

Tesis Doctoral

Mecánica y dinámica del citoesqueleto en células vivas

Pallavicini, Carla

2017-12-11

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pallavicini, Carla. (2017-12-11). Mecánica y dinámica del citoesqueleto en células vivas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pallavicini, Carla. "Mecánica y dinámica del citoesqueleto en células vivas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-12-11.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física

Mecánica y dinámica del citoesqueleto en células vivas

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Ciencias Físicas
por **Lic. Carla Pallavicini**

Directora: Dra. Luciana Bruno
Directora: Dra. Valeria Levi
Consejero de estudios: Dr. Gabriel Mindlin
Lugar de trabajo: IFIBA
Fecha de defensa: 11/12/2017

Mecánica y dinámica del citoesqueleto en células vivas

Resumen

El citoesqueleto es una red auto-organizada y dinámica presente en las células eucariotas. Está compuesto por tres tipos de biopolímeros: filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos. Estos filamentos se constituyen a partir de la polimerización de proteínas más simples y forman estructuras con diámetros de $\sim 6\text{nm}$ para los filamentos de actina y $\sim 10\text{nm}$ para los filamentos intermedios. Los microtúbulos son los elementos más rígidos del citoesqueleto, con una estructura tubular de diámetro externo de $\sim 25\text{nm}$. Estos biopolímeros, en conjunto con proteínas motoras, componen un entramado con propiedades mecánicas que permite a las células generar y reaccionar ante la acción de fuerzas.

El citoesqueleto está involucrado en numerosos procesos celulares tales como la migración, división, contracción y el transporte de organelas. Por este motivo es muy importante estudiar el comportamiento mecánico de los filamentos del citoesqueleto para lograr un mayor conocimiento de la organización y mecánica celular.

La microscopía de fluorescencia ha revolucionado nuestro conocimiento del citoesqueleto, permitiendo su visualización en células vivas. El análisis del movimiento y de las fluctuaciones en las formas de los filamentos del citoesqueleto permite estudiar las propiedades mecánicas relevantes a su función biológica. Este tipo de análisis requiere la identificación de las posiciones de filamentos individuales con alta precisión. Sin embargo, el seguimiento de filamentos individuales a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia de células vivas es extremadamente complejo.

Es por ello que en la primera parte de esta Tesis, desarrollamos un algoritmo de *tracking* de filamentos que permite obtener las coordenadas de microtúbulos fluorescentes con precisión subdifracción. Evaluamos el rendimiento de esta rutina mediante simulaciones numéricas de imágenes confocales y experimentos *in vitro* y obtuvimos una precisión de $\sim 9\text{nm}$ para filamentos *in vitro* y $\sim 20\text{nm}$ para filamentos en células fijadas.

Utilizando este algoritmo, estudiamos las distribuciones de curvaturas de microtúbulos en células melanóforas de *Xenopus laevis* vivas. Mediante un análisis de Fourier de las formas de los filamentos hallamos que, en un entorno fuera del equilibrio como el citoplasma, las curvaturas se ajustaban a un comportamiento térmico, de acuerdo con resultados reportados anteriormente. Estos datos fueron utilizados

para calcular la longitud de persistencia de los microtúbulos en distintas condiciones experimentales. La longitud de persistencia es un parámetro ampliamente utilizado para describir las propiedades mecánicas de filamentos, y se define como la razón entre la rigidez flexural del filamento y las fuerzas térmicas actuando sobre el mismo. La longitud de persistencia efectiva calculada para microtúbulos en células vivas fue $\sim 20 \mu\text{m}$, valor significativamente menor que el medido *in vitro*. Este parámetro no se vio modificado en presencia de la proteína asociada a microtúbulos XTP o la depolimerización de actina. En contraste, la depolimerización de la red de filamentos intermedios disminuyó significativamente el valor de este parámetro.

Por otra parte, exploramos si la inhibición de los eventos de polimerización y depolimerización de los microtúbulos podría afectar su rigidez flexural efectiva. En este caso, la distribución de formas de los filamentos no se ajustó a un comportamiento térmico, como el observado en células control, indicando que el comportamiento mecánico de los microtúbulos depende de un delicado equilibrio de fuerzas activas dentro de la célula.

Observamos que la depolimerización de filamentos de actina e intermedios aumenta significativamente las fluctuaciones laterales de los microtúbulos, sugiriendo que estos filamentos contribuyen a la organización global de dicha red. Por otra parte, verificamos que la producción de fuerzas no es homogénea dentro de las células ya que los microtúbulos presentaban un movimiento más lento, pero más direccionado en la región cortical en comparación con la región perinuclear.

En la segunda parte de esta Tesis, estudiamos los aspectos dinámicos de los eventos de *buckling* de microtúbulos en células melanóforas de *Xenopus laevis*. Éstos son eventos transitorios y localizados observados frecuentemente en células, y se caracteriza por una rápida flexión del filamento seguida de su relajación. Se ha propuesto que estos eventos de rápida deformación dependen de fuerzas localizadas espacio-temporalmente resultantes de la acción de motores moleculares.

Para comprender este fenómeno, caracterizamos los eventos de *buckling* mediante el *tracking* de microtúbulos fluorescentes individuales en combinación con simulaciones numéricas, las cuales nos permitieron explorar distintos mecanismos que podrían producir la flexión de filamentos. Los eventos simulados reprodujeron muchas de las características observadas en microtúbulos en células vivas, sugiriendo que el modelo mecánico implementado representaba los procesos esenciales del *buckling* de microtúbulos. Luego analizamos la interacción entre vesículas fluorescentes transportadas activamente y la red de microtúbulos pudiendo así observar eventos generados por fuerzas activas y correlacionarlos con el movimiento de las vesículas. Los resultados obtenidos de este análisis sugieren que los microtúbulos podrían afectar el transporte indirectamente, aparte de servir como vías para las organelas transportadas.

Con el fin de extender nuestro análisis del citoesqueleto a otros sistemas biológicos, estudiamos células de cáncer de próstata, que muestran una expresión anormal de proteínas del citoesqueleto, resultando en una resistencia a la quimioterapia y capacidad de colonizar órganos lejanos. Desarrollamos técnicas computacionales para analizar imágenes de fluorescencia de citoesqueleto en estas células y, en particular, cuantificar la acción de una droga que induce la expresión de Hemo oxigenasa-1, una enzima implicada en la regulación de la morfología celular. Nuestros resultados mostraron que la células bajo la inducción de HO-1 presentaban menos migración y una proporción significativamente mayor de protrusiones tipo-filopodias que las células control, los que indicaría una mayor comunicación entre células vecinas.

En síntesis, llevamos a cabo experimentos biológicos para observar el citoesqueleto y desarrollamos técnicas que nos permitieron estudiar estos filamentos en células vivas. De esta forma, pudimos analizar cuantitativamente la importancia del balance y dinámica de fuerzas activas en células para la organización de la red de microtúbulos. Estos conocimientos también fueron de utilidad para analizar los cambios en el citoesqueleto de células de cáncer de próstata.

Palabras clave: citoesqueleto, microscopía de fluorescencia, microtúbulos, *tracking* de filamentos, *buckling* de filamentos, cáncer de próstata.

Mechanics and dynamics of the cytoskeleton in living cells

Abstract

Eukaryotic cells contain a cytoskeleton; a self-organized and highly dynamic network, which consists of three main types of protein filaments: microtubules, intermediate filaments and actin filaments. Actin filaments present a cable-like structure, with a diameter of $\sim 6\text{nm}$ and intermediate filaments have a rope-like structure, with a diameter of $\sim 10\text{nm}$. The stiffest elements of cytoskeleton are microtubules, pipe-like structures with an outer diameter of $\sim 25\text{nm}$. Cells both actively generate and sensitively react to forces through the mechanical framework composed by these biopolymers and motor proteins.

The cytoskeleton is involved in numerous cellular processes such as migration, division, and contraction and provides the tracks for transport driven by molecular motors. Therefore, it is very important to quantify the mechanical behavior of the cytoskeletal filaments to get a better insight into cell mechanics and organization.

Fluorescence microscopy has revolutionized our understanding of the cytoskeleton by allowing the visualization of these filaments in living cells. It has been demonstrated that relevant mechanical properties of microtubules can be extracted from the analysis of their motion and shape fluctuations. These analyses require identifying with high spatial precision the localization of single microtubules. However, tracking individual filaments from fluorescence microscopy images of living cells is extremely complex. The existing filament tracking routines so far, require high signal to noise ratios and homogeneous backgrounds.

In the first part of this Thesis, we developed a new filament tracking algorithm that allows recovering the coordinates of fluorescent microtubules. We evaluated the performance of this algorithm through computational simulations and *in vitro* experiments and found that its precision is $\sim 9\text{ nm}$ and 20 nm *in vitro* and in fixed cells, respectively. Using this algorithm, we studied the distributions of curvatures of fluorescent microtubules in living *Xenopus laevis* melanophore cells. By performing a Fourier analysis of the microtubule shapes, we found that the curvatures in a non-thermal environment as the cytoplasm followed a thermal-like distribution, as previously reported. These data were used to calculate microtubule persistence length (lp) in different experimental conditions. The persistence length is a widely used parameter to describe filament mechanical properties, it is determined by the

ratio of the flexural rigidity of the filament with the thermal forces acting upon it. The effective lp of microtubules in living cells was $\sim 20 \mu\text{m}$, i.e. significantly smaller than that measured *in vitro*. In addition, we found that the microtubule-associated protein XTP or the depolymerization of the actin network did not affect the effective lp. In contrast, the depolymerization of the intermediate filaments network decreased the effective persistence length.

We also explored whether inhibiting the microtubule polymerization/depolymerization events affects the effective flexural rigidity. We found that microtubule shapes do not follow the thermal-like behavior observed in control cells, implying that this behavior depends on a delicate balance of active forces within the cell.

We also explore the influence of actin and intermediate filaments on the motion of microtubules and observed that the depolymerization of these filaments significantly increased microtubule motion, suggesting that these filaments contribute to the overall organization of the microtubule network. Moreover, the analysis of trajectories of microtubule segments in control cells showed that these filaments presented a slower but more directional motion in the cortex with respect to the perinuclear region.

In the second part of this Thesis, we studied dynamical aspects of microtubule buckling using *Xenopus laevis* melanophores as a model system. Microtubule buckling is a transient and localized event commonly observed in living cells and characterized by a fast bending of the filament followed by its relaxation. It has been proposed that these rapid deformations depend on active forces resulting from the action of molecular motors.

We characterize these buckling events by tracking single fluorescent microtubules from confocal movies with high temporal resolution (0.3–2 s). We recovered the center coordinates of the filaments with 10–20 nm precision and analyzed the amplitude of the deformation as a function of time.

Using numerical simulations, we explored different force mechanisms resulting in filament bending. The simulated events reproduced many features observed for microtubules in living cells, suggesting that a mechanistic model captured the essential processes underlying microtubule buckling.

Also, we studied the interplay between actively transported vesicles and the microtubule network using a two-color technique. This minimally invasive technique allowed the observation of force driven events and their correlation with the vesicles motion. The results suggested that microtubules may affect transport indirectly in addition to serving as tracks of motor-driven organelles.

In an attempt to extend this analysis to other biological systems we focused on prostate cancer cells that display abnormal expression of cytoskeletal proteins resulting in an augmented capacity to resist chemotherapy and colonize distant organs.

We developed computational tools to analyze fluorescence images of the cytoskeleton in prostate cancer cells, and found that under Heme oxygenase 1 (HO-1) induction (HO-1 is implicated in the regulation of cell morphology) these cells presented a significant higher proportion of filopodia-like protrusions favoring zippering among neighboring cells.

Overall, we performed biological experiments in order to observe the cytoskeleton developed techniques that allowed us to study these filaments in living cells. With this, we were able to analyze quantitatively the importance of the balance and dynamics of active forces within living cells on microtubule network organization. These tools were useful to asses cytoskeletal modifications in prostate cancer cells.

Keywords: cytoskeleton, fluorescence microscopy, microtubules, filament tracking, filament buckling, prostate cancer.

Publicaciones asociadas a esta tesis

Lateral motion and bending of microtubules studied with a new single-filament tracking routine in living cells - Carla Pallavicini, Valeria Levi, Diana E. Wetzler, Juan F. Angiolini, Lorena Benseñor, Marcelo A. Despósito, Luciana Bruno. *Biophysical Journal* 106 (12), 2625–2635. **2014**.

Heme oxygenase-1 in the forefront of a multi-molecular network that governs cell–cell contacts and filopodia-induced zippering in prostate cancer - Alejandra V Paez, Carla Pallavicini, Federico Schuster, Maria Pia Valacco, Jimena Giudice, Emiliano G Ortiz, Nicolás Anselmino, Estefania Labanca, Maria Binaghi, Marcelo Salierno, Marcelo A Martí, Javier H Cotignola, Anna Woloszynska-Read, Luciana Bruno, Valeria Levi, Nora Navone, Elba S Vazquez, Geraldine Gueron. *Cell Death and Disease* 7 (12), e2570-16. **2016**.

Characterization of microtubule buckling in living cells - Carla Pallavicini, Alejandro Monastra, Nicolás González Bardeci, Diana Wetzler, Valeria Levi, Luciana Bruno. *European Biophysical Journal* 46 (6), 509–515. **2017**.

Índice general

1. Introducción	12
1.1. El citoesqueleto	12
1.1.1. Filamentos de actina	13
1.1.2. Filamentos intermedios	15
1.1.3. Microtúbulos	16
1.2. Proteínas asociadas al citoesqueleto	19
1.2.1. Motores moleculares	19
1.3. Microscopía de fluorescencia	24
1.3.1. Resolución de un microscopio óptico	26
1.4. <i>Tracking</i> de filamentos a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia	28
1.5. Propiedades mecánicas de los filamentos del citoesqueleto	34
1.5.1. Modelo de varilla semiflexible	34
1.5.2. Rigidez flexural	34
1.5.3. Ecuación de la elástica de una varilla	35
1.5.4. Ecuación de Euler	36
1.5.5. Longitud de persistencia de biopolímeros	36
1.5.6. Determinación de la longitud de persistencia a partir de la descripción de Fourier	38
1.5.7. Cálculo de curvaturas mediante un análisis de Fourier de las formas de los filamentos	40
1.5.8. <i>Buckling</i> de microtúbulos	40
2. Métodos Experimentales	43
2.1. Células melanóforas de <i>Xenopus laevis</i>	43
2.1.1. Cultivo celular y preparación de muestras	43
2.1.2. Depolimerización de la red de actina	44
2.1.3. Marcación de endosomas fluorescentes	44
2.1.4. Remoción de ATP celular	44
2.1.5. Inhibición de polimerización y depolimerización de microtúbulos	44
2.1.6. Transfecciones transientes	44

2.1.7.	Fijación de células	45
2.2.	Técnicas de biología molecular	45
2.2.1.	Transformación de células competentes	45
2.2.2.	Extracción de DNA plasmídico	46
2.2.3.	Construcción del plásmido mCherry-vim(1-138)	47
2.3.	Microscopía	49
2.3.1.	Microscopía de epifluorescencia de campo amplio	49
2.3.2.	Microscopía confocal	50
2.4.	Métodos estadísticos para el análisis de los datos	50
2.4.1.	Test de Wilcoxon	50
2.4.2.	Método de <i>Bootstrap</i>	51
2.4.3.	Construcción de histogramas	51
3.	Desarrollo de una rutina de <i>tracking</i> de microtúbulos individuales en células vivas	52
3.1.	Análisis de perfiles de intensidad con redes neuronales	53
3.2.	Implementación de la rutina de <i>tracking</i> de filamentos: AFTER . . .	54
3.3.	Evaluación de AFTER	58
3.3.1.	Error del algoritmo	58
3.4.	Evaluación del error en imágenes confocales simuladas	58
3.4.1.	Intersección de filamentos	61
3.4.2.	Fondo inhomogéneo	62
3.4.3.	Rotación de la imagen	64
3.4.4.	Influencia del tamaño del píxel	65
3.5.	Determinación del error de <i>tracking</i> en imágenes de microscopía confocal	66
3.5.1.	Microtúbulos <i>in vitro</i> fijados	66
3.5.2.	Células fijadas	68
3.6.	Extensión de AFTER I: <i>Tip tracking</i>	69
3.7.	Adaptación de AFTER II: Análisis de imágenes de filamentos obtenidas por STORM	71
3.8.	Conclusiones	72
4.	Estudio de la mecánica de microtúbulos en células vivas	74
4.1.	Análisis de las formas de los microtúbulos	74
4.1.1.	Descripción discreta de la forma de los filamentos	75
4.1.2.	Cálculo de curvaturas	76
4.1.3.	Cálculo de la longitud de persistencia para filamentos simulados	77
4.2.	Determinación de la longitud de persistencia de microtúbulos en células melanóforas de <i>Xenopus laevis</i>	81

4.2.1.	Utilización de MAPs para marcar establemente la red de microtúbulos	84
4.2.2.	Influencia de la red de actina sobre la lp^* de los microtúbulos .	85
4.2.3.	Influencia de los filamentos intermedios sobre la lp^* de los microtúbulos	86
4.2.4.	Efecto de las fuerzas de polimerización y depolimerización en la distribución de formas de la red de microtúbulos	88
4.3.	Conclusiones	90
5.	Movimiento lateral de microtúbulos en células vivas	92
5.1.	Desplazamiento cuadrático medio	92
5.1.1.	Influencia de las redes de filamentos de actina y filamentos intermedios en el movimiento lateral de microtúbulos	94
5.1.2.	Mapeo del movimiento de microtúbulos en células vivas	97
5.2.	Conclusiones	99
6.	Deformación de microtúbulos y producción de fuerzas: estudio numérico	101
6.1.	Los eventos de <i>buckling</i> ocurren frecuentemente en células vivas . . .	101
6.2.	Modelado del movimiento de un microtúbulo mediante simulaciones numéricas	102
6.3.	Deformación de un filamento en distintos escenarios	105
6.3.1.	Fuerzas de compresión	105
6.3.2.	Fuerzas Transversales	111
6.3.3.	Relajación del filamento	113
6.3.4.	Influencia de la longitud del filamento	115
6.3.5.	Influencia de las condiciones de borde	116
6.4.	Conclusiones	117
7.	<i>Buckling</i> de microtúbulos en células vivas	119
7.1.	Eventos de <i>buckling</i> en células melanóforas de <i>X. laevis</i>	119
7.2.	Caracterización espacial de eventos de <i>buckling</i>	121
7.3.	Fuerzas activas dentro de la célula	122
7.3.1.	Influencia de las fuerzas de polimerización y depolimerización en las características espaciales de los eventos de <i>buckling</i> . . .	123
7.4.	Evolución temporal de los eventos de <i>buckling</i>	124
7.4.1.	Crecimiento	127
7.4.2.	Relajación	128
7.5.	<i>Tracking</i> simultáneo de endosomas transportados activamente y microtúbulos	129

7.6. Conclusiones	134
8. Influencia del citoesqueleto en las características invasivas de células de cáncer de próstata	137
8.1. Patrones migratorios de células PC3 bajo la expresión forzada de HO-1	138
8.2. Distancias entre células	139
8.3. Modificación del citoesqueleto bajo inducción de HO-1	141
8.3.1. Longitud de persistencia aparente de los microtúbulos	141
8.3.2. Modificaciones en la red de actina: análisis de los contactos entre células	143
8.3.3. Análisis de las protrusiones celulares de cáncer de próstata en la presencia de medio condicionado	148
8.4. Conclusiones	150
9. Conclusiones generales y perspectivas	152
Apéndices	156
A. Abreviaturas usadas	157

Capítulo 1

Introducción

1.1. El citoesqueleto

Las células eucariotas tienen la capacidad de migrar, modificar su forma, resistir a fuerzas externas y dirigir el transporte interno de organelas, proteínas y otras cargas para su supervivencia [1]. Todas estas funciones dependen de un conjunto interconectado de proteínas filamentosas conocido como citoesqueleto. El mismo está compuesto por tres clases de biopolímeros: los filamentos de actina, los filamentos intermedios y los microtúbulos (figura 1.1). Como describiremos más adelante, ciertas propiedades mecánicas de estos polímeros hacen que podamos pensar en ellos como cables, sogas y tubos, respectivamente. El citoesqueleto contiene además una gran colección de proteínas accesorias que se vinculan a los filamentos y los entrelazan o median la interacción con otras estructuras intracelulares tales como la membrana plasmática, organelas, proteínas de membrana y cromosomas [2].

Las propiedades mecánicas, la organización y el movimiento de estas redes de proteínas determinan, en gran parte, la morfología y las propiedades mecánicas de las células. Esta relación es especialmente importante en el caso de células animales, las cuales carecen de pared celular [2]. Además de determinar la estructura global de la célula, el citoesqueleto también es crucial para su organización interna.

Desde su descubrimiento, las proteínas del citoesqueleto han sido purificadas y polimerizadas *in vitro*, resultando en filamentos virtualmente indistinguibles de los observados dentro de las células [2]. Mientras que los filamentos de actina y los microtúbulos son polímeros compuestos por un único tipo de proteínas (actina y tubulina, respectivamente), los filamentos intermedios se componen por una variedad de proteínas, dependiendo del tipo celular. Más de 50 proteínas de filamentos intermedios han sido identificadas y clasificadas en grupos basados en similitudes en sus secuencias de aminoácidos [3].

Los tres tipos de filamentos tienen en común el estar formados por dos o más protofilamentos. Esto genera interacciones no sólo entre subunidades de un mismo

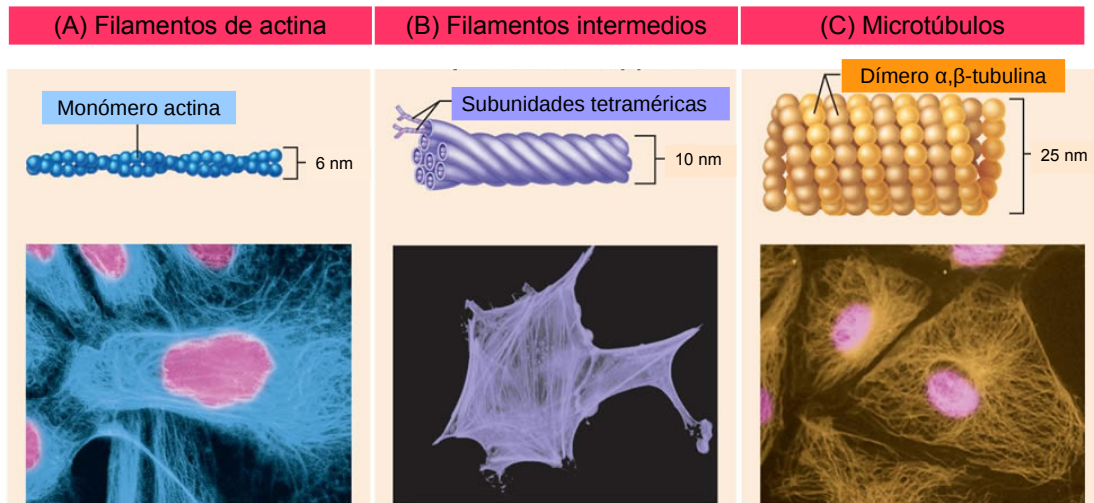


Figura 1.1: **Filamentos del citoesqueleto:** Los paneles superiores muestran esquemáticamente cada filamento y las subunidades que los componen. Se esquematizan en forma simplificada los monómeros como esferas. En los paneles inferiores se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de las distintas redes : (A) Filamentos de actina en azul y núcleo en rosa. (B) Filamentos intermedios en violeta. (C) Microtúbulos en amarillo y núcleo en rosa. Figura adaptada de (<http://biologicalfreak.blogspot.com.ar/2017/07/1-cytoskeleton-07-14-2017.html>)

protofilamento sino también entre ellos, lo cual determina que la polimerización y depolimerización ocurra sólo por la adición o sustracción de monómeros en los extremos y no mediante la rotura o quiebre de los filamentos. Esta es una de las razones por las cuales los filamentos tienen grandes longitudes dentro de las células [2].

Si bien los microtúbulos están formados por dos proteínas distintas (i.e. α -tubulina y β -tubulina), estas proteínas tienen estructuras similares que resultan en propiedades mecánicas prácticamente idénticas, por lo que podemos considerar a estos filamentos como cuasi-simétricos.

En las siguientes secciones describiremos cada tipo de filamento con más detalle.

1.1.1. Filamentos de actina

Los filamentos de actina son polímeros polares que están formados por dos protofilamentos entrelazados [2]. Estos filamentos se forman a partir del autoensamblado de actina monomérica. La dinámica de polimerización/depolymerización depende de un ciclo de eventos que involucran la unión e hidrólisis ATP.

La formación del filamento ocurre en etapas, tal como esquematiza la figura 1.2 [4]. En primer lugar, se produce el reclutamiento de los monómeros (actina-G) a un complejo proteico de nucleación [5]. Este complejo se encuentra constituido por tres monómeros de actina-G-ATP y diferentes proteínas nucleadoras, entre las cuales

se encuentran el complejo Arp2/3 y las forminas. En segundo lugar, se produce la polimerización del filamento de actina por la adición rápida de más monómeros de actina-G-ATP, constituyéndose el extremo positivo (+, *barbed end*) del filamento. Por otro lado, la depolimerización de los mismos ocurre en el extremo negativo (−, *pointed end*) donde la hidrólisis de ATP genera un cambio conformacional que disminuye la energía de interacción entre las subunidades.

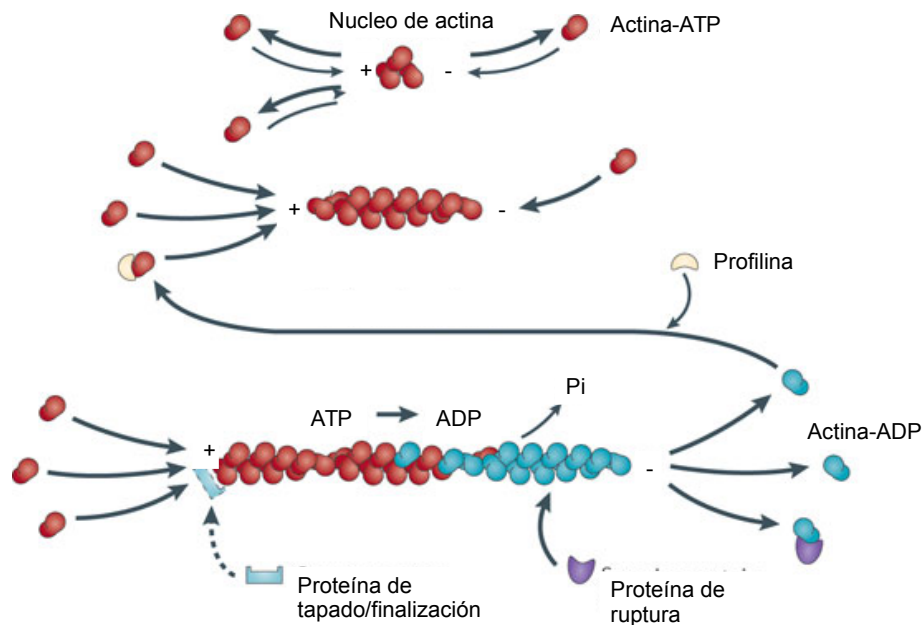


Figura 1.2: **Esquema de la polimerización y depolimerización de los filamentos de actina:** Figura adaptada de [4]

Estructuralmente, los filamentos de actina consisten en una doble hélice con un diámetro aproximado de 6 nm [2] en las cuales las subunidades pueden contactarse tanto lateral como longitudinalmente (figura 1.1) [5]. Un período completo del filamento contiene 26 subunidades que realizan 12 vueltas completas, con una longitud de 72 nm.

La polaridad de los filamentos tiene dos consecuencias importantes [2]. En primer lugar, y como ya hemos mencionado, la polimerización tiene una cinética más veloz en un extremo (+) que en otro (−). En segundo lugar, la polaridad resulta esencial para el movimiento unidireccional de proteínas motoras sobre estos filamentos, como veremos más adelante.

Los filamentos de actina individuales se ensamblan en dos tipos de estructuras que tienen diferentes funciones dentro de la célula: manojos (*bundles*) y redes de actina. En los *bundles* los filamentos se empaquetan en fibras de varios filamentos paralelos. En el caso de las redes, los filamentos están más débilmente interconectados en arreglos ortogonales que forman una estructura entrelazada tridimensional

con propiedades de un gel semi-sólido. La formación de estas estructuras depende de una variedad de proteínas asociadas a actina [3]. Su densidad y topología dependen del tipo de célula, de la matriz extracelular o el sustrato sobre el cual la célula crece y/o de estímulos externos o internos [6, 7]. Por ejemplo, en células epiteliales o en fibras musculares, los filamentos de actina se organizan en fibras de estrés, formando conjuntos de filamentos o *bundles* que soportan tensiones mayores que un filamento individual. Estas fibras están relacionadas a las adhesiones focales que anclan a la célula al sustrato y proveen los mecanismos para la migración celular y supervivencia, entre otros [8].

1.1.2. Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios están formados por protofilamentos entrelazados en forma de sogá. A diferencia de los filamentos de actina y los microtúbulos, los filamentos intermedios no son estructuras únicas, sino un conjunto de polímeros con distinta estructura molecular y caracterizados por poseer un diámetro de 10 nm [2].

Los diversos tipos de filamentos intermedios, se constituyen a partir del ensamblado de diferentes proteínas filamentosas, las cuales carecen de actividad enzimática -a diferencia de los monómeros de microtúbulos y filamentos de actina- pero conservan una subestructura necesaria para su autoensamblaje [1].

La figura 1.3 esquematiza el proceso de polimerización de filamentos intermedios. Brevemente, la secuencia de siete aminoácidos permite la formación de dímeros enrollados entre dos hélices α paralelas. En la siguiente etapa del ensamblaje, dos de los dímeros enrollados interaccionan anti-paralelamente formando un tetrámero, el cual constituiría la unidad fundamental para el ensamblaje del filamento. La disposición antiparalela de los dímeros implica que el tetrámero y, por consiguiente, el filamento que forma, sea una estructura no polarizada, i.e. es la misma estructura en ambos extremos y es simétrica en toda su longitud. Si bien la etapa final del ensamblado de los filamentos intermedios aún no está completamente caracterizada, se postula que los tetrámeros se añaden al filamento en crecimiento alineándose a lo largo de su eje y uniéndose siguiendo un patrón helicoidal [1] .

En contraste con la actina y tubulina, las cuales se encuentran altamente conservadas, las proteínas que forman los filamentos intermedios comparten sólo $\approx 20\%$ de identidad en sus secuencias [9]. En las células existen diversos tipos de filamentos intermedios los cuales se clasifican en cinco grupos en función de su estructura primaria, propiedades de ensamblado y expresión génica [10]. Estructuralmente, las proteínas tipo I y II (queratinas) y las proteínas tipo IV (subunidades de neurofilamentos) se caracterizan por formar heteropolímeros en células epiteliales y neuronas, respectivamente. Por otro lado, las proteínas tipo III (vimentina, desmina, la pro-

teína fibrilar glial y periferina) forman homopolímeros en células mesenquimáticas y ectodérmicas. Por último, las proteínas tipo V constituyen los filamentos intermedios nucleares o laminas [11].

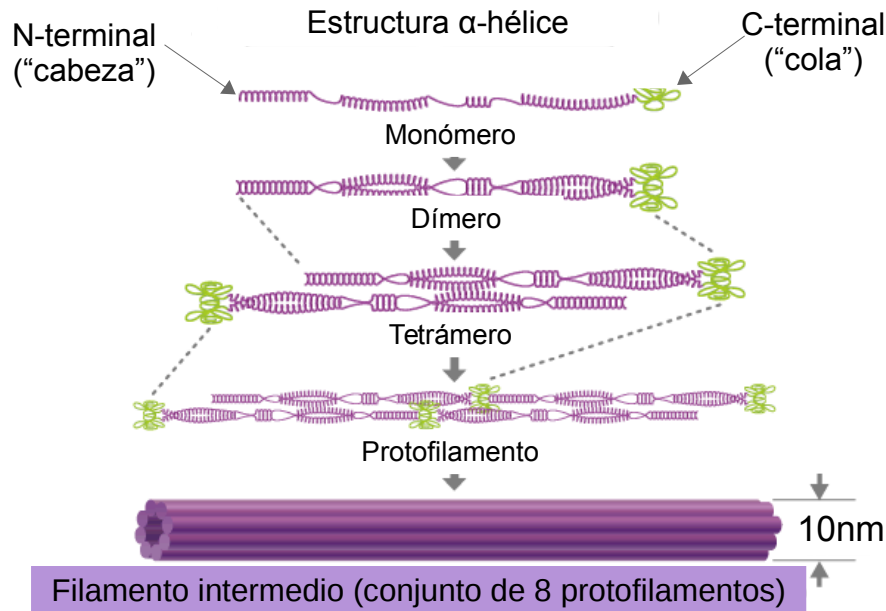


Figura 1.3: **Esquema de la polimerización de filamentos intermedios:** Figura adaptada de (<http://csls-text.c.u-tokyo.ac.jp/active/>)

Los filamentos intermedios forman redes complejas dentro de las células, interactuando con los filamentos de actina y microtúbulos. Son abundantes en células bajo tensión física, tales como células epidermales, y en neuronas. En general los filamentos intermedios son relativamente estables ya que los ciclos de polimerización y depolimerización son menos frecuentes que los observados para actina y microtúbulos. Sin embargo, cuando la célula atraviesa cambios importantes, como ser la división celular, su degradación y reconstrucción se vuelven muy activos [2].

