



Universidad Distrital Francisco José de Caldas
Facultad de Ciencias y Educación

Relación dinámica entre el envejecimiento celular y la difusión Browniana para “*Saccharomyces cerevisiae*”

Presentado por:

Juan Diego Naranjo Mojica

Trabajo de grado en modalidad pasantía para optar por el título de Licenciatura en Física.

Dirigido por:

Director - Universidad Distrital
César Aurelio Herreño Fierro

Profesional Responsable - Universidad de los Andes
Juan Manuel Pedraza Leal

Bogotá D.C
Enero 2024

Agradecimientos

Agradezco a mi madre Alba Roció Mojica, quien ha cultivado en mí el respeto, el amor, la disciplina y la responsabilidad para poder llevar a cabo todos los objetivos personales, gracias por cultivar en mí el accionar de ser mejor cada día.

Valoro inmensamente a David Camilo Duran por su constante ayuda, supervisión y consejos que brindaron seguridad, apoyo y crecimiento personal.

Agradezco al convenio establecido entre la Universidad Distrital Francisco José de Caldas y la Universidad de los Andes, la cual hizo posible llevar a cabo mi pasantía en el Laboratorio de Biofísica de la Universidad de los Andes.

Finalmente agradezco a mis directores César Herreño por la franqueza y la confianza para poder hacer realidad esta pasantía, al profesor Juan Manuel Pedraza por el acompañamiento, el respaldo y la magnífica guía que ilustro grandes enseñanzas, desde el aparatado académico y humano.

Índice

Resumen.....	5
Introducción	6
1) Objetivos.....	7
1.1 Objetivo General	7
1.2 Objetivos específicos	7
2) Fundamentos teoricos	8
2.1Biología de sistemas	8
2.2 Replicative Life Span (RLS).....	9
2.3 Chronological Life Span	10
2.4 Curva de envejecimiento (RLS).....	10
2.5 Curva de supervivencia: Análisis de supervivencia.....	11
3) Difusión antecedentes históricos	12
3.1 Movimiento Browniano	12
3.2 Sobre la difusión anómala.....	13
3.3 Difusión anómala	14
4) Métodos de caracterización de propiedades físicas	16
4.1 Reología y Microreología	16
4.2 GEMs(Genetically Encouded Multimerical Nanoparticles)	16
4.3 GEMspa	18
5) Protocolos: Variaciones en el medio	19
5.1 Preparación de medios	19
5.2 Recuperación de células.....	21
5.3 Microscopía.....	22
6) Resultados.....	24
6.1 Manejo de datos	25
6.2 Intervalo de Entrada en Senescencia.....	26
6.3 Creación de máscaras.....	29
7) Análisis de Resultados	32
7.1 Replicative lifespan.....	32
7.2 Cronological lifespan	39
7.3 Análisis de supervivencia.....	45

8) Evaluación y cumplimiento de los objetivos de la pasantía	49
9) Conclusiones y recomendaciones	51
Bibliografía	53
Anexos	55
Starvation Cyclohexamide	55

Resumen

“*Saccharomyces cerevisiae*” es el nombre científico de uno de los organismos unicelulares más representativos a nivel industrial y científico. Al ser un tipo de levadura investigada ampliamente permite el acceso y manipulación de sus componentes estructurales. Por ende, ha sido utilizado como organismo modelo para todo tipo de estudios a nivel celular. Entre ellos el envejecimiento entendido como una serie de sucesos dependientes del tiempo que se vincula con el deterioro a nivel estructural y homeostático. Es también uno de los pilares más importantes en el proceso vital de las células, entendiendo los factores internos-externos que afectan el envejecimiento podemos pronosticar, predecir y dar hipótesis sobre qué procesos fisiológicos cambiaron, además de que circunstancias evitar para prolongar el buen funcionamiento en una célula. Existen dos definiciones de envejecimiento a nivel celular y experimental como: esperanza de vida replicativa (replicative lifespan) en sus siglas “RLS” concepto que nos describe el ciclo de envejecimiento de una muestra de células, en la fase exponencial de crecimiento o Esperanza de vida cronológica (chronological lifespan) en sus siglas “CLS” otro importante concepto que nos describe el ciclo de envejecimiento midiendo el tiempo que sobre- viven las células que no se dividen¹. Dichos procedimientos serán los adecuados para analizar el envejecimiento de manera experimental.

Atrapando estas células en sistemas de microflúidos denominados Slipstreaming Mother Machine el cual puede agarrar células, permitiendo la obtención de imágenes dinámicas de una célula de levadura. la construcción de un dispositivo de atrapamiento hidrodinámico, permite la singular ventaja de eliminar las presiones mecánicas con un porcentaje específico de atrapamiento. Dado el amalgama de factores, propiedades y procesos estocásticos que pueden o no afectar el envejecimiento, encontramos la difusión, específicamente la Browniana entendiéndose esta como las fluctuaciones estadísticas de las partículas en algún medio. Esto se puede estudiar por medio de GEMs (Genetically Encoded Multi- meric Nanoparticles) nanopartículas fluorescentes generadas propiamente por la célula de levadura. El proyecto tiene dos etapas, paralelas, se recogen datos pertenecientes al laboratorio Holt de la Universidad de New York con la cooperación de David Camilo Duran Chaparro Candidato a doctorado en la Universidad de los Andes, con el objetivo de ampliar aún más la base de datos, que nos permita estimar con mayor precisión una posible relación de estas variables dinámicas. Mediante los datos recolectados, comenzo un tratamiento estadístico que valide como varía la difusividad en dichas células. Con la ayuda de paquetes de procesamiento de imágenes como Fiji o NIS-Elements, además de un programa de análisis de seguimiento de trayectorias individuales GEMspa se calculará la difusividad eficaz. Una vez aplicado los tratamientos estadísticos se interpreto un parámetro fundamental en la difusividad como lo es el factor alfa, a través de medidas de desviación como el MSD (mean squared displacement)

Introducción

La Biofísica como campo interdisciplinario y transdisciplinario surge con el objetivo de explicar la estructura y comportamientos de los sistemas biológicos. La combinación de elementos plausibles de la biología y la física, se interconectan entre si para llegar a entender las diferentes ramas de la biofísica, como lo son la mecánica celular y adhesión microscópica además de la biofísica de membranas.

A través de dichas ramas, se permite estudiar el envejecimiento celular, una de las características de mayor estudio debido a su fuerte impacto en los seres vivos. Superar este factor para la ciencia en general ha sido de largo alcance donde las múltiples investigaciones dirigen los esfuerzos a retrasar el proceso de envejecimiento. Como consecuencia de estas dificultades, La célula de levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo modelo comúnmente utilizado para estudios de envejecimiento en células eucariotas [Liu, P., Young, T. Z., & Acar, M. (2015)]. Al ser un tipo de levadura investigada ampliamente permite el acceso y manipulación de sus componentes estructurales entre ellos el envejecimiento celular. Dentro del campo experimental de la biología de sistemas se tiene dos definiciones para el envejecimiento celular, denominados “RLS” envejecimiento replicativo y “CLS” envejecimiento cronológico. Estos tipos de envejecimiento en conjunto con GEMs (Genetically Encoded Multi- meric Nanoparticles) nanopartículas fluorescentes generadas propiamente por la célula de levadura permiten obtener y visualizar diferentes propiedades que cambian con el envejecimiento. Una de ellas, la difusión o transporte de partículas u cantidades de un lugar a otro. Dado que algunas investigaciones en diferentes orgánulos sugieren y muestran una disminución en esta propiedad. En este trabajo en específico se proyecta una difusión Browniana en las células de levadura, de lo contrario una difusión anómala.

1) Objetivos

1.1 Objetivo General:

Mediante la implementación de nanopartículas fluorescentes GEMs (Genetically Encoded Multimeric Nanoparticles). Se busca realizar un seguimiento de trayectorias individuales de las células "*S. cerevisiae*" para analizar una propiedad física fundamental como la difusión, aplicando las definiciones de envejecimiento celular RLS y CLS además de variar las condiciones del medio donde proliferan.

1.2 Objetivos específicos:

- Obtención de las posiciones de las nanopartículas fluorescentes por medio de microscopia de fluorescencia.
- Calcular el coeficiente de difusión a través de las posiciones de las nanopartículas por medio del programa de análisis de seguimiento de trayectorias individuales GEMspa.
- Relacionar el coeficiente de difusión con el tiempo de envejecimiento por medio de las definiciones experimentales de envejecimiento "RLS" y "CLS".
- Comparar las curvas de envejecimiento para las definiciones experimentales de envejecimiento "RLS" y "CLS" con reducción y abundancia de nutrientes.

2) Fundamentos Teóricos

2.1 Biología de Sistemas:

La biología de sistema busca comprender los sistemas biológicos complejos con el uso de métodos cuantitativos, computacionales, de forma general (poblacional) y particular (individual). Para nuestro caso el envejecimiento en este trabajo se centrará de forma individual, la biología de sistema ofrece los componentes teóricos y experimentales para lograr este objetivo. Puede existir bastante factores que interfieren en el envejecimiento, lo cual vuelve a este fenómeno un sistema con variables estocásticas, la biología de sistemas desenvuelve, fragmenta y despliega una serie de rutas para analizar el envejecimiento.

Entre las experimentales encontramos dos rutas. La primera ruta, dado un sistema complejo se vuelve a agrupar en subsistemas hasta sus componentes más básicos. La segunda parte es un recíproco de la primera. La superposición, la interacción en el funcionamiento de los componentes básicos y subsistemas para formar el sistema complejo.

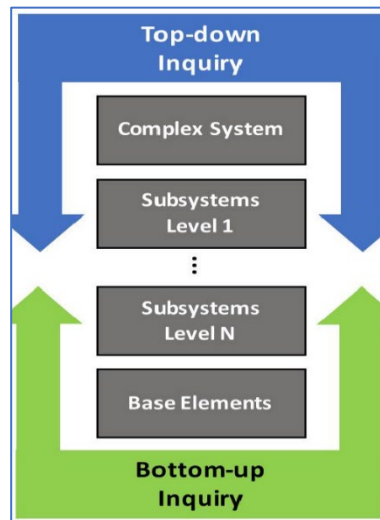


Figura 1. esquema direccional, rutas de análisis del envejecimiento de sistema complejo, el mapeo se puede realizar de abajo hacia arriba o de arriba hacia abajo. Imagen tomada de: *The Systems Biology of Single-Cell Aging*.

Cabe resaltar el comportamiento condicional de elementos que llevan a una ruta o a la otra. Una combinación de dos o más elementos puede ser un factor causal de envejecimiento en la ruta número dos. Así mismo en un enfoque holístico de la biología basado en la idea de que el todo es mayor que la suma de sus partes, por ende, no se puede lograr una comprensión completa de un sistema biológico sin estudiarlo como un todo (Chuang et al., 2010; Ideker et al. 2001; Kitano, 2002)

Para este trabajo, se seguirá la ruta número dos, analizando el comportamiento de diferentes proteínas, genes y propiedades del ciclo celular, para ver cómo las interacciones entre todos ellos influyen en el proceso del envejecimiento.

2.2 Replicative Life Span (RLS)

Hay dos formas principales de consultar la vida útil de este organismo. Si los académicos e investigadores se preguntan ¿Cuántas veces se puede dividir una célula?, la respuesta es su vida útil replicativa (RLS). Si por el otro lado, uno pregunta cuánto tiempo puede permanecer viva una célula sin dividir, la respuesta será su vida cronológica (CLS). Estas son definiciones experimentales que ayudan a entender el envejecimiento celular en.

Los estudios de la duración de la vida replicativa (RLS) se remontan a más de 50 años (Mortimer y Johnston, 1959). Desde sus orígenes en envejecimiento replicativo se define por la cantidad de células hijas que puede producir una sola célula madre antes de que deje de reproducirse y muera (Apoptosis), en castas palabras es lo que se define como vida útil replicativa (RLS) (Longo, et al.,2012)



Figura 2. Representación del envejecimiento replicativo

Debido a que el envejecimiento replicativo ocurre en una escala de tiempo de días en lugar de semanas, tiene el potencial de interactuar sin problemas con dispositivos de microflúidos y microscopía de fluorescencia. Para este trabajo, será menester manejar la microscopia de fluorescencia.

Otro factor a considerar es la elección de condiciones de crecimiento que pueden repercutir en los estudios de envejecimiento y efectos importantes en los resultados experimentales. Para ello se siguen una serie de protocolos que pueden tener alteraciones pequeñas dependiendo del experimento en cuestión, no obstante, siguen un patrón en un medio rico en presencia de glucosa al 2 % (peptona dextrosa de levadura [YPD]).

2.3 Chronological Life Span

En los años 90, surge otra alternativa a la ya mencionada duración de la vida replicativa, denominada duración de la vida cronológica y actualmente utilizado por varios laboratorios en todo el mundo. (Fabrizio y Longo 2003; Longo et al. 1996). Definida como el tiempo de supervivencia máximo de las poblaciones de tiempo que no se dividen.

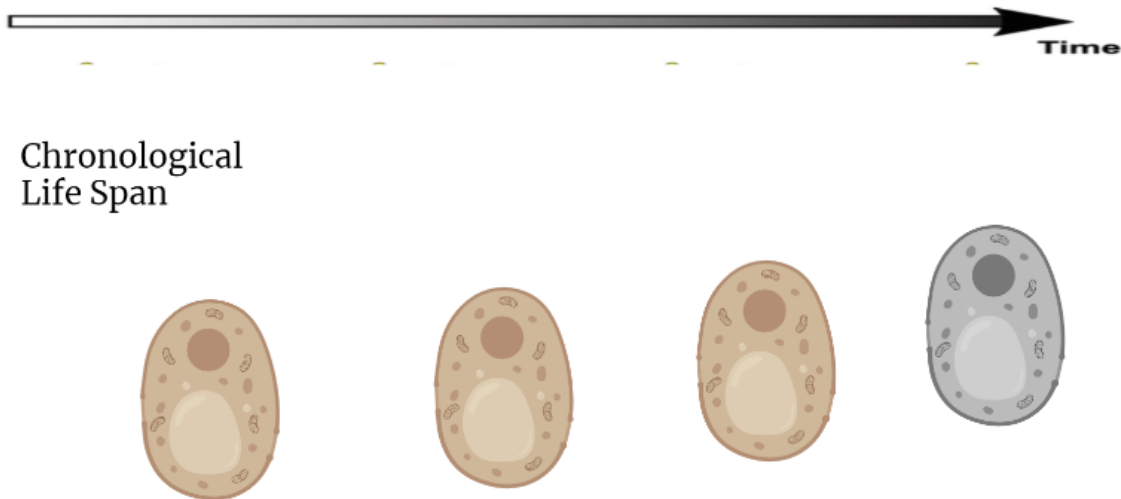


Figura 3. Representación del envejecimiento cronológico

Para medir el envejecimiento cronológico se mide el tiempo en que las células permanecen en estado estacionario o de cero divisiones; este tiempo es mucho más extenso que el tiempo de RLS, por lo que estos experimentos pueden durar semanas antes de llegar a la muerte celular (Apoptosis).

Así como en la duración de la vida replicativa, los cambios en el medio, la condiciones o las técnicas pueden generar grandes efectos en la supervivencia cronológica.

2.4 Curva de envejecimiento (RLS)

Generalmente conocida por medir el envejecimiento replicativo de una muestra de células, en este caso *saracchomyse cerevisiae*, en un tiempo determinado.

El procedimiento para la construcción de una curva de envejecimiento es establecer un número de células, donde se obtienen una distribución en la división en función del tiempo o en el número de replicas (generaciones) en función del tiempo, hasta el determinando momento en que no pueda proliferar. Para el presente trabajo se realizará en términos de las generaciones debido a su practicidad.

2.5 Curva de supervivencia: Análisis de supervivencia

En biofísica, como en muchos campos de la física, suele ser recurrente la experimentación de variables en función del tiempo. Desde la perspectiva unicelular, diversos estudios que se realizan en crecimiento o muerte celular (en función del tiempo) tienen la particularidad de que el sistema estudio (la célula), presente sesgo en la elaboración de los datos por la pérdida o desaparición de las mismas células. Como una implementación más para apoyar las investigaciones a nivel single cell, el análisis de supervivencia brinda una serie de tratamientos estadísticos para las curvas de envejecimiento. Particularmente en los análisis de supervivencia se define un “evento de interés. Por evento, es referido a muerte, incidencia de enfermedades, recaída de la remisión, recuperación (p. ej., regreso a trabajo) o cualquier experiencia designada de interés que le puede pasar a un individuo (Kleinbaum et al). Para el presente trabajo se considere menester abordar el evento como muerte o inviabilidad de la célula. Con estos estudios, ocurren las denominadas censuras, definidas como la inexactitud en el tiempo de supervivencia debido a diversos factores tales como: el objeto estudio se pierde durante el seguimiento o que el objeto estudio no experimente el evento de interés.

Un ejemplo general para evidenciar los aspectos a tener en cuenta, en los estudios de análisis de supervivencia es:

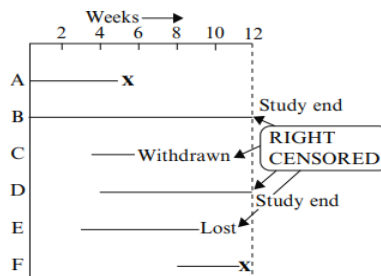


Figura 4. Situaciones a considerar en el análisis de supervivencia. . Tomada de: Kleinbaum.D, K. M. (2012). *Introduction to Survival Analysis - Statistics for Biology and Health*.

Donde las situaciones A y F, representan una correcta ejecución del evento de interés. B y D representan estudios en diferentes comienzos, pero en los cuales no se dio el evento de interés, para lo cual esta censurado. Finalmente, C y E, representan desaparición del objeto a analizar, sesgando la toma datos y aumentando el error experimental en el estudio. Estas situaciones se consideran censuradas.

3) Difusión: Antecedentes Históricos

La difusión es un concepto interdisciplinar que tiene implicaciones en Química, Física, Biología, Sociología entre otros. Particularmente en física, química y biología la difusión se entiende como primer momento, un mecanismo de transporte en donde las partículas u otras cantidades se mueven de un lugar a otro. Estos movimientos son de carácter desordenado, donde pueden tener desplazamientos con cambios de dirección al rebotar con otras partículas, a la difusión en el contexto molecular en ocasiones se le llama proceso de camino desordenado.

Hay dos maneras de visualizar el espectro de la difusión. Una perspectiva es desde el modelo atómico y la otra es fenomenológica a partir de la ley de Fick de la difusión.

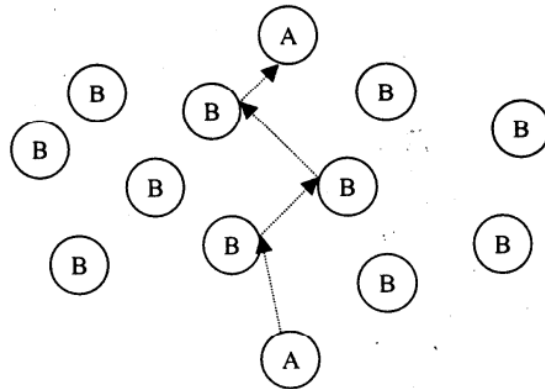


Figura 5. Diagrama esquemático del proceso de difusión. Imagen tomada de <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/10339/Capitulo1.pdf>

3.1 Movimiento Browniano

Propuesto por Albert Einstein en un importante artículo titulado: On the movement of small particles suspended in stationary liquids required by the molecular-kinetic theory of heat.

