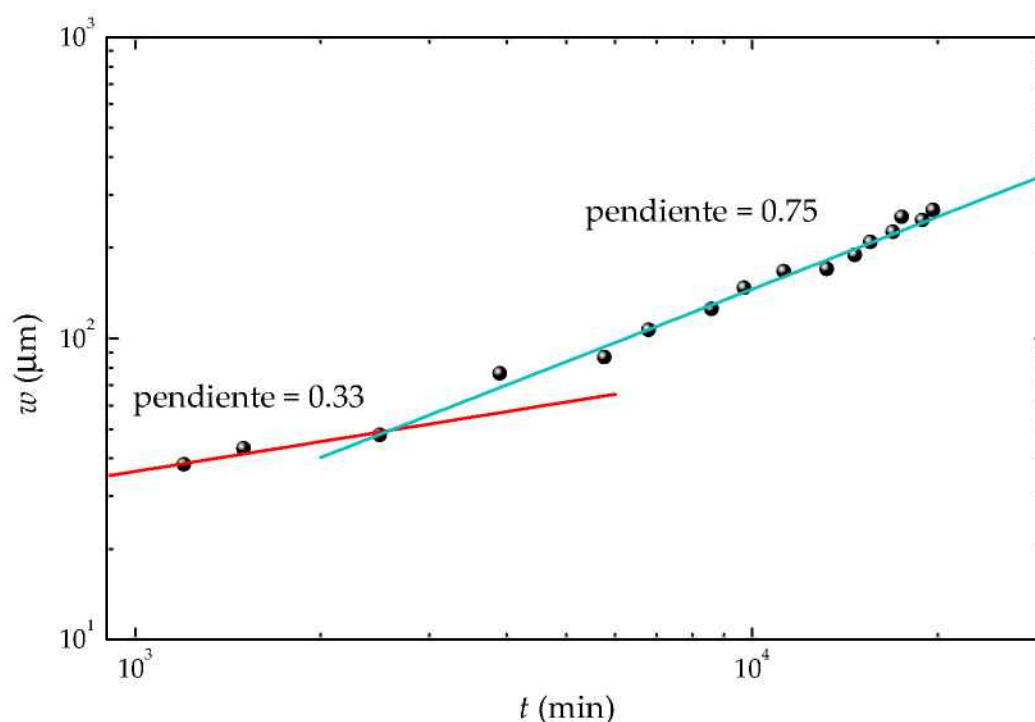


Figura 7.6: Variación de la rugosidad del frente con el tiempo de crecimiento de las colonias en medio de cultivo con metil celulosa al 2,5%. Los datos corresponden a los valores promediados de las diferentes colonias.

comportamiento lineal. El primero de ellos se observa a tiempos iniciales y muestra una pendiente de  $0,33 \pm 0,03$ , en acuerdo con los resultados obtenidos en ausencia de metil celulosa (Capítulo 5). Sin embargo, para tiempos mayores a 2000 minutos la pendiente cambia a un valor de  $0,75 \pm 0,04$ . Este resultado, que corresponde al valor del exponente de crecimiento  $\beta$ , muestra que la rugosidad aumenta a una velocidad mucho mayor que la inicial (Fig. 7.6).

Por otra parte, las curvas de rugosidad para diferentes tamaños del frente exhiben una región inicial recta con una pendiente de  $0,63 \pm 0,05$ , correspondiente al exponente  $\alpha$  de rugosidad, alcanzando la saturación a tamaños mayores como es de esperar para sistemas que no saturan en el tiempo (Fig. 7.7). El análisis de la rugosidad en el espacio de Fourier muestra que las curvas del factor de estructura versus la frecuencia exhiben una región lineal en el rango de frecuencias que va de 0.02 a 1, con una pendiente de  $-2,26$ , que se

corresponde con un exponente  $\alpha = 0,63 \pm 0,05$  (Fig. 7.8). En consecuencia, se puede observar que los exponentes críticos  $\alpha$  y  $\beta$ , que definen el posible mecanismo de crecimiento, han aumentado significativamente respecto de los encontrados para colonias de células Vero y HeLa en condiciones de cultivo estándar. Esto implica que la presencia de la metil celulosa en el medio de cultivo ha afectado no sólo los patrones morfológicos de la colonia y su velocidad de desplazamiento, sino también su mecanismo de crecimiento.

Con el nuevo set de exponentes se calcularon los colapsos para la relación de escalado de Family-Vicsek (Fig. 7.9). Como puede observarse, las curvas tanto de rugosidad como de factor de estructura, muestran un buen colapso para los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  obtenidos independientemente, confirmando la existencia de un cambio de mecanismo de crecimiento.

### 7.3. Síntesis

Las colonias de células Vero creciendo en medio de cultivo en presencia de metil celulosa muestran una exacerbación de la evolución temporal de la distribución de tamaños y formas a lo largo de las colonias. Esto se manifiesta principalmente por el gran número de células gigantes, varias veces mayores que las halladas en los cultivos en condiciones estándar.

La dinámica de crecimiento de estas células también se ve afectada. La velocidad de desplazamiento disminuye a la mitad, respecto al medio sin metil celulosa, mientras que la velocidad con que cambia la rugosidad con el tiempo es mucho mayor. Esto queda de manifiesto a través del valor del exponente de crecimiento  $\beta$  que pasa de un valor inicial de 0,33 a 0,75. El exponente de rugosidad también se ve incrementado, alcanzando el valor de 0,63. Estos nuevos exponentes indican que la dinámica de crecimiento ha cambiado.

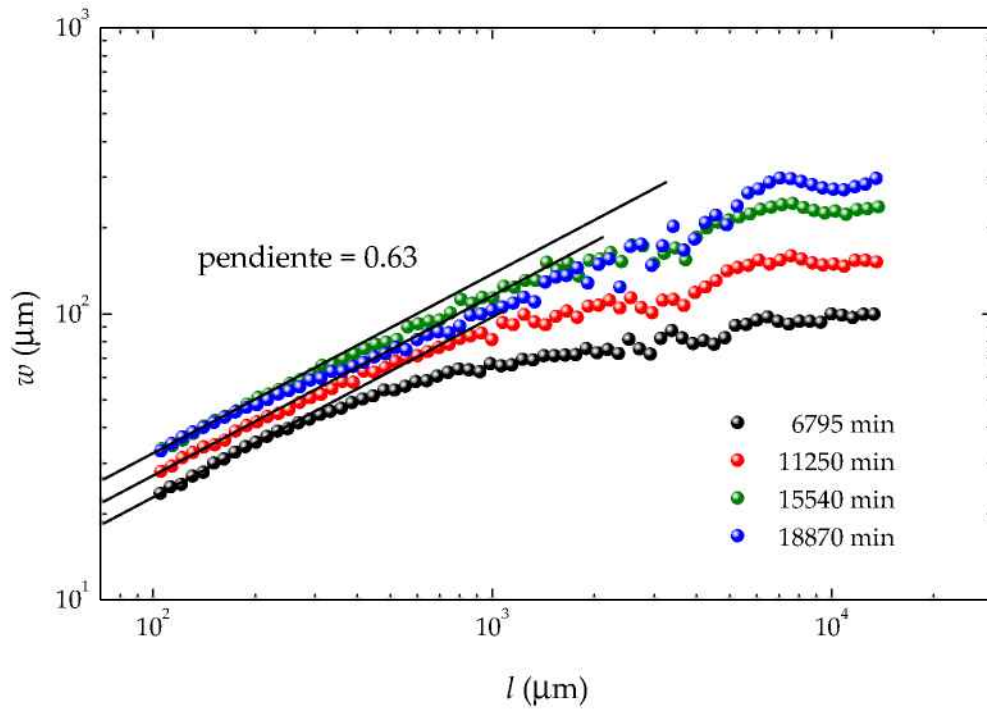


Figura 7.7: Variación de la rugosidad con el tamaño del frente de la colonia, en medio de cultivo con metil celulosa al 2,5 %, a distintos tiempos de crecimiento.

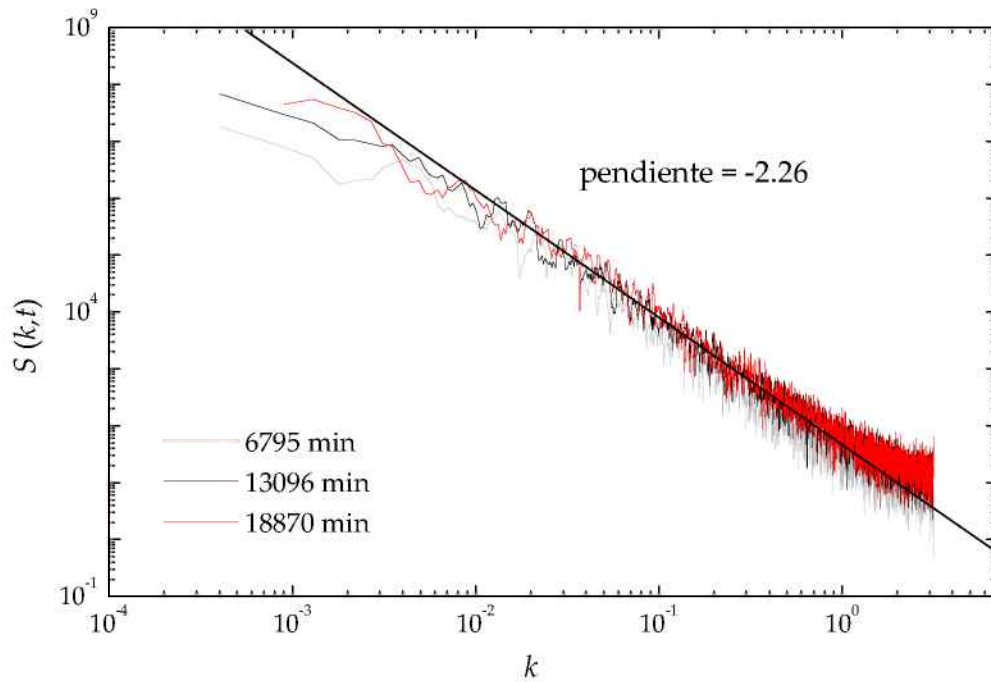


Figura 7.8: Variación del factor de estructura con la frecuencia. La línea recta de pendiente  $-2,26$  se corresponde con un valor de  $\alpha = 0,63$ .