1.1.3. Microtúbulos

Los microtúbulos son filamentos tubulares que se forman por el autoensamblado de subunidades heterodiméricas de α y β -tubulina. Los dímeros se asocian longitudinalmente en forma cabeza-cola para formar un protofilamento. Estos protofilamentos luego se asocian lateralmente formando una hoja que se cierra para formar un tubo cilíndrico de diámetro interno 18 nm y diámetro externo 25 nm. En general, los microtúbulos se constituyen por 13 protofilamentos, aunque este número puede variar en el rango 8-17, resultando en un arreglo helicoidal de los dímeros de tubulina [2].

Los microtúbulos son estructuras denominadas polares debido a que las unidades que los componen (heterodímeros de α y β -tubulina) son asimétricas. Se denomina el extremo positivo (+) del microtúbulo a aquél donde se observan rápidos ciclos de crecimiento o decrecimiento, mientras que el extremo negativo (−) presenta ciclos lentos [2]. Otra consecuencia de la polaridad de los filamentos es la asimetría en su superficie, tal como mencionamos para filamentos de actina, que es fundamental para el transporte direccional de cargas. En muchos tipos celulares, estos filamentos se organizan en forma estrellada: los extremos negativos se concentran en una estructura llamada centrosoma, cercana al núcleo de la célula mientras que los extremos positivos se extienden hacia la periferia celular (figura 1.4) [3, 12].

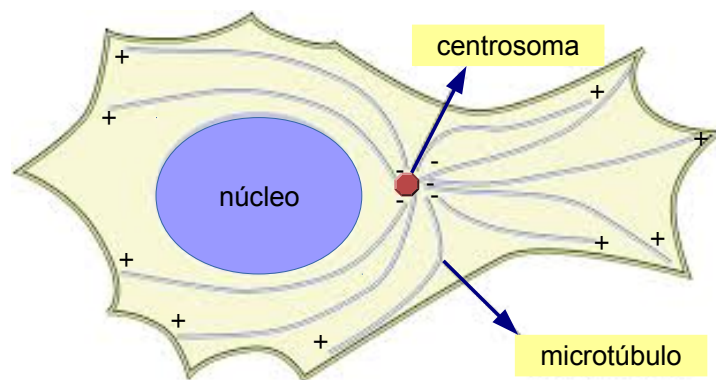


Figura 1.4: **Esquema de la organización de los microtúbulos dentro de las células:** Figura adaptada de [12]

La dinámica de polimerización/depimerización de los microtúbulos se encuentra íntimamente influenciada por un ciclo de eventos que involucran la unión e hidrólisis GTP (figura 1.5). Durante la polimerización, las subunidades de tubulina se encuentran unidas a una molécula de GTP, las cuales poseen un sitio de unión altamente conservado para dicho nucleótido. Sin embargo, cuando el mismo se une a α -tubulina queda prácticamente atrapado en la interfase del dímero y no puede ser hidrolizado, pasando a ser una parte integral de la estructura del heterodímero. Por el contrario, dicho nucleótido en β -tubulina, puede ser hidrolizado a GDP e intercambiado en los dímeros solubles no polimerizados. Esta hidrólisis modula la adición de nuevos dímeros al filamento y conlleva a que los microtúbulos se polimericen mayormente a través del extremo positivo [13].

La dinámica de polimerización de los microtúbulos es esencial para sus funciones biológicas ya que permite adoptar arreglos espaciales que pueden cambiar rápidamente en respuesta las necesidades de la célula e incluso en algunos casos realizar trabajo mecánico [14]. Para llevar a cabo sus variadas tareas dentro de las células, la red de microtúbulos se encuentra en continua remodelación mediante un proceso conocido como inestabilidad dinámica, en el cual los extremos positivos de filamentos individuales cambian entre polimerización y depolimerización mediante la hidrólisis

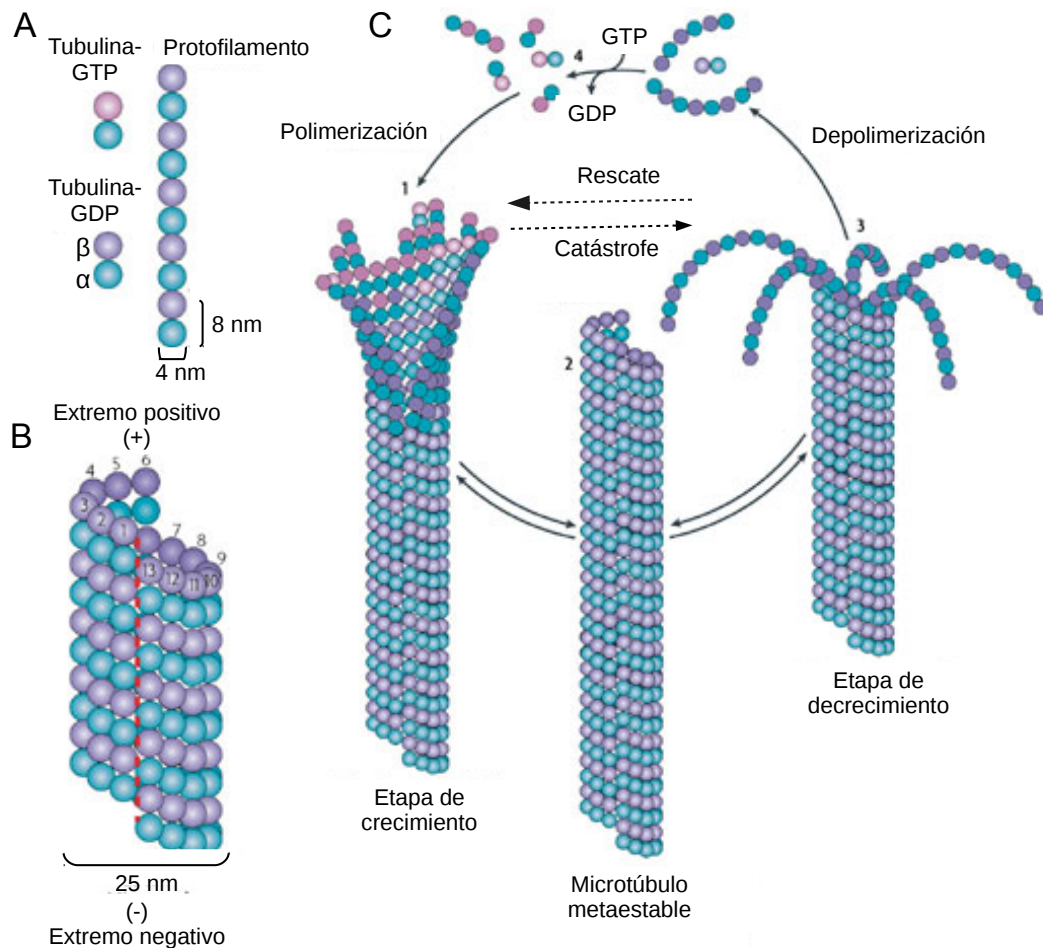


Figura 1.5: **Esquemas de la polimerización y depolimerización de microtúbulos:** (A) Los microtúbulos están formados por heterodímeros estables de α y β -tubulina, organizados en forma "cabeza-cola" para formar protofilamentos. (B) La pared cilíndrica y helicoidal del filamento está formada típicamente por 13 protofilamentos paralelos. (C) La polimerización y depolimerización de los microtúbulos sucede a través de la unión, hidrólisis e intercambio de una guanina en el monómero β -tubulina. Imagen modificada de [13].

de GTP [14, 15]. La transición de crecimiento a decrecimiento se denomina catástrofe, mientras que el proceso inverso se conoce como rescate (figura 1.5C) [16].

Existen eventos en los cuales un microtúbulo en etapa de polimerización colisiona con otro microtúbulo. En estos casos, el ángulo relativo entre los filamentos determina si el microtúbulo en crecimiento interactuará con el secundario, formando un *bundle* o si experimentará un proceso de catástrofe [17]. Se ha demostrado que cuando el ángulo de contacto entre ambos es pequeño ($< 40^\circ$), el extremo positivo del filamento se reorienta y continua creciendo paralelo al microtúbulo que actúa como barrera, formando un *bundle*. Por otra parte, si el ángulo es grande, el microtúbulo o bien cruza por encima del otro o se depolimeriza [18]. Este último mecanismo se

denomina catástrofe por encuentro (*encounter-based catastrophe*) y depende de la fuerza que se opone a la polimerización del microtúbulo [19].

1.2. Proteínas asociadas al citoesqueleto

En la célula, los microtúbulos se encuentran decorados por proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs, por sus siglas en inglés) que los estabilizan y promueven su ensamblado [20]. También existen proteínas asociadas a los otros componentes del citoesqueleto.

Algunas de estas proteínas tienen como función entrelazar filamentos entre sí (*cross-linkers*), como por ejemplo MAP65-1 y PRC1 [21] asociadas a microtúbulos y las fascinas, asociadas a los filamentos de actina [22]. Estas proteínas son responsables de generar manojos de filamentos y también pueden alterar la dinámica del citoesqueleto fijando segmentos y generando deformaciones locales [23]. Existen además proteínas que conectan a los filamentos del citoesqueleto con otras estructuras extra o intracelulares, como las integrinas [24], que tienen un papel importante en la conectividad mecánica de la célula y la transmisión de fuerzas (por ejemplo, mediando la adhesión celular al sustrato e intercelular).

Las MAPs pueden afectar las propiedades mecánicas de los microtúbulos. En particular, Samsonov et al. [25] mostraron que la unión de la proteína tau (la MAP predominante en neuronas) varía de acuerdo a la curvatura del filamento y sugirieron que la interacción del microtúbulo con esta proteína podría afectar las propiedades mecánicas locales del biopolímero. También, Felgner et al. [26] y Mickey y Howard [27] demostraron que distintas MAPs, incluyendo tau, aumentaban la rigidez flexural de microtúbulos purificados. En un estudio más reciente, Portran et al. [28] mostraron que la MAP65/Asel de *Arabidopsis thaliana* tiene el efecto opuesto, ya que reduce la longitud de persistencia de microtúbulos *in vitro*. Estos resultados sugieren que los efectos de las MAPs en la mecánica de microtúbulos no pueden ser generalizados a todo tipo y condición celular.

1.2.1. Motores moleculares

Existen proteínas asociadas al citoesqueleto capaces de producir fuerzas, conocidas como motores moleculares. Son proteínas especializadas en transportar diferentes biomoléculas y componentes celulares a lo largo de los filamentos del citoesqueleto (filamentos de actina y microtúbulos) hasta su destino final en el citoplasma [29-33]. Los motores moleculares también generan fuerzas que actúan sobre el citoesqueleto y afectan la mecánica y organización interna de las células [21, 22, 34-37].

Estas proteínas motoras se dividen en 3 familias, las cuales comparten ciertas

características estructurales pertinentes a su función biológica: miosinas, kinesinas y dineínas.

En la figura 1.6 mostramos un esquema de un motor con sus tres componentes básicos, comunes a todas las familias [38]. Los motores moleculares se unen a las diferentes cargas a través de uno de sus extremos, interactuando directamente con la membrana o complejos proteicos presentes en la misma. En el extremo opuesto, se produce la unión del motor al filamento por medio de dos dominios globulares que presentan actividad catalítica (dominios motores o cabezas globulares). Estos dominios son capaces de unir e hidrolizar ATP y, por consiguiente, son los responsables de generar la energía necesaria para inducir el movimiento a lo largo del filamento [39].

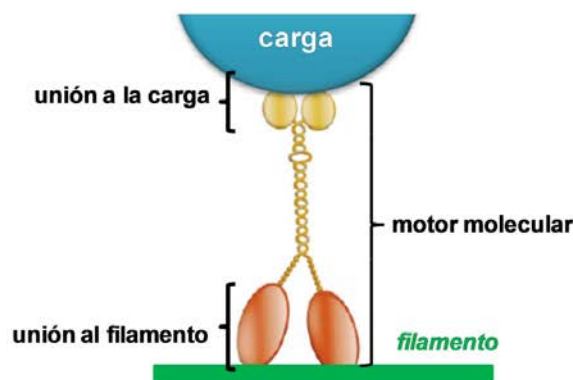


Figura 1.6: **Esquema de la estructura de un motor molecular:** Imagen adaptada de [38]

Las familias de motores moleculares se diferencian por el tipo de filamento sobre el cual realizan el transporte y su direccionalidad [40]. Los motores pertenecientes a la familia de las kinesinas se unen a los microtúbulos y se desplazan hacia sus extremos positivos. Por otro lado, la familia de las dineínas agrupa un conjunto de motores que se caracterizan por desplazarse hacia el extremo negativo de los microtúbulos [41]. Por último, las miosinas constituyen una superfamilia de más de 15 miembros que conducen el transporte hacia el extremo positivo de los filamentos de actina (excepto miosina VI, [42]). En la figura 1.7 mostramos un ejemplo representativo de motores que integran cada una de estas familias.

Las propiedades de los motores definen que estas moléculas puedan avanzar procesivamente a lo largo de los filamentos dando pasos discretos de tamaños nanométricos en forma sucesiva. A modo de ejemplo, describiremos brevemente la dinámica de pasos correspondiente a kinesina-1, uno de los motores moleculares más caracterizados.

Los pasos del motor kinesina-1 se encuentran coordinados en función de un ciclo de eventos que incluyen la producción de energía por hidrólisis de ATP a nivel de las cabezas globulares (figura 1.8). Cuando el motor se aproxima a un microtúbulo,

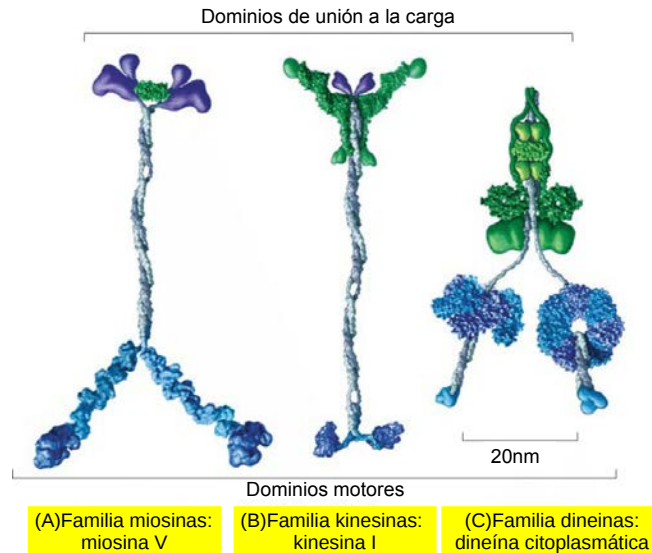


Figura 1.7: **Familias de motores moleculares:** Se muestra un motor representativo de cada familia. Imagen adaptada de [43]

interactúa con β -tubulina a través de los dominios catalíticos [44, 45]. Dichos dominios quedan espacialmente dispuestos uno delante del otro. De esta forma, el avance del motor se produce por el desplazamiento (o paso) de la cabeza retrasada por sobre la cabeza delantera. La energía requerida para lograr este desplazamiento se obtiene por la hidrólisis de ATP que ocurre en dicho dominio. Esta serie de eventos se sucede en el tiempo permitiendo que el motor avance dando pasos discretos a lo largo del filamento [39]. La kinesina se desplaza 8 nm en cada evento de hidrólisis de ATP [46]; distancia denominada paso del motor.

La dinámica de los pasos de kinesina-1 es un claro ejemplo de lo complejo y fascinantes que son los motores moleculares: máquinas biológicas nanométricas, capaces de convertir energía química (provista por la hidrólisis de ATP) en trabajo mecánico [2].

Las dineínas y las miosinas comparten esta dinámica, dando pasos desplazando sus cabezas globulares una delante de la otra. La procesividad y el tamaño de los pasos de dineína son más irregulares que aquellos de kinesina [41, 47-49]. Se han reportado tamaños de pasos para estos motores en el rango 4-32 nm [50]. Algo similar ocurre con la miosina VI, cuyos pasos se encuentran en el rango 21-51 nm [51].

Debido a la alta viscosidad del citoplasma ($10^3 - 10^4$ veces la viscosidad del agua [2, 52]) y a la alta densidad de organelas, biomoléculas de diversos tamaños y macromoléculas (conocido como *crowding* molecular), los motores moleculares deben generar fuerzas que superen el arrastre generado para poder transportar cargas a través del citoplasma.

Las tasas cinéticas en el ciclo de generación de fuerzas de un motor pueden

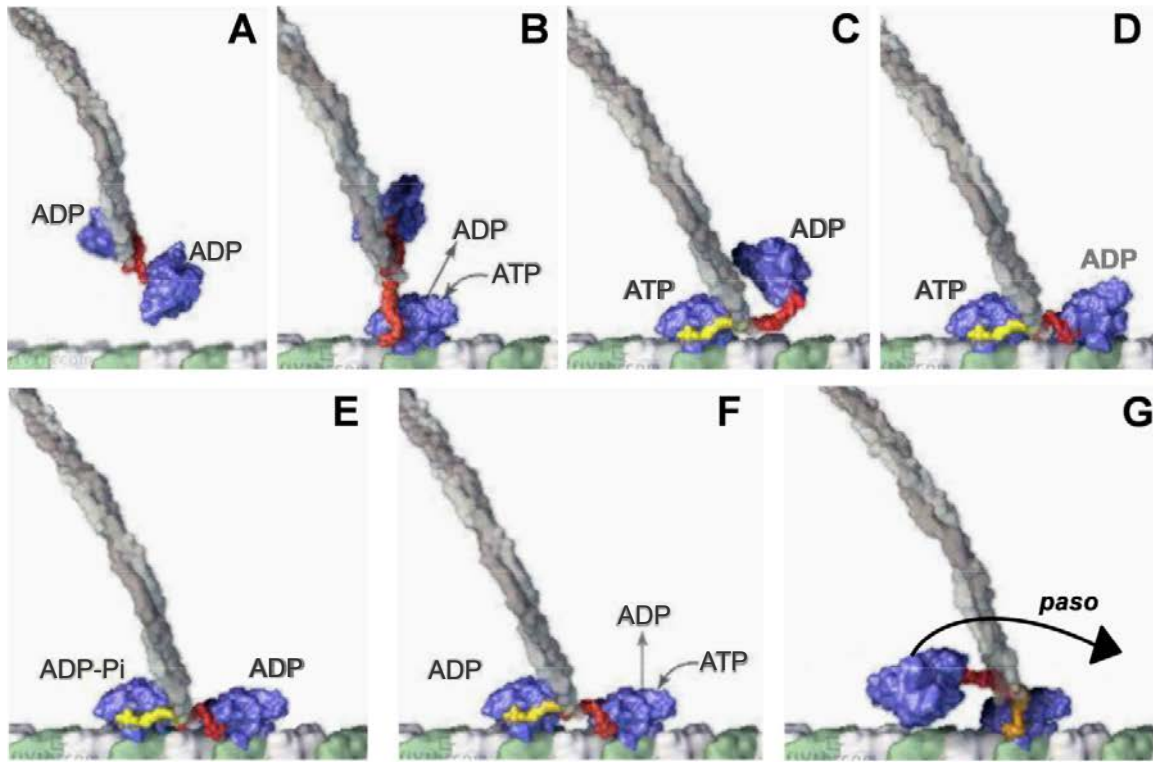


Figura 1.8: **Pasos del motor kinesina-1:** (A) En solución, ambas cabezas globulares presentan ADP unido en su sitio activo. (B) Cuando una de ellas interactúa con el microtúbulo su sitio activo es rápidamente ocupado por ATP. (C) Se genera una interacción fuerte entre el núcleo catalítico y el cuello conector: transición rojo-amarillo. (D) Este evento promueve la unión de la otra cabeza en el siguiente sitio de unión del microtúbulo, generando un estado intermediario donde ambas cabezas se encuentran simultáneamente unidas al filamento quedando ubicada una delante la otra. (E-F) La hidrólisis de ATP en la cabeza trasera genera un cambio conformacional que debilita la interacción con el microtúbulo y la unión del dominio con su cuello conector. (G) Esto permite que la cabeza se desplace hacia adelante y por medio de una exploración local difusiva sobre el microtúbulo encuentre el siguiente sitio de unión ubicado a 16 nm. Imagen modificada de [39]

depender de la carga (F_L) a la que se ve sometido [53]. La figura 1.9 muestra el comportamiento típico de la velocidad de un motor en función de F_L , en este caso para kinesina. Se observa que la velocidad del motor disminuye a medida que aumenta la carga ya que la probabilidad de kinesina de dar un paso decrece con la fuerza opuesta. En el límite de $v = 0$ se determina la carga máxima a la que puede oponerse un motor, la cual se conoce como *stall force* y se asocia con la máxima fuerza que puede generar el motor. Este valor puede variar dependiendo de la concentración de ATP y del tipo de motor.

Se ha medido la *stall force* para los distintos motores *in vitro* utilizando técnicas como las pinzas ópticas. Por ejemplo, para las kinesinas se han reportado valores en el rango 5-7 pN [41, 54]. Para miosina V este valor ronda los 3 pN y para las

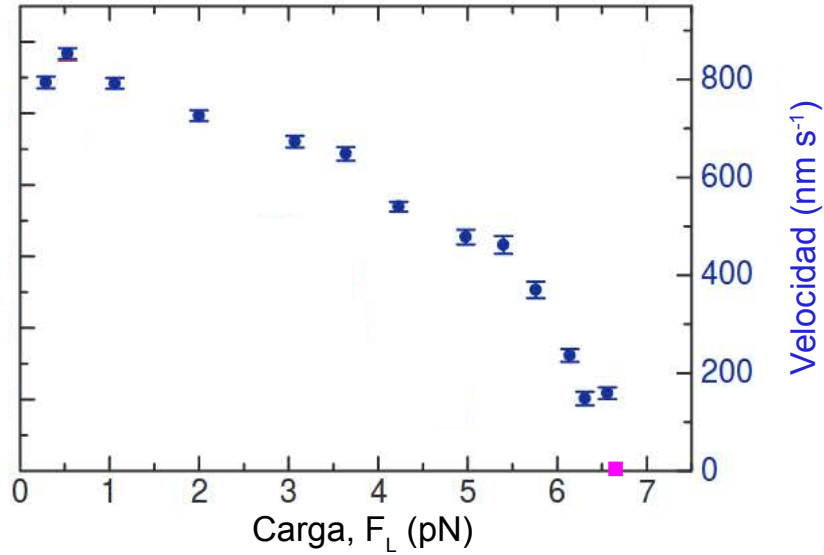


Figura 1.9: **Velocidad vs. Carga para kinesina I:** El (■) ilustra el valor de la *stall force* para este motor. Imagen modificada de [53]

dineínas es 1.1 pN [55].

Dentro de las células estos valores se ven modificados, por ejemplo, se ha medido la fuerza requerida para detener un motor de kinesina-1 en embriones de mosca y se obtuvo un valor ~ 2.5 pN [56]. Al evaluar el transporte mediado por dineína de gotas lipídicas en células de *Drosophila* se hallaron valores típicos de *stall force* de 3.3 y 5.5 pN, múltiplos del valor obtenido para un motor individual. Esto sugiere fuertemente que el movimiento de la carga es llevado a cabo por múltiples motores de dineína [41].

Numerosos trabajos sugieren que el transporte activo de cargas dentro de las células es mediado por múltiples motores [41, 50, 57, 58]. De esta forma se logran trayectorias más procesivas, recorriendo distancias mayores y una mayor generación de fuerzas.

Las fuerzas generadas por los motores son necesarias para diversos procesos celulares además del transporte de cargas. Por un lado, la kinesina-1 es capaz de producir fuerzas que separan conjuntos de microtúbulos unidos por *cross-linkers* como la MAP65-1 y PRC1 [21]. En células grandes, la fuerza provista por la polimerización de los microtúbulos tiene escaso efecto en el posicionamiento del núcleo, y la mayor parte de las fuerzas son generadas por dineína en forma directa (tirando o empujando los microtúbulos) o indirecta (transportando cargas que generan un arrastre por la viscosidad del citoplasma) [36]. Las fuerzas producidas por las dineínas también son capaces de posicionar el centrosoma [59].

Los filamentos de actina presentan dinámicas colectivas e individuales asociados a la fuerza realizada por miosina-II. Este motor puede ejercer suficiente fuerza como para romper los *cross-links* de fascina y asilar los filamentos [22].

1.3. Microscopía de fluorescencia

Con el advenimiento de las sondas fluorescentes, el estudio del citoesqueleto en células vivas cobró impulso ya que fue posible visualizar los filamentos en su entorno natural de una forma muy poco invasiva [60, 61].

Un microscopio de fluorescencia está equipado con fuentes de alta intensidad que emiten luz en el espectro visible. La mayoría de estos microscopios utilizan un montaje conocido como epifluorescencia, en el cual se utiliza al objetivo tanto como condensador de excitación como colector de fluorescencia (figura 1.10) [62].

Se selecciona el rango de longitud de onda de excitación (λ_{ex}) mediante un filtro colocado a continuación de la fuente, que limita la transmisión de la luz a un espectro angosto de longitudes de onda. La luz luego incide en un espejo dicróico y es reflejado a través del objetivo hacia la muestra. La fluorescencia emitida es colectada por el objetivo y luego atraviesa el espejo dicróico. Un filtro de emisión permite seleccionar el rango espectral de los fotones que serán colectados (figura 1.10).

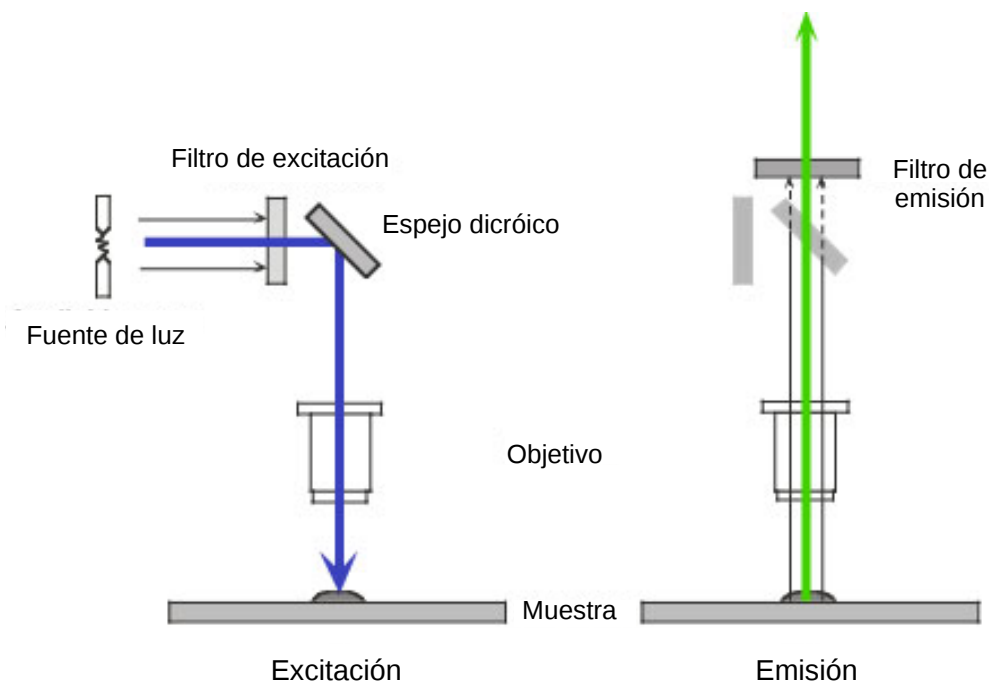


Figura 1.10: **Microscopía de epifluorescencia** Se muestra el camino óptico de en haz incidente (excitación) a la izquierda y el de la fluorescencia colectada (emisión) a la derecha. Imagen adaptada de (<http://microscopy.berkeley.edu/courses/tlm/fluor/>).

En el desarrollo de esta tesis, utilizamos diversos sistemas de microscopía de fluorescencia para adquirir imágenes del citoesqueleto y otros componentes celulares. En microscopía de campo amplio (*wide field*) se ilumina una región amplia de la muestra y se colecta fluorescencia de las moléculas en el volumen excitado. Esto

resulta en una imagen generada por rayos provenientes de planos secundarios (i.e. distintos al plano focal) que reduce el contraste de la imagen [62].

Por otra parte, en un microscopio confocal se aumenta el contraste rechazando la luz que viene de planos fuera de foco. Esto se logra agregando una apertura confocal o *pinhole* al camino óptico previo a la colección de la fluorescencia emitida [63, 64]. El radio del *pinhole* determina la profundidad del volumen focal observado. Además de aumentar el contraste en el plano de observación, los microscopios confocales permiten la obtención de imágenes tridimensionales, muestreando distintos planos en la dirección z (i.e. el eje óptico) con mayor resolución y realizando una reconstrucción 3D del conjunto de planos. La figura 1.11 ilustra el funcionamiento de un microscopio confocal.

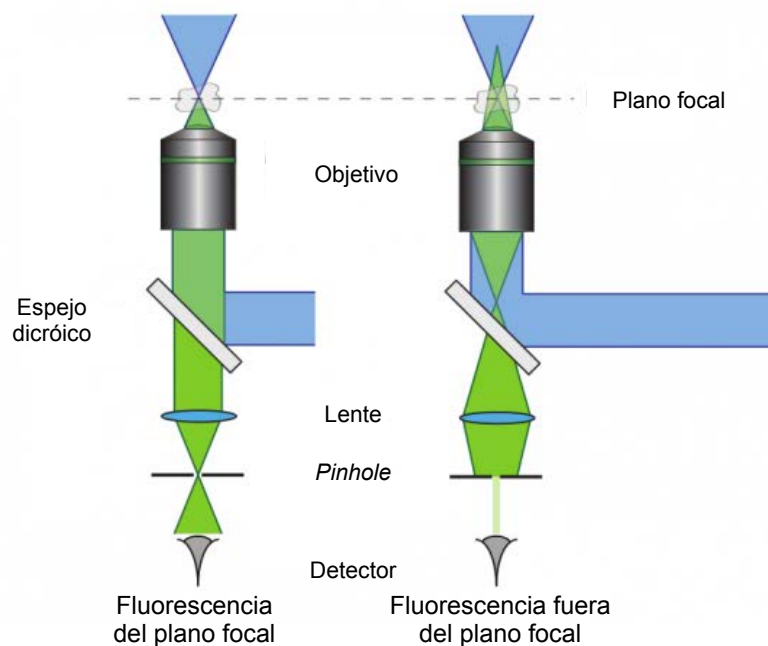


Figura 1.11: Esquema del principio de funcionamiento de un microscopio confocal: Un haz colimado de luz incidente (azul) incide sobre la muestra, haciendo foco en un plano. La imagen de la izquierda muestra la emisión de fluorescencia de un punto del plano focal enfocada a través del *pinhole*. La intensidad detectada de este punto será máxima. La imagen de la derecha muestra un caso donde la fluorescencia emitida proviene de un punto fuera del plano focal y que no es enfocada a través del *pinhole* y por lo tanto muy pocos fotones alcanzará el detector.

En la figura 1.12 mostramos imágenes de la red de microtúbulos de una célula melanófora obtenidas utilizando ambas técnicas, con el fin de ilustrar la diferencia en nitidez y contraste.