Se describe como el movimiento de partículas con desplazamiento irregular e impredecible suspendidas en la superficie de un fluido. A pesar de que la primera descripción teórica fue desarrollada por Einstein y Smoluchowski en términos de probabilidad y aproximaciones. Fue el británico Robert Brown quien observó el hecho fenomenológico en un primer instante histórico, observó el movimiento continuamente agitado de diminutas partículas expulsadas de ciertos granos de polen bajo un microscopio óptico.

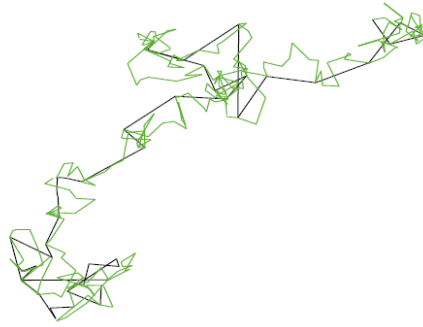


Figura 6. *Movimiento Browniano. Imagen tomada de Galicia Edith, 2007*

Comúnmente referenciado como movimiento con trayectoria irregular y azarosa, evidenciado desde un primero momento por Brown. Puntualmente se destaca que el desplazamiento de las partículas entre dos instantes, es independiente de las posiciones anteriores que hayan tenido. Como consecuencia la probabilidad que rige el movimiento de la partícula solo depende de la distancia temporal (Galicia, 2007.)

La forma básica de la ecuación de difusión Browniana es:

$$\langle x^2 \rangle = 2D\tau \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

$\langle x^2 \rangle$ es el valor esperado del cuadrado de la posición de la partícula,

D es el coeficiente de difusión

t es el tiempo.

Para el caso particular del movimiento Browniano, se estima como $\alpha = 1$

3.2 Sobre la Difusión Anómala

En la difusión clásica, el desplazamiento cuadrático medio aumenta linealmente con el tiempo. Pero en presencia de obstáculos o sitios de unión, puede ocurrir una difusión anómala, en la que el desplazamiento cuadrático medio es proporcional a una potencia no integral del tiempo para algunos o todos los tiempos (Saxton M, 1996)

3.2.1 leyes de potencias: Las leyes de potencias son las leyes más frecuentes en las que el escalonamiento describe la invariación de la relación encontrada en muchos fenómenos naturales. (Edith Jurado, 2007). Y Matemáticamente se expresa como:

$$f(x) = cx^\alpha$$

donde c es la constante de proporcionalidad y α el exponente (constante) de la ley de potencias. Utilizando el recíproco de una función exponencial, la ley de potencias, puede ser expresada como una función lineal.

$$\text{Log } f(x) = \text{Log } cx^\alpha$$

$$\text{Log } f(x) = \text{Log } c + \alpha \text{Log } x$$

La ordenada al origen es el punto de corte en Y, por ende, el logaritmo de la constante de proporcionalidad. La pendiente de la recta, será la potencia que caracteriza al fenómeno. En matemáticas, varias ecuaciones exhiben un comportamiento de auto similitud o verdaderas para todas las escalas. Desde este punto de vista físico, las escalas están limitadas por las dimensiones del mundo real.

3.3 Difusión anómala

Desde el análisis estadístico se define a la difusión normal como el aumento lineal de la varianza para cualquier tiempo τ en el caminante aleatorio. Sin embargo, en la naturaleza no siempre el promedio de los cuadrados de la distancia crece conforme pasa el tiempo. La difusión anómala aparece en sistemas desordenados o en sistemas que se encuentran lejos del equilibrio termodinámico (J. Bouchaud et al, 1990). Sea cual sea el sistema estudio, con comportamiento caótico, la difusión anómala manifiesta un comportamiento en forma de ley de potencia:

$$\langle x^2 \rangle \propto \tau^\alpha = 2D\tau^\alpha \quad \text{Ecuación 2}$$

Para $\alpha \neq 1$.

Como la potencia α es diferente de 1, tenemos varios casos a ilustrar bajo el régimen anómalo, si y solo si las distribuciones de probabilidad que definen la caminata aleatoria, las distribuciones de saltos y de tiempos de espera, son distribuciones libres de escala. (Edith Galicia, 2007).

Los casos en los que la potencia α varía son:

- subdifusión ($0 < \alpha < 1$)
- difusión normal ($\alpha=1$)
- superdifusión ($1 < \alpha < 2$)

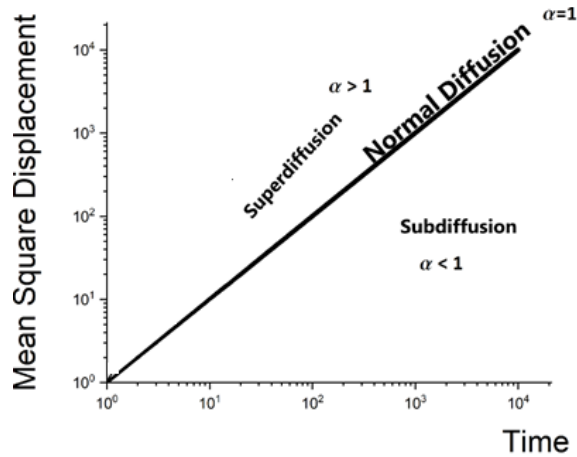


Figura 7. Difusión anómala, escalamiento de la ley de potencia del desplazamiento cuadrático medio (MSD) con el tiempo. Tomada de Lévy Flights Diffusion with Drift in Heterogeneous Membranes

En contraste con la difusión normal, en la subdifusión y la superdifusión las partículas exhiben una magnitud menor o mayor en el desplazamiento cuadrático medio. Específicamente en subdifusión un movimiento desacelerado del MSD con respecto al tiempo, por otro lado, en la superdifusión el MSD aumenta por encima del comportamiento lineal de $\alpha=1$. Estos casos resultan en caminatas más erráticas, por lo que se concluye en un incremento o disminución de la dispersión de las partículas en un medio.

$\alpha = 1$ implica un movimiento libre y no restringido de las partículas, como un medio homogéneo y sin obstrucciones.

$\alpha < 1$ sugiere que las partículas están encontrando obstáculos o barreras en su movimiento, lo que resulta en una difusión más lenta.

$\alpha > 1$ implica que las partículas están experimentando un movimiento más rápido y menos restringido que en la difusión normal.

4) Métodos de caracterización de propiedades Físicas

4.1 Reología y Microreología

La célula como coloide se presenta en un estado de la materia que en algunos estudios se determina como liquido con comportamiento de sólido (Romaric et al, 2015). Además, las células pueden considerarse como materiales complejos y organizados a nivel microscópico, donde una importante parte de la célula como el citoplasma, se puede aproximar a un material complejo y viscoelástico. El estudio de materiales viscoelásticos se llama reología (Bonucci et al, 2023). En materia condensada, suelen estudiar la deformación y el flujo de materia en materiales. La reología como rama de la física de la materia condensada, Se centra en entender cómo los materiales, como los fluidos y los sólidos deformables, responden a las fuerzas. Sin embargo, para contextos de ínfimo tamaño la reología no funciona a plenitud.

Aquí nace la microreología, esta subdivisión de la reología se enfoca en la observación del movimiento de partículas trazadoras incorporadas en materiales y como principal novedad a escala, adentro de la célula. La microreología permite la caracterización de alto rendimiento de las propiedades celulares en entornos extracelulares complejos (Bonucci et al, 2023). Inicialmente la microreología nació con sondas in vivo, que permitía razonar al mismo tamaño intracelular, en los inicios históricos de este campo se han utilizado partículas endógenas y exógenas como sondas de microreología in vivo (Weihs, et al, 2006). Por ende, la microreología ofrece una medida más detallada de la mecánica celular, proyectándonos los comportamientos a nivel molecular de los materiales desde el punto de vista cinemático como por ejemplo difusión y mecánico como el de fuerzas aplicadas a el sistema estudio.

4.2 GEMs(Genetically Encouded Multimerical Nanoparticles)

Nanopartículas multiméricas codificadas genéticamente (GEM) como sondas de micro reología, son conjuntos fluorescentes brillantes de tamaño y forma definidos (Liam et al). Diseñados por Benjamin Engel del Instituto de Bioquímica Max Planck y Liam Holt de la Universidad de Nueva York como alternativa de cuantificar de una manera eficaz, algunas propiedades físicas en las células. Concretamente en el interior de las células. Estas GEMs se componen de andamiajes cimentados en proteínas estructurales homomultimericas fusionadas con proteínas fluorescentes. (Delarue et al. 2018)

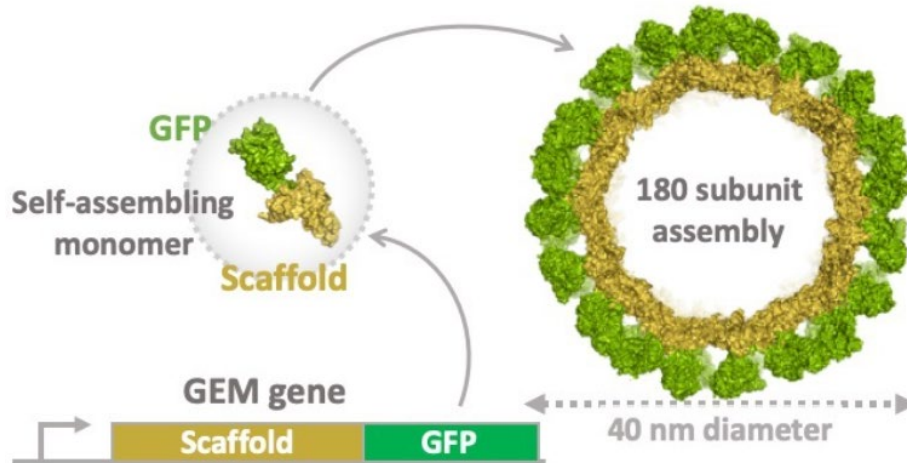


Figura 8. Ilustración de nanopartículas multiméricas codificadas genéticamente. Tomada de: *nucGEMs probe the biophysical properties of the nucleoplasm*

Expresadas por la propia célula, para nuestro caso *saracchomyse cerevisiae*, conducirá a la producción y ensamblaje continuos de nanopartículas fluorescentes brillantes que serán observados por medio de un microscopio de fluorescencia.

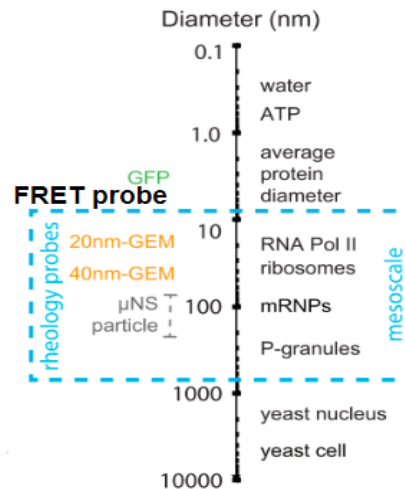


Figura 9. Diámetros de GEM y otras macromoléculas en la escala de longitud meso, mostrados en relación con moléculas pequeñas, complejos proteicos y células. Imagen tomada de: *mTORC1 Controls Phase Separation and the Biophysical Properties of the Cytoplasm by Tuning Crowding. Cell. 2018*

4.3 GEMspa:

GEMspa es un programa de análisis de seguimiento de trayectorias individuales. Un paquete de software para el análisis de datos SPT (Sarah Keegan et al). Este procesador implementa una interfaz gráfica con código abierto en el lenguaje de programación Python, con algoritmos de rastreo individual, que suministra un método directo de extracción de parámetros básicos en el seguimiento de trayectorias. La trayectoria generalmente se analiza utilizando métodos estadísticos para extraer información sobre la dinámica subyacente de la partícula. La GUI de GEMspa está diseñada para seguir el flujo de trabajo de análisis, lo que permite al investigador establecer parámetros y visualizar los resultados en cada paso. (Sarah Keegan et al). Generalmente la metodología del manejo de GEMspa depende del experimento, la configuración de parámetros y los estudios que se quieran realizar. No obstante, una vez que se obtienen las imágenes de la situación y población a estudiar, el software nos lleva por la siguiente ruta: (1) localización de partículas, (2) vinculación de posiciones de partículas localizadas, y (3) cuantificación del movimiento de partículas e inferencia de las propiedades de interés.

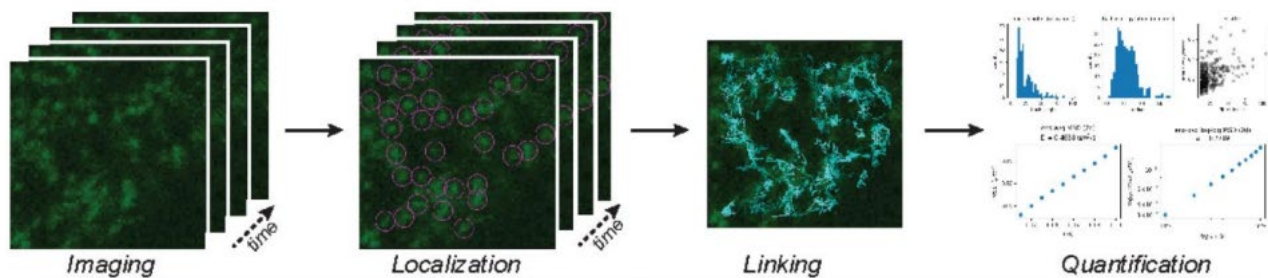


Figura 10. Ilustración los pasos del análisis de datos SPT. Toma de: GEMspa a Napari plugin for analysis of single particle tracking data

Localización: dada la densidad de células que se observan, la localización de una célula, se focaliza por medio de Trackpy, un complemento con lenguaje de programación Python que permite ajustar y acotar parámetros, diferenciando la célula desde el fotograma, hasta el tamaño que se debe considerar para eliminar el posible ruido asociado a otras partículas o ruido. Recortando todos los valores de píxeles por debajo de un valor especificado.

Enlace: Para la vinculación de las posiciones de las partículas en los trayectos, se utiliza la función de enlace. Esta función implementa el paso de vinculación desde el algoritmo de Crocker y Grier 33. (Sarah Keegan et al). La entrada en el algoritmo, conlleva una tabla de posiciones de las partículas para cada frame y asumiendo un movimiento browniano en cada frame.

5) Protocolos: Variaciones en el medio

Se realizaron los siguientes protocolos en el laboratorio de biofísica en la Universidad de los Andes paralelamente al trabajo de análisis de imágenes y de simulación:

- El medio SD “Synthetic Drop-out” es un medio mínimo con pocos nutrientes; los suficientes para ocasionar crecimiento en las células.
- El medio YPD es un medio rico en nutrientes, es versátil y puede ser modificado para adaptarse a diferentes necesidades experimentales.
- El medio SC “Synthetic Complete” es un medio rico en nutrientes que cuenta con las características necesarias para el crecimiento óptimo de las células.

5.1 Preparación de medios

Materiales YPD

- 10 g de extracto de levadura
- 20 g de peptona
- Si se hacen placas añadir 20 g de agar
- 2% (p/v) de glucosa (20 g)

Procedimiento

- a. Se prepara 2 schott de 500 ml cada uno, previamente esterilizados.
- b. Agrega 500 ml de miliQ en cada frasco
- c. En el primer frasco, coloca 10 g de Yeast (Extracto de Levadura) y 20 g de suplemento Peptona. Mezcla hasta que se disuelvan.
- d. Vierta en una fiola cada frasco con la cantidad que contiene cada uno.
- e. Marca ambos frascos y luego autoclávalos.
- f.
- g. Recomendación: Realiza estos pasos en una campana de extracción y etiqueta los frascos con el nombre, tipo de medio y fecha.
- h.
- i. Cada schott añadir 50 ml de glucosa al 40 %.

Recomendación: Realiza estos pasos en una campana de extracción y etiqueta los frascos con el nombre, tipo de medio y fecha.

Materiales	
Medio liquido SD “Synthetic Drop-out”	Medio liquido SC “Synthetic Complete”
6700 mg YNB (Yeast Nitrogen Base). 750 mg DO supplement. 2 Schott de 500 ml 1000 ml de milliQ 20 g D - Glucosa. 20 mg D - Histidina 20 mg D-Uracil. Filtro de 0,22 μ m. Bomba de vacío.	6700 mg YNB (Yeast Nitrogen Base). 2000 mg DO supplement. Schott de 500 ml 1000 ml de milliQ 20 g D - Glucosa. 80 mg D - L Triptófano. 80 mg D - Histidina. 80 mg D - Uracil. Filtro de 0,22 μ m. Bomba de vacío.
Medio solido SD “Synthetic Drop-out”	Medio solido SC “Synthetic Complete”
+ 20g Agar	+ 20g Agar

Tabla 1. Componentes para la preparación del medio liquido/solido de SD (SyntheticDrop-out) y SC (Synthetic Complete).

Procedimiento para la preparación de los medios líquidos SD y SC:

Primera preparación – Medio líquido SD:

- Utiliza dos frascos de 500 ml previamente esterilizados.
- Agrega 500 ml de agua MilliQ en cada frasco.
- En el primer frasco, coloca 6700 mg de YNB (Base de Nitrógeno de Levadura) y 750 mg de suplemento DO. Mezcla hasta que se disuelvan.
- Marca ambos frascos y luego autoclávalos.

Recomendación: Realiza estos pasos en una campana de extracción y etiqueta los frascos con el nombre, tipo de medio y fecha.

- En el segundo frasco con agua MilliQ, agrega 20 g de D-Glucosa, 20 mg de D-Histidina y 20 mg de D-Uracilo. Mezcla hasta disolver.

f. Enciende la bomba de vacío y conéctala a un filtro de 0,22 μm .

g. Conecta el filtro al primer frasco con la primera mezcla.

Segunda preparación - Medio líquido SC:

a. Utiliza dos frascos de 500 ml previamente esterilizados.

b. Agrega 500 ml de agua MilliQ en cada uno.

c. En el primer frasco, coloca 6700 mg de YNB (Base de Nitrógeno de Levadura) y 2000 mg de suplemento DO. Mezcla hasta que se disuelvan.

d. Marca ambos frascos y luego autoclávalos.

Recomendación: Realiza estos pasos en una campana de extracción.

e. En el segundo frasco con agua MilliQ, agrega 20 g de D-Glucosa, 80 mg de D-L Triptófano, 80 mg de D-Histidina y 80 mg de D-Uracilo. Mezcla hasta disolver.

f. Enciende la bomba de vacío y conéctala a un filtro de 0,22 μm .

g. Conecta el filtro al primer frasco con la primera mezcla.

h. Agrega la segunda mezcla al filtro de forma gradual hasta que pase completamente por él.

i. Divide en varios recipientes para un mejor manejo y para evitar la contaminación del medio.

Tercera preparación - Medio sólido SD / SC:

a. Agrega 20 g de agar a la mezcla del primer frasco (YNB + suplemento DO), según sea para el medio líquido SD o SC, y continúa con el procedimiento.

b. Después de verter la segunda mezcla en el primer frasco, verifica que siga en estado líquido y sírvelo inmediatamente en placas antes de que se solidifique.

Recomendación: Si la mezcla se solidifica, caliéntala en intervalos de 30 segundos en un microondas o en una plancha térmica hasta que vuelva a estar líquida.

j. Reparte en varios recipientes para un mejor manejo y para evitar la contaminación del medio.

