

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS
BÁSICAS

ÁREA BIOLOGÍA

TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN BIOFÍSICA

**“Estudio teórico-experimental de los
mecanismos moleculares que evitan la
extrusión celular apical durante el
proceso de neurulación primaria”**

Lic. Santiago A. Bosch Roascio

Director de Tesis:

Dr. Flavio Zolessi

Co-Director de Tesis:

Dr. Julio Hernández

Agradezco a todos los que me han acompañado en esta labor: a mis tutores Flavio y Julio, a mis colegas del piso 4 y 7, particularmente a Gonza, que fue en general mi referente para las tareas de laboratorio, a todos mis amigos, a Lupe, a Ale, a Lu y a mis padres, y a todas las víctimas a las que les conté sobre mi trabajo (“abortar pollos”) en algún bar a lo largo de estos años.

Índice

Resumen.....	5
Introducción.....	6
Neurulación Primaria.....	7
El Neuroepitelio.....	10
Antecedentes: Cómo inducir y estudiar defectos en la neurulación.....	11
La Proteína MARCKS.....	11
Extrusión Celular.....	13
Modelos físico-matemáticos para la neurulación y la extrusión celular.....	13
Experimentos farmacológicos sobre embriones.....	17
Métodos.....	17
Cultivo de Embriones.....	17
Tratamiento farmacológico.....	17
Criocortes.....	18
Inmunofluorescencia indirecta sobre cortes.....	18
Adquisición y análisis de imágenes.....	19
Resultados experimentales.....	20
Experimentos <i>in silico</i>	29
Descripción teórica del modelo.....	29
Implementación computacional.....	33
Resultados de simulaciones.....	34
Simulaciones preliminares sin núcleos ni fuerza compensatoria.....	34
Una célula aislada.....	34
Monocapa sin núcleos.....	36
Simulaciones con núcleos.....	37
Monocapa con núcleo sin la fuerza compensatoria.....	37
Monocapa con núcleos y fuerza compensatoria.....	38
Discusión.....	46
Discusión General.....	46
Consideraciones sobre la extrusión celular y sobre el modelo.....	47
Limitaciones & Perspectivas.....	49
Conclusiones.....	52
Bibliografía.....	53
Anexo.....	63
I: Otras aproximaciones experimentales.....	63
I.i: Cortes macroscópicos sobre embriones.....	63
I.ii: Tratamiento con el agente quelante de calcio EGTA.....	65
I.iii: Tinción con el marcador de membranas BODIPY FL C5-Ceramida.....	67
II: Análisis matemático del modelo básico.....	71
II.i: Estado de equilibrio del modelo básico.....	72
II.ii: Contrastación entre predicciones teóricas y un experimento <i>in silico</i>	80
III: Detalles de la implementación computacional del modelo.....	83
III.i: Estructura general de la implementación.....	83
III.ii: Cálculo de la normal saliente en general.....	85
III.iii: Cálculo de la fuerza nuclear.....	89
III.iv: Simulación de las transiciones de tipo 1 (T1).....	91
IV: Propuestas de nuevas medidas.....	93
IV.i: Relación entre curvatura de la membrana y ángulos medibles en el modelo.....	93

IV.ii: Un posible equivalente al concepto de “densidad celular” aplicable a los
epitelios pseudoestratificados.....95

Resumen

Durante la neurulación primaria, el neuroectodermo pseudoestratificado inicialmente plano del embrión amniota se pliega y se fusiona, dando forma al tubo neural. Este fenómeno complejo (y todavía no bien comprendido) involucra cambios morfológicos y contribuciones mecánicas tanto del neuroectodermo como de los tejidos adyacentes. Podemos intentar entender las condiciones mecánicas que permiten el plegado normal estudiando las condiciones en las que este proceso falla. Por ejemplo, la activación farmacológica via PMA de la quinasa PKC produce defectos inusuales: la falla del cierre del tubo neural, la alteración de la polaridad apico-basal, y la eliminación de células de la monocapa hacia el lado apical. Este último fenómeno, denominado *extrusión celular*, suele clasificarse dependiendo de si la célula eliminada está destinada a la muerte celular por apoptosis (*extrusión apoptótica*) o no (*extrusión viva*), y no ocurre normalmente en este sistema. Resultados previos indicaron que la extrusión observada podría ser de este último tipo, y que su origen podría deberse a la acción de MARCKS, una proteína capaz de vincular la membrana con la corteza celular, sugiriendo una causa principalmente mecánica para la misma.

Con el objetivo de comprender el origen de la extrusión celular emprendimos una aproximación doble, realizando experimentos farmacológicos sobre embriones de pollo cultivados, utilizando PMA y el inhibidor de la apoptosis QVD-OPh, y también experimentos *in silico* con un modelo mecánico que adaptamos buscando representar la morfología de los epitelios pseudoestratificados.

En nuestros experimentos farmacológicos tanto el tratamiento con PMA como el tratamiento doble con PMA y QVD-OPh generaron extrusión apical generalizada y alteraron la distribución normal de MARCKS, así como de los marcadores apicales γ -tubulina y ZO-1, que se volvieron más dispersos y menos polarizados, particularmente entre las células extruidas. En los embriones tratados con PMA fue posible encontrar células extruidas conteniendo la forma activada de Caspasa-3 (un marcador de apoptosis), que presentaron en general un aspecto anormal, diferenciándose de la mayoría de las células extruidas. No fue posible encontrar células así marcadas en los embriones que fueron tratados con PMA y QVD-Oph.

En las simulaciones computacionales se observó extrusión generalizada en tejidos con altas densidades nucleares, que pudo ser prevenida al introducir fuerzas que normalmente no son consideradas a la hora de modelar epitelios, relacionadas en nuestro caso con la distinción entre el lado apical y basal. Bajo estas condiciones se obtuvieron morfologías similares a la pseudoestratificada, con células columnarizadas cuya forma se ajusta a la distribución de núcleos rígidos. Como caso particular, mostramos que las simulaciones inicializadas con un grupo de células con núcleos localizados basalmente flanqueadas por un tejido sin núcleos dan como resultado un epitelio establemente plegado, pasando por estados semejantes a los observados en la neurulación primaria.

En conjunto, podemos afirmar que los diversos defectos inducidos por el tratamiento con PMA son independientes de la apoptosis, y que la extrusión apical así inducida es un ejemplo de extrusión viva, posiblemente causada por una inestabilidad mecánica que en situación normal sería prevenida por mecanismos relacionados con el establecimiento de la polaridad apico-basal de las células del epitelio. Además, nuestros resultados sugieren que estos mecanismos coinciden con aquellos que dan su característica morfología pseudoestratificada al neuroepitelio durante la neurulación primaria, y que difieren con respecto a los que dominan el estado mecánico de otros epitelios.

Introducción

Que durante los fenómenos del desarrollo deben estar actuando fuerzas mecánicas¹ es un hecho conocido desde hace más de un siglo, y es evidente por un simple motivo: los sistemas biológicos son sistemas físicos, y en los sistemas físicos el movimiento no inercial² y las deformaciones (ambas cosas claramente manifiestas en el desarrollo) requieren fuerzas. Sin embargo, en el estudio de la biología del desarrollo, otro tipo de aproximaciones basadas en la bioquímica, la biología celular, la genética, etc. han sido históricamente preferidas y utilizadas con gran éxito. El desarrollo de nuevas técnicas de medición de fuerzas y análisis de imágenes, así como el aumento del poder de cómputo necesario para realizar grandes números de simulaciones computacionales han estimulado el estudio mecánico de los tejidos y los procesos del desarrollo, haciéndolos relevantes sobre todo en las últimas décadas (Goodwin & Nelson, 2021). Este desarrollo reciente permite unir las aproximaciones mecánicas a la lista antes mencionada y así contribuir una nueva perspectiva a las disponibles para la comprensión de los fascinantes eventos propios de la vida temprana.

Naturalmente, aquellos biólogos que se interesen por esta perspectiva requerirán acceder a conocimientos físicos/matemáticos para poder desarrollar modelos y contrastarlos con los resultados experimentales, pero hay que señalar que este interés no es unilateral. Por tratarse de sistemas físicos extremadamente complejos, la materia viva constituye un área intrigante para los físicos, que requerirán a su vez de acceso a conocimientos biológicos, resultando en un tema cuyo estudio es en gran medida interdisciplinario y rinde frutos novedosos a distintas ramas de la Ciencia³.

Motiva al presente trabajo intentar aportar a esta aparente interfaz científica, parcialmente⁴ en el espíritu de la interdisciplinariedad, mediante el estudio de un fenómeno del desarrollo desde una perspectiva mecánica. Para esto fueron utilizados tanto experimentos en embriones cultivados como simulaciones computacionales de modelos físicos, con su correspondiente análisis matemático, limitados en su alcance por los límites actuales de la Ciencia, y (sobre todo) por los de su autor.

El fenómeno elegido en este caso resulta de ciertos defectos sugerentemente mecánicos que pueden ser inducidos durante la **neurulación primaria** en el embrión de pollo.

1 Distintas del concepto de “fuerzas” utilizado de manera abstracta en biología, sin necesariamente guardar relación con la física. De aquí en adelante sólo hablaremos en términos mecánicos, por ejemplo sobre tensiones y presiones.

2 Como el que muestra cambios de velocidad o de dirección, incluyendo el pasaje del reposo al movimiento.

3 Sin mencionar la gran y necesaria interacción con la informática y la óptica, por mencionar algunos.

4 La bibliografía lo es, pero ¿qué tan interdisciplinaria puede ser una sola persona?

Neurulación Primaria

La **neurulación** es el proceso por el cual se genera el tubo neural, precursor del sistema nervioso central, y constituye uno de los eventos más importantes del desarrollo temprano de los embriones vertebrados. Particularmente, la neurulación primaria es el proceso por el cual, en embriones amniotas, el **neuroectodermo** (NE) inicialmente plano se pliega y une sus bordes laterales (en la interfaz con el **ectodermo no neural** (ENN)), logrando una morfología tubular (Figura 1). Este proceso es de interés por distintos motivos: por su rol en el desarrollo de Sistema Nervioso, por ocurrir de manera similar en diversas especies (incluyendo el humano), y sobre todo para nosotros, *por ser un claro ejemplo de la acción de fuerzas mecánicas en el desarrollo*.

Primero el NE forma la **placa neural**, volviéndose más angosto (en dirección medio-lateral), grueso (en dirección dorso-ventral) y extenso (en dirección antero-posterior). A medida que esto ocurre, la placa neural comienza a plegarse, experimentando una serie de cambios: (1) se forma un “Punto bisagra” medial y dos medio-laterales, que constituyen tres puntos donde la placa está anclada a los tejidos adyacentes (2) se elevan los pliegues neurales incipientes alrededor del punto bisagra medial y (3) convergen los pliegues neurales definitivos sobre los puntos bisagra medio-laterales, cerrando el tubo (Schoenwolf et al., 1988). Experimentos clásicos demostraron que la formación de los puntos bisagra depende principalmente de cambios en las células de la placa, mientras que el plegado en sí depende principalmente de las células del ENN adyacente (Figura 2; Colas & Schoenwolf, 2001).

La neurulación primaria se da (con algunas diferencias) a lo largo del eje antero-posterior, ocurriendo de diferentes formas en diferentes especies. En pollos, la región correspondiente al cerebro medio es la primera en completar el cierre, que prosigue tanto anterior como posteriormente, dejando aberturas en ambos extremos (“neuroporo anterior” y “posterior”) que terminan por cerrarse al finalizar la neurulación (Nikolopoulou et al., 2017). Los defectos en el cierre del tubo neural pueden llevar a condiciones patológicas graves tales como anencefalia (si no se termina de cerrar el neuroporo anterior) y espina bífida (en el caso del neuroporo posterior) (Ampartzidis et al., 2023).

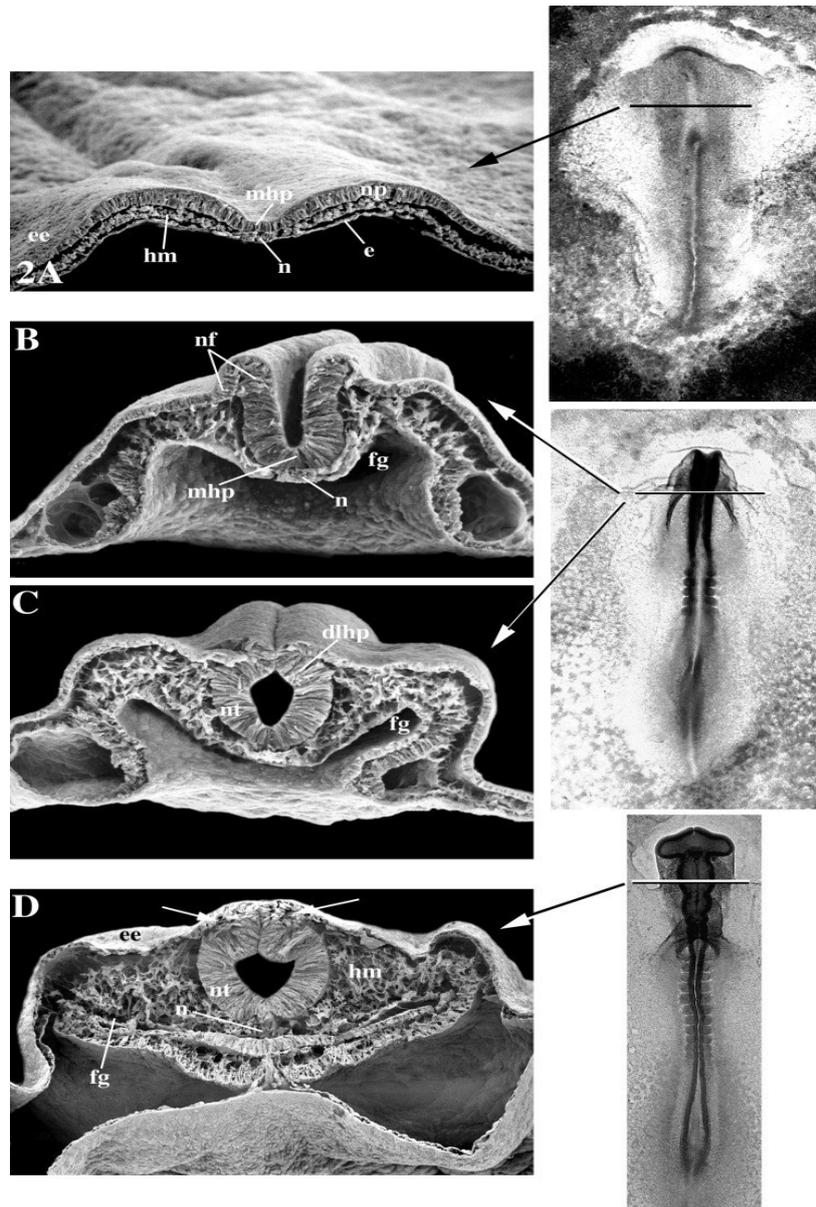


Figura 1: Cortes transversales vistos con microscopía electrónica de barrido (Izquierda, A-D) y embriones enteros (Derecha) en distintos momentos de la neurulación primaria del pollo en aproximadamente la misma región (mesencéfalo presuntivo). (A) Placa neural plana iniciando el plegamiento, presentando un punto bisagra medial. (B) Inicio del plegamiento, con pliegues neurales incipientes ya visibles. (C) Convergencia de los pliegues neurales, que se mantienen sin fusionar. (D) Habiéndose fusionado en gran medida los pliegues neurales definitivos, se forma el techo del tubo neural, definiendo (entre otras) las células de la cresta neural (flechas). dlhp: punto bisagra dorsolateral; ee: ectodermo no neural (ENN), mhp: punto bisagra medial; n: notocorda; nf: pliegue neural; np: placa neural. Reproducido de Colas & Schoenwolf (2001).

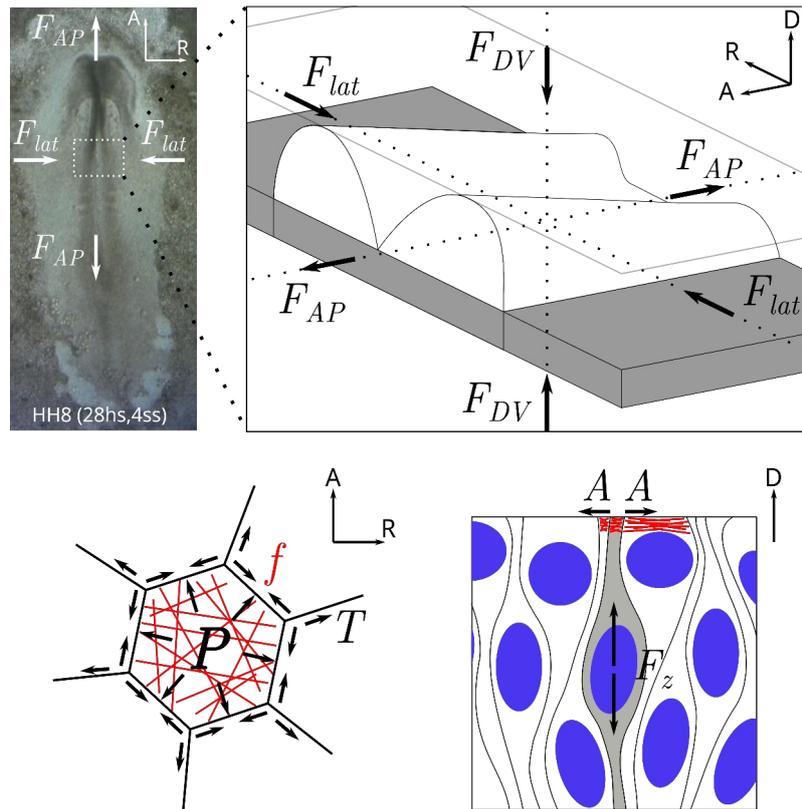


Figura 2: Fuerzas presentes durante la neurulación primaria en el embrión de pollo. (Arriba) Imagen de un embrión de pollo con 28 h de incubación (etapa de 4 somites) visto desde el lado dorsal, junto con un diagrama esquemático que representa la región marcada, mostrando el NE (en blanco) así como los tejidos y estructuras adyacentes (en gris), que participan en la generación de fuerzas externas. F_{AP} : Fuerzas en el eje antero-posterior, F_{lat} : Fuerzas laterales; F_{DV} : Fuerzas externas en el eje dorso-ventral (Abajo) Fuerzas que actúan a nivel microscópico sobre el NE. Los diagramas muestran conjuntos de células del NE, vistos en un corte tangencial desde el lado dorsal, donde presentan una forma aproximadamente poligonal (Izq.) y en un corte perpendicular, donde presentan una forma de huso (Der.), con acumulación apical de actina y núcleos a diferentes alturas del eje dorso-ventral. P : Presión generada por el volumen interior de la célula, y que se resiste a la compresión del mismo; T : Tensión superficial asociada a la interfaz entre células, y que depende principalmente de las propiedades de la membrana celular (en los modelos, sin embargo, se suele incluir en T fuerzas relacionadas a la corteza celular); f : fuerzas de tracción generadas por los distintos filamentos de actina-miosina (la corteza), de organización compleja; A : Fuerzas de adhesión entre las distintas células, generadas por diversas proteínas de adhesión, particularmente la N-cadherina; F_z : Fuerzas asociadas al movimiento del núcleo en el eje dorso-ventral como parte de la migración nuclear intercinética.

Mecánicamente, el pliegue del neuroepitelio ha sido objeto de estudio desde hace 150 años (His, 1874; Roux, 1893). Las fuerzas involucradas pueden ser múltiples y de diversos orígenes (Figura 2), extrínsecas o intrínsecas, todas asociadas de alguna manera a la capacidad de pliegue. Como se mencionó antes, están involucradas fuerzas laterales (F_{lat}) generadas por el ENN, necesarias para completar el plegamiento (Alvarez & Schoenwolf, 1992; de Goederen et al., 2022). El estiramiento del propio EN (p. ej.: por *extensión convergente*) genera fuerzas en sentido axial (F_{AP}) sobre cada sección del mismo que podrían inducir un plegamiento en el eje de estiramiento (Schoenwolf & Smith,

1990). Y aunque no en el caso de la neurulación primaria, se ha propuesto que la acción de fuerzas en el eje dorso-ventral (F_{DV}) por parte de la membrana vitelina puede ejercer una influencia mecánica importante en distintas situaciones durante el desarrollo (Chen et al., 2016; Hočevár Brezavšček et al., 2012). Además se ha demostrado que, una vez cerrado el tubo neural, la interacción mecánica con otros tejidos ejerce fuerzas en el eje antero-posterior con diferentes efectos en diferentes secciones del NE (Danesin et al., 2021).

Más allá de estos efectos a la escala de tejidos, se entiende que los **cambios a nivel celular** en número, posición, forma, tamaño, adhesión y hasta la muerte celular (todos asociados a fuerzas *intrínsecas* al NE) cumplen un rol fundamental (Colas & Schoenwolf, 2001; Roellig et al., 2022). Particular atención se ha prestado al rol de la actina (Escuin et al., 2015; Zolessi & Arruti, 2001), o más en general, al de la corteza celular (Salbreux et al., 2012). La capacidad de la corteza de contraerse y de acoplarse a las proteínas de adhesión celular y a la membrana apical (Lembo et al., 2023; Sawyer et al., 2011) la convierten en un punto de partida natural cuando se buscan las causas mecánicas de diversos procesos morfogenéticos. Se la ha vinculado además con las tensiones medibles apicalmente (Chugh et al., 2017, 2017; Sitarska & Diz-Muñoz, 2020), que figuran usualmente en los modelos actuales del tema (Alt et al., 2017), y sobre todo con la determinación de la forma celular por el bien conocido fenómeno de *constricción apical*.

La constricción apical es un gran ejemplo de cómo los cambios a nivel celular (acoplados con la polaridad epitelial) pueden llevar a cambios en la morfología del tejido entero. Mediante la actividad de la miosina de tipo II presente en la corteza apical, se puede disminuir el área apical de una célula. Si durante este proceso se preserva el volumen de la célula, la misma adquiere una forma de cuña, lo que promueve la curvatura del epitelio. La constricción apical ha recibido atención tanto experimental como teórica (Ampartzidis et al., 2023; Martin & Goldstein, 2014; Yamashita et al., 2024) y suele usarse como explicación para fenómenos morfológicos de este estilo, siendo de los mecanismos de pliegue más estudiados en la actualidad.

Sin embargo, se han propuesto otros mecanismos para el plegado de monocapas epiteliales (Li et al., 2020; Pearl et al., 2017). Particularmente, es sabido que en la neurulación primaria en embriones de pollo la inhibición de la actividad de la miosina II no detiene la formación del pliegue medial ni altera la morfología en cuña de las células involucradas. El motivo parece ser que en este caso, en vez de generar una constricción apical, se produce una expansión basal de las células debido a un posicionamiento preferentemente basal del núcleo durante este proceso, con resultados similares (Schoenwolf et al., 1988). Esta capacidad responde a las características particulares del neuroepitelio, que son fundamentales para entender nuestro problema de estudio.

El Neuroepitelio

El neuroepitelio es un **epitelio pseudoestratificado**, es decir, un epitelio constituido por una sola capa de células que abarcan todo el grosor del tejido pero cuyos núcleos se localizan a distintas alturas, dando un aspecto de diversas capas celulares (de donde surge el término). Estos tejidos presentan polaridad apico-basal y en condiciones normales la división celular ocurre en células cuyo núcleo está localizado apicalmente, lo cual requiere el acoplamiento de la posición nuclear y el ciclo celular en la denominada **migración nuclear intercinética** (Norden, 2017). Esto significa que las células del epitelio pseudoestratificado tienen formas tridimensionales complejas y dinámicas, particularmente al compararlas con otras células epiteliales (Iber & Vetter, 2022). La morfología pseudoestratificada permite la inclusión de un gran número de células en un

espacio reducido, característica imprescindible para un tejido activamente proliferante como el NE, y que se ve acentuada aún más por la columnarización de la placa neural que ocurre al principio de la neurulación⁵.

Debe destacarse que desde un punto de vista mecánico, el NE debe ser capaz no solo de generar las fuerzas que lleven al cambio de forma, sino que también debe ser capaz de ser deformado apropiadamente para que esas fuerzas (más las extrínsecas) efectúen sus resultados. Es decir, debe ser capaz de *afectar*, y *ser afectado*, característica propia de los llamados “materiales activos” (D. A. Fletcher & Geissler, 2009). El tejido debe ser, por ejemplo, tanto suficientemente rígido como para poder completar complejos movimientos morfogénicos de manera organizada, como suficientemente flexible para permitir que la placa se convierta en un tubo (Eom et al., 2011).

Podemos decir que al referirnos a estas propiedades estamos hablando del **estado mecánico** del tejido, que incluye propiedades a distintas escalas espaciales y temporales tales como su rigidez, los esfuerzos internos entre células, la dinámica nuclear, etc., y que parece estar determinado de manera compleja por un gran número de factores conocidos, como la polaridad apico-basal, el citoesqueleto de actina y miosina, el núcleo, los microtúbulos, las proteínas de adhesión, las vesículas intercelulares, entre otros. Para entender la neurulación primaria es necesario entender el estado mecánico del neuroepitelio durante la misma, y para entender esto es buena idea observar qué propiedades cambian cuando la neurulación falla.

Antecedentes: Cómo inducir y estudiar defectos en la neurulación

La Proteína MARCKS

MARCKS (Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate) es una familia de proteínas ubicuas compuesta en pollo por dos proteínas (MARCKS y MARCKS-Like 1) que sirven como sustrato para diferentes quinasas de la familia de la PKC (Figura 3). Las proteínas de esta familia tienen una estructura intrínsecamente desordenada y tres dominios altamente conservados: un extremo N-terminal miristoilado que, por tener unida una cadena larga de ácidos grasos, es capaz de insertarse en la membrana celular y secuestrar PIP₂ (Fosfatidilinositol bisfosfato) (Laux et al., 2000); un dominio llamado MH2; y el dominio efector (ED), que contiene serinas que pueden ser fosforiladas por PKC (Arbuzova et al., 2002). MARCKS se une a la membrana tanto hidrofólicamente vía el dominio miristoilado como electrostáticamente vía residuos básicos del ED, requiriéndose ambas fuerzas para estabilizar la unión. Esto permite que, al fosforilar las serinas del ED, se reduzca la interacción con la membrana lo suficiente como para lograr que se separe de la misma, constituyendo lo que se llama el “Switch electrostático” (McLaughlin & Aderem, 1995), el cual permite regular la distribución y función de MARCKS dentro de la célula. Cuando está unida a la membrana, MARCKS es capaz de entrecruzar filamentos de actina uniéndose directamente a los mismos, e incluso de promover la polimerización de actina (El Amri et al., 2018).

⁵ Existen, sin embargo, epitelios pseudoestratificados mucho más gruesos, llegando hasta el milímetro, aproximadamente (para una discusión sobre esta clasificación, ver Norden, 2017)

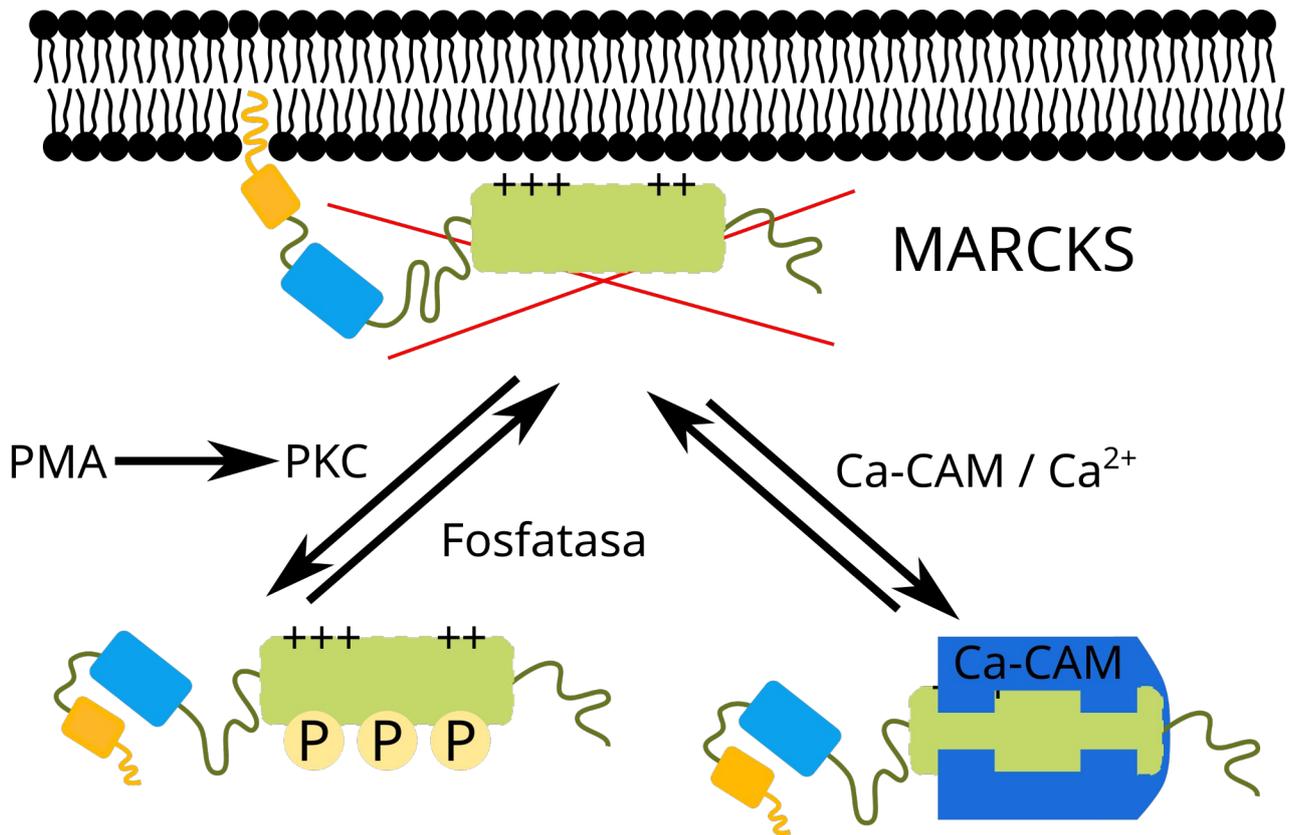


Figura 3: Representación de las principales interacciones y cascadas de señalización de MARCKS. La proteína MARCKS tiene una estructura intrínsecamente desordenada que contiene tres dominios conservados. Cuando las serinas del dominio efector (verde) no están fosforiladas, la proteína puede unirse tanto a filamentos de actina (haciendo crosslinking) como a la membrana, tanto por interacciones electrostáticas del dominio efector como hidrofólicamente por su dominio miristoilado (naranja). En el caso que la proteína sea fosforilada (principalmente por PKC, que a su vez puede ser activada mediante el uso de PMA), la misma se separa de la membrana y se vuelve citoplásmica (“Switch electrostático”). Bajo altas concentraciones de calcio, MARCKS es capaz de unirse a la Ca-calmodulina, lo que también le da una distribución citoplasmática. Nótese que la capacidad de entrecruzar filamentos de actina, así como las interacciones con PKC y Ca-CAM son mutuamente excluyentes.

Trabajos realizados por nuestro grupo de investigación mostraron que la proteína MARCKS se localiza apicalmente en la placa neural del embrión de pollo (a diferencia de los tejidos circundantes) hasta el cierre del tubo neural, cuando pierde esta distribución polarizada (Zolessi & Arruti, 2001). Se demostró además que la activación de PKC utilizando el forbol-ester pro-carcinogénico y permeable a la membrana forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) disminuye en gran medida la polarización apical de MARCKS e induce una serie de defectos en la neurulación (extrusión celular, pérdida de la polaridad apico-basal y disminución del grosor de la monocapa, entre otros) que pueden ser parcialmente evitados al expresar una forma no fosforilable de MARCKS y reproducidos mediante el *knockdown* de MARCKS usando morfolinós (Aparicio et al., 2018; Figura 4). Estos resultados sugieren un rol importante para MARCKS en el correcto desarrollo de la neurulación, particularmente en relación a los defectos antes mencionados.

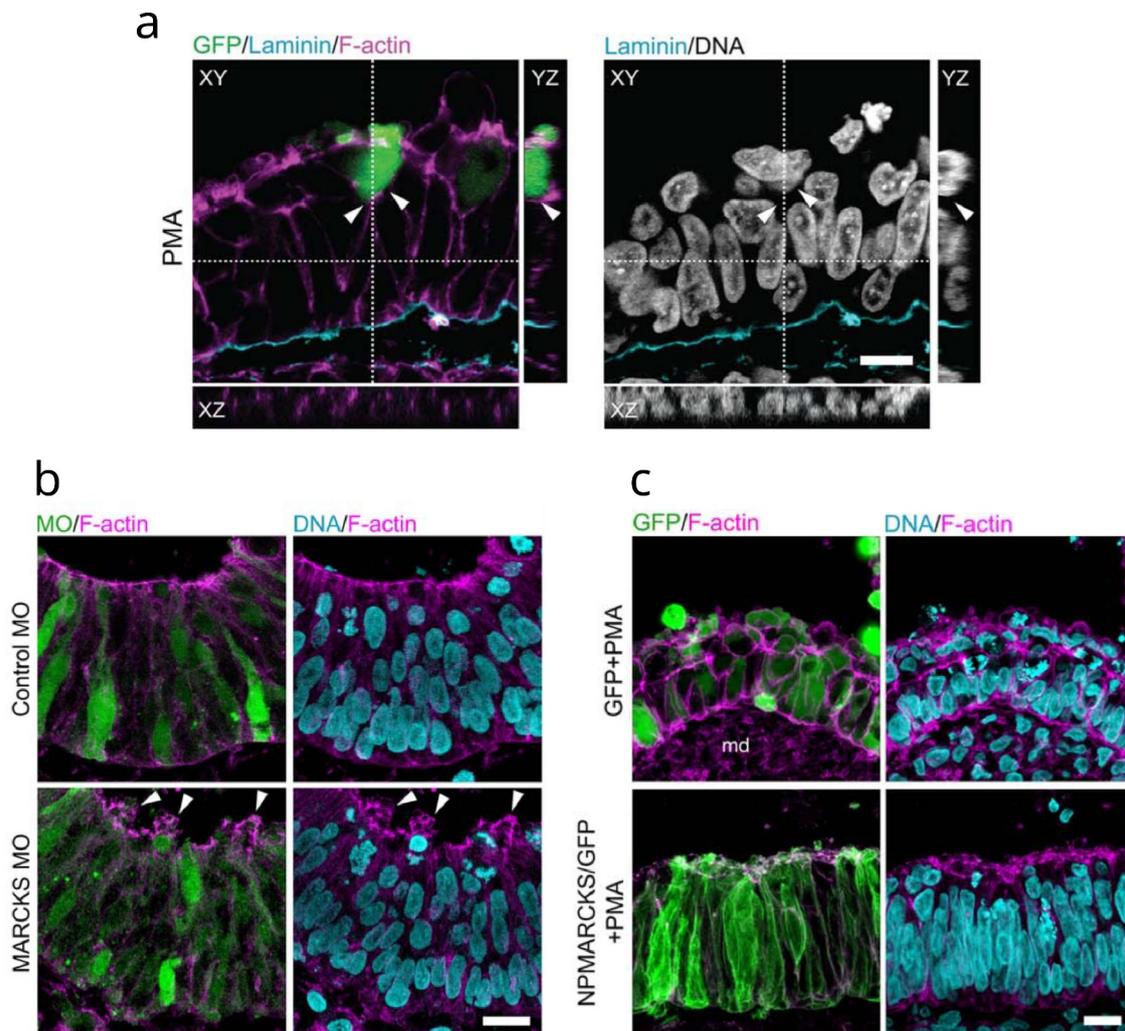


Figura 4: Relación entre defectos inducidos por PMA y la proteína MARCKS en el embrión de pollo. (a) El tratamiento con PMA induce extrusión apical. Al observar células electroporadas para expresar EGFP que han sido extruidas (puntas de flecha) puede comprobarse que han perdido totalmente el contacto con la lámina basal, lo cual no acontece en el EN normal, que conforma una monocapa. (b) Este efecto puede ser parcialmente reproducido (puntas de flecha: células extruidas) haciendo un knockdown de MARCKS usando morfolinós. (c) Los defectos generados por el tratamiento con PMA pueden ser parcialmente evitados mediante la expresión de una forma no fosforilable de MARCKS (NPMARCKS, coexpresada con GFP), permitiendo una disminución casi total de la extrusión, pero manteniendo la pérdida de grosor de la monocapa (no mostrado aquí). Modificado de Aparicio et al. (2018).

Extrusión Celular

Entre los efectos del tratamiento con PMA destacamos la ocurrencia de **extrusión celular**, un mecanismo que ha sido relacionado con varios procesos del desarrollo, así como con la carcinogénesis (Veloz et al., 2022). Este término se refiere a los procesos que involucran señales bioquímicas y mecánicas, y que en conjunto logran expulsar células de la capa epitelial en la que se encuentran, ya sea por el lado apical (como en este caso) o basal (Eisenhoffer & Rosenblatt, 2013; Nanavati et al., 2020). Típicamente la extrusión celular se clasifica en dos tipos: apoptótica (donde se elimina una célula que ha

comenzado el proceso de apoptosis) o viva (“*live*”, donde se elimina una célula viva), con cada una de ellas comprendiendo procesos distintos.

La extrusión apoptótica involucra cambios a mediana escala en el epitelio, como irregularidades topológicas, contracciones pulsátiles y disminución en la tensión del tejido (Atieh et al., 2021; Saw et al., 2017). Las propias células apoptóticas se vuelven hipercontráctiles antes de la extrusión (Nanavati et al., 2020) y secretan esfingosina-1-fosfato (S1P) para activar RhoA en células vecinas (Eisenhoffer et al., 2012; Villars & Levayer, 2020), lo que induce lamelipodios activos y el ensamblaje de un anillo basal de actomiosina mediante un proceso que depende de la cadherina (Duszyc et al., 2021; Lubkov & Bar-Sagi, 2014; Rosenblatt et al., 2001).

La extrusión viva, por otro lado, es uno de los mecanismos compensatorios que los epitelios utilizan para mantener densidades celulares constantes durante la proliferación, y ocurre normalmente en muchos epitelios, como en las microvellosidades intestinales, donde se identificó por primera vez (Madara, 1990). En este tipo de extrusión, que la célula sea extruida “viva” quiere decir que la célula permanecerá viva, jugando un rol activo en el proceso hasta eventualmente morir por *anoikis* una vez completa la extrusión (Slattum & Rosenblatt, 2014). Esta forma de extrusión requiere canales iónicos mecanorreceptores (tipo Piezo1 y Piezo2), S1P y la vía Rho-miosina, y es capaz de producir cambios topológicos regulares en la organización del epitelio (Eisenhoffer et al., 2012; Nanavati et al., 2020)

De estas dos, solo la extrusión apoptótica ha sido señalada como funcional en la neurulación primaria en aves, facilitando el cierre del tubo neural (Roellig et al., 2022), mientras que la extrusión de células vivas no parece ser parte del desarrollo normal del NE. Resultados previos mostraron que en el caso de la extrusión causada por tratamiento con PMA, solo algunas de las células extruidas del NE de pollo se marcaron con un anticuerpo anti Caspasa-3 activa e incluso se observaron algunas células con núcleos mitóticos, indicando que podría tratarse de extrusión viva (Aparicio et al., 2018). Sin embargo, el uso de métodos de inmunodetección puede llevar a subestimar enormemente la importancia correspondiente a la apoptosis en casos de extrusión celular (Levayer et al., 2016). Para poder confirmar que la apoptosis no está relacionada con la extrusión celular observada en este caso, sería necesario evitarla, por ejemplo mediante el uso de un fármaco antiapoptótico.

Modelos físico-matemáticos para la neurulación y la extrusión celular

Tanto el pliegue y cierre del tubo neural como la extrusión han recibido atención desde el punto de vista de la modelización mecánica de manera semi-independiente. Semi-independiente porque, a pesar de no haber sido combinados en un solo modelo, los formalismos utilizados para estudiarlos han coincidido. El esfuerzo de modelización de la neurulación y, más en general, el pliegue de epitelios ha sido diverso, incluyendo *Modelos de Elementos Finitos* (FEM, por sus siglas en inglés) (Brodland et al., 2010; de Goederen et al., 2022; Fierling et al., 2022) y *Vertex Models* (Modelos de Vértices) (Hannezo et al., 2014; Hiraiwa et al., 2019). Los intentos de modelizar la extrusión suelen caer en este último campo (Lee & Morishita, 2017; Marinari et al., 2012; Okuda & Fujimoto, 2020), aunque es posible también encontrar modelos basados en otros formalismos que fortuitamente exhiben extrusión celular (p. ej.: Yamashita et al., 2024).

Los *Vertex Models* (VMs) representan un tejido como un conjunto de células, y a cada célula como un polígono, representando la interfaz con otras células como una línea recta. Pueden ser tridimensionales (donde se representa cada célula como un poliedro y las interfaces como trapecios) o bidimensionales, representando solamente la superficie o un

corte del tejido, típicamente visto “desde arriba” (modelo apical) o “desde un lado” (modelo lateral, como en un corte transversal del tejido)(Figura 5). Las variables de interés en estos modelos suelen ser las posiciones de los vértices que definen las células (de ahí su nombre), de donde se pueden determinar los términos relevantes para las energías o fuerzas que caracterizan el sistema (Fletcher et al., 2014)

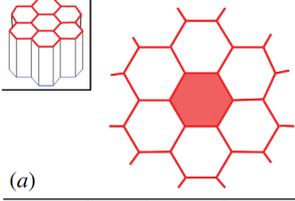
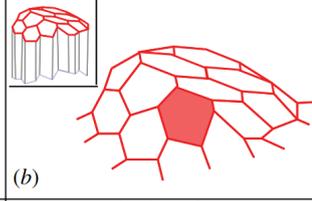
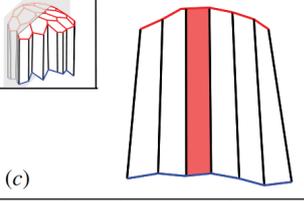
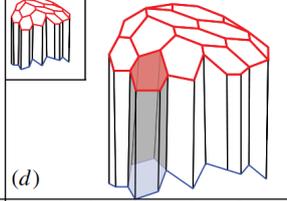
2D apical vertex model	3D apical vertex model	2D lateral vertex model	3D vertex model
			
(a) flat apical surface	(b) apical surface	(c) lateral cross section	(d) apical and basal surface

Figura 5: Diferentes tipos de Modelos de Vértices (VMs) presentes en la literatura. (a) Modelo 2D apical en el que los vértices delimitan la superficie apical de células en un epitelio plano con células aproximadamente prismáticas. (b) Modelo 3D apical en el que se permite que los vértices que definen la superficie apical de las células se desplacen en el espacio, definiendo así epitelios que pueden presentar curvaturas. (c) Modelo 2D lateral en el que los vértices definen células cuadrangulares, representando las dinámicas en un corte transversal del epitelio. (d) Modelos completamente 3D en el cual los vértices que definen una célula poliédrica pueden tomar cualquier posición en el espacio, permitiendo representar cambios en todos los ejes del epitelio. Adaptado de Alt et al. (2017).