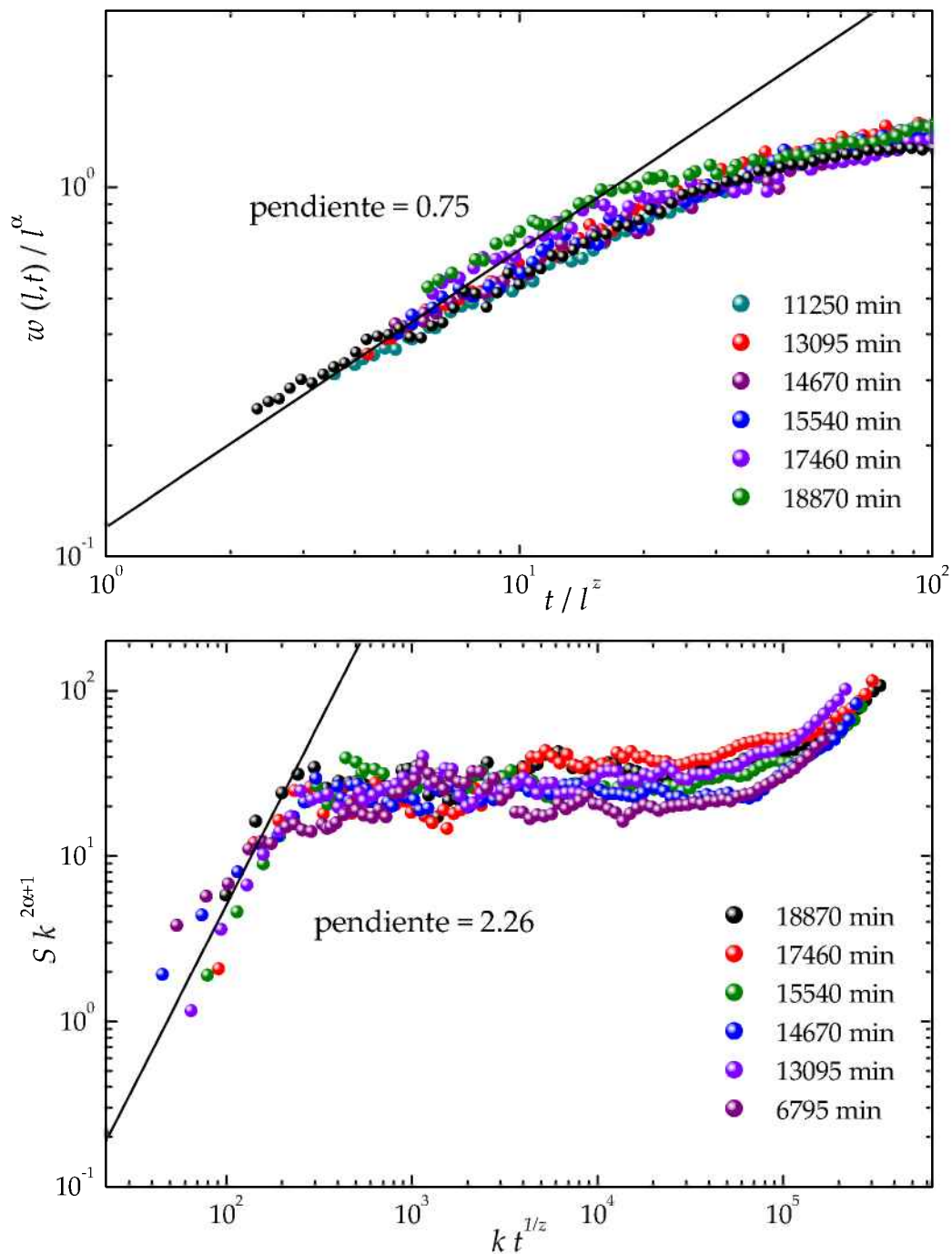


Figura 7.9: Colapsos de las curvas de rugosidad y de factor de estructura según las relaciones de escalado de Family-Vicsek (ecuaciones 2.12 y 2.22), para valores de  $\alpha = 0,63$  y  $\beta = 0,75$ . Se indican los tiempos de crecimiento de cada colonia.

---

## Discusión

Los resultados expuestos a lo largo de los capítulos precedentes muestran, en primer lugar, que el crecimiento y desarrollo de las colonias de células Vero y HeLa no dependen del método de cultivo empleado. En todos los casos, las colonias se forman inicialmente a partir de un conjunto homogéneo de células morfológicamente similares. Estas células iniciales se acomodan en contacto unas con otras sin dejar espacios vacíos pero formando una monocapa que respeta los límites intercelulares. Con el paso del tiempo, las colonias evolucionan hacia un marcado pleomorfismo, con una mayor distribución de tamaños y formas celulares. La aparición de células gigantes, células multinucleadas, el desarrollo de largos filopodios, y una variada distribución de formas que se desarrollan en la región de la interfaz, lleva invariablemente a una disminución de la densidad celular en esta región. Contrariamente, en el seno de las colonias se observa una progresiva disminución del tamaño celular, hasta aproximadamente la mitad de su valor inicial. Estas pequeñas células, de forma redondeada y núcleos prominentes, se encuentran densamente acomodadas y evolucionan hacia la formación de crecimiento tridimensional.

En cuanto a la forma de las colonias se observa que, cuando se desarrollan espontáneamente a partir de pequeños agregados celulares, adquieren en un principio formas llamativamente arbitrarias, no pudiendo ser asociadas a ningún patrón geométrico en particular (Fig. 5.15). La dinámica de estas pequeñas colonias incipientes depende aparentemente de un proceso estocástico de duplicación celular que, debido a la falta de posiciones preferenciales para la formación de nuevas células, tiende a darle a la colonia una forma circular a medida que pasa el tiempo (Figs. 5.16 y 5.17).

El mayor efecto en el desarrollo y crecimiento de las colonias se observa

con la adición de metil celulosa al medio de cultivo. La primer característica diferencial es el elevado número de células gigantes, de tamaños dos o tres veces mayores que las células gigantes halladas en medio líquido. Una posible explicación a este fenómeno es el incremento de la superficie de estas células en un intento de exponer más receptores para capturar un mayor número de factores necesarios para el crecimiento y la supervivencia celular [33]. Es decir que la metil celulosa podría hacer más difícil la llegada de estos factores a la superficie celular debido a que el transporte de material se encuentra disminuido por la viscosidad de la solución, que es 25 veces superior a la del medio líquido, y por la estructura de la metil celulosa que forma canales en el medio. Sin embargo, no puede ignorarse el hecho de que las modificaciones de la rigidez de la matriz extracelular son suficientes para inducir la transformación de células en cultivo. Como ha sido propuesto en la literatura, el uso de geles de matriz extracelular de alta rigidez altera la expresión de integrinas, incrementa el ensamblado de adhesiones focales y distorsiona la arquitectura tisular (Fig. 1.9) [51].

Las células gigantes comienzan a aparecen alrededor de 72 hs luego de incorporada la metil celulosa y se siguen observando en alta proporción hasta el fin de las experiencias, que duran aproximadamente el doble de tiempo que las experiencias equivalentes desarrolladas en condiciones estándar. Los dominios de células gigantes se ubican principalmente en la interfaz de la colonia y se caracterizan por estar distribuidos formando “pasillos” para el avance y formación de las células más pequeñas (Fig. 7.1).

La cinética de expansión de las colonias muestra una fuerte dependencia con el número de células. El radio de una colonia formada por un pequeño número de células se incrementa exponencialmente con el tiempo, pero una vez alcanzada una cierta población, continúa creciendo a velocidad constante [30, 93, 101]. Esta transición en el régimen de desplazamiento concuerda con ciertos modelos computacionales que indican la existencia de tres fases de crecimiento (ecuación 5.8). Según el modelo propuesto [93], existiría una primer etapa de crecimiento difusional que sigue un régimen de ley de potencias con la raíz cuadrada del tiempo, seguido de una etapa de transición exponencial hasta alcanzar finalmente un régimen lineal de desplazamiento a velocidad constante. La aparición de este efecto de retardo estaría asociada al efecto de inhibición por contacto de la división celular a medida que la población se incrementa. Según este modelo, la sección transversal de la colonia podría ser dividida entonces en dos regiones: una central de células quiescentes y un anillo exterior, de un cierto radio efectivo  $\Delta R$ , donde se lleva a cabo la duplicación celular contribuyendo a la expansión de la colonia [93]. El ajuste



de nuestros datos experimentales muestra una coincidencia muy buena con el modelo teórico, teniendo en cuenta los errores experimentales (Fig. 5.29). Sin embargo, la fenomenología del crecimiento de las colonias difiere de las suposiciones del modelo. Los experimentos muestran que la transición del régimen de exponencial a lineal aparece acompañada de importantes cambios en las características de las colonias como son: (i) el cambio del frente de crecimiento desde una morfología arbitraria a una casi circular a medida que crece la población (Fig. 5.16); (ii) una disminución en el tamaño celular desde la periferia hacia el seno de la colonia (Fig. 5.21); (iii) la aparición gradual de células gigantes, principalmente en la región de la interfaz (Figs. 5.16 y 5.18); (iv) la formación de crecimiento tridimensional en el seno de la colonia (Fig. 5.18). Más aún, la proliferación celular, de acuerdo con la marcación del antígeno nuclear PCNA, ocurre en todo el dominio la colonia (figuras 5.27 y 6.3). En consecuencia, el enlentecimiento del desplazamiento de los frentes de crecimiento, que había sido adjudicado hasta ahora al proceso de inhibición por contacto [30,93], involucra en realidad un número importante de fenómenos cooperativos y de interacciones biológicas y fisicoquímicas mucho más complejas, ya que si bien el frente de las colonias tiende a desplazarse linealmente, la población aparentemente sigue creciendo exponencialmente (Figs. 5.25, 5.26 y 5.28).

A pesar de la complejidad de factores que influyen en el desplazamiento de las colonias, la velocidad de desplazamiento alcanza siempre un valor constante que depende de la naturaleza de las células (Vero o HeLa) pero también de las propiedades del medio: la presencia de metil celulosa muestra claramente que la velocidad de desplazamiento de las colonias de células Vero disminuye a la mitad. En este último caso, no está todavía establecido si el efecto proviene del aumento de la viscosidad del medio, de un cambio en la interacción célula-sustrato, dado que la región de la cápsula de Petri por donde avanza la colonia está cubierta por metil celulosa, o de una disminución marcada en la tasa de reproducción de células cuando el medio de cultivo contiene metil celulosa. Si bien el estudio de estos efectos escapa al objetivo del trabajo de tesis, lo importante a destacar es que las colonias siempre se expanden a velocidad constante a partir de un cierto punto de “confluencia”, permitiendo entonces la aplicación de la teoría de escalado dinámico, y la obtención de los exponentes críticos, que permitan establecer el posible mecanismo de crecimiento.

Cuando los frentes de las colonias han alcanzado una cierta población, de alrededor de 1000 células, independientemente del patrón geométrico, esto es, circular o lineal, las colonias se expanden a velocidad constante y la dinámica de crecimiento puede ser analizada según la teoría de escalado dinámico, a

pesar de las diferencias entre el sistema experimental y los modelos teóricos. Los modelos de crecimiento de fases condensadas se basan generalmente en sistemas de partículas puntiformes, que llegan desde el exterior del sistema para depositarse sobre la fase en crecimiento. Por el contrario, una colonia de células está compuesta de unidades de tamaños del orden de decenas de micrones y el crecimiento de las colonias se desarrolla por duplicación celular desde la propia colonia, y no por la llegada de partículas desde el exterior. Más aún, el crecimiento se ve afectado también por la deserción ocasional de células, particularmente en los dominios tridimensionales que se van formando en el seno de la colonia, dado que es de esperar que la energía de interacción (adherencia) entre células sea menor que la correspondiente a la de una célula con el sustrato [102–105]. Las células que se desprenden de la colonia continúan creciendo y forman nuevas colonias que con el tiempo contactan la colonia original y forman parte de ella. Esta imagen del crecimiento de las colonias contrasta con la idea de que el avance de los frentes se produce únicamente por división celular en la interfaz, como en el caso sencillo del modelo de Eden [28,66]. Por otra parte, las imágenes obtenidas en tiempo real del movimiento de las células en el frente muestran que las células no difunden hacia las concavidades del mismo, lo cual implica que el crecimiento de las colonias no puede ser explicado por medio del modelo MBE, tal cual lo propuesto por otros autores [30].

Los datos experimentales revelan además nuevas variables para un modelo, como la distribución de tamaños y formas celulares a lo largo de la colonia, el cambio de tamaño que exhiben los sistemas con el tiempo y la presencia de salientes laterales, entre otras. Estas características muestran que los sistemas celulares, aún los más simples como puede ser una colonia celular en cultivo, están más allá del marco simplificado de los modelos clásicos de crecimiento, y al presente muestran los inconvenientes que han surgido para obtener una imagen acabada de la dinámica de crecimiento de las colonias, a pesar de los esfuerzos llevados a cabo por distintos autores [93,106,107].

El análisis fractal de los perfiles de las colonias, tanto radiales como lineales, en presencia o ausencia de metil celulosa, muestra que son estructuras autoafines. El cálculo de la dimensión fractal realizado por el método del conteo de cajas arrojó un valor de  $d_f$  entre 1,20 y 1,25; valores coincidentes dentro del error estimado de  $\pm 0,05$  (Figs. 5.9, 5.30, 6.9 y 7.5), independientemente del tiempo y de la presencia o no de salientes laterales. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, debido a la presencia de estas últimas, los perfiles de los frentes de crecimiento no son estrictamente autoafines desde el punto de vista de una función monovaluada [21].

El estudio de la evolución de la rugosidad del frente de las colonias con el tiempo de crecimiento y la distancia del frente, muestra datos coincidentes para frentes circulares y lineales. Esto permite confirmar, por primera vez, la validez de la aplicación del método y de sus resultados a un sistema circular. Asimismo, el análisis realizado comparando los datos obtenidos de los contornos experimentales y corregidos por la presencia de salientes, permiten validar la aplicación de los modelos a partir de una cierta distancia crítica, esto es, una distancia a partir de la cual la presencia de salientes no influye sobre el valor de la rugosidad del frente considerado. Dado que el valor de esta distancia está en el orden de, a lo sumo, 3 o 4 células, es perfectamente admisible que la rugosidad del frente de cualquier colonia, de geometría circular o lineal, es independiente de las salientes formadas por algunas pocas células del propio frente, permitiendo la aplicación correcta de las ecuaciones de escalado dinámico al sistema biológico.