5.2 Recuperación de células

Materiales para la recuperación de células:

- Recipiente con nitrógeno
- líquido Equipo de seguridad
- Puntas de 1 ml y 20 μm
- Micropipeta de 1 ml Cepa

Procedimiento

Para prevenir que las células se activen y por seguridad se conservan en un ambiente frío y controlado. Normalmente se encuentran en un refrigerador a una temperatura de -80 °C.

- a. Prepare el equipo de seguridad y pórtelo debidamente.
- b. Prepare un recipiente para cargar el nitrógeno líquido y almacenar las células mientras se realiza la extracción de muestra.
- c. Diríjase al refrigerador y extraiga la muestra de células de alguna de las 8 cepas presentes, coloque la de su preferencia dentro del recipiente y diríjase de nuevo al laboratorio.
- d. Esterilice la zona de trabajo con alcohol o hipoclorito y prepare un mechero, dos falcon con medio líquido (ml aprox.), marcador y cinta.
- e. Ubique en la zona segura el frasco donde se aloja la muestra de células congeladas, destape y raspe con ayuda de una punta de 20 μm .
- f. Atrape una parte pequeña de los residuos generados al raspar e introdúzcalos en el falcon, marque y selle de manera que se permita la oxigenación a las células.
- g. Reserve en la incubadora a 30 °C y espere hasta que crezcan las células.

5.3 Microscopia

Materiales:

- Lamina y Laminilla
 - Laminilla
 - Papel Kim vapers
 - MiliQ
 - Microscopio de fluorescencia
 - Filtros de excitación/emisión
 - Cultivo de levadura
- a. Esterilice la zona de trabajo con etanol
 - b. Se agrega etanol a la laminilla y tome un pedazo de papel Kim para limpiar la lamilla
 - c. Se agrega etanol a la lámina y tome un pedazo de papel Kim para limpiar la lamina
 - d. prepare un mechero y seguidamente realice los pasos del protocolo de recuperación de células.
 - e. Coloque 1 μl de célula, seguidamente coloque una gota de miliQ en dilución con la célula (Figura 11.A)

- f. Coloque la laminilla en la zona de dilución y asegúrese de que no haya burbujas en el aire
- g. Encienda el microscopio, el computador y los láseres con filtros a utilizar.
- h. Abra el programa para el análisis de imágenes Nis-Elements y Configure el sistema de adquisición de imágenes
- i. Observe las células de levadura bajo los objetivos de microscopio de fluorescencia. (Figura 11.B)
- j. Adquiere imágenes en diferentes canales

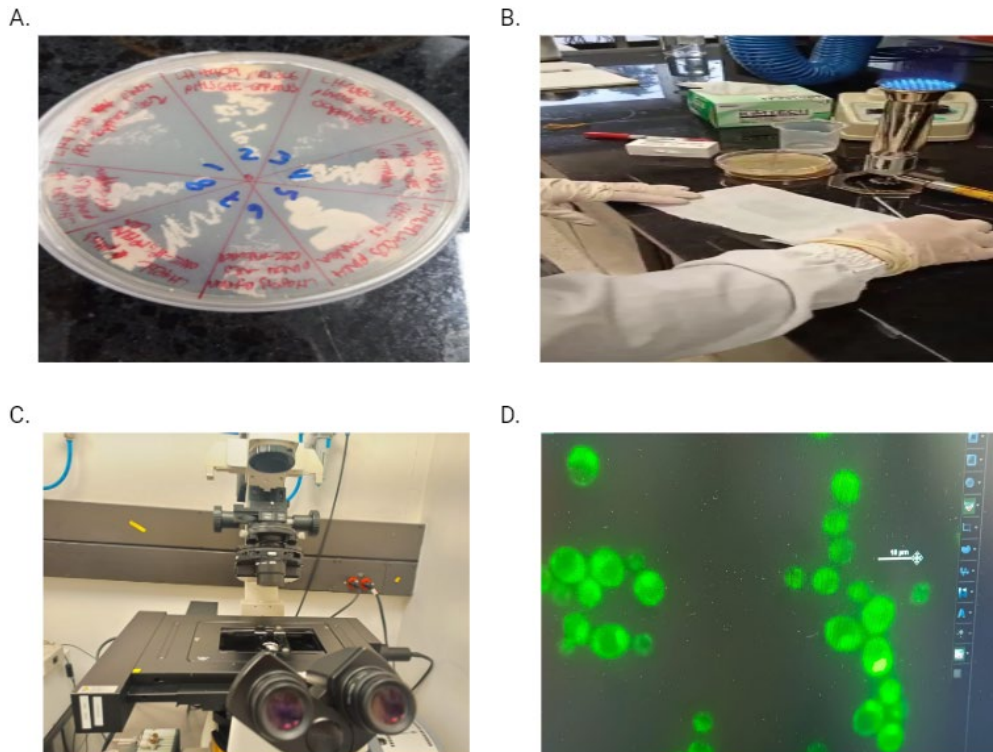


Figura 11. A) Cepas de la célula *Saccharomyces cerevisiae* B) preparación de lámina y laminilla
C) Microscopio TIRF Nikon con la muestra de la cepa #3 D) visualización Gems mediante el programa Nis-Elements

6) Resultados

una vez preparados los medios, los cultivos de las células y recuperación de las mismas, procedemos a visualizar las células por medio del microscopio de fluorescencia. las células fueron atrapadas en un dispositivo de microfluídos y observadas durante su vida, se vuelve a reiterar que de los protocolos hechos en los andes, no se tomaron datos para el presente trabajo, debido a la complejidad que esto presentaba además de la capacitación profesional que esto demandaba en tiempos. Para lo cual en conjunto con David Duran (Candidato a Doctorado en física), se realizó el manejo de datos, análisis de imagen, simulaciones y el proceso estadístico pertinente. Los protocolos y el equipo utilizado por David Duran en el laboratorio Holt Lab adscrito a la Universidad de New York, es similar a las condiciones suministradas por el laboratorio de biofísica de la universidad de los andes.

El microscopio empleado en el laboratorio Holt Lab posibilita realizar un barrido en diferentes secciones del canal, obteniendo capturas de dichas secciones cada 10 milisegundos y obteniendo múltiples imágenes que son procesadas en formato de video para posteriormente realizar su análisis. La distribución de las trapas estará mediada por una matriz de 7x4(7 filas, 4 columnas) distribuidas una distancia equivalente entre ellas. Una vez, detallada la sección de las trapas, se configura el microscopio para la toma de fotografías y almacenamiento de los datos.

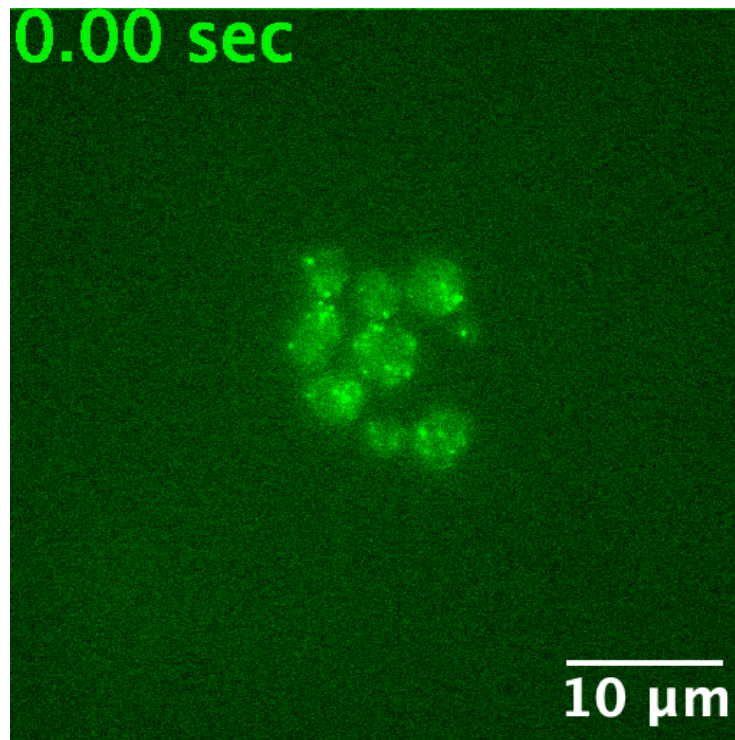


Figura 12. Película de Gems de 400 frames

6.1 Manejo de datos:

Una vez transformadas las imágenes, en formato de video, se permite el análisis, mediante el paquete de procesamiento de imágenes Fiji-ImageJ y Nis-elements, en el canal de fluorescencia brightfield combinado con algunos filtros en rojo, verde, azul y morado. La instrucción y/o organización de los videos se distribuyen por diferentes posiciones en el chip de microfluidos, para una óptima visualización. Con los nombres FOV20, FOV21.

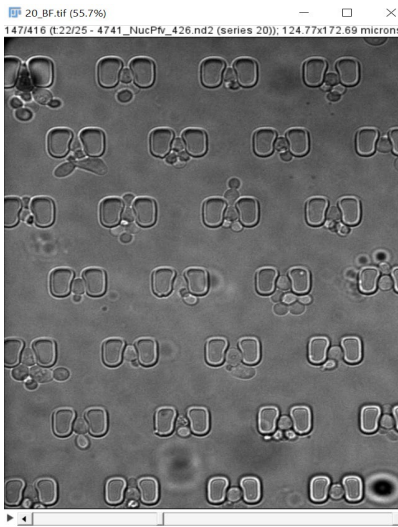


Figura 13. procesamiento de imágenes en video, visualización para el video 20 desde el canal BF.

El programa permite la visualización de cada frame en el canal Brithg Field. Donde cada frame:

$$1 \text{ frame} = 10 \text{ minutos}$$

La división de las células se observa de manera individual y con un promedio de tres observaciones para asegurar un menor rango de error. Algunas trampas al comenzar el video, no poseen célula madre. Otras madres, se pierden conforme aumenta el tiempo y otras simplemente se mueren. Para dar una mayor organización se planteó una serie de tablas que se visualizan en la parte de anexos.

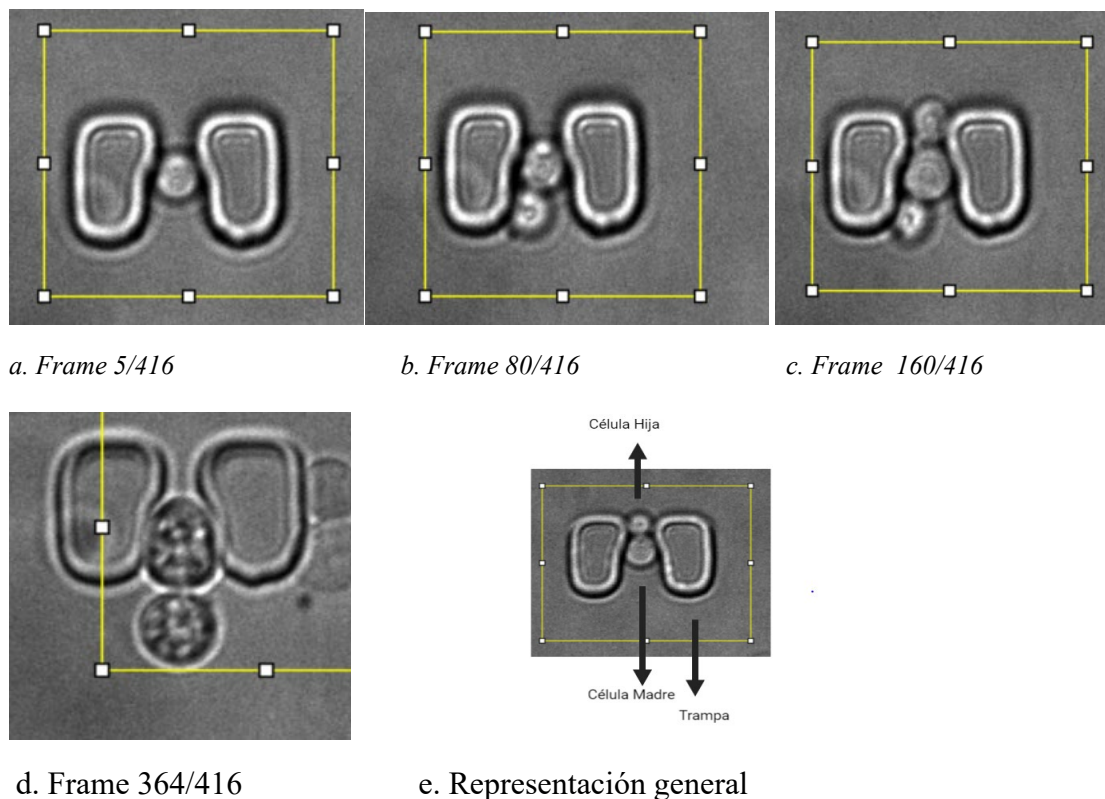


Figura 14. Mediciones de la vida útil replicativas en diferentes intervalos de tiempo.

La figura 18, muestra como es la replicación de las células madres para diferentes frames. Los dos grandes círculos simétricos son las trampas, en el medio se encuentra la célula progenitora, por ultimo las células hijas con un menor tamaño en las partes superior o inferior. La parte (a) muestra a la célula progenitora sin replicación emergente. (b) la célula progenitora con replicación completada. (c) la célula progenitora con una mayor cantidad de replicaciones. (d) la célula progenitora en estado de apoptosis, después de una cantidad considerable de frames.

Para permitir un seguimiento orientado a su tiempo de división y muerte. Se construyeron una serie de tablas, donde se registra cada tiempo de división de las células progenitoras y otras especificaciones:

- a= apoptosis , d= división, l= perdida, e = vacía, i = inviable

6.2 Intervalo de Entrada en Senescencia

La matriz y los respectivos datos de replicación nos permiten evidenciar cada periodo de división, desde el régimen RLS. Se analizo cada célula progenitora, se obtuvieron resultados diferentes, debido a que los tiempos de replicación entre generaciones no son equivalentes entre sí. Por otro lado, los datos nos describen un punto abrupto, en la división celular para cada célula progenitora,

monitoreando la dinámica de las divisiones, concluimos en una región de cambio abrupto en la frecuencia de división, presente en la mayoría de las células. Para ahondar un poco más esta región de entrada en el SEP, es necesario realizar un análisis de regresión de estadística inferencial en el marco de contraste de test de hipótesis que implica la recolección de datos, en este caso generaciones y tiempo de división con la convicción de afirmar que tan correlacionados están estas dos series de datos. La afirmación suele dividirse en dos hipótesis: La hipótesis nula que Usualmente, se afirma que no hay efecto, no hay diferencia o no hay relación entre los dos parámetros que tenemos. La hipótesis Alternativa que es la que busca evidencia de un efecto, una diferencia o una relación entre los dos parámetros que tenemos, dado el argumento principal el cual es que las células *Sarachomicye Cerevisiae* tienen un periodo de división entre 80 y 100 minutos

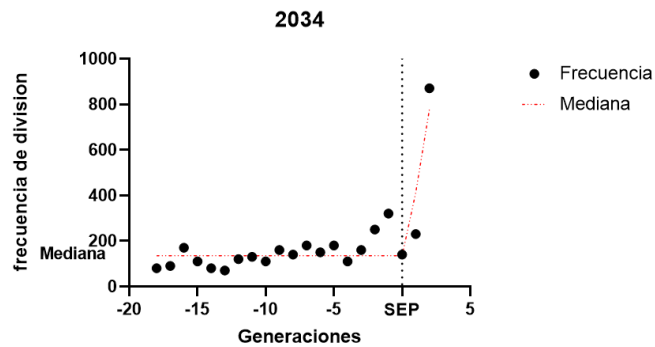
2034						
Estadísticas de la regresión						
Coefficiente d	0,57354254					
Coefficiente d	0,32895105					
R^2 ajustado	0,26184615					
Error típico	31,7265414					
Observaciones	12					
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Grados de libertad de cuadrado de los cua			F	valor crítico de F	
Regresión	1	4934,26573	4934,26573	4,90204252	0,0512077	
Residuos	10	10065,7343	1006,57343			
Total	11	15000				
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	81,8181818	19,5263364	4,19014505	0,00185753	38,3107931	125,325571
Variable X 1	5,87412587	2,65310667	2,21405567	0,0512077	-0,0373642	11,7856159

Tabla 2. Cálculo del valor crítico de F, mediante Excel

Utilizando el análisis de regresión lineal como índice de correspondencia entre las generaciones y sus tiempos de división. Uno de los aspectos a resaltar en el análisis de regresión, es el denominado valor crítico, asociado a la región de rechazo que invalida una hipótesis nula. Cuando una cierta cantidad de datos no están estrechamente relacionadas o no evidencian un comportamiento, el valor crítico tendrá una magnitud inferior a 0.05, concluyendo en efectos estadísticamente significativos para rechazarla hipótesis nula y un cambio entre los dos parámetros.

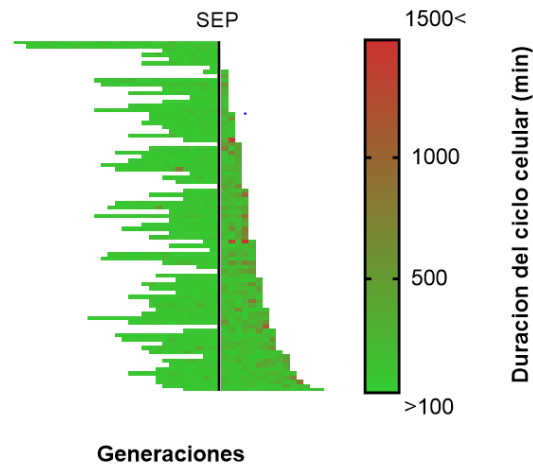
Aun así, este método no determina con exactitud, el punto de entrada en senescencia. En pro de lograr un mayor alcance de estimación, se aumenta la región para una mayor “confianza” estadística, en el SEP. Dado el respectivo valor crítico hallado, se toma el dato de la división al cual corresponde, nombrado como n y proponemos:

$$SEP = n-2$$



Gráfica 1. punto de entrada en SEP. frecuencia de división vs generaciones. para la célula 2034, con $n=21$

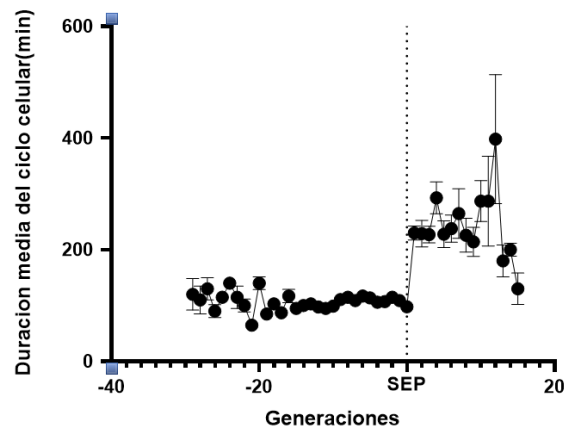
Además, se tomó en cuenta todos los datos de todas las células, para evidenciar el comportamiento agrupado del ciclo celular. Alineando todos los rastros de división hasta el punto de entrada en senescencia. La grafica que mejor evidencia datos agrupados para nuestro interés del ciclo celular, fue un heat map.



Gráfica 2. Duración del ciclo celular basados en la frecuencia de división. Para $N=88$

Cada línea horizontal representa una sola célula madre, y cada segmento corresponde a una división celular. Las líneas se agrupan verticalmente según la duración de la post-SEP.