Típicamente estos modelos están caracterizados por un funcional de energía que incluye términos relacionados al área (o volumen) celular, el perímetro (o superficie) total o de interfaces particulares, como por ejemplo (Farhadifar et al., 2007):

$$E(\vec{R}_i) = \sum_{\alpha} \frac{K_{\alpha}}{2} (A_{\alpha} - A_{\alpha}^0)^2 + \sum_{\langle i,j \rangle} \Lambda_{ij} l_{ij} + \sum_{\alpha} \frac{\Gamma_{\alpha}}{2} L_{\alpha}^2 \quad (\text{Ec. 1})$$

donde \vec{R}_i es el vector (de dos o tres entradas) que representa la posición del vértice i , A_{α} es el área de la célula α y A_{α}^0 un “área objetivo” (*target area*; equivalente volumen objetivo en modelos 3D) propia de la célula o el tejido, l_{ij} el largo de la arista entre los vértices i y j , L_{α} el perímetro de la célula α (equivalente al área superficial en modelos 3D) y K_{α} , Λ_{ij} y Γ_{α} son parámetros (en principio constantes) asociados a cada término. Las sumas sobre α son sobre todas las células y aquellas sobre $\langle i,j \rangle$ son sobre todas las aristas⁶. Se asume en general que el sistema tenderá a un mínimo local de esta energía.

Alternativamente, puede plantearse la dinámica del sistema en términos de fuerzas, que pueden incluso derivarse de ecuaciones como la Ec. 1 mediante la relación

$$\vec{F}_i^{tot} = -\frac{\partial E}{\partial \vec{R}_i} \quad (\text{Ec. 2})$$

siendo \vec{F}_i^{tot} la fuerza neta actuando sobre el vértice i . Uno podría pensar inicialmente que una descripción basándose en fuerzas tendría una dinámica Newtoniana, es decir de segundo orden, con

$$m \frac{d^2 \vec{R}_i}{dt^2} = \vec{F}_i^{tot} \quad (\text{Ec. 3})$$

⁶ Esta nomenclatura puede variar y **no es**, de hecho, la que usaremos en este trabajo.

siendo m la masa de la partícula y $d^2\vec{R}_i/dt^2$ su aceleración. Sin embargo, para sistemas biológicos microscópicos se asume que los efectos inerciales son despreciables (debido al pequeño valor del número de Reynolds), por lo que nos encontramos en un régimen viscoso, donde las fuerzas de fricción dominan. Dicho de otra manera, como la masa de un objeto es aproximadamente proporcional a su largo al cubo y su superficie es aproximadamente proporcional a su largo al cuadrado, a pequeñas escalas espaciales el efecto de la masa se vuelve despreciable frente al de las fuerzas viscosas, que dependen de la superficie de contacto con el medio. Si asumimos que las fuerzas viscosas son proporcionales y opuestas a la velocidad (vía una viscosidad η_R) podemos separar las fuerzas totales en $-\eta_R d\vec{R}_i/dt$ y \vec{F}_i y escribir entonces

$$\vec{F}_i - \eta_R \frac{d\vec{R}_i}{dt} = \vec{F}_i^{tot} = m \frac{d^2\vec{R}_i}{dt^2} \approx 0 \quad (\text{Ec. 4})$$

con lo que se obtiene la dinámica de primer orden (Odell et al., 1981)⁷

$$\eta_R \frac{d\vec{R}_i}{dt} = \vec{F}_i \quad (\text{Ec. 5})$$

Ciertas aproximaciones prácticas son necesarias para el estudio de los VMs. Por ejemplo, si dos vértices se acercan mucho (a menos de una distancia predeterminada), se los une en uno solo. Cuando se utilizan los VMs para estudiar la extrusión celular en 2D, normalmente se dice que la extrusión ocurre cuando una célula se convierte en un solo vértice, marcando su expulsión del plano⁸ (Alt et al., 2017), mientras que en 3D puede explicitarse esto a la reducción a un solo punto en una de las dos caras del epitelio (Okuda & Fujimoto, 2020). Cabe destacar que muchas características de los VMs (por ejemplo, la forma de sus funcionales de energía) se derivan de la física de las espumas, realizando una analogía entre células y burbujas (Fletcher et al., 2014).

Aunque estos modelos no suelen incluir núcleos, preocupándose más por los efectos de las membranas y cortezas celulares, algunos los han incluido, por ejemplo para modelar el efecto de la migración nuclear intercinética (Ishii et al., 2021). Por asumir interfaces rectas o planas, es inmediato que los VMs son incapaces de representar la compleja morfología de los epitelios pseudoestratificados, aunque existen modelos relacionados que permiten interfaces curvas (Kim et al., 2021) y se han encontrado similitudes cuantitativas entre los planos de corte de un epitelio pseudoestratificado y los VMs bidimensionales (Gómez et al., 2021; Iber & Vetter, 2022), implicando una posible generalización que los incluya.

7 Curiosamente, la proporcionalidad de las fuerzas y la velocidad significa que estos sistemas obedecen una dinámica Aristotélica en vez de Newtoniana.

8 Por supuesto, en el caso que el tejido sea “visto desde arriba”, esta ocurrencia no nos dice *hacia dónde* fue extruida la célula.

Hipótesis

Para el presente trabajo, y siguiendo los antecedentes expuestos en la introducción, proponemos que:

1. La extrusión celular inducida por PMA en el neuroepitelio de pollo durante la neurulación primaria es un ejemplo de extrusión viva
2. Durante la neurulación primaria en condiciones normales, el neuroepitelio se encuentra en un estado que es (aproximadamente) mecánicamente estable. Es decir, que aunque hay cambios dinámicos en el mismo, podemos aproximar su estructura como correspondiente a un estado de equilibrio estable de las fuerzas mecánicas involucradas.
3. Bajo el tratamiento con PMA, este estado normal se vuelve inestable y el tejido tiende a otro, necesitando la extrusión generalizada de células en el proceso.

Objetivos

El objetivo de este trabajo de tesis es identificar el origen de la extrusión celular que se observa en la neurulación primaria del embrión de pollo bajo tratamiento con PMA.

Para lograr esto, decidimos aproximarnos al problema por dos caminos distintos: uno experimental, realizando experimentos en embriones de pollo cultivados, y uno teórico, analizando y realizando simulaciones sobre un modelo mecánico. De esta forma los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Determinar el tipo de extrusión observada, es decir si se corresponde a un caso de extrusión viva o apoptótica.
2. Construir un modelo mecánico del neuroepitelio, y utilizarlo para identificar condiciones que puedan llevar a la ocurrencia de extrusión celular.

Experimentos farmacológicos sobre embriones

Métodos

Cultivo de Embriones

Para los experimentos se utilizaron embriones de pollo obtenidos a partir de huevos donados por la avícola Prodhin (Montevideo, Uruguay), incubados a 37 °C con humedad constante. Los embriones fueron cultivados utilizando la técnica EC, por la cual son removidos del huevo usando un papel de filtro y cultivados sobre un sustrato semi-sólido (Chapman et al., 2001), manteniendo la disposición *in ovo* de los distintos componentes, incluyendo la membrana vitelina, que continúa tensionada contra el embrión.

Para realizar el cultivo, los huevos fueron sacados de la incubadora en grupos de 6 o 12 (empezando una vez incubados por 28 h) y procesados individualmente. Siguiendo el método, se rompió la cáscara contra una placa de Petri de vidrio de 100 mm de diámetro, depositando el contenido del huevo en la misma, y posicionando la yema tal que el blastodermo quedara hacia el lado superior. Luego, se retiró la albúmina que se encontraba sobre la membrana vitelina en la zona del blastodermo usando pinzas, permitiendo que el papel filtro pudiera adherirse apropiadamente en el siguiente paso. Se colocó sobre la membrana un trozo cuadrado de papel de filtro de aproximadamente 1.5x1.5 cm con una perforación central con forma de trébol de cuatro hojas, tal que el embrión quedara dentro de la apertura. Luego se cortó la membrana vitelina cerca de los bordes externos del papel y usando pinzas se retiró el papel, junto con la sección de membrana vitelina y blastodermo, suavemente y de manera oblicua, preferentemente en el sentido de flujo del vitelo. Se eliminó el exceso de vitelo mediante inmersiones en PBS y finalmente se colocó el embrión con el lado dorsal hacia abajo sobre un sustrato semi-sólido de agar albúmina en una placa de petri de 35 mm de diámetro.

Una vez en cultivo, los embriones fueron datados bajo lupa binocular de acuerdo a las etapas descritas por Hamburger y Hamilton (Hamburger & Hamilton, 1992). A pesar de haber sido incubados por aproximadamente 28-30 h (correspondiente a la etapa HH 8), los embriones cultivados en un mismo experimento exhibieron una gran variedad en cuanto a su grado de desarrollo, variando en general en edad entre HH4 (18-19 h) y HH10 (33-38 h). Esta variación se debe en parte a que el cultivo fue llevado a cabo en etapas, causando unas horas (menos de 4) de diferencia en el tiempo de incubación de los diferentes grupos de huevos. En muchos casos fue necesario continuar incubando ciertos embriones cultivados en cámara húmeda para obtener suficientes ejemplares en la etapa deseada HH7+/HH8. Los embriones cultivados que se encontraron en la etapa deseada fueron mantenidos a temperatura ambiente por la menor cantidad de tiempo posible mientras se concluyeron las preparaciones para iniciar el tratamiento.

Tratamiento farmacológico

En cada experimento, los embriones fueron separados en grupos correspondientes a las 4 condiciones experimentales: control, tratamiento con la droga pan-anti-caspasa QVD-OPh, tratamiento con PMA y tratamiento con QVD-OPh y PMA (grupo de tratamiento doble). QVD-OPh fue disuelta en DMSO y alicuotada en una concentración de 20 mM, que fue diluida en proporción 1:120 en PBS 1x (correspondiente a DMSO 0,83%) para su uso en los experimentos, logrando una concentración de 167 µM, dentro del rango

reportado para embriones de pollo (100-400 mM en gotas, 100-200 mM en sustrato según Roellig et al. (2022)). PMA fue diluido en PBS 1x proporción 1:1000 a partir de alícuotas de concentración 5 mM (correspondiente a DMSO 0,1%), como fue reportado para generar los defectos deseados (Aparicio et al., 2018). Se igualó la concentración final del solvente DMSO (0.93% en PBS 1x) en todas las condiciones experimentales.

Cabe señalar que la concentración de DMSO que se considera segura para su uso en cultivo celular aproximadamente 0.1% (Gallardo-Villagrán et al., 2022), por lo que esta concentración cercana al 1% es relativamente alta. En nuestro caso fue necesaria una concentración tan alta para poder obtener dosis de QVD-OPh suficientemente concentradas. En el caso de experimentos con la droga anti-apoptótica se ha reportado el uso de DMSO en el rango de 0.5-1% en embriones de pollo cultivados (Roellig et al., 2022). No podemos descartar entonces la posibilidad de que ocurran efectos nocivos atribuibles a DMSO en los embriones utilizados, pero debemos señalar que de haber ocurrido estos efectos, nunca fueron comparables con aquellos causados por el tratamiento con PMA⁹.

En todos los casos los embriones fueron pre-incubados por 30 min (37 °C, en cámara húmeda) luego de haberles aplicado ventralmente una gota de 20 µl conteniendo DMSO (0,83%; grupos control y PMA) o QVD-OPh (grupos QVD-OPh y tratamiento doble). Esto se realizó para garantizar la difusión de QVD-OPh a las células del embrión antes del tratamiento con PMA, evitando que este último pudiera llegar a actuar en células sin inhibición de caspasas. Luego de la pre-incubación se retiró el exceso de solución y, usando pinzas, se trasladaron los embriones (lado dorsal hacia abajo, como antes) a otras placas conteniendo según su grupo DMSO, PMA, QVD-OPh o PMA y QVD-OPh disueltos en el sustrato semi-sólido. Luego se les aplicó una nueva dosis ventral de DMSO o QVD-OPh (igual que para la pre-incubación) y fueron incubados por 3 h en las condiciones antes descritas.

Una vez finalizada la incubación los embriones fueron retirados de las placas, brevemente enjuagados con PBS y fijados en formaldehído (diluido al 4% en PBS) *overnight* a 4 °C.

Criocortes

Los embriones fijados fueron recortados, removiéndose el papel de filtro, la membrana vitelina, y parte de los tejidos extraembrionarios, y luego lavados en PBS por 1 h tres veces para remover el fijador restante en solución. A partir de ahí fueron crioprotegidos, dejándolos primero en una solución de sacarosa al 5% y después en una de 20% en PBS, en cada caso esperando hasta que los embriones se depositaran en el fondo del tubo, indicando el equilibrio del medio interno con la solución. Luego los embriones fueron incluidos en un medio de gelatina 7,5% y sacarosa 15% en PBS (Stern & Holland, 1993) que se dejó solidificar (alineando los embriones) en una placa de petri de 35 mm y fue conservado a 4 °C. A la hora de cortar, se extrajo un bloque rectangular usando un bisturí, y se colocó en el soporte del crióstato (Cryocut E Reichert-Jung), adhiriéndolo con el medio de inclusión para congelación O.C.T. (*Optimal Cutting Temperature* Compund, Tissue-Tek) como pegamento. Los bloques así colocados fueron congelados usando nitrógeno líquido y situados en el crióstato. Se realizaron cortes transversales de 10 µm de grosor a -21 °C, concentrándonos en la región del embrión al nivel de los primeros somitas. Dichos cortes fueron levantados en portaobjetos gelatinizados (gelatina 0,5%, alumbre de cromo 0,05% en H₂O) a temperatura ambiente. Estos portaobjetos fueron posteriormente colocados en una caja de Coplin sellada con Parafilm y almacenados a 4°C, siempre por menos de dos semanas.

9 Ver más abajo, al hablar del número de embriones presentando extrusión celular.

Inmunofluorescencia indirecta sobre cortes

Siguiendo el protocolo de Stern & Holland (1993), se removió la gelatina de los cortes sumergiendo los portaobjetos en PBS a 38 °C por 30-60 min (dependiendo del tiempo de almacenamiento de los mismos) y se realizaron tres lavados cortos con PBS a temperatura ambiente. Se bloquearon los sitios de unión inespecífica incubando los cortes con una solución bloqueadora (seroalbúmina bovina (BSA) al 1% en PBS) por una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. A continuación los cortes fueron incubados con anticuerpos primarios (Tabla 1) a 37 °C por 40 min o a 4 °C *overnight* en cámara húmeda, usando una pequeña cantidad (30-50 µl) de un solo tipo de anticuerpo diluido en BSA 1% para cada grupo de cortes. Ocasionalmente se realizaron controles incubando sin anticuerpo primario presente.

Tabla 1: Anticuerpos primarios usados para la inmunofluorescencia indirecta, junto con su dilución de uso, qué detecta y su origen. Todos los anticuerpos fueron producidos en conejo, salvo por el anticuerpo Anti-ZO-1, producido en ratón.

Anticuerpo primario	Dilución usada	Estructura reconocida/Función	Origen
Polo52	1:1000	MARCKS total	(Toledo et al., 2013)
Anti-Caspasa 3 Activada	1:200	Marcador de apoptosis	Cell Signaling Technology , #9661
Anti-γ-tubulina	1:100	γ-tubulina, proteína del centrosoma	Sigma-Aldrich, T5192
Anti-ZO-1	1:50	ZO-1, marcador de polaridad apical	Invitrogen, 33-9100

Luego de esta incubación se realizaron 5 lavados rápidos en PBS para remover los restos de anticuerpo primario, y se procedió a incubar los cortes con anticuerpos secundarios fluorescentes (Tabla 2) en BSA 1% a 37 °C por 40 min en cámara húmeda. En el mismo lavado se agregó el marcador de actina filamentosa faloidina conjugado con rodamina en dilución 1:8000 o 1:10000.

Tabla 2 Anticuerpos secundarios usados para la inmunofluorescencia indirecta, junto con su dilución de uso y su origen.

Anticuerpo secundario	Dilución usada	Origen
Anti-conejo Alexa488	1:500	Invitrogen A21206
Anti-ratón Alexa488	1:500	Invitrogen A11001

Se realizaron 5 lavados con PBS, incorporando el marcador nuclear Hoechst 33342 (dilución 1:8000) en uno de ellos y dejando incubar por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se montaron los cortes en glicerol (70% en Tris 20 mM, pH 8), colocando un cubreobjetos sobre el grupo de cortes y sellando los bordes del mismo contra el portaobjetos con esmalte de uñas incoloro.

Adquisición y análisis de imágenes

Las imágenes de embriones enteros fueron obtenidas a partir de embriones que fueron fijados, recortados y montados luego del tratamiento farmacológico, sin pasar por los

procesos antes mencionados. Las mismas fueron adquiridas a campo claro usando un microscopio de epifluorescencia Nikon Microphot FXA a un aumento de 4x y, cuando fue necesario, fueron unidas (*stitched*) usando el software libre Hugin (versión 2023.0.0.d88dc56ded0e; d'Angelo, 2004). El uso de este programa introdujo pequeñas deformaciones que resultan despreciables para los propósitos de este trabajo. El mismo microscopio fue usado, con lentes objetivas de 20x (seco, NA = 0,75) y 40x (seco, NA = 0,95) para determinar el número de embriones en los que ocurrió extrusión celular, y realizar el conteo de núcleos picnóticos y de células mostrando actividad de caspasa-3.

Las imágenes de cortes fueron obtenidas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 con lentes objetivas 20x (seco, NA = 0.8), 25x (inmersión en glicerol, NA = 0,8) y 63x (inmersión en glicerol, NA = 1,3), tomando en este último caso secciones ópticas separadas por 1 μ m. El procesamiento y análisis de las imágenes fue llevado a cabo en el programa FIJI (Schindelin et al., 2012). Todas las imágenes de cortes aquí presentadas se corresponden a cortes a la altura del cuarto somita aproximadamente, y muestran la región (relativamente plana) de la placa neural adyacente al punto bisagra medial (Figura 6).

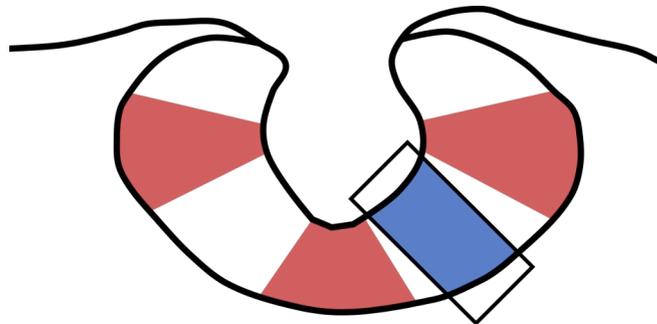


Figura 6: Diagrama de la placa neural de un embrión control de pollo durante la neurulación primaria. En rojo están señaladas las regiones aproximadas correspondientes al punto bisagra medial y los puntos bisagra medio-laterales (no siempre presentes en nuestros cortes). Las figuras de cortes presentadas en este trabajo se corresponden al área recuadrada, y representan la región aproximadamente plana (en azul) adyacente al pliegue medial.

Resultados experimentales

Observando primero la morfología general de los embriones fijados luego del tratamiento (Figura 7) se observa en general que aquellos embriones que fueron tratados solamente con QVD-OPh presentan un aspecto muy similar al de los embriones del grupo control, mientras que aquellos tratados con PMA (ya sea por sí solo o en conjunto con QVD-OPh) exhiben importantes diferencias incluso a primera vista. Notamos la diferencia en el largo total del embrión y en la morfología de la placa neuronal. Mientras que los embriones control y tratados con QVD-OPh tienen una placa bien plegada, con bordes (los pliegues neurales) regulares y aberturas pequeñas (tanto en el extremo anterior como posterior), aquellos tratados con PMA o PMA y QVD-OPh tienen una placa notablemente abierta (lo que se traduce a un mayor ancho de placa) con pliegues de forma irregular, marcando una clara diferencia geométrica entre las regiones de la placa en las que el tubo neural se ha logrado cerrado completamente y aquellas en las que continúa abierto.

A nivel microscópico, los resultados de la inmunodetección sobre cortes transversales nos permiten realizar distintas observaciones sobre la morfología de la placa neural, así como sobre la distribución intracelular de diversas proteínas. Observamos cortes de 72 embriones en total, distribuidos en 5 experimentos (Tabla 3).

Es inmediato al observar estos cortes (p. ej.: Figura 8 y 9) notar que en los embriones control, la placa forma una monocapa pseudoestratificada con núcleos distribuidos a distintas alturas del eje apico-basal, que posee una acumulación de F-actina cerca del borde apical, formando una línea relativamente bien definida y fácilmente visible. Lo mismo puede decirse sobre los embriones tratados exclusivamente con QVD-OPh. Sin embargo, en los embriones tratados con PMA (independientemente del tratamiento con QVD-OPh o no) se ve la presencia de núcleos y actina (mostrando aproximadamente bordes celulares) por sobre la línea de acumulación de actina que marca el borde apical de las células que siguen unidas a la lámina basal, evidenciando la ocurrencia de **extrusión apical**. Vale aclarar que, al no estar observando que se haya perdido contacto con la lámina basal, esto no es estrictamente suficiente para determinar la presencia de células extruidas, tratándose pro lo tanto de una medida indirecta.

Para cuantificar la ocurrencia de extrusión observamos la señal de faloidina en los distintos cortes y determinamos que había extrusión celular cuando se observaban células por encima de la línea (aproximada) de acumulación de actina, ocasionalmente comparando con la señal de la tinción de Hoechst. Para poder afirmar la ausencia de extrusión celular se revisaron 4 cortes cercanos del mismo embrión. Todos los embriones tratados con PMA (20 en total) y aquellos tratados con PMA y QVD-OPh (20) presentaron extrusión celular generalizada, definida en este caso por la presencia de células extruidas en la mayor parte de la placa neural en un corte dado. No se observó extrusión celular en ningún embrión tratado con QVD-OPh (17). Finalmente, fue posible encontrar células extruidas en algunos cortes de embriones de la situación control (5 de 15). Aunque no podemos descartar estos casos, en todos se observaron pequeños grupos de 3-5 células extruidas, a diferencia de la extrusión generalizada antes descrita. De estos 5 embriones, 2 solamente presentaron células extruidas en algunos cortes, por lo que pensamos que puede tratarse de un artefacto causado por un daño mecánico durante el proceso de cortado o montado. Los 3 embriones restantes pertenecieron todos al mismo experimento, por lo que podría tratarse de un artefacto experimental, en particular por una concentración demasiado alta de DMSO causada por un error en las diluciones (recordar que las concentraciones usadas fueron altas, cercanas a 1% en PBS 1x).

Similar a la presencia de extrusión celular, notamos en general diferencias en la distribución intracelular de varias proteínas al comparar los embriones control y tratados con QVD-OPh contra los embriones tratados con PMA o PMA y QVD-OPh. La proteína MARCKS, que en la placa neural de pollo se une a la membrana apical en condiciones normales (Zolessi & Arruti, 2001), presenta una distribución diferente, con poca acumulación apical en las células basales y una mayor distribución citoplasmática en general (Figura 10). La distribución de las proteínas ZO-1 y γ -tubulina, usadas como marcadores apicales, también difiere en los embriones que recibieron algún tratamiento con PMA. La γ -tubulina presenta una apariencia puntiforme al ser marcada, se encuentra en el centrosoma, y en condiciones normales está preferentemente distribuida apicalmente en las células de la placa neural (Chenn et al., 1998) como se ve en las condiciones de control y tratamiento con QVD-Oph. En los embriones tratados con PMA o PMA y QVD-Oph, la marca se distribuye de manera más dispersa en el eje apico-basal, aunque a veces resulta posible detectar varios puntos alineados aproximadamente en la región apical de las células basales (Figura 11). La proteína ZO-1 está asociada a las

uniones de tipo adherente¹⁰, concentrándose del lado apical durante el cierre del tubo neural (Aaku-Saraste et al., 1996). Esta distribución, visible en los embriones control y tratados con QVD-OPh, está apreciablemente distorsionada en los embriones tratados con PMA o el doble tratamiento, presentando una distribución más amplia y un menor grado de acumulación en general (Figura 12).

Un punto que diferencia los embriones que fueron tratados con PMA frente al resto fue el número de células que presentan indicadores de muerte apoptótica. Para determinar esto fueron contados y sumados los núcleos picnóticos y las células marcadas con el anticuerpo frente a la forma activada de Caspasa-3 (comúnmente usada para marcar células en apoptosis (Crowley & Waterhouse, 2016)) en 4 cortes diferentes de cada embrión. El número observado tanto de núcleos picnóticos como de células con actividad de Caspasa-3 fue más alto para los embriones tratados con PMA que para el resto de los tratamientos (en los que fue muy bajo en general) (Figura 13). Estas células en general estaban extruidas, con una apariencia redondeada particular, y separadas del resto. Cabe señalar que estos números son bajos para los embriones tratados con QVD-OPh, como era esperable, aun en embriones con cantidades similares de células extruidas (Figura 14). Esta diferencia puede apreciarse más claramente al ver imágenes del embrión *in toto*

En conjunto, nuestros resultados muestran que el tratamiento con PMA (así como el tratamiento doble) produjo la extrusión de una gran cantidad de células hacia el lado apical en la placa neural del embrión de pollo (Figura 8 y 9), así como una pérdida parcial de la polaridad apico-basal en el neuroepitelio (Figura 10,11 y 12). La única diferencia observada entre los embriones tratados con PMA y aquellos tratados con PMA y QVD-OPh fue el número de células con indicadores de muerte apoptótica (Figura 13, 14 y 15), indicando que el efecto del tratamiento con PMA sería independiente de la ocurrencia de apoptosis.

10 Aunque aquí está asociada a las uniones de tipo adherente, esta proteína participa en general en las uniones estrechas (*tight junctions*), que desaparecen durante el cierre del tubo neural.

Tabla 3: Distribución de embriones en los distintos grupos de tratamiento en los distintos experimentos presentados en este trabajo. Se realizaron en total 5 experimentos, lográndose en general obtener más de 3 embriones para una de las condiciones estudiadas (Control con DMSO 0.93%; PMA 5 μ M; QVD-OPh 167 μ M y el tratamiento doble con PMA y QVD-OPh). En general los resultados aquí presentados se corresponden a los 5 experimentos, salvo en el caso del inmunomarcado contra la forma activa de la Caspasa-3, para la cual sólo se usaron los grupos 3,4 y 5.

Experimento	Control	QVD-OPh	PMA	PMA + QVD	Total
1	2	3	3	3	11
2	3	4	3	3	13
3	3	3	4	4	14
4	3	3	4	4	14
5	4	4	6	6	20
Total	15	17	20	20	72

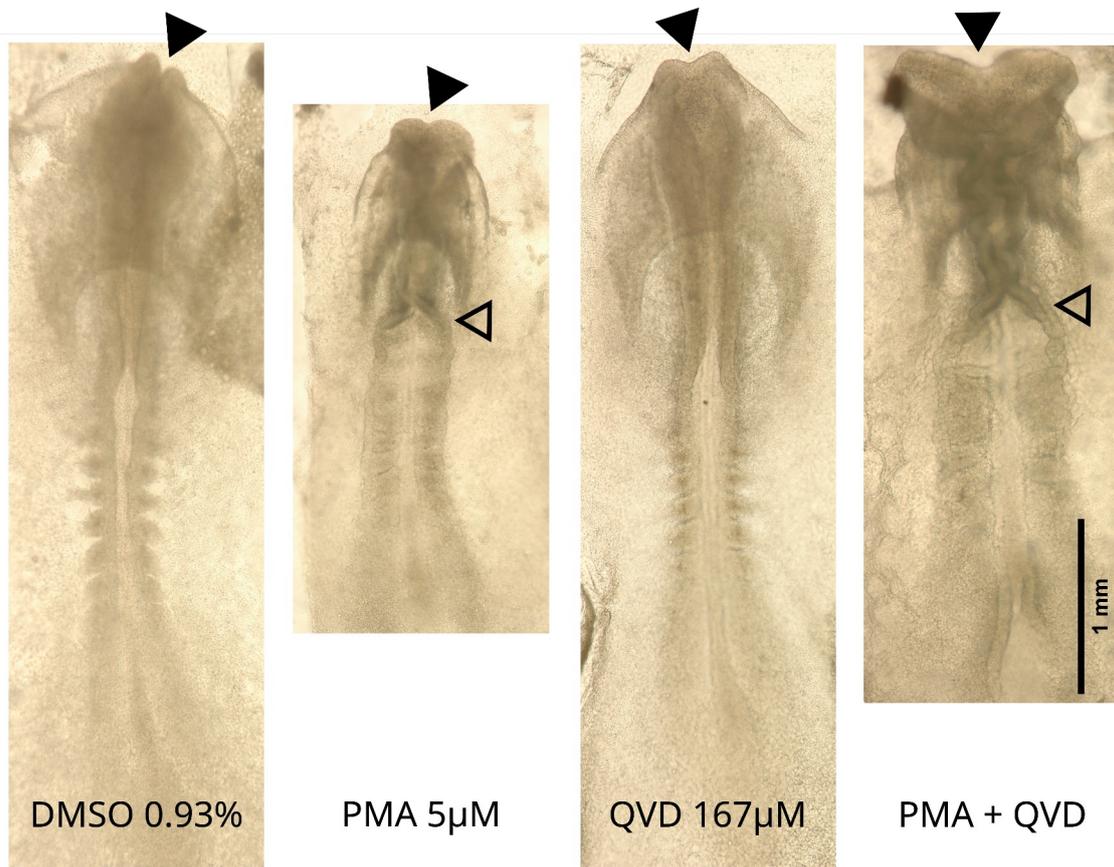
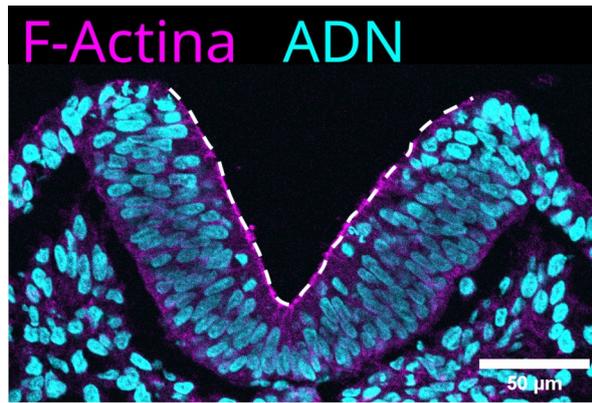
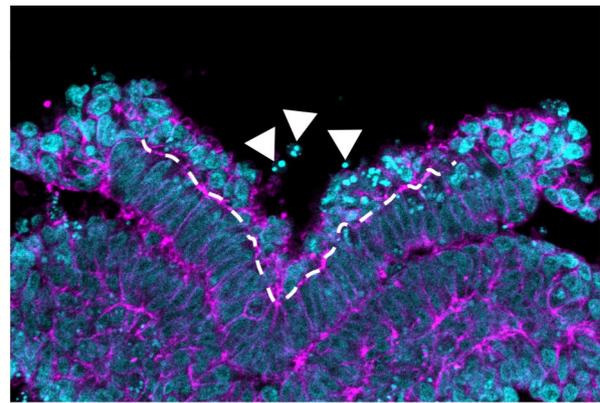


Figura 7 Morfología general del embrión de pollo luego del tratamiento farmacológico en las cuatro condiciones estudiadas (Control con DMSO 0.93%; PMA 5 μ M; QVD-OPh 167 μ M y el tratamiento doble con PMA y QVD-OPh). Se aprecian notables diferencias entre los embriones control y aquellos que recibieron algún tratamiento con PMA (PMA y PMA+QVD), entre las que destacamos el largo del embrión así como el ancho, grado de apertura y regularidad geométrica de la placa neural, particularmente visible en la apertura posterior (punta de flecha vacía) y el neuroporo anterior (punta de flecha rellena). Estas diferencias no son apreciables, sin embargo, al comparar los embriones controles con aquellos que sólo fueron tratados con la droga anti-apoptótica QVD-OPh. Todas las imágenes fueron obtenidas en campo claro utilizando el microscopio Microphot FXA a un aumento de 4x y compuestas usando el software Hugin cuando fue necesario. Barra de escala: 1 mm.



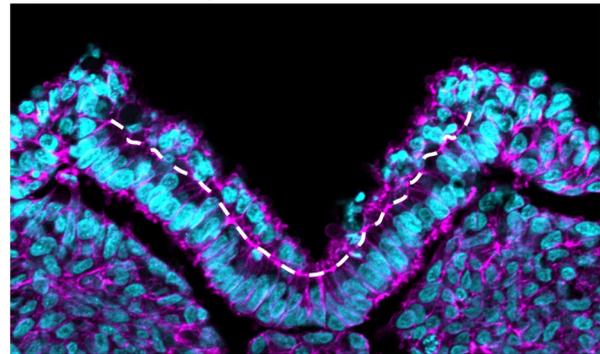
DMSO 0.93%



PMA 5 μ M



QVD-OPh 167 μ M



PMA + QVD

Figura 8: El tratamiento por 3 h con PMA genera defectos en el plegado de la placa neural y extrusión celular apical extensa, aún en presencia de la droga anti-apopótica QVD-OPh. En los embriones control (con DMSO 0.93%; Izq. Sup.) y tratados con QVD-OPh (167 μ M; Izq. Inf.) la placa constituye una monocapa de células altas que presentan acumulaciones apicales de F-actina, que a su vez aproximan la línea de la superficie apical del tejido. En las condiciones de tratamiento con PMA (5 μ M; Der. Sup.) o tratamiento doble (PMA y QVD-OPh; Der. Inf.), la placa presenta un aspecto diferente: las células de la placa tienen menor altura y se observan células extruidas, aquí visibles por la presencia de células redondeadas con núcleos apicales respecto a la línea de acumulación de F-actina (línea punteada). En el caso del tratamiento con PMA fue posible también observar células con núcleos picnóticos (algunos indicados con puntas de flecha), por lo general de forma redondeada y separados del resto de las células extruidas. F-actina marcada con faloidina conjugada a rodamina, ADN con tinción de Hoechst 33342. Todas las imágenes son cortes ópticos únicos a partir de un criocorte de 10 μ m de grosor, tomadas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 (objetivo 20x, seco, NA = 0,8), y procesadas en FIJI. Línea punteada: ubicación aproximada de la línea de acumulación de F-actina, correspondiente a la cara apical de NE normal. Puntas de flecha: núcleos picnóticos. Barra de escala: 50 μ m.

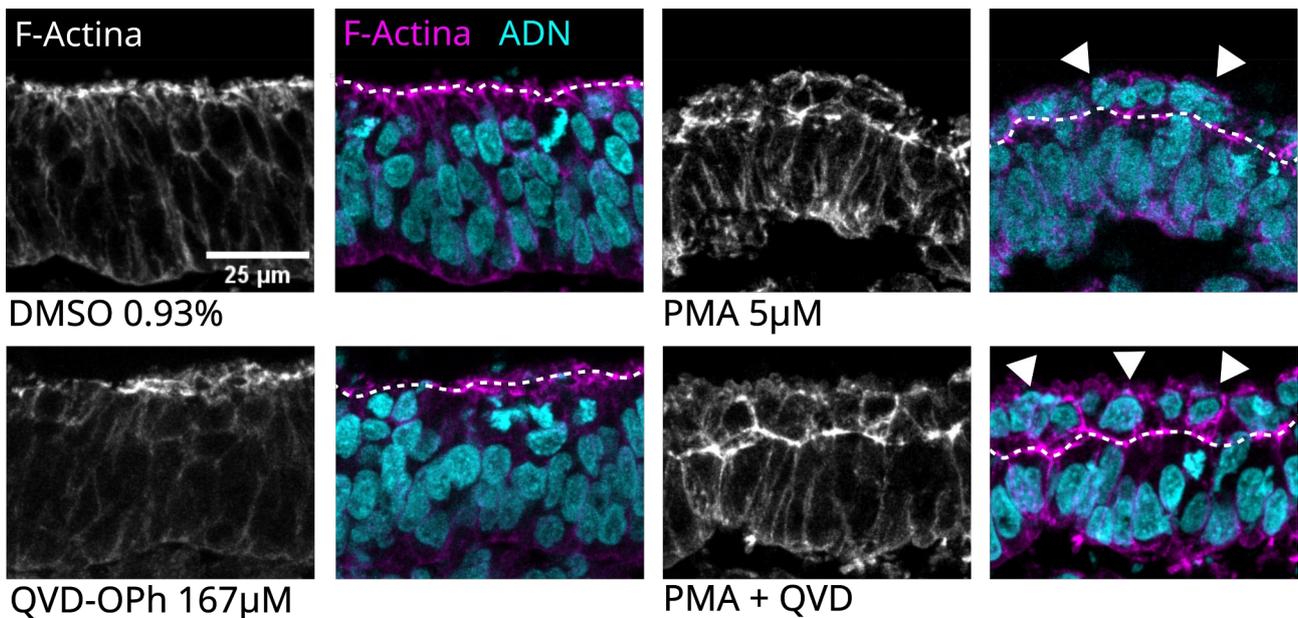


Figura 9: El tratamiento por 3 h con PMA genera extrusión celular apical extensa, aún en presencia de la droga anti-apopótica QVD-OPh. En los embriones control (con DMSO 0.93%; Izq. Sup.) y tratados con QVD-OPh (167 µM; Izq. Inf.) las células son altas y presentan acumulaciones apicales de F-actina, que aproximan la línea de la superficie apical del tejido. En las condiciones de tratamiento con PMA (5 µM; Der. Sup.) o tratamiento doble (PMA y QVD-OPh; Der. Inf.), se observaron células extruidas (algunos ejemplos indicados con puntas de flecha), aquí visibles por la presencia de células redondeadas con núcleos apicales respecto a la línea de acumulación de F-actina (línea punteada). F-actina marcada con faloidina conjugada a rodamina, ADN con tinción de Hoechst 33342. Todas las imágenes son proyecciones de máxima intensidad sobre 3 cortes ópticos (tomados cada 1 µm) centrales a partir de un criocorte de 10 µm de grosor, tomadas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 (objetivo 63x, inmersión en glicerol, NA = 1,3), y procesadas en FIJI. Línea punteada: ubicación aproximada de la línea de acumulación de F-actina, correspondiente a la cara apical de NE normal. Barra de escala: 25 µm..

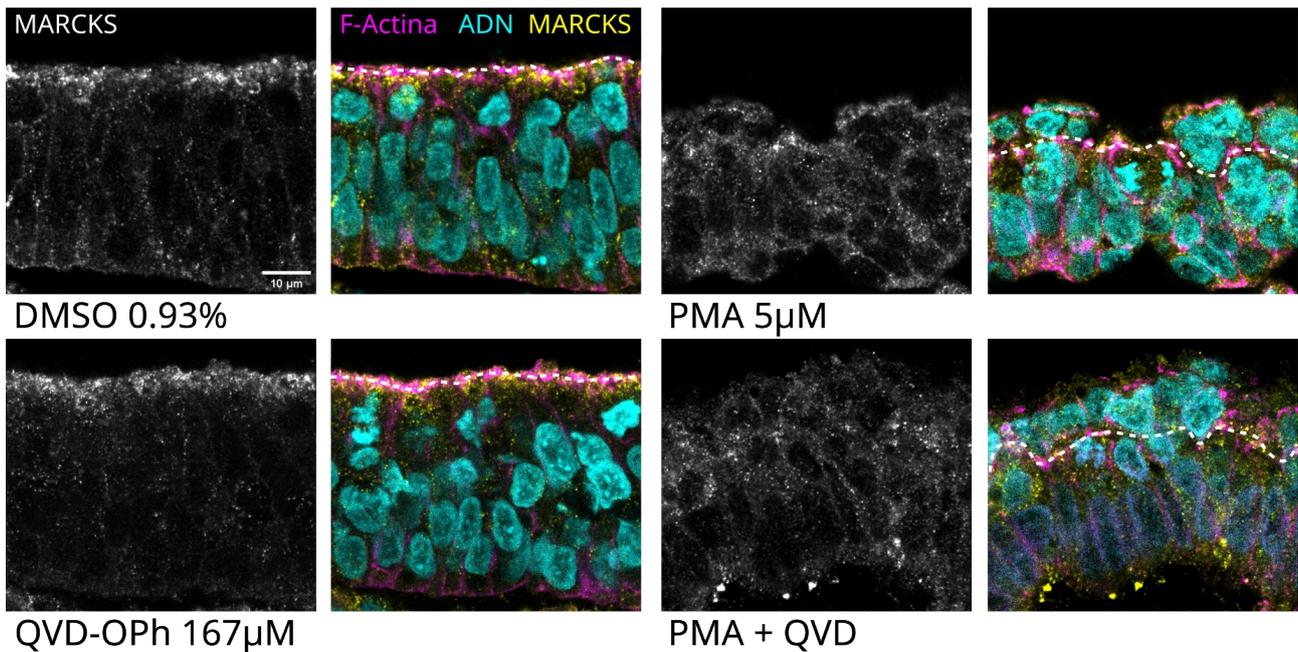


Figura 10: Distribución intracelular de la proteína MARCKS en embriones bajo los distintos tratamientos farmacológicos. Observamos que tanto en el caso control (Izq. Sup.) como en el tratado con la droga anti-apoptótica QVD-OPh (Izq. Inf.), MARCKS tiene una distribución claramente polarizada, acumulándose preferentemente del lado apical de la placa, coincidiendo aproximadamente con la distribución de F-actina (línea punteada). En los embriones tratados con PMA (en presencia o ausencia de QVD-OPh; Der. Inf. y Sup., respectivamente) esta distribución parece ser más dispersa, incluso en la zona de acumulación de F-actina, indicando una menor cantidad relativa de proteína MARCKS unida a la membrana (en su forma no-fosforilada). F-actina marcada con faloidina conjugada a rodamina, ADN con tinción de Hoechst 33342, MARCKS inmunomarcado. Todas las imágenes consisten en cortes ópticos únicos obtenidos a partir de criocortes de 10 µm de grosor usando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 a 63x de aumento (inmersión en glicerol, NA = 1,3), y procesadas en FIJI. Línea punteada: ubicación aproximada de la línea de acumulación de F-actina, correspondiente a la cara apical de NE normal. Barra de escala: 10 µm.

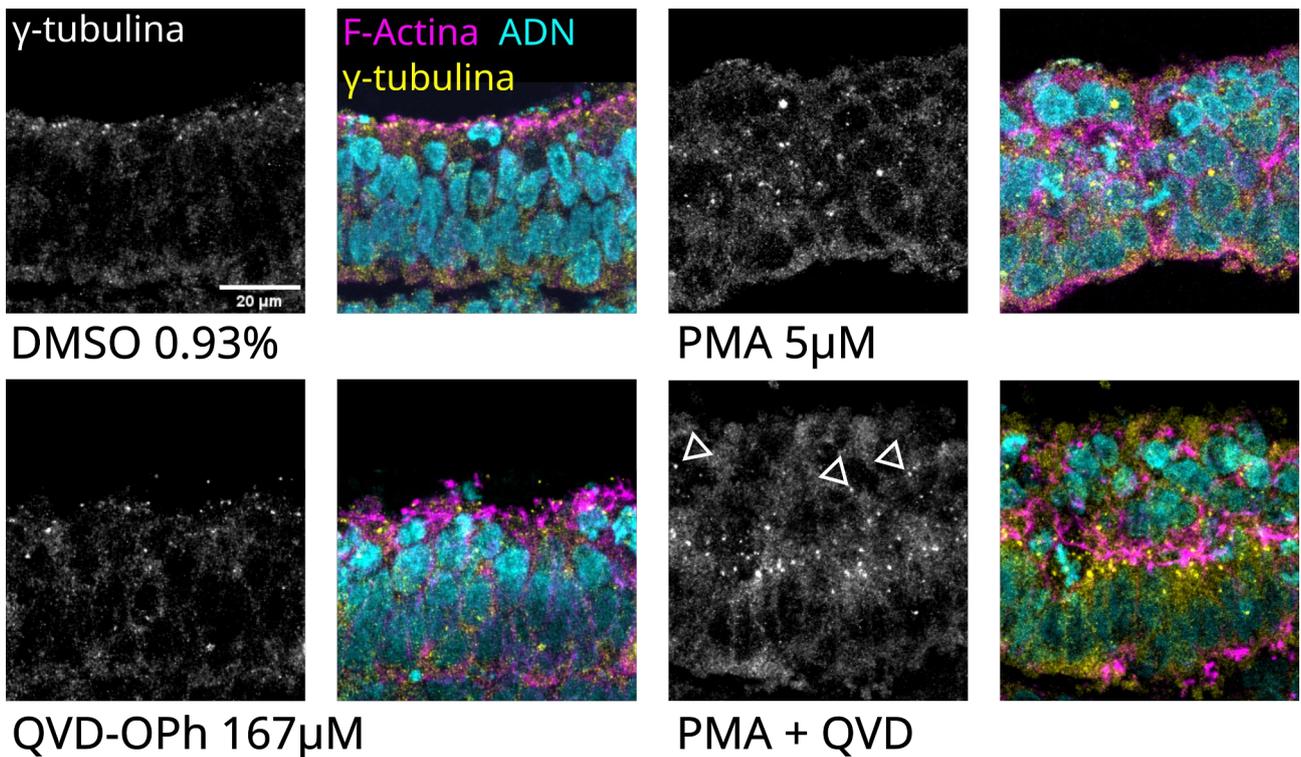


Figura 11: Distribución intracelular de γ -tubulina en embriones bajo los distintos tratamientos farmacológicos. La γ -tubulina marca el centrosoma, que generalmente es apical en el NE, como se observa tanto en el caso control (Izq. Sup.) como en el tratado con la droga anti-apoptótica QVD-OPh (Izq. Inf.). En los embriones tratados con PMA (Der. Sup.) y en aquellos con el tratamiento doble (Der. Inf.) esta distribución está alterada. En aquellas situaciones alteradas en las que es posible definir una línea de acumulación de actina (Der. Inf.), se ve que los centrosomas se localizan cerca de la misma, aunque se observa una distribución más dispersa entre las células extruidas (puntas de flecha huecas). En las que resulta difícil definir esta línea, la distribución es totalmente dispersa (Der. Sup.) indicando un mayor grado de alteración del tejido. F-actina marcada con faloidina conjugada a rodamina, ADN con tinción de Hoechst 33342, γ -tubulina inmunomarcado. Todas las imágenes son proyecciones de máxima intensidad sobre 3 o 4 cortes ópticos (tomados cada 1 μ m) centrales a partir de un criocorte de 10 μ m de grosor, tomadas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 a 63x de aumento (inmersión en glicerol, NA = 1,3), y procesadas en FIJI. Barra de escala: 20 μ m.