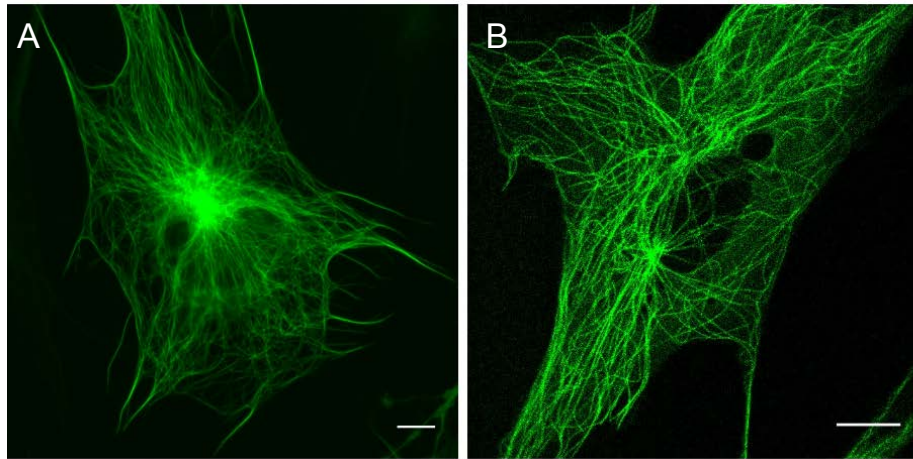


Figura 1.12: **Comparación de imágenes obtenidas con microscopía de campo amplio y confocal:** Imágenes representativas de microscopía de campo amplio (A) y confocal (B) de una célula melanófora de *X. laevis* donde ha sido marcada la red de microtúbulos. Barras de escala: $8\ \mu\text{m}$

1.3.1. Resolución de un microscopio óptico

La resolución de un microscopio óptico se encuentra limitada por la difracción de la luz. Se define resolución como la mínima distancia a la que se encuentran dos objetos puntuales tal que los mismos puedan ser distinguidos como entidades separadas en la imagen [62].

El patrón de difracción obtenido al observar un objeto puntual a través de un microscopio óptico lleva el nombre de disco de Airy [62]. La figura 1.13 muestra un ejemplo de este patrón. La distribución de intensidad del disco de Airy puede ser descrita por medio de una función conocida como función de dispersión de punto (*Point Spread Function*, PSF) [62].

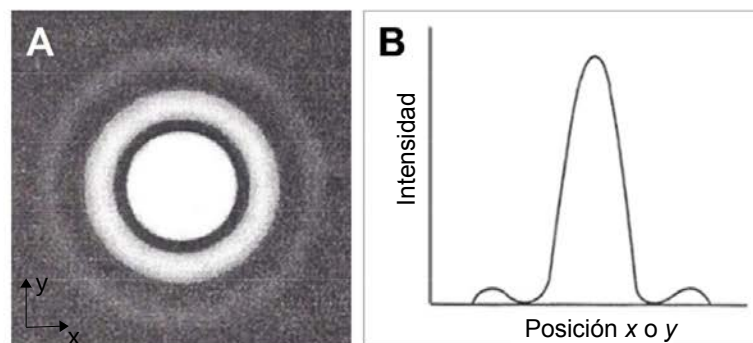


Figura 1.13: **Difracción de una fuente puntual:** (A) Imagen de una fuente puntual observada a través de un microscopio: discos de Airy. (B) Perfil de intensidades: función distribución de punto (PSF). Imagen adaptada de [62].

Cada fuente puntual de luz observada a través de un microscopio genera su propio patrón de difracción, generando una imagen correspondiente al disco de Airy. Para

definir la resolución, nos referimos al criterio de Rayleigh que dicta que la mínima distancia a la cual se pueden resolver dos fuentes cercanas es aquella en la cual el máximo del patrón de una coincide con el primer mínimo de difracción de la otra. Este criterio se encuentra ilustrado en la figura 1.14 [62].

La resolución, por tanto, viene dada por el radio del primer disco de Airy, que para un microscopio de epifluorescencia se define como:

$$w = \frac{0,61 \lambda}{NA} \quad (1.1)$$

donde λ es la longitud de onda y NA es la apertura numérica del objetivo utilizado [62].

Por ejemplo, la resolución en el caso de un objetivo típico de microscopía, con una apertura numérica de 1.35 trabajando con luz en el rango visible ($\lambda = 500$ nm), es del orden de 220 nm.

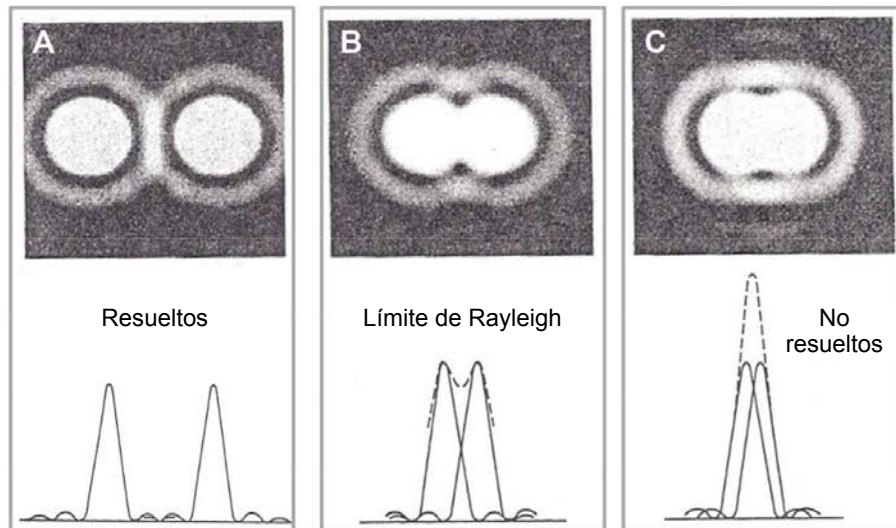


Figura 1.14: **Criterio de Rayleigh para la resolución óptica:** Se muestran ejemplos de imágenes y perfiles de intensidad de dos fuentes puntuales resueltas (A), en el límite de resolución (B) y no resueltas (C). Imagen adaptada de [62].

En el desarrollo de esta tesis, también tuvimos la posibilidad de utilizar una técnica de microscopía de super-resolución llamada STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*, [65]). Brevemente, esta técnica se basa en la activación secuencial y localización de fluoróforos individuales. Se marca la estructura con una sonda fluorescente (idealmente de alto brillo molecular y alta tasa de *photoswitching*) y se colecta un gran número de imágenes de campo amplio donde sólo algunos fluoróforos por imagen emiten. Luego, se aplican técnicas de deconvolución para localizar las posición del máximo del patrón y obtener así las posiciones de los fluoróforos con resolución sub-píxel. Finalmente, se mapean estas posiciones a una imagen final donde se suman las contribuciones de todas las imágenes colectadas.

Una imagen de STORM puede presentar una resolución en el rango 5-20 nm [66] (figura 1.15).

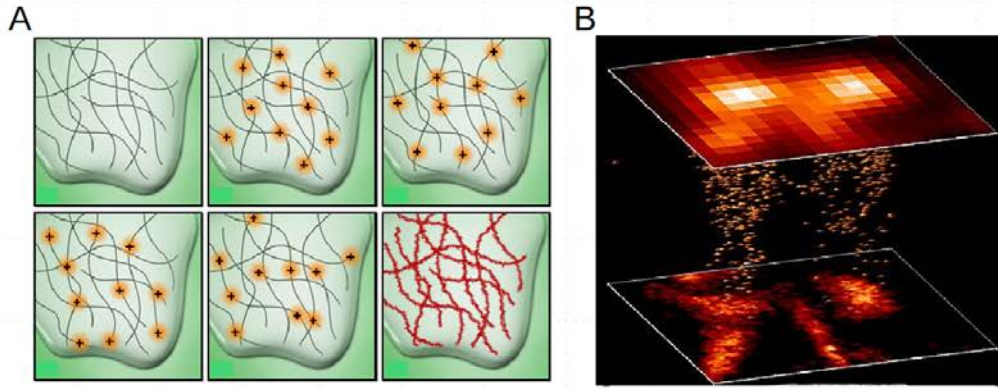


Figura 1.15: **STORM**: (A) Ilustración del funcionamiento de la técnica. Imagen adaptada de [67]. (B) Ejemplo de reconstrucción. Imagen de campo amplio de una muestra (Arriba). Se muestran posiciones de fluoróforos recuperadas en distintas imágenes (puntos naranjas) y finalmente la imagen inferior muestra la reconstrucción STORM. Imagen modificada de (<http://www.futura-sciences.us/dico/d/physics-palmstorm-microscopy-50003843/>).

1.4. *Tracking* de filamentos a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia

Existen numerosos algoritmos para el seguimiento (*tracking*) con precisión nanométrica de partículas individuales de geometría tipo-esférica [58, 68, 69]. En contraste, recuperar las posiciones de un filamento que se encuentra continuamente cambiando su forma y posición es extremadamente difícil.

Las técnicas para localizar partículas fluorescentes se basan en una deconvolución del patrón de difracción que, como mencionamos antes consiste en localizar el centro o centroide del patrón de intensidad, como se muestra en el esquema de la figura 1.16. Al analizar filamentos extensos en el espacio, se obtiene una combinación de los patrones de difracción de varios fluoróforos ubicados en distintas posiciones a lo largo del filamento (figura 1.16) lo cual dificulta la deconvolución de la imagen.

Un factor que puede limitar la localización de partículas es la relación señal a ruido (S/N) definida según la ec. 1.2:

$$S/N = \frac{\langle I_s \rangle - \langle I_b \rangle}{\sigma_{noise}} \quad (1.2)$$

donde I_s e I_b son las intensidades de la señal y del fondo, respectivamente, $\langle \rangle$ representa un promedio y σ_{noise} es la desviación estándar de la señal de fondo.

Dentro de las células, la S/N suele ser pobre como veremos más adelante en el capítulo 3. Esta característica, combinada con el complicado patrón de difracción

generado por filamentos fluorescentes, hace que recuperar sus posiciones dentro de células vivas resulte un desafío importante.

Para poder estudiar las propiedades de los biofilamentos que conforman el citoesqueleto, es necesario extraer información cuantitativa en cuanto a su posición, deformación y movimiento global a partir de imágenes de los mismos. Sin embargo, debido a la geometría asimétrica de estos polímeros, que presentan una dimensión de mayor extensión, no es trivial el proceso de obtención de sus posiciones con alta precisión. Los microtúbulos, por ejemplo, tienen un diámetro sub-resolución óptica y una longitud de varios micrómetros.

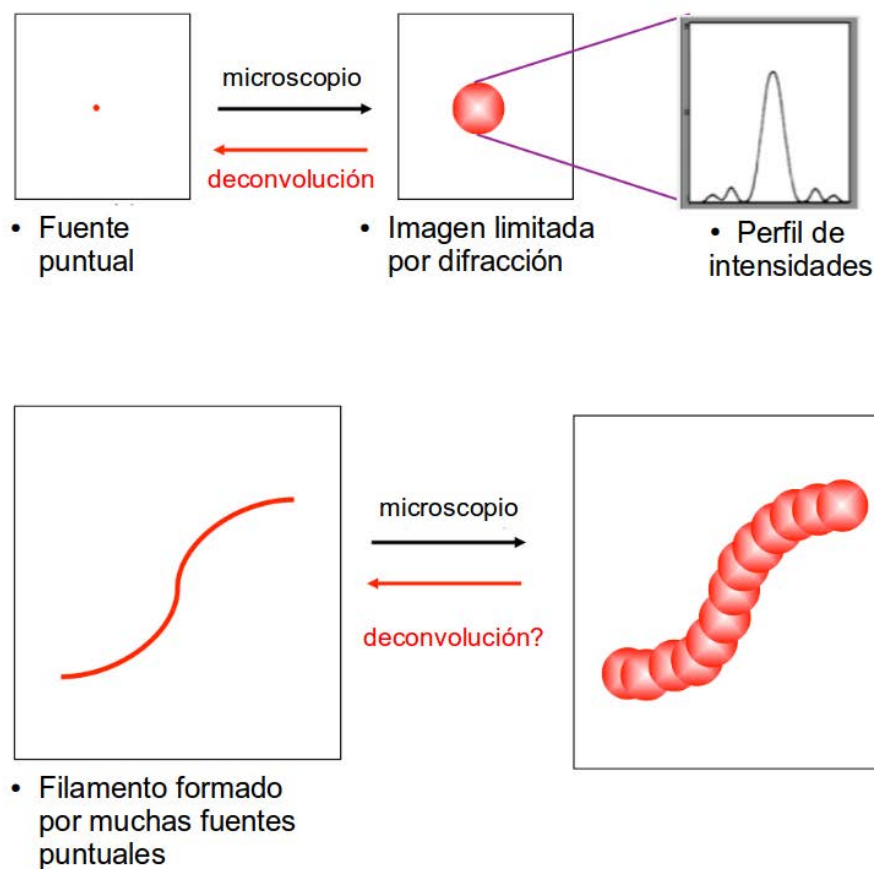


Figura 1.16: **Localización de partículas:** Esquema mostrando una fuente puntual de luz (ej. un fluoróforo) y una combinación de fuentes puntuales, como aquella esperada para un filamento unido a varios fluoróforos.

Varios autores han propuesto métodos para recuperar las posiciones de filamentos fluorescentes. En particular, Gittes et al. [70] diseñaron una rutina que se basa en localizar un pequeño conjunto de puntos en imágenes de un filamento polimerizado *in vitro* (figura 1.17). Este método requiere la selección manual de un conjunto de 10-15 puntos en cada cuadro de la película. Luego, los puntos son interpolados para

lograr 100 puntos equiespaciados y de esta forma obtener un análisis pesado por la longitud de los filamentos. En su trabajo, los autores aplican la rutina a imágenes de filamentos de actina y microtúbulos obtenidas por microscopios ópticos adaptados para DIC (*Differential Interference Contrast*) y microscopía de fluorescencia. Los autores reportan un error de $\sim 0,8\%$ en la longitud del filamento. Sin embargo, este método sólo provee las formas aproximadas de los filamentos y la resolución no es sub-píxel, como los métodos que describiremos a continuación.

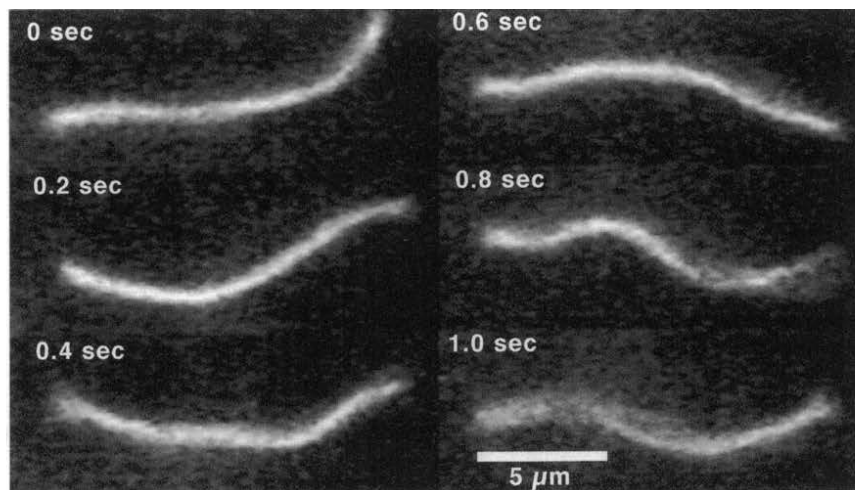


Figura 1.17: **Filamentos aislados *in vitro***: Ejemplo de las imágenes analizadas por los algoritmos que funcionan para filamentos *in vitro* aislados [70-74]). En este caso se muestra una serie temporal de un filamento de actina marcado con rodamina faloidina. Imagen adaptada de [71]

Kas et al. [71] también analizaron imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de campo amplio y microscopía confocal de filamentos fluorescentes aislados *in vitro*, tales como los mostrados en la figura 1.17. La rutina propuesta en ese trabajo es semi-automática: requiere la selección de puntos en los extremos del filamento, para indicar al algoritmo dónde debe finalizar su búsqueda de coordenadas, y de un punto intermedio sobre el filamento donde inicializa dicha búsqueda. La rutina extrae perfiles de intensidad alrededor del punto de inicialización, los ajusta a un modelo cuadrático y selecciona aquel en el cual la pendiente del ajuste es mayor. La orientación de dicho perfil representa la dirección perpendicular al filamento. Se definen las coordenadas xy como el máximo del ajuste obtenido. Esto también define un ángulo tangente al filamento en la posición analizada, el cual se utiliza para dirigir la búsqueda al siguiente punto. Los autores reportan un error de 11 nm para la recuperación de posiciones de filamentos a partir de imágenes de fluorescencia.

Janson et al. [72] usaron microscopía DIC para estudiar los cambios de forma de filamentos aislados *in vitro* (figura 1.18A). Con este fin, seleccionaron microtúbulos que crecían en la dirección ortogonal a la del máximo contraste, resultando en un estudio de filamentos orientados principalmente en la dirección horizontal. Como

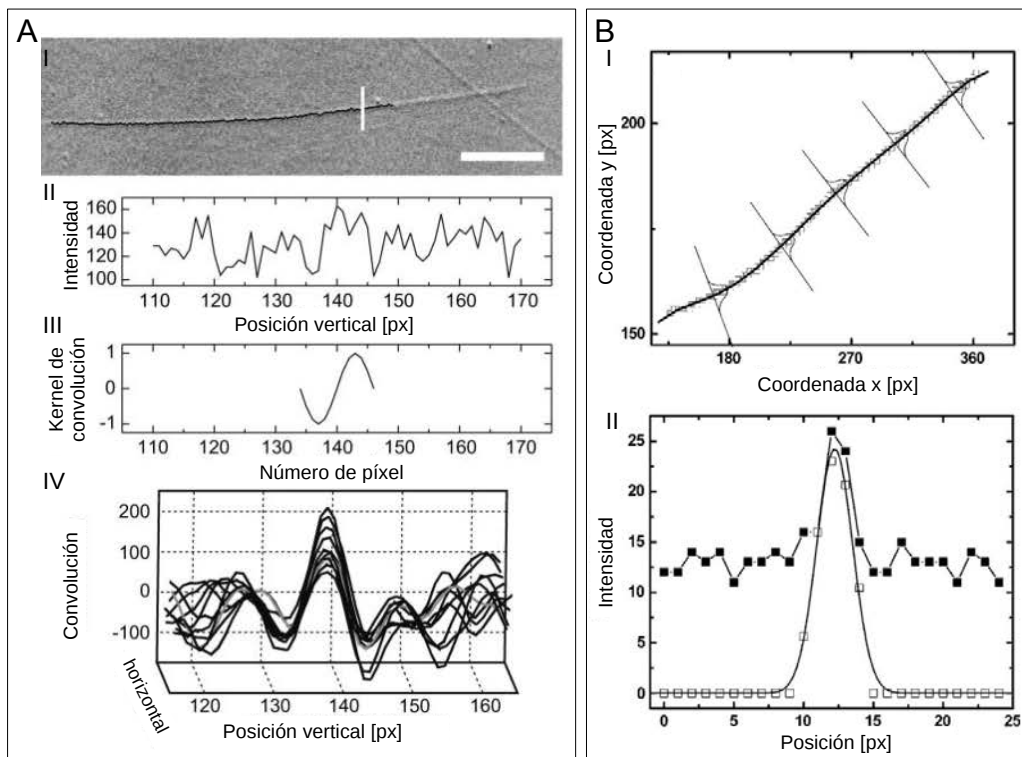


Figura 1.18: **Ejemplos de análisis de perfiles de intensidad:** Dos métodos de análisis de perfiles de intensidad perpendiculares a los filamentos utilizados en rutinas de *tracking*. (A) Rutina desarrollada por Jansen et al. [72]. I) Imagen DIC parcialmente analizada: la línea negra corresponde a las posiciones recuperados por el algoritmo y la línea roja es el perfil de intensidades analizado en este ejemplo. Barra de escala: $5 \mu\text{m}$. II) Perfil de intensidades correspondiente a la columna de píxeles marcada en rojo en I. III) Función seno utilizada como kernel de convolución, para modelar el gradiente de grises de la imagen. IV) Resultados de la convolución: La línea gris corresponde a la convolución del perfil mostrado en II. Las líneas negras son los resultados de la convolución de 9 columnas verticales de píxeles a cada lado del perfil analizado. Imagen adaptada de [72]. (B) Rutina desarrollada por Brangwynne et. al [73]. I) Luego de binarizar y tratar la imagen con métodos computacionales se obtiene un esqueleto del filamento que es ajustado a un polinomio (—). Se muestran esquemáticamente algunos perfiles perpendiculares al ajuste. II) Perfil de intensidades perpendicular al filamento extraído de la imagen de fluorescencia sin procesar (■) y de la imagen filtrada para reducir el ruido (□). El perfil de la imagen filtrada es ajustado a una Gaussiana (—). Imagen adaptada de [73].

consecuencia, la imagen DIC del filamento presenta un gradiente de grises perpendicular al mismo, tal como muestra el panel superior de la figura 1.18A. Esta rutina requiere de la selección manual del punto de inicialización, sobre el extremo izquierdo del filamento que se desea analizar. Para hallar las coordenadas del filamento, extrae un perfil de intensidades vertical de 60 píxeles alrededor de la posición x analizada. Dicho perfil es convolucionado con un período de la función seno y se define la posición y del centro del filamento como la posición del máximo de los

datos convolucionados (figura 1.18A). Luego, pasa a la siguiente posición horizontal donde se analiza el perfil de intensidades alrededor de la posición corregida obtenida en la iteración anterior. Este sistema de *tracking* requiere que los filamentos estén aislados y tengan una forma relativamente recta para su buen funcionamiento, lo cual es posible en condiciones *in vitro*, pero no es el caso de los filamentos hallados en el entorno celular.

Brangwynne et al. [73] también diseñaron un método de *tracking* de filamentos fluorescentes aislados *in vitro* (figura 1.17) que, como primer paso, consiste en binarizar la imagen del filamento mediante la aplicación de un umbral de intensidades a la misma. Luego, la imagen binaria se trata con métodos computacionales; erosionando píxeles positivos pero manteniendo la conectividad de cluster, para lograr una curva de un píxel de ancho, este proceso es llamado esqueletización. Se les aplica un ajuste polinómico a las posiciones definidas por esta curva y las coordenadas ajustadas son utilizadas sobre la imagen de fluorescencia original. Para refinar la posición del filamento se extraen perfiles de intensidad perpendiculares a la función ajustada y se les aplica una deconvolución gaussiana (figura 1.18B). Los autores han reportado un error de 20 nm en la recuperación de las posiciones de los filamentos. En un trabajo posterior [35] utilizan una adaptación de esta rutina para recuperar las posiciones de microtúbulos fluorescentes estáticos en regiones de células donde fue posible aplicar el umbral de intensidad sin perder información del filamento.

Por otro lado, Ruhnnow et al. [75] reportaron un método de localización de filamentos *in vitro* que consiste en la binarización, esqueletización y segmentación de imágenes de fluorescencia de filamentos. La figura 1.19 detalla los pasos seguidos por el algoritmo. Una ventaja de esta técnica es que reconoce automáticamente y reproduce tanto elementos puntuales, como filamentos cortos e intersecciones de filamentos de mayor longitud.

Finalmente, Valdman et al. [74] propusieron un método que considera la forma del biopolímero como un contorno expandido en una base ortogonal de polinomios. Este último enfoque tiene la ventaja de ajustar la imagen completa del filamento y por lo tanto es menos sensible a heterogeneidades en la intensidad de fluorescencia del mismo. Sin embargo, requiere una buena relación S/N, y sólo permite localizar filamentos rígidos y aislados.

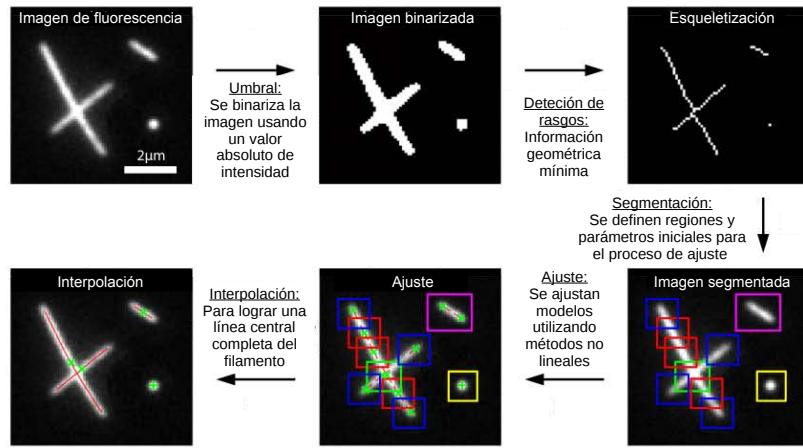


Figura 1.19: **Método automatizado de Ruhnow et al:** Esquema del funcionamiento del método, donde se muestran todas las etapas de manipulación de la imagen hasta obtener las coordenadas del filamento. Los recuadros de diferentes colores indican las distintas estructuras que reconoce el algoritmo: filamento corto (púrpura), partícula puntual (amarillo), extremo de filamento (azul), centro de filamento (rojo) e intersección de filamentos (verde). Imagen adaptada de [75].

La tabla 1.1 resume las características de los métodos de *tracking* de biofilamentos discutidos en esta sección.

Autores/referencia	Filamentos analizados	Automatizado	Bases
Gittes et al. 1993 [70]	<i>in vitro</i> , aislados	No	Selección manual de puntos sobre la imagen
Kas et al 1996 [71]	<i>in vitro</i> , aislados	Semi	Análisis de perfiles sin aplicación de umbral
Janson et al. 2004 [72]	<i>in vitro</i> , aislados	Semi	Análisis de perfiles sin aplicación de umbral
Brangwynne 2007 [73]	<i>in vitro</i> , aislados/ <i>in vivo</i> , estáticos	Sí/Semi	Análisis de perfiles con aplicación de umbral
Ruhnow et al. 2011 [75]	<i>in vitro</i>	Sí	Segmentación y ajuste de la imagen según rasgos geométricos, con aplicación de umbral
Valdman et al. 2012 [74]	<i>in vitro</i> , aislados	Sí	Ajuste del contorno completo sin aplicación de umbral

Tabla 1.1: **Algoritmos de *tracking* de filamentos:** Resumen de las características de los algoritmos de *tracking* de filamentos descriptos.

1.5. Propiedades mecánicas de los filamentos del citoesqueleto

1.5.1. Modelo de varilla semiflexible

Las varillas semiflexibles son un buen modelo para comprender la mecánica de los biopolímeros que constituyen el citoesqueleto. Utilizando las teorías descriptas para estos cuerpos, podemos comprender la respuesta de los filamentos del citoesqueleto ante fuerzas mecánicas e hidrodinámicas que pueden determinar diferentes respuestas biológicas.

1.5.2. Rigidez flexural

Consideramos una varilla de largo L a la que se le aplica una fuerza de compresión pequeña. Se define el radio de curvatura, R , en un punto de la varilla como el radio de la mayor circunferencia tangente a ese punto (figura 1.20), a partir de esta definición, la curvatura se define como $\kappa = 1/R$ y es proporcional al torque [2]:

$$M = EI \frac{1}{R} \quad (1.3)$$

donde EI es la rigidez flexural de la varilla, una propiedad que depende tanto del material como de la geometría.

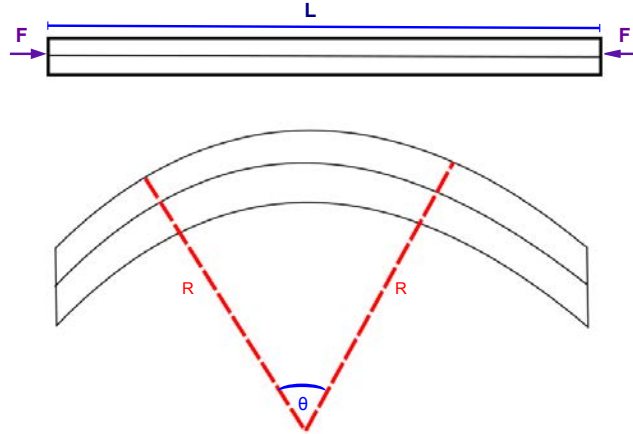


Figura 1.20: **Radio de curvatura:** Esquema mostrando la flexión de una varilla al ser sometida a fuerzas de compresión y representando su radio de curvatura.

El concepto de rigidez flexural es aplicable a cualquier tipo de varilla, sin presuponer que sea isótropa y homogénea ni de sección circular. Es una constante de proporcionalidad entre el momento aplicado y la deformación de la varilla. En general, si la varilla no es isótropa o no tiene sección circular, EI dependerá de la dirección en la cual se curve.

Para un material isótropo y homogéneo, la rigidez flexural se puede separar en dos términos: el módulo de Young, E , que es una propiedad del material; y el segundo momento de inercia de la sección, I , determinado por la geometría de la varilla [2].

Para un biopolímero, como un microtúbulo o filamento de actina, EI depende de las interacciones entre las subunidades de polímero [76]. Hemos mencionado que los filamentos del citoesqueleto tienen simetría helicoidal. Por este motivo, para un filamento desnudo (i.e. sin proteínas asociadas) la rigidez flexural no depende de la dirección hacia la cual se curva.

1.5.3. Ecuación de la elástica de una varilla

Dado un filamento cuyas coordenadas cartesianas son (x, y) , puede realizarse un cambio de variables a las coordenadas (s, θ) que representan la longitud de arco y ángulo tangente (figura 1.21). Estas coordenadas se relacionan con las coordenadas cartesianas según:

$$\begin{aligned}\frac{dx}{ds} &= \cos \theta \\ \frac{dy}{ds} &= \sin \theta\end{aligned}\tag{1.4}$$

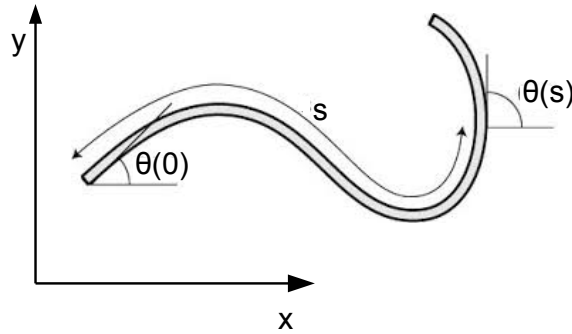


Figura 1.21: **Coordenadas de un filamento:** Esquema de un filamento mostrando la coordenada s a lo largo del contorno y $\theta(s)$, el ángulo tangente al filamento en cada punto.

Toda la información acerca de la forma del filamento se encuentra en la parametrización $\theta(s)$. Para un segmento de radio de curvatura R , la curvatura se expresa como:

$$\frac{d\theta}{ds} = \frac{1}{R}\tag{1.5}$$

Utilizando estas relaciones, podemos reescribir la ec. 1.3:

$$\frac{d\theta}{ds}(s) = \frac{1}{EI}M(s) \quad (1.6)$$

De esta forma obtenemos una ecuación en función de las coordenadas (s, θ) de donde podemos evaluar la rigidez flexural de la varilla.

1.5.4. Ecuación de Euler

Cuando se aplica una fuerza de compresión de magnitud mayor a un determinado umbral sobre una varilla semiflexible, ésta se flexionará. Este fenómeno de inestabilidad elástica se presenta en estructuras cilíndricas largas, tales como los microtúbulos. La fuerza umbral se denomina fuerza crítica o de Euler, F_c . La misma depende de las propiedades mecánicas y geométricas de la varilla y se define como [77]:

$$F_c = a \frac{EI}{L^2} \quad (1.7)$$

donde L es la longitud y EI la rigidez flexural, a es una constante que depende de las condiciones de borde, esto es, si la varilla se encuentra libre o restringida en sus extremos. Una vez superado este umbral la barra se flexiona y ofrece poca resistencia a seguir deformándose.

1.5.5. Longitud de persistencia de biopolímeros

Hemos mencionado que el citoesqueleto está compuesto por 3 tipos de biopolímeros: los filamentos de actina, los filamentos intermedios y los microtúbulos. Un parámetro comúnmente usado para caracterizar la flexibilidad de un polímero es la longitud de persistencia (lp), definida como [2]:

$$lp = \frac{EI}{k_B T} \quad (1.8)$$

donde EI es la rigidez flexural, k_B es la constante de Boltzmann y T la temperatura. De esta forma, la longitud de persistencia resulta de la competencia entre la rigidez flexural de un polímero y la magnitud de las fuerzas térmicas a las que se ve sometido.

Formalmente, esta longitud define la distancia a partir de la cual la orientación de dos vectores tangentes al contorno de un filamento se encuentran descorrelacionados [2]. En dos dimensiones, el promedio del coseno de $\theta(s) - \theta(0)$ decae exponencialmente a medida que s aumenta. La longitud de persistencia se define entonces:

$$\langle \cos(\theta(s) - \theta(0)) \rangle = e^{-s/2lp} \quad (1.9)$$

La figura 1.22 ilustra cómo la relación entre la escala de observación (en este caso L , la longitud del filamento) y la longitud de persistencia, define si el filamento se comporta como una barra rígida, semiflexible o entrópica [78]:

- Si $lp/L \ll 1$, la energía térmica es suficiente para flexionar al filamento sustancialmente, generando una forma enredada, como una cadena flexible.
- Para $lp/L \approx 1$ se define el régimen de semi-flexibilidad, en este caso la energía térmica es suficiente para producir deformaciones de baja longitud de onda.
- Si $lp/L \gg 1$, las fuerzas térmicas no son capaces de deformar significativamente al filamento, presentando una conformación de barra rígida.