Finalmente se calculó la media para cada generación en la duración celular antes y después del SEP. Los resultados certifican el cambio en la división celular, con una media después del SEP mayor a 200 min



Gráfica 3. *Duración media del ciclo celular.*

6.3 Creación de máscaras:

Las GEMs como partículas expresadas por las células de levadura, nos ayudan a cuantificar la difusión celular. Para el cálculo del coeficiente de difusión y demás magnitudes, es necesario acotar la localización de las trayectorias individuales en las células. Especificando el lugar de estudio (las células progenitoras), el software GEMspa analizara a profundidad la dinámica para cada posición por medio del x,y. La segmentación de cada célula progenitora, se le llamo mascara. La máscara se realizó de dos formas diferentes obteniendo resultados similares. La primera mediante el algoritmo generalista para la segmentación celular “CellPose”. Vinculado como extensión de Fiji-ImageJ, recorto cada célula madre para el frame requerido. El segundo método, se llevó a cabo de forma manual, delineando sobre cada célula, acorde a su tamaño.

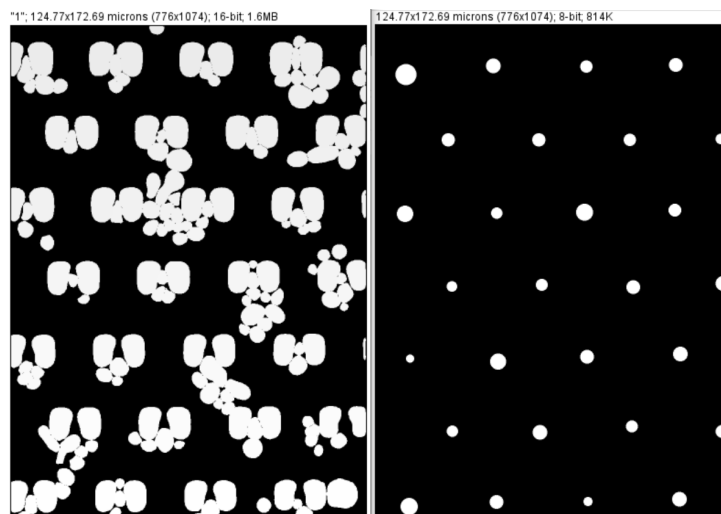


Figura 15. Creación de las máscaras a partir del algoritmo CellPose. B. Creación de las máscaras a partir de la extensión de recorte en Fiji-ImageJ.

Una vez acotada las regiones de análisis, se configura parámetros en el código tracking denominado Mosaic, expuesto en el apartado de GEMspa mediante Fiji para el correcta localización, seguimiento y cuantificación de la trayectoria de las partículas. Los parámetros se configuran de tal manera en función del recorte del frame a analizar (Duplicate), con su respectiva mascara y video, concluyendo en las trayectorias en formato Excel.csv. El diseño y variación de los parámetros se encuentran en los anexos para los diferentes videos (FOV20,FOV21)

Trajectory	Frame	x	y	z	m0	m1	m2	m3	m4	NPscore
1	1	0	592.748	60.367	0	2.116	1.558	3.062	6.711	15.927 0.029
2	1	1	591.395	62.662	0	1.563	1.539	2.921	6.130	13.880 0.056
3	1	2	590.843	65.598	0	1.999	1.701	3.569	8.242	20.334 0.015
4	1	3	591.110	65.669	0	2.098	1.607	3.230	7.188	17.225 0.021
5	1	4	591.266	64.816	0	1.667	1.537	3.022	6.673	16.028 0.038
6	1	5	590.995	66.269	0	1.652	1.582	3.098	6.731	15.775 0.054
7	1	6	590.953	66.521	0	1.814	1.465	2.727	5.658	12.749 0.029
8	1	7	591.625	62.128	0	1.662	1.597	3.204	7.117	17.001 0.048
9	1	8	591.440	62.411	0	1.886	1.606	3.185	6.955	16.294 0.032
10	1	9	591.369	62.776	0	2.252	1.455	2.692	5.600	12.769 0.017
11	2	0	498.128	103.411	0	1.540	1.541	2.962	6.291	14.384 0.084
12	2	1	497.107	108.239	0	1.257	1.472	2.722	5.568	12.310 0.100
13	3	0	346.578	270.236	0	1.472	1.456	2.679	5.497	12.258 0.078
14	3	1	346.052	269.630	0	1.443	1.394	2.412	4.596	9.460 0.055
15	4	0	344.745	277.862	0	5.753	1.401	2.474	4.843	10.284 0.008
16	4	1	343.979	277.695	0	4.063	1.441	2.633	5.389	12.059 0.007
17	4	2	344.274	278.203	0	4.230	1.437	2.576	5.095	10.879 0.009
18	4	3	343.544	278.323	0	4.072	1.359	2.327	4.405	9.040 0.007
19	4	4	343.757	278.831	0	3.774	1.387	2.394	4.562	9.400 0.006
20	4	5	343.474	278.897	0	4.389	1.380	2.378	4.529	9.335 0.009

Tabla 3. Trayectorias x,y para la célula 2033, expresadas del video FOV20

la cantidad de veces que fue detectada se evidencia en la columna Trajectory con su homónimo frame, para este caso, se puede apreciar como para la trayectoria número 1, se detectó en 9 frames. Para cada célula madre, se realizó el respectivo seguimiento en 2 dimensiones(x,y). las columnas m₀,m₁,m₂,m₃,m₄ hacen referencia a los niveles de medición dentro del mosaico. La columna NPscore es una medida de qué tan bien coinciden los vecinos más cercanos de las partículas de un cuadro a otro. Es una medida de confianza. Debido a que las puntuaciones mal altas fueron rastreadas con mayor precisión.

Una vez halladas las trayectorias, se abre el programa de seguimiento GEMspa desde el cmd. El software está inscrito en el lenguaje de programación Python. Donde establecemos y orientamos las principales características para la cuantificación de las trayectorias asociadas a las nanopartículas. Entre los principales resultados que dota el GEMspa, con base en características del movimiento (Vector Desplazamiento) hasta modelos matemáticos que describan el comportamiento cinético encontramos: El coeficiente de difusión efectivo, Mean Square Displacement (Desplazamiento cuadrático medio), Distribución de pasos, Distribución de ángulos, Coseno del ángulo en el cual residió la trayectoria, Radius of Gyration, Distribución del factor alfa, Estimaciones bivariadas, Función de autocorrelación de velocidades

Sin embargo, en el presente trabajo se ordenó, bajo el estandarte de resultados que necesitaron la resolución de la ecuación de la difusión y las características que orientan al vector desplazamiento.

El programa trabaja con base en las ecuaciones de la difusión browniana y anómala. En el caso de la difusión anómala, en ecuación 2, el programa las calcula dado los parámetros solicitados por el usuario. No obstante, la constante de difusión D y el factor alfa, son incógnitas a hallar. Como se señaló en el apartado sobre difusión Browniana, para un $\alpha=1$, se destaca el régimen Browniano, para $\alpha \neq 1$ otros. La inexactitud del régimen en el cual se expresan las GEMs y la constante de difusión asociada, forman el típico problema de una ecuación con dos incógnitas complicado de manejar. A tal situación, se introduce la logaritmación como en la ecuación 10. con la meta de un tratamiento estadístico y analítico más detallado.

$$\langle x^2 \rangle = MSD = 2D\tau^\alpha \quad \text{Ecuación 3}$$

Aplicando la función logaritmo

$$\text{Log } MSD = \text{Log } 2D\tau^\alpha$$

Por propiedades de los logaritmos

$$\text{Log } MSD = \text{Log } 2D + \alpha \text{Log } \tau \quad \text{Ecuación 4}$$

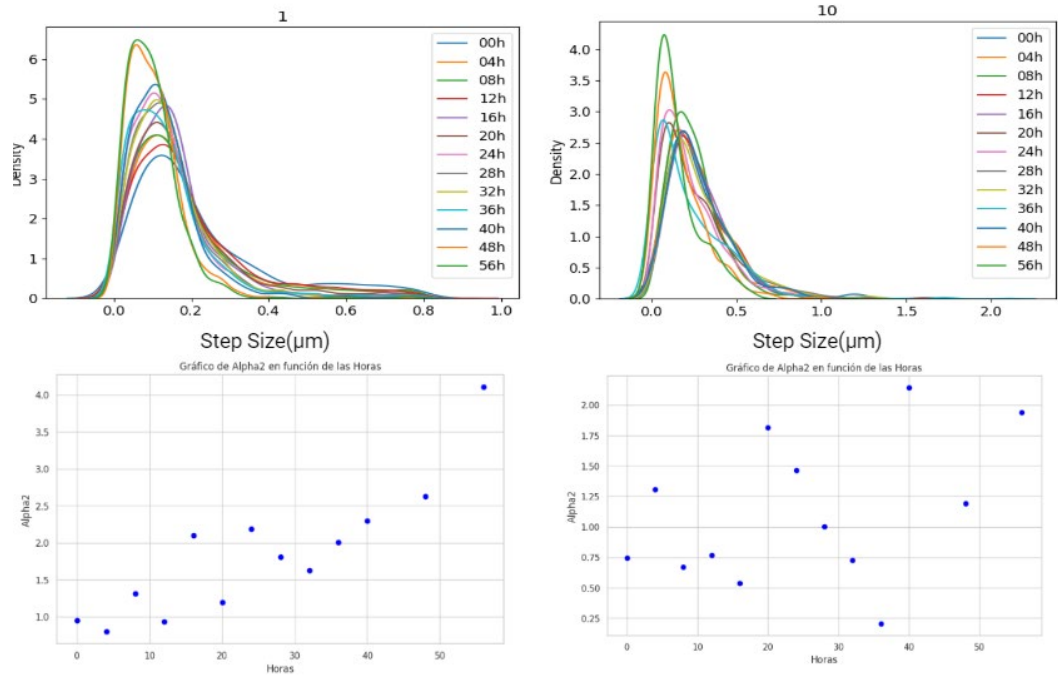
La ecuación 4, se asemeja a una ecuación lineal con punto de corte en el $\text{Log } 4D$ y pendiente α . Para la simplificación de los datos, GEMspa maneja la ecuación 4 desde diversos ajustes no paramétricos que evalúen los valores con mayor probabilidad de ocurrencia. Antes de ilustrar los resultados obtenidos con el software, se dividió el video denominado FOV20, de 0 horas hasta las 56 horas, se tomó estas particiones para maximizar la cantidad de información, minimizar los daños a las células, cuando son iluminadas en el microscopio.

7) Análisis de Resultados

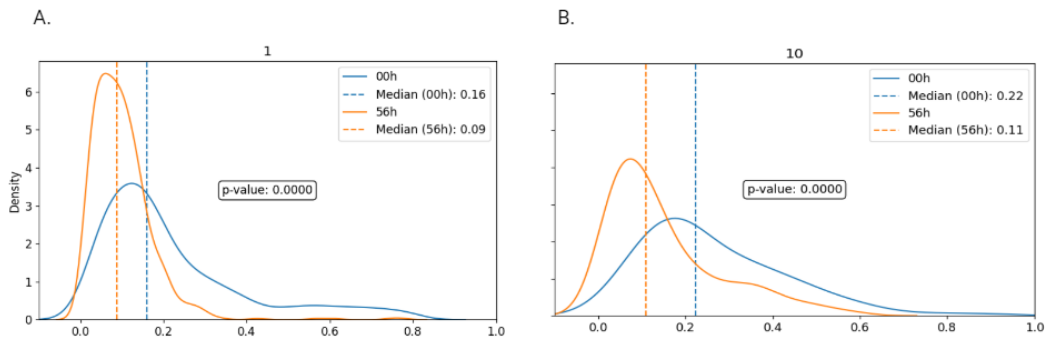
Tomamos el siguiente orden con el fin de abarcar todo el espectro de comportamiento que pueden tener las Gems para las diferentes definiciones de envejecimiento, comenzando con las propiedades fundamentales del vector desplazamiento como son la magnitud, dirección y la autocorrelación de velocidades. Seguido de los valores del exponente α y su correlación con el coeficiente de difusión, las trayectorias con MSD, coeficiente de difusión efectivo, además de algunas magnitudes como radius of gyration que estarán en anexos.

7.1 Replicative lifespan

Con el video FOV20, en la definición RLS se registraron y analizaron datos desde las 0 horas hasta las 56 horas para células de levadura de tipo WT con indicadores de envejecimiento tales como la entrada en la senescencia y las curvas de supervivencia y/o envejecimiento. Sin embargo, en todas las horas se evidencia que los valores posibles del factor α están por debajo de 1, ángulos con ciertos valores atípicos al browniano como también magnitudes de tamaño de salto y datos obtenidos de VACF. Estos resultados (se pueden evidenciar en anexos) nos hablan de un movimiento alejado del movimiento Browniano desde el comienzo hasta el final del experimento. Esto puede ser entendido desde diversas perspectivas, un ejemplo sería que durante su RLS, las células madres acumulan fenotipos de envejecimiento: por ejemplo, los tamaños celulares y vacuolares aumentan drásticamente, la frecuencia de división disminuye y se acumulan círculos de rDNA extra cromosómicos (ERCs) y agregados de proteínas (Wasko, B. et al, 2018 es posible que dichos elementos imposibiliten el movimiento de las Gems, aun con más fuerza, a medida que la célula se divida y posteriormente envejezca.



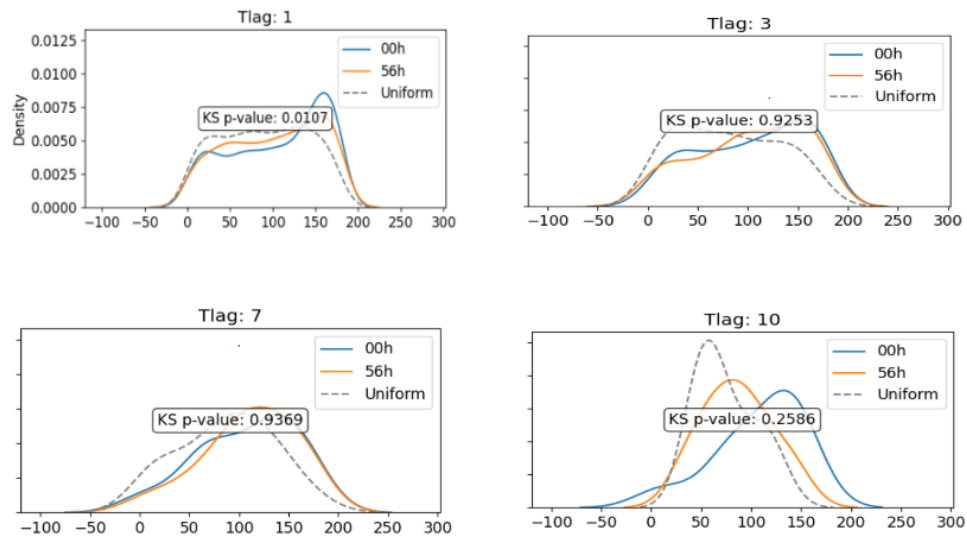
Gráfica 4. Distribución de paso de salto RLS FOV20 para frecuencias de muestreo mínima y máxima, calculadas con el Parámetro no gaussiano α_2 .



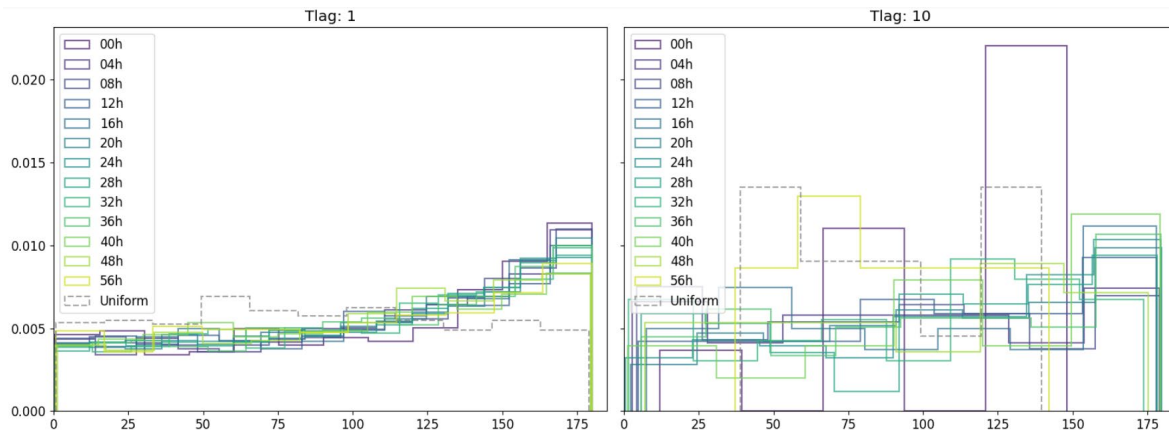
Gráfica 5. Comparación de distribuciones mediante la prueba de Wilcoxon para frecuencias de muestreo mínima y máxima

Para las distancias euclidianas entre posiciones de las GEMs, se ilustraron todas las horas de medida con diferentes frecuencias de muestreo, con el parámetro α_2 en la gráfica 4 nos propone una medida estadística de que tan gaussiana es la distribución. Finalmente se compararon todas las horas con la prueba de rangos con signos, esto con el fin de conseguir un peso estadístico satisfactorio de distinción entre distribuciones. Concretamente se destaca las magnitudes de salto

menores para las ultimas horas del envejecimiento replicativo (48 y 56 horas),o también un sesgo a la derecha lo que puede indicarnos menores magnitudes en el desplazamiento. Con ellos, los valores del parámetro α_2 son los más alejado de 0. No obstante, los valores no son lo suficientemente alejados de 0, para lo cual todas las horas presentan distribuciones aproximadas a distribuciones gaussianas. Además, detallamos el valor del p-valor, representado como la probabilidad de parentesco en las distribuciones, para nuestro caso un valor de 0, que retroalimenta la distinción significativa entre las medianas (gráfica 5). Por último, algunas distribuciones en frecuencias de muestreo máxima en las últimas horas, tienen cola pesada, indicando valores atípicos y lejos de una difusión estándar.

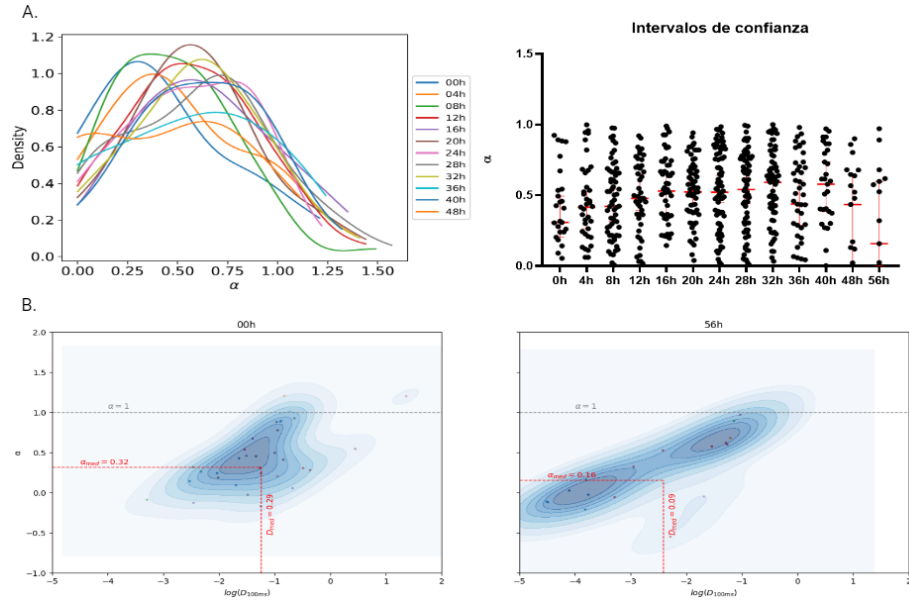


Gráfica 6. Distribución de ángulos en RLS FOV20 para frecuencias de muestreo pequeñas y grandes.