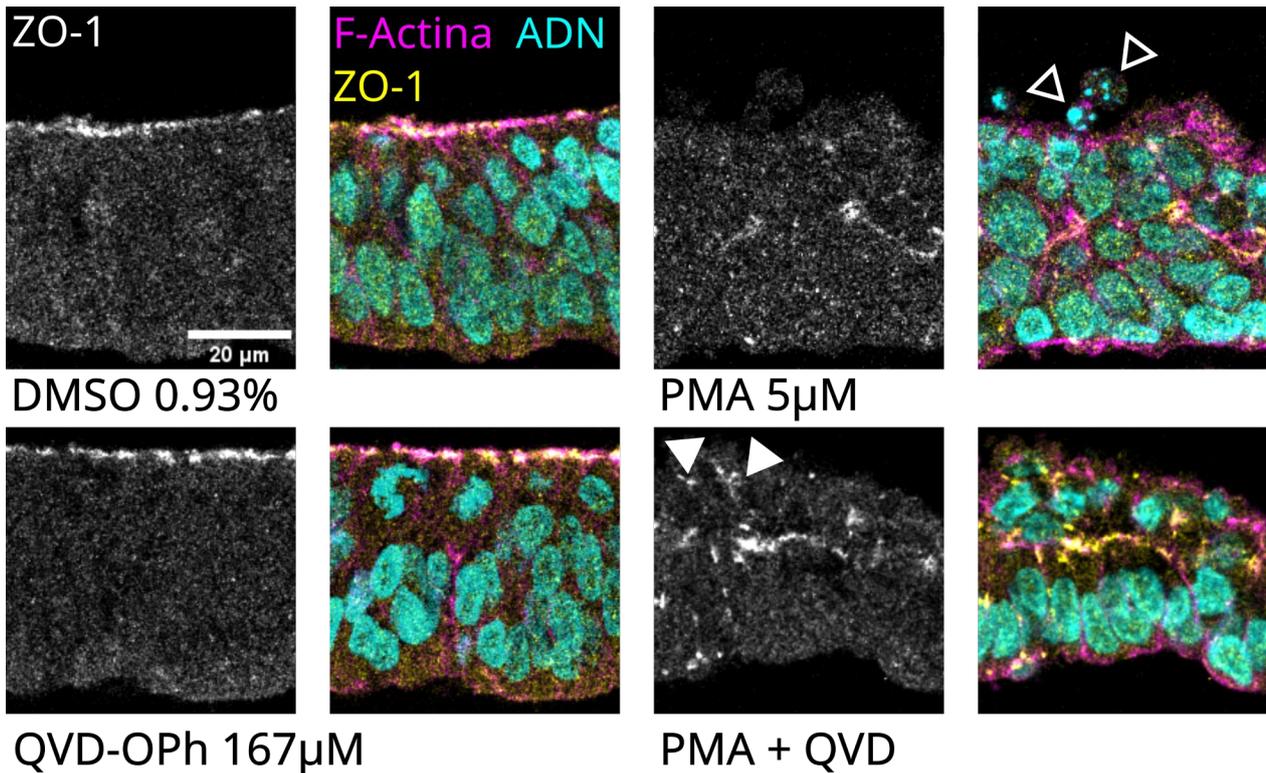


Figura 12: Distribución intracelular del marcador apical ZO-1 en embriones bajo los distintos tratamientos farmacológicos. Tanto en el caso control (Izq. Sup.) como en el tratamiento con la droga anti-apoptótica QVD-OPh (Izq. Inf.), la distribución de ZO-1 es principalmente apical, coincidiendo aproximadamente con la distribución de F-actina (en color magenta). En el tratamiento con PMA (Der. Sup.) y el tratamiento doble (Der. Inf.) esta distribución se ve más dispersa, coincidiendo parcialmente con la acumulación de F-actina en algunos sitios, e incluso presentando acumulaciones anómalas, posiblemente en una interfaz lateral con otra célula (Der. Inf., Punta de flecha rellena). Destacamos que en el caso del corte correspondiente al tratamiento con PMA se observan núcleos picnóticos (puntas de flecha huecas), pertenecientes a células de forma redondeada, separadas del resto de las células extruidas. F-actina marcada con faloidina conjugada a rodamina, ADN con tinción de Hoechst 33342, ZO-1 inmunomarcado. Todas las imágenes consisten en cortes ópticos únicos obtenidos a partir de criocortes de 10 μm de grosor usando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 a 63x de aumento (inmersión en glicerol, NA = 1,3), y procesadas en FIJI. Flechas huecas: Núcleos picnóticos. Flechas rellenas: Distribución anómala de ZO-1. Barra de escala: 20 μm .

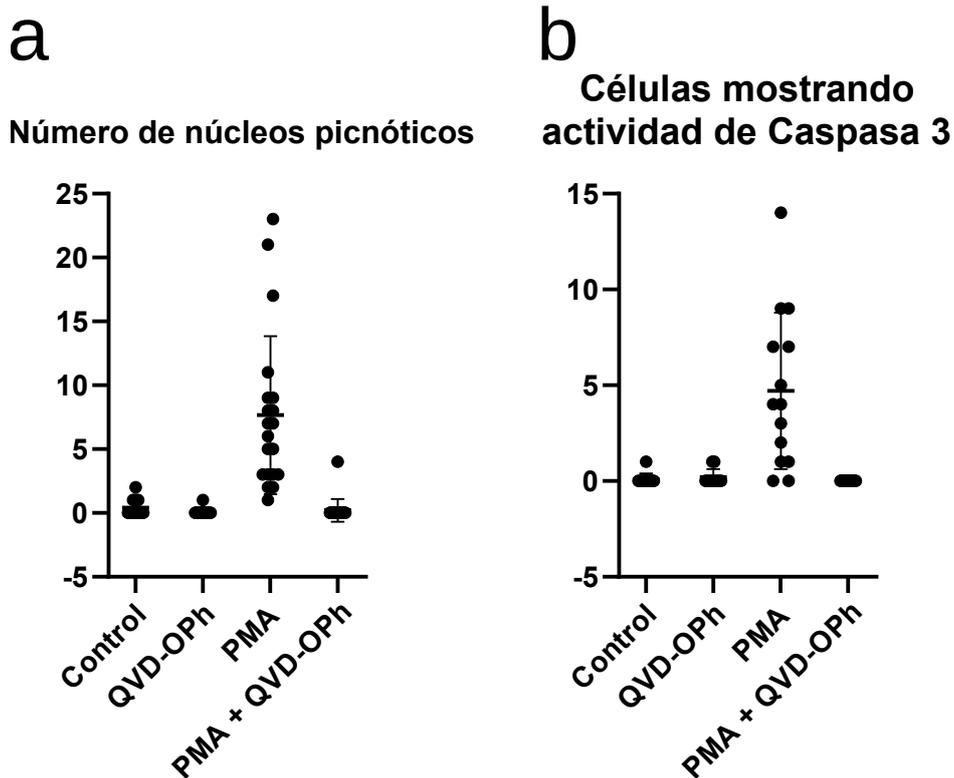


Figura 13: Indicadores de muerte celular para embriones en distintos grupos de tratamiento. En todos los casos los números representan el total acumulado para cada embrión en 4 cortes de $10\ \mu\text{m}$ de grosor diferentes, buscando cortes cercanos entre sí en la región de interés (los primeros somites, como en las otras figuras). (a) Número de núcleos picnóticos observados, indicando un estado avanzado de muerte celular. (b) Número de células marcadas conteniendo la forma activa de la caspasa-3 (marcada por inmunofluorescencia), indicando muerte por apoptosis. Cada punto representa el total acumulado de un embrión visto en 4 cortes cercanos, las barras representan el valor promedio más/menos un desvío estándar. Cortes observados usando un microscopio de epifluorescencia Nikon Microphot FXA a aumentos de 20x (seco, NA = 0,75) y 40x (seco, NA = 0,95).

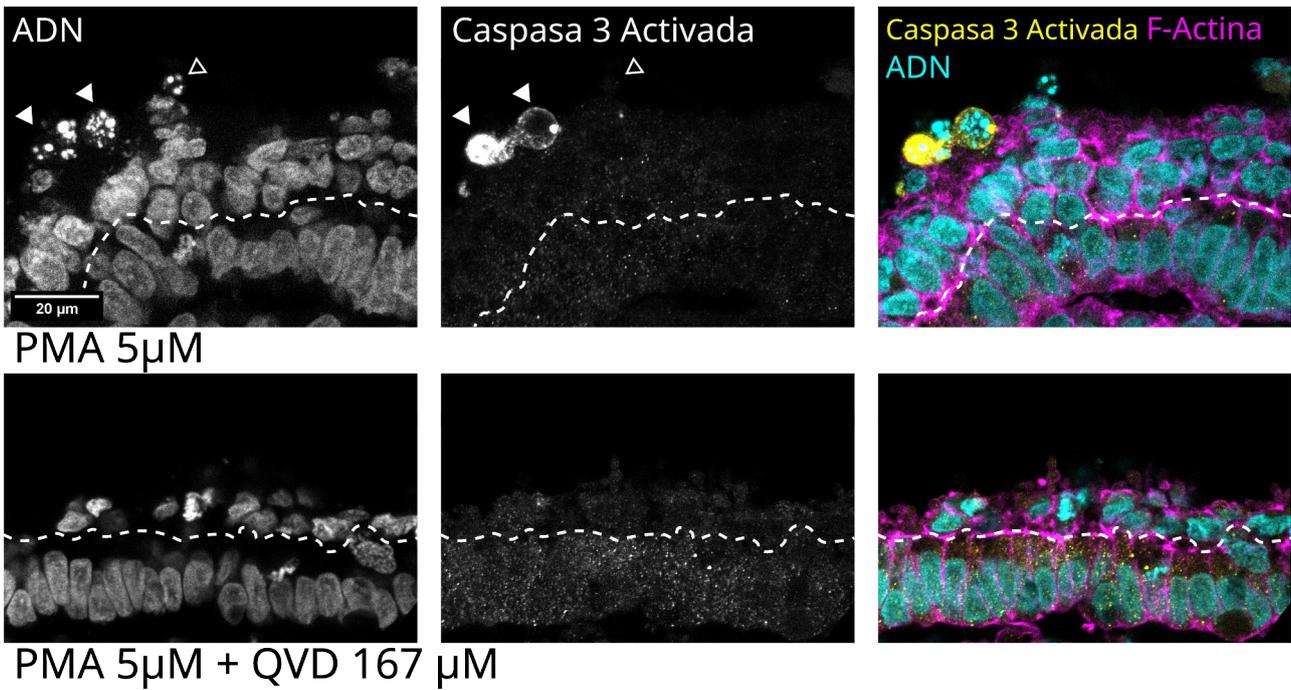


Figura 14 Distribución de F-actina, ADN y Caspasa-3 activada en embriones tratados con PMA (5 μM , Arriba) o con PMA y QVD-OPh (167 μM ; Abajo), ambos presentando células extruidas apicalmente. En el embrión tratado con PMA se ven células (o posiblemente fragmentos) marcadas por un anticuerpo anti Caspasa-3 activada, indicando que estaban en apoptosis. Las mismas presentan una forma redondeada, y parecen estar separadas del resto de las células extruidas. En algunos casos esta señal está asociada a núcleos picnóticos (punta de flecha rellena), pero no siempre (puntas de flecha vacía). No se observaron células marcadas por el anticuerpo anti Caspasa-3 activada en los embriones que recibieron el co-tratamiento con la droga anti-apoptótica QVD-OPh. F-actina marcada con faloidina conjugada a rodamina, ADN con tinción de Hoechst 33342, Casp3 inmunomarcada. Todas las imágenes consisten de cortes ópticos únicos obtenidos a partir de criocortes de 10 μm de grosor usando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 a 63x de aumento (inmersión en glicerol, NA = 1,3), y procesadas en FIJI. Línea punteada: ubicación aproximada de la línea de acumulación de F-actina, correspondiente a la cara apical de NE normal. Puntas de flecha: distribución de ADN en las regiones marcadas para Caspa-3 activada. Barra de escala: 20 μm .

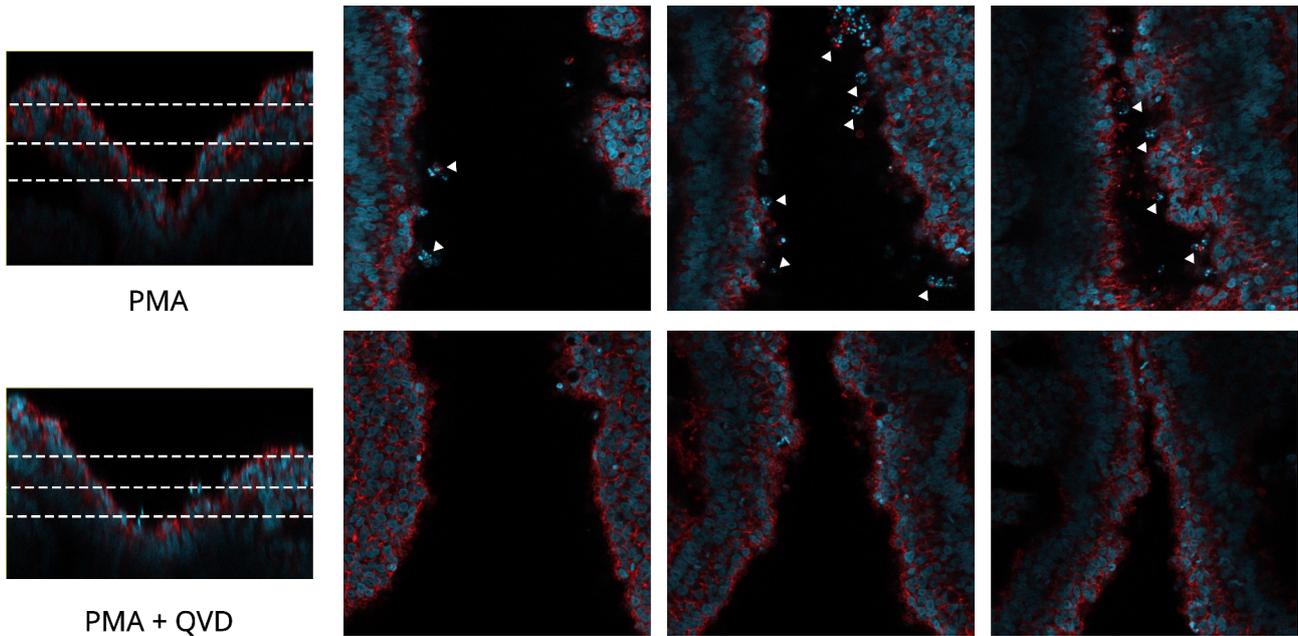


Figura 15: Núcleos picnóticos visibles en embriones observados in toto. (Izq.) Corte ortogonal obtenido a partir de un stack de imágenes confocales de un embrión tratado con PMA y otro con PMA y QVD-OPh montados in toto, donde se observa la placa neural. Las líneas punteadas se corresponden a las imágenes a la derecha. (Der.) Imágenes correspondientes a distintas alturas en el eje dorso-ventral, mostrando aproximadamente la región entre los somites 4 y 6. Se observa un gran número de núcleos picnóticos en el caso del embrión tratado con PMA, mientras que están ausentes en el embrión del tratamiento doble. F-actina marcada con faloidina conjugada a rodamina, ADN con Verde de Metilo. Todas las imágenes consisten de cortes ópticos únicos obtenidos a partir de embriones montados in toto usando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 a 25x de aumento (inmersión en glicerol, NA = 0,8), y procesadas en FIJI. Puntas de flecha: Núcleos picnóticos.

Experimentos *in silico*

Descripción teórica del modelo

Para las simulaciones *in silico* se utilizó un modelo basado en el planteado por Sangwoo Kim y sus colaboradores (Kim et al., 2021,2022). El modelo consiste en una extensión de los *vertex models* (VM): en vez de simular solamente aquellos puntos de la membrana en los que se encuentran 3 células (*3-fold vertices* o *vértices triples*), agregamos los puntos que se corresponden con la interfaz entre dos células (*2-fold vertices* o *vértices dobles*). Los vértices se unen a sus vecinos mediante segmentos de línea recta, por lo que estrictamente se sigue trabajando con células poligonales, aunque este formalismo permite **aproximar la curvatura de las células**.¹¹

En cualquier simulación de este tipo, el nivel de detalle geométrico depende del número de puntos 2-fold que se quieran incluir, lo cual introduce una ambigüedad que afecta notablemente la velocidad de cálculo a la hora de realizar una simulación. Por supuesto, en un extremo está la posibilidad de no incluir ningún punto 2-fold, con lo que se obtiene un VM tradicional. Este tipo de modelos puede verse entonces como una extensión más detallada de los VM existentes.

Es un buen principio de trabajo elegir el modelo lo más simple posible a la hora de modelar. En ese sentido lo más sencillo hubiese sido trabajar con un VM tradicional, pero a lo largo de esta investigación se encontró que los mismos resultaban insuficientes debido esencialmente a una cuestión simple: los resultados experimentales (incluso preliminares) llevaban a pensar que en nuestro sistema de estudio se daba *extrusión viva*, proceso que en los modelos se asocia con altas densidades celulares (Eisenhoffer et al., 2012; Okuda & Fujimoto, 2020), es decir, con un gran número de células ocupando una cierta área del epitelio. Esta medida carece casi totalmente de sentido mecánico cuando hablamos de un epitelio pseudoestratificado como el NE, donde las densidades celulares son muy altas y el principal impedimento mecánico parece ser el del núcleo. Efectivamente, puede entenderse la morfología pseudoestratificada como una solución al problema de minimizar las interfaces de contacto en un tejido con alta densidad de núcleos (Gómez et al., 2021). El núcleo no suele ser considerado a la hora de modelar epitelios pero recientemente su rol mecánico está siendo cada vez más reconocido, emergiendo así como una estructura mecánica y mecanosensorial particularmente importante (Lammerding et al., 2022; Lomakin et al., 2020; Venturini et al., 2020).

Decidimos por lo tanto que para capturar apropiadamente el fenómeno que estábamos observando era imprescindible obtener un modelo que reprodujera las características morfológicas de los epitelios pseudoestratificados, hasta ahora ausente (a conocimiento del autor) en la Bibliografía disponible¹². La capacidad de representar interfaces curvas, así como un *preprint* del mismo grupo mostrando una manera de incluir el aporte mecánico de los núcleos (Kim et al., 2022) indicó al presente modelo como una base apropiada para nuestro trabajo.

Nuestro modelo se basa en la acción de fuerzas aplicadas en vértices (dobles y triples), que se tratan como partículas puntuales, y en el núcleo, que se trata como un sólido. Al

11 Para mayor comentario sobre este punto, y para una demostración que una célula aislada en nuestro modelo logra una forma que aproxima un círculo, ver el Anexo.

12 Una excepción parcial que toma en cuenta el rol mecánico del núcleo pero que, al estudiar mecánicas a mayor escala, toma la sabia decisión de simplificar la morfología celular a trapezoides es el realizado por Ishii et al. (2021)

igual que en los VMs se asume una dinámica de primer orden, es decir que las velocidades de los objetos serán proporcionales a la fuerza neta que actúa sobre ellos. Las ecuaciones del modelo son

$$\begin{aligned}\eta_R \frac{d\vec{R}_\alpha}{dt} &= \sum_{i,j \in \mathcal{C}(\alpha)} \vec{T}_{ij} + \vec{N}_{ij} + \sum_{i \in \mathcal{C}(\alpha)} \vec{F}_{\alpha i} + \vec{\Gamma}_i \\ \eta_N \frac{d\vec{R}_{N,i}}{dt} &= - \sum_{\alpha \in \mathcal{V}(i)} \vec{F}_{\alpha i} + \vec{G}_i \\ \eta_\theta \frac{d\theta_{N,i}}{dt} &= - \sum_{\alpha \in \mathcal{V}(i)} \vec{R}_{\alpha i} \times \vec{F}_{\alpha i} = M_i\end{aligned}\tag{Ec. 1}$$

donde \vec{R}_α representa la posición del vértice α , $\vec{R}_{N,i}$ la posición del centro del núcleo i y $\theta_{N,i}$ la orientación del núcleo i en un momento dado. η_R , η_N y η_θ son las viscosidades (o coeficientes de fricción) correspondientes a cada variable. \vec{T}_{ij} refiere a la tensión efectiva (de dirección **tangente**) en la interfaz celular entre las células i y j , \vec{N}_{ij} es la fuerza **normal** proveniente de las diferencias de presión (osmótica) entre las células i y j (Figura 16), $\vec{F}_{\alpha i}$ es la fuerza repulsiva entre el vértice α y el núcleo de la célula i , $\vec{\Gamma}_i$ es una fuerza compensatoria que se aplica solo en los vértices del lado apical y basal de la célula i y \vec{G}_i es una fuerza restauradora que actúa sobre el centro del núcleo. $\vec{R}_{\alpha i}$ es el vector que une al vértice α con el centro del núcleo de la célula i y M_i es el torque resultante del efecto de $\vec{F}_{\alpha i}$ sobre el núcleo, con $\vec{R}_{\alpha i}$ como brazo. $\mathcal{C}(\alpha)$ es el conjunto de células a las que pertenece el vértice α y $\mathcal{V}(i)$ es el conjunto de vértices que pertenecen a (y definen) la célula i . Todos los vectores aquí definidos tienen dos entradas, por ser un modelo bidimensional. Observamos que si el sistema contiene V vértices y C núcleos, la Ec. 1 determina $2V + 3C$ ecuaciones diferenciales diferentes.

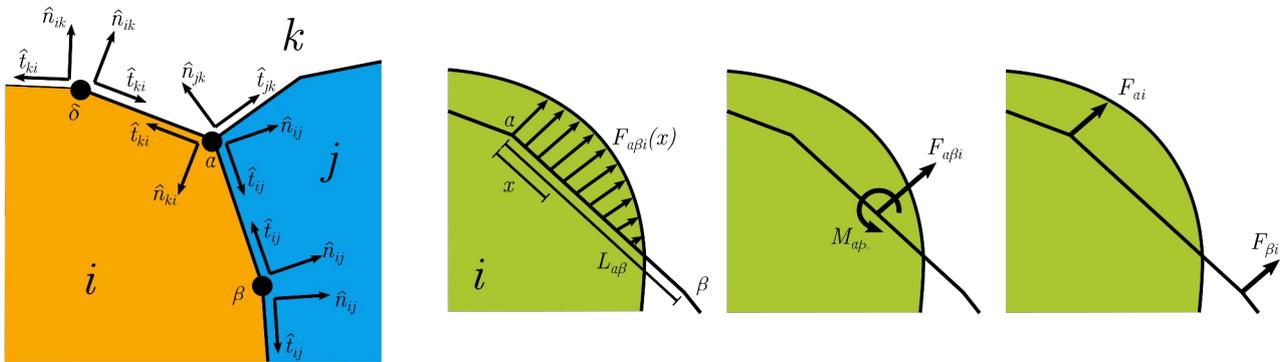


Figura 16: Definiciones gráficas de algunos conceptos del modelo. (Izquierda) Direcciones tangenciales (en las que actúan T_{ij} y Γ_i) y normales (N_{ij}) definidas en las interfaces de las células i , j y k . (Derecha) Definición de la fuerza repulsora $F_{\alpha i}$. Cuando el núcleo de la célula i sobrepasa la arista entre los vértices α y β , se define una pequeña fuerza para cada punto a una distancia intermedia x , que al integrarse determina la fuerza neta $F_{\alpha\beta i}$ aplicada en el centro de la arista y el momento de torque $M_{\alpha\beta i}$, que pueden ser representados de manera equivalente (tratando a la arista como un sólido) mediante fuerzas $F_{\alpha i}$ y $F_{\beta i}$ aplicadas en los vértices α y β respectivamente.

El modelo original incluye dinámicas estocásticas para $T_{ij} = \|\vec{T}_{ij}\|$ pero nosotros lo asumiremos constante e incluso, muchas veces, igual para todos los pares de células. Por reflejar diferencias de presiones entre células, se toma

$$N_{ij} \equiv \|\vec{N}_{ij}\| = (\Delta P_i - \Delta P_j)L_{ij}/2 \quad (\text{Ec. 2})$$

donde L_{ij} es el largo de la interfaz entre las células i y j y ΔP_i la diferencia de presión entre la célula i y el exterior, que en este caso se calcula como

$$\Delta P_i = \frac{K}{A_i} - P_0 \quad (\text{Ec. 3})$$

siendo K la compresibilidad celular, P_0 la presión del medio extracelular y A_i el área de la célula i . Observar que, por lo tanto, puede reescribirse el módulo de las fuerzas normales como

$$N_{ij} = K \left(\frac{1}{A_i} - \frac{1}{A_j} \right) \frac{L_{ij}}{2} \quad (\text{Ec. 4})$$

La fuerza restauradora \vec{G}_i es en principio simplemente una fuerza elástica con módulo elástico K_c que tiende a mover el centro del núcleo hacia una posición predeterminada \vec{O}_i

$$\vec{G}_i = K_c \left(\vec{O}_i - \vec{R}_{N,i} \right) \quad (\text{Ec. 5})$$

Existen diferentes posibilidades para \vec{O}_i . Puede referirse, por ejemplo, al centro geométrico de la célula i (que puede aproximarse promediando las posiciones de todos los vértices en $\mathcal{V}(i)$), a la posición del núcleo al inicio de la simulación (p. ej.: permitiendo definir “núcleos basales”), o puede incluso depender del tiempo, por ejemplo para modelar el efecto de la migración nuclear intercinética (en cuyo caso $\vec{O}_i(t)$ podría ser una función sinusoidal en el eje apico-basal de la monocapa). En nuestras simulaciones generalmente no nos interesó mantener al núcleo centrado en el eje y , pero si en el eje x ¹³, por lo que usamos la proyección horizontal de \vec{G}_i , permitiendo así que los núcleos se re-acomodaran libremente en el eje apico-basal del tejido.

Las fuerzas repulsoras buscan modelar la interacción mecánica que se da entre el núcleo y la membrana plasmática. Esta interacción es indirecta en la realidad, mediada por complejos LINC (“*Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*” (Méjat & Misteli, 2010)), pero por simplicidad asumimos en el modelo que puede ser representada como una interacción mecánica *directa*. Decimos que las fuerzas repulsoras se producen entonces cuando un núcleo *sobrepasa* los límites de su célula, es decir, cuando puede trazarse un vector desde $\vec{R}_{N,i}$ hasta el borde del núcleo, pasando por alguna de las aristas que definen la célula i . De ser ese el caso, puede calcularse la fuerza repulsiva ejercida en el centro de la arista con extremos α y β como

$$\vec{F}_{\alpha\beta i} = K_n \int_0^{L_{\alpha\beta}} \left(\vec{R}_i^0(x) - \vec{R}_i(x) \right) \Theta \left(\left\| \vec{R}_i^0(x) \right\| - \left\| \vec{R}_i(x) \right\| \right) dx \quad (\text{Ec. 6})$$

siendo $K_n = E_N/L_0$ el coeficiente elástico nuclear (E_N : rigidez nuclear), $L_{\alpha\beta}$ es la longitud de la arista $\alpha\beta$, $\vec{R}_i^0(x)$ es el vector que une el centro del núcleo i con el borde nuclear pasando por el punto de la arista $\alpha\beta$ que se encuentra a distancia $x \in [0, L_{\alpha\beta}]$ del vértice α , y $\vec{R}_i(x)$ es el vector que une el centro del núcleo i con dicho punto. Θ representa la función de Heaviside, que figura para que la Ec 6 integre solamente las fuerzas

¹³ Es decir, centrado en el eje perpendicular al del tejido pero no en el eje apico-basal del tejido.

repulsivas. Debe notarse que sin la acción de estas fuerzas el núcleo podría salirse de su célula correspondiente, produciendo un artefacto.

Similarmente, se puede calcular el torque $M_{\alpha\beta i}$ usando la fórmula

$$M_{\alpha\beta i} = K_n \int_0^{L_{\alpha\beta}} \left(\vec{x} - \frac{\vec{L}_{\alpha\beta}}{2} \right) \times \left(\vec{R}_i^0(x) - \vec{R}_i(x) \right) \Theta \left(\left\| \vec{R}_i^0(x) \right\| - \left\| \vec{R}_i(x) \right\| \right) dx \quad (\text{Ec. 7})$$

definiendo $\vec{L}_{\alpha\beta} = \vec{v}_\alpha - \vec{v}_\beta$ y $\vec{x} = x\vec{L}_{\alpha\beta}/L_{\alpha\beta}$. La fuerza y el momento calculado sobre la arista pueden luego ser distribuidas en dos fuerzas $\vec{F}_{\alpha i}$ y $\vec{F}_{\beta i}$, aplicadas en los vértices α y β respectivamente¹⁴(Figura 16).

Finalmente, la “fuerza compensatoria” $\vec{\Gamma}_i$ consiste en una fuerza agregada de manera *ad hoc* cuya necesidad (y la posibilidad de otras fuerzas) discutiremos más adelante. Se trata simplemente de una fuerza elástica aplicada en sentido tangencial en los vértices apicales y basales, de la forma

$$\Gamma_i = \Gamma_i^0 (L_i^a - L_i^b) \quad (\text{Ec. 8})$$

en los vértices apicales, y

$$\Gamma_i = \Gamma_i^0 (L_i^b - L_i^a) \quad (\text{Ec. 9})$$

en los vértices basales, siendo L_i^a y L_i^b el largo del lado apical y basal de la célula i , respectivamente, y Γ_i^0 un coeficiente elástico que en general supusimos independiente de i y llamamos Γ_0 . Le decimos “compensatoria” a esta fuerza pues busca compensar las diferencias de perímetro entre la interfaz apical y basal de una misma célula.

14 Existen ciertas ambigüedades respecto a este proceso. Una explicación más detallada se encuentra en el Anexo.

Implementación computacional

Actualmente existen diversas opciones para realizar simulaciones de VMs (Sego et al., 2023; Theis et al., 2021) y de superficies elásticas (Brakke, 1992). Sin embargo, en nuestro caso (por encontrarnos fuera de estas situaciones) resultó necesario poder realizar las simulaciones de otra manera. Para esto escribimos desde cero una implementación del modelo utilizando Octave¹⁵, cuyos detalles esquematizaremos a continuación. Una descripción un poco más detallada del programa y de algunos de estos cálculos pueden encontrarse en el Anexo II.

Esencialmente, se trata de una integración numérica de una versión adimensionalizada del modelo, que por simplicidad se realizó mediante el método de Euler. Para obtener la versión adimensionalizada, tomamos T_0 (la “escala de tensión efectiva”), $L_0 = \sqrt{A_0} = \sqrt{K/P_0}$, $\tau_R = \eta_R L_0/T_0$, $\tau_N = \eta_N L_0/T_0$ y $\tau_\theta = \eta_\theta/L_0 T_0$, y definimos $\vec{r}_\alpha = \vec{R}_\alpha/L_0$, $\vec{r}_{N,i} = \vec{R}_{N,i}/L_0$, $t_{ij} = T_{ij}/T_0$, $\vec{n}_{ij} = \vec{N}_{ij}/P_0 L_0$, $\vec{f}_{\alpha i} = \vec{F}_{\alpha i}/E_N L_0$, $\vec{\gamma}_i = \vec{\Gamma}_i/\Gamma_0 L_0$ y $\vec{g}_i = \vec{G}_i/K_c L_0$ y escribimos

$$\begin{aligned} \frac{\vec{r}_\alpha}{d\tau_R} &= \sum_{i,j \in \mathcal{C}(\alpha)} \vec{t}_{ij} + \vec{n}_{ij} \frac{P_0 L_0}{T_0} + \sum_{i \in \mathcal{C}(\alpha)} \vec{f}_{\alpha i} \frac{E_N L_0}{T_0} + \vec{\gamma}_i \frac{\Gamma_0 L_0}{T_0} \\ \frac{\vec{r}_{N,i}}{d\tau_R} &= \frac{\tau_R}{\tau_N} \left\{ - \sum_{\alpha \in \mathcal{V}(i)} \vec{f}_{\alpha i} \frac{E_N L_0}{T_0} + \vec{g}_i \frac{K_c L_0}{T_0} \right\} \\ \frac{\theta}{d\tau_R} &= \frac{\tau_R}{\tau_\theta} \left\{ - \sum_{\alpha \in \mathcal{V}(i)} \vec{r}_{\alpha i} \times \vec{f}_{\alpha i} \right\} \frac{E_N L_0}{T_0} \end{aligned} \quad (\text{Ec. 10})$$

Redefiniendo $A_i \equiv A_i/A_0 = A_i/L_0^2$ y $L_{ij} \equiv L_{ij}/L_0$ pueden encontrarse las fórmulas apropiadas para cada fuerza usando las variables espaciales adimensionales. En las simulaciones, se definió $T_0 = P_0 = \tau_R = 1$ y todos los demás coeficientes a partir de ellos. Por adoptar valores probablemente estables en aquellos parámetros que no nos interesó variar, elegimos continuar en general con los parámetro reportados para el modelo desarrollado por Kim et al. (2022)

$$\begin{aligned} K &= 100 \cdot T_0^2 / P_0 \\ L_0 &= \sqrt{K/P_0} \\ K_n &= 50 \cdot T_0 / L_0^2 \\ K_c &= 10 \cdot T_0 / L_0 \\ \tau_N &= \tau_\theta = \tau_R \end{aligned} \quad (\text{Ec. 11})$$

y definimos el radio mayor y menor de los núcleos como $a = 0.05 \cdot L_0$ y $b = 2a/3$, respectivamente. En general la dinámica angular de los núcleos fue muy lenta, por lo que probamos disminuir τ_θ en algunos experimentos, sin observar cambios apreciables.

Las simulaciones asumieron en general condiciones periódicas de borde, con un período λ_x en el plano de la monocapa que en general tuvo igual valor a L_0 (10 en este caso según los datos de Ec. 11), con el número de células N_C variando entre 17 y 20. Puede definirse entonces un “ancho promedio por célula” (una medida de densidad celular) como

¹⁵ La elección del programa se debió principalmente a la familiaridad del autor con el mismo, junto con la posibilidad de convertir los *scripts* fácilmente al formato de MATLAB.

$b \equiv \lambda_x/N_C$. En las pruebas para $N_C > 20$ ($b < 0.5$) ocurrieron siempre defectos en la integración, que creemos que se tratan de artefactos del método de Euler y que por tanto podrían ser evitados modificando los métodos numéricos de la implementación.

Aunque estrictamente los sistemas descritos por la Ec. 10 contienen, en principio, una cantidad fija de vértices, en las simulaciones se permitió que este número variara. Si dos vértices α y β están demasiado lejos (a distancia mayor que un parámetro \mathcal{L}) se pierde información sobre la curvatura de la célula en dicha región, por lo cual es conveniente agregar una cantidad de vértices entre α y β tal que todos los vértices resultantes estén a menos de \mathcal{L} de sus vecinos en el próximo paso de integración. A su vez, si dos vértices están demasiado cerca (a menos de una distancia $d\mathcal{L}$), su dinámica no debería poder distinguirse, pero pequeñas diferencias introducidas por artefactos del método de integración podrían desencadenar en situaciones sin sentido¹⁶, por lo que se los combina en uno solo. Se incluyeron además de manera explícita las llamadas transiciones de tipo 1, o intercambio de vecinos, cuando se detectara un vértice cuádruple o mayor (Método descrito en el Anexo). Decimos que ocurre extrusión celular cuando una célula deja de tener vértices apicales (extrusión hacia el lado basal) o basales(hacia el lado apical).

El estado inicial del sistema consistió en general en una monocapa de células rectangulares, definidas inicialmente por sus vértices triples tomando $A = 1$ y luego agregándose vértices dobles, , para un valor dado de \mathcal{L} , por el método antes descrito. Se realizaron experimentos *in silico* con diferentes posiciones y tamaños nucleares, así como con diferentes valores de la fuerza compensatoria Γ_0 y de los parámetros involucrados en el cambio de número de vértices (\mathcal{L} y $d\mathcal{L}$), que fueron planteados como múltiplos del ancho celular b , como resulta conveniente según el análisis matemático disponible en el Anexo I. El paso de integración fue $dt = \tau_R/100$. Basándose en mediciones de la dinámica epitelial en el plano, se ha reportado un valor de $\tau_R \leq 20s$ aproximadamente (Kim et al., 2021), lo cual nos puede resultar útil para estimar la escala temporal de nuestras simulaciones.

Resultados de simulaciones

Simulaciones preliminares sin núcleos ni fuerza compensatoria

Para estas simulaciones se definieron ambos ejes de cada núcleo como 0, haciendo que el cálculo de las fuerzas repulsoras fuera trivialmente 0¹⁷, y se definió $\Gamma_0 = 0$, evitando cualquier efecto de la fuerza compensatoria en los vértices apico-basales. Estas simulaciones representan efectivamente un modelo más simple, pero ayudan a entender el comportamiento del modelo más general. Permiten además comprobar el buen funcionamiento de la implementación computacional, chequeando que no ocurran artefactos inesperados y que se cumplan las predicciones teóricas derivadas de este modelo más sencillo (ver Anexo I). Todas las gráficas aquí presentes fueron realizadas en el software Octave, usando scripts *custom* (escritos por el autor) para la representación de los vértices, células y núcleos.

16 Por ejemplo, puede el interior de una célula ser no simplemente conexo, como en el caso de una célula “con forma de 8”.

17 Podría lograrse el mismo efecto en el resultado de la simulación definiendo $E_N = 0$, pero el método aquí planteado disminuye en gran medida el número de operaciones que debe realizar el programa.

Una célula aislada

Decidimos realizar algunas simulaciones con una sola célula para estudiar la dependencia de los estados de equilibrio del sistema en función de “pequeños cambios”¹⁸ en las condiciones iniciales. Se inició con un polígono regular de área 1 definido por sus vértices, se definió $\mathcal{L} = 2 \cdot d\mathcal{L} = 0.125$ y se dejó evolucionar el sistema por un intervalo de tiempo de $10 \cdot \tau_R$ (es decir, 1000 pasos de integración). Observamos que en general el resultado final fue una célula “aproximadamente circular” como esperaríamos, pero que los detalles particulares de este estado final dependen de la forma inicial. Destacamos particularmente el caso de las células inicialmente triangulares y cuadradas, que exhiben “restos” notables de los vértices originales a lo largo de la simulación (Figura 17).

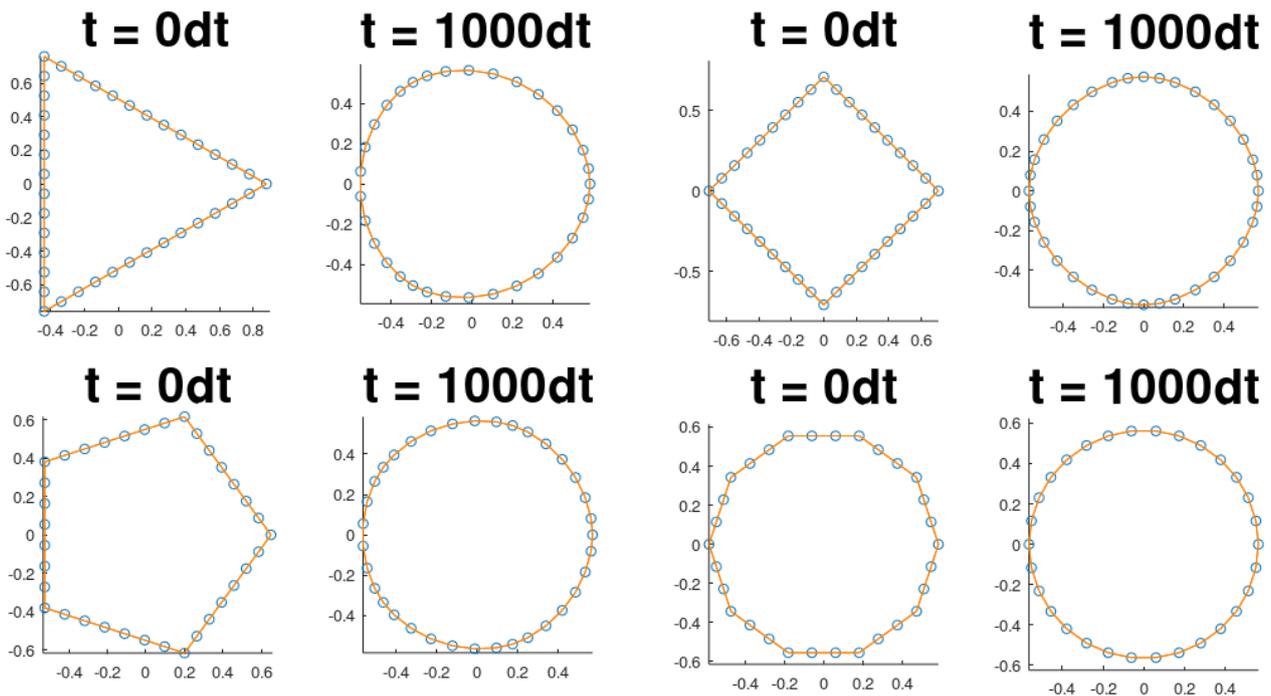


Figura 17: Simulaciones de una sola célula sin núcleo, iniciando con células poligonales de 3, 4, 5 y 10 lados ($t = 0dt$). En todos los casos se dejó correr la simulación por 1000 pasos de integración, obteniéndose los estados de equilibrio correspondientes ($t = 1000dt$). Los círculos celestes indican los vértices y las líneas naranjas las aristas que los unen. Observamos que para condiciones iniciales con pocos lados ocurre una mayor acumulación de vértices en las regiones correspondientes a los vértices del polígono original, lo cual genera pequeños cambios en la curvatura local (ver Anexo I y III.i).