Una manera directa de determinar la longitud de persistencia es estudiar cuantitativamente las formas de un conjunto de filamentos idénticos, ajustando los cambios en su orientación utilizando la ecuación 1.9. Sin embargo, si los filamentos no presentan gran deformación o si los datos que describen la forma son ruidosos, este procedimiento no arroja resultados consistentes.

Un método alternativo desarrollado por Gittes, Mickey y Howard [70] consiste en utilizar la descomposición de Fourier de la forma de los filamentos y analizar la contribución de los distintos modos en un contexto de equilibrio térmico. Este método, que será descrito en detalle más adelante, ha sido implementado para determinar la longitud de persistencia de microtúbulos y filamentos de actina [70].

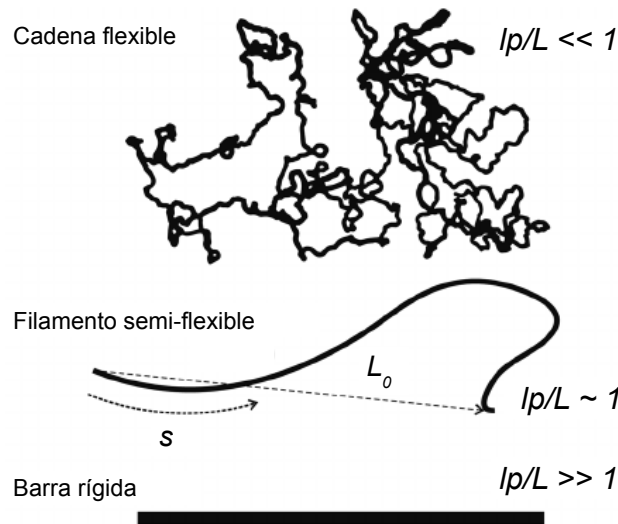


Figura 1.22: **Longitud de persistencia:** La forma de un polímero depende de la relación entre la escala en la cual se lo observa y la longitud de persistencia. Figura adaptada de [78].

Biofilamento	Longitud de persistencia (l_p)	Longitudes típicas (L_c)	l_p/L
ADN	35nm [79]	10 μ m-10cm [80]	$\ll 1$
Filamentos Intermedios	1-3 μ m [81-83]	1-30 μ m	≤ 1
Filamentos de actina	0.1-1 μ m [84]	0.1-10 μ m [85, 86]	~ 1
Microtúbulos	2mm [87]	1-30 μ m	$\gg 1$

Tabla 1.2: Longitud de persistencia de biofilamentos

En la tabla 1.2 se incluyen las longitudes de persistencia medidas para diversos biopolímeros, incluyendo los filamentos del citoesqueleto. Los filamentos de actina se encuentran dentro del régimen semi-flexible, por otro lado, los microtúbulos presentan una longitud de persistencia 2-3 órdenes de magnitud mayor que los tamaños celulares y por lo tanto pueden considerarse rígidos en estas escalas espaciales.

1.5.6. Determinación de la longitud de persistencia a partir de la descripción de Fourier

La parametrización $\theta(s)$ de la forma de un filamento se puede expresar como una superposición de modos de Fourier [70]:

$$\theta(s) = \sum_{n=0}^{\infty} \theta_n(s) = \sqrt{\frac{2}{L}} \sum_{n=0}^{\infty} a_n \cos\left(\frac{n\pi s}{L}\right) \quad (1.10)$$

donde a_n es la amplitud del modo n .

Es importante mencionar que la elección de modos de función coseno es arbitraria y con el fin de optimizar los recursos computacionales, pueden obtenerse los mismos resultados utilizando funciones seno o modos combinados.

A partir de la descripción de Fourier de la forma de un filamento semiflexible de longitud L es posible hallar la energía elástica almacenada y asociarla a la rigidez de la misma [70].

Si tenemos una varilla flexible confinada a deformarse en un plano, su forma está completamente descrita por $\theta(s)$ y su curvatura por $d\theta/ds$. Cuando la varilla se flexiona por la acción de una fuerza, almacena energía elástica que restablece su forma original luego de liberada la fuerza. Si el radio de curvatura es lo suficientemente grande, podemos aplicar la ley de Hooke a un filamento semiflexible con la constante elástica definida por su rigidez flexural, EI . De esta forma, definimos la energía elástica por unidad de longitud como [70]:

$$\frac{dU}{ds} = \frac{1}{2} EI \left(\frac{d\theta}{ds} - \frac{d\theta^0}{ds} \right)^2 \quad (1.11)$$

donde $\theta^0(s)$ es la forma del filamento relajado sin fuerzas aplicadas. Integrando sobre la longitud total, L , obtenemos la energía total (U):

$$U = \frac{1}{2}EI \int_0^L ds \left(\frac{d\theta}{ds} - \frac{d\theta^0}{ds} \right)^2 \quad (1.12)$$

Con la expansión para la forma dada por la ec. 1.10 obtenemos una expresión para U en función de las amplitudes de los modos, a_n :

$$U = \frac{1}{2}EI \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{n\pi}{L} \right)^2 (a_n - a_n^0)^2 \quad (1.13)$$

donde a_n^0 representa la amplitud en ausencia de fuerzas y toma un valor distinto de cero cuando el filamento relajado no es completamente recto [70]. El modo de orden 0 no se encuentra en la definición de U ya que representa la orientación promedio del filamento y no contribuye a la energía elástica. Según el teorema de equipartición [88] cada término cuadrático de la ec. 1.13 contribuye un promedio de $1/2 k_B T$ (con k_B la constante de Boltzmann y T la temperatura), luego:

$$\text{var}(a_n) = \langle (a_n - a_n^0)^2 \rangle = \frac{k_B T}{EI} \left(\frac{L}{n\pi} \right)^2 \quad (1.14)$$

aquí $\langle \rangle$ representa un promedio de ensamble. Debido a que no hay términos cruzados en U , las cantidades $a_n - a_n^0$ no están correlacionadas para distintos valores de n .

Reescribiendo la ec. 1.8 utilizando la ec. 1.14 se tiene:

$$lp = \frac{L^2}{n^2 \pi^2 \text{var}(a_n)} \quad (1.15)$$

Esta ecuación muestra que utilizando la descomposición de Fourier de las formas de los filamentos, es posible calcular su longitud de persistencia. La expresión 1.15 puede ser reescrita como:

$$\text{var}(a_n) = \frac{1}{lp} \frac{1}{q_n^2} \quad (1.16)$$

donde $q_n = n\pi/L$ es el vector de onda para un filamento de longitud L .

Este método ha resultado robusto para determinar la longitud de persistencia de microtúbulos y filamentos de actina *in vitro* [70].

Dentro de las células, de tamaños típicos de decenas de micrones, los microtúbulos presentan una gran variedad de formas y curvaturas. Sin embargo, si nos basamos en la longitud de persistencia medida para estos filamentos *in vitro* esperaríamos un comportamiento rígido de los mismos a estas escalas, lo cual sugiere que otras fuerzas además del ruido térmico contribuyen a la deformación y distribución de formas los microtúbulos. Más adelante volveremos sobre este punto.

1.5.7. Cálculo de curvaturas mediante un análisis de Fourier de las formas de los filamentos

Hemos definido previamente la curvatura de un filamento como $\kappa = d\theta/ds$ (ec. 1.5). Una vez realizada la descomposición de Fourier de $\theta(s)$, podemos hallar una expresión para su derivada en forma directa. Es por esto que resulta natural extender el análisis en modos de Fourier para estimar la distribución de curvaturas. De esta forma obtenemos la siguiente fórmula para la curvatura, expresada en modos de Fourier [89]:

$$\kappa(s) = \left| \frac{d\theta(s)}{ds} \right| = \sqrt{\frac{2}{L}} \sum_{n=0}^{\infty} a_n \left(\frac{n\pi}{L} \right) \sin \left(\frac{n\pi s}{L} \right) \quad (1.17)$$

De esta forma, se puede calcular la curvatura en cada posición del filamento y producir una distribución de curvaturas. Para asignarle un valor de curvatura a un filamento se toma el promedio sobre toda su longitud: $\kappa = \langle \kappa(s) \rangle$.

Bicek et al. [89] utilizaron este método para calcular las curvaturas de microtúbulos fluorescentes en células epiteliales. Recuperaron distribuciones de curvaturas que luego contrastaron con aquellas de filamentos simulados. A partir de este análisis llegaron a la conclusión que la distribución de las curvaturas puede proveer información acerca de los procesos que producen la deformación de los filamentos. Por ejemplo, si los filamentos fueron sometidos a fuerzas térmicas, la distribución tendrá una forma Gaussiana. Por otra parte, si se aleja de una distribución normal, los filamentos se encuentran bajo la acción de otras fuerzas [89].

1.5.8. *Buckling* de microtúbulos

Uno de los aspectos interesantes al estudiar microtúbulos en células vivas son los eventos dinámicos conocidos como *buckling* en los cuales una región del microtúbulo se curva súbitamente y luego relaja su forma más lentamente [23, 90, 91]. El análisis de estos eventos puede ayudar a comprender cómo distintas fuerzas dentro de la célula modelan al citoesqueleto, por lo que serán estudiados en detalle en esta tesis.

Se han propuesto distintos mecanismos capaces de producir *buckling* de microtúbulos. La figura 1.23 muestra esquemáticamente cada uno de ellos, éstos son: polimerización de los filamentos, contracción de acto-miosina y la acción de motores moleculares asociados a microtúbulos [23, 34].

Las fuerzas de polimerización pueden generar eventos de *buckling* de acuerdo al modelo ilustrado en la figura 1.23A. En este modelo, el microtúbulo crece presionando una barrera (por ejemplo la membrana u otro filamento) que puede ser rígida [92] o flexible [93], agregando subunidades que aumentan su compresión. Esto genera que el filamento se flexione, al superar su fuerza crítica [94]. Las fuerzas producidas

en este proceso están en el rango de 2-5 pN [23, 92, 93]. Sin embargo, otros autores sugieren que cuando el microtúbulo se polimeriza en contra de un obstáculo se desencadena una catástrofe que relaja al filamento antes de que se deforme [19], por lo cual este mecanismo no sería el principal causante de eventos de *buckling*.

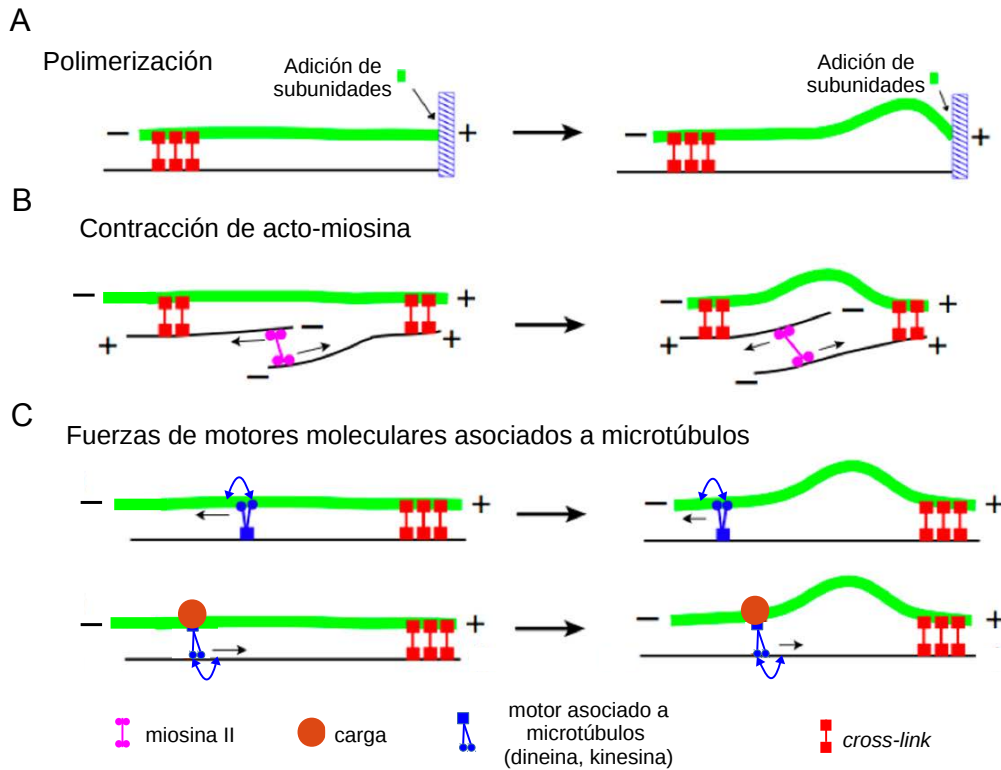


Figura 1.23: Ilustración de los posibles mecanismos de producción de *buckling* de microtúbulos en células: (A) Polimerización: al polimerizarse contra un obstáculo fijo, el microtúbulo acumula material lo cual genera una compresión que puede curvarlo. (B) Contracción de Acto-miosina: El motor miosina II contrae fibras de actina, si a su vez las mismas se encuentran ancladas por algún mecanismo a un microtúbulo, éste sentirá una fuerza de compresión. (C) *Buckling* por fuerzas de motores asociados a microtúbulos: Un motor molecular desplazándose sobre un microtúbulo y anclado en otra estructura dará pasos sin movimiento neto que comprime el filamento. Por otra parte un motor desplazándose a lo largo de un filamento, con su carga unida a un segundo filamento genera una fuerza sobre este último. Figura adaptada de [34].

Por otra parte, los modelos que involucran motores incluyen tres mecanismos diferentes. El primer modelo considera que el motor miosina contrae filamentos de actina unidos a un microtúbulo causando *buckling* [95], como se esquematiza en la figura 1.23B. En esta dirección, existe evidencia de que el flujo retrógrado de acto-miosina puede generar eventos de *buckling* de microtúbulos [96].

Finalmente, los motores moleculares asociados a microtúbulos (kinesina y dineína) pueden ejercer fuerzas y deformar el filamento de acuerdo a dos mecanismos distintos, ilustrados en la figura 1.23C. El primer mecanismo postula que si el motor intenta trasladarse sobre el microtúbulo mientras se encuentra anclado a otra es-

estructura de la célula (membrana celular, otro filamento, etc.) este anclaje le impide desplazarse de manera efectiva a lo largo del filamento. Durante este proceso, el motor continúa dando pasos sin desplazamiento neto, "inyectando" material en el sentido contrario a su marcha y dando como resultado una compresión del filamento [34, 59, 97].

El segundo mecanismo propone que un motor desplazándose sobre un microtúbulo, transportando una carga que a su vez se encuentra unida a otro filamento, genera una fuerza sobre este último [34, 98]. Como consecuencia de este arrastre, el microtúbulo se comprime y deforma.

En la literatura, existe un consenso de que los dos últimos modelos son preponderantes en los eventos de *buckling* de microtúbulos *in vivo*. Existen reportes que tratan la deformación de los microtúbulos específicamente por el motor dineína [23, 34, 59] y otros que demuestran que la kinesina tiene un papel importante en estos eventos [97, 99].

Más allá de la evidencia de que los eventos de *buckling* son generados por procesos activos, muchos aspectos relevantes de los mecanismos involucrados en estos fenómenos permanecen desconocidos. Por ejemplo, en algunos trabajos se propuso que son causados por fuerzas de compresión [23, 34, 91-93]. Por otra parte, existen trabajos que describen eventos generados por fuerzas laterales (i.e. en la dirección perpendicular al eje principal del filamento) [95, 100] con características prácticamente indistinguibles a las de los mencionados anteriormente. Estos antecedentes imponen cautela a las conclusiones que se pueden extraer del análisis de datos experimentales.

En esta tesis estudiaremos eventos de *buckling* en células vivas intentando discernir entre los distintos mecanismos que los generan y su importancia en la remodelación del citoesqueleto.

Capítulo 2

Métodos Experimentales

2.1. Células melanóforas de *Xenopus laevis*

2.1.1. Cultivo celular y preparación de muestras

Las células melanóforas de *X. laevis* fueron cultivadas a 25°C en medio 70 % L-15 (Sigma-Aldrich) enriquecido con glutamina y suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Internegocios, S.A.) como se describe en [101]. En el desarrollo de la tesis, se utilizó la línea *wild type* y otra línea celular de melanóforas expresando establemente EGFP-XTP, un homólogo de *Xenopus* de la proteína tau fusionada a la proteína verde fluorescente (*Enhanced Green Fluorescent Protein*, EGFP). Esta línea celular fue un obsequio del Dr. Vladimir I. Gelfand (Northwestern University, Chicago, IL), a quien estamos muy agradecidos.

Para poder observar la red de microtúbulos correctamente, fue necesario inhibir la producción de melanina en las células. Esta línea celular presenta organelas llamadas melanosomas (diámetro ≈ 500 nm), conteniendo melanina la cual absorbe luz en el rango visible e interfiere con la detección de la fluorescencia de las sondas utilizadas para marcar el citoesqueleto. La inhibición de melanina fue lograda mediante el uso de fenilurea (PTU, por sus siglas en inglés), que inhibe la enzima tirosinasa involucrada en la biosíntesis de melanina. La incubación de las células en medio completo conteniendo PTU por períodos prolongados de tiempo reduce el número de melanosomas sin afectar la proliferación celular [30].

Dos días antes de las mediciones en el microscopio, las células se depositan sobre cubreobjetos circulares esterilizados de 25 mm de diámetro dentro de placas de cultivo con pocillos de 35 mm conteniendo 2 ml de medio completo. Previo a la observación los cubreobjetos son lavados con medio 70 % L-15 libre de suero y montados en una cámara diseñada especialmente para nuestro microscopio.

2.1.2. Depolimerización de la red de actina

La latrunculina es una toxina con capacidad de secuestrar monómeros de actina en células vivas con una estequiometría 1:1 y prevenir la polimerización de los filamentos de actina. Administrada *in vivo* tiene el efecto de disrumipir estos filamentos del citoesqueleto.

Para depolimerizar actina, se incuban las células con 10 μM latrunculina B (Sigma-Aldrich) durante 30 min antes de la observación [101, 102]. Estas muestras luego son estudiadas durante 30 min.

2.1.3. Marcación de endosomas fluorescentes

Los endosomas fluorescentes se generan por endocitosis de FM4-64, una sonda fluorescente (Molecular Probes). Las células se tratan con 4 μM FM4-64 en medio completo 10 minutos antes de la adquisición, esta sonda se intercala en la membrana y al ser ésta endocitada, la sonda se incluye en los endosomas. Luego se adquieren imágenes durante aproximadamente 1 hora.

2.1.4. Remoción de ATP celular

Para eliminar las vías de generación de ATP de las células, éstas se incuban durante una hora en medio completo con 50 mM deoxiglucosa y 20 mM azida sódica antes de la adquisición de las imágenes en el microscopio.

2.1.5. Inhibición de polimerización y depolimerización de microtúbulos

La vinblastina es una droga que a concentraciones bajas estabiliza los microtúbulos, inhibiendo su polimerización y depolimerización [103]. La droga se une a la tubulina inhibiendo el ensamblado de los microtúbulos. En concentraciones relativamente altas, esta droga puede fraccionar los filamentos.

Para estabilizar los microtúbulos se trata a las células con 10 nM vinblastina durante 10 min previos a observarlas [104]. Luego se colectan imágenes durante 1 hora.

2.1.6. Transfecciones transientes

Las células melanóforas de *X. laevis* fueron crecidas sobre cubreobjetos como se explicó en la Sección 2.1.1, y transfectadas con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor y observadas 24 hs después del protocolo de transfección. Cuatro plásmidos fueron utilizados para estudiar estas células. Por

un lado, se utilizó una construcción conteniendo la secuencia completa de vimentina fusionada a EGFP. La expresión de este plásmido nos permitió visualizar esta red de filamentos debido a que vimentina-GFP puede incorporarse a la red endógena.

Por otro lado, se empleó una construcción dominante negativa de vimentina que contiene el dominio no helicoidal (residuos 1-102) y los primeros 36 aminoácidos del dominio altamente conservado α -hélice 1A de vimentina fusionado a GFP (GFP-vim(1-138)). La expresión de esta mutante en las células impide el autoensamblado de vimentina para formar el filamento [105, 106]. Estos plásmidos fueron provistos por nuestro colaborador Dr. Vladimir Gelfand (University of Northwestern, USA).

Se utilizó una variante del plásmido de vimentina truncado fusionado a m-cherry, el cual fue clonado según el protocolo descrito más adelante (sección 2.2.3). Finalmente, se utilizó GFP- α -tubulina, un plásmido que codifica al monómero fusionado a la proteína verde fluorescente.

2.1.7. Fijación de células

Se utilizaron dos técnicas de fijación, los cuales utilizan metanol (i) o paraformaldehído (PFA) (ii):

(i) El metanol deshidrata las células y las fija permeabilizando su membrana. Se añade a las células el metanol frío (-20°C) y se las incuba a -20°C durante 10 minutos. Luego, se enjuagan con 70 % PBS.

(ii) Para la fijación con paraformaldehído se incuban las células con 3,7 % PFA durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se las permeabiliza con 0.2 % Triton X-100 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se enjuagan con 70 % PBS.

2.2. Técnicas de biología molecular

2.2.1. Transformación de células competentes

Se transformaron cepas Top10 de *Escherichia coli* quimiocompetentes siguiendo los protocolos descritos en la literatura [107]. En primer lugar, se agregan 5-10 μl de DNA (10-50 ng) a 50 μl de células competentes incubándose en un baño de agua-hielo durante 30 minutos. Luego, se calienta a 42°C durante 30 segundos y nuevamente se incuba en el baño de agua-hielo por 2 minutos.

Para la recuperación de las células competentes, se agregan 700 μl de medio LB a temperatura ambiente y los tubos posteriormente se incuban 1 hora a 37°C con

agitación constante (150 rpm). Al terminar el período de recuperación, las células se centrifugan 5 minutos a 5000 rpm y el *pellet* se siembra en placas conteniendo medio LB-agar en presencia del antibiótico de selección.

2.2.2. Extracción de DNA plasmídico

La amplificación y purificación de los plásmido fue realiza en pequeña (miniprep) y gran escala (maxiprep) de acuerdo a los protocolos indicados en la literatura [107].

2.2.2.1. Miniprep

A partir de las placas selectivas de LB-agar con antibiótico, se repican colonias individuales de bacterias transformadas con el plásmido que se desea extraer. Estas colonias son luego cultivadas en 3-10ml de medio de cultivo LB a 37°C durante toda la noche (ON, de las siglas de *over night*) en agitación constante (minicultivos).

Los cultivos son centrifugados a 5000 rpm durante 5 minutos y se resuspende el *pellet* en 100 μ l de Solución I (Tris-HCl 25mM, EDTA 10mM, pH=8). Luego, se agregan 200 μ l de Solución II (NaOH 0.2N, SDS 1 %) y se mezcla por inversión 4-5 veces. La muestra se incuba a temperatura ambiente durante 5 min. Por último, se agregan 150 μ l de Solución III (CH₃COOK 5M, CH₃COOH glacial 100 %) a 0°C y, luego de mezclar por inversión, se incuba en un baño de agua-hielo durante 5 min.

Al finalizar la incubación, se centrifuga a 13000 rpm en microcentrífuga durante 30 min a 4°C y el sobrenadante se transvasa a un tubo limpio. Para precipitar, se adicionan 0.6 volúmenes de isopropanol frío (-20°C). Se vuelve a centrifugar durante 20 min y luego se realiza un lavado con etanol 70 %

Por último se descarta el sobrenadante y se deja secar el *pellet*, para luego resuspenderlo en 40 μ l de agua deionizada.

2.2.2.2. Maxiprep

A partir de las placas selectivas de LB-agar con antibiótico, se repican colonias individuales de bacterias transformadas con el plásmido que se desea extraer. Estas colonias son luego cultivadas en 3-10 ml de medio de cultivo LB a 37°C ON en agitación constante. Estos minicultivos son trasvasados a un erlenmeyer conteniendo 400 ml de medio TB e incubados durante 2 días a 37°C en agitación constante.

Estos maxicultivos son centrifugados a 4000 rpm durante 15 minutos y el *pellet* obtenido se resuspende en 10 ml de Solución I. Luego, se agregan 20 ml de Solución II, se mezcla por inversión 4-5 veces y se incuba la muestra en un baño de agua-hielo durante 20 minutos. Al finalizar la incubación, se agregan 15 ml de Solución III a 0°C, se mezcla por inversión y se incuba en agua-hielo 5 minutos.

Se centrifuga a 10000 rpm a 4°C durante 30 minutos, al terminar, se precipita la muestra agregando 0.6 volúmenes de isopropanol (-20°C) y se incuba durante 20 minutos a -20°C. Luego, se centrifuga durante 15 minutos a 5000 rpm a 4°C, se descarta el sobrenadante y se deja secar el *pellet*. Por último, se resuspende el mismo en 3 ml de Solución TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8).

A la muestra resuspendida, se le agregan 3 ml de 5 M LiCl ($T = -20^{\circ}\text{C}$), se mezcla por inversión e inmediatamente se centrifuga a 10000 rpm durante 5 minutos. Al concluir la centrifugación, el sobrenadante se transfiere a un tubo de 15 ml, se agregan 6 ml de isopropanol y se centrifuga 5 minutos a 10000 rpm a 4°C. El *pellet* es resuspendido en 0.5 ml de Solución TE conteniendo 1 μl de RNAsa (20 $\mu\text{g/ml}$).

La muestra es incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente y suplementada con 400 μl de 13 % PEG en 1.6 M NaCl. Luego, se centrifuga 5 minutos a 13000 rpm, se descarta el sobrenadante y el *pellet* es resuspendido en 400 μl de Solución TE.

Posteriormente, se precipita el DNA mediante una extracción con fenol-cloroformo. Esta extracción consiste en 3 pasos: agregado de los solventes, mezcla por inversión y centrifugación 5 minutos a 13000 rpm. En cada paso se recupera la fase acuosa y se la trasvasa a un tubo limpio. En primer lugar, se añade 1 volumen de fenol, se mezcla y centrifuga. A la fase acuosa recuperada se le agrega 1 volumen de una mezcla de fenol-cloroformo (1:1), y se repiten los pasos. Finalmente, al sobrenadante obtenido se le adiciona de 1 volumen de cloroformo.

Finalizada la extracción, se añade 0.1 volumen de 3M CH_3COONa (pH = 5.20) y 2.5 volúmenes de 100 % etanol y la muestra es incubada 20 minutos a -20°C.

2.2.3. Construcción del plásmido mCherry-vim(1-138)

Para una parte de este proyecto fue necesario generar una construcción dominante negativa de vimentina que contiene el dominio no helicoidal (residuos 1-102) y los primeros 36 aminoácidos del dominio altamente conservado α -hélice 1A de vimentina fusionado a mCherry, para que la fluorescencia fuera en un rango espectral distinto al de EGFP y se pudieran observar las sondas simultáneamente. Este trabajo fue realizado bajo la supervisión de la Dra. Diana Wetzler.

Partimos de dos plásmidos: p-Vimentina(1-138)-GFP-N1 (~ 5147 bp) y el vector vacío p-mCherry-N1 (4722 bp). A partir de estos plásmidos seguimos el siguiente protocolo:

El primer día se transforman bacterias competentes según el protocolo descrito en la sección 2.2.1. Al día siguiente se generan minicultivos de estas bacterias con los respectivos plásmidos para realizar una miniprep tal como fue descrito en la sección 2.2.2.1.

Para cuantificar y separar plásmidos se utilizaron geles de 1 % de agarosa que se corrieron a 80V en una cubeta (BioAmerica Inc.).

Se realizaron pruebas de corte para verificar el funcionamiento deseado de las enzimas seleccionadas: Bam-H1 y Eco-R1. Una vez que realizadas las pruebas se procedió a realizar el corte de los plásmidos amplificados y se recortó del gel la banda correspondiente al vector, m-Cherry-N1 (4690 bp), y la correspondiente al inserto, vim(1-138) (414 bp). Purificamos el ADN de estos cortes con el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega).

Luego, se trató al vector con TSAP (*Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, Promega), siguiendo el protocolo del proveedor, para evitar la re-ligación del vector de clonado durante la ligación. Finalmente se ligó utilizando la enzima ligasa con relaciones inserto/vector: 1/1, 3/1 y 5/1.

Para evaluar el resultado se transformaron bacterias con el plásmido construido y se realizó un *screening* de 20 colonias. A partir de una corrida electroforética de proteínas se seleccionó un plásmido para secuenciar.

En la figura 2.1 se muestran imágenes de células de *X. laevis* expresando en forma estable EGFP-XTP y transfectadas con el plásmido generado.

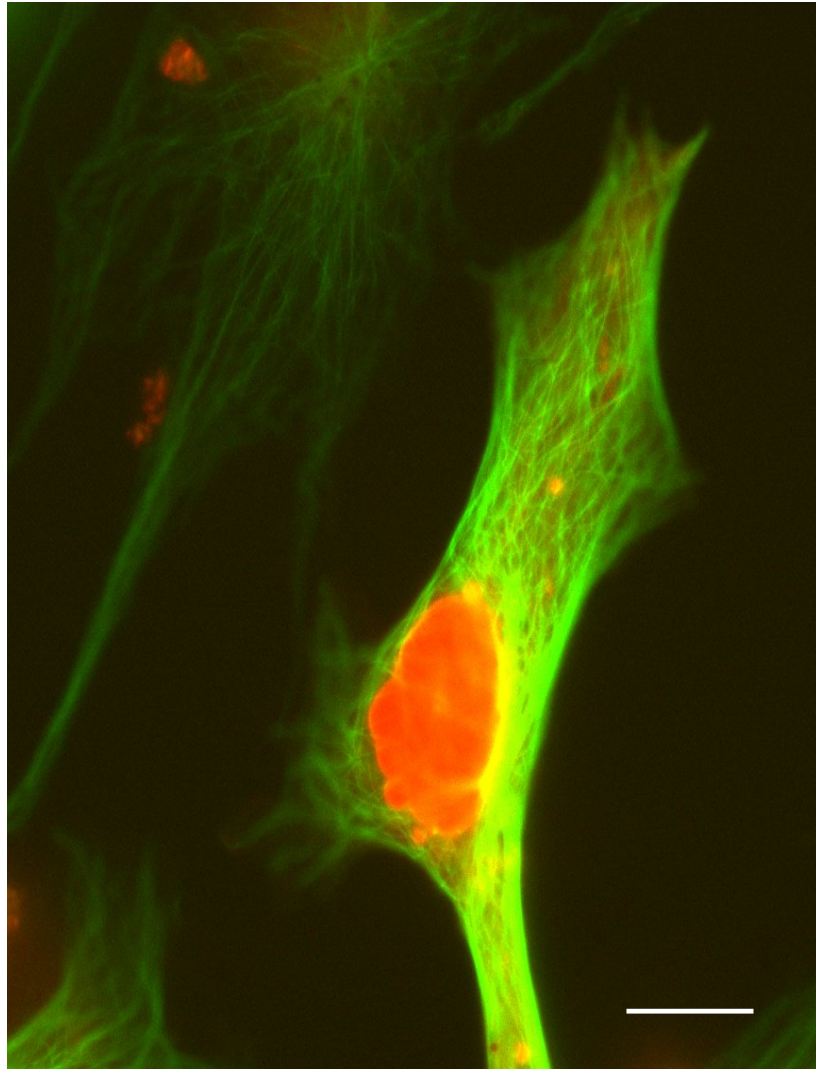


Figura 2.1: **Transfección con mCherry-vim(1-138)**: Imagen confocal compuesta donde se observa una célula melanófora de *Xenopus laevis* marcada con EGFP-XTP (verde) y la vimentina mutada (rojo) reclutada en el núcleo. Barra de escala: 10 μm

2.3. Microscopía

2.3.1. Microscopía de epifluorescencia de campo amplio

Para los experimentos de microscopía de campo amplio se utilizó un microscopio invertido Olympus IX71 (Olympus Inc.) equipado con 2 objetivos (Olympus Inc.): 60X de inmersión en aceite, con $\text{NA} = 1.25$ y 10X con $\text{NA} = 0.30$.