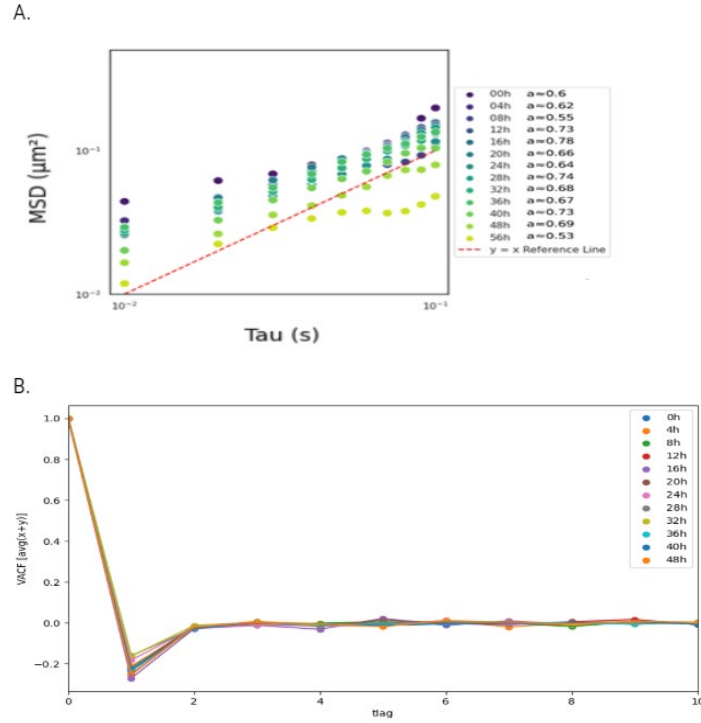
Gráfica 7. Distribución de ángulos en RLS FOV20 para frecuencias de muestreo mínima y máxima

Con el fin de apreciar cambios significativos en las direcciones de movimiento. Se aplicó la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnoff para evaluar si las dos muestras provienen de la misma distribución (Gráfica 6). Bajo la hipótesis nula de que los datos provienen de la misma distribución, o la hipótesis alterna de que los datos no provienen de la misma distribución, esto se logra bajo el estandarte de un valor p , representado como la probabilidad de parentesco en las distribuciones. En consecuencia, un valor de p (p -value) por debajo del umbral 0.05, lo que indica un rechazo a la hipótesis nula. Si el valor p es elevado, no disponemos de suficiente sustento para descartar la hipótesis nula; por ende, cabe la posibilidad de que los datos tengan una fuente común de distribución. En nuestro caso para diferentes Tlag, observamos que, en promedio, nos indica un p -value mayor al umbral, con una posible similitud estadística de las nanopartículas en su movimiento. Sin embargo, para comparaciones de 00 horas y 36 horas, 40 horas, nos detalla un comportamiento imparcial, dado que para tiempos cortos entre frames, suele apreciarse una probabilidad menor al umbral, pero con tiempos grandes se establece nuevamente el indicio de similitud estadística. Esta corroboración y comparación estadística es menester para conocer el posible régimen de movimiento de las GEMs en el interior de la célula. Para la gráfica 7, nos enfocamos en las frecuencias de muestreo máxima y mínima, donde distinguimos patrones de movimiento que están detallados en ciertos máximos que muestran información sobre procesos estocásticos. (Burov et al, 2013). Evidenciamos en frecuencia mínima una distinción de confinamiento en la mayoría de horas, que no se representa en frecuencia máxima con igual intensidad.



Gráfica 8. A. Función de densidad de Kernel para el factor α en de 0 a 48 horas. B) Estimaciones bivariadas entre el factor α y el LogD

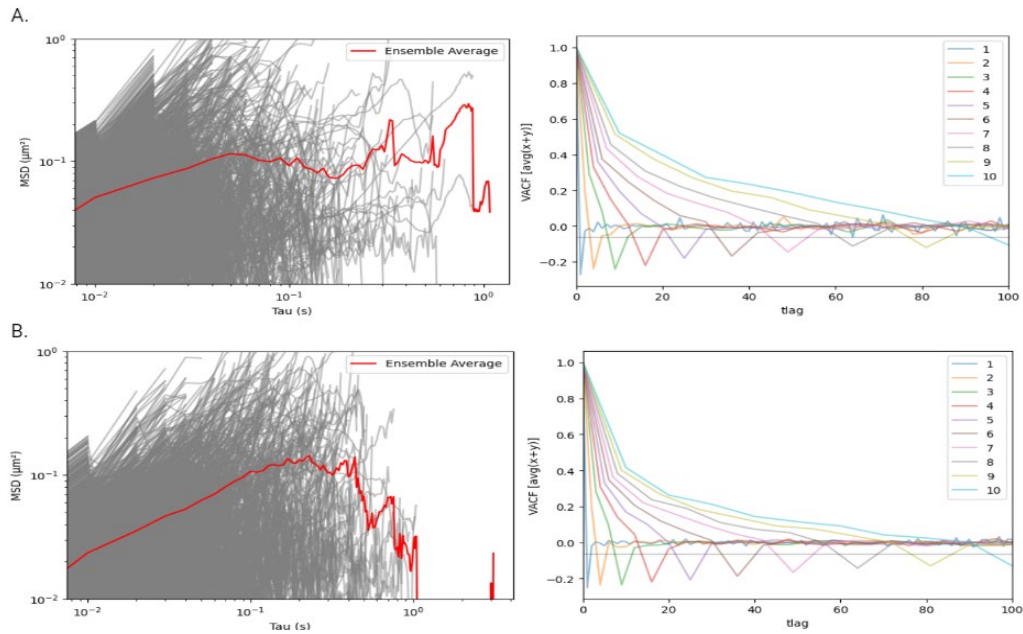
La gráfica 8.A detalla para todas las horas del FOV20, la distribución de factor acotada entre 0 y 1.50, con una mayor probabilidad de ocurrencia para aquellos valores $\alpha < 1$ y sus respectivos intervalos de confianza. Esto repercute en un régimen de subdifusión, en el interior de la célula. Estos resultados concuerdan con los supuestos teóricos, de la restricción de la movilidad en el interior de la célula (Mouton et al, 2023). No obstante, para un mejor análisis, es menester observar los datos del coeficiente D como en 8.B, aproximando con mayor certeza el entorno biológico y de movimiento. Para ello, observamos que conforme el factor α disminuye, el D aproximado baja lentamente, se puede interpretar como una disminución del espacio conforme el movimiento se vuelve más aleatorio, resultando en pasos pequeños de las GEMs.



Gráfica 9. A. MSD vs τ de 0 a 56 horas, con la función de referencia $y=x$ B) Función de autocorrelación de velocidades de 0 a 56 horas.

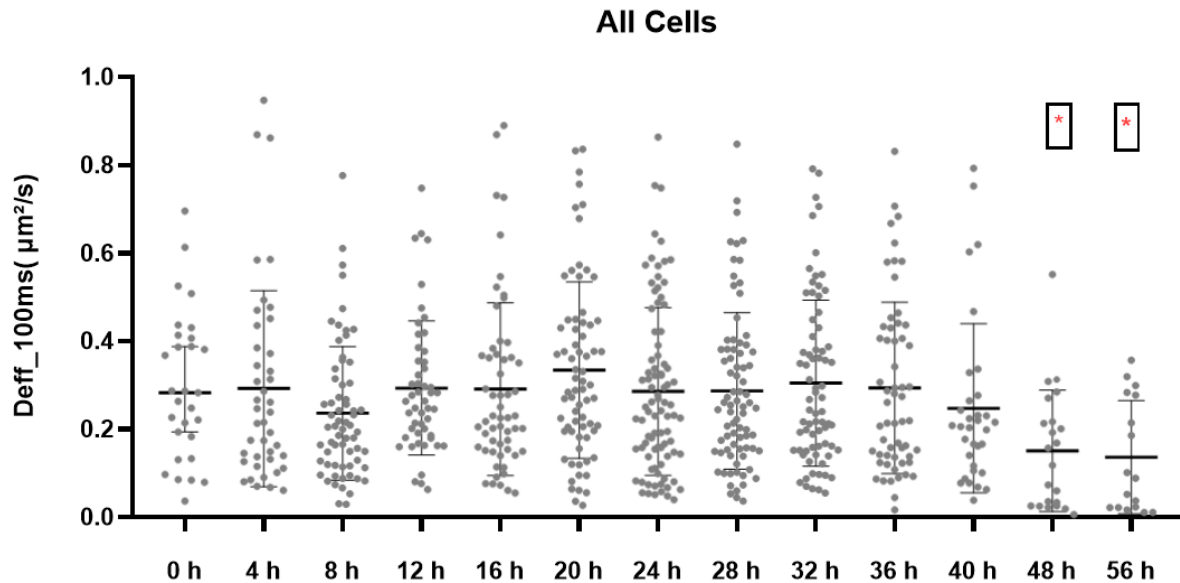
Se tomaron para la gráfica 9.A, diez medidas debido al muestreo de 10 milisegundos con el microscopio a conveniencia experimental. Los resultados obtenidos en el desplazamiento cuadrático promedio especifican aún más el régimen de subdifusión y una desaceleración de la GEMs debido a la comparación con la pendiente $y=x$. Por otra parte, se detallan una disminución en el movimiento en todas las trayectorias, una aproximación hipotética es un entorno con bastantes obstáculos que afectan de alguna u otra forma la dinámica células (Mouton et al, 2023) y el movimiento de las nanopartículas. Cabe recalcar que la comparación se puntualiza con las pendientes de cada hora con respecto a la función $y=x$. por otro lado los valores de α , no superan el 0.8, se realizó dichos resultados con $n=13598$ trayectorias en 28 células madre.

Para la gráfica 9.B, añade la función de autocorrelación de velocidades para cada hora con el motivo de diagnóstico para identificar el mecanismo subyacente de la difusión anómala. como primer indicio a comentar, todas las horas representan un pico negativo que decae a 0, así mismo en las mediaciones de 0, se puede observar fluctuaciones ínfimas. Dado que solo se dispone de una curva en la función de autocorrelación, resulta difícil interpretar cuál es la causa subyacente de la anti correlación. Sin embargo, esta ambigüedad se puede resolver al examinar la forma de C^δ a lo largo de un rango de discretizaciones δ como veremos en las gráfica 10A, B.



Gráfica 10. A) MSD promedio para las 0 horas en conjunto con la función de autocorrelación para diferentes tiempos entre desplazamientos. B) MSD promedio para las 56 horas en conjunto con la función de autocorrelación para diferentes tiempos entre desplazamientos δ .

Se graficaron todos los desplazamientos de las células madres para cada hora donde representamos en una línea roja la promedio en escala logarítmica, junto con la función de autocorrelación de velocidad, se realiza esta presentación para determinar el posible régimen o diagnóstico de movimiento. La grafica 10.A, describe un comportamiento “no lineal”, a partir de 0.1 segundos es inestable el desplazamiento cuadrático promedio fluctuando entre valores por encima y por debajo de la media. Se identifico picos negativos para diferentes tiempos entre desplazamientos en la función de autocorrelación. (Burov et al) informaron recientemente que un proceso de caminata aleatoria en tiempo continuo (CTRW, por sus siglas en inglés) puede mostrar un pico negativo en la Concentración de VACF cuando está confinado a un espacio finito. A medida que crece δ el pico decae con menor tiempo. La combinación de graficas de especifica un aproximado del régimen de movimiento. el comportamiento del MSD promediado en el conjunto con FVCF también se puede utilizar para identificar la fuente de un pico negativo en C^δ . Para nuestro sistema estudio, concluimos un movimiento subdifusivo para las 0 horas y 56 horas, debido a la consistencia de los picos negativos en VACF para las primeras y últimas horas independientemente de los valores de δ , agregando esta premisa a la caída de la pendiente que idéntica al exponente anómalo que se describe en la ecuación 12 para la gráfica 10.B.

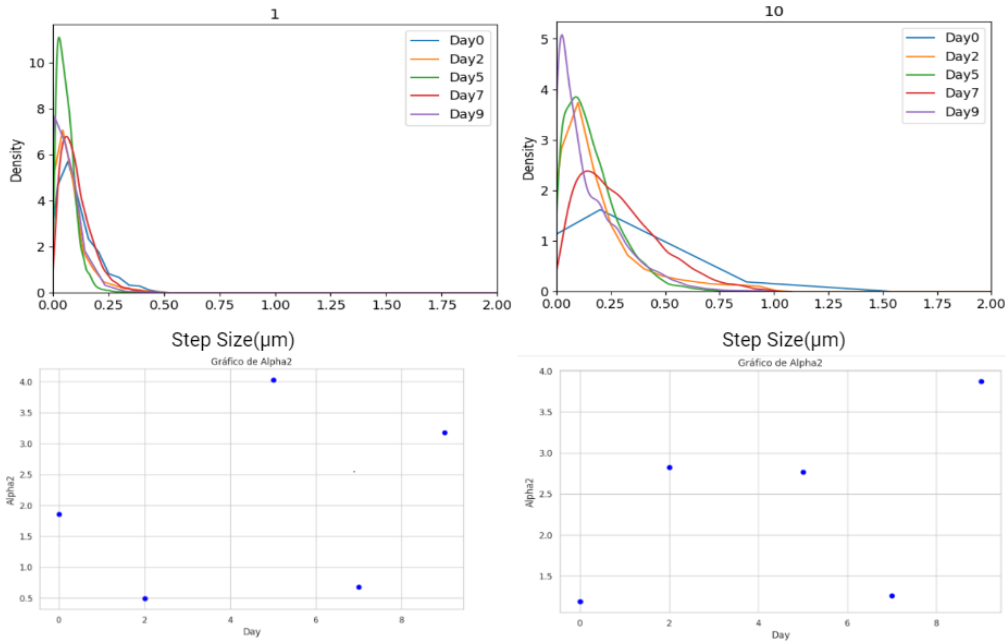


Gráfica 11. Coeficiente de Difusión de 0 a 56 horas en edad replicativa

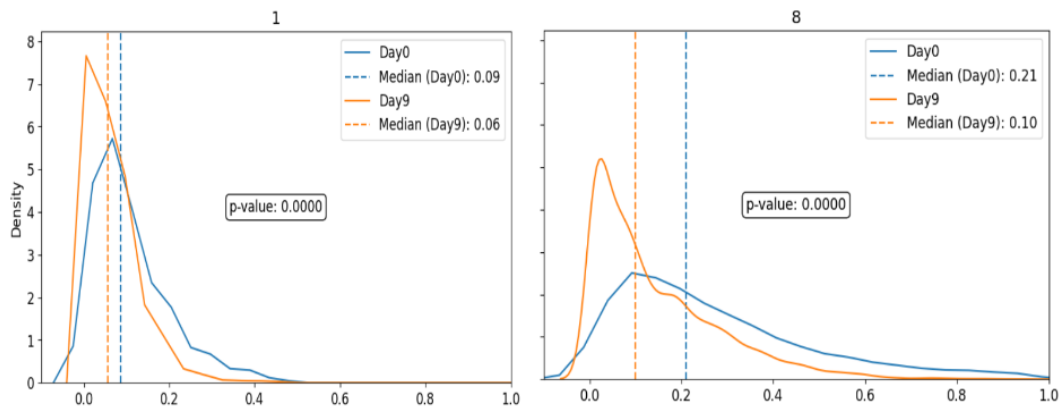
Para la gráfica 11, en el programa se colocaron todas las trayectorias de las respectivas horas, junto a las máscaras y videos, para su correcto seguimiento y desarrollo. Una vez aplicado el análisis, es imperativo retroalimentar la definición de un coeficiente de difusión efectiva en una escala de tiempo efectiva según las trayectorias obtenidas, para nuestro caso 100 milisegundos. los valores tienden a estar en un intervalo de $0.33 \mu\text{m}^2/\text{s}$ y $0.20 \mu\text{m}^2/\text{s}$ aproximadamente. En las 48 horas, desciende una pequeña cantidad y en 56 horas se produce en valor ínfimo de la gráfica. A priori es contraproducente el pensar que la difusión esta descendiendo conforme aumenta el tiempo, al interior de la célula *sarachomyce cerevisiae*. Sin embargo, se hace hincapié en la diferencia significativa entre las medianas, para las ultimas horas como apoyo estadístico a la disminución de los valores de difusividad mediante la prueba de Wilconxon. Debido al comportamiento anómalo descrito por el factor α en los análisis anteriores o aproximaciones a un régimen confinado y subdifusivo con base en las gráficas 10.A,10.B es difícil hablar de una difusión “normal” expresada por las nanopartículas en el citoplasma, si bien los datos se ajustan a la gráfica 9, con el arreglo lineal descrito por la ecuación 4, no es precisamente el estado de aleatoriedad de las partículas con las evidencias estadísticas que así lo detallan.

7.2 Cronological lifespan:

Con la edad cronológica, se cultivaron células en condiciones controladas, con más de 50 células en medio Synthetic Complete Drop Out. dado el valor de OD, el objetivo es llegar a la fase estacionaria para realizar las medidas de tiempo de vida hasta la apoptosis celular. Se tomaron mediciones hasta el día 9



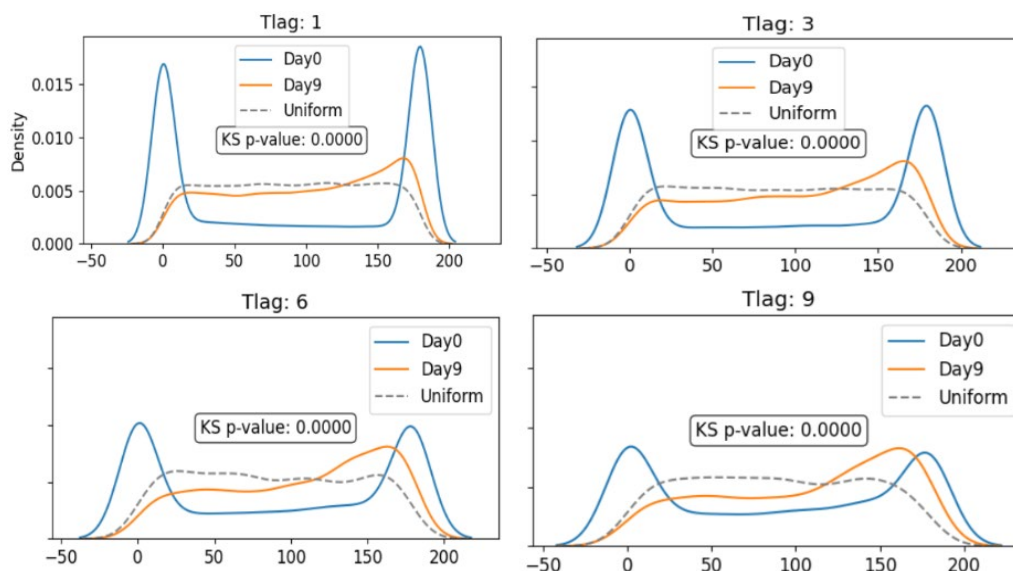
Gráfica 12. Distribución de paso de salto de la edad cronológica (CLS) para frecuencias de muestreo mínima y máxima, calculadas con el Parámetro no gaussiano α_2 .