Estrictamente, el ejemplo del cuadrado anterior utilizó $\mathcal{L} = 2 \cdot d\mathcal{L} = 0.12$. Por ser de lado 1, al definir $\mathcal{L} = 0.125 = 1/8$ ocurre un minúsculo error de redondeo (el largo de los lados difieren de 1 por 2.22×10^{-16}) que, sin embargo, repercute notablemente en el estado final: como tres lados tienen 7 vértices 2-fold y uno tiene 8, se genera una asimetría que persevera hasta el estado de equilibrio (Figura 18). Como se demuestra en el Anexo I, en equilibrio esperamos que todos los ángulos entre un vértice y sus vecinos sean iguales, pero diferencias locales en el largo de las aristas generan diferencias en la curvatura apreciables a mayor escala, llevando al efecto observado.

¹⁸ Pequeños en un sentido conceptual o práctico, pero para nada pequeños en el típico sentido de las pequeñas perturbaciones que suelen estudiarse en los sistemas dinámicos.

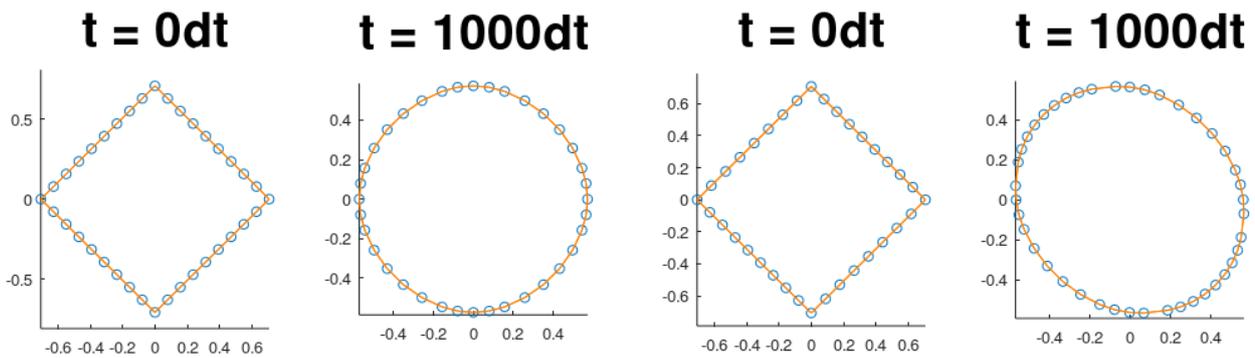


Figura 18: Pequeñas asimetrías en las condiciones iniciales pueden magnificarse en el estado de equilibrio correspondiente. (Izq.) Si los vértices están distribuidos de manera simétrica, el estado de equilibrio es simétrico y aproxima un círculo, aunque la distribución de vértices no sea uniforme. (Der.) De haber asimetrías (un lado tiene 8 vértices, el resto tiene 7), pueden producirse resultados inesperados, como un estado de equilibrio que aproxima una elipse, implicando la generación espontánea de un eje. Círculos celestes: vértices; Líneas naranjas: aristas.

Monocapa sin núcleos

Estas simulaciones (Figura 19) se corresponden a una monocapa de células idénticas vistas de costado, que están en contacto no solo con otras células sino también con un “medio exterior” de un lado apical y un lado basal. Bajo estas condiciones, este modelo tiene un estado de equilibrio de células columnares (dependiendo de la densidad celular), convexas hacia el medio externo, en una monocapa infinita con simetría apico-basal (ver Anexo I). Iniciamos estas simulaciones con una capa de n células rectangulares usando condiciones periódicas de borde, con un largo $\lambda_x = 10$ en el eje horizontal. Las simulaciones con hasta 20 células alcanzaron este estado de equilibrio a partir de estas condiciones iniciales, con buen ajuste a las predicciones teóricas (p. ej.: Tabla 4 en el Anexo).

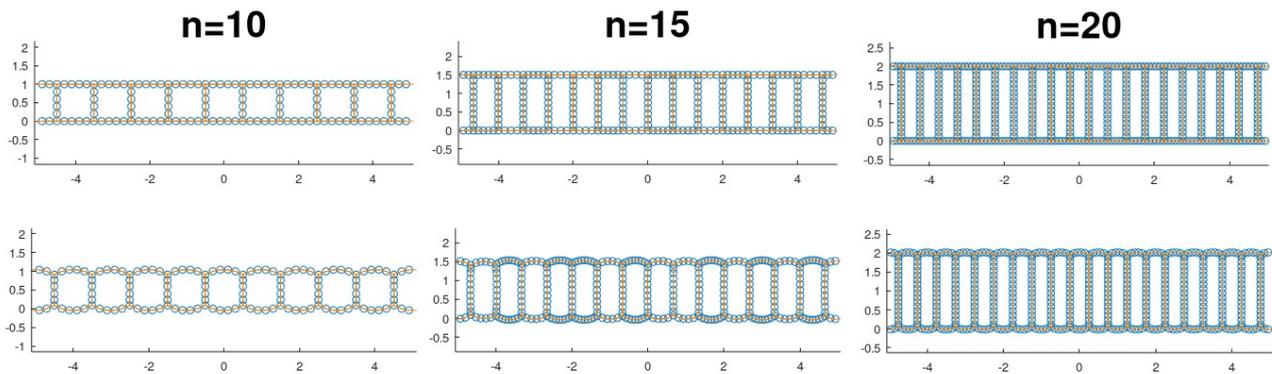


Figura 19: Simulaciones de una “monocapa sin núcleos” compuesta por $n = 10, 15, 20$ células en una monocapa periódica de período $\lambda_x = 10$. (Arriba) Condiciones iniciales: monocapas periódicas formadas por células rectangulares. (Abajo) Estado de equilibrio alcanzado rápidamente ($< 2 \cdot \tau_R$) a partir de la configuración inicial, formada por células idénticas con interfaces rectas entre ellas y convexas al medio externo. Círculos celestes: vértices; Líneas naranjas: aristas

Aunque no hemos realizado los cálculos para demostrar que la monocapa es una morfología celular estable de este modelo simplificado, todas las simulaciones bajo estas

condiciones iniciales mostraron ser estables a largo plazo, salvo aquellas con más de 20 células, donde las simulaciones fallaron por problemas casi inmediatos (en $t \approx \tau_R$) que parecerían ser artefactos de la integración numérica (p. ej.: exceso de tiempo para realizar una operación, problemas topológicos)(Figura 20), por lo que en principio no reflejan correctamente el comportamiento del modelo matemático para altas densidades celulares. Esta limitación podría ser superada en principio con el uso de métodos de integración numérica más sofisticados.

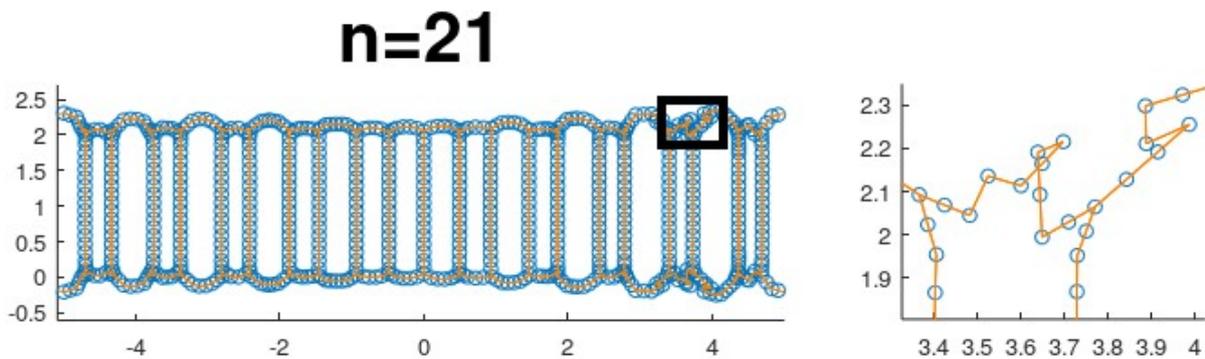


Figura 20: Errores en simulaciones con alta densidad celular. (Izquierda) Una simulación con 21 células en un epitelio periódico de largo $\lambda_x = 10$, luego de 81 pasos de integración, momento en el que aparece un defecto topológico (recuadro). (Derecha) Detalle del recuadro, mostrando que una célula presenta un artefacto topológico (la membrana se cruza con si misma), lo cual conlleva la falla del programa en unos pocos pasos. Esta situación resulta poco intuitiva viniendo de las ecuaciones, lo que parece indicar que se debe a errores en el método de integración numérica. Círculos celestes: vértices; Líneas naranjas: aristas

Simulaciones con núcleos

Monocapa con núcleo sin la fuerza compensatoria $\vec{\Gamma}_i$

Nuestro propósito inicial era obtener una monocapa con células con morfología similar a la de los epitelios pseudoestratificados, para lo cual resultó razonable incorporar núcleos, y estudiar bajo qué rango de parámetros se observaba extrusión celular en el modelo original (sin la fuerza compensatoria $\vec{\Gamma}_i$). Definiendo $\Gamma_0 = 0$ realizamos distintas simulaciones con núcleos (siempre del mismo tamaño, pero cambiando el ancho inicial de cada célula $b = \lambda_x/n$), y observamos extrusión generalizada en muchos casos (Figura 21). Destacamos el caso de 20 células que observamos hasta llegar a un estado aparentemente equilibrado, en el que claramente se observan dos capas de células redondeadas, producto de la extensa extrusión celular ocurrida (Figura 22). Parecería ser que las monocapas con núcleos más anchos que el b son inestables en este modelo, tendiendo a otras morfologías que permitan acomodar mejor los núcleos.

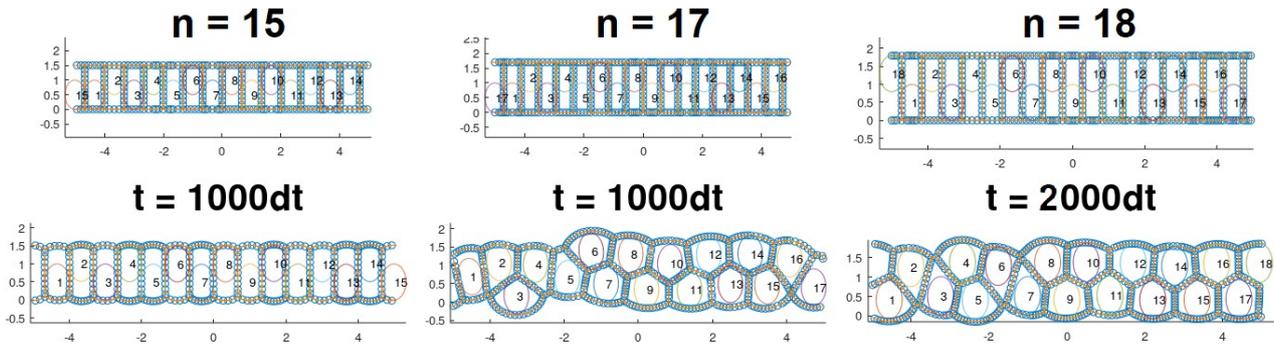


Figura 21: Simulaciones de monocapas con núcleos alternantes sin la fuerza restauradora $\vec{\Gamma}_i$ para distintos números de células n . (Arriba) Condiciones iniciales. Estrictamente estos núcleos no son alternantes si n es impar, pero vemos que el resultado es similar. (Abajo) Estado del sistema para cada n después de un cierto tiempo de observación (1000, 1000 y 2000 pasos de integración respectivamente). Observamos que en el caso de $n = 15$ los núcleos no sobresalen del ancho natural de las células $b = \lambda_x/n$, por lo que los núcleos no tienen un efecto en la forma del epitelio y se logra un equilibrio como en el caso de las células sin núcleo. Por otro lado, para casos con mayor n se observa una cantidad notable de extrusión a lo largo de toda la capa, teniendo así células de distintas morfologías mezcladas en un mismo tejido (aunque sea de manera posiblemente transitoria). Círculos celestes: vértices; Líneas naranjas: aristas

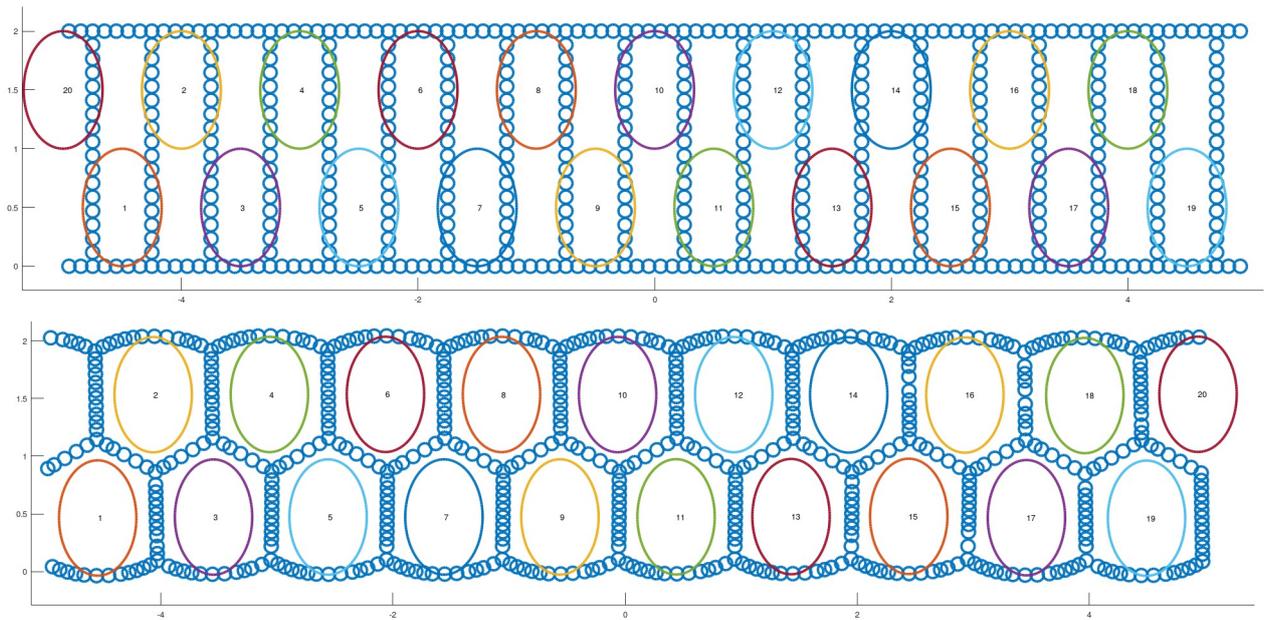


Figura 22: Sin la fuerza compensatoria $\vec{\Gamma}_i$, un epitelio rectangular formado por 20 células con núcleos alternados (Arriba) experimenta extrusión de manera extensa, eventualmente conformando una bicapa de células redondeadas (Abajo). Círculos celestes: vértices.

Monocapa con núcleos y fuerza compensatoria

En base a estos resultados, optamos por intentar promover la estabilidad del tejido agregando la fuerza compensatoria *ad hoc* $\vec{\Gamma}_i$ al modelo. Para estas simulaciones se utilizó en general (donde no se especifique) $\Gamma_0 = 0.5 \cdot T_0 L_0$, un valor posiblemente bajo si

observamos que en general L_a y L_b no suelen ser tan diferentes en una célula, pero que resultó capaz de contrarrestar el efecto de las otras fuerzas en muchos casos. Se variaron las posiciones de los diferentes núcleos para las diferentes condiciones iniciales.

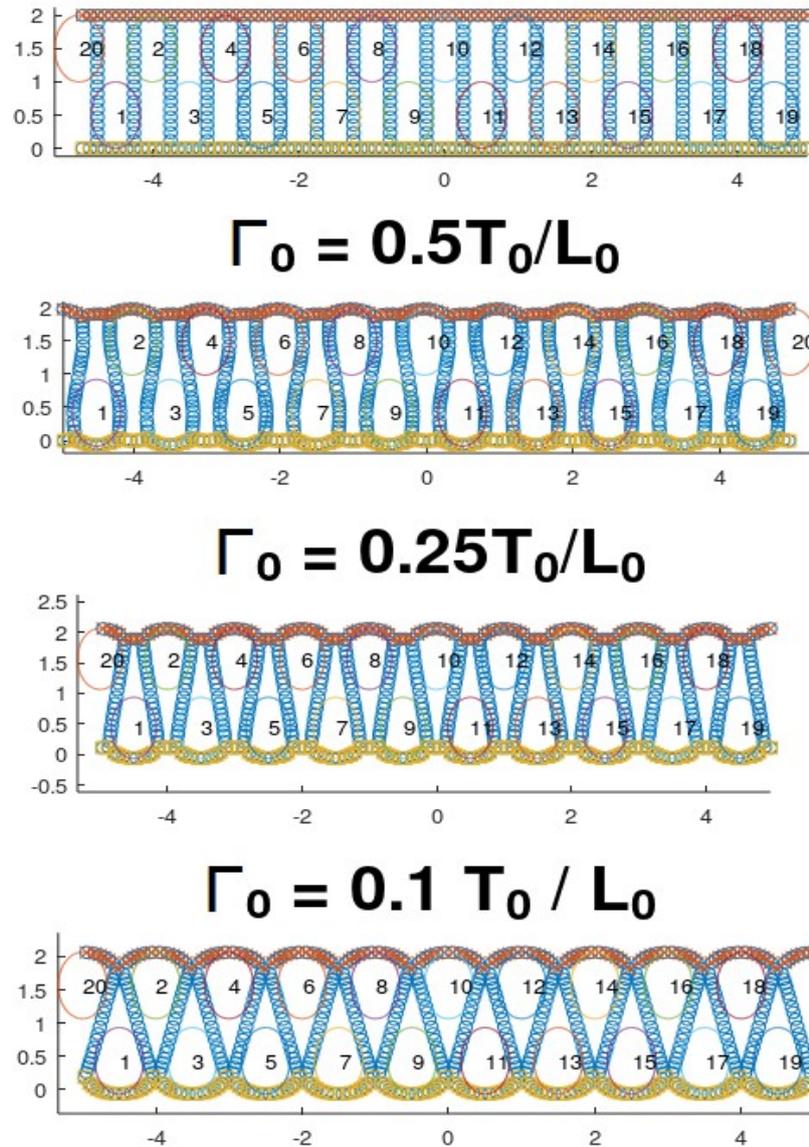


Figura 23: Estado de equilibrio del sistema a partir de un epitelio rectangular con núcleos en posiciones alternadas (Sup.) para diferentes valores del parámetro Γ_0 . Observamos que el valor $\Gamma_0 = 0.5 \cdot T_0/L_0$ permite un epitelio plano estable con una morfología similar a la de los epitelios pseudoestratificados, mientras que $\Gamma_0 = 0.25 \cdot T_0/L_0$ llega a un estado estable con células de bordes rectos y que $\Gamma_0 = 0.1 \cdot T_0/L_0$ lleva a la desaparición del lado apical/basal de muchas células (en $\approx 6 \cdot \tau_R$), presumiblemente conduciendo a la extrusión de las mismas. Círculos celestes: vértices; cruces naranjas: vértices apicales; círculos amarillos: vértices basales.

Como primera situación estudiamos el comportamiento de una monocapa formada por 20 células apicales ordenadas de manera alternada, teniendo algunas núcleos apicales y otras núcleos basales (Figura 23). Esta conformación elemental parece razonable pues para esta distribución no hay ningún problema con la organización de los núcleos, todos “tendrían espacio” en la monocapa si las células adoptaran una forma que se ajustara al

núcleo, pero ya hemos mostrado que sin usar la fuerza compensatoria $\vec{\Gamma}_i$ este tipo de monocapas resulta inestable (Figura 22). Para intentar estabilizar este sistema, realizamos simulaciones partiendo de esta misma configuración pero cambiando el valor del parámetro Γ_0 , encontrando configuraciones inestables¹⁹ ($\Gamma_0 = 0.1 \cdot T_0/L_0$) varias configuraciones estables (p. ej.: $\Gamma_0 = 0.25 \cdot T_0/L_0$), y particularmente, un estado de equilibrio con interfaces celulares francamente curvas que se ajustan a los núcleos adyacentes, logrando una morfología que recuerda a la de los epitelios pseudoestratificados ($\Gamma_0 = 0.5 \cdot T_0/L_0$).

Es interesante probar además situaciones en las que los núcleos se estén solapando en la configuración inicial. Es decir, una configuración imposible a largo plazo, pues en cualquier monocapa estable los núcleos deben poder estar acomodados en el eje apico-basal. La más sencilla de estas es una monocapa con núcleos puestos en “niveles” que se solapan, por ejemplo “apical”, “central” y “basal”. En estas condiciones puede obtenerse una monocapa estable, pero esto conlleva una cierta curvatura del epitelio para poder acomodar los núcleos (Figura 24). Simulaciones con núcleos distribuidos aleatoriamente en el eje apico-basal pueden producir morfologías más complejas (Figura 25), y en algunos casos (usando $\Gamma_0 = 0.3 \cdot T_0/L_0$) pueden llevar a extrusión o a situaciones computacionalmente complejas (Figura 26).

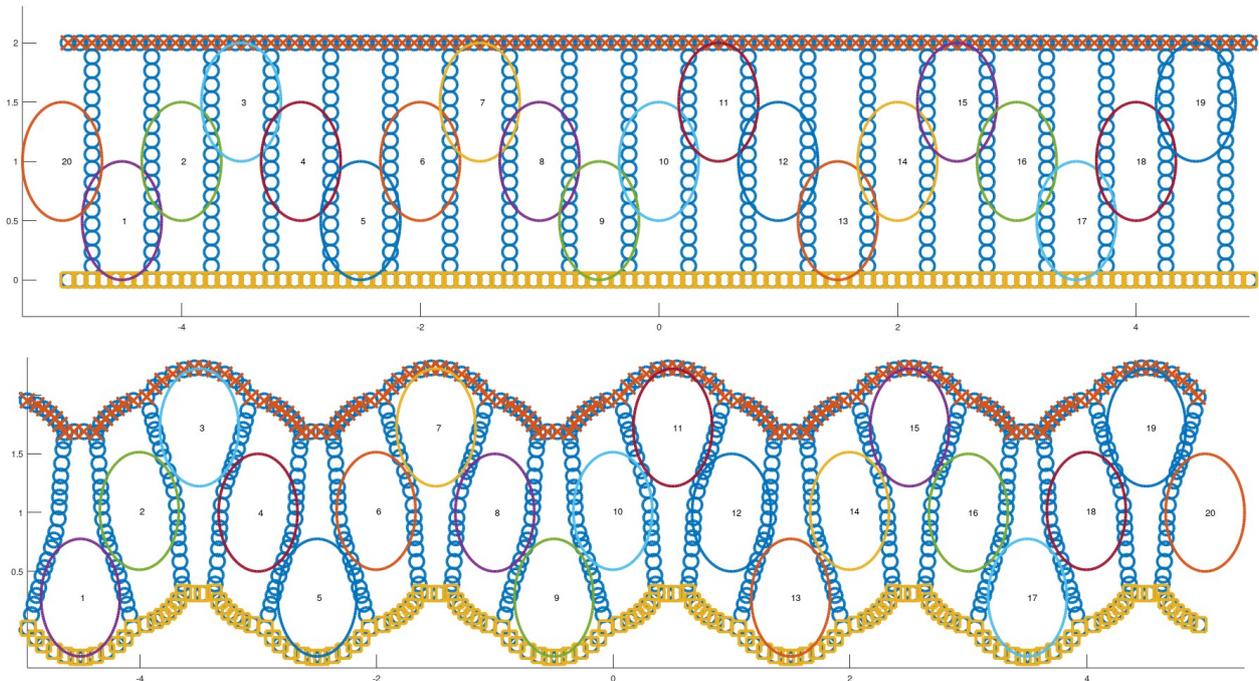


Figura 24 Simulación de una monocapa con un estado inicial de distribución nuclear “imposible”, en el que los núcleos se solapan entre sí (Arriba). Vemos que, bajo estos parámetros, se obtiene un estado final (aquí correspondiente a 1800 pasos de integración, o $18 \cdot \tau_R$) estable de monocapa localmente levemente curvada, con células columnarizadas (Abajo). Círculos celestes: vértices; cruces naranjas: vértices apicales; círculos amarillos: vértices basales.

¹⁹ Por limitaciones técnicas no simulamos la extrusión en este caso en sí, si no que marcamos el punto en el cual uno de los lados hacia el medio externo se reduce a un punto, aunque *estrictamente* podría no desembocar en la extrusión de dicha célula.

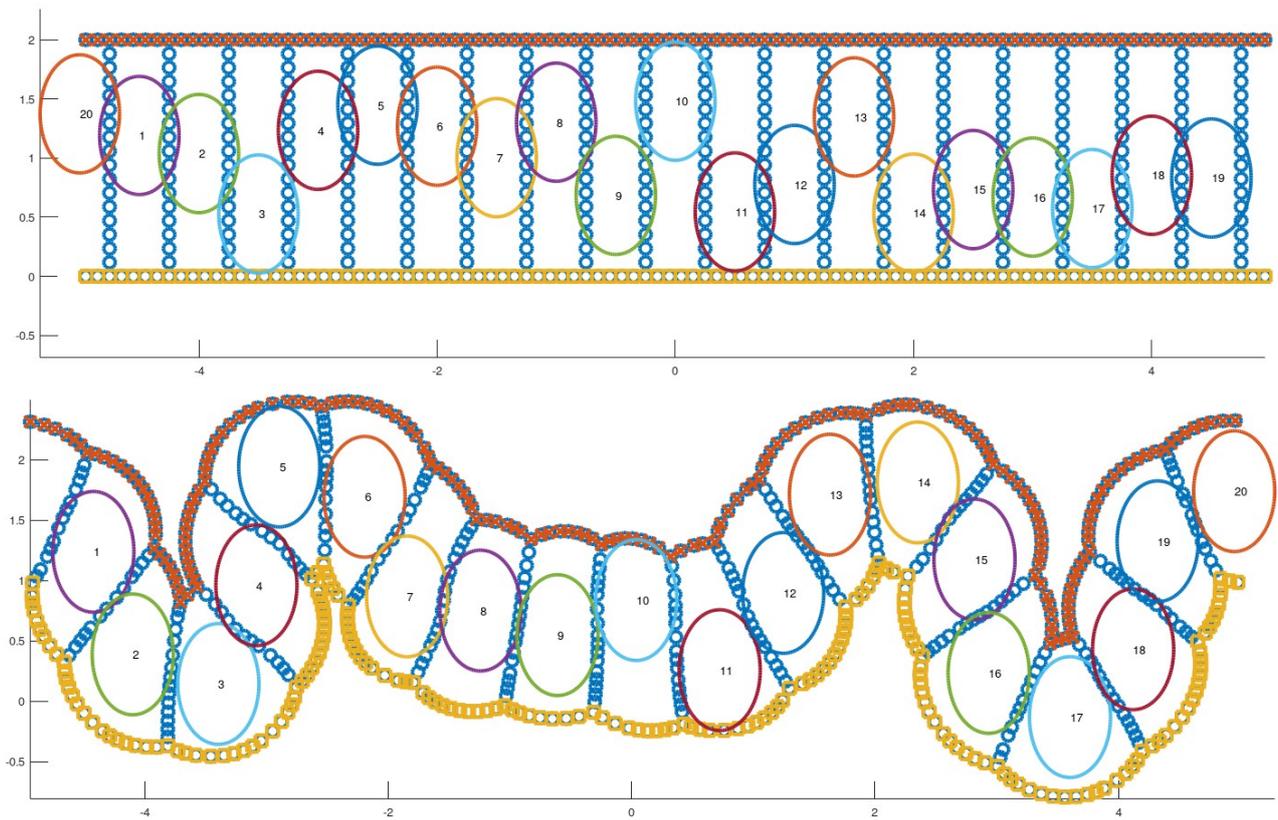


Figura 25 Simulación de una monocapa con un estado inicial de distribución nuclear aleatoria (arriba). Bajo estos parámetros, se obtiene un estado final estable (aquí correspondiente a 3000 pasos de integración, o $30 \cdot \tau_R$) de morfología compleja, con notable curvatura y células columnarizadas (abajo). Círculos celestes: vértices; cruces naranjas: vértices apicales; círculos amarillos: vértices basales.

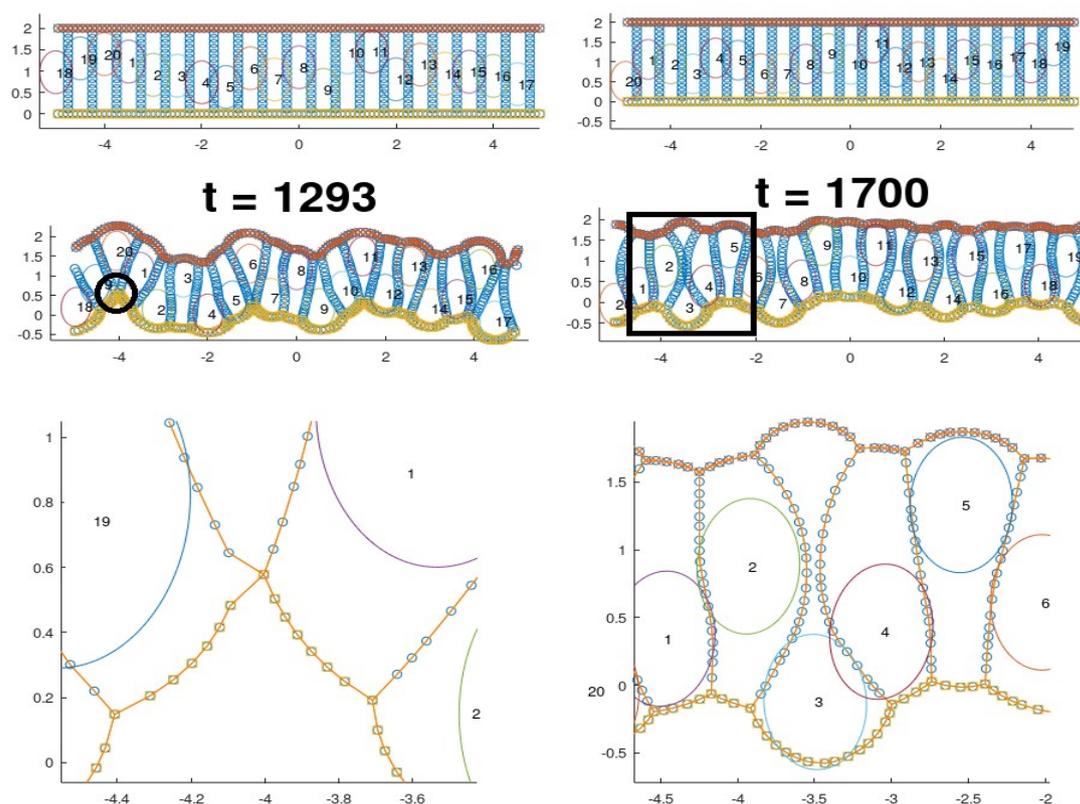


Figura 26: Simulaciones con núcleos organizados al azar a lo largo del eje apico-basal mostrando inestabilidades para $\Gamma_0 = 0.3 \cdot T_0/L_0$. (Arriba) Condiciones iniciales mostrando una monocapa de 20 células rectangulares con núcleos asignados una posición aleatoria en el eje apico-basal. (Medio) Simulación luego de un cierto tiempo ($\approx 13 \cdot \tau_R$ y $17 \cdot \tau_R$ respectivamente), a partir del cuál ocurren inestabilidades, señaladas con un reborde negro. (Abajo) Detalle de las zonas de interés. (Izq.) En este caso se genera un vértice cuádruple, cuya evolución no seguimos por cuestiones técnicas, pero que llevaría en principio a la extrusión de la célula en cuestión (la número 20). (Der.) Debido a la gran expansión basal en esta simulación, se generó una expansión apical acompañante que, junto con las fuerzas de las células adyacentes, genera una forma de “reloj de arena”, que tiene altas probabilidades de generar artefactos en la integración (por ejemplo, que en un paso la interfaz entre 2 y 3 se cruce con la de 3 y 4). Círculos celestes: vértices; cruces naranjas: vértices apicales; círculos amarillos: vértices basales.; líneas naranjas: aristas

Además de estudiar conjuntos de células nucleadas, podemos asignarle tamaño 0 a algunos núcleos (similar al caso de las células sin núcleo), logrando así una monocapa formada efectivamente por “dos tejidos”: uno cuyas células tienen núcleo y otro en el que no. Sin tomarlo muy literalmente como un tejido con y uno sin núcleos, uno puede imaginar que se trata de tejidos en los que el núcleo juega un rol mecánico bien diferenciado: importante en uno, despreciable en el otro. Un ejemplo podría ser el caso de la placa neural, rodeada a ambos lados por epitelio no neural, en las que el núcleo tiene distinta importancia debido a sus claras diferencias morfológicas (células columnares y angostas en un caso, cuboidales en el otro).

Como ejemplo interesante decidimos simular una situación en la que un grupo relativamente chico (7 de 20) de células posee núcleos y todos ellos están inicialmente en

posición basal, inspirados por el posicionamiento basal de los núcleos del EN y su relación con la formación del punto bisagra medial en embriones de pollo (Schoenwolf et al., 1988). Efectivamente, en nuestras simulaciones también ocurrió un pliegue (una especie de *buckling* de la monocapa), alcanzándose un estado final notablemente plegado en sentido basal, compuesto por células no-columnarizadas (esto es esperable pues no existe ningún término que promueva o mantenga la columnarización en las ecuaciones del modelo) (Figura 27c)

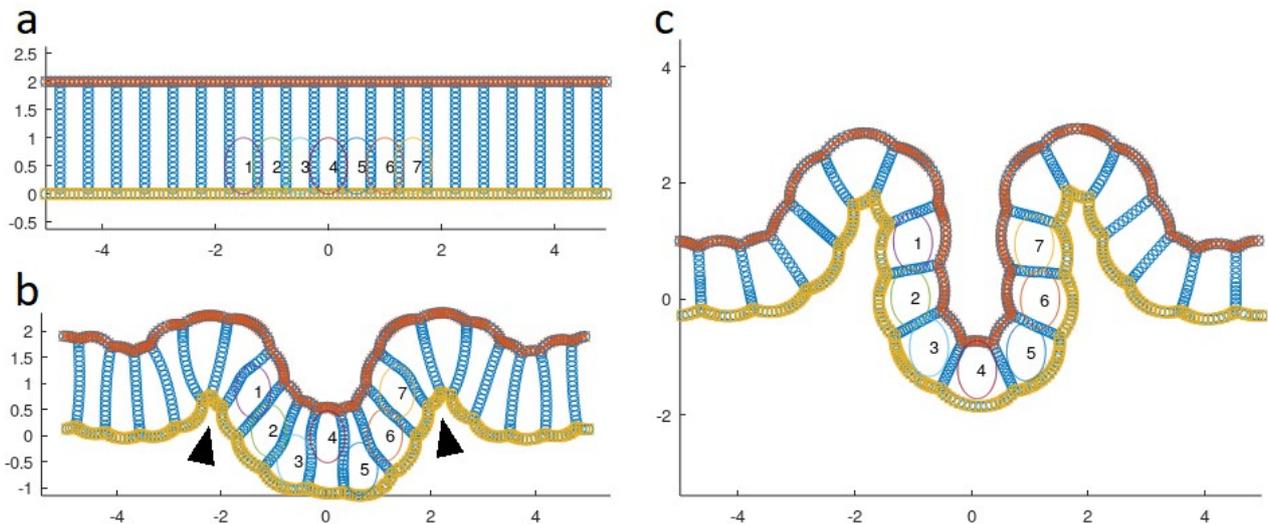


Figura 27: Un epitelio nucleado (con núcleos basales) rodeado por otro epitelio sin núcleos lleva al buckling de todo el tejido en nuestro modelo. (a) Condición inicial de 20 células rectangulares en una monocapa de largo $\lambda_x = 10$, de las cuales 7 tienen núcleos, que inicialmente están en posición basal (señalados de 1 a 7 en la figura). (b) Estado del sistema luego de $30 \cdot \tau_R$, mostrando una morfología transitoria que presenta un buckling basal y células de morfología columnar. Destacamos los pliegues que ocurren entre las células nucleadas y las no nucleadas (puntas de flecha) que se asemejan a los pliegues que ocurren entre el EN y el ENN durante la neurulación primaria. (c) Estado final del sistema, alcanzado luego de aproximadamente $60 \cdot \tau_R$, presentando un plegamiento basal notable y una falta casi total de columnarización celular. Círculos celestes: vértices; cruces naranjas: vértices apicales; círculos amarillos: vértices basales.

Destacamos un par de aspectos de los resultados de esta simulación. Primero que, aunque transitoriamente, el sistema fue capaz de producir un tejido plegado formado por células columnares. Curiosamente, los pliegues formados incidentalmente en estas situaciones entre el tejido nucleado y el circundante (Figura 27b, puntas de flecha) recuerdan por su morfología a los pliegues que se forman entre la placa neural y el ectodermo no-neural durante la neurulación primaria, involucrados tanto en la generación de fuerzas necesarias para el cierre del tubo neural como en el origen de las células de la cresta neural (Barresi & Gilbert, 2019). Segundo, que la monocapa experimentó una deformación notable y a largo plazo (en este caso permanente) como resultado de restringir las posiciones nucleares *solamente en el estado inicial*. Esto difiere de la situación *in vivo* de la formación el punto bisagra medial de la placa neural, en la que los núcleos se mantienen basales en sus células en todo momento mediante la regulación del ciclo celular. Este resultado sugiere que *in vivo* podría organizarse el pliegue de ciertas estructuras mediante el posicionamiento especial de algunos núcleos durante períodos muy cortos de tiempo, incluso mucho antes de la formación de la estructura final, una posibilidad que no suele ser discutida entre los mecanismos de la morfogénesis.

Para estudiar la posibilidad de que el estado final dependiera apreciablemente de diferencias en el número de vértices para situaciones iniciales *grosso modo* iguales (como en el caso de una sola célula mostrado en la Figura 18), el último experimento fue realizado múltiples veces bajo los mismos parámetros y condiciones iniciales, variando solo los valores de \mathcal{L} y $d\mathcal{L}$. Hallamos que, aunque hubieron diferencias locales en la morfología y sobre todo en la escala temporal, en todos los casos se llegó a la misma morfología general final (Figura 28), aunque en algunos casos surgieron asimetrías. Siendo $b = \lambda_x/N_C$ nuestra medida de la densidad celular, usamos $\mathcal{L} = b/2, b/5, b/7$ y $d\mathcal{L} = b/8, b/8, b/10$ respectivamente. Para determinar que se había llegado al equilibrio (así como el tiempo necesario para esto) estudiamos la dinámica temporal de las áreas y perímetros celulares, parámetros involucrados (directa o indirectamente) en las fuerzas del sistema (Figura 29). No queda claro, en todo caso, si las diferencias encontradas reflejan correctamente el comportamiento del modelo o si se deben a particularidades de la implementación computacional.

Adicionalmente, para comprobar que este efecto no depende estrictamente de la ausencia de núcleos en la región adyacente a las células centrales con núcleos inicialmente basales, realizamos un nuevo experimento utilizando solamente células con núcleo. Para esto se utilizó una condición inicial similar a la anterior, tal que el tejido que “rodea” (es decir, el que no poseía núcleos en la simulación anterior) tuviera núcleos dispuestos de manera alternante, configuración capaz de producir un epitelio pseudoestratificado estable y sin curvatura global, como mostrado en la Figura 23. Similarmente al caso anterior, bajo estas condiciones el epitelio adquirió una curvatura global estable, aunque lo hizo en una escala temporal un poco mayor, y presentando una cierta asimetría (Figura 30).

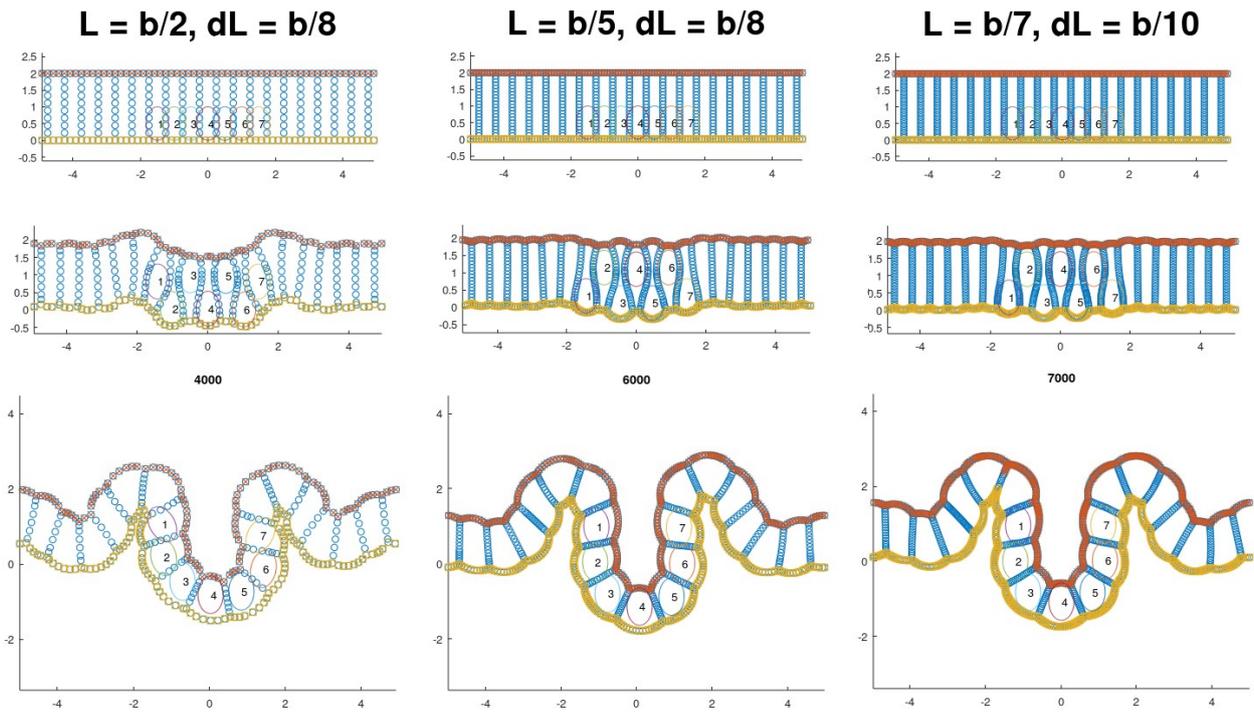


Figura 28: Comparación de simulaciones con condiciones iniciales similares pero distintos valores para la "máxima/mínima distancia entre dos vértices" \mathcal{L} y $d\mathcal{L}$. Las columnas muestran simulaciones con $\mathcal{L} = b/2, b/5, b/7$ y $d\mathcal{L} = b/8, b/8, b/10$, respectivamente, siendo $b = 0.5$ una medida de densidad celular. (Arriba) Situación inicial del sistema: células rectangulares de ancho b , con vértices apicales y basales señalados. Un grupo central de ellas tiene núcleos (numerados del 1 al 7 en la figura), inicialmente de ubicación basal. (Medio) Estado del sistema después de 1000 pasos de integración ($10 \cdot \tau_R$), mostrando distintos grados de deformación según el valor de \mathcal{L} y $d\mathcal{L}$. (Abajo) Estado final del sistema, alcanzado a distintos tiempos en cada simulación, $40 \cdot \tau_R$, $60 \cdot \tau_R$ y $70 \cdot \tau_R$ (4000, 6000 y 7000 pasos de integración) respectivamente. La identidad del estado final, así como el tiempo necesario para alcanzarlo fueron determinados a partir del estudio en el tiempo de parámetros geométricos (Figura 29). Círculos celestes: vértices; cruces naranjas: vértices apicales; círculos amarillos: vértices basales.