En el caso del crecimiento de las colonias en medio de cultivo estándar, la dependencia de la rugosidad de los frentes de las colonias con el tiempo de crecimiento (Figs. 5.10 (a), 5.31 (a) y 6.10) permite obtener un exponente de crecimiento  $\beta = 0,33 \pm 0,04$ , que es independiente de la geometría del sistema y del tipo de célula considerada. Por otra parte, la comparación de los gráficos de rugosidad a diferentes tamaños del frente de crecimiento, de datos experimentales y corregidos, muestra que se solapan para valores de  $l$  superiores a una longitud crítica, que crece con el tiempo, y determina el tamaño de la colonia a partir del cual la dinámica se vuelve prácticamente insensible a la presencia de salientes laterales. El efecto opuesto se observa para fracciones del frente menores a este valor crítico. Por lo tanto, la influencia de las salientes laterales sobre el frente de crecimiento disminuye a medida que la fracción aumenta y la rugosidad de la colonia se aproxima a la rugosidad propia de un perfil sin salientes o monovaluado. El incremento del valor de la longitud crítica puede entenderse como un incremento en la densidad de salientes laterales a medida que la rugosidad de la colonia crece con el tiempo.

El análisis de los gráficos de rugosidad que resulta de los datos corregidos por sus salientes muestra una región inicial, para  $l$  entre 10 y 30  $\mu\text{m}$ , que escala con un exponente  $\alpha' = 0,85 \pm 0,05$ ; independientemente del tiempo y del procedimiento experimental. Este exponente de rugosidad, relacionado con tamaños del orden de unas pocas células promedio, puede ser asociado con la rugosidad ocasionada por fluctuaciones de la membrana celular o la aparición esporádica y aleatoria de una saliente lateral. Esta saliente lateral resulta producto del estiramiento de la membrana plasmática o la aparición de una nueva célula en una posición lateral, por duplicación de una célula

vecina. Sin embargo, este exponente de rugosidad no puede ser relacionado con el crecimiento global de la colonia debido a que corresponde a cambios muy locales del frente, que comprenden una distancia de 3 o 4 células, no siendo este dominio representativo de la colonia. Esto implica que  $\alpha'$  no puede ser asociado con la clase universal o modelo de crecimiento de la colonia propiamente dicha, como había sido propuesto en la literatura, llevando a la interpretación de otra clase universal [30, 75].

Por otra parte, cuando se analizan estos gráficos dentro del dominio de la colonia, es decir para valores de frentes mayores a  $100 \mu\text{m}$ , se observa que las curvas presentan una subida suave que tiende a un valor límite de rugosidad que crece con el tiempo (Figs. 5.12, 5.33 y 6.12). Esta tendencia confirma que el crecimiento de la colonia no ha alcanzado la condición de saturación en el tiempo. Sin embargo, para valores del tamaño del frente en el rango de  $150$  a  $1100 \mu\text{m}$ , las curvas tienden a aproximarse a una pendiente cercana a  $0,5$  que se hace más marcada a tiempos avanzados, como es de esperar para un sistema que correlaciona. Los cálculos de factor de estructura para los frentes de las distintas colonias muestran una región de decrecimiento lineal, en el rango de frecuencias de  $0.02$  a  $1$ , con una pendiente que se aproxima al valor de  $-2$ , correspondiendo a un valor de  $\alpha = 0,50$  (Figs. 5.13, 5.34 y 6.13), valor que es independiente del tiempo y del procedimiento experimental empleado. Como hemos visto, este set de exponentes,  $\beta = 0,33$  y  $\alpha = 0,5$  satisface la relación de escalado de Family-Vicsek (Figs. 5.14, 5.35, 6.14 y 6.15).

En base a estos resultados, se puede establecer que el crecimiento de colonias celulares en medio de cultivo estándar puede explicarse según el modelo de crecimiento de interfaces propuesto por Kardar, Parisi y Zhang, es decir, el crecimiento de las colonias pertenecería a la clase universal KPZ [69].

Como se mencionó en el capítulo 2, la ecuación de Kardar, Parisi y Zhang para el crecimiento de una colonia autoafín bajo un régimen de velocidad constante comprende tres contribuciones: un término lineal, un término no lineal y un término estocástico.

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = \nu \nabla^2 h + \frac{\lambda}{2} (\nabla h)^2 + \eta(x, t) \quad (8.1)$$

El primer término a la derecha de la ecuación es el término lineal que representa la relajación superficial, que tiende a producir un suavizado de la superficie. Este término involucra un coeficiente de tensión superficial  $\nu$ , que contribuye a la formación del perfil disminuyendo las irregularidades y por lo tanto cambiando el valor promedio de la altura de las protrusiones. El segundo término, no lineal, contribuye al incremento del área de crecimiento lateral

de las protrusiones. En este caso, el crecimiento lateral de las protrusiones ( $\lambda > 0$ ), dado por duplicaciones, deformaciones o desplazamientos celulares, incrementa la altura promedio de los frentes. El tercer término corresponde al ruido gaussiano,  $\eta(x, t)$ , y se relaciona con la distribución al azar de células en división. Este proceso se caracteriza por la duración promedio del ciclo celular, que depende de un gran número de variables que escapan a alcance de este trabajo.

Es interesante destacar que los resultados experimentales coinciden con las predicciones del modelo de autómatas celulares sobre una red irregular [64], en el cual tienen en cuenta que los efectos de la división celular y la presión ejercida por las propias células lleva a la migración celular [64, 93, 94]. Este modelo supone que la división celular no está restringida a la región del frente de la colonia y que la migración celular está desencadenada por la división de una de ellas con el fin de minimizar el estrés mecánico en la vecindad. Si bien las descripciones modelísticas muchas veces no coinciden con la realidad, en este caso, tanto modelo como experiencia son consistentes en asignar la dinámica de crecimiento a la clase universal KPZ, la cual implica que el avance del frente de la colonia contiene un aporte de crecimiento lateral. Por otra parte, es importante remarcar que las dos líneas celulares analizadas en este trabajo presentan dinámicas de crecimiento similares, a pesar de su diferente naturaleza tumoral. Mas aún, las células de la línea Vero provienen no sólo de un tejido renal no neoplásico, sino que, como se ha mostrado aquí, son de origen mesenquimático (Fig. 5.1) de una especie no humana (*Cercopithecus aethiops*), mientras que las células HeLa, provienen de un carcinoma de cuello uterino, de origen humano.

Ahora bien, cuando el medio de cultivo se modifica, sin alterar otras condiciones fisicoquímicas aparte de la viscosidad, el análisis de escalado dinámico de los frentes de crecimiento muestra que la rugosidad crece mucho más rápido con el tiempo para estos sistemas, alcanzando un exponente de crecimiento  $\beta = 0,75 \pm 0,05$ , a pesar de que la velocidad de desplazamiento de la colonia se encuentra disminuida a la mitad de su valor original. Asimismo, el exponente de rugosidad alcanza un valor de  $\alpha = 0,63 \pm 0,02$ , valores ambos que son confirmados por el buen colapso de las curvas de rugosidad y de factor de estructura correspondientes (Fig. 7.9). De ello se desprende que la dinámica de crecimiento ha sido modificada. Comparativamente, el elevado valor de  $\beta$  indica que el aumento de la rugosidad del frente de crecimiento ocurre muy rápidamente, por encima de lo esperado para una simple dinámica de Kardar, Parisi y Zhang. Esto puede ser una consecuencia del hecho de que parte del frente de crecimiento se encuentra obstaculizado en ciertas regiones donde

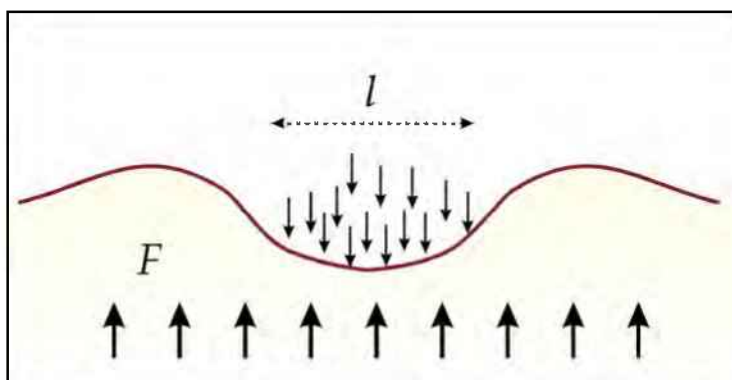


Figura 8.1: Esquema del proceso de “pinning” de una porción de ancho  $l$  de la interfaz. Las impurezas locales se representan como flechas pequeñas que se oponen al movimiento de la interfaz, actuando en contra de la fuerza de desplazamiento  $F$ , y de las fuerzas elásticas generadas por la curvatura local de la interfaz.

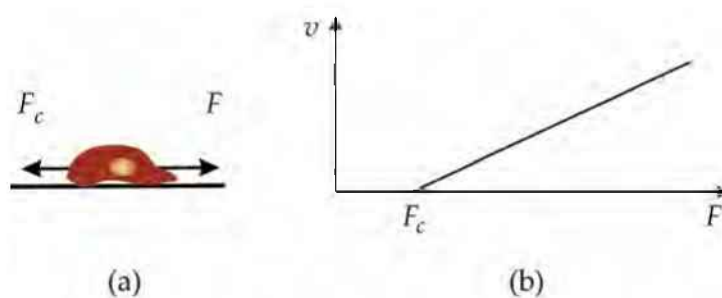


Figura 8.2: Transición “pinning-depinning” de una partícula única en un plano (en este caso la partícula está representada como una célula). a) La partícula sufre el efecto de dos fuerzas que actúan en dirección contraria: la fuerza  $F$  de avance y la fuerza  $F_c$  de frenado. b) Velocidad de la partícula como función de la fuerza de avance  $F$ .

aparecen significativas fuerzas de frenado (“pinning”), mientras que en otras partes avanza sin mayor resistencia (Fig. 8.1). En este caso, aparece una competencia entre una fuerza de frenado  $F_c$  y la fuerza  $F$  de avance del sistema en crecimiento. La interfaz aparece frenada cuando  $F < F_c$ , y se mueve a velocidad constante cuando  $F > F_c$ . Esto es lo que en el campo de la física de las interfaces se conoce como transición “pinning-depinning” (Fig. 8.2).

Un hecho interesante es la presencia de un valor de  $\beta$  de 0,33 durante las

primeras 24 horas de cultivo en medio con metil celulosa. Esto implica que el proceso de frenado del sistema no es inmediato, sino que lleva un tiempo su aparición. Una posibilidad, de acuerdo a las imágenes obtenidas, sería adjudicar el proceso de “pinning” a las células gigantes que aparecen en el frente luego de un cierto tiempo de cultivo en presencia de metil celulosa, de forma tal que cuando todavía no se han formado, la dinámica sigue el proceso clásico descrito por la ecuación 2.32 y por lo tanto se obtiene el valor de 0,33. Sin embargo, no se observan cambios en la velocidad de desplazamiento de la colonia cuando aparecen las células gigantes. Es más, medidas realizadas sobre el desplazamiento de las células gigantes y las células más pequeñas del cultivo, indican que ambas se mueven con la misma velocidad. Esto hace pensar entonces que el efecto proviene de la presencia de la metil celulosa, la cual, si bien es inerte respecto al desarrollo de las células en el cultivo, pondría de alguna manera un freno al avance de la colonia y el desarrollo de la rugosidad del frente. De hecho, la metil celulosa tiene la particular propiedad de que a bajas temperaturas es soluble y actúa como espesante del medio y al aumentar la temperatura comienza a solidificar funcionando como un gelificante. Estudios experimentales [108] sobre la estructura de la metil celulosa en agua han propuesto la formación de una compleja red consistente en dominios hidrofóbicos unidos por cadenas de tamaño del orden de  $10000 \text{ g mol}^{-1}$ .