Para observar EGFP-XTP, se utilizó un cubo de fluorescencia U-MWIBA, el cual consiste de un filtro de excitación (pasabanda, BP: 460-495 nm), un espejo dicróico (DM 505 nm) y un filtro de emisión (BP: 510-550 nm), y se excitó a la muestra con un LED de 450 nm. La luz emitida fue colectada con una cámara *QImaging EXi Aqua* (*Bio-Imaging Microscopy Camera*) (figura 1.11).

Para los experimentos de células PC3 marcadas con C-Laurdan se utilizó un cubo U-MWU2: filtro de excitación (BP: 330-380 nm), espejo dicróico (DM 400 nm)

y filtro de emisión (pasa-bajo 420 nm); y se excitó la muestra con un LED de 365 nm.

2.3.2. Microscopía confocal

Las imágenes confocales fueron obtenidas usando un microscopio confocal Olympus FV1000.

En todos los casos, el haz del láser fue reflejado por un espejo dicróico y enfocado sobre la muestra a través de un objetivo 60x de inmersión en aceite Olympus (NA = 1.35). La fluorescencia fue luego colectada por el mismo objetivo, proyectada sobre el *pinhole*, reflejada sobre una red de difracción y transmitida a través de una rendija ajustada para transmitir en el rango de longitudes de onda seleccionado para cada muestra.

En la tabla 2.1 se resumen los arreglos experimentales utilizados en el microscopio confocal para observar cada una de las sondas fluorescentes utilizada en esta tesis.

Sonda	Láser	Espejo dicróico	Banda de λ_{em} colectado (nm)
EGFP	488 nm	DM 405/488	500-600
m-Cherry	543 nm	DM 405/488/543/635	620-700
Rodamina	543 nm	DM 405/488/543/635	555-655
EGFP (CH1) + FM4-64 (CH2)	488 nm	DM 405/488	CH1: 500-550 CH2: 650-750

Tabla 2.1: Arreglos del microscopio confocal para observar las sondas utilizadas: En el caso en el cual se observan dos sondas en simultáneo se denomina CH1: canal 1 y CH2: canal 2.

En todos los casos, la fluorescencia fue detectada por un fotomultiplicador en modo de detección pseudo *photon-counting* y el tamaño del píxel fue de 80-100 nm.

2.4. Métodos estadísticos para el análisis de los datos

2.4.1. Test de Wilcoxon

Las distribuciones de los parámetros obtenidos del ajuste el MLSD a un modelo de difusión anómala fueron comparados mediante una prueba de rangos con signo

de Wilcoxon [108]. Esta es una prueba no paramétrica que permitió comparar el rango medio entre los datos sin asumir la normalidad de las muestras.

Este análisis estadístico fue llevado a cabo utilizando la prueba *ranksum* de Matlab.

2.4.2. Método de *Bootstrap*

Para computar la probabilidad de la co-ocurrencia de pequeñas amplitudes iniciales y una dinámica de crecimiento de la amplitud exponencial en el estudio de eventos de *buckling* utilizamos un método de *Bootstrap* [109]. La técnica es ampliamente usada para estimar errores e intervalos de confianza, entre otras propiedades de una distribución. El método asume solamente que la distribución de la muestra es una buena aproximación de la distribución de la población (i.e. que la muestra es representativa de la población). A partir de las muestras experimentales realizamos réplicas (muestras *bootstrap*) mediante un procedimiento *Bootstrap* con re-muestreo de las cuales seleccionamos datos al azar.

2.4.3. Construcción de histogramas

Los tamaños de los intervalos (h) de los histogramas fueron obtenidos mediante la regla de Freedman Diaconis [110]:

$$h = 2 \frac{iqr(x)}{n^{1/3}} \quad (2.1)$$

donde $iqr(x)$ es el rango intercuartil de los datos y n el número de datos.

Capítulo 3

Desarrollo de una rutina de *tracking* de microtúbulos individuales en células vivas

Uno de los objetivos de esta tesis fue desarrollar un algoritmo que permitiera recuperar la forma de segmentos de microtúbulos individuales con precisión nanométrica a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia.

En los trabajos previos, descritos en la introducción (sección 1.4), se reportan rutinas mayormente destinadas a recuperar las coordenadas de filamentos aislados [70-72, 74, 75], y en condiciones *in vitro*. Esto hace posible, por ejemplo, la aplicación de umbrales de intensidad a las imágenes para binarizarlas y tener bien definido un contorno del filamento en cada cuadro. Por otra parte, la mayoría de esos algoritmos utilizan ajustes simétricos a la forma de los perfiles de intensidad [71, 73-75].

Dado que el objetivo principal de esta tesis es estudiar los filamentos del citoesqueleto en su entorno natural (i.e. en células vivas), decidimos diseñar un algoritmo de *tracking* que nos permitiera extraer información en condiciones en las cuales los algoritmos existentes no proveen resultados satisfactorios, como veremos más adelante.

El código fue diseñado particularmente para el seguimiento de microtúbulos fluorescentes en células vivas a partir de imágenes confocales; sin embargo, puede adaptarse a imágenes obtenidas con otras técnicas, tales como campo amplio o microscopía de superresolución, así como al análisis de otros filamentos del citoesqueleto.

En la primera parte de este capítulo describimos las bases del funcionamiento del algoritmo y su implementación usando Matlab. En lo que resta del capítulo evaluamos su precisión utilizando imágenes simuladas y experimentales. Finalmente, presentamos una rutina de seguimiento de extremos de filamentos (*Tip tracking*) y una adaptación del algoritmo para recuperar coordenadas de filamentos a partir de imágenes de STORM.

Parte de los experimentos realizados en este capítulo contaron con la colaboración del Lic. Juan Francisco Angiolini.

3.1. Análisis de perfiles de intensidad con redes neuronales

El método que proponemos está basado en el análisis de los perfiles de intensidad perpendiculares a los filamentos. A primera vista, este procedimiento no representa una novedad respecto a otros algoritmos reportados [71-73]. La diferencia radica en la forma de analizar estos perfiles que se realiza utilizando redes neuronales [111, 112].

Esta metodología permite recuperar de manera más robusta las coordenadas del centro del filamento en comparación con otros métodos reportados, tal como mostraremos a lo largo de este capítulo. La figura 3.1 ilustra la base de este análisis.

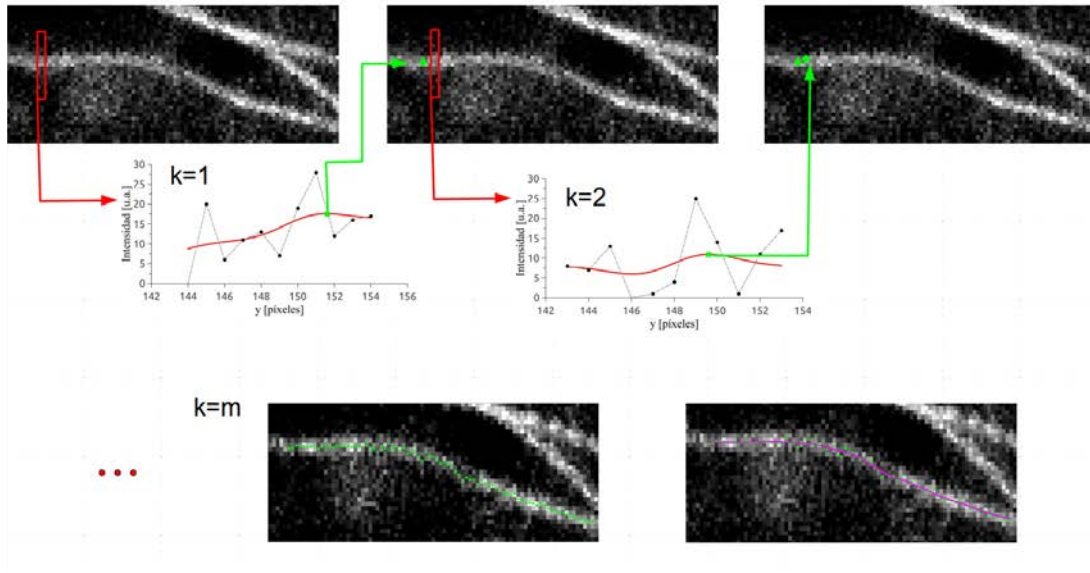


Figura 3.1: **Análisis de los perfiles de intensidad mediante redes neuronales:** Gráfico de flujo ilustrando el método de análisis de los perfiles de intensidad perpendiculares al filamento utilizando redes neuronales. Para cada x_k se extrae el perfil (●), se lo aproxima e interpola utilizando redes neuronales (—) y se busca el máximo de la función obtenida (■). Esa es la nueva posición y'_k en ese punto (◆). Las coordenadas recuperadas son suavizadas (—).

Brevemente, para analizar unívocamente los perfiles de intensidad necesitamos definir la dirección perpendicular al filamento. Luego, se asigna una coordenada (x_k, y_k) a cada posición a lo largo del segmento. Para cada (x_k, y_k) se extrae el perfil de intensidades vertical, definido por una distancia de 300 nm alrededor del punto (i.e. ~ 10 píxeles/perfil). Esta distancia resulta adecuada para recuperar posiciones

de microtúbulos individuales, pero puede ser modificada de ser necesario. Cada perfil es luego interpolado utilizando una red neuronal y se determina la posición corregida y'_k como el máximo de esa interpolación. La posición corregida tiene precisión sub-píxel, como veremos más adelante.

3.2. Implementación de la rutina de *tracking* de filamentos: AFTER

La rutina de *tracking* de filamentos fue implementada en Matlab y funciona de forma semi-automática ya que el usuario debe indicar el filamento que desea analizar en el primer cuadro de la película, mediante la selección de posiciones en la imagen. Luego, el algoritmo realiza el *tracking* en forma automática siguiendo los pasos que se esquematizan en la figura 3.2.

El algoritmo se denomina AFTER (*Automated Filament Tracking and Evaluation Routine*) y consiste en dos módulos principales: el primero, de importación de imágenes y el segundo, de *tracking* de filamentos. Estos módulos se muestran en la figura 3.3, que reproduce la interfase gráfica del algoritmo. AFTER se ofrece a la comunidad para su libre uso.

El módulo de importación de imágenes permite importar películas obtenidas con más de un canal de adquisición; se puede especificar el número canales y seleccionar el que se desea analizar. Además, se presentan opciones para reconocer imágenes guardadas como archivos tiff individuales y multi-tiff. La interfase presenta ventanas que muestran las imágenes a medida que son importadas o analizadas.

En el módulo de *tracking* se introducen parámetros de configuración, tales como el tamaño del píxel y el tiempo entre cuadros.

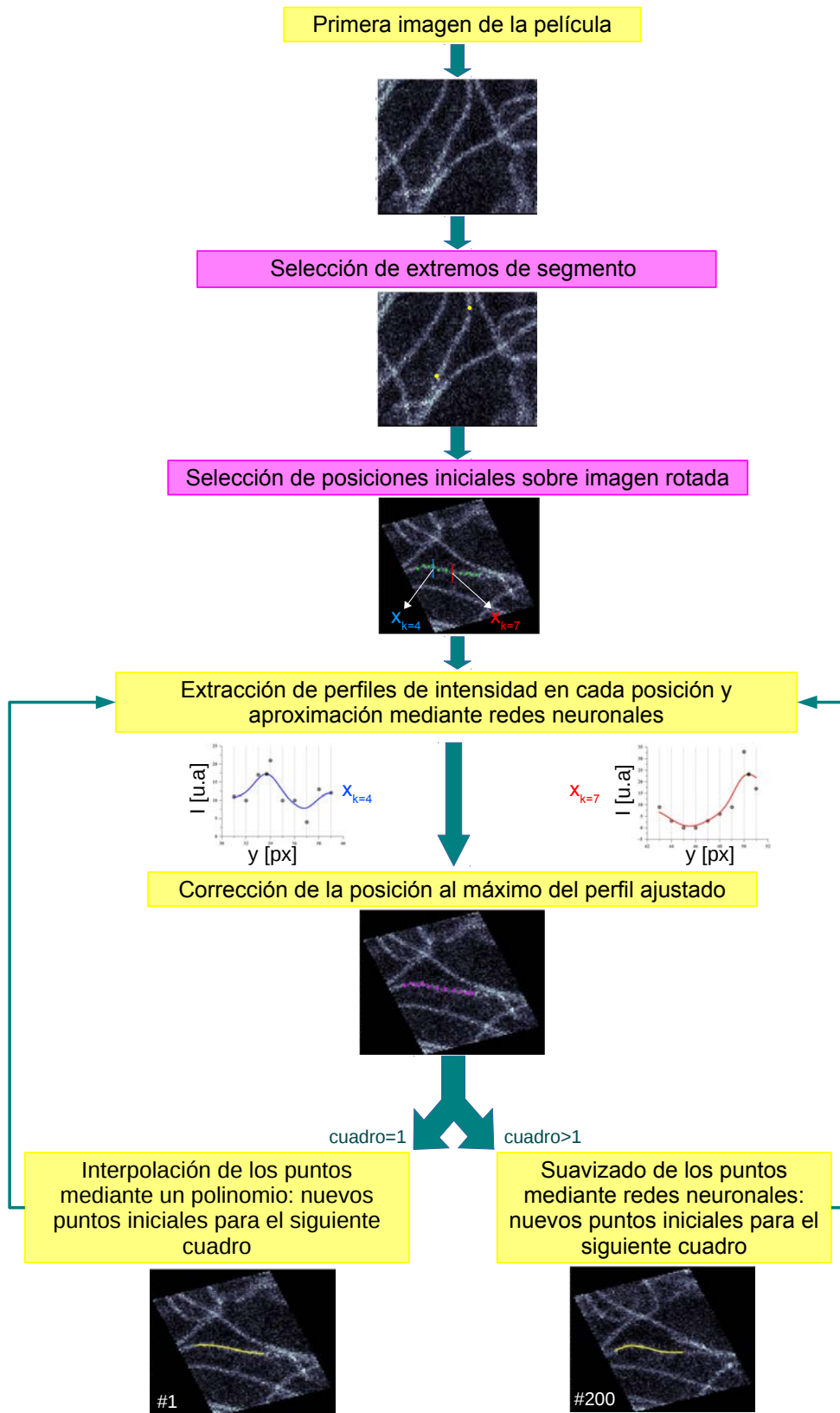


Figura 3.2: Diagrama de flujo esquematizando los pasos de la rutina de *tracking* de filamentos: Los recuadros magenta corresponden a los pasos en los cuales interviene el usuario, los amarillos son automáticos.

Al comenzar el *tracking*, el usuario debe seleccionar la posición aproximada de los puntos iniciales y finales del segmento de filamento que desea estudiar sobre la

primera imagen de la serie temporal. El algoritmo detecta la orientación del filamento y aplica una rotación a la imagen de forma tal que cada nueva coordenada x_k del filamento esté unívocamente asociada a una única coordenada y_k . Para detectar la re-orientar el filamento, el algoritmo realiza un ajuste lineal a estos dos puntos y evalúa su pendiente. La transformación de rotación de la imagen se realiza con el comando *imrotate* de Matlab.

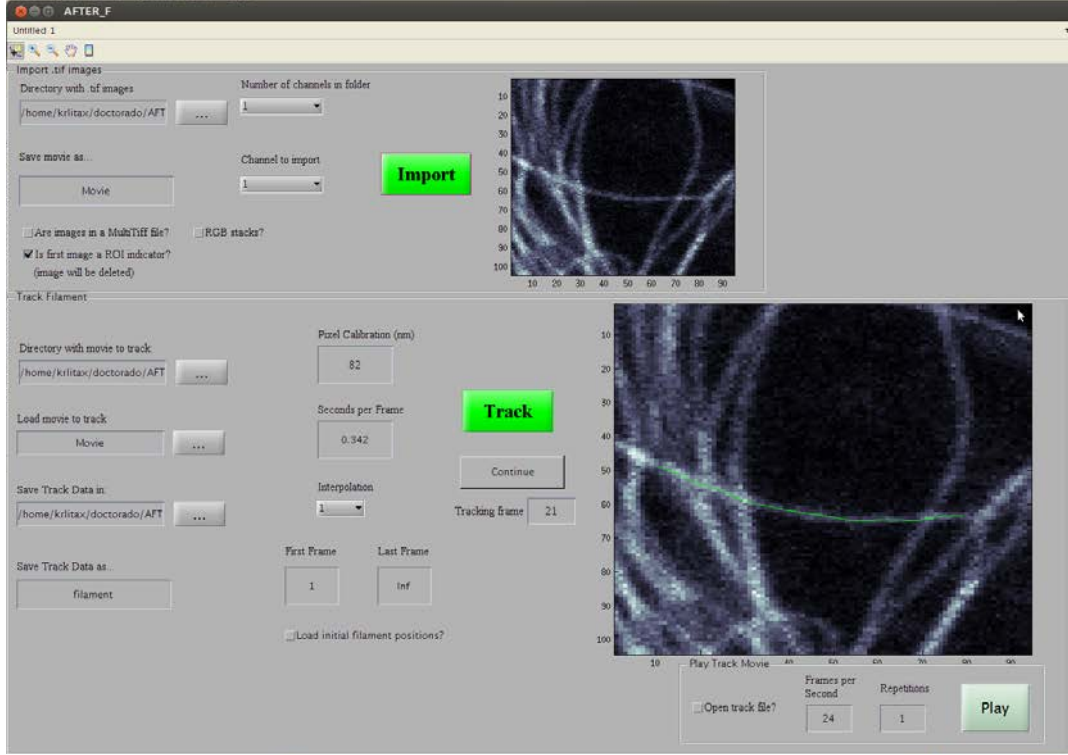


Figura 3.3: **Interfase gráfica de la rutina de *tracking* (AFTER):** Captura de pantalla de la interfase gráfica del algoritmo. La parte superior es el módulo de importación y la inferior el de *tracking*. Se muestra la primera imagen de una película importada y el *tracking* de uno de los filamentos en el mismo cuadro.

Una vez rotadas las imágenes, el programa presenta nuevamente el primer cuadro de la serie al usuario, en este caso rotado. En esta imagen, el usuario debe seleccionar puntos aproximados a lo largo del segmento que desea seguir (x_{ki}, y_{ki}) , teniendo en cuenta que los cambios de curvaturas deben estar representados con al menos un punto para mejorar el resultado (figura 3.2). Luego el algoritmo analiza los perfiles de intensidad alrededor de los puntos seleccionados tal como fue descrito en la sección anterior. Finalmente, completa las posiciones x_k restantes mediante interpolación polinómica de grado 3.

Para ejecutar las aproximaciones e interpolaciones de los perfiles mediante redes neuronales utilizamos la función *newgrnn* de la librería de Redes Neuronales de Matlab.

En el siguiente ciclo de la rutina de *tracking*, se repite el método recién descrito

para encontrar las coordenadas y_k , pero en este caso se toman como punto de partida las coordenadas del filamento obtenidas en el cuadro anterior y se analizan todos los perfiles a lo largo del segmento.

Las posiciones recuperadas son sometidas a un proceso de suavizado utilizando una red neuronal auxiliar para disminuir variaciones de pequeña longitud de onda en las coordenadas del filamento.

Para ilustrar el funcionamiento de la rutina, en la figura 3.4 mostramos el primer cuadro de una película confocal de una célula en la que se encuentra marcada la red de microtúbulos y una secuencia de imágenes de un sector en la que hemos superpuesto las coordenadas recuperadas de un segmento de microtúbulo. En las siguientes secciones de este capítulo, evaluaremos cuantitativamente el rendimiento de AFTER.

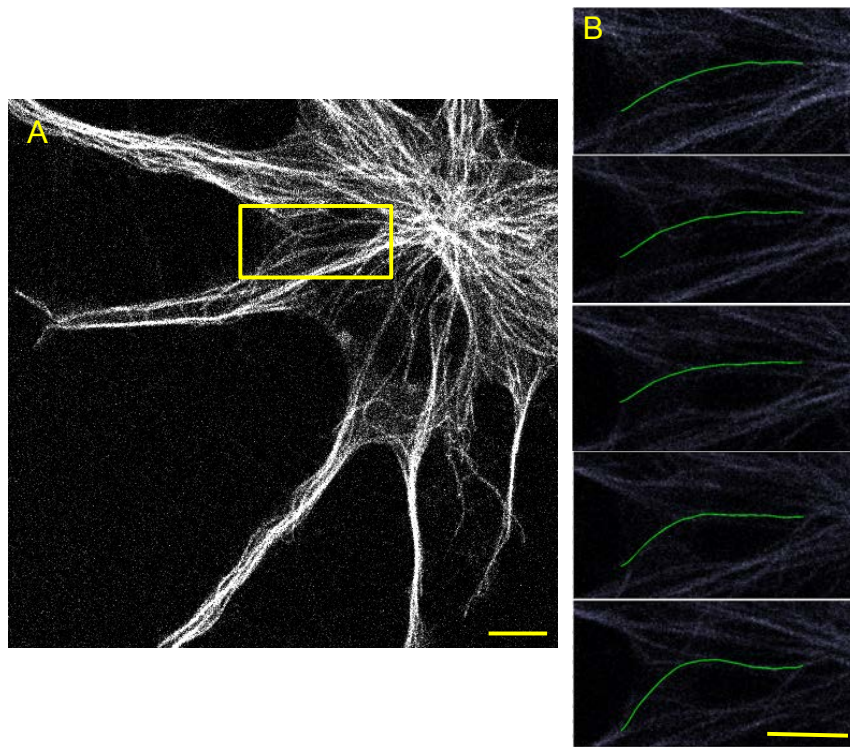


Figura 3.4: **Tracking de microtúbulos con AFTER:** Ejemplo de *tracking* de un segmento de microtúbulo a partir de una imagen confocal. (A) Primer cuadro de una serie de imágenes confocales de una célula melanófora de *Xenopus laevis* con la red de microtúbulos marcada con EGFP-XTP. Barra de escala = 10 μm (B) Serie de imágenes tomadas a un cuadro/minuto del sector recuadrado en el panel A. Se superponen las coordenadas de un filamento trackeado con nuestro algoritmo a las imágenes confocales. Barra de escala = 5 μm

3.3. Evaluación de AFTER

Para poner a prueba la rutina de *tracking* y evaluar su rendimiento teórico en distintos escenarios, simulamos imágenes confocales de filamentos aislados y utilizamos AFTER para recuperar sus coordenadas. Implementamos también un algoritmo basado en una deconvolución gaussiana similar al usado en trabajos previos [34] con el fin de comparar ambos procedimientos. Luego, evaluamos la rutina en imágenes confocales de microtúbulos polimerizados *in vitro* y en células melanóforas fijadas de *Xenopus laevis*.

3.3.1. Error del algoritmo

Definimos el error de *tracking* o precisión (σ) como el promedio de las desviaciones estándar de todas las posiciones recuperadas, a partir del análisis de N imágenes de un filamento fijo:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{m} \sum_{k=1}^m \sum_{1}^N \frac{(y_k - \overline{y_k})^2}{N}} \quad (3.1)$$

donde y_k es la coordenada y recuperada para la posición x_k ($k = 1 : m$) e $\overline{y_k}$ es la media de y_k , promediada para todas las imágenes analizadas (N).

Para el caso de las simulaciones numéricas, en las que se conoce exactamente las coordenadas del filamento, definimos exactitud (a) en la determinación de la posición como:

$$a = \sqrt{\frac{1}{m} \sum_{k=1}^m \sum_{1}^N \frac{(y_k - y_{ks})^2}{N}} \quad (3.2)$$

En esta expresión, y_{ks} es la coordenada y verdadera del centro del filamento en la posición x_k . En este punto queremos remarcar que el mínimo en la exactitud representa un resultado más exacto. Aquí también es posible definir la exactitud local en cada posición x_k como cada uno de los términos de la suma sobre m en la ec. 3.2. Esto será utilizado más adelante para evaluar la eficiencia del algoritmo en la discriminación de filamentos individuales cuando se presentan intersecciones.

3.4. Evaluación del error en imágenes confocales simuladas

Como primer paso, simulamos imágenes de filamentos rectos con un fondo ruidoso. Elegimos esta forma simple ya que más adelante, permitirá explorar el efecto de la orientación y ángulo relativo entre filamentos en la eficiencia del algoritmo. El

procedimiento para la generación de estas imágenes se puede resumir en los cuatro pasos generales ilustrados en la figura 3.5.

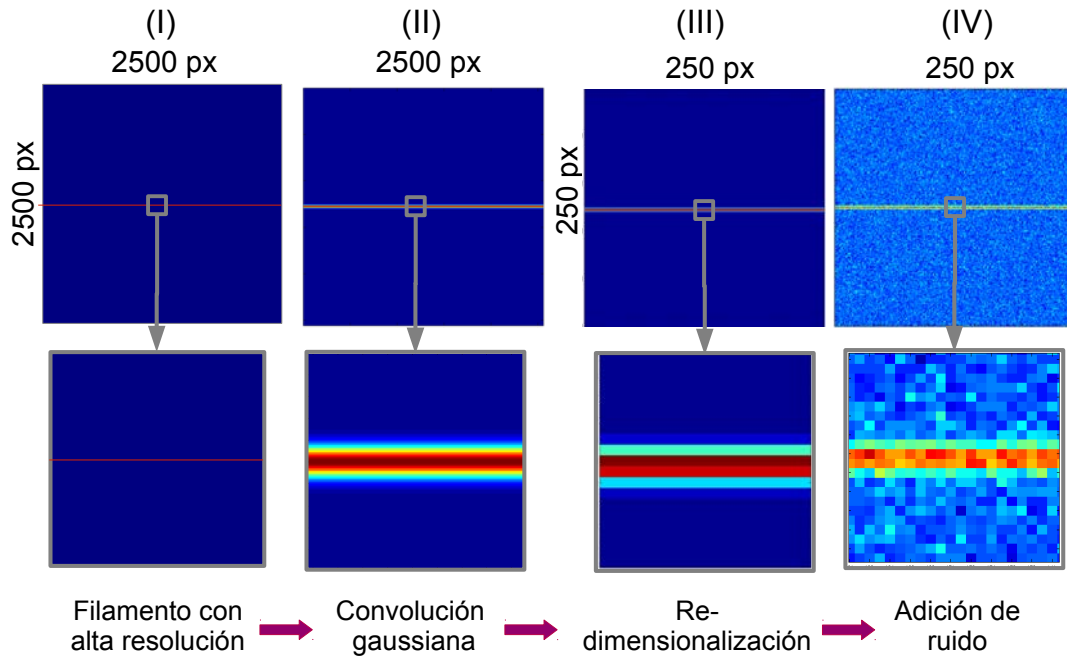


Figura 3.5: **Esquema del procedimiento utilizado en la simulación de imágenes confocales de microtúbulos:** (I) Generación del filamento (10 nm/pix). (II) Convolución mediante la aplicación de un filtro gaussiano para simular efectos de difracción (10 nm/pix). (III) Re-dimensionalización: se generan píxeles de tamaño similar a los utilizados en imágenes confocales (100 nm/pix). (IV) Agregado de ruido obtenido de una distribución de Poisson. En este caso particular, se muestra una imagen con $S/N \simeq 9$ (100 nm/pix).

Partimos de una grilla de píxeles virtuales del tamaño de la resolución deseada. En este caso, usamos 1 y 10 nm (recordemos que un microtúbulo tiene un diámetro de 25 nm). A los píxeles de la grilla se les asignó un valor nulo, salvo una fila completa de píxeles con valor > 0 . Esa fila constituye el filamento original (paso I).

Luego, para considerar el efecto de la difracción de la luz, convolucionamos la matriz resultante del paso anterior con un filtro gaussiano. Este filtro emula la PSF del microscopio. Utilizamos el filtro de Matlab *fspecial* seleccionando el tipo *gaussian*, que crea un filtro bidimensional en forma de un kernel de correlación. Luego implementamos este filtro con la función *imfilter* (paso II).

A continuación, re-dimensionalizamos la matriz obtenida para obtener píxeles de tamaño similar al de una imagen confocal (≈ 100 nm). Este paso consiste en generar una grilla de menor resolución, mediante la transformación de un conjunto cuadrado de píxeles de alta resolución en un gran píxel de menor resolución, con intensidad igual al valor promedio de los píxeles originales. La cantidad de píxeles de alta resolución promediados para obtener el píxel final depende tanto de la resolución

simulada en los primeros pasos de esta secuencia como del tamaño de píxel final que se desea obtener (paso III).

Finalmente, sumamos a cada píxel un ruido obtenido de una distribución poissioniana, que simula el ruido de disparo (*shot-noise*) característico de los fotodetectores [113] (paso IV).

Dado que el algoritmo propuesto se basa en el reconocimiento del máximo de intensidad de un perfil, quisimos evaluar su eficiencia en imágenes con distintos niveles de S/N. Para ello, variamos el valor de intensidad asignado al filamento original así como la del ruido para estudiar el efecto de la relación S/N sobre el rendimiento del algoritmo.

Para cada S/N generamos un conjunto de 20 imágenes simuladas para el mismo filamento y aplicamos AFTER.

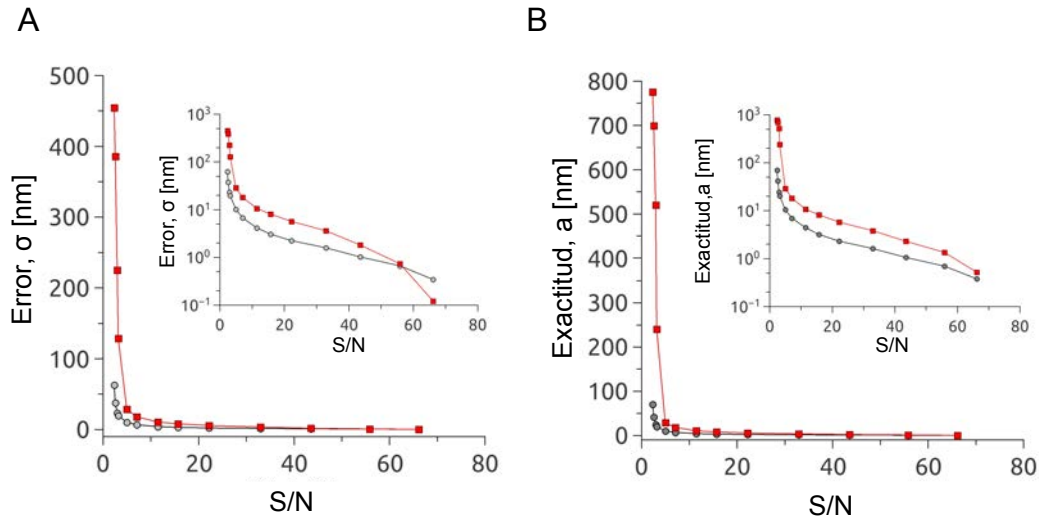


Figura 3.6: **Dependencia del rendimiento de la rutina de *tracking* con la S/N:** Se simularon 20 imágenes confocales de un filamento fluorescente y se utilizó AFTER (●) y un algoritmo basado en una deconvolución gaussiana (■) para determinar sus posiciones. (A) El error en la determinación de la posición fue calculado utilizando la ec. 3.1. En el inserto se grafica el error en escala logarítmica, para facilitar su visualización. (B) La exactitud de las posiciones recuperadas fue calculada según la ec. 3.2. Con la rutina basada en redes neuronales se obtienen resultados más precisos para los niveles de S/N típicos dentro de una célula ($S/N \simeq 5-10$). La escala de pseudocolor representa la intensidad de las imágenes simuladas.

Como era esperable, en la figura 3.6 se observa que tanto el error de *tracking* como la exactitud disminuyen a medida que aumenta la relación S/N. Este comportamiento también se observa en el *tracking* de partículas puntuales [114]. Más importante, el error de nuestra rutina basada en redes neuronales es menor que el de deconvolución gaussiana para $S/N < 60$ (figura 3.6A, panel interno). A niveles

mayores de S/N, el método gaussiano tiene un mejor rendimiento. Sin embargo, la precisión alcanzada con nuestro algoritmo en estos casos también es muy buena ($\cong 1$ nm). En el caso de la exactitud, también observamos que el algoritmo basado en redes neuronales recupera posiciones más certeras a niveles de S/N bajos. Como veremos más adelante, la S/N en células vivas se encuentra en el rango < 15 , por lo tanto nuestra rutina resultaría una mejor opción para el *tracking* de microtúbulos en su entorno natural.

En resumen, este análisis permitió cuantificar el rendimiento teórico de nuestro algoritmo, recuperando las posiciones de filamentos en imágenes confocales simuladas con una precisión de 3-10 nm para niveles de S/N típicos en células vivas, $S/N \approx 5-15$.

A continuación estudiamos como distintos fenómenos que podrían afectar el rendimiento de AFTER.

3.4.1. Intersección de filamentos

En las imágenes obtenidas de la red de microtúbulos en células vivas, es habitual observar filamentos que se cruzan unos con otros (figura 3.4A).