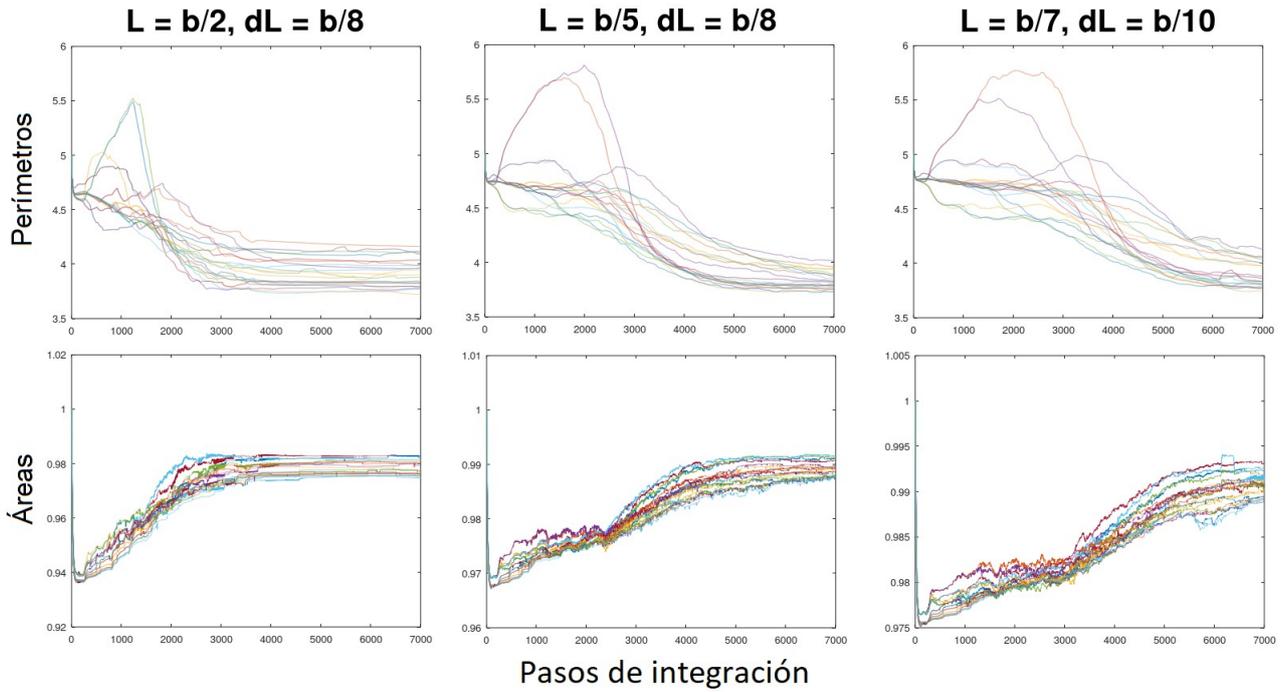


Figura 29: Dinámica temporal de los perímetros y las áreas (en unidades adimensionales) para simulaciones que parten de condiciones iniciales similares, variando los valores de \mathcal{L} y $d\mathcal{L}$ (como fracciones de la densidad celular b), expresados en función del número de pasos de integración. Cada línea de un color se corresponde a una de las 20 células presentes en el sistema simulado. (Izq.) Datos para la simulación con $\mathcal{L} = b/2$, $d\mathcal{L} = b/8$, donde se observa una estabilización de la dinámica a partir de $t \approx 4000 \equiv 40 \cdot \tau_R$. (Centro) Datos para la simulación con $\mathcal{L} = b/5$, $d\mathcal{L} = b/8$, donde se observa una estabilización de la dinámica a partir de $t \approx 6000 \equiv 60 \cdot \tau_R$. (Der.) Datos para la simulación con $\mathcal{L} = b/7$, $d\mathcal{L} = b/10$, donde se observa una estabilización de la dinámica hacia $t \approx 7000 \equiv 70 \cdot \tau_R$.

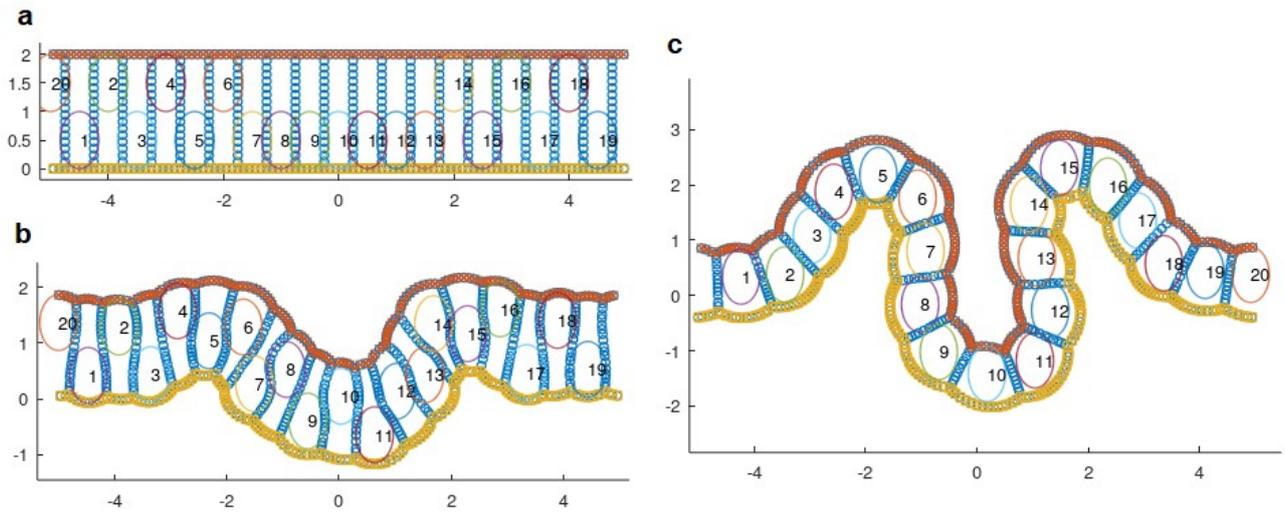


Figura 30: Un epitelio nucleado formado por una región con núcleos basales rodeada por otra con núcleos alternados lleva al buckling de todo el tejido en nuestro modelo. (a) Condición inicial de 20 células rectangulares en una monocapa de largo $\lambda_x = 10$, de las cuales 7 tienen núcleos, que inicialmente están en posición basal (señalados de 7 a 13 en la figura). (b) Estado del sistema luego de $35 \cdot \tau_R$, mostrando una morfología transitoria que presenta un buckling basal y células de morfología columnar. (c) Estado final del sistema, alcanzado luego de aproximadamente $80 \cdot \tau_R$, presentando un plegamiento basal notable y una falta casi total de columnarización celular. Círculos celestes: vértices; cruces naranjas: vértices apicales; círculos amarillos: vértices basales.

Discusión

Discusión General

En este trabajo hemos mostrado resultados experimentales sobre la polaridad apico-basal y la morfología del neuroepitelio de pollo bajo distintos tratamientos farmacológicos en el contexto de la neurulación primaria. Hemos presentado también un modelo dinámico que incluye a la membrana y al núcleo como elementos mecánicos importantes, y que es capaz de reproducir ciertas situaciones biológicas interesantes, capturando elementos de los epitelios pseudoestratificados no presentes en los modelos publicados.

Los resultados experimentales presentados indican que los efectos causados por el tratamiento con PMA 5 μM , en especial la extrusión, no se deben a la apoptosis. Entonces, es probable que lo observado sea un fenómeno de *extrusión viva*, promovido por algún tipo de restricción mecánica (como lo es la alta densidad celular en otros epitelios) que es **evitada** en la situación normal *in vivo*. El pasaje relativamente rápido de un epitelio normal, estable en el tiempo (en un rango de aproximadamente 1 h) a un epitelio que ha experimentado un alto nivel de extrusión apical sugiere que, por algún motivo, el tejido se ha vuelto *mecánicamente inestable*, por ejemplo por la pérdida de algún mecanismo relacionado con la polaridad apico-basal, que se ve alterada en todos los casos en los que ocurre extrusión que mostramos en el presente trabajo.

A su vez, los resultados computacionales muestran que, en nuestro modelo de un epitelio con núcleos sólidos y membranas capaces de curvarse, la presencia de núcleos con un eje menor mayor que el ancho $b = \lambda_x/N_C$ (el ancho que tendría cada célula en el equilibrio sin tomar en cuenta los núcleos) puede llevar a una inestabilidad que se resuelve mediante la extrusión de células, que permanecen adheridas a las otras células, hasta la formación de un tejido con varios estratos, situación en la que se puede llegar a un equilibrio estable. Esta inestabilidad parece inevitable si tomamos solamente en cuenta las fuerzas usualmente presentes en los Vertex Models, es decir, si modelamos a las células esencialmente como burbujas. Pensándolo así, la extrusión celular resulta un fenómeno totalmente natural y esperable: el núcleo actúa para perturbar la membrana (burbuja) hacia una posición en la cuál uno esperaría que una burbuja “resbale” (en este caso, que extruya). Uno no esperaría que una burbuja adoptara establemente la forma que adquieren las células en un epitelio pseudoestratificado sin la acción de elementos externos. De la misma forma, resulta necesario implementar elementos nuevos al modelo para lograr estabilizar esta morfología.

La introducción de la “fuerza compensatoria” $\vec{\Gamma}_i$ permite que el epitelio alcance un estado estable con núcleos de tamaño considerable a diferentes alturas en la monocapa. Aún logrando el equilibrio, distintos valores de Γ_0 conllevan interfaces celulares con distintas curvaturas. Esta fuerza es el único elemento del modelo que distingue los lados apicales, basales y laterales y nuestras simulaciones muestran que su reducción (disminuyendo el valor del parámetro Γ_0) tiende a favorecer la extrusión celular. Esta fuerza hace referencia formalmente a un eje apico-basal, pero no realizamos ninguna simulación en la cual los parámetros del lado apical fueran distintos de los del lado basal. Por lo tanto, aunque nuestros resultados sugieren una relación con la polaridad apico-basal, no hemos explorado esta afirmación lo suficiente. Dicho esto, estos resultados indican que una pérdida de polaridad apico-basal podría conllevar un aumento en la inestabilidad del epitelio para altas densidades nucleares, llevando a la extrusión celular.

Los resultados experimentales indican que la extrusión en este caso puede deberse a una inestabilidad mecánica del tejido, y las simulaciones muestran que esta hipótesis tiene sentido desde un punto de vista físico. Pero no solo eso, de estos resultados sobre la ocurrencia *excepcional* de la extrusión celular *in vivo* emerge la idea de que el neuroepitelio es un tejido cuya mecánica y morfología normal **no puede ser explicada** satisfactoriamente mediante modelos clásicos como los VMs, que carecen de membranas curvadas y hacen una analogía entre los tejidos y las espumas. El hecho de que esta complejidad morfológica esté presente naturalmente sin la ocurrencia espontánea de extrusión parece requerir de la acción de ciertos mecanismos específicos a los epitelios pseudoestratificados, posiblemente relacionados con la polaridad apico-basal. En ese sentido, podría pensarse que *los mecanismos que evitan la extrusión celular durante la neurulación primaria son simplemente parte de los mecanismos que determinan la morfología pseudoestratificada del neuroepitelio*, con todas las condiciones mecánicas necesarias para la neurulación que esto seguramente conlleva.

En este trabajo propusimos un posible mecanismo con ese propósito en la forma de la fuerza $\vec{\Gamma}_i$, elegida en principio por su clara tendencia a evitar la extrusión (frenando la disminución del lado apical/basal), pero no fue nuestra primera opción. Aunque no mostramos los resultados, se realizaron distintos intentos de estabilizar el epitelio con fuerzas de otro estilo, pero no fueron exitosos²⁰. El uso de $\vec{\Gamma}_i$, aunque conveniente, plantea la pregunta de su validez biológica. De efectivamente ocurrir, este tipo de fuerzas podrían estar revelando la existencia de mecanismos de “cross-talk” entre los lados basal y apical de la célula, vinculándolos mecánicamente. Realizamos más comentarios al respecto más adelante en la discusión.

Consideraciones sobre la extrusión celular y sobre el modelo

El modelo aquí presentado permite, bajo ciertos parámetros y condiciones iniciales, reproducir ciertas situaciones que juzgamos interesantes desde una perspectiva biológica. Destacamos entre ellas (1) la posibilidad de obtener monocapas mecánicamente estables compuestas por células columnares cuya forma se ajusta a la presencia de un núcleo rígido en contextos de alta densidad celular; (2) la posibilidad de determinar el plegado de un tejido mediante la localización inicial de los núcleos, sugiriendo que *in vivo* podría organizarse el pliegue de ciertas estructuras mediante el posicionamiento especial de los núcleos durante cortos períodos de tiempo previo a la formación de la estructura final; y (3) la ocurrencia de extrusión celular, que lleva el tejido inestable a una morfología estratificada formada por células más bien redondeadas, reflejando los resultados experimentales en los que la extrusión celular suele conllevar una pérdida de la estructura columnarizada, sobre todo en las células extruidas.

Sobre este último punto cabe aclarar que *no es necesariamente correcto* interpretar las extrusiones observadas en nuestro modelo como análogas a la extrusión viva de los experimentos, aunque así lo hayamos hecho hasta ahora. Por ejemplo, se ha mostrado que en epitelios monoestratificados, la extrusión viva requiere la contracción de un anillo de actina, en un proceso que involucra señalización vía esfingosina-1-fosfato (S1P) y que es mediado por ROCK (Eisenhoffer et al., 2012). Aunque no podemos realizar afirmaciones respecto a si esta interacción ocurre en el caso de los epitelios pseudoestratificados, no la planteamos explícitamente en nuestro modelo y, salvo que sea extremadamente rápida, no parecería poder estar contemplada de manera implícita.

²⁰ Estos intentos incluyen: diferencias en la tensión interfacial entre células vs. con el medio externo, fuerzas elásticas apico (basales) a favor u opuestas al incremento de perímetro total o apical (basal), tanto tangentes como normales, así como fuerzas laterales que promovieran la columnarización.

Cuando una célula extruye en nuestro modelo, esto es el producto de una inestabilidad del tejido considerando puramente aquellos elementos mecánicos que regulan las fuerzas de la célula de manera más o menos constante, refiriéndonos principalmente a la membrana plasmática, el citoesqueleto y el núcleo. No ocurren señales químicas nuevas que aparezcan como resultado de los cambios mecánicos y geométricos del tejido²¹ y que sean capaces de generar un efecto de umbral.

Esta distinción también es propia de otros modelos de extrusión, pero es posible en este caso señalar un par de hechos que le dan validez a nuestra correspondencia. Primero, que una célula extruye en nuestro modelo si y solo si en la zona (apical o basal) existe una suma de fuerzas que (1) tienda a disminuir la superficie con el medio exterior y (2) haga favorable una transición de tipo 1, es decir la separación de la célula del medio exterior. Claramente, la presencia de estas condiciones favorecerían la extrusión en una célula *in vivo* más allá de la existencia de procesos que efectivamente permitan *concretar* la extrusión, procesos que podrían activarse a partir de una inestabilidad, que estaría actuando como señal. Estudiar bajo qué condiciones ocurre la extrusión en el modelo permite entonces ver situaciones en las que podríamos esperar extrusión viva *in vivo*. Es interesante en ese sentido notar que, según nuestras simulaciones, una forma de causar extrusión parecería ser aumentar la densidad celular (en este caso, disminuir el ancho promedio celular b), al igual que como se ha descrito para la extrusión viva en epitelios con morfologías más sencillas (Eisenhoffer et al., 2012; Okuda & Fujimoto, 2020).

La construcción de un modelo²² obliga a ignorar muchas de las posibles causas de un proceso, no por falta de relevancia, si no porque su inclusión complejizaría demasiado el trabajo. Analicemos en particular el caso de la migración nuclear intercinética (INM). Este fenómeno, fundamental en los epitelios pseudoestratificados, resulta particularmente relevante para determinar el estado mecánico del neuroepitelio debido a su relación con el ciclo celular. La INM implica un acoplamiento (con discontinuidades, por supuesto, en cada división celular) entre la posición nuclear y (1) la forma celular, pues las células mitóticas necesariamente se redondean, (2) el volumen nuclear, con un aumento de casi 6 veces en el embrión de pollo (Sauer, 1935), y (3) el aumento de la población celular, confinado en principio al mismo espacio que antes. Aunque las estimaciones temporales de los fenómenos observados en nuestras simulaciones ($< 75 \cdot \tau_R \approx 25$ min) parecen ser más cortas que el efecto de la migración (8-12 h; Schoenwolf, 2018), al estar ocurriendo esta en todo momento, sería esperable siempre ver un porcentaje apreciable de células experimentando los dos últimos cambios mencionados. Además, el efecto del cambio de tamaño nuclear debería verse como una heterogeneidad en el tamaño nuclear de las distintas células en todo momento. Por lo tanto, implementar la INM en nuestro modelo requeriría no solo incluir la migración nuclear en sí (p. ej.: vía la fuerza \vec{G}_i , como se discutió antes), si no también introducir cambios en el tamaño nuclear, una transición capaz de producir nuevas células, y nuevas fuerzas necesarias para el cambio en la morfología celular.

Entre otros procesos que decidimos no considerar están las fluctuaciones que ocurren en las tensiones interfaciales, a pesar de ser consideradas importantes por algunos autores y de estar incluidas en el modelo original de Kim et al. (2021). Limitamos además nuestro análisis siempre al plano transversal, tanto en cuanto a los resultados experimentales como a nuestro modelo, pero es destacable que el tratamiento farmacológico también

21 Que en todo caso, podrían agregarse al modelo.

22 Especialmente modelos matemáticos/físicos/computacionales, pero se aplica a la síntesis de ideas más en general.

produce defectos en el eje antero-posterior, como se observa en nuestros resultados. Estos defectos pueden estar relacionados por ejemplo con problemas en la orientación de las divisiones celulares o con el proceso de extensión-convergencia por el cual las células se intercalan en el eje anteroposterior (Colas & Schoenwolf, 2001).

Además de la complejidad que podría representar agregar una tercera dimensión y todas las interacciones que eso implicaría modelar, los fenómenos recién mencionados tienen todos en común el estar relacionados con los *flujos* del tejido a diferentes escalas. En efecto, se ha mostrado que tanto la INM como las fluctuaciones de las tensiones interfaciales aportan a la fluidez del tejido en el tiempo (Gómez et al., 2021; Kim et al., 2021), y que los movimientos en los distintos ejes están acoplados durante el desarrollo (Xiong et al., 2020). En nuestras simulaciones buscamos estados de equilibrio relativamente rápidos y estables en el tiempo como aproximación para la compleja evolución temporal del neuroepitelio, pero es cada vez más reconocido que la reología del tejido (es decir, cómo fluye) es un elemento crucial en la morfogénesis (Petridou & Heisenberg, 2019).

Todos estos factores interactúan para determinar el estado mecánico del tejido que, como ya hemos discutido, es clave para comprender los movimientos morfogenéticos del mismo. Sería ideal para un trabajo como el presente poder establecer un vínculo explícito entre las propiedades mecánicas a nivel de la célula o el tejido y los componentes subcelulares que las producen. Sin embargo, aún conociendo factores importantes para nuestro fenómeno de estudio, como la relación que guarda con el estado de fosforilación y la distribución de la proteína MARCKS (Aparicio et al., 2018; Veloz et al., 2022), no podemos realizar predicciones cuantitativas al respecto. El rol mecánico de las proteínas que, como MARCKS, anclan la corteza celular a la membrana constituye un tema particularmente difícil y poco estudiado (Lembo, 2021; Lembo et al., 2023), pero el problema resulta inextricable aún si solo consideramos el rol de la corteza celular en el establecimiento de una sola propiedad mecánica. Si queremos hablar sobre la rigidez (por ejemplo, medida por microscopía de fuerza atómica), la intuición nos lleva a pensar que la contracción de la corteza bajo la acción de la miosina II debe conllevar un aumento en la rigidez, con todas las consecuencias que de ahí se deducen. Sin embargo, esta relación no tiene nada de sencillo. No solo *no es obvio* que la contracción de una red la hace más rígida (demostrado teóricamente en algunos casos en Sharma et al., 2016) sino que, más aún, se ha mostrado que en el caso particular de la corteza celular este cambio depende fuertemente de la topología de la red de filamentos de F-Actina tanto a nivel celular (Lembo et al., 2023) como supracelular (Yevick et al., 2019), pudiendo incluso disminuir la “solidez” del tejido al favorecer su fluidez (Herrera-Perez et al., 2023), de manera aparentemente contradictoria.

Actualmente parece difícil incorporar estos aspectos en un modelo físico.

Limitaciones & Perspectivas

Como ya mencionamos, nuestra aproximación presenta ciertas limitaciones inevitables, pero nos gustaría destacar algunas y proponer formas en las que podrían ser superadas.

Primero que nada, no hemos podido contrastar nuestros resultados experimentales con nuestro modelo de manera cuantitativa. Esto es en parte porque no realizamos ninguna medida mecánica sobre los embriones. Una opción en ese sentido sería medir la elasticidad del tejido mediante microscopía de fuerza atómica pero, debido a la complejidad antes discutida, esto podría servir más para caracterizar el estado del tejido que para comprender mejor nuestros fenómenos de interés. Por otra parte, nuestra

implementación del modelo presenta limitaciones que dificultan el contraste cuantitativo. El uso del método de integración de Euler, aunque conveniente desde el punto de vista de la programación, imposibilita alcanzar densidades celulares tan altas como las que ocurren *in vivo*. Este problema podría ser resuelto implementando otro método de integración más complejo, o incluso basado en minimización de energía. Otra gran dificultad es la gran cantidad de tiempo requerida para las simulaciones presentadas en este trabajo. En una simulación del modelo completo, un paso de integración lleva entre 8 y 16 segundos, dependiendo del hardware, lo cual significa que se requieren más de 9 horas para una simulación de 3000 pasos, equivalente a $30 \cdot \tau_r \approx 10$ min. Además de cambiar el hardware utilizado (todas las simulaciones se realizaron en una computadora personal, podrían usarse otras de mayor potencia o un servidor remoto, por ejemplo), esto podría mejorarse optimizando el código de la implementación, pero también podría ser afectado negativamente por el uso de algoritmos de integración más complejos.

Existen además discrepancias más sutiles entre los resultados de los experimento *in vivo* e *in silico*. En nuestras simulaciones la extrusión involucra *siempre* una pérdida de columnarización en todas las células, mientras que *in vivo*, aunque están asociadas (como muestran nuestros resultados)²³, se sabe que estos efectos pueden ser desacoplados experimentalmente (Aparicio et al., 2018). Otra cuestión ya mencionada es la de la naturaleza de la fuerza compensatoria $\bar{\Gamma}_i$, que requiere la transmisión de información mecánica rápidamente entre ambos extremos de la célula, implicando una definición *global* de la misma. Una alternativa quizás más probable en el sentido biológico consiste en asumir que tanto el lado apical como el basal tienen, de manera independiente, una cierta compresibilidad y una cierta extensión para la cual la superficie se encuentra relajada en equilibrio, originado por ejemplo por la presencia de la corteza celular, las uniones adherentes o por la adhesión a la lámina basal. Esto permite una definición *local* de $\bar{\Gamma}_i$, que en primera aproximación podría ser por ejemplo

$$\Gamma_i = \Gamma_i^0 (L_i^a - L_0^a) \quad (\text{Ec. 1})$$

para los vértices apicales y

$$\Gamma_i = \Gamma_i^0 (L_i^b - L_0^b) \quad (\text{Ec. 2})$$

para los basales. Como ejemplo, definiendo $L_0 = 0.52$ (el largo apical y basal en equilibrio para $b = 0.5$) y $\Gamma_0 = T_0/L_0$ probamos realizar algunas simulaciones (Figura 31). Este modelo con $\bar{\Gamma}_i$ local alcanza un estado estable con morfología similar a la de nuestro modelo en el caso de un tejido con núcleos alternantes (comparar con Figura 23), pero no es capaz de reproducir el plegado de la monocapa con un grupo de núcleos basales, produciéndose artefactos durante la simulación. Ya que ambos problemas involucran grandes deformaciones de las interfaces laterales, quizás sea posible tener ambas en cuenta introduciendo algún mecanismo que promueva la morfología columnar, que podrían interpretarse parcialmente en términos de las contribuciones de los microtúbulos (Colas & Schoenwolf, 2001).

23 Esta pérdida es notable sobre todo en las células extruidas, pero es visible también en aquellas no-extruidas, que tienen menor altura en los tratamientos con PMA y PMA + QVD-OPh que en la situación control.

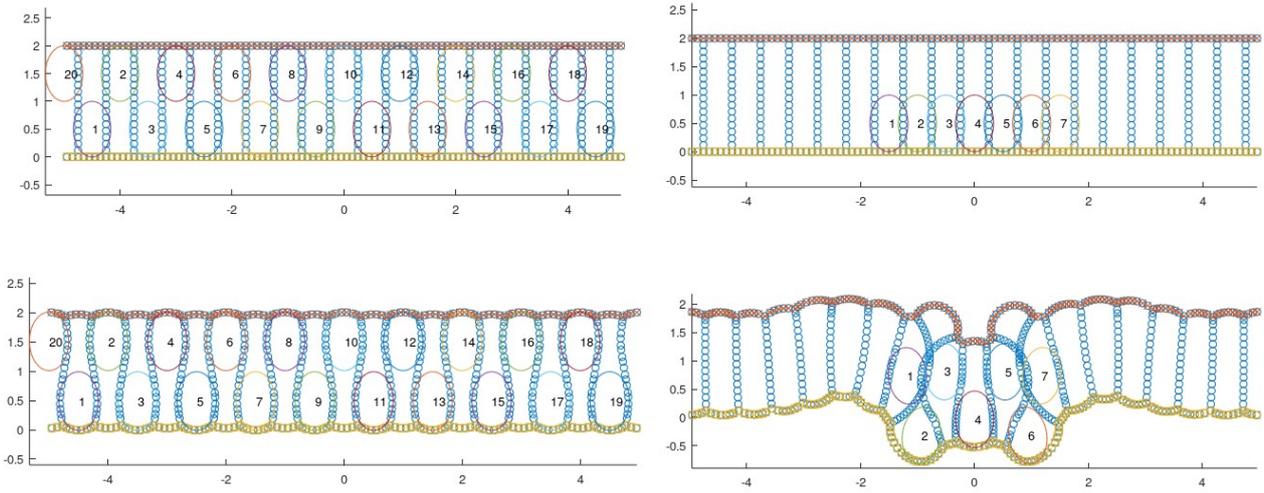


Figura 31: Definiendo $\vec{\Gamma}_i$ de manera local pueden reproducirse algunos de los resultados del modelo antes mostrado, pero no todos. (Izq.) Partiendo de una monocapa de células rectangulares con núcleos alternados, se obtiene una morfología que recuerda a la de los epitelios pseudoestratificados en un tiempo menor a $10 \cdot \tau_R$ (comparar con Figura 23). (Der.) Partiendo de una monocapa de células rectangulares con un grupo de núcleos basales se llega a artefactos que generan situaciones absurdas en la simulación. Aquí, se cruzan interfaces distintas luego de un tiempo aproximado de $30 \cdot \tau_R$ (comparar con Figura 26). Simulaciones realizadas con $L_0 = 0.52$ apical y basalmente, y $\Gamma_0 = T_0/L_0$. Círculos celestes: vértices; cruces naranjas: vértices apicales; círculos amarillos: vértices basales.

A pesar de no poder relacionar cuantitativamente nuestros resultados *in vivo* e *in silico*, nos parece interesante proponer un par de medidas que pueden resultar útiles a futuro, expuestas en más detalle en el Anexo III. Por un lado, gracias a que nuestro modelo puede presentar interfaces curvas, podría compararse la curvatura observada al microscopio con alguna medida para la “curvatura local” de una curva poligonal como la del modelo, que para un vértice de ángulo interno $2\omega_i$ con aristas adyacentes de largo l_i podríamos aproximar (de manera “externa” κ_i^{ex} o “interna” κ_i^{in}) como

$$\kappa_i^{ex} \approx \frac{2\cos(\omega_i)}{l_i} \text{ o } \kappa_i^{in} = \frac{2}{l_i \cdot \tan(\omega_i)} \quad (\text{Ec. 3})$$

Por otro lado, ya que la extrusión en epitelios pseudoestratificados parece depender de alguna medida de densidad diferente a la densidad celular de otros epitelios, nos parece que sería bueno estudiar la distribución relativa del área ocupada por núcleos respecto al área total del epitelio a diferentes altura del eje apico-basal. Un análisis inicial permite intuir que dicha distribución reflejaría la curvatura del epitelio y creemos que podría ser útil para caracterizar las condiciones bajo las cuales ocurre extrusión celular.

Finalmente, los datos aquí presentados señalan posibilidades interesantes para el estudio futuro, tanto desde el punto de vista experimental como del modelado.

Los resultados teóricos parecen indicar que el núcleo cumple esencialmente una función “perturbadora” sobre la morfología de la célula, que es capaz de alcanzar un estado estacionario sin extruir (aún más con el efecto estabilizador de una fuerza como $\vec{\Gamma}_i$). Por lo tanto, podría ser interesante alterar sus propiedades mecánicas *in vivo* en algunas células y observar el efecto en la extrusión. Se podría por ejemplo intentar disminuir la rigidez del

núcleo alterando la expresión de las laminas (Srivastava et al., 2021) (p. ej.: en nuestro sistema podríamos lograrlo introduciendo morfolidos mediante electroporación),

Nos interesa también mejorar y profundizar en el modelo, ya sea mediante su aplicación a nuevas situaciones experimentales (p. ej.: otros defectos mecánicos que pueden ser inducidos en la neurulación primaria, sin necesariamente involucrar extrusión), la búsqueda de mecanismos alternativos biológicamente plausibles que puedan producir resultados interesantes, o realizando más cálculos que nos permitan implementarlo de manera más eficiente, posiblemente convirtiendo las ecuaciones de fuerza del mismo a un funcional de energía, lo cual facilitaría tanto la simulación como el análisis matemático del mismo.

Conclusiones

Tomando en cuenta la información presentada en este trabajo, podemos afirmar que los diversos defectos inducidos por la activación de PKC mediante el tratamiento con PMA son independientes de la apoptosis, y en particular, que la extrusión celular así inducida es un ejemplo de extrusión viva, que podría ser inducido por una inestabilidad mecánica prevenida en situación normal por mecanismos relacionados con la polaridad apico-basal.

Nuestros resultados teóricos no solo apoyan esta conclusión, si no que también indican que, lejos de ser un fenómeno improbable, la extrusión parece resultar favorable en cualquier epitelio que, como la placa neural, deba contener altas densidades nucleares. Esto a su vez sugiere que aquellos mecanismos que previenen la extrusión apical en condiciones normales son precisamente aquellos que dan al neuroepitelio su característica morfología pseudoestratificada durante la neurulación primaria, y que son diferentes a aquellos que dominan el estado mecánico de otros epitelios.

La unión en este trabajo de resultados experimentales y teóricos, aunque incompleta y cualitativa, permite dar un sustento más firme a estas afirmaciones previas y, tras la búsqueda del origen de un defecto ciertamente *infrecuente*, resalta las complejidades que yacen en *cada* escala de *cada* uno de los procesos que, una y otra vez, dan forma a los seres vivos.

Bibliografía

- Aaku-Saraste, E., Hellwig, A., & Huttner, W. B. (1996). Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure—Remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Developmental Biology*, 180(2), 664-679. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0336>
- Alt, S., Ganguly, P., & Salbreux, G. (2017). Vertex models: From cell mechanics to tissue morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1720). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0520>
- Alvarez, I. S., & Schoenwolf, G. C. (1992). Expansion of surface epithelium provides the major extrinsic force for bending of the neural plate. *Journal of Experimental Zoology*, 261(3), 340-348. <https://doi.org/10.1002/jez.1402610313>
- Ampartzidis, I., Efstathiou, C., Paonessa, F., Thompson, E. M., Wilson, T., McCann, C. J., Greene, N. De., Copp, A. J., Livesey, F. J., Elvassore, N., Giobbe, G. G., De Coppi, P., Maniou, E., & Galea, G. L. (2023). Synchronisation of apical constriction and cell cycle progression is a conserved behaviour of pseudostratified neuroepithelia informed by their tissue geometry. *Developmental Biology*, 494, 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2022.12.002>
- Aparicio, G., Arruti, C., & Zolessi, F. R. (2018). MARCKS phosphorylation by PKC strongly impairs cell polarity in the chick neural plate. *Genesis*, 56(4), 1-13. <https://doi.org/10.1002/dvg.23104>
- Arbuzova, A., Schmitz, A. A. P., & Verge, G. (2002). *Cross-talk unfolded: MARCKS proteins*.
- Atieh, Y., Wyatt, T., Zinke, A. M., & Eisenhoffer, G. T. (2021). Pulsatile contractions promote apoptotic cell extrusion in epithelial tissues. *Current Biology*, 31(6), 1129-1140.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.12.005>
- Barresi, M. J. F., & Gilbert, S. F. (2019). *Developmental Biology* (12th edition). Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press.
- Brakke, K. A. (1992). The surface evolver. *Experimental Mathematics*, 1(2), 141-165.

- Brodland, G. W., Chen, X., Lee, P., & Marsden, M. (2010). From genes to neural tube defects (NTDs): Insights from multiscale computational modeling. *HFSP Journal*, 4(3-4), 142-152. <https://doi.org/10.2976/1.3338713>
- Chapman, S. C., Rome, J. É., Rome Collignon, R., Schoenwolf, G. C., & Lumsden, A. (2001). *Improved Method for Chick Whole-Embryo Culture Using a Filter Paper Carrier*.
- Chen, Z., Guo, Q., Dai, E., Forsch, N., & Taber, L. A. (2016). How the embryonic chick brain twists. *Journal of The Royal Society Interface*, 13(124), 20160395. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0395>
- Chenn, A., Zhang, Y. A., Chang, B. T., & McConnell, S. K. (1998). Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 11(4), 183-193. <https://doi.org/10.1006/mcne.1998.0680>
- Chiou, K. K., Hufnagel, L., & Shraiman, B. I. (2012). Mechanical Stress Inference for Two Dimensional Cell Arrays. *PLOS Computational Biology*, 8(5), e1002512. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002512>
- Chugh, P., Clark, A. G., Smith, M. B., Cassani, D. A. D., Dierkes, K., Ragab, A., Roux, P. P., Charras, G., Salbreux, G., & Paluch, E. K. (2017). Actin cortex architecture regulates cell surface tension. *Nature Cell Biology*, 19(6), 689-697. <https://doi.org/10.1038/ncb3525>
- Colas, J., & Schoenwolf, G. C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Developmental Dynamics*, 221(2), 117-145. <https://doi.org/10.1002/dvdy.1144>
- Crowley, L. C., & Waterhouse, N. J. (2016). Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(11), pdb.prot087312. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087312>
- d'Angelo, P. (2004). *Hugin* (2023.0.0.d88dc56ded0e) [Software]. <http://hugin.sourceforge.net/>
- Dady, A., Blavet, C., & Duband, J. L. (2012). Timing and kinetics of E- to N-cadherin switch during neurulation in the avian embryo. *Developmental Dynamics*, 241(8), 1333-1349. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23813>

- Danesin, C., Ferreira, M. A., Degond, P., & Theveneau, E. (2021). Anteroposterior elongation of the chicken anterior trunk neural tube is hindered by interaction with its surrounding tissues. *Cells and Development*, 168. <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203723>
- de Goederen, V., Vetter, R., McDole, K., & Iber, D. (2022). Hinge point emergence in mammalian spinal neurulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(20), e2117075119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2117075119>
- Duclut, C., Paijmans, J., Inamdar, M. M., Modes, C. D., & Jülicher, F. (2021). Nonlinear rheology of cellular networks. *Cells and Development*, 168. <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203746>
- Duszyc, K., Gomez, G. A., Legendijk, A. K., Yau, M. K., Nanavati, B. N., Gliddon, B. L., Hall, T. E., Verma, S., Hogan, B. M., Pitson, S. M., Fairlie, D. P., Parton, R. G., & Yap, A. S. (2021). Mechanotransduction activates RhoA in the neighbors of apoptotic epithelial cells to engage apical extrusion. *Current Biology*, 31(6), 1326-1336.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.003>
- Eisenhoffer, G. T., Loftus, P. D., Yoshigi, M., Otsuna, H., Chien, C. B., Morcos, P. A., & Rosenblatt, J. (2012). Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature*, 484(7395), 546-549. <https://doi.org/10.1038/nature10999>
- Eisenhoffer, G. T., & Rosenblatt, J. (2013). Bringing balance by force: Live cell extrusion controls epithelial cell numbers. *Trends in Cell Biology*, 23(4), 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.11.006>
- El Amri, M., Fitzgerald, U., & Schlosser, G. (2018). MARCKS and MARCKS-like proteins in development and regeneration. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0445-1>
- Eom, D. S., Amarnath, S., Fogel, J. L., & Agarwala, S. (2011). Bone morphogenetic proteins regulate neural tube closure by interacting with the apicobasal polarity pathway. *Development*, 138(15), 3179-3188. <https://doi.org/10.1242/dev.058602>
- Escuin, S., Vernay, B., Savery, D., Gurniak, C. B., Witke, W., Greene, N. D. E., & Copp, A. J. (2015). Rho-kinase-dependent actin turnover and actomyosin disassembly are

necessary for mouse spinal neural tube closure. *Journal of Cell Science*, 128(14), 2468-2481. <https://doi.org/10.1242/jcs.164574>

Farhadifar, R., Röper, J.-C., Aigouy, B., Eaton, S., & Jülicher, F. (2007). The Influence of Cell Mechanics, Cell-Cell Interactions, and Proliferation on Epithelial Packing. *Current Biology*, 17(24), 2095-2104. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.11.049>

Fierling, J., John, A., Delorme, B., Torzynski, A., Blanchard, G. B., Lye, C. M., Popkova, A., Malandain, G., Sanson, B., Étienne, J., Marmottant, P., Quilliet, C., & Rauzi, M. (2022). Embryo-scale epithelial buckling forms a propagating furrow that initiates gastrulation. *Nature Communications*, 13(1), 3348. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30493-3>

Fletcher, A. G., Osterfield, M., Baker, R. E., & Shvartsman, S. Y. (2014). Vertex Models of Epithelial Morphogenesis. *Biophysical Journal*, 106(11), 2291-2304. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.4498>

Fletcher, D. A., & Geissler, P. L. (2009). Active Biological Materials. *Annual Review of Physical Chemistry*, 60(1), 469-486. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.040808.090304>

Gómez, H. F., Dumond, M. S., Hodel, L., Vetter, R., & Iber, D. (2021). 3D cell neighbour dynamics in growing pseudostratified epithelia. *eLife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.68135>

Goodwin, K., & Nelson, C. M. (2021). Mechanics of Development. *Developmental Cell*, 56(2), 240-250. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.11.025>

Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*, 195(4), 231-272. <https://doi.org/10.1002/aja.1001950404>

Hannezo, E., Prost, J., & Joanny, J.-F. (2014). Theory of epithelial sheet morphology in three dimensions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 27-32. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312076111>

Herrera-Perez, R. M., Cupo, C., Allan, C., Dagle, A. B., & Kasza, K. E. (2023). Tissue Flows Are Tuned by Actomyosin-Dependent Mechanics in Developing Embryos. *PRX Life*, 1(1), 013004. <https://doi.org/10.1103/PRXLife.1.013004>

- Hiraiwa, T., Wen, F. L., Shibata, T., & Kuranaga, E. (2019). Mathematical modeling of tissue folding and asymmetric tissue flow during epithelial morphogenesis. *Symmetry*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/sym11010113>
- His, W. (1874). *Unsere Körperform und das physiologische Problem ihrer Entstehung Briefe an einen befreundeten Naturforscher* (pp. 1-246). F.C.W. Vogel. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.28860>
- Hočevar Brezavšček, A., Rauzi, M., Leptin, M., & Zihlerl, P. (2012). A Model of Epithelial Invagination Driven by Collective Mechanics of Identical Cells. *Biophysical Journal*, 103(5), 1069-1077. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.07.018>
- Iber, D., & Vetter, R. (2022). 3D Organisation of Cells in Pseudostratified Epithelia. *Frontiers in Physics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphy.2022.898160>
- Ishihara, S., & Sugimura, K. (2012). Bayesian inference of force dynamics during morphogenesis. *Journal of Theoretical Biology*, 313, 201-211. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.08.017>
- Ishii, M., Tateya, T., Matsuda, M., & Hirashima, T. (2021). Stalling interkinetic nuclear migration in curved pseudostratified epithelium of developing cochlea. *Royal Society Open Science*, 8(12). <https://doi.org/10.1098/rsos.211024>
- Kim, S., Amini, R., & Campàs, O. (2022). A nuclear jamming transition in vertebrate organogenesis. <https://doi.org/10.1101/2022.07.31.502244>
- Kim, S., Pochitaloff, M., Stooke-Vaughan, G. A., & Campàs, O. (2021). Embryonic tissues as active foams. *Nature Physics*, 17(7), 859-866. <https://doi.org/10.1038/s41567-021-01215-1>
- Kong, W., Loison, O., Chavadimane Shivakumar, P., Chan, E. H., Saadaoui, M., Collinet, C., Lenne, P.-F., & Clément, R. (2019). Experimental validation of force inference in epithelia from cell to tissue scale. *Scientific Reports*, 9(1), 14647. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50690-3>
- Lammerding, J., Engler, A. J., & Kamm, R. (2022). Mechanobiology of the cell nucleus. *APL Bioengineering*, 6(4), 040401. <https://doi.org/10.1063/5.0135299>
- Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D., & Caroni, P. (2000). GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate

cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *The Journal of Cell Biology*, 149(7), 1455-1472. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.7.1455>

Lee, S.-W., & Morishita, Y. (2017). Possible roles of mechanical cell elimination intrinsic to growing tissues from the perspective of tissue growth efficiency and homeostasis. *PLOS Computational Biology*, 13(7), e1005651. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005651>

Lembo, S. (2021). *Shedding light on Membrane- to-cortex attachment through the development of molecular tools* [PhD Thesis, Ruperto Carola University Heidelberg]. https://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/30848/1/Sergio%20Lembo_PhD%20thesis.pdf

Lembo, S., Strauss, L., Cheng, D., Vermeil, J., Siggel, M., Toro-Nahuelpan, M., Chan, C. J., Kosinski, J., Piel, M., Du Roure, O., Heuvingsh, J., Mahamid, J., & Diz-Muñoz, A. (2023). *The distance between the plasma membrane and the actomyosin cortex acts as a nanogate to control cell surface mechanics*. <https://doi.org/10.1101/2023.01.31.526409>

Levayer, R., Dupont, C., & Moreno, E. (2016). Tissue Crowding Induces Caspase-Dependent Competition for Space. *Current Biology*, 26(5), 670-677. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.072>

Li, J., Economou, A. D., Vacca, B., & Green, J. B. A. (2020). Epithelial invagination by a vertical telescoping cell movement in mammalian salivary glands and teeth. *Nature Communications*, 11(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16247-z>

Lomakin, A. J., Cattin, C. J., Cuvelier, D., Alraies, Z., Molina, M., Nader, G. P. F., Srivastava, N., Saez, P. J., Garcia-Arcos, J. M., Zhitnyak, I. Y., Bhargava, A., Driscoll, M. K., Welf, E. S., Fiolka, R., Petrie, R. J., de Silva, N. S., González-Granado, J. M., Manel, N., Lennon-Duménil, A. M., ... Piel, M. (2020). The nucleus acts as a ruler tailoring cell responses to spatial constraints. *Science*, 370(6514). <https://doi.org/10.1126/science.aba2894>

Lubkov, V., & Bar-Sagi, D. (2014). E-cadherin-mediated cell coupling is required for apoptotic cell extrusion. *Current Biology: CB*, 24(8), 868-874. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.02.057>

- Madara, J. L. (1990). Maintenance of the macromolecular barrier at cell extrusion sites in intestinal epithelium: Physiological rearrangement of tight junctions. *The Journal of Membrane Biology*, *116*(2), 177-184. <https://doi.org/10.1007/BF01868675>
- Marinari, E., Mehonic, A., Curran, S., Gale, J., Duke, T., & Baum, B. (2012). Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit tissue overcrowding. *Nature*, *484*(7395), 542-545. <https://doi.org/10.1038/nature10984>
- Martin, A. C., & Goldstein, B. (2014). Apical constriction: Themes and variations on a cellular mechanism driving morphogenesis. *Development*, *141*(10), 1987-1998. <https://doi.org/10.1242/dev.102228>
- McLaughlin, S., & Aderem, A. (1995). The myristoyl-electrostatic switch: A modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends in Biochemical Sciences*, *20*(7), 272-276. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89042-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89042-8)
- Nanavati, B. N., Yap, A. S., & Teo, J. L. (2020). Symmetry Breaking and Epithelial Cell Extrusion. *Cells*, *9*(6), 1416. <https://doi.org/10.3390/cells9061416>
- Nikolopoulou, E., Galea, G. L., Rolo, A., Greene, N. D. E., & Copp, A. J. (2017). Neural tube closure: Cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development*, *144*(4), 552-566. <https://doi.org/10.1242/dev.145904>
- Norden, C. (2017). Pseudostratified epithelia – cell biology, diversity and roles in organ formation at a glance. *Journal of Cell Science*, *jcs.192997*. <https://doi.org/10.1242/jcs.192997>
- Odell, G. M., Oster, G., Alberch, P., & Burnside, B. (1981). The mechanical basis of morphogenesis. I. Epithelial folding and invagination. *Developmental Biology*, *85*(2), 446-462. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90276-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90276-1)
- Okuda, S., & Fujimoto, K. (2020). A Mechanical Instability in Planar Epithelial Monolayers Leads to Cell Extrusion. *Biophysical Journal*, *118*(10), 2549-2560. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.03.028>
- Pearl, E. J., Li, J., & Green, J. B. A. (2017). Cellular systems for epithelial invagination. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *372*(1720), 20150526. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0526>

- Petridou, N. I., & Heisenberg, C. (2019). Tissue rheology in embryonic organization. *The EMBO Journal*, 38(20), 1-13. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102497>
- Prieto, D., Aparicio, G., Morande, P. E., & Zolessi, F. R. (2014). A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochemistry and Cell Biology*, 142(3), 335-345. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1215-0>
- Roellig, D., Theis, S., Proag, A., Allio, G., Bénazéraf, B., Gros, J., & Suzanne, M. (2022). Force-generating apoptotic cells orchestrate avian neural tube bending. *Developmental Cell*, 57(6), 707-718.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.02.020>
- Rosenblatt, J., Raff, M. C., & Cramer, L. P. (2001). An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Current Biology*, 11(23), 1847-1857. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00587-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00587-5)
- Roux, W. (1893). Beiträge zur Entwicklungsmechanik des Embryo. *Anatomische Hefte*, 2(3), 277-333. <https://doi.org/10.1007/BF02301138>
- Salbreux, G., Charras, G., & Paluch, E. (2012). Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. *Trends in Cell Biology*, 22(10), 536-545. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.07.001>
- Sauer, F. C. (1935). Mitosis in the neural tube. *Journal of Comparative Neurology*, 62(2), 377-405. <https://doi.org/10.1002/cne.900620207>
- Saw, T. B., Doostmohammadi, A., Nier, V., Kocgozlu, L., Thampi, S., Toyama, Y., Marcq, P., Lim, C. T., Yeomans, J. M., & Ladoux, B. (2017). Topological defects in epithelia govern cell death and extrusion. *Nature*, 544(7649), 212-216. <https://doi.org/10.1038/nature21718>
- Sawyer, J. K., Choi, W., Jung, K. C., He, L., Harris, N. J., & Peifer, M. (2011). A contractile actomyosin network linked to adherens junctions by Cnca3/afadin helps drive convergent extension. *Molecular Biology of the Cell*, 22(14), 2491-2508. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-05-0411>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-

source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Schoenwolf, G. C. (2018). Contributions of the chick embryo and experimental embryology to understanding the cellular mechanisms of neurulation. *The International Journal of Developmental Biology*, 62(1-2-3), Article 1-2-3. <https://doi.org/10.1387/ijdb.170288gs>

Schoenwolf, G. C., Folsom, D., & Moe, A. (1988). A reexamination of the role of microfilaments in neurulation in the chick embryo. *The Anatomical Record*, 220(1), 87-102. <https://doi.org/10.1002/ar.1092200111>

Schoenwolf, G. C., & Smith, J. L. (1990). Mechanisms of neurulation: Traditional viewpoint and recent advances. *Development*, 109(2), 243-270.