En todo caso, el conjunto de exponentes críticos resultantes del crecimiento de las colonias de células Vero en presencia de metil celulosa, corresponde a los esperados para un proceso donde la dinámica de crecimiento ha cambiado desde KPZ ( $\alpha = 0,5$ ;  $\beta = 0,33$ ) a tiempos iniciales, a valores significativamente superiores, cuando el tiempo de crecimiento de la colonia es suficientemente largo como para que la presencia de metil celulosa tenga efecto sobre el desarrollo de la interfaz. Los valores de  $\alpha = 0,63$  y  $\beta = 0,75$  son los esperados para un sistema que crece bajo la influencia de un proceso de “frenado” a nivel local. En este caso se habla de que existe un “ruido” extinguido (“quenched noise”), esto es, el “ruido”  $\eta(x, t)$ , que en la ecuación de KPZ es el que genera la rugosidad y expresa un crecimiento al azar en el tiempo, en el caso de la existencia de obstáculos en el frente de crecimiento, es reemplazado por un ruido  $\eta(x, h)$  que es ahora función del lugar donde ocurre. Esta forma de ruido expresa un fenómeno físico claro, por ejemplo, cuando un líquido penetra en un medio poroso y encuentra resistencias locales para su movimiento que no cambian explícitamente con el tiempo sino con la posición. Las simulaciones teóricas de tales procesos muestran que la rugosidad de la interfaz aumenta con mayor velocidad, dando exponentes de crecimiento del orden de 0,7–0,8, reflejando que parte de la interfaz se encuentra obstaculizada en ciertas re-

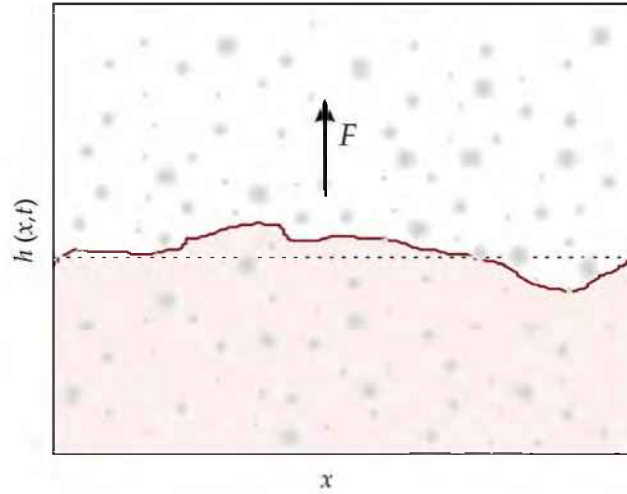


Figura 8.3: Esquema de la misma interfaz representada en la figura 2.20 pero creciendo en un medio desordenado. Los círculos sombreados representan la distribución aleatoria de los obstáculos (“pinning”).

giones a causa de una gran resistencia para el avance de la misma [109]. En consecuencia, la ecuación de KPZ puede ser modificada como

$$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = \nu \nabla^2 h + \frac{\lambda}{2} (\nabla h)^2 + \eta(x,h) \quad (8.2)$$

En este caso, el término  $\eta(x,h)$  incluye el ruido producido por la heterogeneidad (o “desorden”) del medio (Fig. 8.3). De este modo el término correspondiente al ruido propio de las fluctuaciones debidas a la aparición de células y deformaciones de membrana en el frente de la colonia,  $\eta(x,t)$ , se transforma en un “ruido”  $\eta(x,h)$ , que depende de la posición y no varía con el tiempo. La aparición de efectos de “pinning” ha sido considerada también en modelos denominados de “depinning” auto-organizado (*self-organised depinning* o SOD) en los cuales el avance de la interfaz ocurre en los puntos donde la perturbación es la mínima del frente de crecimiento. Esta clase universal ha sido hallada para interfaces que, siguiendo una dinámica de tipo KPZ, han sido sometidas a un bloqueo local del crecimiento [21, 83–85].

La aparición de este fenómeno en el crecimiento de las colonias de células Vero abre una nueva perspectiva para el estudio de sistemas neoplásicos, dado que surge la posibilidad de modificar la dinámica de crecimiento celular por la presencia de una sustancia no tóxica.



---

## Conclusiones

A través de los capítulos anteriores hemos demostrado que es posible estudiar el crecimiento de colonias de líneas celulares mediante la aplicación de la teoría del escalado dinámico. Este resultado no es trivial dado que existen varios factores que podrían haber llevado a resultados poco satisfactorios, como el que tradicionalmente se conoce como “variabilidad biológica”. Resulta realmente impactante observar que células de tan variados orígenes, como son la línea Vero, de origen renal proveniente del *Cercopithecus aethiops* y la línea HeLa, con origen en el cáncer de cuello uterino de una mujer, presentan un comportamiento similar y altamente reproducible, al punto de poder ser descrito mediante un modelo matemático inicialmente desarrollado para sistemas de partículas. Pareciera ser entonces que el crecimiento de las colonias no depende de las características particulares de las células sino del comportamiento colectivo y cooperativo que mantienen.

El desarrollo de metodologías adecuadas para el crecimiento de colonias con frentes de distinta geometría, permitió contrastar una teoría, desarrollada para sistemas lineales con frentes de crecimiento sin protuberancias, con el sistema experimental que involucraba una geometría radial, morfología que naturalmente exhibe una colonia de células durante su crecimiento. Muchos autores, la mayoría de ellos investigadores teóricos, habían discutido vastamente, como ha sido mencionado anteriormente, sobre la factibilidad de la aplicación o no del escalado dinámico a sistemas de tamaño creciente. Los datos experimentales aquí presentados han resultado muy claros en cuanto a que las colonias de células con frente radial no sólo satisfacen las leyes de escalado, sino que además lo hacen siguiendo las mismas leyes que para un sistema con frente lineal.

La existencia de salientes o protuberancias en el frente de un sistema en crecimiento es frecuentemente obviado en los análisis teóricos, lo cual presenta ciertamente una limitación cuando se intenta estudiar un sistema real. Los resultados expuestos muestran que tal complicación en el análisis de escalado dinámico de las colonias celulares resulta inexistente cuando el tamaño del sistema alcanza un valor crítico que se lo puede relacionar con la diferenciación entre lo que es un “dominio” de la membrana celular y lo que es un “dominio” de la colonia. Esta otra variable permite por lo tanto, más allá de una cierta longitud crítica, corregir los contornos de la colonia, eliminando las “entrantes”, y aplicar correctamente la metodología de escalado dinámico.

El modelo de crecimiento, o clase universal, desarrollado por Kardar, Parisi y Zhang y establecido para diversos sistemas no biológicos, resulta ser también el seguido por las colonias de células estudiadas. Esto permite afirmar que la expansión de una colonia de células, que se desplazan con una velocidad constante, ocurre a partir del desarrollo de un perfil cuya rugosidad se incrementa con el tiempo siguiendo una ley de potencias con un exponente de crecimiento  $\beta = 0,33$ . El incremento de la rugosidad tiene entonces lugar a través del avance y crecimiento del frente con expansión lateral debido a la formación de nuevas células, y no por difusión de células del frente hacia sectores más coordinados (concavidades) como había sido propuesto anteriormente. Las mediciones *in situ* del crecimiento de las colonias confirman este hecho, ya que el seguimiento fotográfico por más de 72 hs no muestra ninguna célula difundiendo hacia una concavidad, sino simplemente avanzando en la dirección de crecimiento del frente.

La posibilidad de modificar el modo de crecimiento de una colonia celular, es decir que crezca con otra dinámica, mediante el simple agregado de una sustancia no tóxica, como es la metil celulosa, al medio de cultivo abre nuevas perspectivas al estudio del crecimiento de sistemas biológicos. Esto implica, por ejemplo, la posibilidad de inducir en forma local modificaciones en la dinámica de expansión de tejidos normales o patológicos, permitiendo que un tejido específico se vea más o menos afectado por la presencia de un modulador, según sea un tejido que se pretende preservar o destruir.

Una perspectiva interesante resulta también la de poder emplear el cálculo de la dimensión fractal y la aplicación del escalado dinámico a imágenes obtenidas por métodos complementarios de diagnóstico. Tales aplicaciones podrían ser la predicción de un comportamiento y la estadificación de una patología, la selección de un tratamiento sobre otro o el estudio de la respuesta al mismo, entre otras.

La pregunta final y lógica que subyace en este trabajo es: ¿qué aporta dentro del campo específicamente médico el conocimiento de los fenómenos estudiados?. Hemos hablado de fractalidad, escalado y rugosidad, términos que no son comunes en el campo de la medicina, y a través de ellos intentado explicar cómo crecen colonias de células inmortales. El problema del cáncer puede ser mirado de diferentes formas: la búsqueda de métodos cada vez más efectivos para extirpar o matar a los tumores; la búsqueda de los mecanismos que a nivel molecular regulan su crecimiento, con el fin de modificarlos; la búsqueda de las leyes fisicoquímicas que regulan el desarrollo de la superficie o interfaz del tumor, para ver la posibilidad de controlar o modificar su dinámica de crecimiento, la cual lógicamente incluye el desarrollo de vasculaturas. En este sentido, aunque se conocen los actores principales a nivel molecular del proceso de angiogénesis, los principios físicos que determinan la morfología global de la red vascular en los tejidos tumorales no es todavía conocida. Allí es donde entran a jugar los conceptos de desarrollo de estructuras fractales y de cuán “rugosa” es la estructura, qué factores la determinan y cómo es el proceso a través del cual se desarrolla. Evidentemente, desde el punto de vista biológico, no es posible actualmente trabajar sobre estructuras de tumores *ex situ*, que por otra parte al ser objetos tridimensionales requieren un tratamiento matemático mucho más complejo, pero sí es posible tomar como modelo inicial a un cultivo de células tumorales y ver si hay forma de encontrar principios físicos y leyes que permitan describir el fenómeno y eventualmente aporten herramientas para el control o modificación del desarrollo de los mismos. En este sentido, el empleo de relaciones de “escalado” en lo que respecta a cómo se desarrolla la “rugosidad” del frente de las colonias, ha permitido encontrar que los bordes de las mismas siguen una dinámica de crecimiento que se puede sintetizar en una ecuación matemática (KPZ) que contiene parámetros que están relacionados con procesos físicos específicos. La posibilidad de modificar estos parámetros o de alterar este proceso natural por cambios en el entorno, permiten ver más allá del simple caso de cultivos: abre la posibilidad de avanzar en el desarrollo de modelos y experimentos que permitan alcanzar el manejo de las superficies de los tumores y de esa manera controlar su interacción con el medio circundante.



---

## Apéndices

### 10.1. Apéndice I: Transformada de Fourier

#### 10.1.1. Aproximación intuitiva

El Teorema de Pitágoras nos dice que dado un triángulo rectángulo, el cuadrado de la hipotenusa es igual a la suma del cuadrado de los catetos:

$$h^2 = a^2 + b^2 \quad (10.1)$$

donde  $h$  es la hipotenusa,  $a$  es un cateto y  $b$  es el otro. Una de las ventajas principales de este importante teorema es que permite descomponer el vector  $h(x, y)$ , que representa a la hipotenusa enmarcada por un eje de coordenadas, en dos componentes  $a(x, 0)$  y  $b(0, y)$ . Esto es así pues los catetos tienen la propiedad de ser ortogonales o perpendiculares, como se muestra en la figura 10.1.