Con el fin de evaluar el desempeño del algoritmo en estos casos y determinar si es capaz de reconocer cada filamento por separado, generamos imágenes de dos filamentos intersecantes formando ángulos entre 5° y 80° . Las intensidades de los píxeles en la zona de intersección se computaron como la suma de las intensidades provenientes de cada filamento. Luego, aplicamos AFTER a uno de los filamentos. La figura 3.7A muestra algunos ejemplos de estas simulaciones.

Es razonable que en la zona de la intersección el algoritmo confunda los filamentos, por lo que realizamos el *tracking* de uno de ellos y computamos la exactitud local, a partir de la ec. 3.2 como:

$$a(x_k) = \sqrt{\sum_1^N \frac{(y_k - y_{ks})^2}{N}} \quad (3.3)$$

Definimos “región de confusión” a la zona donde la exactitud local es mayor que 21 nm (i.e. 3 veces el valor calculado para un filamento aislado al mismo nivel de S/N). Para ilustrar estas zonas, marcamos las regiones de confusión con recuadros en la figura 3.7A.

La figura 3.7B muestra que la región de confusión se hace más pequeña a medida que el ángulo de intersección de los filamentos aumenta. Por otra parte, esta región es mayor a la esperada de acuerdo al límite de difracción, es decir la región en que los filamentos están más cerca que el límite de la resolución óptica y por ende no se

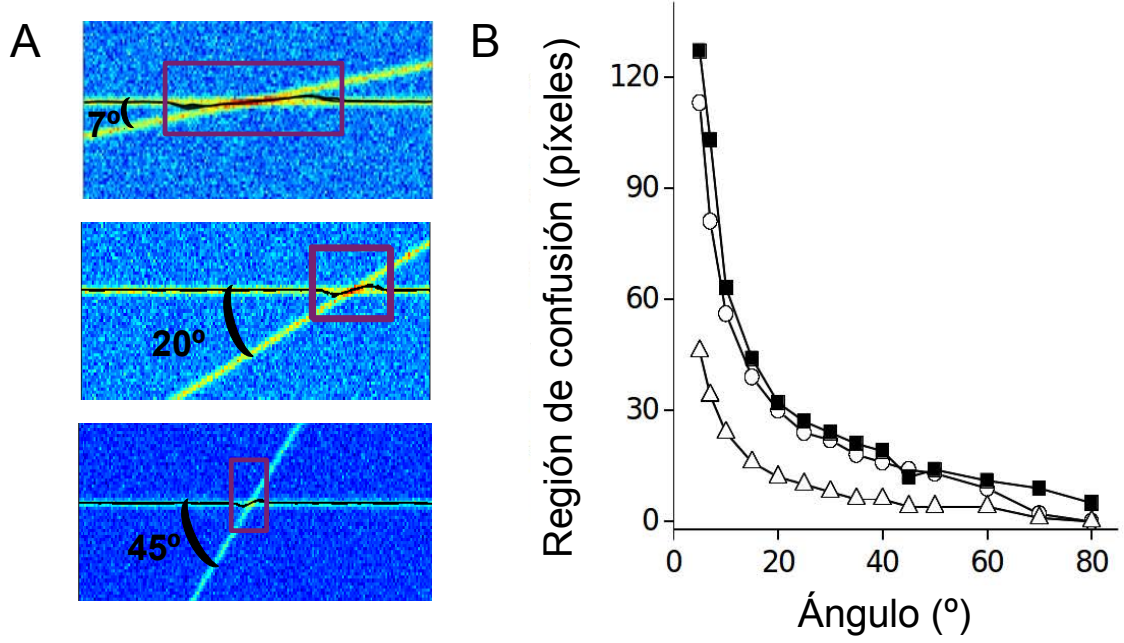


Figura 3.7: **Intersección de filamentos:** Se simularon 20 imágenes de filamentos cruzándose a distintos ángulos y se recuperaron las posiciones de aquel orientado horizontalmente. (A) Ejemplos de imágenes simuladas con las posiciones recuperadas del filamento horizontal superpuestas. Los recuadros marcan la región de confusión. Tamaño del píxel = 100 nm y $S/N \approx 10$. La escala de pseudocolor representa la intensidad en las imágenes simuladas. (B) Dependencia de la región de confusión con el ángulo de la intersección. Se muestran los resultados recuperados con la rutina AFTER (○) y con una deconvolución gaussiana (■). Se representa también la región de confusión predicha de acuerdo al límite de difracción (△).

los puede resolver. Esto se debe a que la rutina requiere 6-7 píxeles (600-700 nm) para reconstruir correctamente el perfil de intensidades en cada posición x_k y esto no es posible si los filamentos están a una distancia menor. La figura también muestra que la rutina de deconvolución gaussiana se comporta de forma similar a AFTER. Para ángulos pequeños (filamentos más alineados) la región de confusión aumenta, pero en todos los casos el desempeño de nuestro algoritmo es levemente mejor.

A partir de estos resultados concluimos que las posiciones recuperadas con nuestro algoritmo son confiables para filamentos que intersecan a un ángulo $> 20^\circ$.

3.4.2. Fondo inhomogéneo

En imágenes obtenidas en células, es muy común observar regiones con intensidad de fondo variable. Con el fin de estudiar el efecto de un fondo inhomogéneo, sumamos a las imágenes simuladas una matriz cuya intensidad crece linealmente en

la dirección perpendicular al eje del filamento. Esto representa el caso más significativo de inhomogeneidad lineal ya que si el ruido de fondo aumenta en la dirección paralela al filamento, la S/N local cambia con el fondo y observaríamos una precisión local que se comportaría como los datos representados en la figura 3.6.

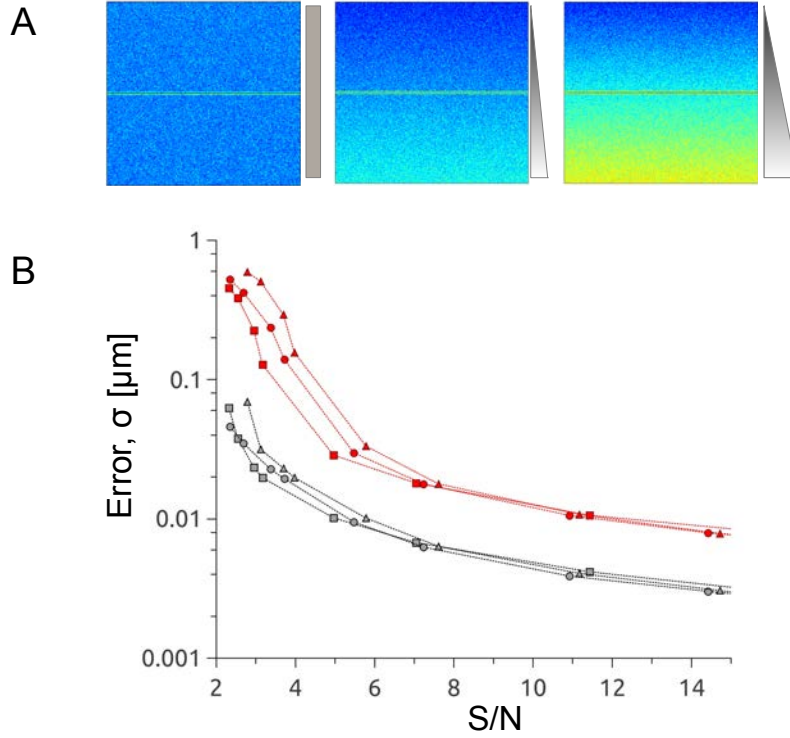


Figura 3.8: **Fondo inhomogéneo:** Se simularon conjuntos de 20 imágenes confocales de filamentos rectos con un fondo de intensidad linealmente creciente en la dirección perpendicular al mismo y se recuperaron sus posiciones utilizando la rutina basada en redes neuronales y otra basada en deconvolución gaussiana. Tamaño del píxel = 100 nm; S/N 12-14. (A) Ejemplos representativos de imágenes generadas para ruidos de fondo con diferente grado de inhomogeneidad. Las figuras a la derecha de cada imagen (rectángulo y triángulos) ilustran el gradiente de intensidad del fondo. La escala de pseudocolor representa la intensidad en las imágenes simuladas. (B) Se muestra el error de *tracking* calculado según la ec. 3.1 en función de la relación S/N. La intensidad del fondo crece como $b.y$ donde $b = 0$ (■, ■), 0.1 (●, ●) y 0.2 (▲, ▲). Los símbolos grises representan los resultados obtenidos con AFTER y los rojos con la rutina basada en deconvolución gaussiana.

Consideramos valores de intensidad del fondo que varían linealmente según $I_{fondo} = b.y$, donde $b = 0.1$ y 0.2 (figura 3.8). Debemos aclarar en este punto que la varianza del ruido poissoniano se mantiene constante para todos los casos.

La figura 3.8B muestra que el rendimiento de nuestra rutina a niveles bajos de S/N es considerablemente mejor que la esperada con el método gaussiano en presencia de fondos no-homogéneos. Este resultado indica que nuestro algoritmo es más confiable que otros basados en deconvoluciones gaussianas en este tipo de escenarios.

3.4.3. Rotación de la imagen

Hemos descrito los pasos necesarios para obtener con precisión las coordenadas de los filamentos a partir de imágenes confocales (sección 3.2). En particular, la necesidad de rotar la imagen para obtener perfiles orientados perpendicularmente al filamento. En esta sección evaluamos si estas rotaciones introducen errores significativos, dado que en algunos casos, la rotación implica interpolar la intensidad de píxeles vecinos para generar los píxeles de la imagen rotada. Con este fin, simulamos imágenes de filamentos rotados respecto a la horizontal y calculamos el error del *tracking* en función del ángulo de rotación, ya sea para las imágenes originales o para imágenes rotadas mediante la función *imrotate*.

Las simulaciones se realizaron como se describió anteriormente pero, en este caso, las posiciones subyacentes del filamento respondían a funciones lineales con pendiente $\neq 0$. En la figura 3.9 se muestran algunos ejemplos de filamentos simulados.

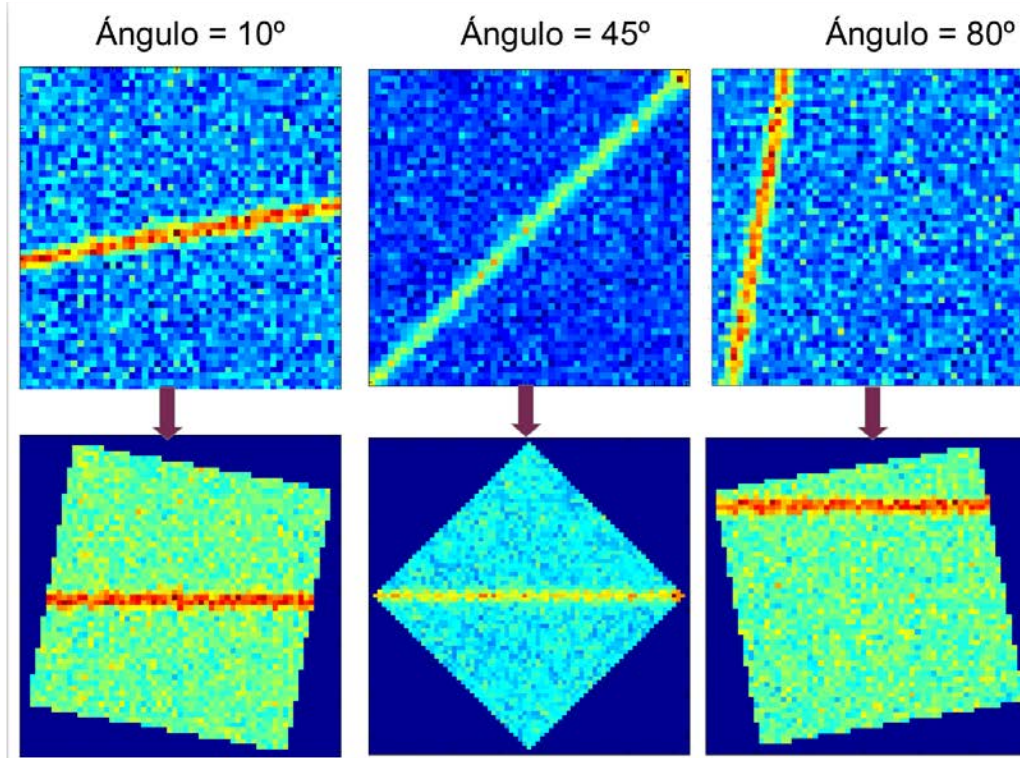


Figura 3.9: **Simulaciones de imágenes rotadas:** Se simularon conjuntos de 20 imágenes de filamentos rectos orientados en distintos ángulos con respecto a la horizontal. Tamaño del píxel = 100 nm; $S/N \approx 10$. Se muestran ejemplos de imágenes simuladas para ángulos 10°, 45° y 80° y las respectivas imágenes rotadas de forma tal que el filamento se encuentra siempre orientado horizontalmente.

En la figura 3.10A, se observa que el error crece abruptamente para ángulos $\geq 70^\circ$, impidiendo la recuperación confiable de las coordenadas. Para filamentos con orientaciones más cercanas a la horizontal, el error se encuentra alrededor de 8 nm para tamaño de píxel = 100 nm. Luego realizamos el *tracking* de los filamentos

en las imágenes rotadas y hallamos que la rotación de la imagen no introduce errores significativos en la determinación de la posición del filamento. Por lo tanto, concluimos que es conveniente que el algoritmo realice la rotación de la imagen cuando el ángulo de orientación del filamento supere los 45° .

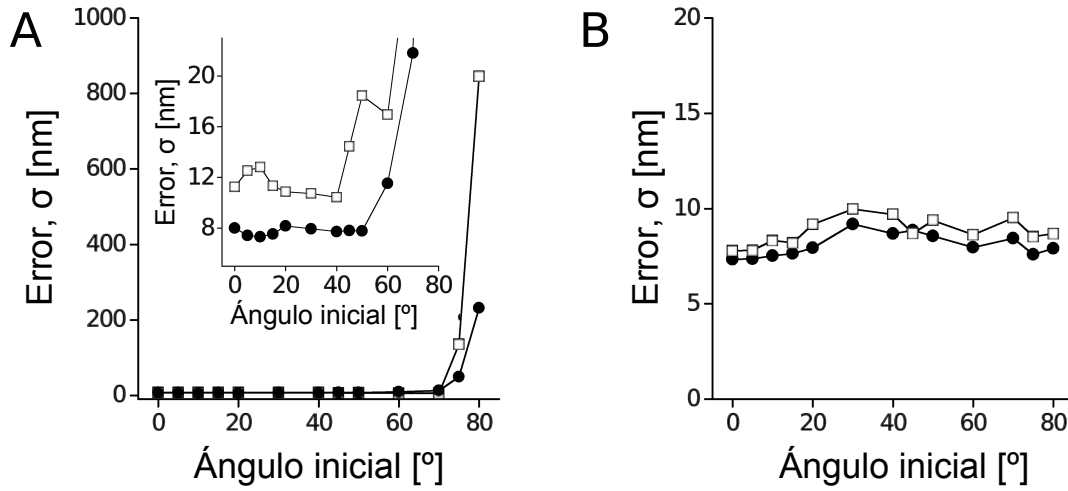


Figura 3.10: **Errores por rotación de las imágenes:** Se recuperaron las posiciones de los filamentos simulados a orientaciones de $0-80^\circ$ y de los mismos filamentos rotados para obtener una orientación horizontal utilizando AFTER y se calculó el error utilizando la ec. 3.1 (A) Dependencia del error de *tracking* para los filamentos inclinados en función del ángulo de inclinación. El panel interno muestra una magnificación de la zona de pequeños ángulos. (B) Error de *tracking* en función del ángulo para los filamentos rotados a una posición horizontal. En ambos casos, los tamaños de píxel fueron 100 nm (●) ó 200 nm (□).

3.4.4. Influencia del tamaño del píxel

Un resultado adicional de las simulaciones realizadas en la sección anterior, es que el error depende del tamaño del píxel (figura 3.10B). En particular, observamos que el menor tamaño de píxel provee un menor error. Para orientaciones de ángulo pequeño el error es ~ 12 nm con el píxel de 200 nm, mientras que para un píxel de 100 nm, el error es ~ 8 nm. Merece la pena aclarar en este punto que hay un límite inferior para el tamaño del píxel, determinado por la resolución óptica del microscopio, a partir del cual no se puede mejorar la resolución y puede resultar en una menor relación S/N.

3.5. Determinación del error de *tracking* en imágenes de microscopía confocal

3.5.1. Microtúbulos *in vitro* fijados

En esta sección, evaluamos la precisión de nuestro algoritmo al ser implementado en imágenes confocales reales de microtúbulos fijados. Para ello, preparamos microtúbulos *in vitro* a partir de una mezcla de soluciones de tubulina y tubulina-rodamina y los adsorbimos sobre un cubreobjetos (figura 3.11).

Con el objetivo de estudiar la dependencia del error de *tracking* con la S/N, diseñamos el siguiente protocolo experimental: adquirimos películas de 20 cuadros de los microtúbulos fijados, luego realizamos un fotoblanqueo parcial, aplicando sobre el campo completo de observación un barrido con una potencia de láser mayor y repetimos la adquisición de una nueva serie de 20 imágenes (figura 3.11C). La secuencia fue repetida hasta alcanzar un nivel de $S/N \sim 5$. Este protocolo tiene la ventaja permitir estudiar al mismo microtúbulo (i.e con igual posición, orientación, forma, etc.) y sólo variar la S/N. Posteriormente, recuperamos las coordenadas de los filamentos en cada película de 20 cuadros y calculamos el error de *tracking* según la ec. 3.1.

En la figura 3.11B mostramos un ejemplo representativo del *tracking* de un microtúbulo fijado que ilustra la heterogeneidad en la intensidad de fluorescencia en un mismo filamento, lo cual genera una variación local de la S/N. Es por ello que calculamos la S/N de los filamentos individuales considerando el valor de la intensidad promedio del microtúbulo. Luego se presenta una superposición de todas las posiciones recuperadas, donde se observan sectores que presentan más variabilidad en las posiciones recuperadas que otras (con dos regiones marcadas y amplificadas). Se puede correlacionar la intensidad local con la precisión local en la determinación de la posición del filamento, a mayor intensidad, mayor relación S/N y por ende menor error. Estos datos ilustran que el error es mayor cuanto menor es la relación S/N, tal como discutimos en la sección 3.4. Por otra parte, observamos cualitativamente que el error no depende de la curvatura del microtúbulo.

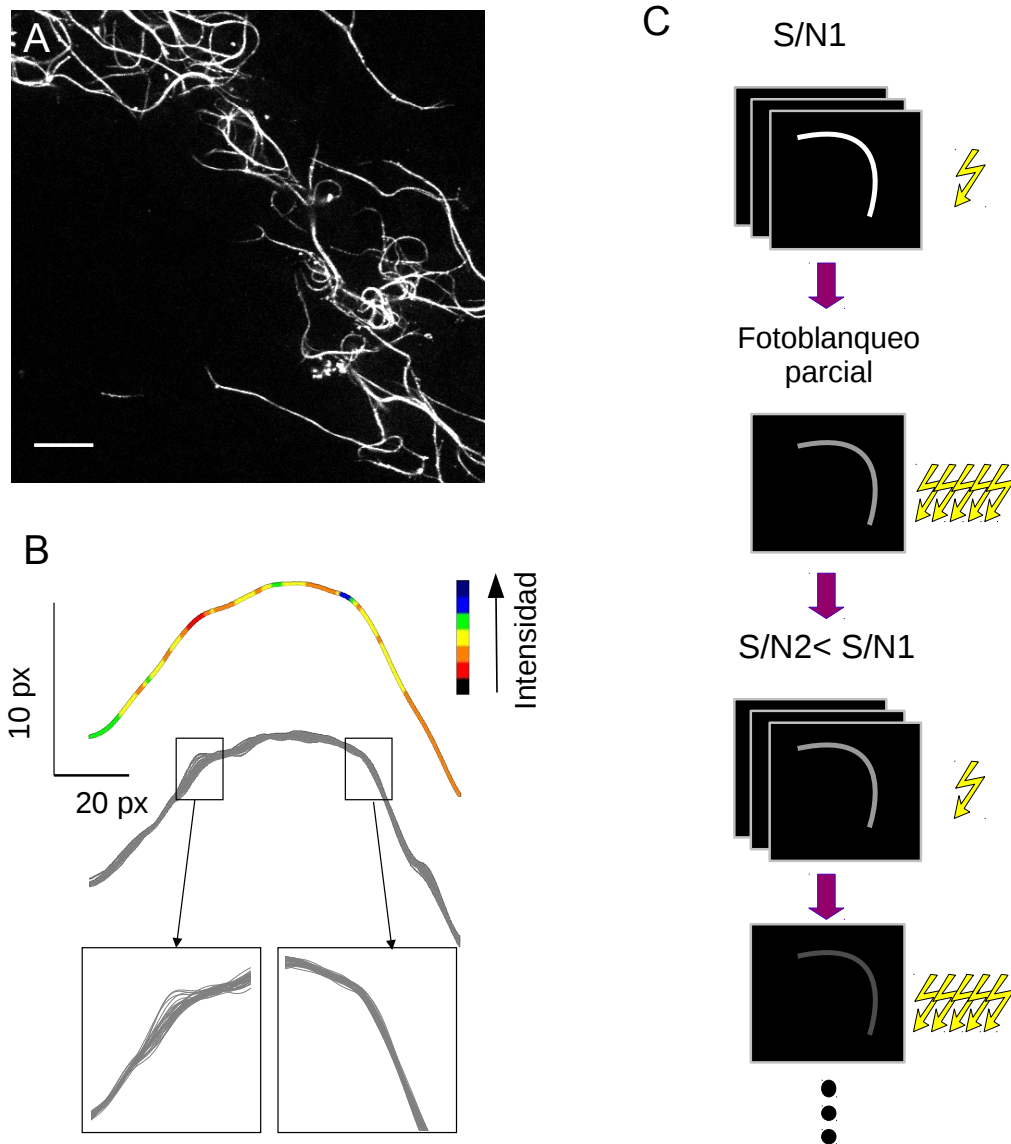


Figura 3.11: **Tracking de microtúbulos fijados.** (A) Imagen confocal de microtúbulos polimerizados *in vitro* a partir de tubulina marcada con rodamina y fijados al cubreobjetos. La imagen pertenece al conjunto de máxima intensidad ($S/N \sim 15$), previo al protocolo de fotoblanqueo parcial. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$. (B) Ejemplo del análisis de una película de 20 cuadros de microtúbulos *in vitro*. Los conjuntos de imágenes fueron analizados utilizando AFTER. Se muestra una imagen en pseudo-color ilustrando la intensidad de fluorescencia recuperada a lo largo un filamento promediada en los 20 cuadros. En los paneles inferiores se muestra una superposición de las posiciones recuperadas por la rutina para todos los cuadros de la película con respectivas magnificaciones en zonas de alta (derecha) o baja (izquierda) S/N . (C) Esquema del método de fotoblanqueo parcial: en primer lugar se toma una película de 20 cuadros con baja intensidad del láser y tiempo entre cuadros de 3.3 s, luego se expone la muestra completa al láser con intensidad mayor por la duración de un cuadro, se vuelve a tomar una película que en este caso tiene una relación S/N menor que la anterior. El proceso se repite hasta alcanzar una relación $S/N \sim 5$.

La figura 3.12 muestra el error de *tracking* calculado para estos filamentos, aquí observamos que la precisión en la posición aumenta con la S/N, como describimos previamente. En particular, la precisión llega a valores de ~ 9 nm para relaciones S/N ~ 10 , muy similar a la que se alcanza en la localización de partículas puntuales o esféricas [68, 69, 115] y superior a los medidos anteriormente para microtúbulos (por ej. 20nm [73] y 50-70nm [89]).

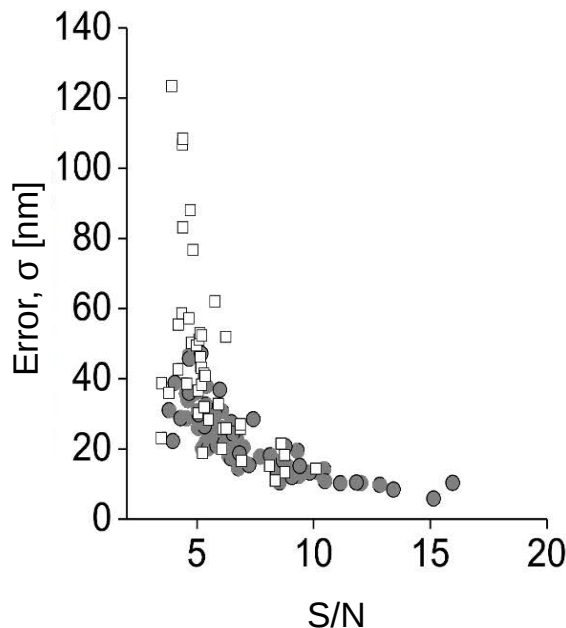


Figura 3.12: **Precisión de AFTER en el *tracking* de microtúbulos:** Error de *tracking* en función de la S/N para microtúbulos fijados *in vitro* (●) y para microtúbulos marcados con EGFP-XTP en células fijadas de *X. laevis* (□)

3.5.2. Células fijadas

Con el fin de explorar el rendimiento del algoritmo en la recuperación de las posiciones de microtúbulos en el entorno intracelular, fijamos células melanóforas de *Xenopus laevis* con microtúbulos marcados con EGFP. Seguimos el protocolo descrito previamente para microtúbulos *in vitro*: realizamos el *tracking* de filamentos de películas de estas células, aplicando el procedimiento de fotoblanqueo parcial (figura 3.11) para obtener distintas relaciones de S/N y calculamos para cada uno el error.

La figura 3.12 muestra el error en la posición recuperada de los filamentos en función de la relación S/N obtenido para microtúbulos *in vitro* y en células fijadas (*ex vivo*). Observamos que la S/N es menor para los filamentos dentro de las células, tal como esperamos. Sin embargo, el entorno celular aparentemente no afecta el rendimiento de AFTER, ya que se superponen los datos *in vitro* con los obteni-

dos en células fijadas. Estos resultados indican que el algoritmo permite localizar microtúbulos individuales en el complejo entorno celular con una precisión muy alta.

3.6. Extensión de AFTER I: *Tip tracking*

El algoritmo presentado en la sección anterior realiza el seguimiento de filamentos fluorescentes de imágenes confocales en una ventana espacial fija. Por lo tanto, consideramos que es adecuado para analizar las formas locales de los filamentos y su movimiento lateral. Sin embargo, el movimiento longitudinal del segmento estudiado no puede ser evaluado, a menos que pueda marcarse un punto particular del filamento que permita la identificación de la coordenada longitudinal. Existen procesos dentro de las células en los que esta identificación se da naturalmente. Tal es el caso, por ejemplo, del proceso de polimerización y depolimerización de los microtúbulos, donde se observa el crecimiento del extremo + del filamento, que llamaremos *tip*. Para estudiar este fenómeno, desarrollamos una segunda herramienta computacional que denominamos *Tip tracking*. Este algoritmo recupera las coordenadas xy del extremo de la imagen de un microtúbulo a partir de imágenes de microscopía confocal (figura 3.13).

La rutina de *Tip tracking* es semi-automatizada, tal como AFTER. Al comienzo muestra la primera imagen de una película. El usuario debe seleccionar dos posiciones iniciales sobre cada punta que desea seguir en el tiempo: uno posicionado sobre el extremo del filamento y otro (punto auxiliar) a lo largo del microtúbulo. Si el extremo del filamento se encuentra curvado, el punto auxiliar deberá seleccionarse entre la punta y el punto de máxima curvatura. Luego, el algoritmo re-ubica las coordenadas y de estos dos puntos sobre el microtúbulo con precisión sub-píxel, utilizando una exploración de perfiles de intensidades ajustadas con redes neuronales, tal como fue implementado en la rutina AFTER.

Estos puntos re-ubicados definen un eje longitudinal en el centro del filamento. Pudimos verificar que el perfil de intensidades a lo largo de este eje sigue un comportamiento tipo sigmoide por lo tanto, la rutina interpola ese perfil con una sigmoidea y determina la coordenada x de la punta como la posición para la cual el valor de la intensidad interpolada alcanza el 50% de su variación total (figura 3.13C). Para determinar la coordenada y del *tip*, el programa sigue un procedimiento idéntico al descrito para el algoritmo de *tracking* de filamentos, utilizando una interpolación mediante redes neuronales para analizar el perfil de intensidades perpendicular al eje del filamento en la posición x hallada previamente.

La posición sub-píxel del extremo del filamento recuperada y un nuevo punto auxiliar son guardados en el programa y utilizados en el siguiente cuadro como parámetros iniciales. El algoritmo repite automáticamente este procedimiento en

los cuadros siguientes hasta analizar todas las imágenes pertenecientes a la película. A modo de ejemplo, la figura 3.13D muestra las trayectorias de los extremos recuperadas para el caso particular presentado en la figura 3.13A.

La rutina de *Tip tracking* permite obtener las posiciones de extremos de microtúbulos con una precisión de $\approx 10\text{nm}$ en los rangos de S/N observadas en células vivas. Si bien esta sub-rutina no fue utilizada en esta tesis, consideramos que su combinación con AFTER enriquece el análisis del movimiento de microtúbulos en células vivas.

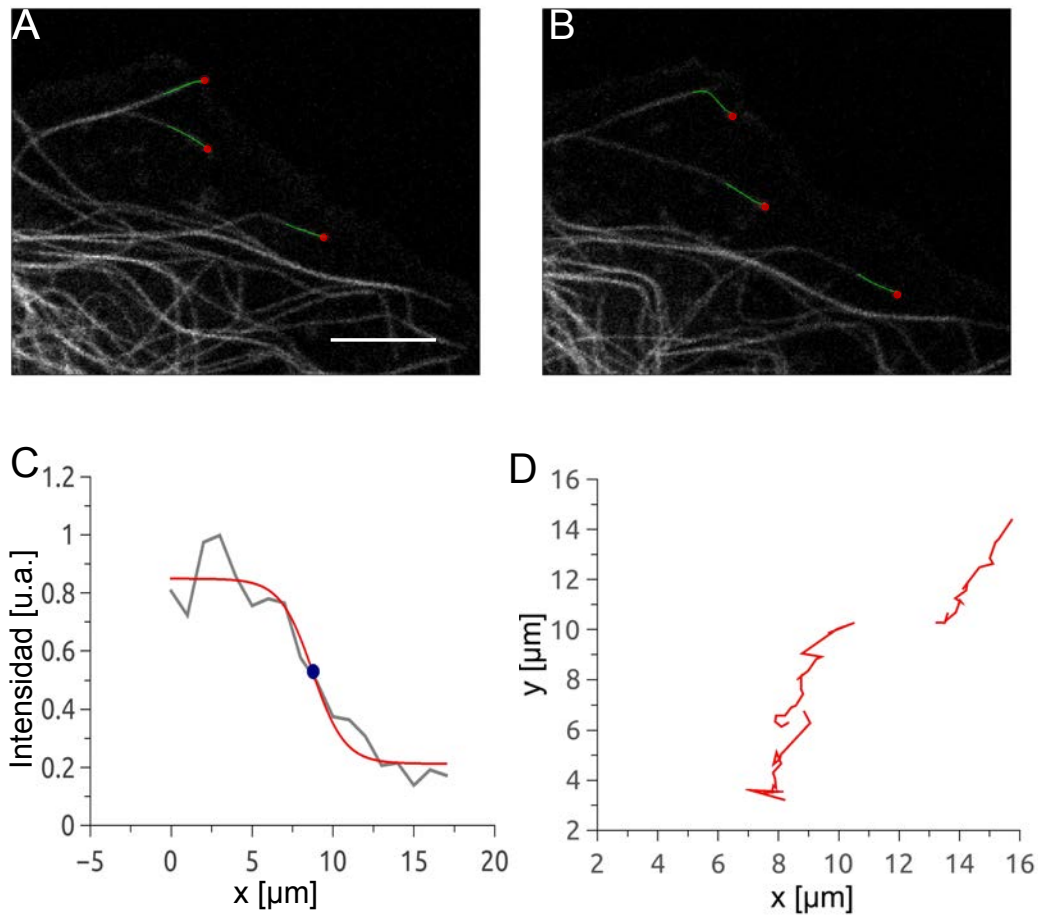


Figura 3.13: **Tracking de extremos de microtúbulos en células vivas:** (A-B) Imágenes confocales a $t = 0$ s (A) ó 70 s (B) de microtúbulos fluorescentes en células vivas. En este caso particular, se observan tres filamentos polimerizándose que han sido trackeados combinando AFTER (—) y la sub rutina de *tip tracking* (●). Barra de escala: $5\ \mu\text{m}$. (C) Ejemplo de un perfil de intensidades analizado (—), con su respectivo ajuste (—) y la posición x de la punta recuperada (●) en un cuadro de la película. (D) Trayectorias recuperadas para los extremos de microtúbulos.