Sego, T. J., Comlekoglu, T., Peirce, S. M., Desimone, D. W., & Glazier, J. A. (2023). General, open-source vertex modeling in biological applications using Tissue Forge. *Scientific Reports*, 13(1), 17886. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45127-x>

Sharma, A., Licup, A. J., Rens, R., Vahabi, M., Jansen, K. A., Koenderink, G. H., & MacKintosh, F. C. (2016). Strain-driven criticality underlies nonlinear mechanics of fibrous networks. *Physical Review E*, 94(4). <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.94.042407>

Sitarska, E., & Diz-Muñoz, A. (2020). Pay attention to membrane tension: Mechanobiology of the cell surface. *Current Opinion in Cell Biology*, 66, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.04.001>

Slattum, G. M., & Rosenblatt, J. (2014). Tumour cell invasion: An emerging role for basal epithelial cell extrusion. *Nature Reviews Cancer*, 14(7), 495-501. <https://doi.org/10.1038/nrc3767>

Srivastava, L. K., Ju, Z., Ghagre, A., & Ehrlicher, A. J. (2021). Spatial distribution of lamin A/C determines nuclear stiffness and stress-mediated deformation. *Journal of Cell Science*, 134(10), jcs248559. <https://doi.org/10.1242/jcs.248559>

Stein, M. B., & Gordon, R. (1982). Epithelia as bubble rafts: A new method for analysis of cell shape and intercellular adhesion in embryonic and other epithelia. *Journal of Theoretical Biology*, 97(4), 625-639. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(82\)90363-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(82)90363-0)

- Stern, C. D., & Holland, P. W. H. (Eds.). (1993). *Essential Developmental Biology: A Practical Approach*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780199634231.001.0001>
- Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M., & Peifer, M. (2000). Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(2), 91-100. <https://doi.org/10.1038/35040042>
- Theis, S., Suzanne, M., & Gay, G. (2021). Tyssue: An epithelium simulation library. *Journal of Open Source Software*, 6(62), 2973. <https://doi.org/10.21105/joss.02973>
- Toledo, A., Zolessi, F. R., & Arruti, C. (2013). A Novel Effect of MARCKS Phosphorylation by Activated PKC: The Dephosphorylation of Its Serine 25 in Chick Neuroblasts. *PLoS ONE*, 8(4), e62863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062863>
- Veloz, L., A. Bosch, S., Aparicio, G., & R. Zolessi, F. (2022). Cell extrusion in development and cancer, what MARCKS the difference for epithelial integrity? *BIOCELL*, 46(3), 639-644. <https://doi.org/10.32604/biocell.2022.018798>
- Venturini, V., Pezzano, F., Català Castro, F., Häkkinen, H.-M., Jiménez-Delgado, S., Colomer-Rosell, M., Marro, M., Tolosa-Ramon, Q., Paz-López, S., Valverde, M. A., Weghuber, J., Loza-Alvarez, P., Krieg, M., Wieser, S., & Ruprecht, V. (2020). The nucleus measures shape changes for cellular proprioception to control dynamic cell behavior. *Science (New York, N.Y.)*, 370(6514), eaba2644. <https://doi.org/10.1126/science.aba2644>
- Villars, A., & Levayer, R. (2020). Cell Extrusion: Crowd Pushing and Sticky Neighbours. *Current Biology*, 30(4), R168-R171. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.033>
- Xiong, F., Ma, W., Bénazéraf, B., Mahadevan, L., & Pourquié, O. (2020). Mechanical Coupling Coordinates the Co-elongation of Axial and Paraxial Tissues in Avian Embryos. *Developmental Cell*, 55(3), 354-366.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.08.007>
- Yamashita, S., Ishihara, S., & Graner, F. (2024). Apical constriction requires patterned apical surface remodeling to synchronize cellular deformation. *eLife*, 13. <https://doi.org/10.7554/eLife.93496.1>

- Yevick, H. G., Miller, P. W., Dunkel, J., & Martin, A. C. (2019). Structural Redundancy in Supracellular Actomyosin Networks Enables Robust Tissue Folding. *Developmental Cell*, 50(5), 586-598.e3. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.06.015>
- Zolessi, F. R., & Arruti, C. (2001). Apical accumulation of MARCKS in neural plate cells during neurulation in the chick embryo. *BMC Developmental Biology*, 1, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-1-7>

Anexo

I: Otras aproximaciones experimentales

A lo largo de la realización de esta maestría probamos distintas aproximaciones experimentales que, por diversos motivos, no continuamos estudiando. Todos estos resultados fueron obtenidos antes de la realización de los experimentos presentados en el texto principal y, aunque no aparecen directamente, fueron importantes indirectamente para la elaboración conceptual de los experimentos finales. A continuación presentamos un resumen de estos experimentos y los resultados obtenidos.

I.i: Cortes macroscópicos sobre embriones

Como se mencionó en la Introducción, diversas fuerzas actúan a nivel macroscópico sobre el neuroepitelio durante la neurulación primaria. La acción de estas fuerzas genera tensiones internas al embrión que podemos evidenciar realizando cortes en los tejidos y luego observando la deformación resultante. Para tener una idea (aunque fuera grosera) de estas tensiones y su relación con la neurulación primaria durante nuestro período de interés, realizamos cortes rectos en diferentes direcciones y en diferentes regiones del embrión, utilizando una aguja de microdissección de acero. En todos los casos se procuró realizar cortes simétricos respecto al eje izquierda-derecha. Similarmente a los experimentos con PMA y QVD, utilizamos embriones en etapas tempranas del cierre del tubo neural (HH7⁺-8) cultivados según el método EC (Chapman et al., 2001), que luego fueron incubados por 3 h, tiempo en el cual esperaríamos que, bajo condiciones normales, el tubo neural se pliegue y cierre casi completamente. Los embriones fueron fotografiados utilizando una cámara BRESSER MikrOkular Full HD a través de una lupa binocular Nikon SMZ800 antes y después de la incubación, permitiendo corresponder la localización y el tamaño inicial de cada corte recto con los de la situación final. Las imágenes fueron procesadas en FIJI (Schindelin et al., 2012).

Como se observa (Figura 32), los distintos cortes produjeron distintos efectos, visibles tanto por la deformación en el plano como por los cambios en el cierre normal del tubo neural. En nuestros resultados, parecería ser que los cortes laterales “lejanos” (es decir, en el área opaca) no producen cambios en la morfología general del embrión ni en el cierre del tubo neural, a pesar de conllevar deformaciones apreciables (Figura 32A). Cortes más cercanos de similar tamaño produjeron tanto deformaciones como defectos en el cierre del tubo neural muy apreciables (Figura 32B, sección destacada entre puntas de flecha). Cortes laterales más pequeños produjeron también defectos en el cierre del tubo en las zonas cercanas (Figura 32C y D, observar entre los cortes, destacado con punta de flecha), a pesar de que las deformaciones asociadas fueron pequeñas. Un corte longitudinal ubicado centralmente en la parte posterior del embrión produjo una deformación notable (Figura 32E). Los cortes transversales al embrión produjeron resultados diversos, desde grandes deformaciones y consecuentes defectos en el cierre del tubo para un corte posterior (Figura 32F) hasta deformaciones mínimas y cierres de tubo aparentemente normales para un corte más anterior (Figura 32G). También se

realizó una combinación de un corte anterior y uno posterior, en la que no se observaron ni deformaciones ni defectos del cierre del tubo neural notables (Figura 32H).

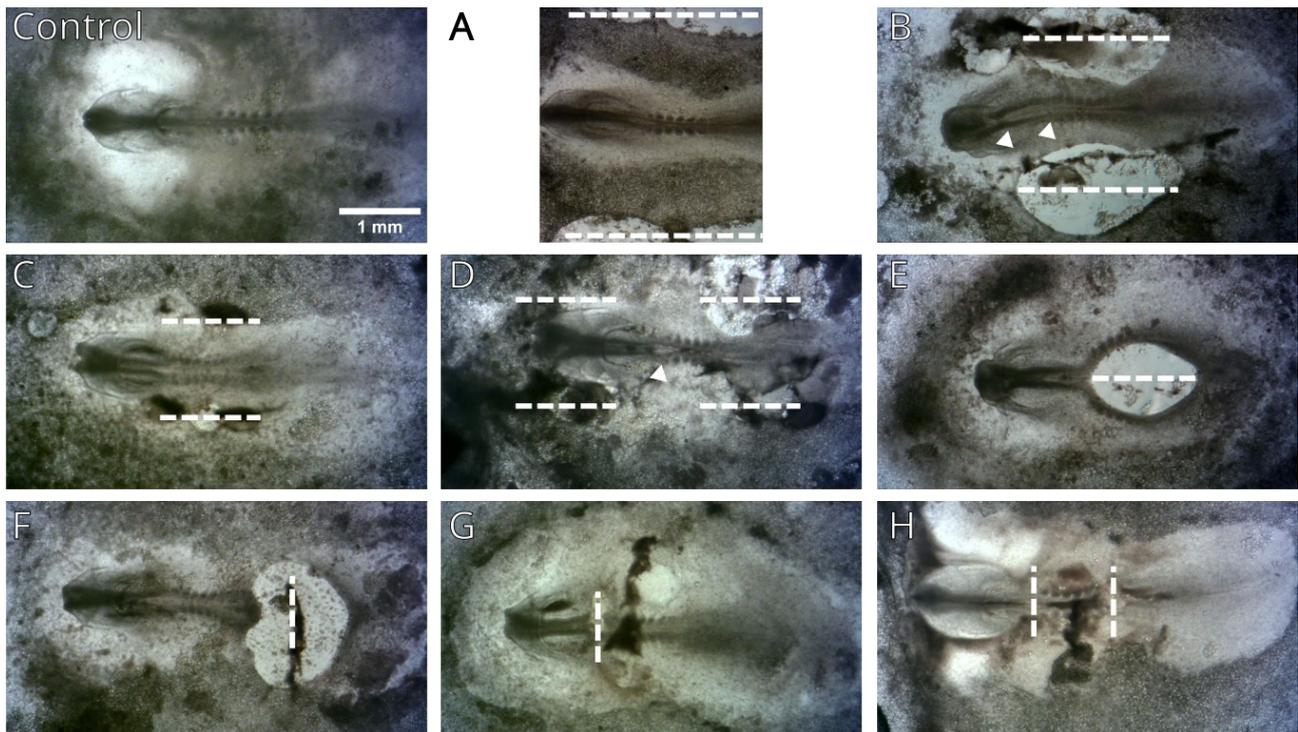


Figura 32: Distintas deformaciones y defectos en el cierre del tubo neural causados por cortes macroscópicos. Se realizaron cortes rectos de distinto tipo utilizando una aguja de microdissección de acero en embriones de pollo en etapas tempranas del cierre del tubo neural (HH7+-8) cultivados según el método EC, que luego fueron incubados por 3 h. Líneas punteadas: posición de los cortes originales, comparados con fotografías previas a la incubación. Puntas de flecha: región del tubo neural que permanece abierto en las condiciones B y D. Embriones fotografiados utilizando una cámara BRESSER MikrOkular Full HD a través de una lupa binocular Nikon SMZ800. Línea de escala: 1 mm.

Estos resultados son pocos en número y fueron obtenidos por una aproximación experimental inexacta (todos los cortes atravesaron todos los tejidos), pero sugieren la presencia de tensiones en el embrión entero, con diferencias en distintas direcciones y regiones, reflejadas en las diferentes deformaciones observadas. Ilustran entonces algunas de las complejidades del estado mecánico al que está sujeto el embrión en todo momento durante el desarrollo.

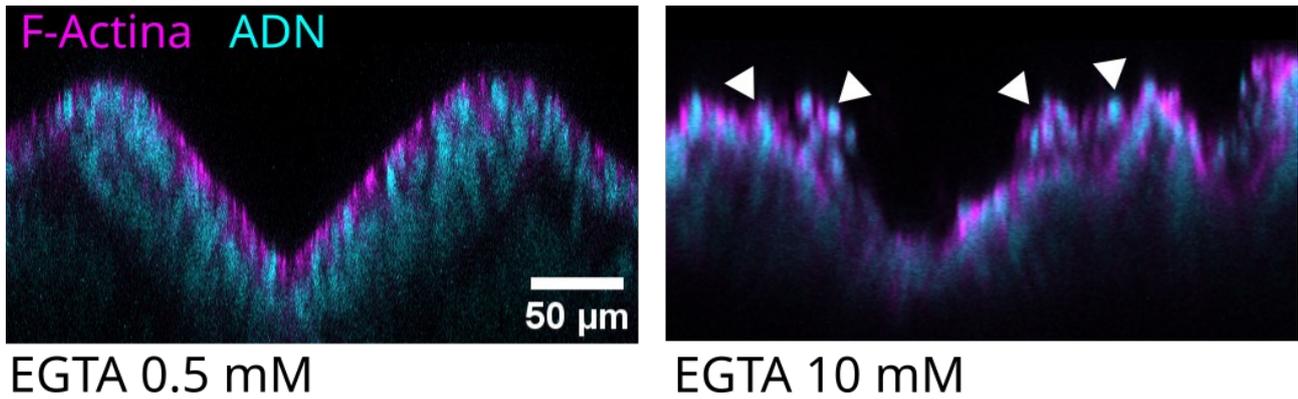
I.ii: Tratamiento con el agente quelante de calcio EGTA

Uno de los aportes más importantes al estado mecánico de un tejido viene dado por las uniones celulares que se establecen entre las distintas células del mismo, permitiendo acoplar los fuerzas y deformaciones que ocurren a nivel celular con aquellas a niveles más macroscópicos. Las cadherina, proteínas de adhesión dependientes del calcio, forman uno de los principales grupos de proteínas encargadas de esta tarea (Tepass et al., 2000). La placa neural, que expresa E-cadherina al inicio de la neurulación, pasa a expresar predominantemente N-cadherina, en un proceso que, en los embriones de pollo, coincide parcialmente con nuestro período de interés (Dady et al., 2012). Nos resultó

interesante entonces la posibilidad de alterar la función de las cadherinas, por tratarse de componentes subcelulares que sabemos que son importantes para la neurulación y que en parte determinan las condiciones mecánicas que causan (o previenen) la extrusión celular apical que observamos en la placa neural.

Para esto, similarmente a los experimentos con PMA y QVD, incubamos embriones de pollo (a partir de la etapa HH7⁺-8; cultivados por el método EC (Chapman et al., 2001)) durante 3 h con soluciones del quelante de calcio EGTA en diferentes concentraciones (0.5 mM, 2 mM y 10 mM; diluidas a partir de un stock de EGTA 1 M preparado en agua). La exposición a EGTA se realizó mediante su inclusión en el sustrato semi-sólido (del lado dorsal) y una gota de 20 µl de igual concentración del lado ventral del embrión. Luego los embriones fueron fijados (usando PFA al 4% en PBS), recortados, lavados 3 veces con PBS por 30 minutos (cada lavado) e incubados *overnight* en agitación suave a 4 °C en una solución conteniendo verde de metilo (dilución 1:8000, solución stock 2% en agua) y faloidina conjugada a rodamina (dilución 1:5000, solución stock de 2 mg/ml en metanol) en PBS. Posteriormente los embriones fueron lavados 5 veces en PBS por 30 minutos. Finalmente los embriones fueron montados *in toto* en glicerol (al 50% en PBS) en cámaras especialmente preparadas y fotografiados usando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 (objetivo 25x, inmersión en glicerol, NA = 0.8). Las imágenes luego fueron procesadas en FIJI (Schindelin et al., 2012).

No mostramos aquí todos los resultados de los distintos experimentos, pero en general se observó que los embriones tratados con concentraciones bajas (0.5 mM) de EGTA no mostraban diferencias con los embriones control en cuanto a su morfología general (Figura 33). Concentraciones más altas (10 mM) llevaron a diferentes defectos, notablemente a la pérdida de confluencia en el embrión (es decir, la ruptura del mismo) siempre originándose en la zona posterior del eje central, así como a la pérdida de muchas estructuras morfológicas reconocibles. Para destacar el cambio mecánico que estos embriones experimentaron con respecto a la condición control, basta señalar que en general fue necesario fijarlos en la misma placa de Petri donde fueron incubados debido a que resultó imposible levantarlos junto con el papel de filtro, algo posible en todas las otras condiciones experimentales que estudiamos. Estos embriones, fotografiados en un microscopio confocal, presentaron por lo general células sueltas cerca de los bordes restantes de los tejidos, pero solo en un caso pudimos observar células unidas o cercanas a la placa neural lejos de un borde del tejido, dando la apariencia de extrusión celular apical (Figura 33). Pensamos que puede tratarse de un caso en que el EGTA pudo haber tenido un efecto suave respecto a lo esperado para dicha concentración.



EGTA 0.5 mM **EGTA 10 mM**

Figura 33: Resultados del tratamiento con el quelante de iones Ca^{2+} EGTA a diferentes concentraciones. (Izq) Vista ortogonal de la placa neural de un embrión incubado con EGTA a 0.5 mM, mostrando una apariencia similar a la de los embriones control. (Der.) Vista ortogonal de la placa neural de un embrión incubado con EGTA a 10 mM, mostrando varias células por encima del resto de las células del tejido, indicando (puntas de flecha), indicando algún tipo de extrusión celular. F-actina marcada con faloidina conjugada a rodamina, ADN con verde de metilo. Las imágenes son proyecciones ortogonales obtenidas a partir de stacks ópticos a partir de embriones montados in toto, tomadas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 (objetivo 25x, inmersión en glicerol, NA = 0,8), y procesadas en FIJI.

Debido a problemas en el montaje, no pudimos observar aquellos embriones que fueron tratados con concentraciones intermedias (2 mM) en el microscopio confocal. Sin embargo, a gran escala las alteraciones morfológicas parecieron intermedias entre los casos antes mencionados, por lo que pensamos que se podrían haber observado más casos de aparente extrusión apical causada por la acción del EGTA.

Dejamos de lado estos experimentos preliminares cuando iniciamos los que se presentan en el texto principal, pero como perspectiva sería interesante estudiar si aquellos embriones que presentan extrusión apical bajo tratamiento con EGTA comparten otras características con aquellos tratados con PMA, como la morfología celular, pérdida de polaridad apico-basal, etc. Las similitudes o diferencias encontradas podrían ayudar en la determinación de los mecanismos que evitan la extrusión celular en la placa neural durante el desarrollo normal.

I.iii: Tinción con el marcador de membranas BODIPY FL C5-Ceramida

Es conveniente poder observar directamente la geometría de la membrana celular de las células de un tejido si uno desea investigar las propiedades mecánicas del mismo, por varios motivos. Uno de ellos es que los modelos mecánicos existentes (incluyendo el nuestro) incluyen a la membrana celular, por lo que estos datos ayudan a contrastar las predicciones del modelo con la realidad. Por otro lado, conocer la geometría de un plano de un epitelio nos permite, bajo ciertas hipótesis, calcular indirectamente las fuerzas actuando en el mismo mediante los distintos métodos de *Force Inference* (Chiou et al., 2012; Ishihara & Sugimura, 2012; Stein & Gordon, 1982). Estos métodos permiten obtener una medida relativa de las fuerzas, es decir que difiere en una constante con respecto al valor real. Para normalizar estos valores, por ejemplo, se suele asumir que las presiones

relativas (que difieren entre sí por una constante aditiva) tienen promedio 0, y que las tensiones relativas (que difieren entre sí por una constante multiplicativa) tienen promedio 1 (Kong et al., 2019). A pesar de esta limitante, estos métodos tienen la ventaja de permitir calcular propiedades mecánicas del tejido de manera no invasiva.

En muchos casos puede usarse la distribución de F-Actina para determinar la geometría de la membrana celular del lado apical (corte tangencial) de las células de un epitelio, pero en nuestro caso esto no sería posible, porque los experimentos con PMA alteran esta distribución y porque en nuestro modelo nos interesa la forma de las células en un corte transversal. Decidimos entonces probar el marcador fluorescente de membranas BODIPY FL C₅-ceramida (Invitrogen D3521), que además tiene la ventaja de poder ser utilizado *in vivo*, para teñir embriones cultivados según el método EC (Chapman et al., 2001), con el objetivo de usarlo en los experimentos con las drogas PMA y QVD descritos en el texto principal.

Al no tener un protocolo establecido para esta situación experimental, probamos realizar la tinción en diferentes condiciones. Se preparó una solución stock de BODIPY de 8 mM o 4.8 g/L en DMSO, a partir de la cual se prepararon las diluciones utilizadas en los experimentos (de 1:1000 a 1:10.000) en PBS, para las tinciones en embriones fijados, y en PBS Dulbecco (con iones de calcio y magnesio) para las tinciones en embriones vivos.

Para la tinción en embriones fijados, luego de la fijación (usando PFA al 4% en PBS) se realizaron 3 lavados de 30 minutos, en algunos casos solamente con PBS, y en otros usando PBS-T (adicionando el detergente Triton X100 en dilución 0.2%) en uno de ellos. Posteriormente, los embriones fueron recortados e incubados *overnight* en agitación suave a 4 °C en una solución conteniendo BODIPY, Verde de Metilo (dilución 1:8000, solución stock 2% en agua) y en algunos casos faloidina conjugada a rodamina (dilución 1:5000, solución stock de 2 mg/ml en metanol) en PBS. Entonces se llevaron a cabo 5 lavados de 30 minutos en PBS. Finalmente, los embriones fueron montados en glicerol al 50% en PBS, en una cámara realizada con cinta aisladora sobre un portaobjetos, sellando el espacio entre el portaobjetos y el cubreobjetos con esmalte de uñas incoloro. Para la tinción de embriones vivos se utilizó además de BODIPY el marcador nuclear Hoechst 33342 (dilución 1:500, solución stock de 1 mg/ml en agua), vertiendo la solución gentilmente en la placa de Petri hasta cubrir todo el embrión cultivado (aproximadamente 200 µl), e incubando por 10 minutos. El montaje fue similar en ambos casos.

Como puede apreciarse en la Figura 34, en general el marcado produjo una señal difusa, marcando tanto el borde celular como su citoplasma. Esto queda particularmente claro en aquellas imágenes en las que podemos comparar la señal de BODIPY con la distribución espacial de la F-actina, que en embriones control aproxima mucho mejor el borde celular (Figura 34A, C). La señal parece estar ausente en todo el cuerpo celular, salvo notablemente por aquellas zonas donde se encuentra el núcleo, resultado que se observa incluso para concentraciones bajas (Figura 34B). En aquellos embriones lavados con PBS-T se observó, además de la señal antes descrita, la presencia de marcas redondas de distinto tamaño (Figura 34C) que suponemos que pueden tratarse de membranas intracelulares, debido a que existen protocolos de marcado de membranas intracelulares

usando este marcador. En los embriones que fueron teñidos vivos el marcado no resultó mucho más claro, e incluso observamos pequeñas puntos de alta intensidad de señal (Figura 34D), cuyo origen también desconocemos.

Debido a la señal poco clara, evidentemente insuficiente para determinar las características geométricas que nos interesaban, decidimos no continuar utilizando esta tinción. Luego de realizar estos intentos, iniciamos con los experimentos del texto principal, en el que la forma celular se evidencia indirectamente mediante la distribución de F-actina.

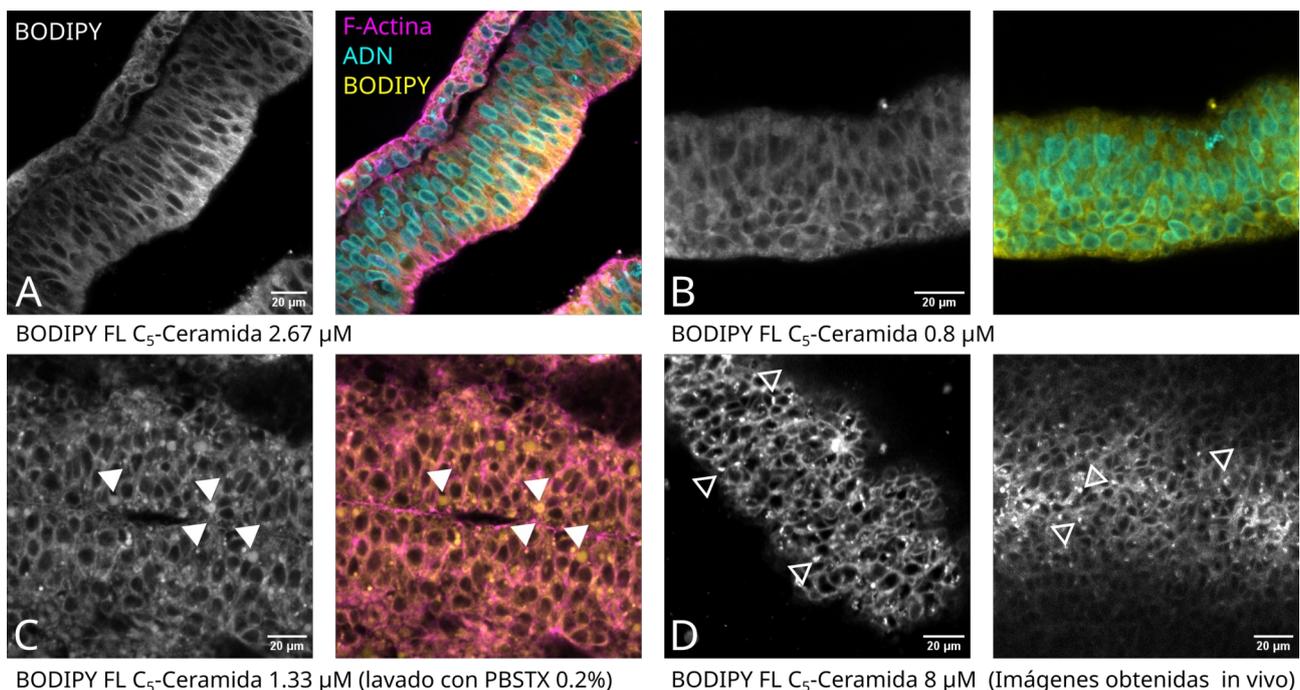


Figura 34: Distintos intentos de teñir la membrana plasmática de las células de la placa neural utilizando BODIPY FL C5-ceramida, un análogo fluorescente de las ceramidas. (A, B) La tinción en embriones fijados y lavados con PBS produjo, para distintas concentraciones, una señal difusa que ocupó de forma general todo el citoplasma no ocupado por los núcleos. (C) El uso del detergente Tritón X-100 (al 0.2 % en PBS) en uno de los lavados hizo que se marcaran múltiples cuerpos redondos de diferente tamaño (puntas de flecha) en casi todas las células. Podría tratarse de membranas intracelulares, pues existen protocolos que permiten marcarlas usando BODIPY FL C5-ceramida. (D) En las imágenes obtenidas en embriones vivos se observan pequeñas marcas no identificadas (puntas de flecha vacías). F-actina marcada con faloidina conjugada a rodamina, ADN con verde de metilo. Todas las imágenes consisten en cortes ópticos únicos obtenidos a partir de embriones montados in toto, tomadas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 (objetivo 25x, inmersión en glicerol, NA = 0,8), y procesadas en FIJI. Barra de escala: 20 μ m. Puntas de flecha rellenas: Cuerpos redondos marcados por BODIPY FL C5-ceramida, posiblemente correspondientes a membranas intracelulares. Puntas de flecha vacías: marcas pequeñas de diferentes formas, visibles en los embriones montados in vivo.

II: Análisis matemático del modelo básico

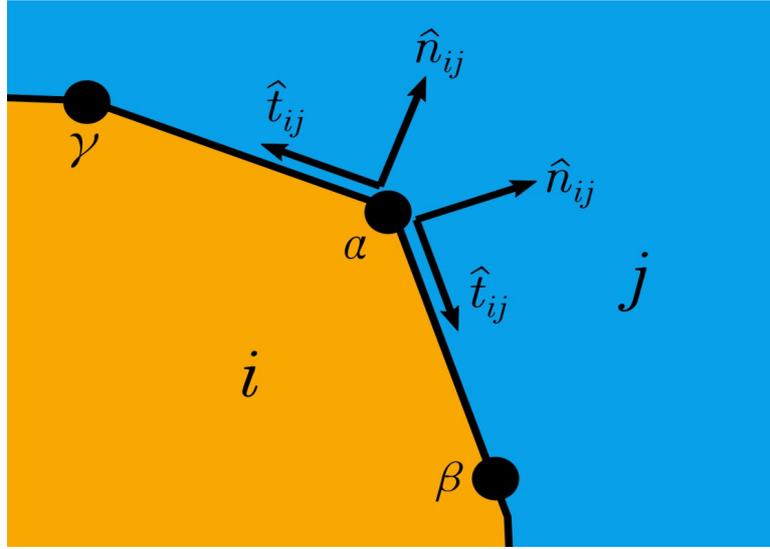


Figura 35: Diagrama ilustrando las direcciones locales definidas en el vértice α por las aristas que lo unen con sus vecinos γ y β : las normales salientes (respecto a i) \hat{n}_{ij} y las tangentes \hat{t}_{ij} , en la interfaz entre las células i y j .

En su versión más básica (Kim et al., 2021), sólo se toman en cuenta dos fuerzas que actúan sobre cada vértice: una tensión tangencial y una presión normal. Cada vértice tiene tantas direcciones tangentes y normales como vecinos, definidos por la arista que los une (Figura 35). Un vértice α perteneciente a las células i y j experimenta tensiones \vec{T}_{ij}^α de dirección tangencial y magnitud T_{ij} (que asumiremos función sólo de i y j), y presiones \vec{N}_{ij}^α de dirección normal, que siguen la fórmula

$$\vec{N}_{ij}^\alpha = (\Delta P_i - \Delta P_j) \frac{L_{ij}}{2} \hat{n}_{ij} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde ΔP_i y ΔP_j son las diferencias de presión osmótica a través de cada célula, L_{ij} el largo del contacto entre ambas células, y \hat{n}_{ij} la normal saliente respecto a i . Observamos que \vec{N}_{ij}^α es saliente si y solamente si $\Delta P_i > \Delta P_j$. En el caso de que el vértice pertenezca a 3 células i , j y k , cada arista corresponde a dos de ellas, y el cálculo es igual al anterior (es decir, considerando además \vec{T}_{ik}^α , \vec{T}_{jk}^α , \vec{N}_{ik}^α y \vec{N}_{jk}^α).

Combinando estas fuerzas, junto con la consideración usual de los VMs en cuanto al régimen viscoso se obtiene la expresión, para cada vértice de posición \vec{R}_α

$$\eta_R \frac{d\vec{R}_\alpha}{dt} = \sum_{i,j \in \mathcal{C}(\alpha)} \left(T_{ij} \hat{t}_{ij} + (\Delta P_i - \Delta P_j) \frac{L_{ij}}{2} \hat{n}_{ij} \right) \quad (\text{Ec. 2})$$

donde η_R es la viscosidad asociada al movimiento de los vértices y $\mathcal{C}(\alpha)$ el conjunto de células en las que participa α .

Pueden definirse las presiones de distintas maneras, y aunque es usual definirlas linealmente respecto al área en otros modelos (por ejemplo, el término de la forma $(A - A_0)^2$ en la energía de la ecuación 1 se corresponde a una fuerza que es lineal

respecto a A), en este caso asumimos una relación inversa, con lo que podemos expresar

$$\Delta P_i = \frac{K}{A_i} - P_0 \quad (\text{Ec. 3})$$

donde K expresa la compresibilidad de las células, A_i su área y P_0 la presión externa, que se asume constante. Usando esto, puede expresarse la ecuación 2 como

$$\eta_R \frac{d\vec{R}_\alpha}{dt} = \sum_{i,j \in \mathcal{C}(\alpha)} \left(T_{ij} \hat{t}_{ij} + K \left(\frac{1}{A_i} - \frac{1}{A_j} \right) \frac{L_{ij}}{2} \hat{n}_{ij} \right) \quad (\text{Ec. 4})$$

II.i: Estado de equilibrio del modelo básico

Estudiar este modelo, aunque sea más simple que el utilizado en las simulaciones, nos permite hacer ciertas afirmaciones sobre el comportamiento de la versión más compleja. Primero que nada, es conveniente obtener una versión adimensionalizada de la ecuación 4. Tomando T_0 (la "escala de tensión efectiva"), $L_0 = \sqrt{A_0} = \sqrt{K/P_0}$ y $\tau_R = \eta_R L_0 / T_0$, podemos definir $\vec{r}_\alpha = \vec{R}_\alpha / L_0$, $t_{ij} = T_{ij} / T_0$, $\vec{n}_{ij} = \vec{N}_{ij} / P_0 L_0$ y escribir

$$\dot{\vec{r}}_\alpha = \sum t_{ij} \hat{t}_{ij} + \left(\frac{1}{A_i} - \frac{1}{A_j} \right) \frac{L_{ij}}{2} \frac{P_0 L_0}{T_0} \hat{n}_{ij} \quad (\text{Ec. 5})$$

abusando la notación y obviando el uso tanto de A_i y A_j como de L_{ij} en su forma normalizada (dividiendo por L_0^2 y L_0 , respectivamente) por simplicidad.

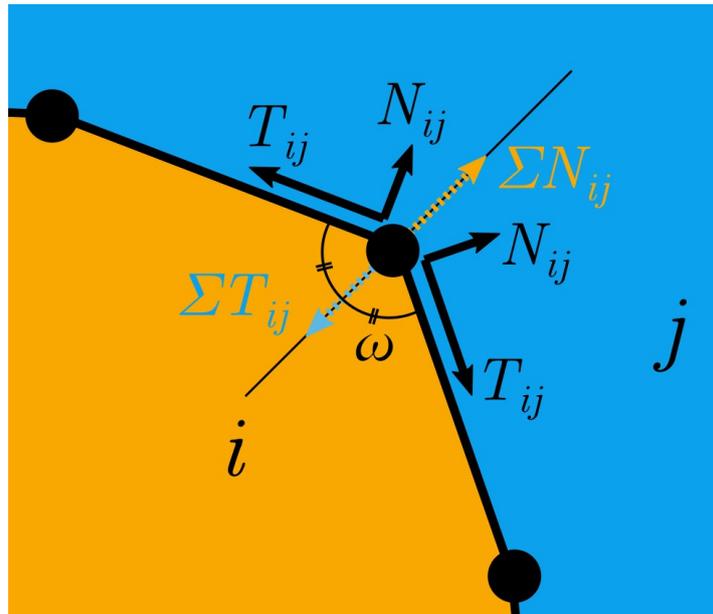


Figura 36: Diagrama ilustrando las fuerzas resultantes sobre un vértice en el equilibrio (ΣT_{ij} y ΣN_{ij}), que resultan ser colineales, y que bisecan el ángulo local de la interfaz entre las células i y j en dos ángulos de valor ω .

Estudiemos qué pasa con los vértices 2-fold en el equilibrio, asumiendo que este existe (Figura 36). Por tener solo dos aristas, podemos denominar al ángulo interior entre ellos como 2ω y establecer un eje de simetría bisecando el ángulo en dos de valor ω . Observamos que las magnitudes de las fuerzas dependen de las células de la interfaz y

no de la identidad del vértice. Por simetría, es claro que la sumatoria de las fuerzas normales será colineal con la suma de las tensiones, y tendremos que

$$2T_{ij}^{eq} \cos(\omega) = \left(\frac{1}{A_i^{eq}} - \frac{1}{A_j^{eq}} \right) L_{ij}^{eq} \frac{P_0 L_0}{T_0} \sin(\omega) \quad (\text{Ec. 6})$$

o, equivalentemente

$$T_{ij}^{eq} = \left(\frac{1}{A_i^{eq}} - \frac{1}{A_j^{eq}} \right) \frac{L_{ij}^{eq} P_0 L_0}{2 T_0} \tan(\omega) \quad (\text{Ec. 7})$$

Por lo que ω también resulta ser función solo de las células de la interfaz, y deducimos que **todos los vértices 2-fold que conforman la misma interfaz entre dos células presentarán el mismo ángulo de apertura. Si asumimos que la distancia entre vértices vecinos es aproximadamente constante, esto quiere decir que esta interfaz aproximará un arco de circunferencia**²⁴. En particular, una célula aislada en equilibrio (considerando al exterior como una célula de presión P_0 , es decir 1 al normalizar) aproximará una circunferencia.

Observamos que otras definiciones de las fuerzas producirían el mismo resultado siempre y cuando dependieran solo de cantidades propias de las células de la interfaz. Por lo tanto, ningún modelo de este estilo (incluyendo trivialmente los VM) puede reproducir una morfología compuesta por más que arcos de circunferencia, como es el caso de la morfología pseudoestratificada.

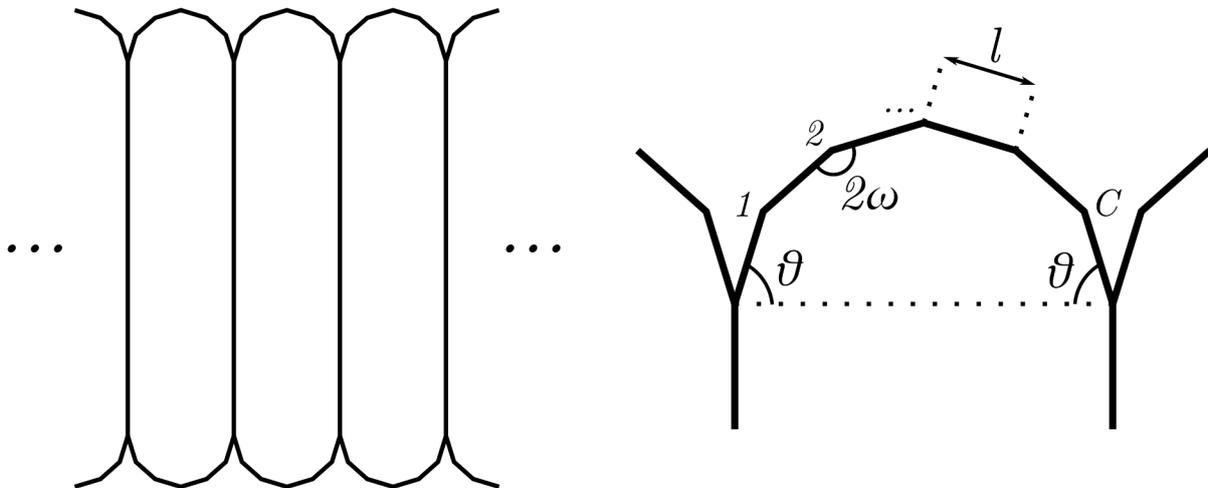


Figura 37: Estudio de la situación de equilibrio de la ecuación 5, representando una monocapa infinita compuesta por células idénticas. (Izquierda) Diagrama de una solución. (Derecha) Diagrama del borde apical de una célula, formado por C (en este caso 5) vértices 2-fold caracterizados por un ángulo ω y 2 vértices 3-fold caracterizados por el ángulo θ . Todos los vértices están separados de sus vecinos por una distancia l .

²⁴ A primera vista uno podría pensar que también se cumpliría la ecuación si dos vértices vecinos tuviesen ángulos menores apuntando en diferentes sentidos, pero esto se resuelve recordando que el ángulo menor es el que da al interior de la célula con mayor presión (menor área), que en este caso es igual para todos los vértices de la interfaz.