Este teorema no se encuentra restringido únicamente al caso de dos dimensiones, ni al caso de vectores. Es posible plantearlo en forma genérica para vectores o funciones de cualquier tipo y dimensión, llegándose a la forma generalizada del teorema de Pitágoras: si  $\{g_i\}_{i=1}^{\infty}$  es un conjunto ortogonal de funciones en el espacio vectorial  $E$ , cualquier combinación lineal finita de elementos del conjunto satisface la condición

$$\left\| \sum_{i=1}^m a_{n_i} g_{n_i} \right\|^2 = \sum_{i=1}^m a_{n_i}^2 \|g_{n_i}\|^2 \quad (10.2)$$

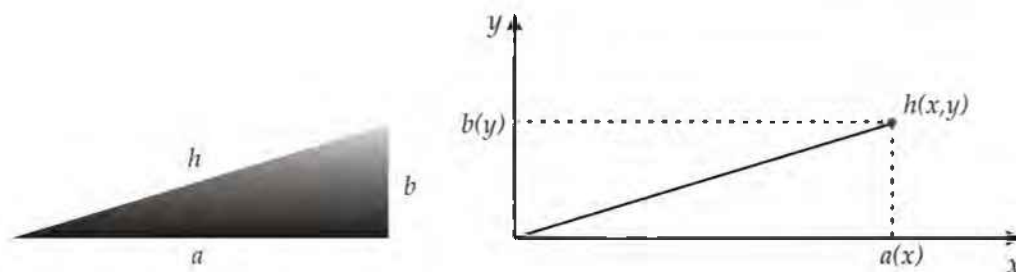


Figura 10.1: Representación de un triángulo rectángulo como un vector, en un espacio vectorial de dimensión 2.

Es decir que para una función (o vector) de dimensión  $n$ , la suma del cuadrado de cada una de sus componentes en cada dirección es igual al cuadrado de la función (o vector) original. Podría decirse entonces que se realiza una especie de “Transformada de Pitágoras” de la función original.

El hecho de poder trabajar con las componentes ortogonales brinda la ventaja de trabajar con sistemas linealmente independientes, situación que facilita significativamente los cálculos.

La transformada de Fourier de una función es algo bastante parecido a lo que se mencionó anteriormente, aunque matemáticamente un poco más compleja. Simplemente se busca descomponer una función en sus componentes ortonormales (es decir ortogonales y de módulo igual uno) para facilitar el tratamiento de esa función. Finalmente, aplicando la antitransformada de Fourier, se recupera la función original.

### 10.1.2. Representación de funciones mediante conjuntos ortonormales. Coeficientes de Fourier.

Sea  $\{g_i\}_{i=1}^{\infty}$  una familia ortonormal de elementos de  $E$ , y sea  $f$  una función  $\in E$ . El objetivo es encontrar una combinación lineal de elementos de  $\{g_i\}_{i=1}^{\infty}$ , tal que de alguna manera represente a la función  $f$ . Para ello se establecen las siguientes condiciones:

1. Se denominan coeficientes de Fourier de  $f$  respecto del conjunto orto-

normal  $\{g_i\}_{i=1}^{\infty}$  a los números reales:

$$c_i = (f, g_i) = \int_a^b f(x)g_i(x)dx \quad (10.3)$$

2. Se denomina  $n$ -ésima suma parcial de Fourier de  $f$ , asociada al conjunto ortonormal  $\{g_i\}_{i=1}^{\infty}$  a:

$$S_n = \sum_{i=1}^n c_i g_i \quad (10.4)$$

Es posible demostrar que una suma parcial de Fourier de  $f$ , asociada a una familia ortonormal de funciones en  $E$ , da una mejor aproximación a  $f$  que cualquier otra combinación lineal de los  $n$  primeros elementos de la familia, y que la aproximación mejora cuando crece  $n$ .

### 10.1.3. Definición formal

Si  $f$  es una función integrable, en el sentido de la integral de Lebesgue, de tal modo que en cada intervalo finito de la recta real se cumple que

$$\int_{-\infty}^{\infty} |f(x)|dx < \infty \quad (10.5)$$

entonces se cumple que

$$F(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} f(x)e^{i\omega x} dx \quad (10.6)$$

La función  $F(\omega)$  es la transformada de Fourier de  $f(x)$  y a su vez  $f(x)$  se denomina antitransformada de Fourier de  $F(\omega)$ , lo que permite volver a la función original.

Aplicando la fórmula de Euler

$$e^{i\omega x} \equiv \cos(\omega x) + i \sin(\omega x) \quad (10.7)$$

a ecuación 10.6 puede escribirse de la siguiente manera:

$$F(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} f(x)[\cos(\omega x) + i \sin(\omega x)]dx \quad (10.8)$$

Esta es la forma continua de representar a una función como la suma infinita de senos y cosenos. De este modo, la transformada de Fourier permite representar en base de frecuencias (bases de Fourier - sumas de senos y cosenos) una señal que originalmente está representada en las bases del espacio o el tiempo.

### 10.1.4. Representación de señales discretas en el dominio de la frecuencia.

Se entiende por señal discreta a aquella señal definida sólo para ciertos instantes de tiempo.

Matemáticamente se define una secuencia discreta como:

$$y_n = y_{-i}, y_{-i+1}, \dots, y_{-1}, y_0, y_1, y_2, \dots, y_k \quad (10.9)$$

para  $k, i \geq 0$

Así como se analizan las señales continuas en el dominio de la frecuencia, también las señales discretas pueden ser representadas en dicho dominio. Para obtener una descripción espectral de una señal discreta en el dominio de la frecuencia, como es el caso que se analiza en este trabajo de tesis, se utiliza la transformada de Fourier para señales discretas. Sea  $y(n)$  la muestra  $n$ -ésima de la señal en el dominio del tiempo o del espacio, e  $y(k)$  la muestra  $k$ -ésima de la señal en el dominio de la frecuencia. Entonces se define la Transformada Discreta de Fourier como:

$$Y(k) = \sum_{n=0}^{N-1} y(n) e^{ink \frac{2\pi}{N}}, k = 1, 2, \dots, N-1 \quad (10.10)$$

y la transformada inversa discreta de fourier se puede expresar como

$$Y(n) = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} y(k) e^{-ink \frac{2\pi}{N}}, n = 1, 2, \dots, N-1 \quad (10.11)$$

Así se obtiene una forma de transformar una señal experimental discreta la forma espectral de Fourier, sin la necesidad de contar con una función matemática continua, más típica de un desarrollo teórico.

## 10.2. Apéndice II: Breve desarrollo de las reglas básicas de simetría.

1) Invarianza ante traslaciones en el tiempo.

La ecuación de crecimiento no debería depender de la definición del origen del tiempo. Por tal motivo se dice que la ecuación debe ser invariante ante una transformación de tipo  $t \Rightarrow t + \Delta t$ .



Ejemplo: si se tiene un término que va con el cuadrado del tiempo ( $t^2$ ), ante una traslación temporal, este término se convierte en  $(t + \Delta t)^2$ . Como la ecuación es invariante con el tiempo, y dado que el cuadrado de un binomio aporta un término más,  $t^2$  queda excluido de esta ecuación de crecimiento. En cambio  $\partial h/\partial t$  es invariante ante traslaciones temporales ya que  $\partial h/\partial(t + \Delta t) = \partial h/\partial t$  (esto es así porque la derivada del término constante  $\Delta t = 0$ ).

2) Invarianza de traslación en la dirección de crecimiento.

La ecuación de crecimiento del sistema no debería depender del sitio donde se define  $h = 0$ . De este modo, la ecuación debería ser invariante ante la traslación  $h \Rightarrow h + \Delta h$ . Esta regla de simetría descarta la dependencia de  $G$  con la posición, de modo tal que la ecuación debe construirse a partir de combinaciones de  $\nabla h, \nabla_2 h, \dots, \nabla_n h$  (en forma genérica, el operador  $\nabla_n h$  representa la derivada  $n$ -ésima de  $h$ ).

Ejemplo: si se tiene el término  $h^2$ , bajo una traslación en  $h$  se convierte en  $(h + \Delta h)^2$ , por lo que  $h^2$  debe ser excluido de la ecuación. Por el contrario  $\nabla(h + \Delta h) = \nabla h$ , por lo que este término sobrevive a la transformación.

3) Invarianza de traslación en la dirección perpendicular a la dirección de crecimiento.

La ecuación no debería depender del valor de  $x$ . Así, se obtiene la simetría  $x \Rightarrow x + \Delta x$ .

Ejemplo: si se tiene un término de  $x^2$  en la ecuación de crecimiento, bajo una traslación en  $x$  se convierte en  $(x + \Delta x)^2$ , por lo que debería ser excluida de la ecuación de crecimiento. Por el contrario,  $\partial h/\partial(x + \Delta x) = \partial h/\partial x$ , por lo que  $\nabla h$  sobrevive a esta transformación. De forma similar la forma funcional  $\partial^n/\partial x^n$  con  $n > 0$  obedece a esta simetría.

4) Simetría de rotación e inversión sobre la dirección de crecimiento normal  $n$ .

Estas reglas descartan las derivadas de orden impar en las coordenadas, excluyendo vectores como  $\nabla h, \nabla(\nabla^2 h)$ , etc. Esto proviene del hecho de que las derivadas de orden impar son antisimétricas respecto del eje de las ordenadas, no admitiendo invarianzas ante rotaciones e inversiones; mientras que las derivadas de orden par son simétricas respecto de ese eje y mantienen la invarianza ante esas modificaciones.

Ejemplo: se ha mostrado que  $\nabla h$  sobrevive a ambas transformaciones (b) y (c). Sin embargo no sobrevive al último requisito. Bajo  $x \Rightarrow -x$  se convierte en  $\partial h/\partial(-x) = -\partial h/\partial x$ , esto significa que  $\partial h/\partial x$  cambia de signo bajo esta transformación, por lo que debe ser excluida de la ecuación de crecimiento. En cambio  $(\nabla h)^2 = \nabla^2 h$ , sobreviviendo a la transformación por tener un número par de derivada en  $x$ .

5) Simetría superior e inferior para  $h$ .

Las fluctuaciones de la interfaz son similares con respecto a la altura media. Esto descarta potencias pares de  $h$ , términos como  $(\nabla h)^2, (\nabla h)^4$ , etc. Esta simetría está conectada íntimamente a la naturaleza de equilibrio de la interface, y para problemas fuera de equilibrio, esta simetría debe romperse. Son invarianzas de tipo  $h \Rightarrow -h$ .

Ejemplo: el término no lineal  $(\nabla h)^2$  (se lo llama término no lineal porque  $h$  se encuentra elevada al cuadrado) queda descartado, mientras que el término  $\nabla^2 h$  sí satisface la linealidad y sobrevive a todos los requerimientos impuestos en los puntos previos. Sin embargo no sobrevive a este último requerimiento:  $\partial h / \partial t = (\nabla h)^2$ ; bajo la transformación  $h \Rightarrow -h$ , la ecuación se convierte en  $\partial(-h) / \partial t = (\nabla h)^2$  y equivalentemente  $\partial h / \partial t = -(\nabla h)^2$ . Desde el momento en que  $(\nabla h)^2$  cambia de signo bajo esta transformación, debe ser excluída de la ecuación de crecimiento (esto se deduce del hecho de que si  $h$  está elevada a una potencia par, su valor siempre es positivo, por lo que necesariamente se debe colocar un signo menos para obtener el resultado negativo del lado derecho de la ecuación). Por el contrario  $\nabla^2 h$  sobrevive a esta transformación, desde que ambos lados de la ecuación de crecimiento tienen un número impar de factores de  $h$  ( $\partial h / \partial t = \nabla^2 h$ ).

Para encontrar la forma final de la ecuación, se deben considerar todos los términos que puedan formarse a partir de combinaciones de potencias de  $\nabla^n h$  pero que no violen las reglas de simetría antes mencionadas. Finalmente se obtiene

$$\frac{\partial h}{\partial t} = (\nabla^2 h) + (\nabla^4 h) + \dots + (\nabla^{2n} h) + (\nabla^h)(\nabla h)^2 + \dots + (\nabla^{2k} h)(\nabla h)^{2j} + \eta \quad (10.12)$$

donde  $n, k$  y  $j$  pueden tomar cualquier valor de un entero positivo. Como el interés está centrado en las propiedades de escalado, el foco debe hacerse en el comportamiento de las funciones que caractericen a la interfaz a largos tiempos ( $t \Rightarrow \infty$ ) y grandes distancias ( $x \Rightarrow \infty$ ). Es posible demostrar, utilizando ciertos tratamientos matemáticos, que las derivadas de orden superior son menos importantes que las de orden inferior. Por ejemplo, el término  $\nabla^4 h$  es irrelevante comparado con el término  $\nabla^2 h$ , ya que no afecta el comportamiento de escalado de la ecuación de crecimiento. Si se reescala la interfaz en la dirección  $x$  por un factor  $b$ , a través de la transformación de escala  $x \Rightarrow x' \equiv bx'$ . Como la interfaz es autoafín, con un exponente de rugosidad  $\alpha$ , la altura debería rescalarse de la misma manera según  $h \Rightarrow h' \equiv b^\alpha h$  para obtener una interfaz de características geométricas similares. Como resultado de esta transformación,  $\nabla^2 h$  y  $\nabla^4 h$  se rescalan de la siguiente manera:

$$\nabla^2 \rightarrow \nabla^2 h \equiv b^{\alpha-2} \nabla^2 h \quad (10.13)$$

y

$$\nabla^4 \rightarrow \nabla^4 h \equiv b^{\alpha-4} \nabla^4 h \quad (10.14)$$

Es importante observar que  $(\alpha - 4) < (\alpha - 2) < 0$ , por lo en el límite en que  $b \Rightarrow \infty$ , el término  $\nabla^4 h \Rightarrow 0$  más rápido de lo que lo hace el término  $\nabla^2 h$ . De este modo se llega a que  $\nabla^4 h$  es irrelevante en comparación a  $\nabla^2 h$ , y es posible quitarlo de la ecuación de crecimiento, sin que esta se vea afectada significativamente.