3.7. Adaptación de AFTER II: Análisis de imágenes de filamentos obtenidas por STORM

La técnica STORM permite obtener imágenes de filamentos con una resolución espacial muy alta. Si bien las imágenes confocales de la red de microtúbulos tienen la resolución suficiente para poder realizar el *tracking* de estos filamentos, el estudio se dificulta en el caso de los filamentos de actina o intermedios que suelen encontrarse a distancias pequeñas entre sí, o presentan un mayor entrecruzamiento. Por otro lado, al tener mayor resolución, STORM permitiría analizar microtúbulos en zonas de la célula más pobladas. Por estos motivos, nos resulta importante adaptar AFTER para poder recuperar las coordenadas de imágenes de filamentos obtenidas con esta técnica.

Las imágenes obtenidas con técnicas estocásticas de superresolución (como STORM) difieren de las imágenes de fluorescencia presentadas hasta aquí no sólo en su resolución espacial, sino también en la continuidad de la intensidad en los píxeles pertenecientes a un filamento. Como hemos mencionado (sección 1.3.1), son el resultado de un procesamiento computacional de muchas imágenes de las cuales se extraen posiciones de los fluoróforos con resolución sub-píxel, por lo cual la imagen de superresolución es un “mapa” de posiciones.

Al basarse en el análisis de perfiles de intensidad, nuestro algoritmo no tiene la capacidad de hallar una posición de un filamento que presenta regiones discontinuas (casos en los cuales no hay intensidad en los píxeles). Por este motivo, generamos una adaptación de AFTER para recuperar coordenadas de filamentos en imágenes generadas por STORM.

La adaptación consiste en interpretar píxeles vacíos como “*agujeros*” en la imagen y se analiza la siguiente posición. Si se observa una continuidad de 5 *agujeros* consecutivos, la posición no se considera como una coordenada del filamento y el *tracking* se detiene. De esta manera, los *agujeros* no tienen una coordenada *y* asociada. Al completar el estudio del segmento analizado, se realiza una interpolación de los datos obtenidos utilizando redes neuronales y se completan las coordenadas faltantes.

La figura 3.14 muestra una imagen obtenida mediante STORM de una región de una célula en la que han sido marcados los microtúbulos donde se superponen las coordenadas recuperadas para algunos de los filamentos. Logramos recuperar las posiciones de los microtúbulos precisión de ~ 10 nm .

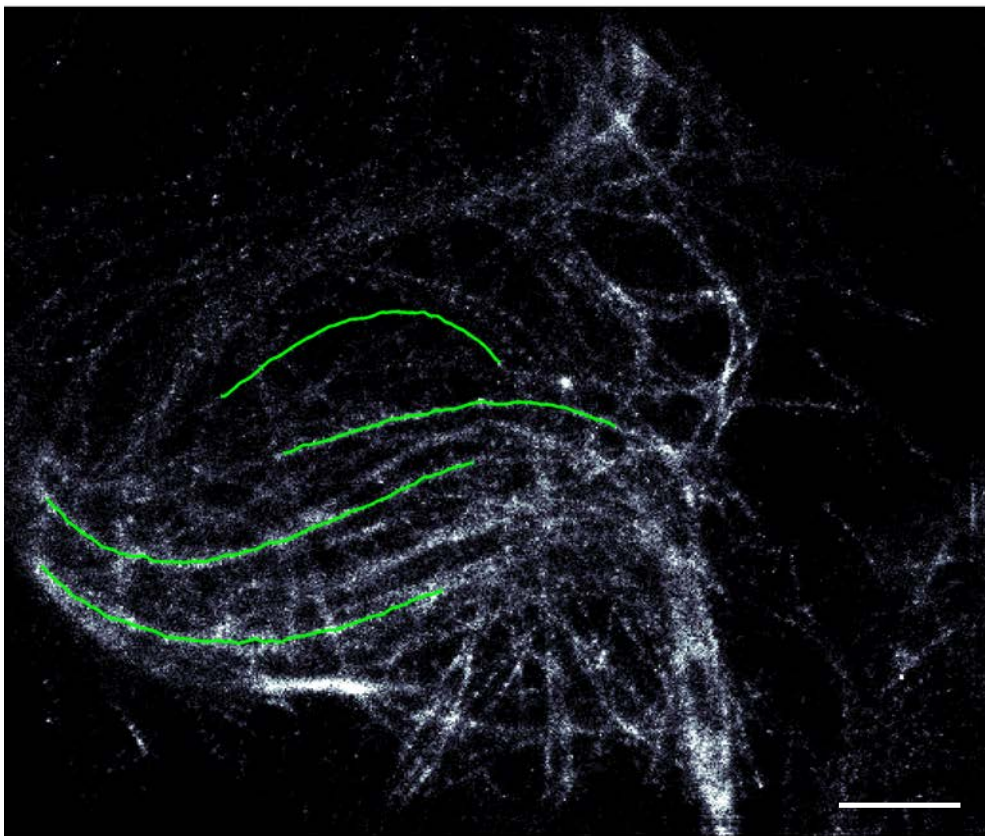


Figura 3.14: **Coordenadas de microtúbulos recuperadas a partir de imágenes de STORM:** Se muestra una imagen de STORM de una región de una célula de cáncer de próstata donde se han superpuesto las coordenadas recuperadas de 4 microtúbulos. Barra de escala: $2\ \mu\text{m}$

3.8. Conclusiones

En nuestro afán de comprender la mecánica y dinámica de los filamentos del citoesqueleto nos enfrentamos con la dificultad de poder extraer de manera confiable las coordenadas de los mismos en imágenes de células vivas. Tras probar los diversos algoritmos publicados a nuestro alcance hallamos que en ningún caso logramos obtener resultados satisfactorios.

Ante este obstáculo, generamos un nuevo algoritmo de *tracking*, considerando específicamente las dificultades que presentan este tipo de imágenes: heterogeneidad en la intensidad de fondo, entrecruzamientos de filamentos y valores bajos de S/N.

En este capítulo, presentamos AFTER con todas las pruebas computacionales y experimentales a las que fue sometido para evaluar su desempeño. Esta rutina permite recuperar con una precisión de $\approx 10\ \text{nm}$ las coordenadas de un microtúbulo individual en su entorno natural (figura 3.12). Hallamos que el algoritmo es robusto ante intersecciones (figura 3.7), rotaciones (figura 3.10) y heterogeneidades en la intensidad de fondo (figura 3.8) y pudimos compararlo con un algoritmo similar basado en deconvolución gaussiana.

En lo que sigue en esta tesis, utilizaremos este algoritmo para estudiar distintos aspectos de la red de microtúbulos. Lo aplicaremos tanto en imágenes estáticas, para extraer información mecánica de la red de microtúbulos, como en películas de centenas de cuadros, donde tendremos la oportunidad de explorar aspectos dinámicos de dichos filamentos.

Capítulo 4

Estudio de la mecánica de microtúbulos en células vivas

Hemos mencionado en el capítulo 1 el papel fundamental del citoesqueleto en la organización intracelular; está involucrado en conectar a la célula física y bioquímicamente con el entorno extracelular con otras células [7] y genera fuerzas coordinadas que permiten a la célula migrar y cambiar su forma [91, 116]. Distintos estímulos mecánicos y químicos pueden generar la remodelación de esta red, produciendo cambios en la morfología y propiedades mecánicas de la célula. Estos cambios pueden ser importantes en enfermedades, por ejemplo durante la invasión de células cancerosas [7, 117] o en cardiopatías hipertróficas [118, 119].

Hemos descrito también que Los microtúbulos son biopolímeros rígidos, con longitudes de persistencia en el orden de los milímetros (sección 1.5.5). Sin embargo, se encuentran flexionados dentro de las células dando lugar a una longitud de persistencia aparente de algunas decenas de micrones [91]. En este contexto, nos resultó interesante estudiar los aspectos mecánicos de los microtúbulos en células vivas y cuáles son los factores que pueden modificarlos.

En este capítulo combinamos las técnicas de microscopía de fluorescencia con el algoritmo de *tracking* descrito en el capítulo anterior [120] para estudiar las curvaturas y longitud de persistencia efectiva de segmentos de microtúbulos en células melanóforas de *Xenopus laevis*. Evaluamos estos parámetros en diferentes condiciones experimentales para investigar qué factores intracelulares afectan tanto sus valores medios como la distribución de los datos de cada condición.

4.1. Análisis de las formas de los microtúbulos

En esta sección describimos brevemente los métodos utilizados para obtener información cuantitativa relevante acerca de las propiedades mecánicas de los microtúbulos a partir de las posiciones de los mismos obtenidas de imágenes confocales

de células vivas.

Con simulaciones, evaluaremos la aplicación de los modelos de Fourier (sección 1.5.6) para obtener la longitud de persistencia de filamentos en células vivas y el cálculo de curvaturas (sección 1.5.7).

4.1.1. Descripción discreta de la forma de los filamentos

Dado un filamento cuyas coordenadas cartesianas son (x_k, y_k) , realizamos un cambio de variables a las coordenadas (s_k, θ_k) que representan la longitud de arco y ángulo tangente (ver sección 1.5.3):

$$s_k = \sum_{n=1}^{k-1} \Delta s_n + \frac{\Delta s_k}{2} \quad (4.1)$$

y

$$\theta_k = \arctan \left(\frac{y_{k+1} - y_k}{x_{k+1} - x_k} \right) \quad (4.2)$$

donde la distancia entre puntos se define como $\Delta s_k = \sqrt{(x_{k+1} - x_k)^2 + (y_{k+1} - y_k)^2}$, $k = 1 : m - 1$, donde m es el número de coordenadas recuperadas.

A partir de estas coordenadas, realizamos una descomposición en modos de Fourier de la parametrización $\theta(s)$, tal como se describió en la sección 1.5.6.

La figura 4.1 muestra un ejemplo representativo de este análisis. En particular, el panel A representa las posiciones de un filamento según un sistema de referencia cartesiano. Estas coordenadas fueron transformadas al espacio (s_k, θ_k) (figura 4.1B) y la función paramétrica $\theta_k(s_k)$ fue descompuesta en modos de Fourier. En la figura 4.1C se observan los primeros 5 modos de Fourier, graficados con su respectiva amplitud y la forma $\theta_k(s_k)$ recuperada a partir de 10 modos. Notamos que la forma recuperada se aproxima a la original, reduciendo las fluctuaciones de alta frecuencia que corresponden al ruido, como veremos más adelante.

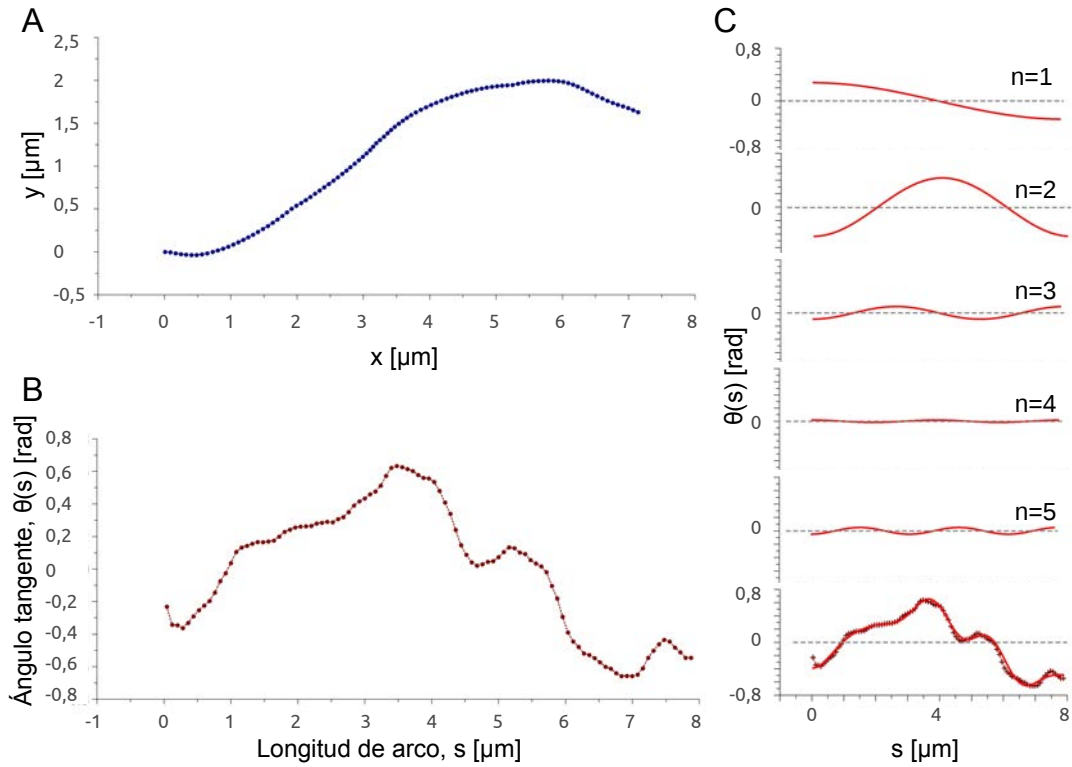


Figura 4.1: **Descomposición de la forma de un filamento en modos de Fourier:** (A) Posiciones (x_k, y_k) de un filamento. (B) El mismo filamento graficado en función de las variables (s_k, θ_k) . (C) Primeros 5 modos de Fourier graficados con su amplitud correspondiente y la función $\theta(s)$ recuperada a partir de 10 modos (panel inferior) .

4.1.2. Cálculo de curvaturas

En este capítulo estudiaremos las distribuciones de curvaturas de microtúbulos en células vivas en diferentes condiciones experimentales.

Las curvaturas serán estimadas utilizando el método descrito en la sección 1.5.7. Para evaluar la eficiencia de este método, lo aplicamos a arcos de circunferencia de radio conocido, r . Con este fin, discretizamos arcos de circunferencia de distintos radios tales que tengan curvaturas similares a las reportadas en células epiteliales, la cuales son $\leq 0.5 \mu m^{-1}$ [89]. A cada coordenada, le sumamos un ruido gaussiano de valor medio similar al error de *tracking* de los filamentos en células vivas (0.01-0.1 % de su longitud total) y analizamos si el método puede recuperar correctamente las curvaturas de los segmentos.

La figura 4.2 muestra las curvaturas calculadas según la ec. 1.17 comparadas con las teóricas calculadas a partir del radio de la circunferencia utilizada : $\kappa = 1/r$. Recuperamos el valor teórico con un error $< 5\%$, lo cual resultaría aceptable para la evaluación de las curvaturas de microtúbulos en células vivas.

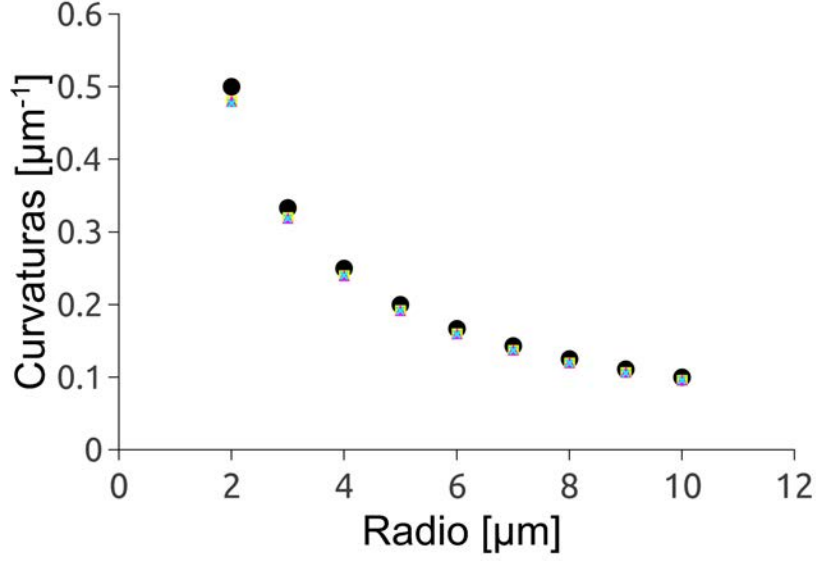


Figura 4.2: **Evaluación del método de cálculo de curvaturas:** Se utilizó el método basado en el estudio de los modos de Fourier descrito en la sección 1.5.7 para calcular las curvaturas de arcos de circunferencia conocidas. Se muestran las curvaturas teóricas (●) y las recuperadas en presencia de 0 % (■), 0.01 % (▲) y 0.1 % (x) de ruido.

4.1.3. Cálculo de la longitud de persistencia para filamentos simulados

El método para el cálculo de lp propuesto por Gittes et al. [70] establece una relación inversa cuadrática entre la varianza de las amplitudes de los modos de Fourier y el número de onda¹ (ec. 1.16). Para corroborar dicha expresión, simulamos un conjunto de 2000 filamentos siguiendo el método propuesto por Brangwynne et al. [35]. Este método permite generar ensambles de filamentos teóricos a partir de un procedimiento constructivo.

Brevemente, los filamentos se forman a partir de la unión de segmentos de 1 nm de longitud donde el ángulo de orientación de cada segmento se obtiene de una distribución normal centrada en la orientación del segmento anterior. Es posible obtener ensambles de filamentos con distintas longitudes de persistencia variando el valor del ancho de la distribución. Iniciamos la simulación con segmentos con orientación $\theta = 0$.

La figura 4.3 muestra tres conjuntos de filamentos simulados con distinto ancho de las distribuciones que generan las variaciones de la orientación de los segmentos. Utilizando el método de Fourier descrito en la sección 1.5.6 determinamos la lp de cada conjunto (figura 4.4). La figura 4.3A muestra filamentos con una distribución de formas caracterizada por una $lp = (0,200 \pm 0,006) \mu\text{m}$. Para el panel B, obtu-

¹ $var(a_n) = \frac{1}{lp} \frac{1}{q^2}$

vimos $lp = (19,38 \pm 0,04) \mu\text{m}$, valor cercano a la longitud total de los filamentos. Finalmente, en el panel C presentamos un conjunto de filamentos para los cuales $lp = (308,7 \pm 0,6) \mu\text{m}$, que se comportan como rígidos, con pequeñas desviaciones de la orientación inicial.

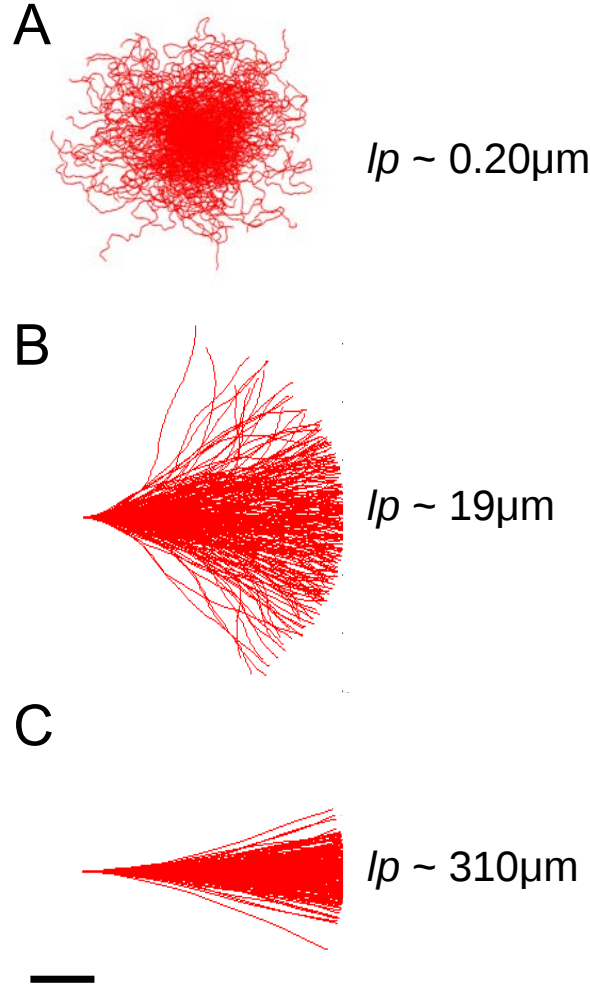


Figura 4.3: **Construcción numérica de filamentos a partir del ensamblado de segmentos orientados al azar:** Se muestran 200 filamentos con $L = 8 \mu\text{m}$ de un conjunto de 2000 para cada caso. (A) Filamentos flexibles o entrópicos: $lp \ll L$. (B) Filamentos semi-flexibles: $lp \sim L$. (C) Filamentos rígidos: $lp \gg L$. Barra de escala: $2 \mu\text{m}$

La figura 4.4 muestra el análisis de las amplitudes de los modos de Fourier recuperadas. En el panel A se observan las amplitudes calculadas, mostrando una gran dispersión para los modos más bajos y en el panel B se observa el comportamiento de la varianza de dichas amplitudes en función del número de onda. Los datos ajustan correctamente a la ec. 1.16 para todos los modos computados.

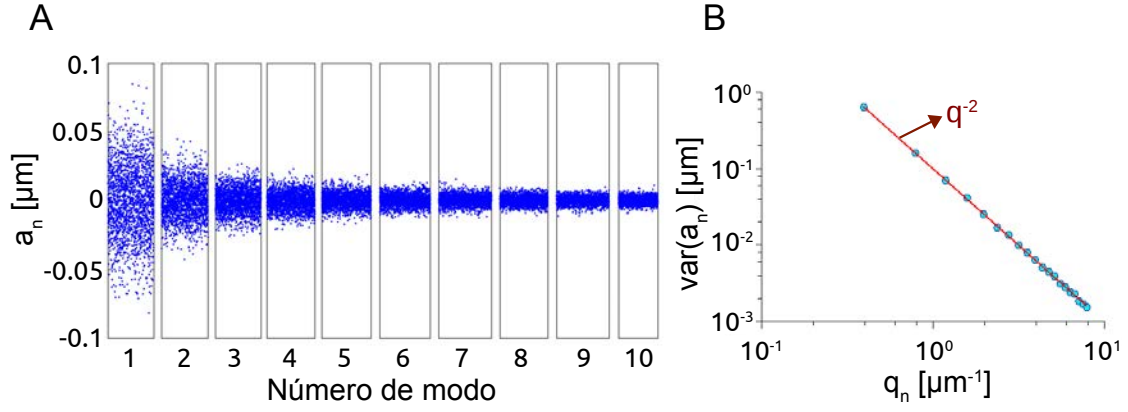


Figura 4.4: **Dependencia de la varianza de las amplitudes de los modos de Fourier con el número de onda para filamentos simulados:** Se generan 2000 filamentos, ilustrados en la figura 4.3B, como se describió en el texto y se analizaron por el método de Fourier. (A) Amplitudes de los 10 primeros modos de Fourier recuperadas a partir de los filamentos representados en la figura 4.3B (B) Dependencia de la varianza de las amplitudes con el número de onda. La línea continua muestra el ajuste de la ec. 1.16 con $lp = (19.38 \pm 0.04)\mu\text{m}$.

En un paso posterior, exploramos si el error asociado a la localización del microtúbulo afecta la determinación de lp . En este sentido, Gittes et al [70] mostraron que el ruido afecta principalmente la información en los modos altos, estableciendo un límite al número de modos relevantes para la determinación de lp .

Por este motivo, realizamos simulaciones de imágenes de filamentos de longitud $L = 8 \mu\text{m}$ con curvaturas determinadas por una distribución térmica con $lp = 15 \mu\text{m}$, utilizando el modelo descrito por la ec 1.15. La figura 4.5A muestra un conjunto de filamentos térmicos obtenidos con este método. A partir de estos filamentos, simulamos imágenes confocales (figura 4.5B) tal como describimos en el capítulo anterior (sección 3.4) con una excepción. En el primer paso de la generación de imágenes simuladas, en lugar de completar una fila de posiciones de intensidad > 0 , se les asigna este valor a posiciones determinadas por una curva obtenida del modelo matemático descrito en la sección 1.5.6.

Recuperamos las posiciones de los filamentos de las imágenes simuladas utilizando AFTER, descompusimos las formas en modos de Fourier y calculamos la varianza de cada modo. La figura 4.6B muestra que la varianza de a_n de los filamentos simulados decrece a medida que el vector de onda aumenta, presentando claras desviaciones respecto al modelo teórico para $q_n > 3,6 \mu\text{m}^{-1}$ (i.e. $n > 9$). Esto indica que el método no permite obtener amplitudes correctas de los modos para los componentes de alta frecuencia. Por lo tanto, ajustamos los datos obtenidos a la ec. 1.15 para $n < 9$ y recuperamos $lp = (16 \pm 3)\mu\text{m}$; este valor no es significativamente

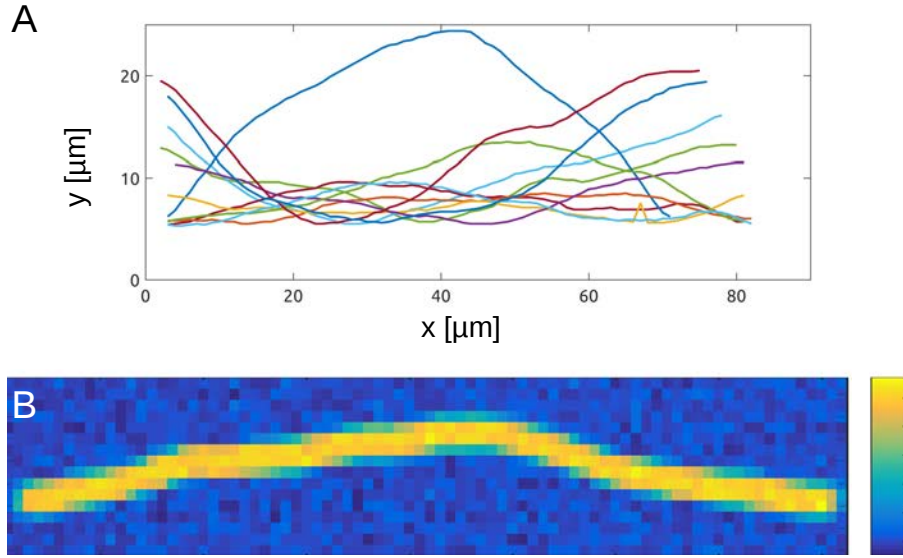


Figura 4.5: **Filamentos térmicos simulados:** (A) Conjunto de filamentos térmicos simulados, previo a la generación de las imágenes. (B) Ejemplo de una imagen obtenida al simular un filamento semiflexible sometido a fuerzas térmicas. Tamaño de la imagen: 16x82 píxeles, tamaño del píxel = 100 nm y $S/N \simeq 10$. La escala de pseudocolor representa la intensidad en las imágenes simuladas.

diferente al simulado ($15 \mu\text{m}$), lo cual sugiere que el método permite un estudio cuantitativo de las distribuciones de formas de los microtúbulos en este rango de número de onda para $S/N \approx 10$.

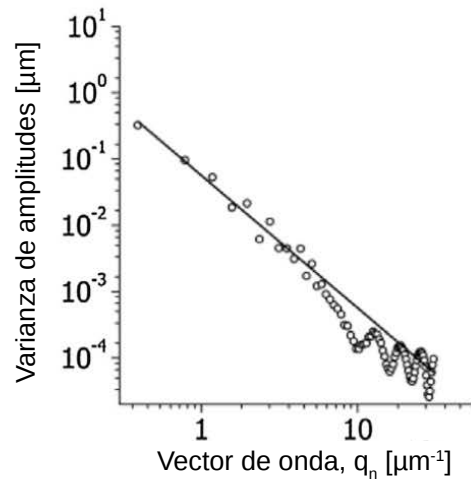


Figura 4.6: **Método de Fourier para imágenes simuladas:** Análisis de la varianza de las amplitudes de los modos de Fourier recuperadas del tracking de las imágenes simuladas. Los datos se apartan del modelo (ec. 1.16), representado en la línea continua de pendiente q^{-2} , a partir del $q_n \approx 3,6 \mu\text{m}^{-1}$

4.2. Determinación de la longitud de persistencia de microtúbulos en células melanóforas de *Xenopus laevis*

Para estudiar las propiedades mecánicas de microtúbulos en células vivas y la influencia del entorno citosólico sobre las mismas, adquirimos imágenes confocales de células melanóforas expresando α -tubulina-EGFP. La figura 4.7A muestra una imagen representativa obtenida en esta condición. Analizamos segmentos lo suficientemente largos como para que sean representativos en sus formas y lo suficientemente cortos como para obtener una cantidad de datos estadísticamente relevantes.

Utilizamos la rutina de *tracking* para localizar segmentos de filamentos de $8\ \mu\text{m}$ de longitud en estas imágenes. Realizamos el cambio de variables para representar la forma en (s, θ) , tal como fue descrito en la sección 4.1.1.

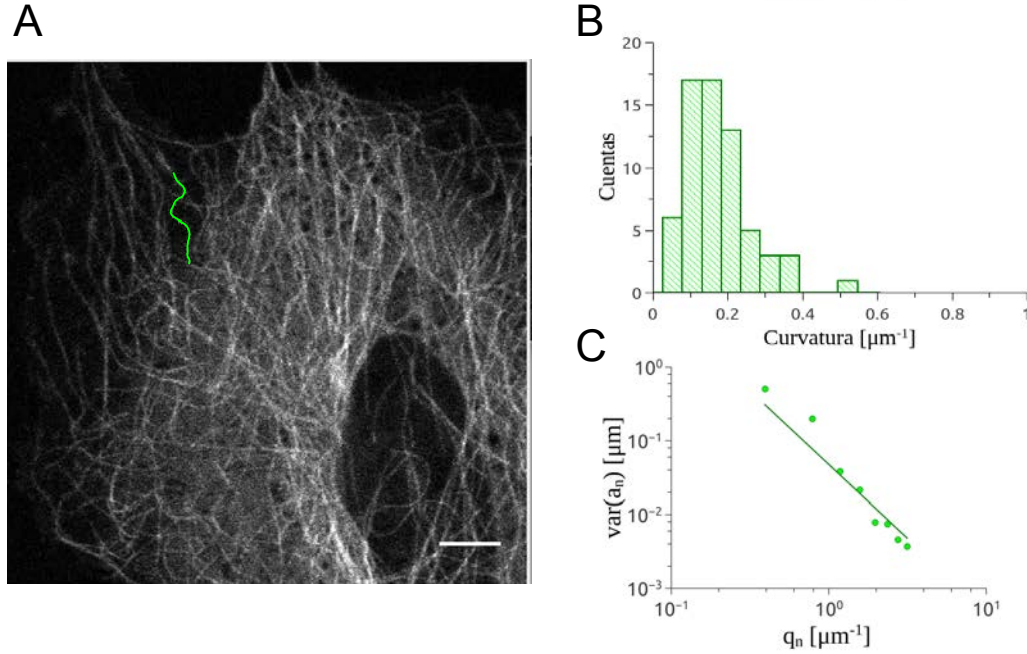


Figura 4.7: **Análisis de formas de microtúbulos en células vivas:** (A) Imagen confocal representativa de células control transfectadas con EGFP- α -tubulina, la red de microtúbulos se observa en escala de grises. En verde se superponen las coordenadas de un segmento de $8\ \mu\text{m}$. Barra de escala: $5\ \mu\text{m}$. (B) Histograma de las curvaturas calculadas para segmentos de $8\ \mu\text{m}$ trackeados con AFTER. (C) Varianza de la amplitud de los modos de Fourier en función del número de onda obtenida de un conjunto de 65 filamentos, los círculos representan los datos experimentales y la línea el ajuste de la ec. 1.16.

La figura 4.7B muestra la distribución de curvaturas obtenida para los segmentos de microtúbulos de $8\ \mu\text{m}$ de longitud. El valor medio obtenido es $\langle \kappa \rangle = (0,20 \pm 0,01)\ \mu\text{m}^{-1}$, de acuerdo con los datos reportados por Bicek et al. [89], que obtuvieron curvaturas en el rango $0\text{-}0.3\ \mu\text{m}^{-1}$.

Luego, descompusimos las formas de los segmentos recuperadas en modos de Fourier (sección 1.5.6) y calculamos la varianza de las amplitudes de cada modo. La figura 4.7C muestra que la varianza de las amplitudes de los modos obtenida presenta un comportamiento símil-térmico, ya que decrece como q^{-2} . Ajustamos estos datos experimentales a la ec. 1.16 y obtuvimos una longitud de persistencia aparente $lp^* = (21 \pm 3) \mu m$. Este valor se encuentra dentro del orden de magnitud de la longitud de persistencia aparente en células CHO y COS-7 *in vivo* [35] y es aproximadamente 100 menor que la lp de microtúbulos *in vitro*, indicando que las amplitudes de las fluctuaciones en curvatura son significativamente mayores y probablemente, de origen no-térmico.