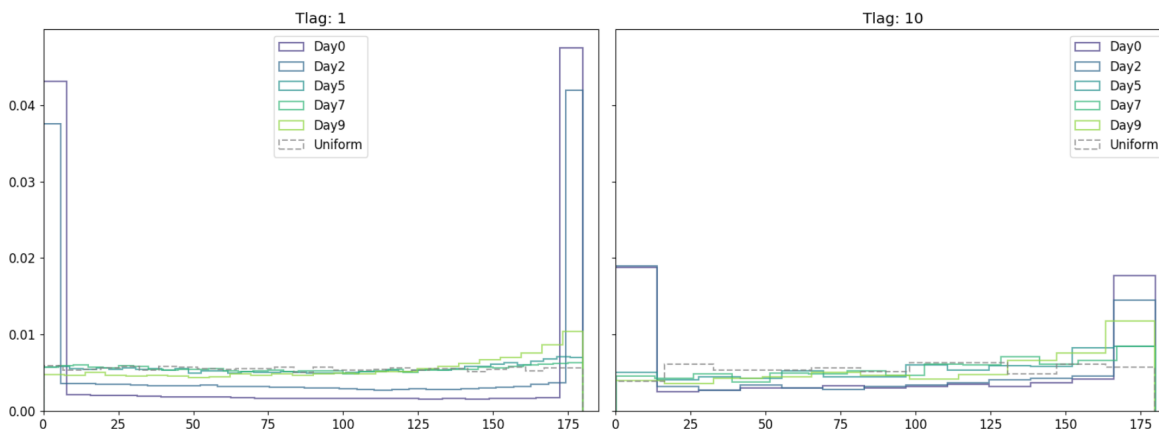
Gráfica 13. Comparación de distribuciones mediante la prueba de Wilcoxon para frecuencias de muestreo mínima y máxima

Para las mediciones en la edad cronológica se obtuvieron las magnitudes de pasos menores para el día 9 y día 5 (gráfica 12). Estos días reportan los valores del parámetro α_2 más grandes, aun así, siguen un parentesco gaussiano. Por otro lado, la gráfica nos muestra un mayor rango de cola pesadas para las frecuencias de muestreo máximas. También, se destaca un aumento de la mediana a medida que aumentamos a frecuencia de muestreo, por ende, para ninguna

comparación de la prueba de Wilcoxon hay evidencia significativa de equivalencia entre distribuciones para las horas comparadas en la gráfica 13.



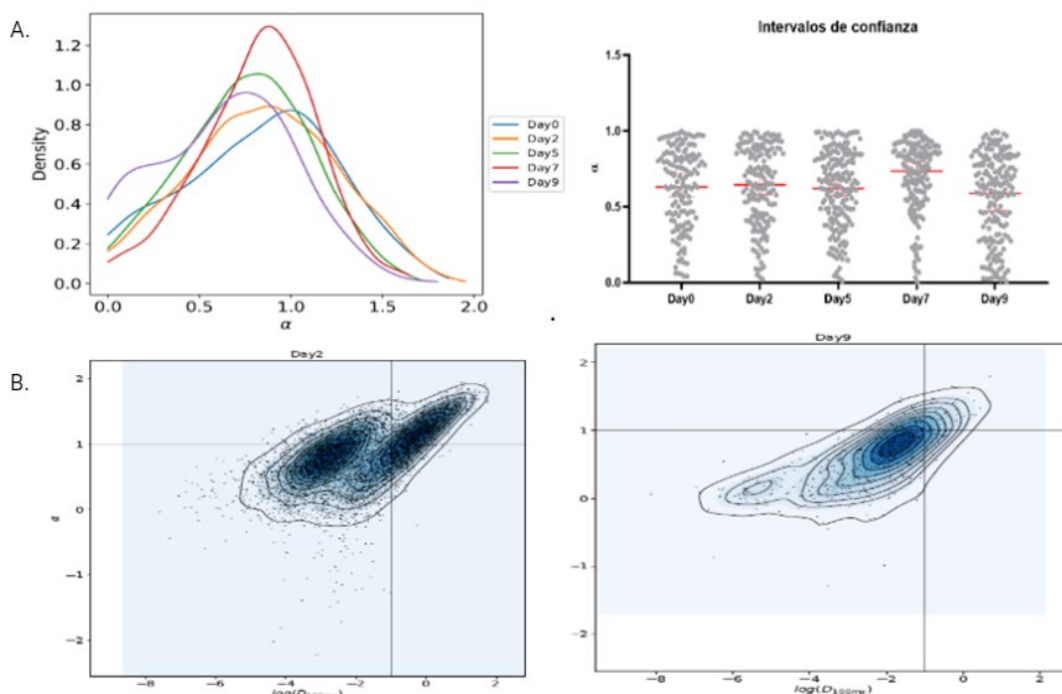
Gráfica 14. Distribución de ángulos en edad cronológica (CLS) para frecuencias de muestreo pequeñas y grandes



Gráfica 15. Distribución de ángulos en edad cronológica (CLS) para frecuencias de muestreo mínima y máxima

Se reprodujo la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnoff para evaluar si las dos muestras provienen de la misma distribución (figura 14). En comparación con la edad replicativa se obtuvo una significancia estadística p-valor diferente para todas las medidas en todas las frecuencias de muestreo. Además, para el día 0 en particular, demuestra una aproximación a un movimiento dirigido por desarrollar un pico en 0 grados y mantenerlo para las diferentes frecuencias de muestreo, para los demás días subdifusión para todas muestras, estas presunciones

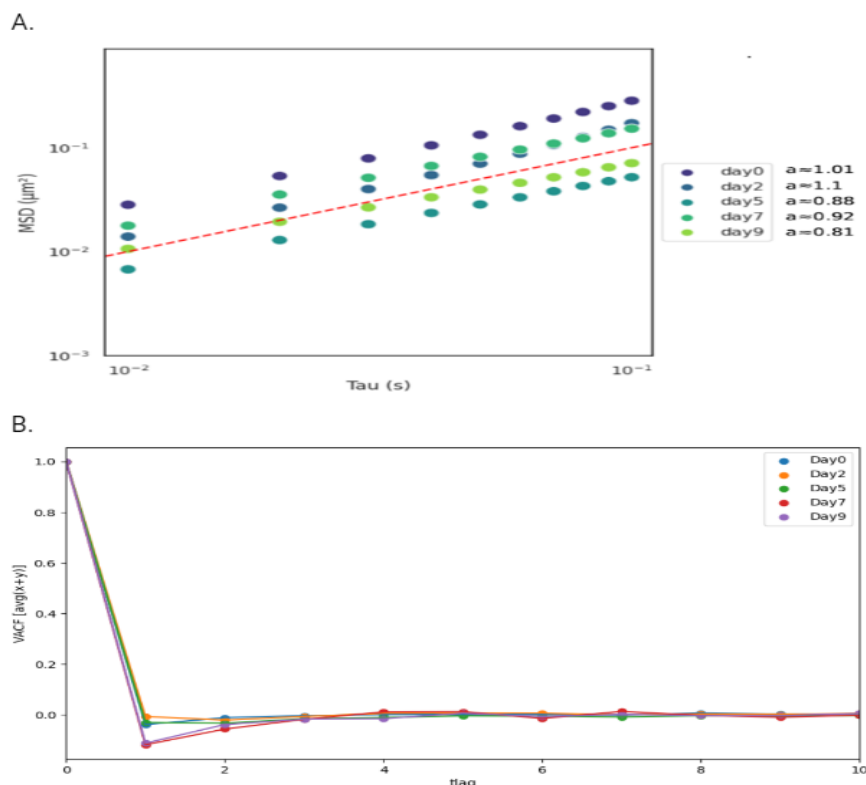
se pueden confirmar con las gráficas de autocorrelación de velocidades. Finalmente, para la gráfica 15, vuelve a tener peso la aproximación de un confinamiento debido a la comparación para la frecuencia de muestreo mayor, pero se añade el día 2 y se destaca dicha característica de movimiento solo para las dos primeras medidas (día 0 y 2) en la edad cronológica.



Gráfica 16. A) Función de densidad de Kernel para el factor α en de 0 a 48 horas B) Estimaciones Bivariadas entre el factor α y el LogD

Puntualmente en CLS, los valores del exponente anómalo α tienen una mayor densidad entre la vecindad del 0.6 y 0.9, se realizaron los intervalos de confianza para desarrollar una mayor confianza estadística de los valores plausibles del exponente (gráfica 16A). Dichos valores nos hablan de un movimiento subdifusivo de las nanopartículas, sin embargo, son más cercanos al valor de $\alpha=1$ en comparación con la edad replicativa. En 16.B las estimaciones de correlación entre el factor y el LogD, nos muestra un comportamiento bivariado, para el día 2 y día 9 con una mayor probabilidad bimodal en el día 2, específicamente en comportamientos bimodales representan variaciones en la difusividad debido a la formación de 2 grupos de trayectorias, pero sin la conformación de 2 grupos de células, de tal forma que la variación puede ser intracelular. Para este día resalta un comportamiento aproximado al de difusión normal. Las

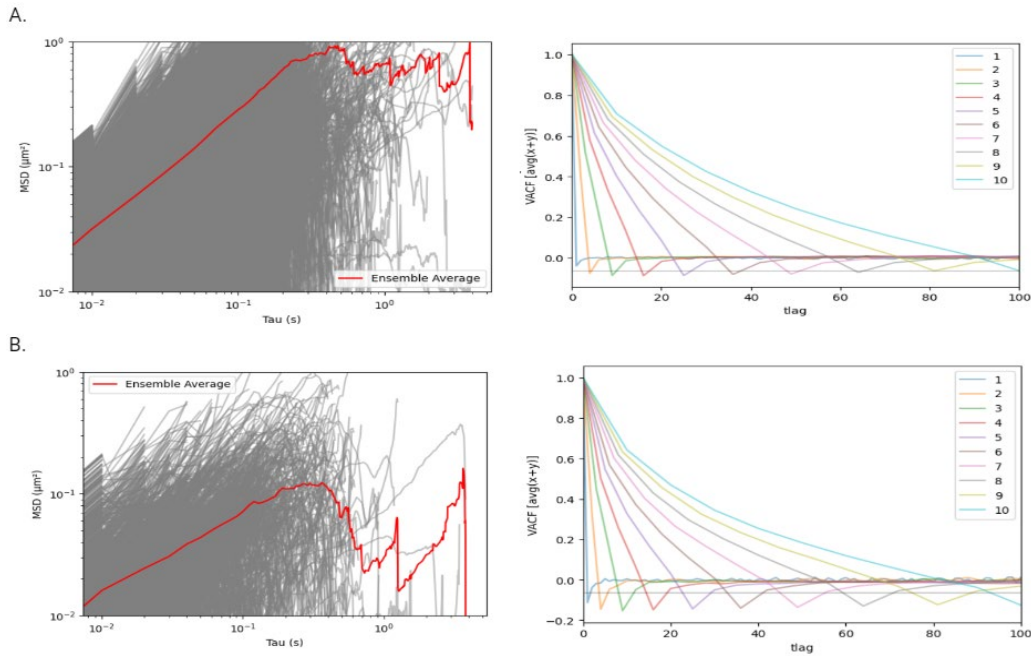
dos grandes muestras o patrones representan un movimiento donde hay cierta limitación para el movimiento o para la dispersión de las nanopartículas, tendiendo a subdifusión para la primera muestra. Se considera importante remarcar nuevamente este comportamiento para el día 9, no obstante, se aprecia muy poca densidad para el comportamiento bimodal, la gran correlación se direcciona a un exponente anómalo cercano a 1 con un coeficiente difusivo cercano a 0.



Gráfica 17. A) MSD vs τ en edad cronológica, con la función de referencia $y=x$. B) Función de autocorrelación de velocidades de 0 a 9 días.

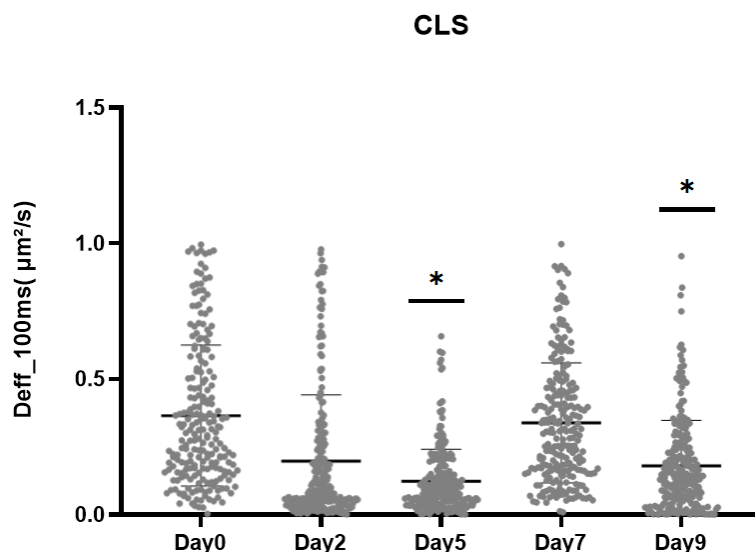
Se tomaron para la gráfica 17.A diez medidas debido al muestreo de 10 milisegundos con el microscopio a conveniencia experimental. Se observa que los valores de alfa para los dos primeros son aproximados a 1, dándonos otro indicativo de aproximación a difusión normal para las primeras medidas. Seguidamente, se refleja una disminución del desplazamiento cuadrático promedio para el ultimo día, este resultado concuerda con las distribuciones de tamaño de paso con menor magnitud para el ultimo día. en 17.B, se destacan picos negativos en los últimos dos días de experimentación y donde las velocidades están más correlacionadas. Pero como se comentó

en las gráficas de VACF en RLS, es menester realizar la comparación con diferentes deltas o tiempos entre desplazamientos.



Gráfica 18. A) MSD promedio para el día 0 en conjunto con la función de autocorrelación para diferentes tiempos entre desplazamientos. B) MSD promedio para el día 9 en conjunto con la función de autocorrelación para diferentes tiempos entre desplazamientos.

Para la figura 18.A, el conjunto promedio de desplazamiento cuadrático muestra el mayor comportamiento de proporcionalidad lineal con el tiempo transcurrido en el día 0 y comparado con la edad replicativa. Para este día, se vuelve a dar indicios de un posible movimiento browniano por el valor del exponente anómalo $\alpha=1.01$. Se observa que, para un incremento de desplazamiento entre velocidades y desplazamientos, la correlación entre velocidades decae más lentamente. En el régimen subdifusivo, el MSD promedio del conjunto sigue una ley de potencias y tiene un pico negativo estable e independiente de δ (Weber et al, 2012). Sin embargo, el pico negativo en la función de autocorrelación aumenta para el día 9 (figura 18.B), aun así, el desplazamiento cuadrático para tiempos largos en este mismo día retrata un comportamiento inestable que tiende a 0, prosiguiendo a un régimen anómalo subdifusivo.



Gráfica 19. *Coeficiente de difusión en edad cronológica*

El coeficiente de difusión efectivo para una medida de 100 milisegundos, disminuye hasta un valor ínfimo para el día 5. Sin embargo, se incrementa hasta un valor cercano a la primera medida (día 0), estos días se corroboraron con la prueba de rangos con signos, para lo cual se estableció una significancia estadística de aceptación de la hipótesis nula. Por otro lado, los símbolos *, revelan una marcada diferencia en las medianas con respecto a los demás días, estableciendo las menores medidas de difusividad efectiva.

7.3 Análisis de Supervivencia

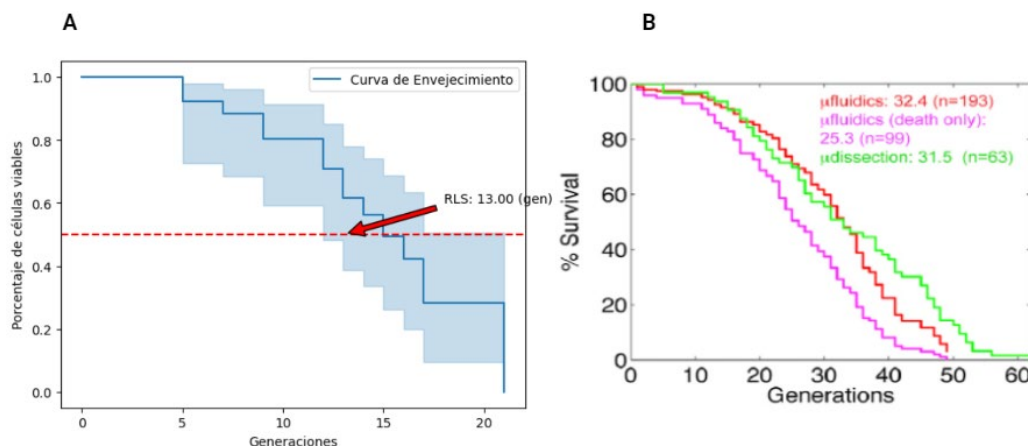
Se registraron y manejaron los datos mediante el paquete de procesamiento de imágenes Fiji-ImageJ, permitiendo la edición y observación de cada célula. Se realizó el análisis de supervivencia para los videos FOV20 y FOV21, comenzando con la construcción de tablas de datos CP en función de las generaciones y el tiempo. Cada célula madre fue fijada con el paquete, posteriormente se cuentan el número de generaciones y un tiempo de experimentación de 416 frames, el evento de interés (Muerte celular), se presentan 3 casos denominados X_1 (No viable, Perdida y No ocurrencia)

FOV20					FOV21				
Tabla CP en función del tiempo y generaciones					Tabla CP en función del tiempo y generaciones				
Ni	tc (h)	N.º Gen	X1 (motivo)	Censura	Ni	tc (h)	N.º Gen	X1 (motivo)	Censura
2011	62.1	3	Pérdida	0	2011	44.1	12	No Viable	1
2012	35.1	12	No viable	1	2012	4.3	1	No Viable	1
2013	56.5	13	No viable	1	2013	43.8	13	No Viable	1
2014	56.3	13	Pérdida	0	2014	68.6	23	No Viable	1
2021	45	9	Pérdida	0	2021	40.6	9	Perdida	0
2022	51.6	7	No viable	1	2022	69	12	No Viable	1
2023	41.3	12	No viable	1	2023	42.1	15	No Viable	1
2024	41.5	20	Pérdida	0	2024	43	16	Perdida	0
2031	69.3	14	No ocurrió	0	2031	37.1	14	No Viable	1
2032	56.6	19	Pérdida	0	2032	51.3	5	No Viable	1
2033	69.3	7	No ocurrió	0	2033	29.6	13	No Viable	1
2034	67.5	21	No viable	1	2034	44.3	16	Perdida	0
2041	27.3	14	No viable	1	2041	59.5	3	No Viable	1
2042	34.5	15	No viable	1	2042	46	21	Perdida	0
2043	39.8	9	Pérdida	0	2043	69.3	15	No ocurrió	0
2044	39.3	14	Pérdida	0	2044	62.1	24	No Viable	1
2051	35.5	5	No viable	1	2051	69.3	22	No ocurrió	0
2052	69.3	14	No ocurrió	0	2052	21	8	No Viable	1
2053	63.3	9	No viable	1	2053	19.3	5	No Viable	1
2054	64.1	18	Pérdida	0	2054	63.5	5	No Viable	1
2061	44.5	13	No viable	1	2061	24.1	11	Perdida	0
2062	36	9	No viable	1	2062	29.6	14	No Viable	1
2063	64.6	17	No viable	1	2063	33.1	13	No Viable	1
2071	67.1	17	No viable	1	2064	36.1	7	No Viable	1
2072	45	10	Pérdida	0	2071	30.3	14	No Viable	1
2073	63.1	16	No viable	1	2073	44.1	11	No Viable	1
2074	45.8	5	No viable	1					

Tabla 4. Tablas CP FOV20 y FOV21 en función del tiempo y generaciones

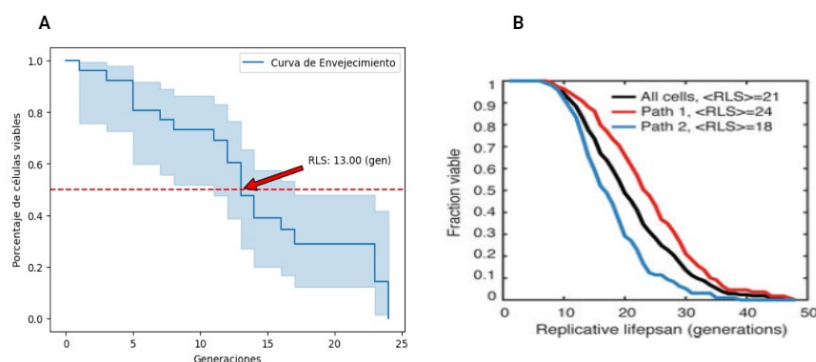
Los motivos de análisis Pérdida y No ocurrencia se marcaron como censura debido a su inexactitud y falta de información acerca de su posible muerte celular o evento de interés, para el caso de no ocurrencia es debido a no presentar el evento de interés antes de los 416 frames. Para el caso de aquellas células que se perdieron o desprendieron de las trampas, nosotros conocemos que el evento de replicación ocurrió hasta cierto punto, no obstante, se censura, para reflejar esta dificultad presentada en el experimento (No conocer su posible muerte) se concede a presentar el análisis con el estimador de Kaplan Meier con la intención de aumentar la precisión del análisis de supervivencia y manejar estadísticamente los datos más cercanos a la realidad. A continuación, se graficaron los datos y se compararon con otros estudios académicos, para la censura al final del intervalo, como la censura más aproximada para nuestro análisis de estudio. Las gráficas a comparar se realizaron bajo condiciones similares: 2 ml de medio completo sintético (SC, glucosa al 2%) y se cultivaron durante la noche a 30°C.