Estudiemos un tipo de equilibrio particular: el de una monocapa infinita formada por células idénticas. Tanto del lado apical como basal planteamos el medio externo como una célula de presión normalizada 1, y asignamos a cada célula una tensión propia de dicha interfaz, que anotamos con el subíndice ii . Esperamos que una monocapa de estas características esté compuesta por células columnares (dependiendo de la densidad local de células) con bordes rectos entre ellas y con una especie de “bóveda” apical y otra igual basal. Esta simetría parece garantizar la existencia de este equilibrio, y nuestro análisis permitirá determinarlo. Verdaderamente, son los resultados de muchas simulaciones los que motivan esta solución.

Primero caracterizaremos estas “bóvedas”/“tapas”. Ya sabemos que están descritas por un ángulo ω (por ser interfaz de 2-folds), al que se agrega un ángulo θ que determina sus puntos de apoyo (los vértices 3-fold). Asumiremos que hay C vértices 2-fold en cada una, y que todos los vértices están separados por una distancia l aproximadamente constante (Figura 37). Todas las células tienen área A y perímetro apical (basal) $L = (C + 1)l$.

Nuestra primera ecuación que caracteriza el estado de equilibrio es la ecuación 7 ya mencionada que, definiendo $T = T_{ij}$ y $\alpha = T_{ii}/T$, se convierte en

$$\alpha T = \left(\frac{1}{A} - 1 \right) \frac{L P_0 L_0}{2 T_0} \tan(\omega) \quad (\text{Ec. 8})$$

Podemos realizar un análisis similar en los puntos 3-fold: La suma de las tensiones apicales (T_{ii}) y laterales (T_{ij}) debe ser igual a la suma de las normales N_{ii} ($N_{ij} = 0$ con $i \neq j$ por simetría), con lo que

$$(2\sin(\theta)\alpha T - T) + \left(2\cos(\theta) \left(\frac{1}{A} - 1 \right) \frac{L P_0 L_0}{2 T_0} \right) = 0 \quad (\text{Ec. 9})$$

donde, sustituyendo con la ec. 7 obtenemos

$$2\alpha T \sin(\theta) - T + 2\cos(\theta) \frac{\alpha T}{\tan(\omega)} = 0 \quad (\text{Ec. 10})$$

o, despejando α

$$\alpha = \frac{\tan(\omega)}{2(\cos(\theta) + \tan(\omega)\sin(\theta))} \quad (\text{Ec. 11})$$

con α siendo un parámetro de nuestras simulaciones, de donde pueden determinarse los ángulos en el equilibrio. Esta segunda ecuación permite también determinar la relación α entre las tensiones de manera “experimental”, midiendo los ángulos en un resultado de simulación que se parezca a esta solución. Si $\alpha = 1$, tenemos

$$\tan(\omega) = \frac{2\cos(\theta)}{1 - 2\sin(\theta)} \quad (\text{Ec. 12})$$

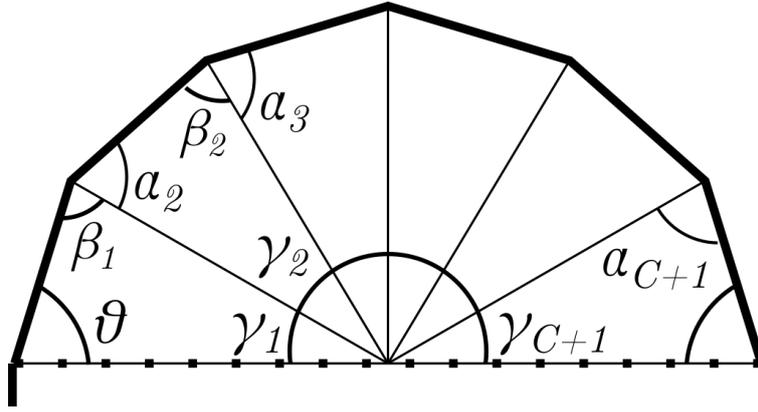


Figura 38: División de la parte apical de una célula en la situación de equilibrio en $C + 1$ triángulos. Los ángulos α_i , β_i y γ_i del i -ésimo triángulo se definen como en la figura.

Otra identidad sencilla de deducir es la siguiente (Figura 38): si se divide la tapa en $C + 1$ triángulos centrados en un punto sobre la base de la misma, vemos que la suma de los ángulos internos es $\sum_{i=1}^{C+1} \gamma_i = \pi$, que $\beta_i + \alpha_{i+1} = 2\omega$ y que los ángulos internos de cada triángulo deben sumar π , con lo que $\sum \gamma_i + 2\theta + \sum \alpha_i + \sum \beta_i = (C + 1)\pi$.

Uniendo estas ecuaciones se encuentra otra expresión que relaciona los ángulos entre sí

$$2\theta = C(\pi - 2\omega) \quad (\text{Ec. 13})$$

Un primer corolario de esta ecuación es que si C tiende a infinito, ω debe tender a $\pi/2$ para que θ tenga un valor finito. En ese caso la primera ecuación (ec. 8) deja de tener sentido, y la segunda (ec. 12) implica que, en el límite, θ tiende a $\pi/6$. Además, al pertenecer C a los números naturales, impone limitaciones estrictas a los valores que pueden tomar (aproximadamente) θ y ω . De las ecuaciones 12 y 13 se obtiene

$$C = \frac{2\theta}{\pi - 2 \tan^{-1} \left(\frac{2 \cos(\theta)}{1 - 2 \sin(\theta)} \right)} \in \mathbb{N} \quad (\text{Ec. 14})$$

El gráfico de la función $C(\theta)$ (Figura 39) nos muestra claramente que en el rango $\theta \in [0, \pi]$, todo $C > 1$ tiene solamente 2 preimágenes ($C = 1$ tiene 3), correspondientes con las distintas "ramas" de la función. Una rama tiene una asíntota en $\pi/6$ y la otra en $5\pi/6$. Como $C = 1$ se corresponde a $\pi/2$ en la rama central, observamos que todo $C > 1$ se corresponde a un $\theta > \pi/2$ en dicha rama, lo cual contradice nuestra definición. Por lo tanto, solo la rama en que $\theta \in (0, \pi/6)$ nos interesa, con lo que, gracias a la ecuación 12, existe una biyección entre θ y ω , que ya no pueden variar continuamente, si no que se ajustan a un conjunto numerable: las preimágenes de \mathbb{N} en la ecuación 14. Volviendo a la ec. 12 vemos que ω debe estar entonces entre $\tan^{-1}(2) \sim \pi/2.84$ y $\pi/2$.

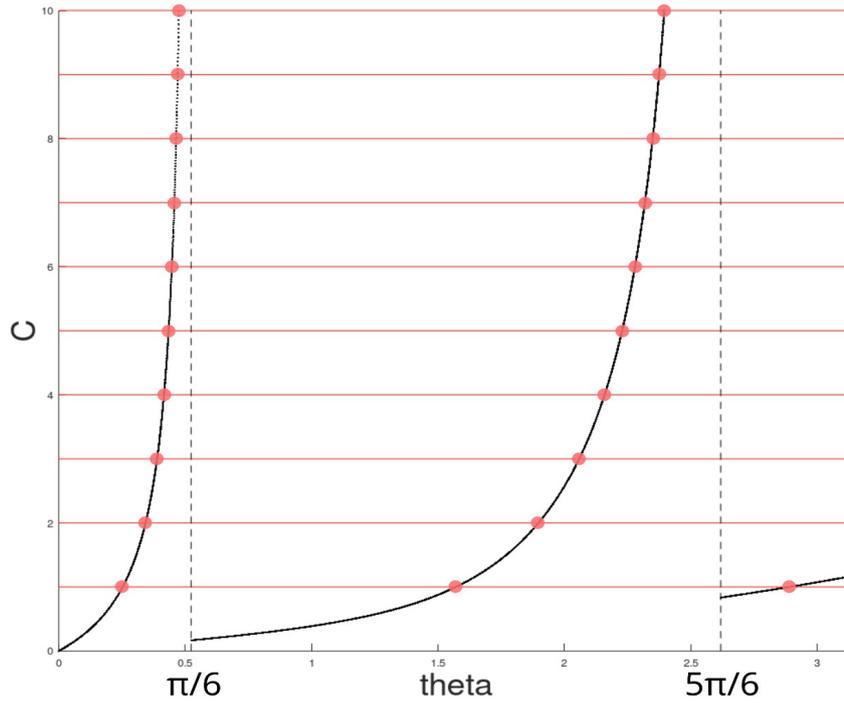


Figura 39: Gráfico de la función mostrada en la ecuación 14 en el rango $[0, \pi]$, relacionando θ con C . Las líneas verticales marcan las asíntotas ($\theta = \pi/6$ y $5\pi/6$) y las horizontales los valores posibles en \mathbb{N} . Los puntos marcan las posibles preimágenes de $C \in \mathbb{N}$.

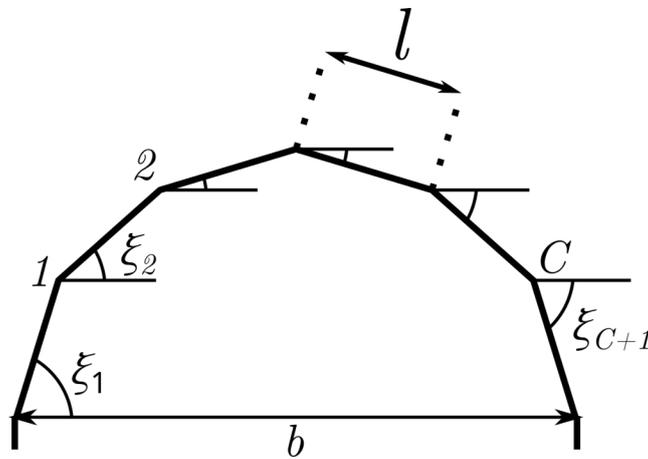


Figura 40: Diagrama ilustrando la definición de los ángulos ξ_i .

Para caracterizar más la geometría de la tapa, podemos derivar alguna relación geométrica entre los ángulos θ y ω y el largo l de las aristas. El ángulo ξ_i que cada una de estas aristas forma con la horizontal (Figura 40) puede expresarse con la relación

$$\xi_i = \theta + (i - 1)(2\omega - \pi) = (2(i - 1) - C)(\omega - \pi/2) = \theta \left(1 - \frac{2(i - 1)}{C} \right) \quad (\text{Ec. 15})$$

donde $i = 1, 2, \dots, C + 1$, $\xi_1 = \theta$, y las igualdades se lograron usando la ec. 13. Notar que puede calcularse la posición de un vértice sumándole el vector $l [\cos(\xi_i), \sin(\xi_i)]$ al vértice

inmediatamente a su izquierda. Sumando las contribuciones en el eje vertical de cada arista volvemos a la altura original, mientras que la suma de contribuciones horizontales nos da el ancho b de la célula. Estos ángulos caracterizan entonces las ecuaciones

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^{C+1} \sin(\xi_i) &= 0 \\ \sum_{i=1}^{C+1} \cos(\xi_i) &= b/l \end{aligned} \quad (\text{Ec. 16})$$

Observamos que b es una medida de la densidad celular, pues determina el número de células contenidas en un segmento de largo unidad, mientras que l es en la práctica un parámetro propio de la simulación, que restringimos a un rango apropiado para nuestro nivel de detalle deseado. Este análisis muestra que es relevante definir l relativo a b para poder determinar ciertas características de nuestro modelo. Aunque obtener una fórmula para l/b sea complicado, el cálculo numérico nos permite obtener una gráfica de esta función (Figura 41), revelando una función escalonada que localmente es aproximadamente constante. Cotejando con los datos hasta $C = 24$, se cumple que, para los promedios

$$\left. \frac{\bar{l}}{\bar{b}} \right|_C \approx \frac{1}{C+1} \quad (\text{Ec. 17})$$

y que para todo $C < 22$ (bastante por encima de lo que solemos incluir en las simulaciones), se cumple además que

$$\left. \frac{\bar{l}}{\bar{b}} \right|_C > \frac{1}{C+1} > \left. \frac{\bar{l}}{\bar{b}} \right|_{C+1} \quad (\text{Ec. 18})$$

con lo que $(C+1)^{-1}$ aproxima \bar{l}/\bar{b} adecuadamente por debajo.

C	θ_{max}	\bar{l}/b	$(C + 1)^{-1}$
0	0,253	1	1
1	0,3434	0,5164	0,5
2	0,3890	0,3468	0,333...
3	0,4164	0,2593	0,25
4	0,4345	0,2077	0,2
5	0,4474	0,1734	0,166...
6	0,4570	0,1487	0,142...
7	0,4645	0,1302	0,125
8	0,4705	0,1158	0,111...
9	0,4754	0,1043	0,1
10	0,4795	0,0958	0,090...

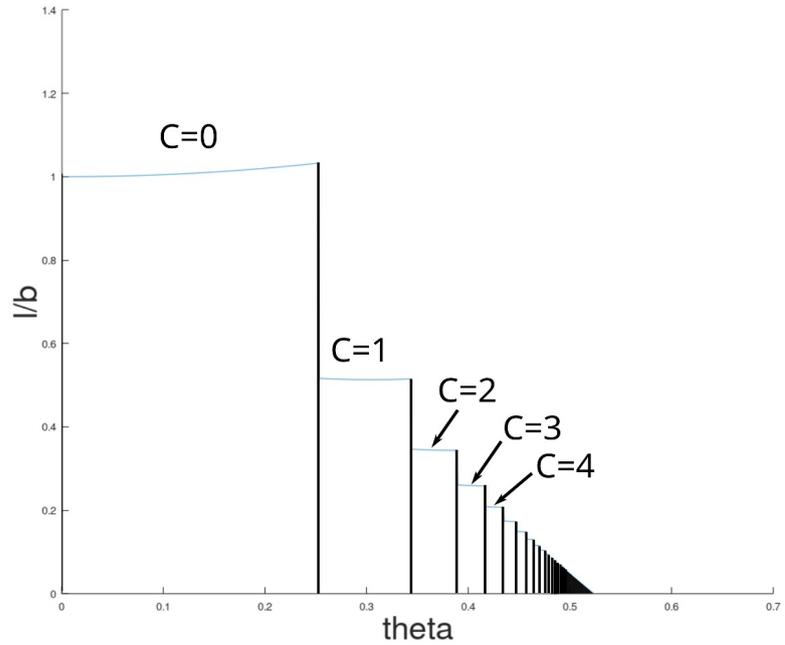


Figura 41: Relación entre l/b y θ , calculada numéricamente a partir de la ecuación 16. Se ve que la relación es escalonada y aproximadamente localmente constante, pudiendo ser aproximada por la relación $\bar{l}/b \approx (C + 1)^{-1}$. θ_{max} es el máximo valor de θ correspondiente a un cierto valor de C .

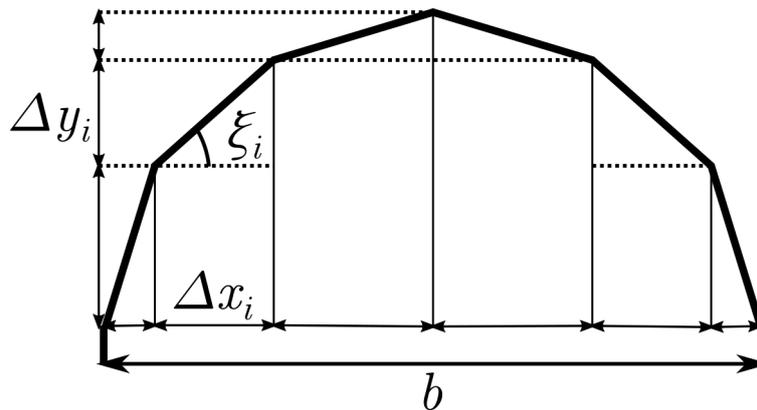


Figura 42: Diagrama ilustrando las contribuciones horizontales Δx_i y verticales Δy_i de cada arista en la tapa apical. Nótese que la suma de las contribuciones horizontales debe ser b , y la de las verticales (tomada con signo) debe ser 0 .

Conocer los ángulos ξ_i nos permite obtener una fórmula para el área total de la célula, sabiendo que es de la forma $A = bh + 2A_{ab}$, siendo h el largo de las interfaces laterales y A_{ab} el área de cada tapa apical/basal. Una fórmula para A_{ab} se puede derivar considerando las contribuciones horizontales y verticales correspondientes a cada arista (Figura 42). Sea A_i el área que está entre el eje x y el segmento de recta que une el vértice i y el $i + 1$, así como su área simétrica del otro lado de la tapa. A_i está compuesto por 2 triángulos de base Δx_i y altura Δy_i , y 2 rectángulos de base Δx_i y altura $\sum_{j=1}^{i-1} \Delta y_j$ ²⁵, es decir

²⁵ Asumiendo la suma sin sentido $\sum_{j=1}^0$ como 0, por ejemplo.

$$A_i = \Delta x_i (\Delta y_i + 2 \sum_{j=1}^{i-1} \Delta y_j) \quad (\text{Ec. 19})$$

Si C es impar, esto es suficiente para calcular el área. Si C es par, falta un rectángulo central sin complemento simétrico. Siendo $N = \left\lfloor \frac{C+1}{2} \right\rfloor = C/2$ (donde $\lfloor x \rfloor$ denota la función *floor*, es decir el entero inmediatamente menor a x), tenemos

$$A_{N+1} = \Delta x_{N+1} \sum_1^N \Delta y_j = \Delta x_{N+1} \sum_1^{N+1} \Delta y_j \quad (\text{Ec. 20})$$

usando que en este caso $\Delta y_{N+1} = 0$. Tenemos entonces²⁶

$$A_{ab} = \sum_{i=1}^N \Delta x_i \left(\Delta y_i + 2 \sum_{j=1}^{i-1} \Delta y_j \right) + \text{mod}_2(C+1) \Delta x_{N+1} \sum_{j=1}^{N+1} \Delta y_j \quad (\text{Ec. 21})$$

o, usando los ξ_i antes definidos

$$\begin{aligned} \frac{A_{ab}}{l^2} = \sum_{i=1}^N \left(2 \cos(\xi_i) \sum_{j=1}^{i-1} \sin(\xi_j) + \frac{1}{2} \sin(2\xi_i) \right) \\ + \text{mod}_2(C+1) \cos(\xi_N) \sum_{j=1}^N \sin(\xi_j) \end{aligned} \quad (\text{Ec. 22})$$

También puede obtenerse una fórmula para el área (total) usando la ec. 8, obteniéndose

$$A = \frac{L \tan(\omega)}{2 \frac{\alpha T_0}{P_0 L_0} T + L \tan(\omega)} \quad (\text{Ec. 23})$$

en el que $\alpha T_0 / P_0 L_0$ se comporta como un solo parámetro. Asumiendo $T = 1$ (es decir, que la tensión sin normalizar es igual a T_0), puede verse esta relación numéricamente para distintos valores del mismo, calculando $L = (C+1)l$, ω en función de θ (ec. 12, asumiendo $\alpha = 1$), l a partir de la ec. 16 y $C = \left\lfloor \frac{2\theta}{\pi - 2\omega} \right\rfloor$ (Figura 43; observamos que la función presenta discontinuidades, seguramente por la función *floor* involucrada en el cálculo). Quizás sea posible ajustar esta curva aparente a una fórmula más fácil de aplicar, lo cuál ayudaría a aproximar la expresión de la ec. 22.

²⁶ Notar que el último término aparece si y solo si $C+1$ es impar, o sea, si C es par.

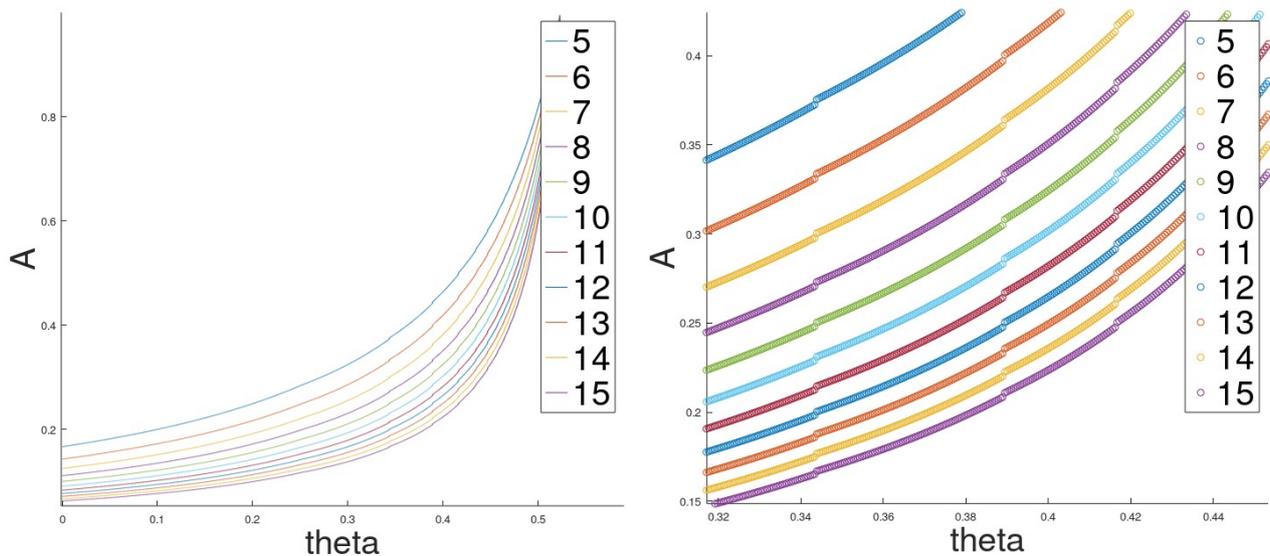


Figura 43: Relación entre A , el valor del área celular total en equilibrio y θ , el ángulo con la horizontal de la base de la interfaz apical/basal, calculada numéricamente para distintos valores del parámetro $\alpha T_0/P_0 L_0$ (indicados en el cuadro). (Derecha) Vista en mayor detalle de una región del gráfico, donde se aprecia la discontinuidad de la función.

Con estas ecuaciones y unas pocas consideraciones más, ya podemos determinar el estado de equilibrio. Primero, elijamos un valor de b , es decir, una cierta densidad celular, y C , el número de puntos (de “resolución espacial”) en el lado apical. De C puede determinarse el valor de θ , pues su relación es biyectiva (según el análisis de la ec. 14, en la práctica se trata de una aproximación numérica). Conociendo θ podemos despejar ω (ec. 11 y 12), y así los ξ_i y el valor de l , conociendo b (Ec. 16). De ahí pueden calcularse A_{ab} (Ec. 22) y A (Ec. 23) y despejar h sabiendo que $A - A_{ab} = bh$, lo que determina totalmente el estado de equilibrio.

Por supuesto, en la práctica estas determinaciones serán aproximadas y, en efecto, al simular se determina un rango para l en vez de elegir un valor exacto para C . Sin embargo, el uso de este análisis permite restringir los valores de l a un rango reducido de C posibles (usando los datos en la Figura 41 o la ec. 17), lo cual en la práctica facilita la obtención de resultados consistentes.

Nótese que la elección de b es totalmente arbitraria, con lo que **existe un estado de equilibrio para cualquier densidad celular que uno elija**. Esto no quita que en la práctica pueden ocurrir dificultades (al igual que con la elección de l) en la *integración numérica*. Por haber utilizado el método de Euler, las simulaciones del presente trabajo no pueden explorar todas las posibilidades planteadas por este análisis, pero en principio uno no esperaría extrusiones espontáneas para ningún valor de b ni l en este modelo.

II.ii: Contrastación entre predicciones teóricas y un experimento *in silico*

Como comprobación del análisis (o viceversa, de la programación), vale la pena comparar los valores esperados con aquellos medidos en los resultados de un experimento *in silico* (Figura 44). Para la simulación se inició con un sistema compuesto por 20 células rectangulares en una condición de borde periódico de período 10. Por lo tanto, esperamos que tengan un ancho $b = 10/20 = 0.5$. Se tomaron como parámetros $\alpha = 1$, y $L_0 = 10 \cdot T_0/P_0$

$L_0 = 10 \cdot T_0/P_0$. Al implementar estas simulaciones es conveniente ser flexibles con el valor de l , por lo que se determinó que pudiera estar entre $b/4$ y $b/8^{27}$, lo cual se corresponde aproximadamente a un rango de C entre 3 y 7 (Ec. 17), dando por tanto un valor medio de $C = 5$, valor que se observó en todas las células de la simulación. Usamos por lo tanto ese número para nuestras predicciones teóricas. En general, las predicciones (calculadas según la secuencia antes descrita, a partir de b y C) están de acuerdo con las medidas obtenidas de este experimento (Tabla 4). La cercanía entre las predicciones y las mediciones nos lleva a creer que nuestros resultados computacionales reflejan fielmente las propiedades matemáticas del modelo, dando validez a los resultados *in silico* presentados en este trabajo.

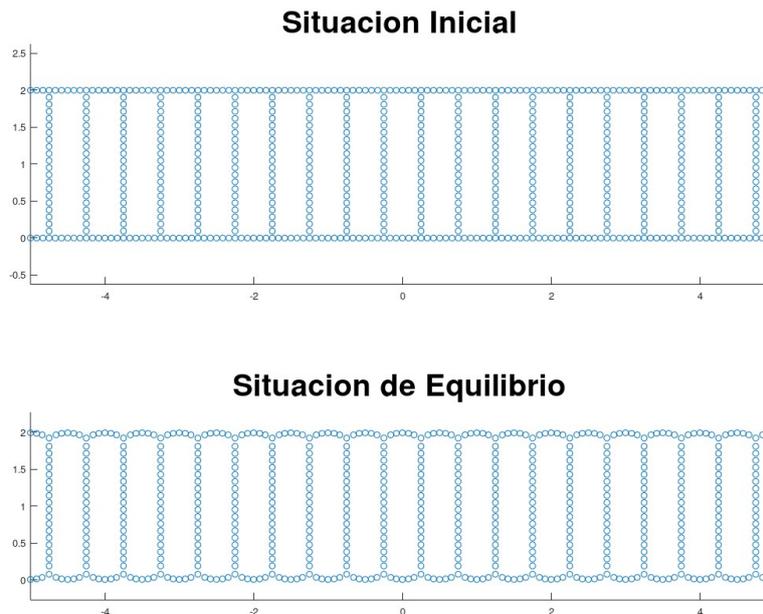


Figura 44: Experimento in silico del modelo de la Ec. 5. Partiendo de una monocapa formada por células rectangulares se obtiene un sistema estable en el tiempo con las características descritas en el análisis.

²⁷ Esto conlleva, por supuesto, un mayor rango de error esperable con respecto a las predicciones, tanto en el cálculo de l como en todos los otros que lo involucren (en este caso A_{ab} y h).

Tabla 4: Comparación entre las predicciones teóricas del equilibrio, según el texto, y las mediciones obtenidas en un experimento in silico con 20 células. Los valores promedio y de desvío estándar de b , C , A_{ab} , A , h y L se calcularon sobre las 20 células del tejido, mientras que los de θ , ω y l se calcularon sobre los vértices y aristas apropiados.

	Valor teórico	Valor promedio	Desvío Estándar
b	0.5	0.5	1.9162e-15
C	5	5	0
θ	0.4345178	0.4345178	3.7280e-15
ω	1.4838927	1.4838928	2.0479e-15
l	0.0871230	0,0840762	8.1603e-03
A_{ab}	0.0218849	0.0229281	7.2507e-16
A	0.9678710	0.9678710	4.1975e-15
h	1.8919721	1.8440296	3.0343e-15
L	0.5227379	0.5249075	3.8434e-15

III: Detalles de la implementación computacional del modelo

III.i: Estructura general de la implementación

En nuestra implementación, el estado de un sistema con V vértices y N_C células en un momento dado está compuesto por varios elementos, que por lo general almacenamos al final de una simulación para preservar sus datos y poder representarlos gráficamente.

- (1) Un arreglo de celdas (*cell array*, esencialmente una lista) de N_C elementos, que en cada entrada contiene un vector que define a la célula correspondiente, llamado “cells”. Si la célula c está compuesta los N vértices c_1, c_2, \dots, c_N formando una curva simple en ese orden, entonces

$$\text{cells}\{c\} = [c_1, c_2, \dots, c_N, c_1] \quad (\text{Ec. 24})$$

- (2) Una matriz “vertices” de tamaño $V \times 2$ cuya α -ésima fila se corresponde a \vec{r}_α , el vector posición del vértice α , permitiendo obtener la posición de un vector según su número en la lista, y viceversa.
- (3) Una matriz *nuclei* de tamaño $N_C \times 5$ que contiene toda la información referida a las variables nucleares. Cada fila se corresponde a un núcleo, correspondiéndole a la c -ésima célula

$$\text{nuclei}(c, :) = [x_c, y_c, a_c, b_c, \text{theta}_c] \quad (\text{Ec. 25})$$

siendo $[x_c, y_c] = \vec{r}_{N,c}$, el vector posición del núcleo c -ésimo, a_c y b_c el largo del eje mayor y menor de la elipse del núcleo, respectivamente, y theta_c el ángulo θ_c del núcleo respecto a los ejes cartesianos .

- (4) Un vector bidimensional $\lambda = [\lambda_x, \lambda_y]$ que determina las condiciones periódicas de borde de la simulación. En todas las simulaciones aquí presentadas $\lambda_x = 10$ y $\lambda_y = 0$ (equivalente a quitar las condiciones de borde en ese eje).
- (5) Dos vectores, *apical* y *basal*, que contienen una lista de aquellos vértices pertenecientes al lado apical y basal, respectivamente. Aún en casos en los que no se aplique la fuerza compensatoria $\vec{\Gamma}_i$ esta lista es importante pues permite definir correctamente los perímetros apicales y basales a la hora de calcular el largo de las interfaces para obtener las fuerzas normales.
- (6) Ocasionalmente se agrega también una matriz *original_pos* de tamaño $C \times 2$ que representa las posiciones \vec{o}_i a las que tenderá a llevar a los núcleos la fuerza restauradora \vec{G}_i .

Para realizar una simulación se inicializan los parámetros del sistema, se determina el estado inicial del sistema (definido manualmente o partir de un archivo) y se ejecuta el script *EulerFoam_L.m*, que se encarga de llamar a los scripts apropiados para agregar o combinar vértices (*finer_mesh.m* y *coarser_mesh.m*) o chequear la estabilidad de los vértices cuádruples (*T1_mesh.m*) y de realizar la integración numérica (por el método de Euler, de ahí el nombre del script), calculando las fuerzas necesarias paso a paso, y realizando respaldos del sistema cada un tiempo determinado. El producto final de este proceso es un conjunto de arreglos de celdas con nombres referentes a las variables (p. ej.: *cells_in_time*, *vertices_in_time*, etc.) tal que la entrada t se corresponda con el estado de esa variable en el t -ésimo paso de integración. Estas variables contienen entonces toda la trayectoria del sistema en el tiempo, y pueden ser graficadas (como en

las distintas figuras de este trabajo) utilizando un pequeño script `c_plot.m` que ofrece varias opciones de visualización.

III.ii: Cálculo de la normal saliente en general

Como muchos otros modelos que representan los bordes celulares mediante curvas poligonales e incluyen ecuaciones de fuerza, nuestro modelo incluye fuerzas que apuntan en dirección normal al borde celular. Calcular las fuerzas en un punto de la membrana (en nuestro caso, en los vértices de la curva poligonal) requiere entonces determinar explícitamente un vector normal “saliente” con respecto al interior de una célula dada. Esto puede parecer sencillo conceptualmente, pero en algunas situaciones lleva a dificultades importantes a la hora de realizar la implementación computacional del modelo.

Primero que nada, en general es fácil determinar las direcciones tangentes en un vértice. Si nos interesa el vértice \vec{v}_α , la tangente que lo une con un vecino \vec{v}_β se obtiene inmediatamente de la forma

$$\hat{t}_{\alpha\beta} = \frac{\vec{v}_\beta - \vec{v}_\alpha}{\|\vec{v}_\beta - \vec{v}_\alpha\|} \quad (\text{Ec. 26})$$

La dirección normal asociada es fácil de determinar porque forma un ángulo recto con la tangente, por lo que si $\hat{t}_{\alpha\beta} = (t_1, t_2)$, hay dos opciones para la normal

$$\hat{n}_{\alpha\beta} = \pm(t_2, -t_1) \quad (\text{Ec. 27})$$

Pero ¿cómo determinar ese signo? Si la célula es convexa, la solución obvia (y de poco costo computacional) es calcular el centro geométrico \vec{o} de la célula promediando la posición de los vértices que determinan su borde y, sabiendo que $\vec{v}_\alpha - \vec{o}$ apuntará *desde el centro hacia afuera* (Figura 45a), simplemente definir la saliente con respecto a esa célula como el sentido que coincida más con $\vec{v}_\alpha - \vec{o}$. Es decir,

$$\hat{n}_{\alpha\beta} = sg((t_2, -t_1) \cdot (\vec{v}_\alpha - \vec{o})) (t_2, -t_1) \quad (\text{Ec. 28})$$

donde “ \cdot ” denota el producto escalar y $sg()$ el signo.

Esta *definición global* no funciona en un par de situaciones: Si la célula no es convexa o si las células no son continuas. La primera situación es probable (aunque no necesariamente problemática) en nuestro modelo, porque cada interfaz curva entre dos células significa que una de ellas no es convexa (Figura 45b), mientras que la segunda es particularmente relevante para nuestras simulaciones, pues utilizamos condiciones periódicas de borde, y simplemente calcular el promedio de las posiciones de los vértices que definen una célula puede tener resultados absurdos(Figura 45c).

Para esta última situación se plantean dos posibilidades. Una consiste en encontrar, para cada vértice, un equivalente (una imagen) de cada vértice de su célula tal que formen una poligonal conexa, y de ahí realizar el mismo cálculo que antes. Este método conlleva una cantidad enorme de cálculo para las células del borde y es extremadamente redundante en general. Otra opción más sencilla consiste en calcular la imagen del centro solo para *un* vértice en particular y de ahí encontrar para cada vértice la imagen correspondiente de ese centro geométrico, en vez de una imagen de la célula entera.

Ambos métodos son esencialmente cálculos globales que seguramente puedan efectivamente ser usados sin mayores dificultades. Sin embargo, es interesante plantearse un problema matemático más general que resuelve ambos problemas: ¿Puede obtenerse la normal mediante algún cálculo local que permita ignorar cualquier suposición sobre la forma de la curva poligonal? Esta pregunta motiva el siguiente método.

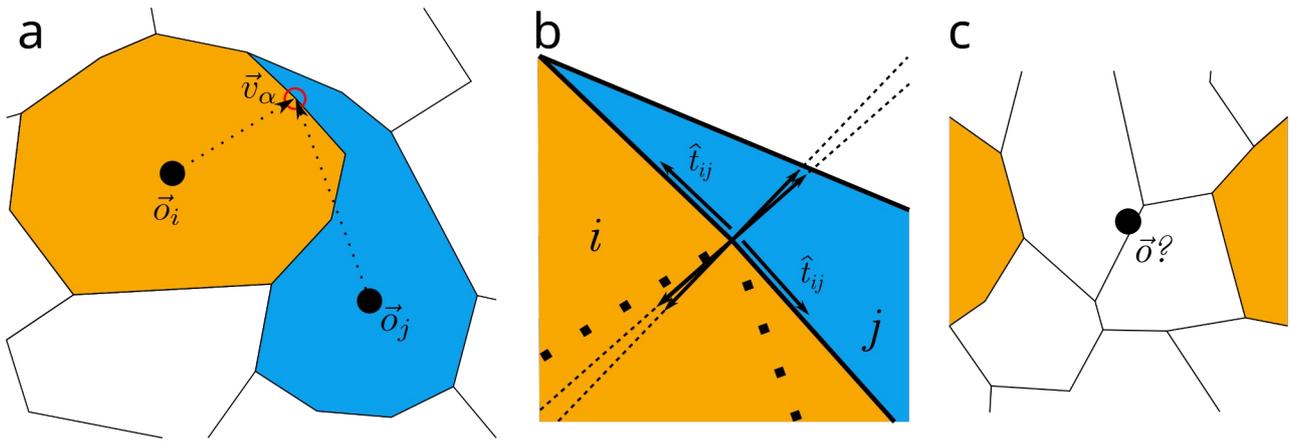


Figura 45: Determinación global de la normal saliente. (a) Diagrama mostrando un vértice \vec{v}_α (círculo rojo) entre dos células, una de las cuales es convexa. Se marcan los centros geométricos aproximados de las células, así como el vector $\vec{v}_\alpha - \vec{o}$ para cada célula (vector punteado). (b) A mayor aumento se aprecian las direcciones normales, así como las posibles elecciones de normal saliente. Es claro que $\vec{v}_\alpha - \vec{o}_i$ es siempre saliente, como se ve en este caso, por lo que elegiríamos la normal saliente como la que se le asemeja en sentido. No puede afirmarse lo mismo en el caso de j , pues no es convexa. (c) Al haber condiciones periódicas de borde, puede ocurrir que el centro geométrico, calculado simplemente como el promedio de las posiciones asignadas a cada vértice de la célula, no tenga sentido a la hora de determinar las normales salientes.

Aclaremos primero que la respuesta es negativa en el caso de un vértice 2-fold. Si el mismo está alineado con sus dos vecinos, la situación (relevante para nuestras simulaciones) es totalmente simétrica y es claro que cualquier determinación de una normal saliente sería igual de válida en sentido contrario. Nuestro método involucrará determinar las normales en los puntos 3-fold²⁸ (o de mayor multiplicidad, llegado al caso) y, usando la constancia de la normal a lo largo de cada arista, *propagar* el sentido saliente al resto de los vértices.

El problema se reduce entonces a la determinación de las normales salientes en los vértices 3-fold. En nuestra implementación, cada célula está definida por la lista de vértices que la delimitan, por lo que es fácil determinar la interfaz a la que pertenece cada arista saliente de un vértice \vec{v}_α particular: si éste pertenece a las células i, j, k, \dots , entonces su vecino \vec{v}_β debe pertenecer, entre otras (y sin pérdida de generalidad) a i y j . Por lo tanto podemos asignarle a cada tangente no solo los vértices que une ($\hat{t}_{\alpha\beta}$), si no también la interfaz a la que pertenece (\hat{t}_{ij}). v_α tiene asignados entonces un conjunto de tangentes $\{\hat{t}_{ij}, \hat{t}_{ik}, \hat{t}_{jk}, \dots\}$ con sus respectivas interfaces. Supongamos que este mismo conjunto está ordenado según su ángulo con respecto a un eje (p. ej.: en coordenadas polares, con ángulos entre 0 y 2π o entre $-\pi$ y π), obteniendo $\{\hat{t}_1, \hat{t}_2, \hat{t}_3, \dots\}$ tal que \hat{t}_j esté en sentido antihorario con respecto a \hat{t}_i si $j > i$ (Figura 46a).

Tomemos \hat{t}_1 y \hat{t}_2 . Ambos pertenecen a la interfaz de una misma célula A y cada uno a otra célula²⁹. Podemos llamar B al resto del plano que no es A , que incluye a estas otras

28 Si no hay puntos 3-fold entonces otro método es necesario. El caso de células aisladas entre sí es una de las pocas situaciones en que esto sería relevante.

29 Por ser 3-fold, es fácil ver que salvo situaciones con poco sentido biológico, no pueden ambas pertenecer a las mismas 2 células. La única excepción es que ambos estén en la interfaz entre A y el espacio extracelular. Esto no tiene por qué ser un problema si se sabe distinguir este espacio de una célula normal. Por ejemplo, en nuestra implementación las interfaces de este estilo se caracterizan por ser "entre A y A ", por lo que no hay ambigüedad en cuanto a la identidad de A .

células (Figura 46b). Nos interesa determinar qué normales \hat{n}_1 y \hat{n}_2 son salientes de A . Esto debe quedar registrado de algún modo, en nuestro caso asumimos que si $\hat{t}_1 = \hat{t}_{Aj}$, \hat{n}_1 será saliente con respecto a A . Si cambia el orden de los subíndices, basta cambiar el sentido de la normal. Si los subíndices son iguales (es decir, si se trata de una interfaz con el medio externo, con lo que A no representa a ninguna célula), buscamos las normales entrantes, que serán salientes para las células involucradas.

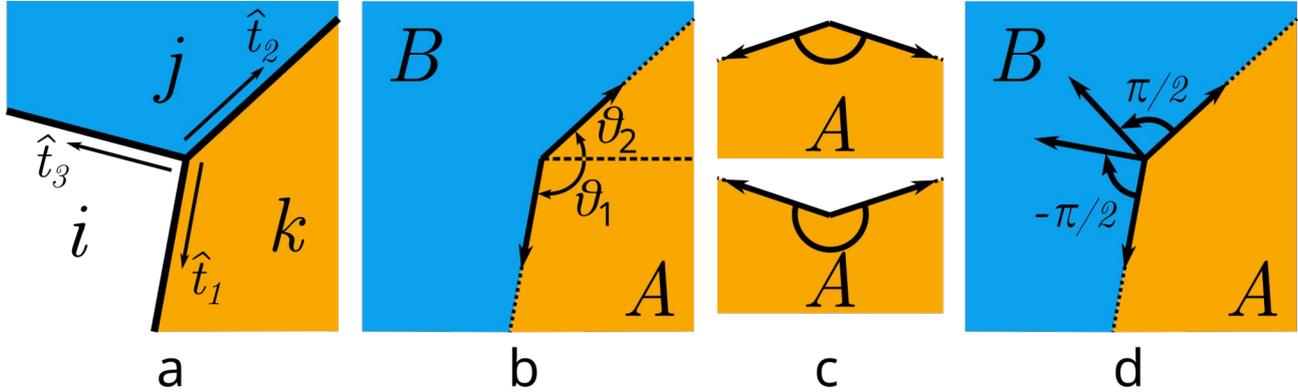


Figura 46: Diagramas ilustrando el método para encontrar normales salientes. (a) Células i , j y k y tangentes $\hat{t}_{ki} = \hat{t}_1$, $\hat{t}_{kj} = \hat{t}_2$ y $\hat{t}_{ji} = \hat{t}_3$, numeradas en sentido horario. (b) Definimos A como la célula que yace entre \hat{t}_1 y \hat{t}_2 . El ángulo interno que forman estos vectores puede obtenerse restando θ_1 (negativo en este caso) a θ_2 . (c) El valor del ángulo interno con respecto a π determina si la suma de las tangentes será saliente o entrante. (d) Determinadas ambas normales salientes respecto a A (\hat{n}_{ki} y \hat{n}_{kj}), es claro que si una equivale a una rotación positiva de la tangente correspondiente, la otra debe equivaler a una rotación negativa.

Para determinar las normales salientes hacemos la siguiente afirmación: **que la suma de las tangentes $\hat{t}_1 + \hat{t}_2$ será entrante si las tangentes forman un ángulo interno (respecto a A) menor a π , y saliente si forman uno mayor a π** (Figura 46c). Si el ángulo es exactamente π , observamos que, como \hat{t}_2 está en sentido antihorario respecto a \hat{t}_1 , la normal saliente debe ser antihoraria con respecto a \hat{t}_2 (de lo contrario estaría “entre \hat{t}_1 y \hat{t}_2 ”, es decir, apuntando hacia A). Calcular el ángulo interno es fácil: Contando el ángulo en sentido anti-horario (como es usual), basta restarle el ángulo de \hat{t}_2 al de \hat{t}_1 pues sabemos que \hat{t}_2 está en sentido antihorario respecto a \hat{t}_1 . **Tenemos entonces un vector que sabemos es saliente (o entrante) con respecto a A , y que podemos comparar con nuestras posibles normales**, de la misma manera que comparamos con $\vec{v}_\alpha - \vec{o}$ en el otro método.