Un argumento similar se utiliza para demostrar que  $\nabla^2 h (\nabla h)^2$  es el término mas relevante de los posibles términos  $\nabla^{2k} h (\nabla h)^{2j}$  de la ecuación 10.12, pero aun así, es irrelevante en comparación con el término  $\nabla^2 h$ .

### 10.3. Apéndice III: Microscopía de fuerzas atómicas

Las microscopías de barrido han iniciado una nueva etapa en el estudio de los procesos interfaciales. Los datos derivados de estas técnicas, especialmente la microscopía de efecto túnel (STM) y la microscopía de fuerzas atómicas (AFM,) ofrecen la posibilidad de estudiar la fisicoquímica de las superficies sólidas a niveles atómicos y moleculares [110]. Las nanoscopías (escala nanométrica (nm)) aportan información de dominios moleculares restrictivos que comprenden cientos de moléculas. Este tipo de información a nivel local no es accesible por otras técnicas de análisis superficial, ya que éstas finalmente proveen datos promediados de la muestra completa. Los estudios a nivel local revelan la complejidad de los procesos fisicoquímicos que ocurren en las interfaces bajo diferentes condiciones de perturbación. La información local aporta bases sólidas para la interpretación teórica de estos procesos a través del uso de la Mecánica Cuántica.

El microscopio de fuerzas atómicas (AFM) es un tipo de Microscopio de Fuerzas de Barrido (SFM) que provee imágenes tridimensionales utilizando la interacción de fuerzas del orden de los pico-newtons, entre una punta (o tip) y la superficie de una muestra sólida, a medida que la base se desplaza respecto del tip (Fig. 10.2). El AFM aporta información sobre la topografía de la muestra, las fuerzas de interacción entre el tip y la muestra, la fricción, la viscosidad, las propiedades magnéticas de la muestra etc. En general

puede utilizarse para estudiar superficies conductoras, semi- conductoras y no conductoras.

### 10.3.1. Conformación del microscopio

El AFM está conformado por una cabeza óptica que censa las deflexiones de un cantiléver, que es la pieza que sostiene a la punta que interacciona con la muestra (Fig. 10.2). La cabeza consiste en un diodo que emite un as de láser, un colimador y un sistema óptico para enfocar el as al vértice del cantiléver en dos direcciones perpendiculares. Esta señal es recibida por un fotodiodo con dos segmentos ajustables que maximizan la señal. El sostén del cantiléver puede ser un bloque metálico si se trabaja en aire o un bloque de vidrio si se trabaja en líquidos. Su función es sostener al cantiléver que se encuentra atado por un fino alambre de oro. También hay un espejo que refleja el as de laser desde el cantiléver hasta el fotodiodo. El “scanner” que muestra los movimientos tridimensionales de la muestra, es un cilindro metálico que contiene el tubo piezoeléctrico.

La punta utilizada en el AFM está generalmente hecha de nitruro de silicio y tiene un radio del orden del nanómetro. La muestra es ubicada en el tubo piezoeléctrico bajo el cantiléver, y de este modo puede ser movida en las direcciones ( $x$ -  $y$ -  $z$ ) del espacio. Durante el recorrido, el cantiléver se mueve verticalmente a medida que la fuerza de interacción entre la punta y la muestra varía, lo que también depende de la topografía de la muestra. De acuerdo con esto, la relación entre la fuerza ( $F$ ) y la distancia entre el tip y la muestra ( $s$ ) es

$$F \propto \frac{1}{s^n} \quad (10.15)$$

esto es, el cantiléver presenta grandes deflexiones para pequeños valores de  $s$ .

### 10.3.2. Modos operacionales

En general existen dos formas básicas de operar del AFM que son el modo de contacto y el modo de no contacto, siendo este último poco utilizado sobre muestras biológicas. En el modo de contacto el rango de fuerzas utilizado es aquel de fuerzas repulsivas ( $n = 12$  de la ecuación 10.15) debidas a la interacción entre el electrón externo de las capas del tip y la muestra. Puede ocurrir que en el modo de contacto las fuerzas laterales y de capilaridad

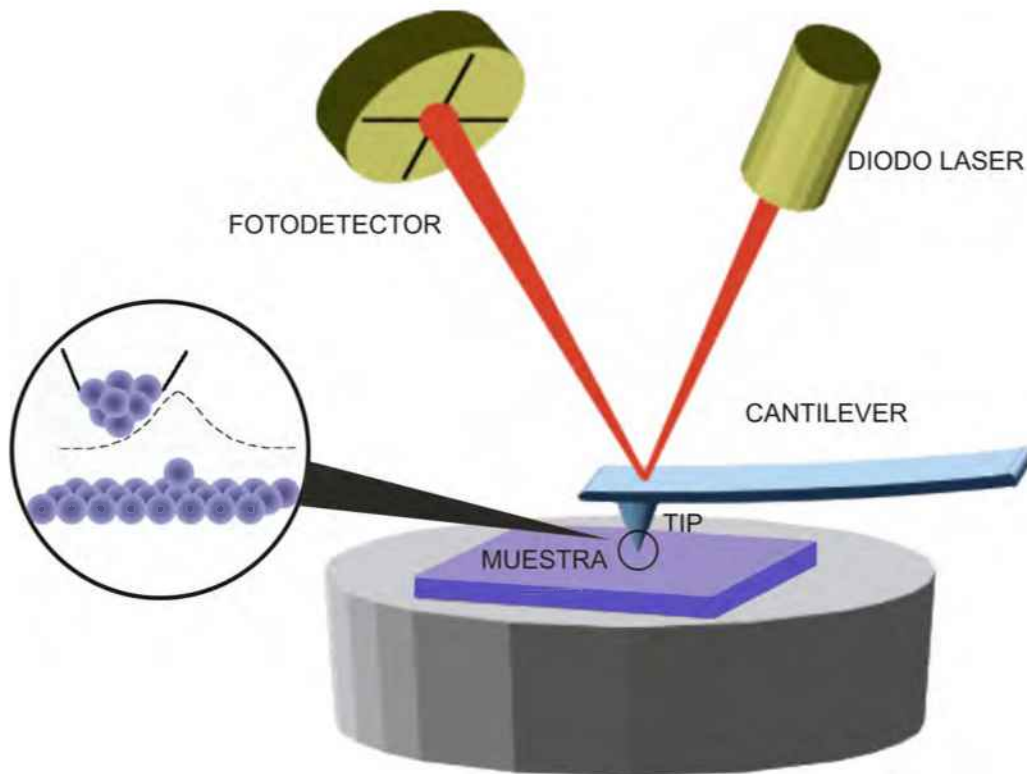


Figura 10.2: Esquema de un microscopio de fuerzas atómicas (AFM).

distorsionen la imagen y eventualmente lesionen el tip. Este problema es minimizado trabajando en el modo “tapping” (repiqueteo) en que el cantiléver vibra verticalmente durante el barrido (Fig. 10.3).

La deflexión del cantiléver generalmente es medida utilizando un as de láser que recae sobre el vértice del cantiléver. La luz reflejada es dirigida hacia un fotodiodo de 2 segmentos. El ángulo de reflexión del as y su intensidad dependen de la deflexión vertical del cantiléver. El as incide sobre los segmentos del fotodiodo, y la diferencia en la intensidad de la luz que recibe cada segmento es proporcional a la deflexión vertical ( $d$ ) del cantiléver. Además,  $d$  se relaciona con  $F$  a través de la ley de Hooke,

$$F = kd \quad (10.16)$$

donde  $k$  es la constante elástica del cantiléver.

En el modo de contacto pueden medirse tanto la variación en la deflexión del cantiléver, como los cambios en el voltaje aplicados al tubo piezoeléctrico

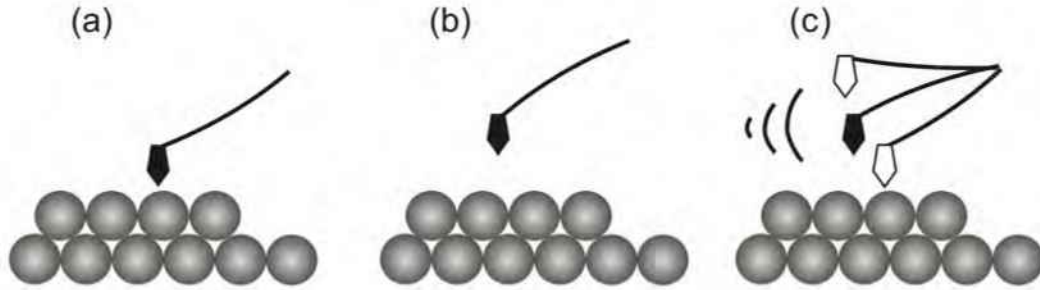


Figura 10.3: Modos de operación del AFM: (a) modo de contacto, (b) modo de no contacto y (c) modo 'tapping'

en la dirección  $z$ . En este modo, la deflexión del cantiléver se mantiene constante por un circuito de retroalimentación que opera con una señal  $\Delta$  que es la diferencia entre el valor ideal de la deflexión del cantiléver elegida por el operador, y el valor registrado. El valor de  $\Delta$  es controlado con el circuito de retroalimentación del tubo piezoeléctrico. El potencial aplicado al piezoeléctrico en la dirección  $z$  es proporcional a la dimensión vertical de la muestra, proveyendo información tridimensional de la misma.

En el modo de "tapping", mientras se realiza el barrido lateral, el cantiléver oscila verticalmente a alta frecuencia de tal modo que el circuito de retroalimentación no sigue el desplazamiento. En su desplazamiento vertical el tip penetra la capa húmeda, que se encuentra siempre presente cuando una muestra es analizada en aire, tocando suavemente la muestra. En este caso, las interacciones entre la punta y la muestra se deben a los gradientes verticales de fuerza. La fuerza total ( $F$ ) recibida en el cantiléver está dada por

$$F = F_0 + \left(\frac{\partial F}{\partial z}\right)\Delta z = Kd \quad (10.17)$$

donde  $F_0$  es la fuerza recibida por tip cuando se mueve horizontalmente, con una separación entre la punta y la muestra que permanece constante, y  $z$  es la variación en la separación entre el tip y la muestra como resultado de la oscilación vertical. Cuando el tip encuentra huecos o escalones en la superficie, tiende a incrementar o disminuir la amplitud de oscilación, respectivamente. La diferencia entre la amplitud fijada y la medida se utiliza como un error de señal en el ciclo de retroalimentación. En el modo "tapping", las fuerzas de interacción y, por ende, la resolución espacial, son menores que en el modo de contacto. Este modo de repiqueteo es el indicado para evaluar muestras

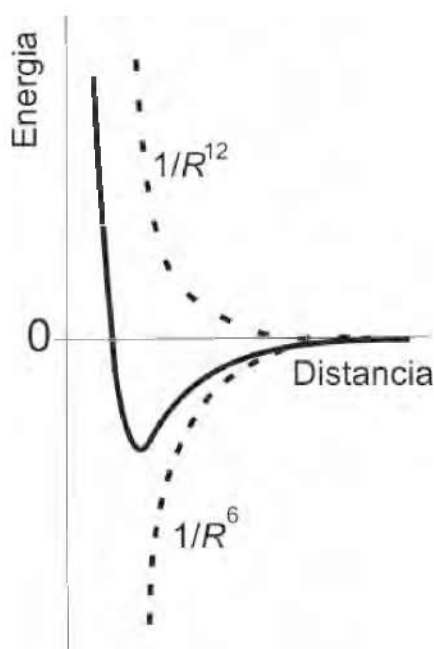


Figura 10.4: Representación de la ecuación del potencial energético de Lennard-Jones. Las líneas punteadas indican las contribuciones atractivas  $1/R^6$  y repulsivas ( $1/R^{12}$ ).

blandas a baja resolución.