Se deja en anexos las tablas y graficas para censura durante el intervalo y al comienzo del intervalo



Gráfica 20. Curvas RLS. A) Replicative Life Span en función de las generaciones FOV20. Células con nanopartículas(Gems) que crecen en un dispositivo de microfluidos. B Replicative Life Span en función de las generaciones. células analizadas en un experimento de microdissección estándar. Imagen tomada de: Aging Yeast Cells Undergo a Sharp Entry into Senescence Unrelated to the Loss of Mitochondrial Membrane Potential.

Inicialmente se planteó la comparación para diferentes videos en la edad replicativa, no obstante, se relacionaron con curvas de artículos enfocados también en la “*S. cerevisiae*”. El motivo principal de comparación con otros documentos académicos, es visualizar la supervivencia y/o envejecimiento con respecto a estudios sin la expresión de GEMs, esto como comprobación del uso además del impacto de las nanopartículas en la vida de las células. Evidenciamos para las dos primeras tomas FOV20 y FOV21, una leve disminución en la supervivencia, aunque para el presente trabajo no estamos teniendo en cuenta todas las mediciones posibles que se realizaron en la Universidad de New York, se deja como idea vaga el posible descenso de la vida media con la expresión de GEMs.



Gráfica 21. Curvas RLS. A)Replicative Life Span en función de las generaciones. B) Células analizadas para dos caminos de envejecimiento. Imagen tomada de: Divergent Aging of Isogenic Yeast Cells Revealed through Single-Cell Phenotypic Dynamics B). Replicative Life Span en función de las generaciones FOV21. Células con nanopartículas (Gems) que crecen en un dispositivo de microfluidos.

Para estas gráficas, cada vez que una célula madre se replica cuenta como una generación, se puede observar en las tablas CP, que para nuestro sistema estudio, algunas células madre ya cuenta con tiempo de vida desconocido, esto conlleva a no tener un muestro uniforme entre el tiempo de replicación y las generaciones, además de encontrarnos con el intervalo de entrada en senescencia que perjudica y extiende el tiempo de división. La distribución en las replications de cada una de las células madre es diferente, en algunos casos ya con un tiempo de vida medio lo suficientemente corto como para solo llegar a tener 3 generaciones y entrar en apoptosis. En otros casos, células madre son viables el suficiente tiempo de vida como para presentar varias generaciones.

Se aprecia que para un intervalo de tiempo t , específicamente el de la mediana, disminuye significativamente la curva de supervivencia, dándonos a entender la duración típica antes de que ocurra el evento de interés.

8) Evaluación y cumplimiento de los objetivos de la pasantía

1. El primer objetivo, estimado para realizarse en la universidad de los andes, se cumplió con la visualización de las Gems, pese a no obtener de forma concreta y precisa la posición puntual de las células, sino regiones donde se encontraban fluorescentes. En el transcurso de la obtención de imágenes, surgieron algunas complicaciones que son necesarios de enfatizar, para futuros estudiantes que realicen toma de imágenes y análisis de resultados. Primero, es menester emplear reactivos con la quiralidad Levógira en los aminoácidos necesarios para la realización del medio SC. Dado que en el medio SC(apartado), las células no demuestran estar con buenos nutrientes para su correcto ciclo celular, crecimiento y fluorescencia. Segundo, las configuraciones presenten en el microscopio del laboratorio Q 405, como el tiempo de exposición necesario para la correcta visualización debe ser inferior a 10 milisegundos así mismo el tiempo entre fotos, debido al movimiento rápido y anómalo de las nanopartículas. Por ende, deben tener un rango optimo que la configuración del microscopio no alcanza. Además, la cámara presente, deja entrar ruido de fondo lo cual torna difícil la observación de las células.
2. El segundo objetivo se cumplió a cabalidad, una vez generado los videos con la colaboración de David Duran, Candidato a doctorado, se realizó el respectivo análisis del video denominado FOV20. Se manejo correctamente el programa de Fiji-ImageJ para reproducir, acotar y trackear los videos con los respectivos parámetros sugeridos por el manual (GEMspa User Manual) a las secciones de interés, junto con los análisis de seguimiento individual. El software calculo sobre todas las trayectorias en un archivo.CSV. Ajustando la ecuación 4 a los valores de MSD y de tiempo. Se graficaron los valores del coeficiente de difusión efectiva con un intervalo de confianza del 95%. A pesar del correcto procedimiento para el cálculo del coeficiente de difusión, se destaca los cálculos alcanzados para un movimiento browniano. Sin embargo, como se expuso en los resultados y análisis de resultados, el movimiento de las nanopartículas en el citoplasma de las células de levadura proyecta a través de las estimaciones estadísticas y físicas un movimiento anómalo. Se deja como aproximación los valores y las gráficas obtenidas del coeficiente. También se vuelve a recalcar que las posibles estimaciones que se pueden realizar de los valores del coeficiente de difusión, necesitan de una mayor cantidad de datos que amplíen el espectro de información tal como las distribuciones de salto, de ángulos, función de autocorrelación de velocidades, MSD entre otros. Se deja en anexos una serie de códigos que simulan el movimiento Browniano con el mismo pipeline mostrado en análisis de resultados
3. Se Analizo con éxito, el cambio en la difusión mediante la definición RLS para todas las células presentes en las trampas y para las células madres (28 en total). En intervalos de 4

horas. Así mismo, se analizó con la definición CLS, para 100 células de levadura desde el día 0 hasta el día 9. En ambas definiciones se realizaron análisis hasta la apoptosis celular, se detalla un mejor estudio en la definición RLS, dado que permite maximizar los tiempos de experimentación con división celular sin afectar gravemente a las células por la exposición al microscopio. Por otro lado, el análisis de imagen, estadístico y físico es más cómodo en CLS debido a un rango menor de datos. Finalmente, en ambas definiciones, se describe un descenso en la difusividad a medida que transcurre la edad y la edad cronológica. No obstante, la caída es más pronunciada en la edad cronológica. Estas afirmaciones se realizan con otros análisis que amplían el espectro de propiedades físicas y comportamientos cinéticos y dinámicos que se encuentran en las nanopartículas y que se correlacionan entre sí para identificar el porqué de los valores de difusión.

4. Se realizaron las curvas de envejecimientos para los videos FOV20 y FOV21 con éxito, donde se encontrar patrones similares en la supervivencia de las células madres a lo largo de la vida replicativa con una media $RLS=13$ generaciones, curiosamente en ambos videos. Por otro lado, se compararon con otros estudios que no utilizan GEMs pero utilizan los mismos protocolos de experimentación y cultivo celular, con el fin de ubicar la supervivencia de las células de levadura que expresan GEM, debido a la poca documentación que se ha realizado al respecto.

9) Conclusiones y recomendaciones

A partir de el algoritmo “cell pose” y las mascarar diseñadas de forma manual se logró simplificar la región de reconocimiento de células madre y como consecuencia sus trayectorias

El punto de entrada en la senescencia nos permitió reconocer además de organizar las células y su división abrupta de una manera no exacta pero aproximada mediante el análisis de regresión junto con los valores p asociados al nivel de significancia. Desde este punto se evidencia un mayor descenso de la difusividad en las células madre y un aumento en la frecuencia de división celular. aunque en este trabajo no se ahondo en los mecanismos que llevan a la desaceleración del ciclo celular y al SEP, fue de suma importancia para intentar ilustrar alguna correlación entre el envejecimiento celular y la difusividad.

Se obtuvieron todos lo valores y distribuciones del exponente α para la edad cronología y replicativa. En busca de orientar un apoyo estadístico, se elaboró la incertidumbre asociada además de intervalos de confianza al modelo no paramétrico mediante Bootstrap, esta herramienta nos revelo que el valor obtenido por GEMspa para el exponente anómalo esta fuera del rango de confianza hecho con Bootstrap en la gran mayoría de medidas y resultados, la posible explicación de este suceso se basa: en que si bien los datos de alfa siguen una distribución totalmente asimétrica, este valor es producto de resolver la ecuación 3 y que el programa GEMspa dote los valores plausibles para la ecuación 4. Dicha ecuación viene de un acoplamiento estadístico con respecto a la media para los desplazamientos cuadráticos. Pero, como los datos de alfa son no paramétricos, al momento de efectuar el análisis con bootstrapping que se sostiene en la mediana con medida de tendencia central para proporcionar los intervalos de confianza y/o incertidumbre. Las distribuciones de α son Skewed Distribution o distribuciones sesgadas a la derecha, con la media siendo el valor mas alto de las medidas de tendencia central como se evidencia.

Las diferentes mediciones cinéticas previas a la resolución de la ecuación de difusión, como las distribuciones de tamaño de paso, distribuciones de ángulos y de la función de autocorrelación de velocidades fueron esenciales para caracterizar el movimiento además de estimar el posible entorno en el cual se encuentran las nanopartículas, también indicaciones de patrones recurrentes en el movimiento, sus magnitudes permitieron evidenciar cambios en las trayectorias desde el punto de vista angular, espacial con efectos tales como poder estimar una restricción en el movimiento en pro de ser apoyo para los resultados finales de difusividad.

En el marco de correlación entre el envejecimiento celular y la difusión browniana no fue específicamente el resultado deseado, porque a lo largo del trabajo experimental, simulativo, de documentación, de análisis de imagen y estadístico, se reflejaron resultados por fuera del marco Browniano en la mayoría de datos. Entendiendo el entorno abarrotado, la gran dinámica inter e intra celular se puede simplificar en comportamientos estocásticos en todo lo que constituye una

célula. Es más satisfactorio además de razonable concluir y relacionar una difusión anómala con el envejecimiento celular que con una difusión Browniana, que es detalladamente para un contexto ideal.

La visualización de GEMs en el laboratorio de biofísica en la Universidad de los Andes nos permite inferir que el protocolo para la creación de medios (SC Y SCD) puede estar incompleto o con falta de especificaciones para células de levadura que expresen GEMs, esto debido a la dificultad de las células para llegar a fase exponencial y crecer, en términos coloquiales se observan sufridas para crecer, se propone que los reactivos y aminoácidos utilizados en el protocolo sugieren una quiralidad D no obstante, el protocolo presente en la Universidad de New York, sugiere que todos los aminoácidos tengan una quiralidad L.

Luego de ahondar en todo el apartado de caracterización del movimiento tales como: cinética del movimiento, trayectorias y las curvas de envejecimiento. Estos resultados dotan de suficiente sustento para mostrar que a medida que el ciclo celular avanza algunas propiedades físicas fluctúan como la difusividad. Los resultados expresan una disminución en edad replicativa con abundancia y reducción de nutrientes en las mediciones finales, pero en otros casos se observan fluctuaciones con aumentos en tiempos cortos como en Starvation EDC3(anexos). Pero si se realiza hincapié en las últimas medidas destacamos el valor del coeficiente de difusión más ínfimo de todo el experimento acompañados del régimen de subdifusión con los valores más bajos de α , esto implicaría la presencia de interacciones significativas o obstáculos que dificultan el movimiento de las GEMs, Por otro lado en la edad cronológica, los resultados mostraron un movimiento browniano para las primeras medidas(día 0 y 2) lo cual conlleva a pensar que la difusión anómala no es universal para todos los casos de envejecimiento, como generalmente se asume. Este hecho se respalda con las distribuciones de ángulos y de autocorrelación de velocidades. Sin embargo, para las últimas mediciones, se destaca la difusión anómala con régimen subdifusivo. Este resultado en CLS se han documentado en “Crowding Effects on Diffusion in Solutions and Cells” donde estiman con mediciones experimentales sobre la difusión de solutos en soluciones y compartimientos acuosos generalmente muestran difusión Browniana y anómala, siendo esta última producida por abarrotadores (James et al,2008).

En entornos biológicos y densamente poblados, como el interior de la célula, nuestros datos indican una disminución en la tasa de difusión efectiva a medida que la célula envejece, así como la presencia de comportamientos subdifusivos anómalos.

Bibliografía

- Bonucci, M., Shu, T., & Holt, L. J. (2023). How it feels in a cell. *Trends in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.05.002>
- Song, R., Sarnoski, E. A., & Acar, M. (2018). The Systems Biology of Single-Cell Aging. *IScience*, 7, 154–169. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.08.023>
- Fehrmann, S., Paoletti, C., Goulev, Y., Ungureanu, A., Aguilaniu, H., & Charvin, G. (2013). Aging yeast cells undergo a sharp entry into senescence unrelated to the loss of mitochondrial membrane potential. *Cell reports*, 5(6), 1589-1599. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.08.023>
- Fabrizio, P., & Longo, V. D. (2007). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology*, 371, 89–95. <https://doi.org/10.1385/1-59745-361-7:89>
- MORTIMER, R., JOHNSTON, J. Life Span of Individual Yeast Cells. *Nature* 183, 1751–1752 (1959). <https://doi.org/10.1038/1831751a0>
- Li, Y., Jin, M., Laughlin, R. O., Bittihn, P., Tsimring, L. S., Pillus, L., & Hasty, J. (2017). Multigenerational silencing dynamics control cell aging. *PNAS*, 114, 6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703379114>
- Einstein, A. (1905) On the movement of small particles suspended in stationary liquids required by the molecular-kinetic theory of heat. *Annals of Physics*, 322, 549-560. <http://dx.doi.org/10.1002/andp.19053220806>
- Delarue, M., Brittingham, G. P., Pfeffer, S., Surovtsev, I. V., Pinglay, S., Kennedy, K. J., ... & Holt, L. J. (2018). mTORC1 controls phase separation and the biophysical properties of the cytoplasm by tuning crowding. *Cell*, 174(2), 338-349. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.042>
- Wasko, B. M., & Kaeberlein, M. (2014). Yeast replicative aging: a paradigm for defining conserved longevity interventions. *FEMS yeast research*, 14(1), 148-159. DOI: <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12104>
- Jin, M., Li, Y., O’Laughlin, R., Bittihn, P., Pillus, L., Tsimring, L. S., ... & Hao, N. (2019). Divergent aging of isogenic yeast cells revealed through single-cell phenotypic dynamics. *Cell systems*, 8(3), 242-253. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.02.002>
- Longo, V. D., & Fabrizio, P. (2012). Chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Research in Yeast*, 101-121. DOI: [10.1007/978-94-007-2561-4_5](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2561-4_5)

- Keegan, S., Fenyo, D., & Holt, L. J. (2023). GEMspa: a Napari plugin for analysis of single particle tracking data. *bioRxiv*, 2023-06. DOI: <https://doi.org/10.1101/2023.06.26.546612>
- Saxton, M. J. (1997). Single-particle tracking: the distribution of diffusion coefficients. *Biophysical journal*, 72(4), 1744-1753.
- Mouton, S. N., Boersma, A. J., & Veenhoff, L. M. (2023). A physicochemical perspective on cellular ageing. *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2023.08.007>
- Weihs, D., Mason, T. G., & Teitell, M. A. (2006). Bio-microrheology: a frontier in microrheology. *Biophysical journal*. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.081109>
- Longo, V. D., Shadel, G. S., Kaeberlein, M., & Kennedy, B. (2012). Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell metabolism*, 16(1), 18-31. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.002>
- Michalet, X. (2010). Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error: Brownian motion in an isotropic medium. *Physical Review E*, 82(4), 041914. DOI: 10.1103/PhysRevE.82.041914
- Manzo, C., & Garcia-Parajo, M. F. (2015). A review of progress in single particle tracking: from methods to biophysical insights. *Reports on progress in physics*, 78(12), 124601. DOI: 10.1088/0034-4885/78/12/124601
- Delarue, M., Brittingham, G. P., Pfeffer, S., Surovtsev, I. V., Pinglay, S., Kennedy, K. J., & Holt, L. J. (2018). mTORC1 controls phase separation and the biophysical properties of the cytoplasm by tuning crowding. *Cell*, 174(2), 338-349.
- Weber, S. C., Thompson, M. A., Moerner, W. E., Spakowitz, A. J., & Theriot, J. A. (2012). Analytical tools to distinguish the effects of localization error, confinement, and medium elasticity on the velocity autocorrelation function. *Biophysical journal*, 102(11), 2443-2450. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.03.062>
- Saxton, M. J. (1996). Anomalous diffusion due to binding: a Monte Carlo study. *Biophysical journal*, 70(3), 1250-1262.
- Burov, S., J. H. Jeon, ., E. Barkai. 2011. Single particle tracking in systems showing anomalous diffusion: the role of weak ergodicity breaking. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13:1800–1812

Anexos

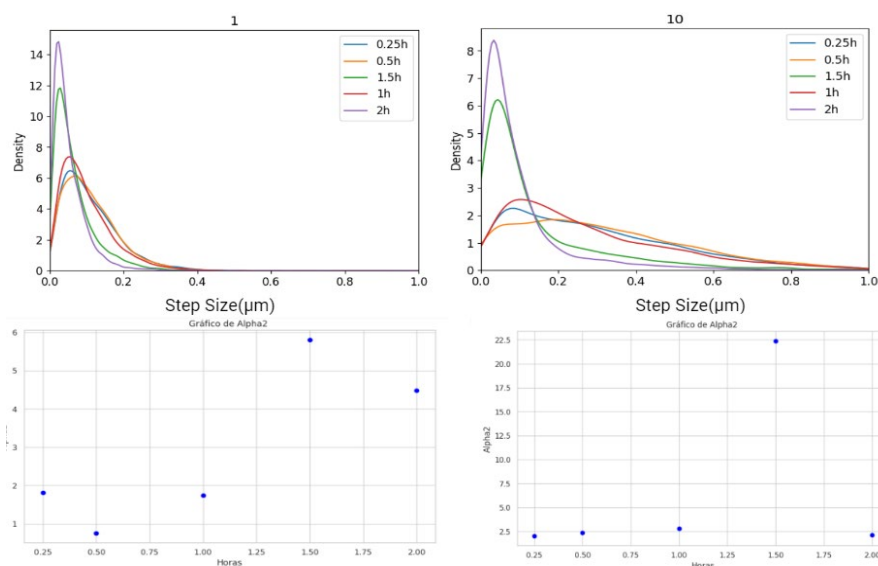
Los códigos de las simulaciones del movimiento Browniano, el fit realizado a los datos experimentales y las tablas utilizadas que amplían aún más el espectro de las mediciones realizadas están en los siguientes repositorios:

<https://github.com/juandiego11/Brownian-Motion->

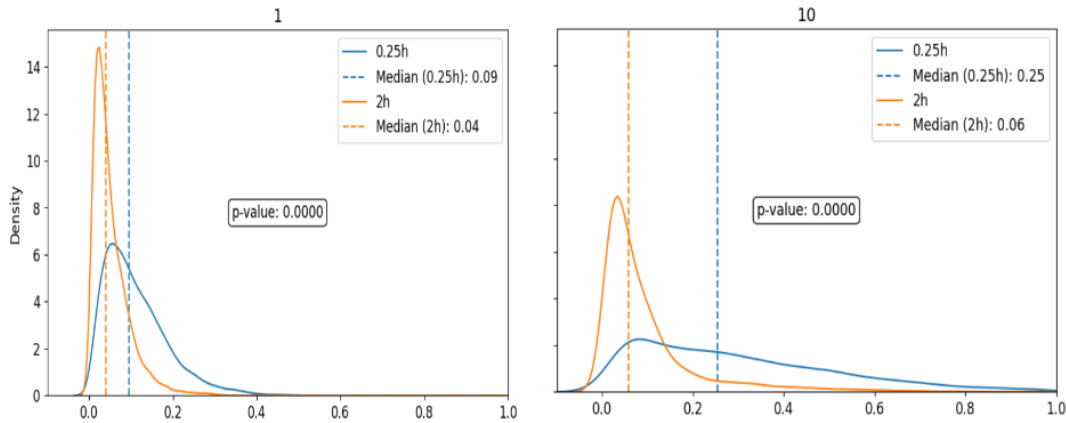
<https://github.com/juandiego11/analisis-de-supervivencia>

Starvation Ciclohexamide

Se registraron datos para crecimiento de las células con pocos nutrientes. Con el denominado Starvation, se busca originar una deficiencia de nutrientes esenciales, específicamente glucosa. Cuando la *Saccharomyces cerevisiae* pasa por períodos de inanición, se producen cambios en su metabolismo y en diversas vías bioquímicas para adaptarse a la falta de nutrientes. A tal dificultad de alimentación, se tomaron datos cada 15 minutos durante 2 horas. Se manejó con la cepa WT-LH4248, esta cepa se agregó cicloheximida (C), un fármaco que se utiliza comúnmente en investigación para inhibir la traducción del ARNm (ARN mensajero) en proteínas, como principal motivo de la configuración presente, es analizar cómo cambian las propiedades físicas bajo la inyección de este fármaco.

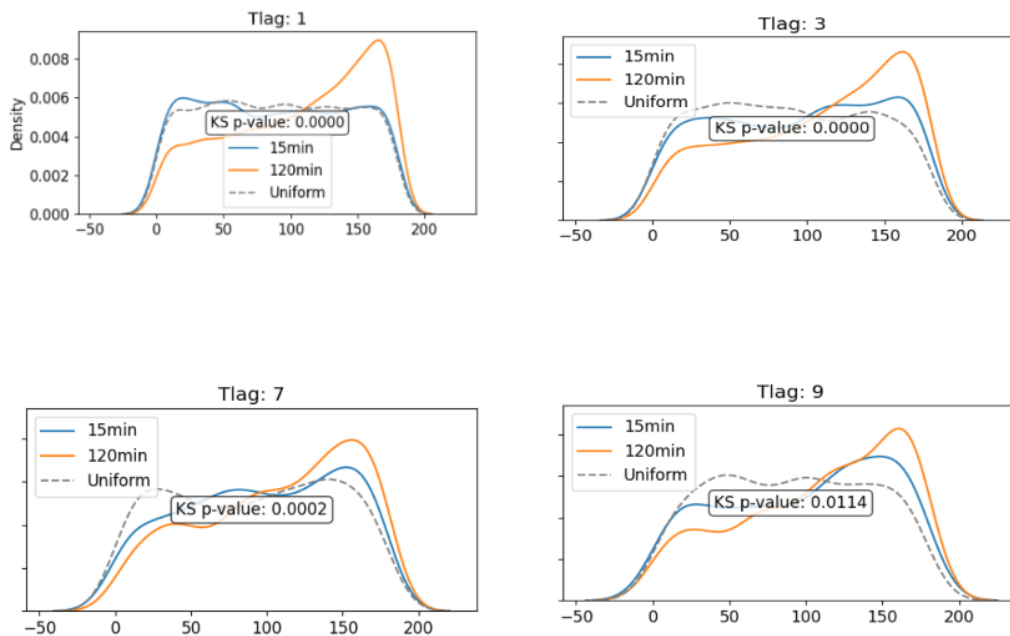


Gráfica 22. Distribución de paso de salto STARVATION (C) para frecuencias de muestreo mínima y máxima, calculadas con el Parámetro no gaussiano α_2 .

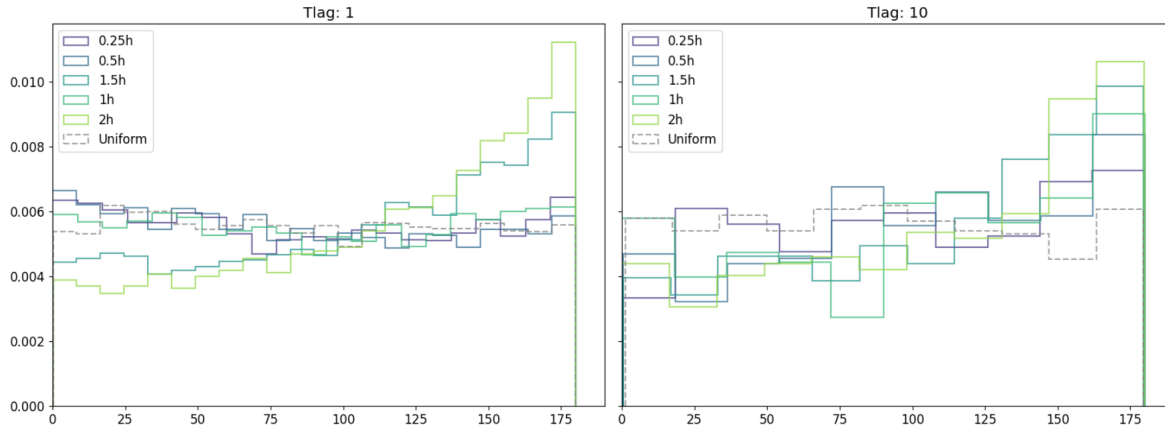


Gráfica 23. Comparación de distribuciones mediante la prueba de Wilcoxon para frecuencias de muestreo mínima y máxima

Para Starvation con Ciclohexamida (C), registramos un mayor tamaño de paso para las primeras medidas de experimentación así mismo, las últimas medidas demuestran menor magnitud de paso. Particularmente para la inanición de glucosa, la penúltima medida 1.5 horas se obtiene un parámetro α_2 máximo en comparación a RLS y CLS en la frecuencia mínima y máxima de muestreo, en ese mismo sentido se observa sesgos en las distribuciones de las últimas horas hacia la derecha. Con la prueba de Wilconxon (figura 22) se vuelve a repetir el patrón de mayor diferencia de medianas conforme se aumenta la frecuencia de muestreo.

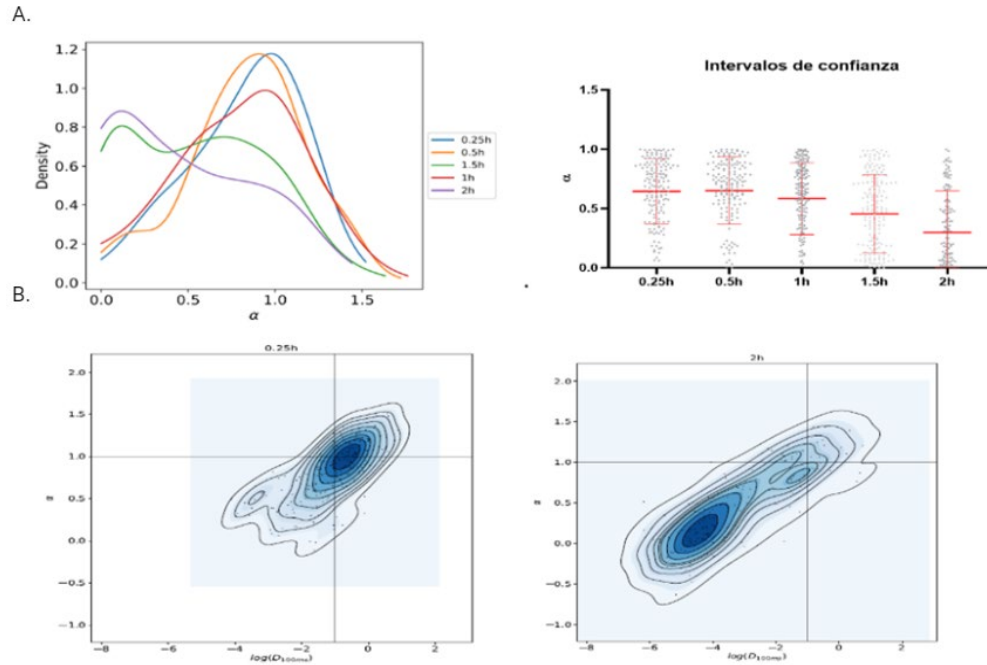


Gráfica 24. Distribución de ángulos en starvation (C) para frecuencias de muestreo pequeñas y grandes.



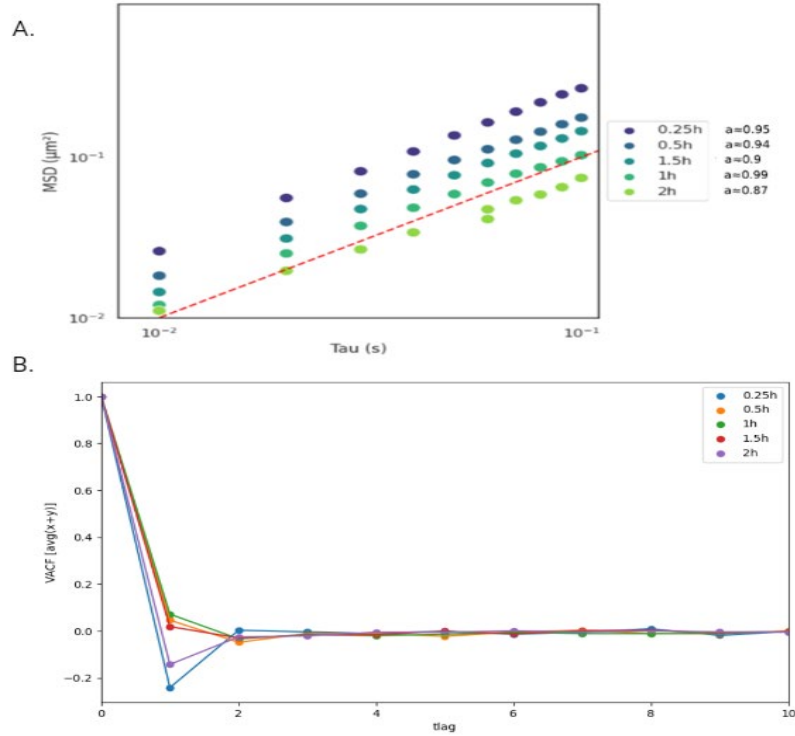
Gráfica 25. Distribución de ángulos en Starvation (C) para frecuencias de muestreo mínima y máxima

Para la distribución de ángulos se graficaron la primera toma de datos en 0.25 horas y la última en 2 horas, con el fin de apreciar cambios significativos en las direcciones de movimiento. Se aplicó la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnoff para evaluar si las dos muestras a tiempos diferentes provienen de la misma distribución como en el apartado del FOV20. Para todas las frecuencias de muestreo se aprecia un valor menor en el p-value de 0.05, con lo cual en starvation, las distribuciones son diferentes, dando a entender a un cambio en los desplazamientos de las GEMs y el régimen de movimiento. Además, con picos en intervalos de 90° a 180° indicio aproximado de confinamiento. Para reafirmar o contra argumentar dichos picos o aumentos se tomaron las medidas de todas las horas en la gráfica 25, para la frecuencia de muestreo máxima y mínima, donde se destaca para la última medida de inanición de glucosa el pico en 180° para las dos medidas de muestreo, indica con mayor fuerza una característica de confinamiento.



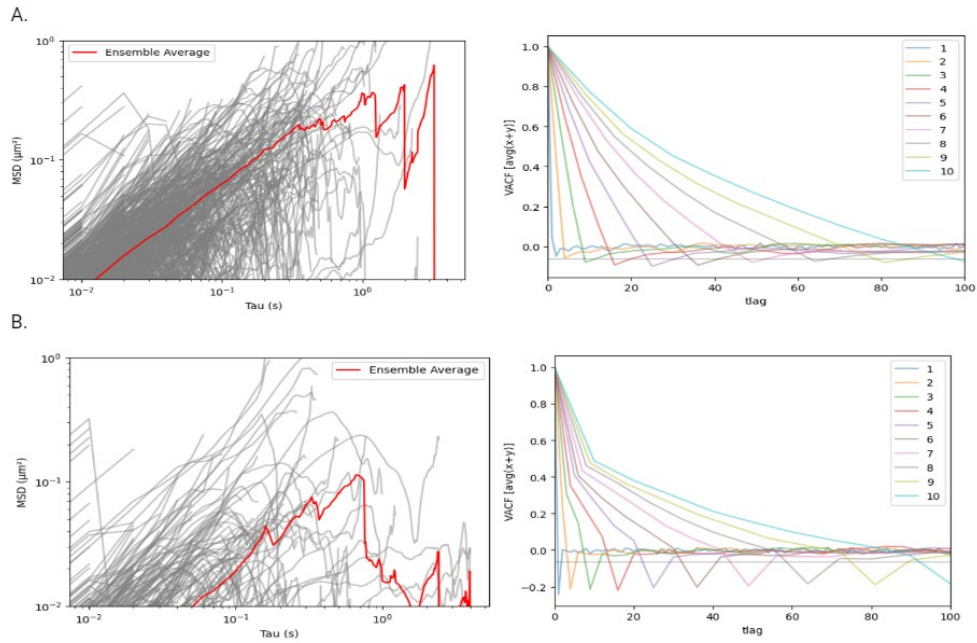
Gráfica 26. A) Función de densidad de Kernel para el factor α . B) Estimaciones Bivariadas entre el factor α y el LogD

Las funciones de densidad de Kernel (gráfica 26.A) demuestran valores de alta densidad en picos en una vecindad cercana a 1, aunque esta conducta cambia para las ultimas horas. Todas las horas se le realizaron los intervalos de confianza para una mayor viabilidad estadística. normal en las primeras medidas de 0.25 horas y una posible transición a un régimen de subdifusion para la última medida de 2 horas. De igual forma, Para las correlaciones del exponente anómalo con el LogD en la última medición debido a la reducción del exponente anómalo, baja la difusividad lentamente, repercutiendo en un menor espacio de movimiento o en un movimiento anti correlacionado además se puede observar otra variación con mayor difusividad, pero con una menor probabilidad.



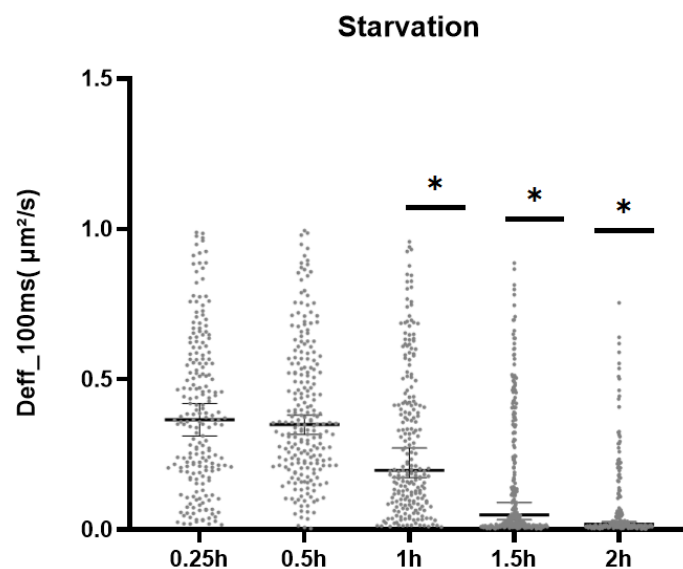
Gráfica 27. A) MSD vs τ de 0.25 a 2 horas, con la función de referencia $y=x$. B) Función de autocorrelación de velocidades de 0.25 a 2 horas.

Para la gráfica 27.A, el desplazamiento cuadrático medio, proporcionan una cinemática celular con desaceleración a medida que pasa el tiempo, pero se vuelve a destacar un comportamiento cercano a la difusión normal en las primeras mediciones con base en las comparaciones con la función $y=x$ pero en las últimas mediciones se obtiene un comportamiento sublineal proporcionando información sobre el entorno que dificulta la libre dispersión de las nanopartícula. Además de los exponentes anómalos $\alpha \approx 0.95$ y 0.94 que es plausible para la ecuación x . Se tomaron estas medidas para $n > 10000$ trayectorias en 28 células.



Gráfica 28. A) MSD promedio para las 0.25 horas en conjunto con la función de autocorrelación para diferentes tiempos entre desplazamientos. B) MSD promedio para las 2 horas en conjunto con la función de autocorrelación para diferentes tiempos entre desplazamientos.

el MSD y la VACF de 28.A sigue un comportamiento parecido a las gráficas 18.A, en la edad cronológica, con picos negativos constantes para todo δ además de seguir un comportamiento no lineal decreciente a tiempos mayores. No obstante, para la última medición (figura 28.B) el decaimiento del MSD es dinámico y ligero pronunciando un claro margen de limitación espacial o de barreras en el sistema como se demuestra en las gráficas 24 y 26.A. seguidamente la VACF, aumenta sus picos negativos para todos los tiempos entre desplazamientos con mayor tasa decreciente para tiempos menores. La hipótesis a destacar, es movimiento subdifusivo para las primeras mediciones con un cambio a confinamiento para tiempos de muestreo mayores.



Gráfica 29. A) Coeficiente de difusión de 0.25 horas a 2 horas para células en starvation (C) B. Coeficiente de difusión de 0.25 horas a 2 horas para células en starvation EDC3.

La difusividad efectiva, a escala de 100 ms, disminuyo paulatinamente como en informes previos que describieron disminución en el movimiento de macromoléculas tras la privación de glucosa (Joyner et al, 2016). Se destaca el cambio para 1 hora de inanición de glucosa, la diferencia significativa entre las medianas para las últimas medidas. Este resultado apoya y fortalece las graficas de (22, 23 y 26A, B) que ilustran menor tamaño de paso y de correlación con el exponente anómalo.