Aunque pueda parecer que hay 4 elecciones para las normales (2 sentidos para cada una), en realidad es fácil ver que si \hat{n}_1 es una rotación de ángulo $\pi/2$ de \hat{t}_1 en un sentido, \hat{n}_2 debe ser una rotación de \hat{t}_2 en el sentido contrario, ya que $\hat{t}_1 + \hat{t}_2$ apuntará en una dirección intermedia entre ambos (Figura 46d). Por lo tanto, determinar el sentido de ambas normales es equivalente a determinar el de una sola, o de la suma de ambas (asumiendo lo antes dicho). Si $\hat{t}_1 = [t_1^1, t_1^2]$ y $\hat{t}_2 = [t_2^1, t_2^2]$, y sus ángulos son θ_1 y θ_2 , podemos escribir

$$\begin{aligned}\hat{n}_1 &= sg(\pi - (\theta_2 - \theta_1))sg([t_1^2 - t_2^2, t_2^1 - t_1^1] \cdot (\hat{t}_1 + \hat{t}_2))[-t_1^1, t_1^2] \\ \hat{n}_2 &= sg(\pi - (\theta_2 - \theta_1))sg([t_1^2 - t_2^2, t_2^1 - t_1^1] \cdot (\hat{t}_1 + \hat{t}_2))[t_2^2, -t_2^1]\end{aligned}\quad (\text{Ec. 29})$$

o, usando solo una de las normales, y observando que $(t_i^2, -t_i^1) \cdot \hat{t}_i = 0$

$$\begin{aligned}\widehat{n}_1 &= sg(\pi - \theta_2 + \theta_1)sg([t_1^2, -t_1^1] \cdot \widehat{t}_2)[-t_1^2, t_1^1] \\ \widehat{n}_2 &= sg(\pi - \theta_2 + \theta_1)sg([t_1^2, -t_1^1] \cdot \widehat{t}_2)[t_2^2, -t_2^1]\end{aligned}\tag{Ec. 30}$$

De ahí el procedimiento es fácil: para obtener los siguientes \widehat{n}_N en el mismo vértice, rotamos \widehat{t}_N en el sentido opuesto a la rotación que hicimos para obtener \widehat{n}_{N-1} a partir de \widehat{t}_{N-1} , teniendo cuidado de tomar en cuenta la notación que uno esté utilizando. Podría ser que $\widehat{n}_{N-1} = \widehat{n}_{jk}$ pero $\widehat{n}_N = \widehat{n}_{ki}$, en cuyo caso este método produciría una normal *entrante respecto a k*. Basta cambiar el sentido si es esa la situación.

Una vez determinadas todas las normales salientes en este vértice, podemos propagar el resultado a los vértices 2-fold vecinos. Aunque las tangentes pertenecientes a una misma arista son opuestas, es claro que la normal saliente ha de ser la misma, con lo que se determina uno de los sentidos salientes en el vértice vecino. Pero como ya hemos dicho, en un mismo vértice una saliente determina la otra, pues deben ser rotaciones por $\pi/2$ de los vectores tangentes en sentidos opuestos. Siguiendo este procedimiento, quedan determinadas las normales salientes para todos los vértices a partir de cálculos locales realizados en vértices con multiplicidad ≥ 3 .

Nota práctica: Ciertas características del método están inspiradas en nuestra implementación particular del modelo. En ella cada vértice α tiene asignado una matriz (su “base local”) que contiene información sobre las aristas que lo unen con sus vecinos. Cada fila contiene información sobre una arista, ordenadas en sentido antihorario como descrito. Específicamente, si $\widehat{t}_N = \widehat{t}_{ij}$, la N -ésima fila tiene largo 7 y forma

$$[i, j, \widehat{t}_N, \widehat{n}_N, \beta_N]\tag{Ec. 31}$$

donde β_N es el identificador del N -ésimo vecino de nuestro vértice, es decir, para el que se cumple que \widehat{t}_N es colineal con $\vec{v}_\alpha - \vec{v}_{\beta_N}$.

Por estar así anotado, \widehat{n}_N está siempre definido como saliente respecto a i y está bien identificada como tal. Esta forma permite obtener directamente los vectores de la base pero ocupa memoria innecesaria: por ser versores, podrían remplazarse las tangentes y normales por su ángulo correspondiente, reduciendo cada fila a 5 entradas. En este caso habría que luego realizar el cálculo necesario cada vez que se quiera usar el vector, reduciendo memoria pero aumentando el número de cálculos potencialmente requeridos.

III.iii: Cálculo de la fuerza nuclear

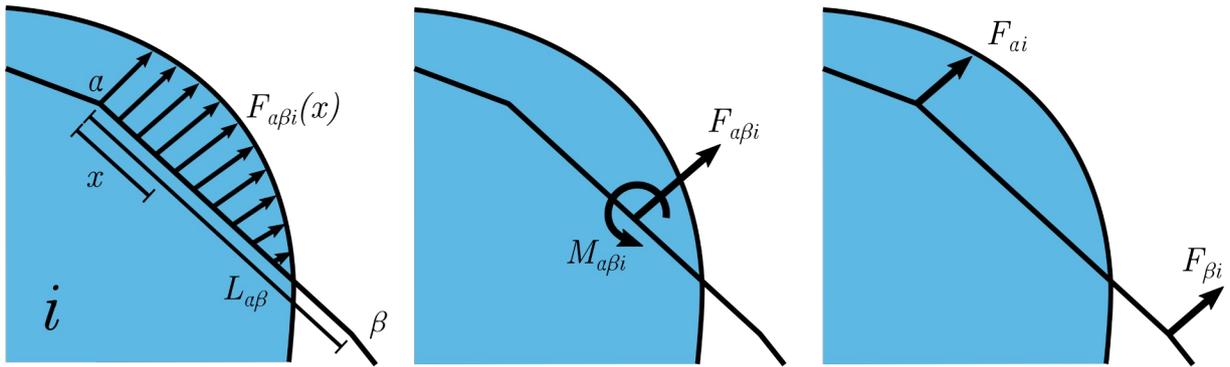


Figura 47: Definición de la fuerza repulsora $F_{\alpha i}$. Cuando el núcleo de la célula i sobrepasa la arista entre los vértices α y β , se define una pequeña fuerza para cada punto a una distancia intermedia x , que al integrarse determina la fuerza neta $F_{\alpha\beta i}$ aplicada en el centro de la arista y el momento de torque $M_{\alpha\beta i}$. Estos pueden ser representados de manera equivalente (tratando a la arista como un sólido) mediante fuerzas $F_{\alpha i}$ y $F_{\beta i}$ aplicadas en los vértices α y β respectivamente.

Recordamos que las fuerzas repulsoras se producen cuando un núcleo sobrepasa los límites de su célula, es decir, cuando puede trazarse un vector desde $\vec{R}_{N,i}$ hasta el borde del núcleo, pasando por alguna de las aristas que definen la célula i . De ser ese el caso, puede calcularse la fuerza repulsiva ejercida en el centro de la arista con extremos α y β como

$$\vec{F}_{\alpha\beta i} = K_n \int_0^{L_{\alpha\beta}} \left(\vec{R}_i^0(x) - \vec{R}_i(x) \right) \Theta \left(\left\| \vec{R}_i^0(x) \right\| - \left\| \vec{R}_i(x) \right\| \right) dx \quad (\text{Ec. 32})$$

siendo $K_n = E_N/L_0$ el coeficiente elástico nuclear (E_N : rigidez nuclear), $L_{\alpha\beta}$ es la longitud de la arista $\alpha\beta$, $\vec{R}_i^0(x)$ es el vector que une el centro del núcleo i con un punto del borde nuclear pasando por el punto de la arista $\alpha\beta$ caracterizado por la distancia $x \in [0, L_{\alpha\beta}]$ y $\vec{R}_i(x)$ es el vector que une el centro del núcleo i con dicho punto. Θ representa la función de Heaviside (es decir, $\Theta(x) = 1$ si $x > 0$, $\Theta(x) = 0$ si no), que figura para que la ec. 32 integre solamente las fuerzas repulsivas (salientes).

El cálculo de estas fuerzas en una arista requiere entonces determinar los vectores $\vec{R}_i^0(x)$ y $\vec{R}_i(x)$, realizar la integral y finalmente distribuir la fuerza resultante entre los extremo α y β . Para lo primero debemos encontrar la ecuación que define el borde del núcleo. Para una elipse de centro en el origen, y radios mayor a y menor b alineados con los ejes cartesianos \hat{x} y \hat{y} respectivamente, esta es

$$\frac{x^2}{a^2} + \frac{y^2}{b^2} = 1 \quad (\text{Ec. 33})$$

Si el núcleo posee un ángulo de rotación θ_i , debemos realizar un cambio de coordenadas, obteniendo

$$\left(\frac{x \cdot \cos(\theta_i) + y \cdot \sin(\theta_i)}{a} \right)^2 + \left(\frac{x \cdot \sin(\theta_i) - y \cdot \cos(\theta_i)}{b} \right)^2 = 1 \quad (\text{Ec. 34})$$

Observamos que $\vec{R}_i^0(x)$ y $\vec{R}_i(x)$ están alineados y parten del centro nuclear (que tomamos como origen), por lo que podemos escribir $\vec{R}_i^0(x) = \mu \vec{R}_i$ (con $\mu \geq 1$) y de ahí, debe cumplirse que para $\vec{R}_i(x) = [x, y]$:

$$\left(\frac{x \cdot \cos(\theta_i) + y \cdot \sin(\theta_i)}{a} \right)^2 + \left(\frac{x \cdot \sin(\theta_i) - y \cdot \cos(\theta_i)}{b} \right)^2 = \frac{1}{\mu^2} \leq 1 \quad (\text{Ec. 35})$$

Por lo tanto, dados dos extremos de una arista α y β , y determinado un punto entre ellos a una distancia $x \in (0, L_{\alpha\beta})$ de α , el vector $\vec{R}_i(x)$ que une este punto con el centro del i -ésimo núcleo nos da la dirección de la fuerza en este punto, siendo su magnitud $\mu - 1$ veces su largo, es decir

$$\left(\vec{R}_i^0(x) - \vec{R}_i(x) \right) \Theta \left(\left\| \vec{R}_i^0(x) \right\| - \left\| \vec{R}_i(x) \right\| \right) = (\mu - 1) \Theta (\mu - 1) \vec{R}_i(x) \quad (\text{Ec. 36})$$

donde $\vec{R}_i(x) = x \frac{\vec{v}_\beta - \vec{v}_\alpha}{|\vec{v}_\beta - \vec{v}_\alpha|} + \vec{R}_i(0)$ ($\vec{R}_i(0)$ une el centro nuclear con \vec{v}_α) y μ se despeja de la ec. 35 usando $\vec{R}_i(x)$ y θ_i .

En teoría sería bueno realizar el cálculo explícito de la integral, pero en la práctica aproximamos la fuerza y torque neto con una integración numérica en 20 puntos equidistantes para cada arista en la que el núcleo sobrepase alguno de los vértices que la definen. Por supuesto, existe la posibilidad de que el núcleo sobrepase la arista sin sobrepasar los vértices de sus extremos pero, asumiendo aristas cortas, este efecto es despreciable.

Una vez calculadas $F_{\alpha\beta i}$ y $M_{\alpha\beta i}$, podemos redistribuirlas a fuerzas $F_{\alpha i}$ y $F_{\beta i}$ en los extremos de la arista, asumiendo que la misma se comporta como una barra rígida. Esta equivalencia está dada por

$$\begin{aligned} \vec{F}_{\alpha i} + \vec{F}_{\beta i} &= \vec{F}_{\alpha\beta i} \\ \frac{\vec{L}_{\alpha\beta}}{2} \times \vec{F}_{\beta i} + \frac{-\vec{L}_{\alpha\beta}}{2} \times \vec{F}_{\alpha i} &= \frac{\vec{L}_{\alpha\beta}}{2} \times (\vec{F}_{\beta i} - \vec{F}_{\alpha i}) = M_{\alpha\beta i} \end{aligned} \quad (\text{Ec. 37})$$

Si ϕ_α y ϕ_β son los ángulos que forman $F_{\alpha i}$ y $F_{\beta i}$ respecto a la tangente $\hat{t}_{\alpha\beta}$ en sentido antihorario, puede reescribirse esto como

$$\begin{aligned} \vec{F}_{\alpha i} + \vec{F}_{\beta i} &= \vec{F}_{\alpha\beta i} \\ \frac{L_{\alpha\beta}}{2} (F_{\beta i} \cdot \sin(\phi_\beta) - F_{\alpha i} \cdot \sin(\phi_\alpha)) &= M_{\alpha\beta i} \end{aligned} \quad (\text{Ec. 38})$$

dejando una ambigüedad en cuanto a la elección de direcciones. Los autores originales del modelo (Kim et al., 2022) asumen que estas fuerzas son perpendiculares a la arista, pero nosotros optamos por otra suposición más débil: al ser corta la arista comparada con el tamaño del núcleo, podemos pensar que todas las fuerzas repulsivas puntuales serán aproximadamente paralelas, y podemos distribuir la fuerza total en dos fuerzas con el mismo ángulo $\phi_{\alpha\beta}$ que $\vec{F}_{\alpha\beta i}$, con magnitudes

$$\begin{aligned} F_{\alpha i} &= \frac{F_{\alpha\beta i}}{2} - \frac{M_{\alpha\beta i}}{L_{\alpha\beta} \cdot \sin(\phi_{\alpha\beta})} \\ F_{\beta i} &= \frac{F_{\alpha\beta i}}{2} + \frac{M_{\alpha\beta i}}{L_{\alpha\beta} \cdot \sin(\phi_{\alpha\beta})} \end{aligned} \quad (\text{Ec. 39})$$

III.iv: Simulación de las transiciones de tipo 1 (T1)

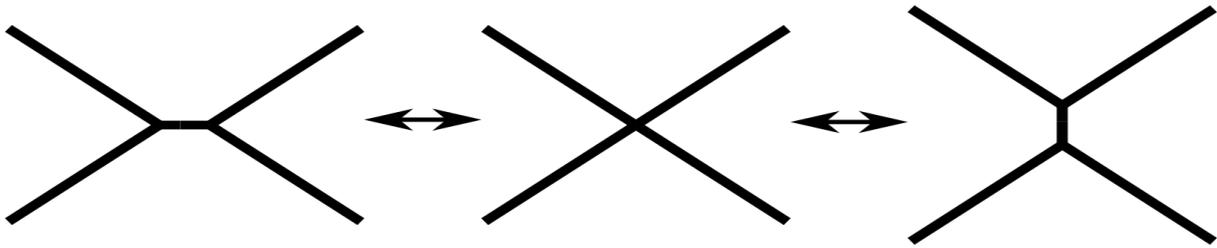


Figura 48: Definición gráfica de una transición de tipo 1 o T1. En una transición de este tipo un conjunto de células realizan un intercambio de vecinos, que puede entenderse como dos vértices 3-fold cercanos uniéndose en un vértice 4-fold que puede volver a separarse en 2 vértices 3-fold. En nuestro modelo, la extrusión celular está mediada por T1's.

Durante las simulaciones, cuando dos vértices están demasiado cerca (a menos de una distancia $d\mathcal{L}$ determinada *a priori*), se los unifica en un mismo vértice, con lo que es posible tener vértices 4-fold, que en general se consideran inestables y pueden dar lugar a una llamada “transición de tipo 1” o simplemente “T1” (Figura 48), en las que ocurre un “intercambio de vecinos” (*neighbour exchange*). Debido a que la extrusión celular en nuestro modelo requiere transiciones T1, vale la pena discutir qué ocurre cuando se detecta un vértice 4-fold.

Para intentar disminuir las arbitrariedades adoptamos el método utilizado por Duclut et al. (2021): En cada paso de integración, cuándo se detecta un vértice 4-fold³⁰, se proponen dos maneras de partir este vértice, generando dos topologías posibles de la red. Si en una de estas opciones las fuerzas separarían los nuevos vértices, el vértice 4-fold es inestable. Si el vértice es inestable para ambas topologías, se elige la que maximiza la distancia de los nuevos vértices en el próximo paso de integración como la más favorable energéticamente. Si los nuevos vértices tienden a juntarse (o permanecer en su posición) en ambas topologías, el vértice 4-fold es estable y se mantiene.

En nuestra implementación los nuevos vértices se determinan promediando la dirección de las 4 aristas dos a dos, a una distancia un poco mayor a $d\mathcal{L}$ entre sí, y con igual distancia respecto al 4-fold (Figura 49), con vecinos apropiadamente asignados. Se calculan las nuevas fuerzas localmente en cada situación y se determina la diferencia entre esta distancia y la nueva distancia calculada para el próximo paso, eligiendo la opción que la maximiza (si ambas son negativas, nos quedamos con el 4-fold original).

³⁰ Podría ser 5-fold, etc. El método se puede seguir usando independientemente de la multiplicidad del vértice, aunque no figura en nuestra implementación.

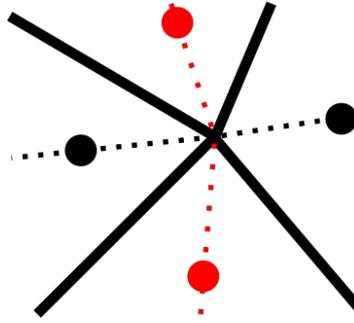


Figura 49: Método para elegir separaciones de vértices 4-fold en nuestra implementación. Promediando los ángulos de las aristas incidentes dos a dos se determinan 2 vértices a distancia $> d\mathcal{L}$ entre sí y con igual distancia respecto al centro. Una posibilidad se muestra en negro y otra en rojo (promedio de direcciones en línea punteada, los puntos marcan los nuevos vértices).

IV: Propuestas de nuevas medidas

IV.i: Relación entre curvatura de la membrana y ángulos medibles en el modelo

Durante el análisis teórico del equilibrio del modelo simple (en el Anexo I) obtuvimos el resultado que, en equilibrio, todos los vértices 2-fold de una misma interfaz adquieren el mismo ángulo 2ω con respecto a sus vecinos. Una manera de interpretar esto es decir que *aproximan un arco de circunferencia*, pero esto es solo cierto cuando la distancia entre ellos es aproximadamente igual.

Recordemos que, para una curva suave en el plano, se cumple que la curvatura κ se relaciona con el “radio de curvatura” R (es decir, el radio del círculo que mejor aproxima localmente la curva) mediante

$$\kappa = \frac{1}{R} \quad (\text{Ec. 40})$$

Saber que una curva poligonal tiene todos sus ángulos iguales no necesariamente refleja κ directamente porque *no aporta información sobre el radio*. Es fácil imaginarse situaciones en las que una curva que gira con siempre el mismo ángulo no aproxima necesariamente un arco de circunferencia. Por otro lado, la curvatura es una medida geométrica que puede resultar útil en la práctica. Para tratar de encontrar una equivalencia podemos, en vez de pensar en “la circunferencia que mejor aproxima a la curva”, pensar en el polígono regular que mejor la aproxima, y luego compararlo con la correspondiente circunferencia exinscrita. A continuación presentamos una medida que desarrollamos utilizando ese razonamiento.

El ángulo interno de un polígono regular de N lados es igual a $\pi(1 - 2/N)$. Si llamamos $2\omega_i$ al ángulo menor formado por un vértice 2-fold v_i con respecto a sus vecinos, esto significa que podemos aproximar un N_i local mediante

$$N_i \approx \frac{2\pi}{\pi - 2\omega_i} \quad (\text{Ec. 41})$$

Recordemos que del análisis se desprende también que, *en equilibrio*, $2\omega_i$ varía entre $2\tan^{-1}(2)$ y π , lo cual implica $N_i \geq 7$, aunque esto no tiene por qué cumplirse en general.

Un polígono inscrito en un círculo de radio R tiene lados de largo $2R\sin(\pi/N)$, o $2R\cos(\pi(1/2 - 1/N))$. Esto quiere decir que el lado s del polígono puede aproximarse por

$$s \approx 2R\cos(\omega_i) \quad (\text{Ec. 42})$$

Si las aristas que se unen en v_i tienen un largo aproximadamente igual a l_i , esto nos permite definir una **curvatura local externa** κ_i^{ex} mediante el inverso del radio aproximado:

$$\kappa_i^{ex} \approx \frac{2\cos(\omega_i)}{l_i} \quad (\text{Ec. 43})$$

Por otro lado, podemos también aproximar usando la circunferencia *inscrita* en vez de la exinscrita, y así definir una **curvatura local interna** κ_i^{in} . En ese caso, podemos decir que una circunferencia inscrita en un polígono de N lados de largo s tiene $r = s/2\tan(2\pi/N)$, lo que significaría

$$r \approx \frac{s}{2}\tan(\omega_i) \quad (\text{Ec. 44})$$

y de ahí, tomando $s \approx l_i$

$$\kappa_i^{in} = \frac{2}{l_i \cdot \tan(\omega_i)} \quad (\text{Ec. 45})$$

Observamos que ambas medidas convergen para $\omega_i = \pi/2$, aunque por supuesto, divergen para valores más bajos de ω_i . Esta diferencia no es particularmente mala dentro del rango entre $\tan^{-1}(2)$ y $\pi/2$ que ω_i puede adoptar en equilibrio. En este rango $\cos(x) < 0.45$ y $\sin(x) > 0.89$ por lo puede acotarse la diferencia

$$\kappa_i^{in} - \kappa_i^{ex} = 2 \frac{\cos(\omega_i)}{l_i} \left[1 - \frac{1}{\sin(\omega_i)} \right] < \frac{0.09}{l_i} \quad (\text{Ec. 46})$$

que equivale a una diferencia de aproximadamente 1 si tomamos $l_i \approx 0.09$, como en la simulación que contrastamos con nuestras predicciones teóricas en el Anexo I.

Por como está implementado el modelo, efectivamente esperamos que las aristas a cada lado de un vértice tengan largos similares. De lo contrario podría aproximarse (usando la curvatura externa como ejemplo) promediando ya sea los largos de las aristas

$$\kappa_i^{ex} \approx \frac{2\cos(\omega_i)}{\frac{1}{2}(l_i^1 + l_i^2)} \quad (\text{Ec. 47})$$

o las curvaturas aparentes obtenidas de cada lado

$$\kappa_i^{ex} \approx \frac{1}{2} \left(\frac{2\cos(\omega_i)}{l_i^1} + \frac{2\cos(\omega_i)}{l_i^2} \right) = \cos(\omega_i) \frac{l_i^1 + l_i^2}{l_i^1 l_i^2} \quad (\text{Ec. 48})$$

Sería interesante usar estas medidas para contrastar cuantitativamente los resultados experimentales con los obtenidos gracias a modelos como el presentado en este trabajo.

IV.ii: Un posible equivalente al concepto de “densidad celular” aplicable a los epitelios pseudoestratificados

Como mencionamos en el texto, el concepto de densidad celular no es útil como predictor de la extrusión en un epitelio pseudoestratificado. Es decir, el número de células que uno cuenta por unidad de área del lado apical (o en un corte tangencial, paralelo al borde apical) resulta útil como medida de “que tan apretadas están las células” en muchos epitelios, pero no tiene el mismo significado mecánico en nuestro tejido de interés. Si pensamos que el principal impedimento mecánico (es decir, el elemento más rígido) en los epitelios pseudoestratificados es el núcleo, esperaríamos que el área relativa ocupada por núcleos en un corte tangencial del tejido (un tipo de *densidad nuclear*) sea una medida más mecánicamente significativa. En nuestro modelo, el sistema siempre presenta un equilibrio con forma de monocapa columnarizada (sin límite de densidad celular) cuando no hay núcleos, o cuando los mismos son pequeños relativo al ancho celular (es decir, con baja densidad nuclear). Sin embargo, es complejo obtener una solución estable en forma de monocapa cuando hay núcleos y estos ocupan bastante espacio en cada célula, reflejando la posible utilidad de esta medida.

El contenido de este último anexo fue de los primeros en este trabajo en ser desarrollado. Una de las primeras hipótesis que consideramos sobre el origen de la extrusión celular era que las alteraciones mecánicas causadas por el tratamiento con PMA podrían estar llevando a un aumento en la densidad nuclear, por ejemplo por la pérdida parcial de columnarización. En ese caso, esperaríamos que ocurra extrusión celular hasta que el epitelio volviera a una densidad en la que pudiera estabilizarse. La densidad nuclear representaría entonces la capacidad (máxima) del tejido de contener núcleos, y podría actuar como una cantidad conservada del neuroepitelio. Tener una cantidad conservada de este estilo permitiría caracterizar fácilmente los epitelios estables de los inestables (en los que esperamos extrusión celular). En la práctica esto no resultó ser tan fácil, tanto por nuestra capacidad de obtener estos datos, como por el hecho de que, más que un número, la densidad es una función de la “altura” a la que se realiza cada corte tangencial. A pesar de las dificultades mencionadas, nos parece que esta medida puede resultar útil para estudiar epitelios pseudoestratificados desde el punto de vista mecánico. Realizamos el siguiente desarrollo para poder obtener valores de la misma en un modelo geoméricamente sencillo contra el que podrían contrastarse medidas experimentales.

Consideremos un epitelio compuesto por células con forma de pirámide truncada de base poligonal regular (Figura 50A). En un epitelio pseudoestratificado las células no tienen esta forma, por supuesto, aunque sí parecen adoptar formas poligonales en un corte tangencial, similares a las vistas en otros epitelios (Iber & Vetter, 2022). Asumimos que los núcleos son elipsoidales, con un eje de radio a (alineado con la dirección apico-basal) y ejes perpendiculares de radio b (Figura 50B), y que cada célula se ajusta a su núcleo, es decir, que los bordes celulares son tangentes al mismo en algún punto. Llamemos z a la coordenada medida en el eje apico-basal del tejido (aumentando desde el basal hacia el apical, de 0 a h), que puede variar de dirección en distintos puntos del mismo (Figura

50C). Buscamos una fórmula para la densidad nuclear en la i -ésima célula en el corte tangencial a altura z , que llamaremos $\eta_i(z)$.

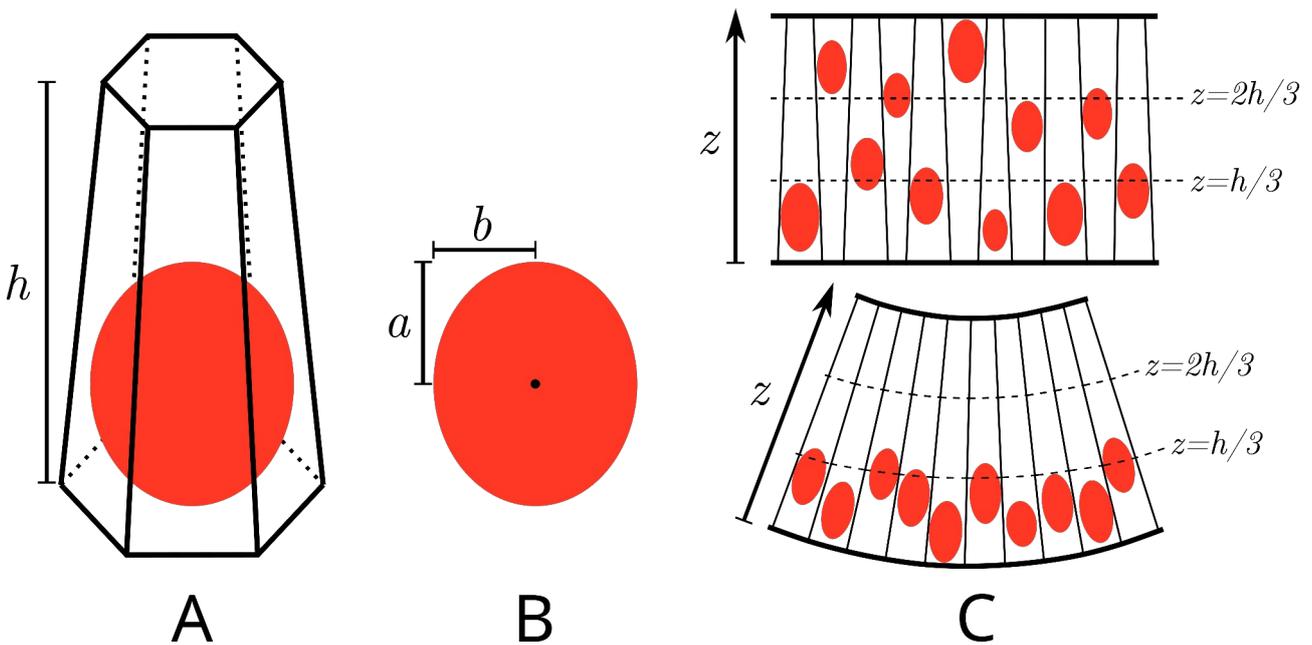


Figura 50: Diagramas del modelo geométrico sencillo que utilizamos para el cálculo de la densidad nuclear η . (A) Asumimos que las células tienen forma de pirámide truncada de base poligonal regular (en general con N lados, en este caso 6), de altura h . (B) Cada célula contiene un núcleo elipsoidal de radio a en la dirección apico-basal y radio b en el plano perpendicular a este eje. (C) Cortes transversales de monocapas compuestas por células de distintas formas, exhibiendo distintas curvaturas. Llamamos z al eje apicobasal de este tejido, definido localmente. Podemos pensar al tejido como compuesto de capas (cortes tangenciales), una para cada valor de $z \in [0, h]$. En ambos tejidos se señalan las “líneas de corte” correspondientes a $z = h/3$ y $z = 2h/3$, que son perpendiculares al eje z en cada punto. Observar que un solo corte no puede representar totalmente la geometría de todas las células, por lo que los núcleos parecen tener distintos tamaños y no parecen estar centrados ni ser tangentes a los bordes de su célula.

Consideremos un corte transversal del tejido³¹ que (1) pase por el centro del núcleo de nuestra célula de interés, y (2) muestre al núcleo tangente al borde de la célula en algún punto (visto así, este modelo resulta similar al de Ishii et al. (2021), aunque en nuestro modelo geométrico este corte puede ser asimétrico). Llamemos $z = 0$ al centro del núcleo, z_n al valor de z en el cual el núcleo y el borde celular se tocan (y son tangentes) y x al eje perpendicular a z centrado en el centro nuclear y definido positivo hacia el lado donde el núcleo contacta con la membrana (Figura 51A). Evidentemente, como el núcleo tiene radio a en el eje z , $\eta_i(z) = 0$ para todos los $z \notin (-a, a)$. Para calcular $\eta_i(z)$ en $(-a, a)$ necesitamos calcular el área $A_i^N(z)$ de la célula (un polígono de N lados), y el área $A_i^{nuc}(z)$ del núcleo a la altura z . En este corte, la célula tiene un perfil triangular (truncado), y su ancho desde el centro nuclear (en el lado positivo del eje x) se corresponde con el apotema del polígono de N lados que se obtendría en un corte perpendicular al eje z .

31 Es decir, un corte que muestre toda la altura de las células, como en la Figura 46C y 47A.

Queda claro también que η_i necesariamente tendrá un máximo en z_n , pues es el punto en el que el borde celular más se ajusta al núcleo, como se ilustra en la Figura 51B.

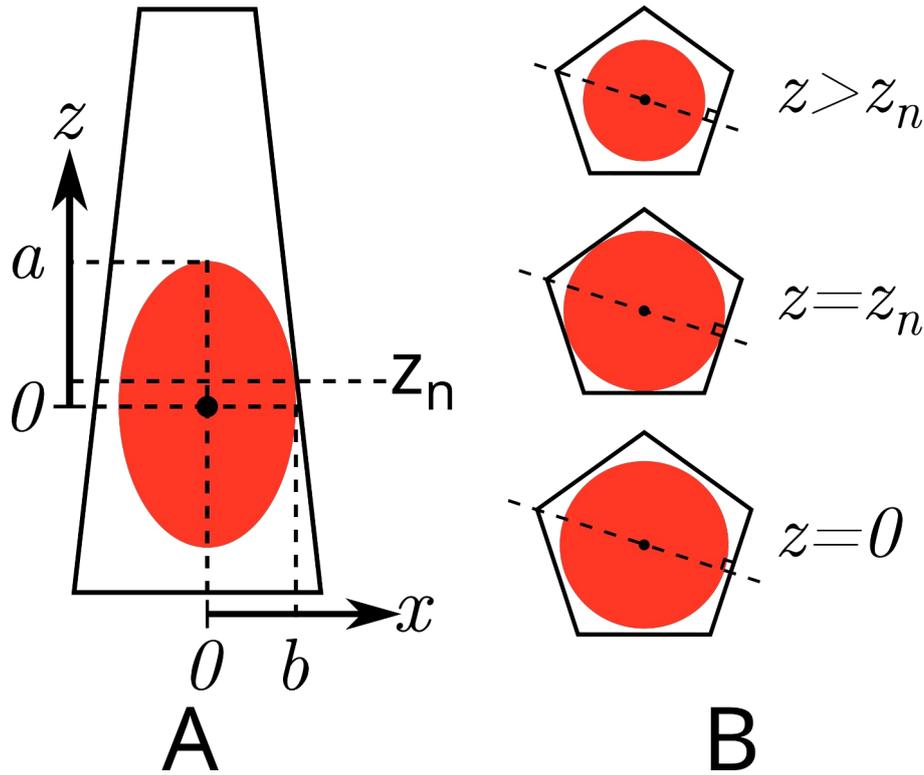


Figura 51: Modelo geométrico sencillo que utilizamos para el cálculo de la densidad nuclear $\eta_i(z)$ en una sola célula. (A) Corte transversal de una célula que pasa por el centro del núcleo y en el que se puede ver el núcleo tangente al borde celular. Se definen los ejes perpendiculares x y z , centrados en el centro del núcleo, y z_n , el valor en z en el cual coinciden el núcleo y el borde celular. En este corte el núcleo es asimétrico respecto al borde celular debido a que N es impar, lo cual no afecta los cálculos. (B) Cortes tangenciales de la célula para distintos valores de z , asumiendo $N = 5$. En todos los casos la línea punteada indica uno de los posibles cortes representados en (A) y el segmento que va desde el centro nuclear a la arista corresponde al apotema del polígono. Aunque el área nuclear es máxima en $z = 0$, el máximo valor de η_i se da en z_n , pues allí el borde celular se ajusta al área del núcleo. Para z mayores (o menores, dependiendo del caso) a z_n , tanto el área nuclear como celular varían en el corte, pero siempre $\eta_i(z) < \eta_i(z_n)$.

El perfil de la célula que tiene valores positivos en x es una recta de la forma

$$x = Az + B \quad (\text{Ec. 49})$$

con $A < 0$. Para estos ejes, el núcleo sigue la fórmula de una elipse centrada en el origen, con ejes principales x y z

$$\left(\frac{z}{a}\right)^2 + \left(\frac{x}{b}\right)^2 = 1 \quad (\text{Ec. 50})$$

o, para $z \in [-a, a]$

$$\tilde{x}(z) = b\sqrt{1 - \left(\frac{z}{a}\right)^2} \quad (\text{Ec. 51})$$

donde distinguimos $\tilde{x}(z)$ como función para facilitar la notación. Como el borde celular es tangente al núcleo en z_n , $A = \frac{d\tilde{x}}{dz} \Big|_{z=z_n}$ y ambas ecuaciones (49 y 51) coinciden en ese punto, por lo que

$$b\sqrt{1 - \left(\frac{z_n}{a}\right)^2} = \frac{d\tilde{x}}{dz} \Big|_{z=z_n} z_n + B \quad (\text{Ec. 52})$$

Derivando la ecuación 51 obtenemos que

$$\frac{d\tilde{x}}{dz} \Big|_{z=z_n} = \frac{-bz_n}{a^2\sqrt{1 - \frac{z_n^2}{a^2}}} = \frac{-bz_n}{a\sqrt{a^2 - z_n^2}} \quad (\text{Ec. 53})$$

Usando las ecuaciones 52 y 53 despejamos B y obtenemos que el perfil de la célula sigue la ecuación

$$x = \frac{b}{\sqrt{a^2 - z_n^2}} \left(\frac{a^2 - z_n \cdot z}{a} \right) \quad (\text{Ec. 54})$$

Por ser este el largo del apotema de un polígono regular de N lados, el área de la célula en el corte tangencial a la altura z será

$$A_i^N(z) = N \cdot \tan\left(\frac{\pi}{N}\right) \cdot x(z)^2 = N \cdot \tan\left(\frac{\pi}{N}\right) \cdot \frac{b^2}{a^2} \cdot \frac{(a^2 - z_n \cdot z)^2}{a^2 - z_n^2} \quad (\text{Ec. 55})$$

Por otro lado, en este corte el núcleo tiene forma de disco con radio dado por la ecuación 51, con lo que

$$A_i^{nuc}(z) = \pi \cdot \frac{b^2}{a^2} (a^2 - z^2) \quad (\text{Ec. 56})$$

Finalmente, tenemos

$$\eta_i(z) = \frac{A_i^{nuc}(z)}{A_i^N(z)} = \frac{\pi}{N \cdot \tan(\pi/N)} \cdot \frac{(a^2 - z^2)(a^2 - z_n^2)}{(a^2 - z_n \cdot z)^2} \quad (\text{Ec. 57})$$

donde el primer término es un factor multiplicativo que depende solamente del número N de lados de la célula, y el segundo determina la forma del gráfico de η_i en función de z . Si $z_n = 0$, entonces

$$\eta_i(z) = \frac{\pi}{N \cdot \tan(\pi/N)} \frac{(a^2 - z^2)}{a^2} \quad (\text{Ec. 58})$$

por lo que se trata de una parábola centrada en 0, con valor máximo dado por el primer término (que depende de N). Puede verse entonces a la fórmula general de $\eta_i(z)$ como una parábola con un "sesgo" hacia z_n (Figura 52). Esta función siempre tiene un máximo en $z = z_n$, y toma el mismo valor que en el caso $z_n = 0$.

La fracción nuclear $\eta(z)$ de todo el tejido puede obtenerse de la siguiente manera: si tenemos C células, cada una con núcleo centrado en z_i ($i = 1, \dots, C$, midiendo desde el lado basal), entonces el área que ocupan todos los núcleos es $\sum_{i=1}^C \eta_i(z - z_i) A_i^N(z - z_i)$.

Por lo tanto, si $A_{tot}(z)$ es el área total del corte perpendicular al eje apico-basal a la altura z , podemos expresar

$$\eta(z) = \sum_{i=1}^C \eta_i(z - z_i) \frac{A_i^N(z - z_i)}{A_{tot}(z)} \quad (\text{Ec. 59})$$

con lo que $\eta(z)$ es un promedio de los distintos η_i (ajustados a la altura de su centro nuclear correspondiente), ponderado por la proporción de área que ocupa cada célula a esa altura del tejido. En el caso particular en el que todas las células son iguales, es claro que $\eta(z)$ tiene igual forma que $\eta_i(z)$. En ese caso podríamos distinguir la forma de las células y la distribución de estos núcleos según la forma de $\eta(z)$, por ejemplo, podríamos distinguir si todos los núcleos fueran centrales ($z_n \approx z_i$, células aproximadamente prismas) o basales ($z_n > z_i$, suponiendo que su lado basal está expandido). Por supuesto, una monocapa compuesta enteramente por células de forma piramidal (truncada) de igual forma debe tener una cierta curvatura que le permita acomodar las células que lo componen, por lo que en este caso el perfil de $\eta(z)$ serviría como una medida indirecta de la curvatura del epitelio.

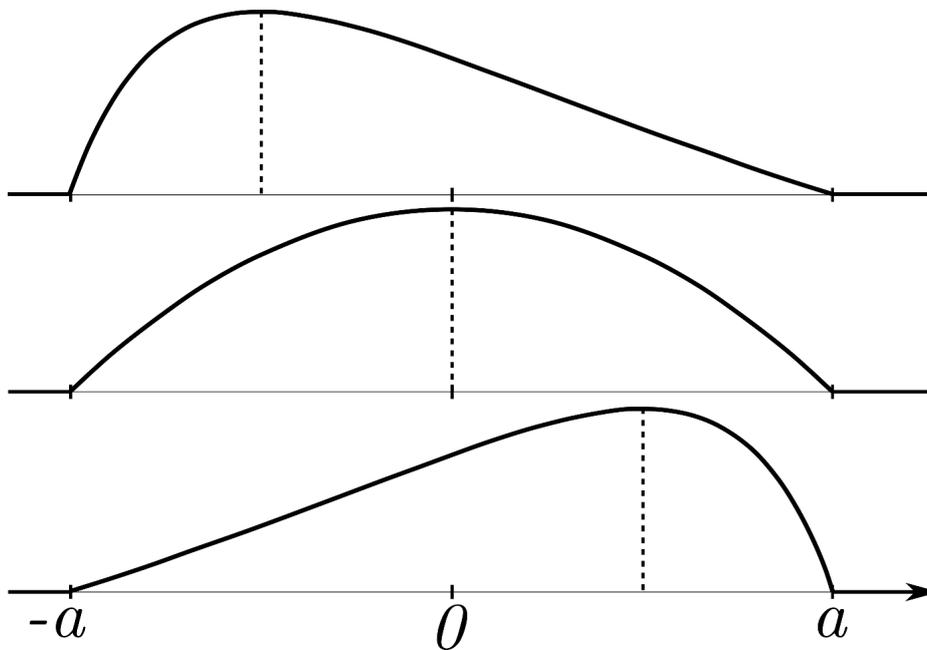


Figura 52: Gráfico de la función $\eta_i(z)$ para el caso de un núcleo "apical" (arriba), "central" (centro) o "basal" (abajo). En todos los casos la línea punteada marca el valor de z_n . Estrictamente no puede afirmarse la localización del núcleo en el eje apico-basal del tejido a partir de estas distribuciones pues la misma solo lleva información del valor de z_n respecto al centro nuclear (aquí $z = 0$ como en la ecuación 57), pero es esperable que, por ejemplo, una célula con un lado apical de menor área que el basal tenga un núcleo en posición basal, llevando a una distribución como la que corresponde a $z_n > 0$. La altura máxima de todas estas gráficas se da en $z = z_n$ y vale $\pi / (N \cdot \tan(\pi/N))$.

El recíproco no puede afirmarse, porque una curvatura puede estar dada por una distribución no uniforme de núcleos. Por ejemplo, puede lograrse un epitelio plano con una población mixta (en proporciones similares) de células con núcleos apicales y basales

(como en las simulaciones que mostramos en la Figura 23). Si asumimos que las células con núcleos basales tienen $z_i = a$ y las de núcleos apicales $z_i = h - a$ (siendo h la altura del tejido), queda claro que $\eta(z)$ tendrá dos picos (si h es apreciablemente mayor que $2a$) pues A_i^N de las células con núcleos basales tendrá valores altos y η_i no será nulo para z bajo, mientras que lo mismo pasará para las células con núcleos apicales para z alto.

Algo similar ocurre si la distribución de núcleos está distribuida de manera más uniforme a lo largo del eje z . Todas las células con forma similar contribuirán una distribución similar, con un máximo a la altura correspondiente a z_n , y con valor dependiente del número N de lados del borde celular. Podemos esperar entonces que la distribución final $\eta(z)$ sea aproximadamente constante en algún rango en $z \in (a, h - a)$. Observar una distribución de este tipo nos permitiría afirmar que los núcleos están distribuidos todo a lo largo del eje apico-basal, lo cual no es muy informativo y seguramente sería apreciable directamente a partir de imágenes. Sin embargo, algo interesante es que en esta situación sería en principio posible definir un valor numérico representativo para la densidad celular, tomando por ejemplo el valor promedio de $\eta(z)$ en el rango $z \in (a, h - a)$.

Concluimos entonces que, en el caso de tener un epitelio con núcleos distribuidos aproximadamente a la misma altura en el eje apico-basal, la densidad celular es una función de z cuya forma puede permitirnos determinar esta distribución y representa indirectamente la curvatura de la monocapa. Por otro lado, en el caso de tener una distribución aproximadamente uniforme de núcleos a lo largo del eje z , podemos reducir la información sobre la densidad nuclear del epitelio a un solo número. Esto permite simplificar el análisis de esta propiedad del tejido, convirtiéndola en una medida similarmente práctica a las otras medidas de densidad celular presentes en los distintos trabajos sobre extrusión celular