### 10.3.3. Fuerzas

En la microscopía de fuerzas atómicas, las fuerzas más importantes son las de van der Waals, las de adhesión y repulsión, de fricción, de contacto e interfaciales. Para las nuevas aplicaciones de AFM las fuerzas magnéticas y electrostáticas también son relevantes.

La energía de interacción  $U_r$  entre dos moléculas en el vacío, separadas por una distancia  $R$ , puede describirse con la ecuación de Lennard-Jones, que consiste en un término proporcional a  $1/R^6$  de interacción atractiva, y un término proporcional a  $1/R^{12}$  de interacción repulsiva de van der Waals (Fig. 10.4)

$$U(r) = \frac{-a}{R^6} + \frac{b}{R^{12}} \quad (10.18)$$

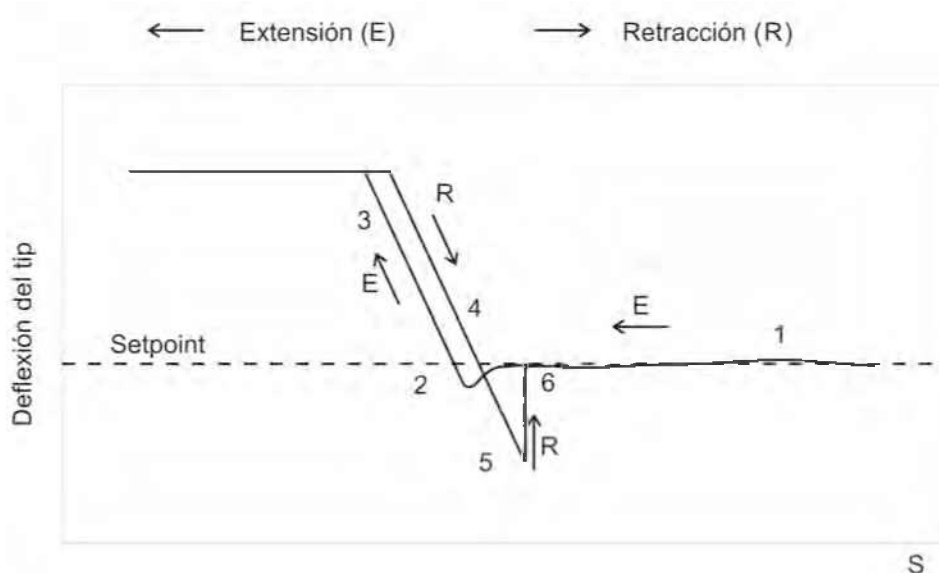


Figura 10.5: Curva que representa la fuerza medida ( $F$ ) respecto de la distancia ( $s$ ) entre la punta y la muestra

donde  $a$  y  $b$  son constantes. El primer término prevalece para valores grandes de  $R$  y el segundo para valores pequeños. Esta ecuación incluye implícitamente un mínimo para la distancia de separación en el equilibrio ( $R = R_e$ ).

#### 10.3.4. Curva de fuerza

En el AFM la deflexión del cantiléver se mide cuando la punta se acerca o aleja de la muestra en un lugar determinado, obteniéndose así la curva de fuerza ( $F$ ) versus distancia ( $s$ ) entre el tip y la muestra (Fig. 10.5). Esta curva muestra la histéresis asociada con la aproximación y la separación del tip (fuerzas capilares) en una medición en aire. Este efecto es debido a la fina capa de agua, producto de la condensación de la humedad. Cuando la punta atraviesa esta capa se genera un efecto de capilaridad que aumenta la fuerza requerida para separarlo completamente de la muestra. Debido a este efecto, es que la muestra (si es blanda) o la punta (si la muestra es dura) pueden dañarse. Este problema puede superarse midiendo en un medio líquido, sin fuerzas capilares, o utilizando el modo de “tapping”.



# Bibliografía

- [1] H. M. Byrne, J. R. King, D. L. S. McElwain y L. Presiozi. A two-phase model of solid tumour growth. *App. Math. Lett.*, **16**, 567–573, 2003.
- [2] G. B. West, J. H. Brown y B. J. Enquist. A general model for ontogenetic growth. *Nature*, **413**, 628–631, 2001.
- [3] G. B. West y J. H. Brown. Lifes universal scaling laws. *Phys. Today*, **57**, 36–43, 2004.
- [4] C. Guiot, P. G. Degiorgis, P. P. Delsanto, P. Gabriele y T. S. Deisboeck. Does tumor growth follow a “universal law”? *J. Theoret. Biol.*, **225**, 147, 2003.
- [5] M. Mandelbrot. *Fractal Geometry of Nature*. Freeman, San Francisco, 1982.
- [6] M. J. Vilela, M. L. Martins y S. R. Boschetti. Fractal patterns for cells in culture. *J. Pathol.*, **177**, 103–107, 1995.
- [7] M. Obert, P. Pfeifer y M. Sernetz. Microbial growth patterns described by fractal geometry. *J. Bacteriol.*, **172**, 1180–1185, 1990.
- [8] G. Károlyi. Fractal scaling of microbial colonies affects growth. *Phys. Rev. E*, **71**, 031915, 2005.
- [9] F. Family, B. R. Masters y D. E. Platt. Fractal pattern formation in human retinal vessels. *Physica D*, **38**, 98–103, 1989.
- [10] F. Fujikawa y M. Matsushita. Bacterial fractal growth in the concentration field of nutrient. *J. Phys. Soc. Japan*, **58**, 3875, 1989.
- [11] J. W. Baish y R. K. Jain. Fractals and Cancer. *Cancer Research*, **60**, 3683, 2000.

- [12] O. Heymans, J. Fissette, P. Vico, S. Blacher, D. Masset y F. Brouers. Is fractal geometry useful in medicine and biomedical sciences? *Med Hypotheses*, **53**, 360–366, 2000.
- [13] M. Canals y R. Solís. Geometría de los sistemas vivos y su importancia en Medicina. *Rev Méd Chile*, **133**, 1097–1107, 2005.
- [14] A. C. Sullivan, J. P. Hunt y A. L. Oldenburg. Fractal analysis for classification of breast carcinoma in optical coherence tomography. *J. Biomed. Optics*, **16**, 066010, 2011.
- [15] P. Miller y S. Astley. Classification of breast tissue by texture analysis. *Image Vis. Comput.*, **10**, 277–282, 1992.
- [16] C. B. Caldwell, S. J. Stapleton, D. W. Holdsworth, R. A. Jong, W. J. Weiser, G. Cooke y M. J. Yaffe. Characterization of mammographic parenchymal pattern by fractal dimension. *Phys. Med. Bio.*, **35**, 235–247, 1990.
- [17] S. S. Cross. The application of fractal geometric analysis to microscope images. *Micron.*, **25**, 101–113, 1994.
- [18] C. E. Priebe, J. L. Solk, R. A. Lorey, G. W. Rogers, W. L. Poston, M. Kallergi, W. Qian, L. P. Clarke y R. A. Clark. The application of fractal analysis to mammographic tissue classification. *Cancer Lett.*, **77**, 183–189, 1994.
- [19] R. M. Rangayyan y T. M. Nguyen. Pattern classification of breast masses via fractal analysis of their contours. *International Congress Series*, **1281**, 1041–1046, 2005.
- [20] G. A. Losa. Fractals in pathology: are they really useful? *Pathologica*, **87**, 310–317, 1995.
- [21] A. L. Barabasi y H. E. Stanley. *Fractal Concepts in Surface Growth*. Cambridge University Press, 1995.
- [22] M. Pasquale, S. Marchiano y A. Arvia. Transition in the Growth Mode of Branched Silver Electrodeposits Under Isothermal and non-Isothermal Ionic Mass Transfer Kinetics. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **532**, 255–268, 2002.

- [23] C. Horowitz, M. Pasquale, E. Albano y A. Arvia. Experimental Evidence of the Development of Scale Invariance in the Internal Structure of Self-affine Aggregates. *Physical Review B*, **70**, 033406 1–4, 2004.
- [24] M. Pasquale, S. Marchiano y A. Arvia. Sieving Effect of Agarose on Quasi-2D Silver Pattern Electroformation: A Pinning-Depinning-like Transition Resulting from Gelled Silver Plating Solutions. *Journal of Physical Chemistry B*, **108**, 9720–9727, 2004.
- [25] T. M. Mayer, E. Chason y A. J. Howard. Roughening instability and ion-induced viscous relaxation of SiO<sub>2</sub> surfaces. *J. Appl. Phys.*, **76**, 1633–1643, 1994.
- [26] A. Be’era, Y. Lereahb, A. Frydmana y H. Taitelbaum. Spreading of a mercury droplet on thin gold films. *Physica A*, **314**, 2002.
- [27] H. Sakaguchi. Self-organized criticality in an interface-growth model with quenched randomness. *Phys. Rev. E*, **82**, 032101–3, 2010.
- [28] M. Eden. *Proc. 4th Berkeley Symp. on Math. Statistics and Probability*, tomo 4, capítulo A two dimensional growth process, 223. University of California Press, Berkeley, 1961.
- [29] T. Vicsek, M. Cserzo y V. K. Horvath. Self-affine growth of bacterial colonies. *Physica A*, **167**, 315–321, 1990.
- [30] A. Brú, S. Albertos, J. L. Subiza, J. L. García-Asenjo y I. Brú. The universal dynamics of tumor growth. *Biophys J.*, **85**, 2948–2961, 2003.
- [31] J. Buceta y J. Galeano. Comments on the article “The universal dynamics of tumor growth”. *Biophys. J.*, **88**, 3734–3736, 2005.
- [32] A. Brú. Reply to comments by Buceta and Galeano regarding the article “The universal dynamics of tumor growth”. *Biophys. J.*, **88**, 3737–3738, 2005.
- [33] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter. *Molecular Biology of the cell*. Garland Science, New York, 4th edición, 2002.
- [34] H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaura, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, S. L. Sipursky y J. Darrell. *Biología celular y molecular*. Panamericana, Bs. As., quinta edición, 2005.

- [35] V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto y J. C. Fausto. *Patología estructural y funcional*. Elsevier, Barcelona, octava edición, 2010.
- [36] V. T. DeVita, S. Hellman y S. A. Rosenberg (editores). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Lippincott–Raven, Philadelphia, fifth edición, 1997.
- [37] W. I. Schaeffer y T. C. C. T. C. Association. Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In Vito Cellular & Developmental Biology - Plant*, **26**, 97–101, 1990.
- [38] ATCC: The Global Bioresource Center. ATCC Number: CCL-81.
- [39] ATCC: The Global Bioresource Center. ATCC Number: CCL-2.
- [40] S. Kumar y V. M. Weaver. Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev*, **28**, 113–127, 2009.
- [41] D. T. Butcher, T. Alliston y V. M. Weaver. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer*, **9**, 108–122, 2009.
- [42] I. Ramis-Conde, M. A. J. Chaplain, A. R. A. Anderson y D. Drasdo. Multi-scale modeling of cancer cell intravasation: the role of cadherins in metastasis. *Phys. Biol.*, **6**, 2009.
- [43] I. Ramis-Conde, D. Drasdo, A. R. A. Anderson y M. A. J. Chaplain. Modeling the Influence of the E-Cadherin- $\beta$ -Catenin Pathway in Cancer Cell Invasion: A Multiscale Approach. *Biophys. J.*, **95**, 155–165, 2008.
- [44] J. E. Olberding, M. D. Thouless, E. M. Arruda y K. Garikipati. The Non-Equilibrium Thermodynamics and Kinetics of Focal Adhesion Dynamics. *PLoS ONE, Open Access*, **5(8)**: e12043, 2010.
- [45] J. Galle, M. Hoffmann y G. Aust. From single cells to tissue architecture a bottom-up approach to modelling the spatio-temporal organisation of complex multi-cellular systems. *J. Math. Biol.*, **58**, 261–283, 2009.
- [46] H. Yamaguchi, J. Wyckoff y J. Condeelis. Cell migration in tumors. *Currents Opinion in Cell Biology*, **17**, 559–584, 2005.
- [47] K. Wolf y P. Friedl. Mapping proteolytic cancer cell–extracellular matrix interfaces. *Clinical and Experimental Metastasis*, **26**, 289–298, 2009.

- [48] B. G. Hollier, K. Evans y S. A. Mani. The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **14**, 29–43, 2009.
- [49] J. P. Thiery. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, **2**, 442–454, 2002.
- [50] R. Kalluri y R. A. Weinberg. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, **119**, 1420–1428, 2009.
- [51] M. J. Paszek, N. Zahir, K. R. Johnson, J. N. Lakins, G. I. Rozenberg, A. Gefen, C. A. Reinhart-King, S. S. Marguiles, M. Dembo, D. Boettiger, D. A. Hammer y V. M. Weaver. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, **8**, 241–254, 2005.
- [52] F. A. Eleta y J. L. S. Román. *Diagnóstico por imágenes*. Bs. As., 2008.
- [53] C. S. Pedrosa. *Diagnóstico por imagen*, tomo Tórax. Madrid, 2009.
- [54] H. F. Jelinek y E. Fernandez. Neurons and fractals: how reliable and useful are calculations of fractal dimensions? *Journal of Neuroscience Methods*, **81**, 9–18, 1998.
- [55] F. Family. Dynamic scaling and phase transitions in interface growth. *Physica A*, **168**, 561–580, 1990.
- [56] F. Family y T. Vicsek. Scaling of the active zone in the Eden process on percolation networks and the ballistic deposition model. *J. Phys. A*, **18**, L75, 1985.
- [57] J. Krim y J. O. Indekeu. Roughness exponents: A paradox resolved. *Phys. Rev. E*, **48**, 1576–1578, 1993.
- [58] R. Chiarello, V. Panella y J. Krim. X-Ray Reflectivity and Adsorption Isotherm Study of Fractal Scaling in Vapor-Deposited Films. *Phys. Rev. Lett.*, **67**, 3408–3411, 1991.
- [59] A. Kufner y J. Kadlex. *Fourier series*. ILIFE, London, 1971.
- [60] J. W. Brown y R. V. Churchill. *Fourier Series and Boundary Value Problems*. McGraw-Hill, Inc., Nueva York, quinta edición, 1993.
- [61] J. J. Ramasco, J. M. López y M. A. Rodríguez. Generic Dynamic Scaling in Kinetic Roughening. *Phys. Rev. Lett.*, **84**, 2199–2202, 2000.

- [62] J. M. López, M. A. Rodríguez y R. Cuerno. Superroughening versus intrinsic anomalous scaling of surfaces. *Phys. Rev. E*, **56**, 3993–3998, 1997.
- [63] J. Schmittbuhl, J.-P. Vilotte y S. Roux. Reliability of self-affine measurements. *Phys. Rev. E*, **51**, 131–147, 1995.
- [64] M. Block, E. Schöll y D. Drasdo. Classifying the Expansion Kinetics and Critical Surface Dynamics of Growing Cell Populations. *Phys. Rev. Lett.*, **99**, 248101, 2007.
- [65] J. C. Russ. *Fractal Surfaces*. Plenum, New York, 1994.
- [66] J. Kertész y D. E. Wolf. Noise reduction in Eden models: II. Surface structure and intrinsic width. *J. Phys. A, Math. Gen.*, **21**, 747–761, 1988.
- [67] D. E. Wolf y J. Villain. Growth with Surface Diffusion. *Europhys. Lett.*, **13**, 389–394, 1990.
- [68] S. D. Sarma y P. Tamborenea. A New Universality Class for Kinetic Growth: One-Dimensional Molecular-Beam Epitaxy. *Phys. Rev. Lett.*, **66**, 325–328, 1991.
- [69] M. Kardar, G. Parisi y Y.-C. Zhang. Dynamic Scaling of Growing Interfaces. *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 889–892, 1986.
- [70] M. T. Batchelor, B. I. Henry y S. D. Watt. Continuum model for radial interface growth. *Physica A*, **260**, 11–19, 1998.
- [71] J. B. Bassingthwaite, J. H. van Beek y R. B. King. Fractal Branchings: The Basis of Myocardial Flow Heterogeneities? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **591**, 392–401, 1990.
- [72] F. Family, B. R. Masters y D. E. Platt. Fractal Pattern Formation in Human Retinal Vessels. *Physica D*, **38**, 98–103, 1989.
- [73] A. L. Goldberger y B. J. West. Fractals in Physiology and Medicine. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, **60**, 421–435, 1987.
- [74] F. Caserta, H. E. Stanley, W. D. Eldred, G. Daccord, R. E. Hausman y J. Nittmann. Physical Mechanisms Underlying Neurite Outgrowth: A Quantitative Analysis of Neuronal Shape. *Phys. Rev. Lett.*, **64**, 95–98, 1990.

- [75] A. Brú, J. M. Pastor, I. Feraud, I. Brú, S. Melle y C. Berenguer. Super-Rough Dynamics on Tumor Growth. *Phys. Rev. Lett.*, **81**, 4008, 1998.
- [76] I. D. Bassukas. Comparative Gompertzian of Alterations of Tumor Growth Patterns. *Cancer Research*, **54**, 4385–4392, 1994.
- [77] P. Waliszewski y J. Konarski. On time-space of nonlinear phenomena with Gompertzian dynamics. *Biosystems*, **80**, 91–97, 2005.
- [78] S. D. Sarma, S. V. Ghaisas y J. M. Kim. Kinetic super-roughening and anomalous dynamic scaling in nonequilibrium growth models. *Phys. Rev. E*, **49**, 122–125, 1994.
- [79] A. Brú y D. Casero. Anomalous scaling of multivalued interfaces. *Europhys. Lett.*, **64**, 620–626, 2003.
- [80] A. Brú, S. Albertos, J. A. L. García-Asenjo y I. Brú. Pinning of tumoral growth by enhancement of the immune response. *Phys. Rev. Lett.*, **92**, 238101, 2004.
- [81] A. Brú y D. Casero. The effect of pressure on the growth of tumour cell colonies. *J. Theor. Biol.*, **243**, 171–180, 2006.
- [82] H. A. Makse, S. Buldyrev, H. Leschhorn y H. E. Stanley. The pinning paths of an elastic interface. *Europhys. Lett.*, **41**, 251–256, 1998.
- [83] K. Park y I. Kim. Phase transitions in a simple growth model for a driven interface in random media. *Phys. Rev E*, **62**, 3322–3326, 2000.
- [84] K. Park, H. Kim y I. Kim. Growth of a driven interface in isotropic and anisotropic random media. *Phys. Rev E*, **62**, 7679–7682, 2000.
- [85] K. Sneppen. Self-Organized Pinning and Interface Growth in a Random Medium. *Phys. Rev. Lett.*, **69**, 3539–3542, 1992.
- [86] J. Buceta y J. Galeano. Comments on the article "The universal dynamics of tumor growth" by A. Brú et al. *Biophys. J.*, **88**, 3734–6; discussion 3737–8, 2005.
- [87] J. Galeano, J. Buceta, K. Juárez, B. Pumariño, J. de la Torre y J. M. Iriondo. Dynamic scaling analysis of plant callus growth. *Europhys. Lett.*, **63**, 83–89, 2003.

- [88] J. M. Pastor y J. Galeano. New dynamic scaling in increasing systems. *Central European J. of Physics*, **5**, 539–548, 2007.
- [89] C. Escudero. Stochastic models for tumoral growth. *Phys. Rev. E.*, **73**, 020902 1–4, 2006.
- [90] C. Escudero. Geometrical approach to tumor growth. *Phys. Rev. E.*, **74**, 021901 1–7, 2006.
- [91] G. Brodland y J. H. Veldhuis. Computer simulations of mitosis and interdependencies between mitosis orientation, cell shape and epithelia reshaping. *Journal of Biomechanics*, **35**, 673–681, 2002.
- [92] F. A. Meineke, C. S. Potten y M. Loeffler. Cell migration and organization in the intestinal crypt using a lattice-free model. *Cell Prolif.*, **34**, 253–266, 2001.
- [93] M. Radszuweit, M. Block, J. G. Hengstler, E. Schöll y D. Drasdo. Comparing the growth kinetics of cell population in two and three dimensions. *Phys. Rev. E*, **79**, 051907, 2009.
- [94] D. Drasdo y S. Höhme. A single-cell-based model of tumor growth in vitro: monolayers and spheroids. *Phys. Biol.*, **2**, 133–147, 2005.
- [95] J. Galle, G. Aust, G. Schaller, T. Beyer y D. Drasdo. Individual Cell-Based Models of the Spatial-Temporal Organization of Multicellular Systems Achievements and Limitations. *Cytometry Part A*, **69A**, 704–710, 2006.
- [96] H. D. Young. *Statistical Treatment of Experimental Data*. McGrae-Hill Book Company, Inc., Nueva York, 1962.
- [97] ECACC: European Collection of Cell Cultures. ECACC Number: 84113001.
- [98] A. T. Nahapetian, J. M. Thomas y W. G. Thilly. Optimisation of Environment for High Density Vero Cell Culture: Effect of Dissolved Oxygen and Nutrient Supply on Cell Growth and Changes in Metabolites. *J. Cell. Sci.*, **81**, 65–103, 1986.
- [99] M. A. C. Huergo, M. A. Pasquale, A. E. Bolzán, A. J. Arvia y P. H. González. Morphology and dynamic scaling analysis of cell colonies with linear growth fronts. *Phys. Rev. E*, **82**, 031903, 2010.



- [100] B. R. Bird y F. T. Forrester. *Basic Laboratory Techniques in Cell Culture*. US Department of Health and human Services, 1981.
- [101] M. A. C. Huergo, M. A. Pasquale, A. E. Bolzán, A. J. Arvia y P. H. González. Dynamics and Morphology Characteristics of Cell Colonies with Radially Spreading Growth Fronts. *Phys. Rev. E*, **84**, 021917 1–11, 2011.
- [102] E. Paluch, J. van der Gucht y C. Sykes. Cracking up: symmetry breaking in cellular systems. *J. Cell Biol.*, **175**, 687–692, 2006.
- [103] M. Aubert, M. Badoual, S. Féreol, C. Christov y B. Grammaticos. A cellular automaton model for the migration of glioma cells. *Phys. Biol.*, **3**, 93–100, 2006.
- [104] Y.-S. Chu, O. Eder, W. A. Thomas, Y. Sincha, F. Pincet, A. Ben-Ze'ev, E. Perez, J. P. Thiery y S. Daffour. Prototypical Type I E-cadherin and Type II Cadherin-7 Mediate Very Distinct Adhesiveness through Their Extracellular Domains. *J. Biol. Chem.*, **281**, 2901–2910, 2006.
- [105] T. Rosen y D. S. Misfeldt. Cell density determines epithelial migration in cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4760–4763, 1980.
- [106] C. Escudero. Reply to the “Comment on Dynamic scaling of non-Euclidean interfaces”. *Phys. Rev. Lett.*, **102**, 139602, 2009.
- [107] O. Wolkenhauer, C. Auffray, S. Baltrusch, N. Blüthgen, H. Byrne, M. Cascante y *et al.* Systems Biologists Seek. Fuller Integration of Systems. Biology Approaches in New Cancer Research Programs. *Cancer Res.*, **70**, 12–13, 2010.
- [108] L. Li, P. M. Thangamathesvaran, C. Y. Yue, K. C. Tam, X. Hu y Y. C. Lam. Gel Network Structure of Methylcellulose in Water. *Langmuir*, **17**, 8062–8068, 2001.
- [109] G. Parisi. On surface growth in random media. *Europhys. Lett.*, **17**, 1992.
- [110] R. C. Salvarezza y A. J. Arvia. Recent applications of STM and AFM to electrochemistry and electrocatalysis. *Current Topics in Electrochemistry*, **10**, 89–140, 2004.