Si bien no es sorprendente que las fluctuaciones en las formas de los microtúbulos dentro de las células sean mayores que en la condición *in vitro*, la observación del comportamiento símil-térmico sí lo es, ya que las células son sistemas fuera del equilibrio.

Se ha propuesto que los propios filamentos que componen el citoesqueleto determinan, al menos parcialmente, las propiedades mecánicas de los microtúbulos [91, 96, 119, 121]. Para evaluar esta hipótesis depolimerizamos selectivamente distintas redes del citoesqueleto (figura 4.8A) y determinamos lp^* como describimos previamente. Los resultados obtenidos a partir de este estudio indican que la depolimerización de la red de filamentos intermedios tiene un efecto significativo sobre la lp^* los microtúbulos (figura 4.8B). En las siguientes secciones detallamos los experimentos que nos permitieron llegar a esta conclusión.

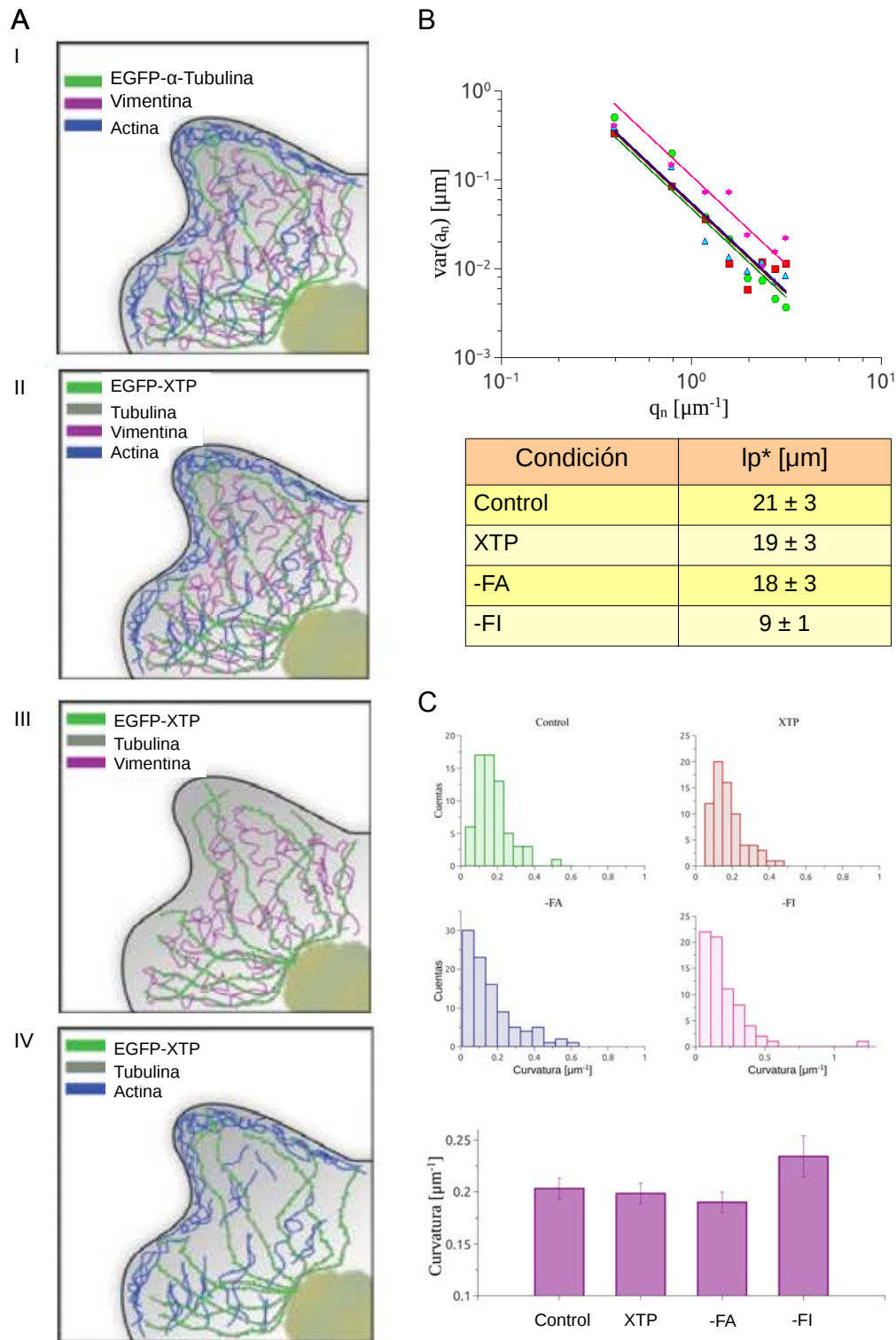


Figura 4.8: **Análisis de la influencia de polimeros del citosequeleto en la mecánica de microtúbulos en células vivas:** (A) Esquemas de condiciones experimentales. I) Citoesqueleto completo y microtúbulos marcados con EGFP- α -Tubulina (Control). II) Citoesqueleto completo y microtúbulos marcados con EGFP-XTP (XTP). III) Filamentos de actina depolimerizados usando latrunculina y microtúbulos marcados con EGFP-XTP (-FA). IV) Filamentos intermedios inhibidos por transfección y microtúbulos marcados con EGFP-XTP (-FI). (B) Análisis de Fourier. Arriba: Varianza de los modos vs. número de onda. Se muestran los datos experimentales con símbolos y los ajustes al modelo con la línea del color correspondiente. Control (●), XTP (■), -FA (▲) y -FI (★). Abajo: Longitudes de persistencia aparentes calculadas. (C) Análisis de las curvaturas de los segmentos. Arriba: Histogramas para cada condición. Abajo: Comparación de las curvaturas promedio obtenidas.

4.2.1. Utilización de MAPs para marcar establemente la red de microtúbulos

Al marcar la red de microtúbulos con EGFP- α -tubulina, el fluoróforo se encuentra unido covalentemente al monómero del filamento y sólo puede intercambiarse por eventos de depolimerización/polimerización. Es por esto que el fluoróforo se fotoblanquea y como consecuencia, la relación S/N baja durante la observación continua de una célula en el microscopio confocal. Una posibilidad para disminuir este efecto es utilizar una sonda que interactúe con microtúbulos pero presente cierto recambio con una población de moléculas libres en la ventana temporal del experimento. Por este motivo, pensamos en marcar MAPs, que se asocian transitoriamente a los microtúbulos.

Decidimos utilizar una línea celular estable expresando EGFP-XTP (figura 4.9A). XTP es una proteína asociada a los microtúbulos tipo-tau de las células melanóforas de *Xenopus*. Esta proteína se encuentra en equilibrio con la fracción soluble por lo cual presenta un recambio constante. Por este motivo, la marcación con esta sonda permitiría que se renueven los fluoróforos constantemente y se pueda observar la muestra por tiempos más prolongados.

Obtuvimos series temporales de imágenes de células melanóforas con la red de microtúbulos marcada con EGFP- α -tubulina o con EGFP-XTP (figura 4.9B). La figura muestra que en el primer caso, los filamentos presentan un claro fotoblanqueo, mientras que en las células marcadas con EGFP-XTP los filamentos presentan un nivel aproximadamente constante de intensidad en el tiempo.

Las MAPs pueden afectar la mecánica de los microtúbulos dentro de las células [20, 25-28]. Por lo tanto, evaluamos el efecto de XTP sobre la longitud de persistencia aparente repitiendo los experimentos descritos en la sección 4.2 utilizando células melanóforas expresando EGFP-XTP.

La figura 4.8B muestra también un comportamiento similar-térmico de las formas de los microtúbulos expresando EGFP-XTP. Obtuvimos una longitud de persistencia aparente $lp^* = (19 \pm 3) \mu\text{m}$, no significativamente diferente a la lp^* en células expresando α -tubulina-EGFP (tabla en la figura 4.8B). También estudiamos las curvaturas de los filamentos en esta condición (figura 4.8C) y no hallamos diferencias significativas en su distribución con respecto a la presentada en el caso anterior, presentando un valor medio $\langle \kappa \rangle = (0,20 \pm 0,01) \mu\text{m}^{-1}$.

Estos resultados muestran que el uso de EGFP-XTP para marcar los microtúbulos no afecta las propiedades medidas. Sumado a la robustez frente al fotoblanqueo, decidimos trabajar de aquí en adelante con esta línea celular.

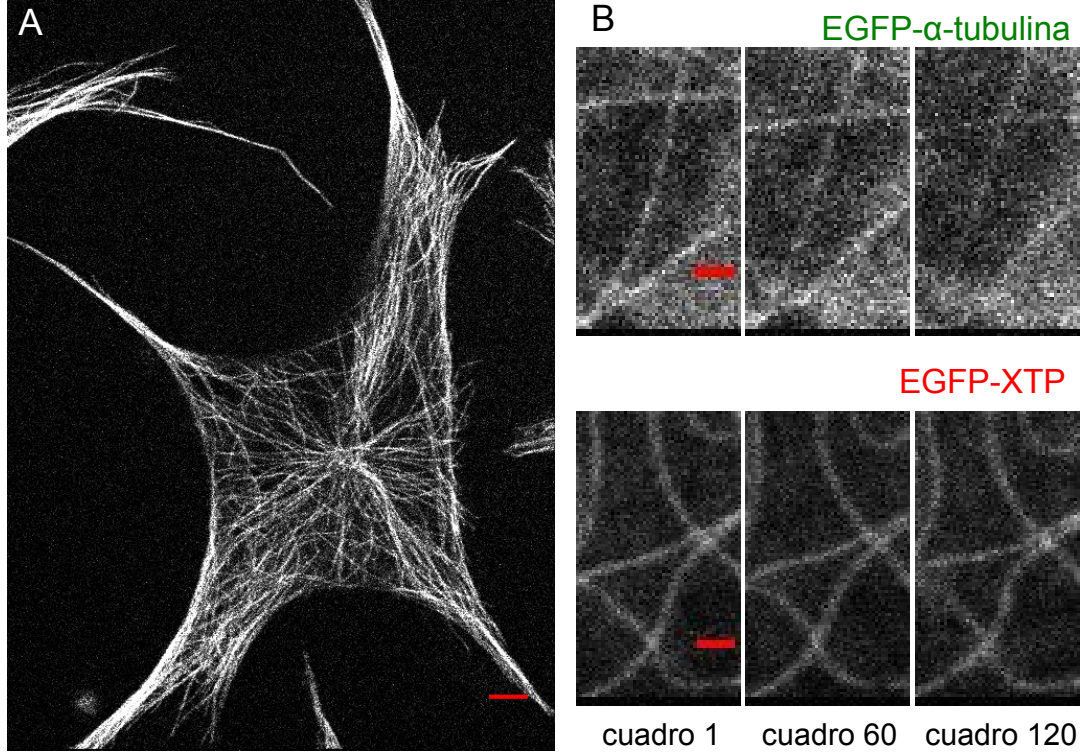


Figura 4.9: **Marcación de la red de microtúbulos con EGFP-XTP para disminuir el fotoblanqueo:** (A) Imagen confocal representativa de una célula expresando EGFP-XTP, la red de microtúbulos se observa en escala de grises. Barra de escala: $5 \mu\text{m}$. (B) Evaluación del fotoblanqueo observado en células que expresan EGFP- α -tubulina (arriba) o EGFP-XTP (abajo). Se muestran los cuadros 1, 60 y 120 de películas adquiridas en idénticas condiciones.

4.2.2. Influencia de la red de actina sobre la lp^* de los microtúbulos

Con el fin de explorar el rol de los filamentos de actina en las propiedades mecánicas de los microtúbulos, recuperamos las formas de segmentos de filamentos ($L = 8 \mu\text{m}$) en células expresando EGFP-XTP tratadas con latrunculina como se indica en la sección 2.1.2 para depolimerizar los filamentos de actina (figura 4.10).

Analizamos los datos mediante la descomposición de Fourier y observamos que $\text{var}(a_n) \propto q^{-2}$, correspondiendo con un comportamiento símil-térmico (figura 4.8B). La longitud de persistencia efectiva en este caso, $lp^* = (18 \pm 3) \mu\text{m}$, no fue significativamente distinta a la obtenida para células control. Estudiamos, también las curvaturas de estos segmentos y hallamos que la distribución de las mismas no difiere de la obtenida en células control (figura 4.8C). Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos por Bicek et al. [34] que observaron que los eventos de flexión de los microtúbulos no están correlacionados con la presencia de filamentos de actina.

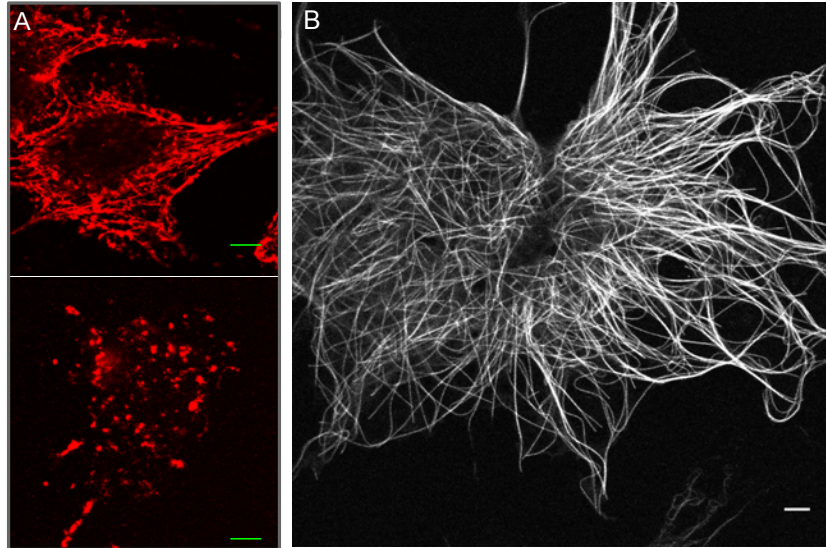


Figura 4.10: **Depolimerización de la red de actina:** Se trataron células expresando EGFP-XTP con latrunculina para depolimerizar los filamentos de actina (A) Como control del tratamiento, se registraron imágenes confocales de células melanóforas control (arriba) y tratadas con latrunculina (abajo) marcadas con rodamina-faloidina. La red de actina se muestra en rojo (B) Imagen representativa de red de microtúbulos obtenida para la condición EGFP-XTP tratada con latrunculina, la red de microtúbulos se observa en escala de grises. Barras de escala: 5 μm

Por otro lado, Brangwynne et al. [91] hallaron que la depolimerización de actina tenía un efecto muy leve en la longitud de onda de los microtúbulos en células vivas y sugirieron que otros componentes del citoesqueleto, tales como los filamentos intermedios, deben ser importantes para determinar el comportamiento mecánico de los microtúbulos.

4.2.3. Influencia de los filamentos intermedios sobre la lp^* de los microtúbulos

Repetimos los estudios mencionados previamente en células expresando una variante dominante negativa de vimentina (EGFP-vim(1-138)), una proteína característica de filamentos intermedios [2]. Se ha demostrado que la sobreexpresión de esta versión mutante provoca la depolimerización de los filamentos intermedios en células melanóforas de *Xenopus laevis* [106]. La figura 4.11A confirma que la expresión de esta mutante resulta en ausencia de filamentos intermedios. Por otra parte, se observa cualitativamente, que la morfología aparente de la red de microtúbulos se preserva (figura 4.11B). Las células transfectadas con EGFP-vim(1-138) presentan una alta concentración en el núcleo celular (figura 4.11A), por este motivo, pueden visualizarse fácilmente [106, 122].

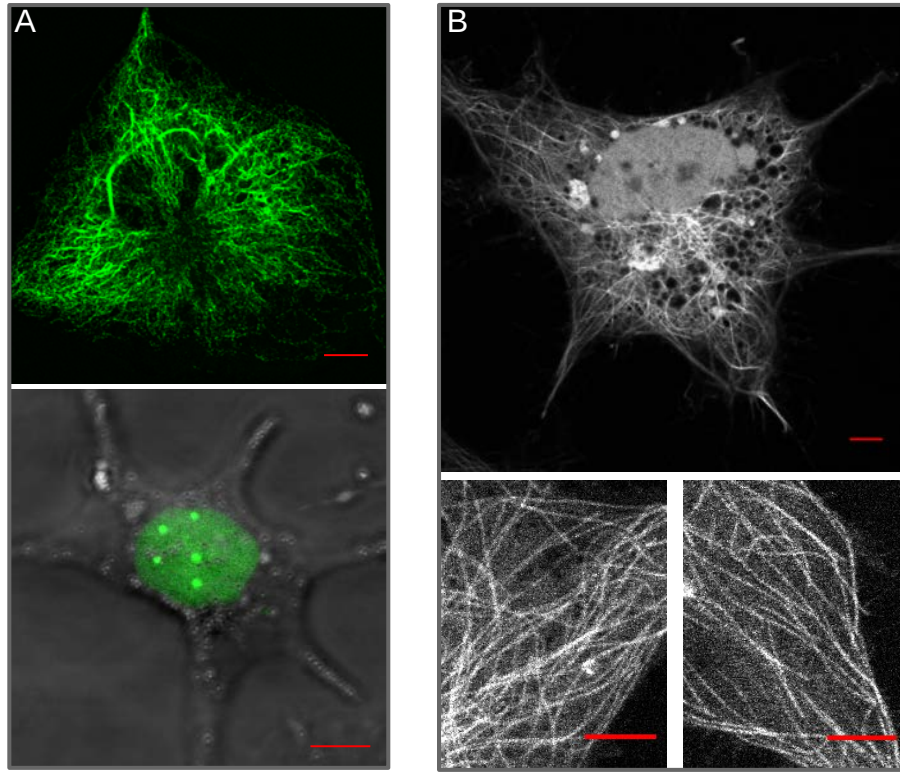


Figura 4.11: **Depolimerización de filamentos intermedios:** Se transfectaron células expresando EGFP-XTP con una variante dominante negativa de vimentina (A) Imágenes confocales de células melanóforas transfectadas con EGFP-vimentina (arriba) o GFP-vim(1-138) (abajo) y posteriormente fijadas. En verde se muestra la vimentina, en la imagen control se encuentra formando filamentos mientras que en la transfectada con la mutante (GFP-vim(1-138)) está reclutada al núcleo (B) Imágenes representativas de células expresando EGFP-XTP transfectadas con GFP-vim(1-138) para eliminar los filamentos intermedios, la red de microtúbulos se observa en escala de grises. Barras de escala: $5\ \mu\text{m}$

La figura 4.8B muestra que la varianza de las amplitudes de los modos de Fourier en ausencia de filamentos intermedios sigue un comportamiento símil-térmico. Calculamos la longitud de persistencia aparente para los microtúbulos en estas condiciones y obtuvimos $lp^* = (9 \pm 1)\mu\text{m}$, valor significativamente menor al obtenido en células control. Por otra parte, la distribución de curvaturas difiere de aquella obtenida en condiciones control, presentando un valor medio mayor, $\langle \kappa \rangle = (0,24 \pm 0,02)\mu\text{m}^{-1}$ (figura 4.8C). Estos resultados muestran que este componente del citoesqueleto tiene un papel importante en la estructura de la red de microtúbulos dentro de las células.

4.2.4. Efecto de las fuerzas de polimerización y depolimerización en la distribución de formas de la red de microtúbulos

En las secciones anteriores hallamos valores de la longitud de persistencia aparente de microtúbulos en células vivas que son dos órdenes de magnitud menores a las lp medidas *in vitro*. Este resultado se encuentra asociado a mayores fluctuaciones en las formas de los filamentos, lo cual era esperable dentro de las células. Sin embargo, no existen motivos para esperar *a priori* que las formas de los filamentos ajustaran a un modelo de equilibrio. Una explicación a este comportamiento similar podría ser la presencia de fuerzas activas actuando en forma aleatoria en el tiempo y el espacio sobre los microtúbulos [123]. A partir de esta hipótesis, nos preguntamos cuan delicado es el balance de fuerzas activas dentro de las células y cómo varía la lp^* al modificarlas. En el capítulo 1 mencionamos que los procesos de polimerización y depolimerización de microtúbulos son capaces de generar fuerzas de compresión sobre los filamentos. Es posible eliminar dichos procesos tratando a las células con vinblastina. En concentraciones adecuadas, esta droga estabiliza a los microtúbulos, inhibiendo su polimerización y depolimerización [103] sin causar la ruptura de los filamentos preexistentes [124].

Nos basamos en los resultados presentados por Robert et al. [104] para determinar la concentración óptima de vinblastina requerida para estabilizar los microtúbulos. En su trabajo, y en otro reportes [124], la concentración utilizada fue 10 nM. Por este motivo tratamos a las células melanóforas expresando EGFP-XTP con 10 ó 20 nM vinblastina. En un análisis cualitativo de las células tratadas con vinblastina 20 nM, notamos segmentos de microtúbulos fragmentados, i.e. ya no formando una red, y otros agrupados y muy curvados. Por otro lado, en las células tratadas con 10 nM vinblastina observamos un detenimiento en los eventos de polimerización y depolimerización sin modificar drásticamente a la red de microtúbulos. Por lo tanto utilizamos esta concentración en todos los experimentos con esta droga.

En estos experimentos, las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de campo amplio (figura 4.12). Este cambio en el método de observación de las células se debe a que buscamos obtener imágenes de células enteras con alta resolución temporal, para realizar un análisis dinámico de la flexión de los microtúbulos que será presentado en un capítulo posterior (Capítulo 7).

Como paso inicial, realizamos un experimento para corroborar que el cambio en el método de adquisición de imágenes y el ruido asociado al mismo no modificara los resultados en células control, i.e. células EGFP-XTP sin tratamiento. Calculamos la longitud de persistencia aparente y obtuvimos un valor de $lp^* = (16 \pm 1) \mu\text{m}$, que no es significativamente diferente al obtenido con imágenes confocales de esta

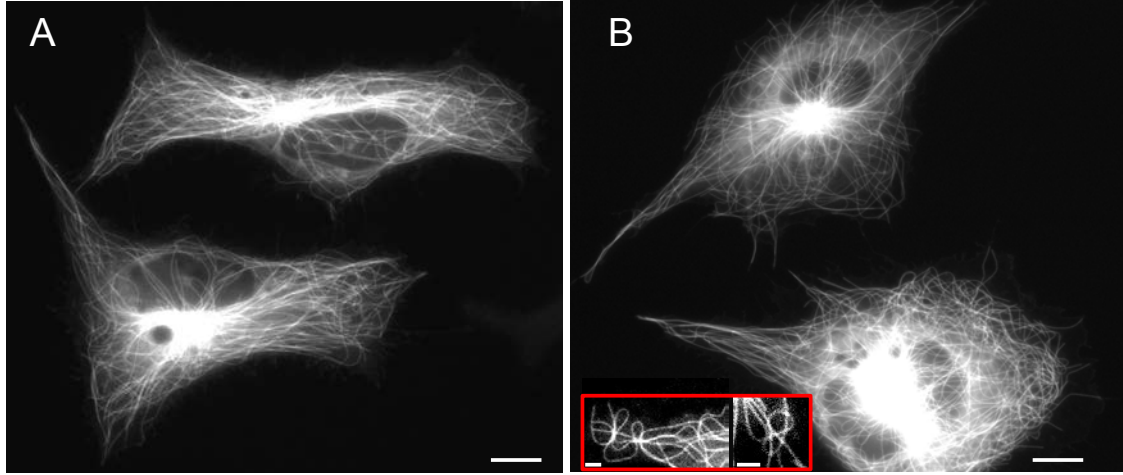


Figura 4.12: **Imágenes de células control y tratadas con vinblastina:** Imágenes de campo amplio de células melanóforas de *Xenopus laevis* expresando EGFP-XTP en condición control (A) o tratadas con 10nM de vinblastina (B) Barras de escala: 10 μm . En el panel interno de (B) se muestran ampliaciones de zonas con microtúbulos altamente curvados. Barras de escala: 2 μm .

misma línea celular (figura 4.13A). En este caso, el comportamiento también fue símil-térmico.

Una vez comprobado que los resultados obtenidos mediante la técnica de campo amplio son indistinguibles de aquellos obtenidos mediante microscopía confocal, analizamos la influencia de vinblastina en los microtúbulos. La figura 4.12 muestra que los microtúbulos en células tratadas con vinblastina son cualitativamente diferentes a los de células control; las primeras presentan microtúbulos con mayores curvaturas.

La figura 4.13B muestra que la varianza de las amplitudes de los modos decrece con el número de onda, pero no sigue el comportamiento símil-térmico ya que el exponente es $\neq -2$. Este resultado sugiere que la distribución de formas de los microtúbulos responde a un delicado balance de fuerzas activas a las que se encuentran sometidos los microtúbulos en células vivas y que la supresión de los procesos de polimerización/depimerización es suficiente para perturbar este equilibrio.

Forzando el ajuste de los datos a la ecuación 1.16, obtuvimos $lp^* = (11 \pm 2) \mu\text{m}$. La comparación de este dato con los mostrados en la figura 4.8 sugiere que este valor es menor al obtenido en células no tratadas, consecuente con la observación cualitativa de filamentos más curvados en las células tratadas (figura 4.12).

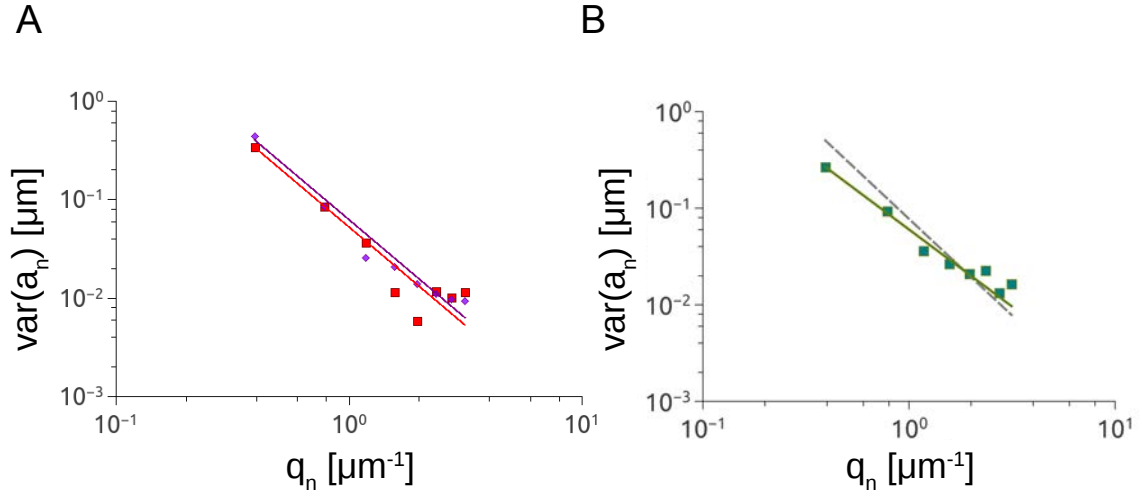


Figura 4.13: **Efecto de la vinblastina en la lp^* :** (A) Comparación de células control observadas mediante microscopía confocal (datos ■, ajuste —) y de campo amplio (◆, ajuste —), ambos casos siguen el comportamiento de $var(a_n) \propto q_n^{-2}$ y no dan diferencias significativas en las lp^* recuperadas. (B) Datos obtenidos de células tratadas con 10nM de vinblastina (■) con su exponente libre (—) o fijado a un valor de -2 (---).

4.3. Conclusiones

En este capítulo, hemos estudiado las propiedades mecánicas de los microtúbulos y la influencia del entorno celular en su organización en células melanóforas de *Xenopus laevis*.

Exploramos la influencia de una MAP específica (XTP), de los filamentos de actina y los filamentos intermedios en la mecánica red de microtúbulos. Con este fin, cuantificamos la distribución de curvaturas de microtúbulos fluorescentes en células vivas y hallamos que la misma sigue un comportamiento símil-térmico, tal como fue reportado para microtúbulos en células fijadas [35]. La longitud de persistencia que medimos es significativamente menor a la reportada para estos filamentos *in vitro*. Este resultado no variaba en células expresando EGFP-XTP (figura 4.8).

Este comportamiento símil-térmico fue reportado anteriormente, Brangwynne et al. [35] sugirieron que fluctuaciones no-térmicas de la orientación de la punta del filamento al polimerizarse pueden generar curvaturas que persistirían por el micro-entorno elástico. Por otra parte, estas formas también podrían verse alteradas por la acción de fuerzas activas sobre filamentos ya polimerizados. En este sentido Bicek et al. [34] propusieron que los motores moleculares asociados a los microtúbulos son los responsables de generar la mayor parte de la energía de compresión almacenada en la red. Nuestra hipótesis postula que el comportamiento símil-térmico observado se

debe a un balance de procesos activos dentro de la célula, donde los microtúbulos se ven sometidos a fuerzas no-térmicas actuando forma aleatoria tanto espacial como temporalmente.

Al suprimir las fuerzas activas de polimerización y depolimerización de microtúbulos, los datos se apartan del modelo de equilibrio (figura 4.13). Este resultado sugiere que existe un delicado equilibrio entre fuerzas activas, tanto las generadas por motores moleculares como las de polimerización/depolimerización. Al eliminar uno de estos procesos, el equilibrio se ve alterado.

Hasta el momento no encontramos en la literatura trabajos que relacionen la polimerización/depolimerización de los microtúbulos con su longitud de persistencia efectiva. Sin embargo, existen reportes de la flexión de los microtúbulos como consecuencia de su polimerización ante una barrera rígida [34, 91, 92]. Si el único efecto del tratamiento con vinblastina fuera el de eliminar una fuerza de compresión sobre las células, esperaríamos encontrar una distribución que se modificara en el sentido de una mayor lp^* , ya que los filamentos, en promedio, sufrirían una compresión menor bajo el tratamiento. Sin embargo, el comportamiento fue opuesto (figuras 4.13B y 4.8B).

La fuerza de polimerización es pequeña comparada con otras fuerzas intracelulares (por ejemplo, las generadas por motores moleculares) y los eventos de flexión debidos a esta fuerza son poco frecuentes dentro de las células [34]. En las células tratadas con vinblastina la depolimerización también es inhibida. Mediante este mecanismo, los microtúbulos liberan su compresión cuando el extremo + se encuentra con una barrera, mediante el fenómeno denominado catástrofe por encuentro (*encounter-based catastrophe*) [18, 19, 21], descrito en la sección 1.1.3. Al eliminar esta posibilidad, los microtúbulos podrían estar acumulando mayor compresión y por ende deformándose con longitudes de onda menores, lo cual explicaría la acumulación de filamentos curvados hacia la periferia celular, donde la membrana actúa de barrera. Esto es un hipótesis que debe ser estudiada experimentalmente.

Por otra parte, observamos que la depolimerización de filamentos intermedios reduce significativamente la longitud de persistencia aparente (figura 4.8B), sugiriendo que esta red se encuentra vinculada mecánicamente a los microtúbulos dentro de las células.

Capítulo 5

Movimiento lateral de microtúbulos en células vivas

Los microtúbulos se ven sometidos a fuerzas activas dentro de las células que generan desplazamientos y deformaciones de los filamentos. En el capítulo anterior analizamos las formas instantáneas de los microtúbulos de manera aislada. Sin embargo, en el citoplasma los microtúbulos varían su forma y se desplazan. Al ser una de las vías para el transporte de cargas dentro de las células, el movimiento de estos filamentos se encuentra íntimamente ligado a las trayectorias de dichas cargas y a su destino final [98]. Por este motivo, nos resulta importante describir la dinámica de estos filamentos, en pos de hallar una descripción global de la organización intracelular.

Para estudiar la remodelación local de la red de microtúbulos debida a desplazamientos de sus componentes, evaluamos el movimiento lateral de los microtúbulos en células. Por otra parte logramos mapear el movimiento lateral de los filamentos en dos regiones celulares: una central y otra periférica y observamos diferencias en los parámetros ajustados.

Parte de los experimentos presentados en este capítulo fueron realizados con la colaboración de la Dra. Diana Wetzler.

5.1. Desplazamiento cuadrático medio

Un parámetro ampliamente utilizado para extraer información cuantitativa de trayectorias de partículas individuales es el desplazamiento cuadrático medio (MSD, por sus siglas en inglés). Este parámetro indica la distancia media que ha recorrido un ensamble de partículas después de un lapso de tiempo τ , y por ende su comportamiento está relacionado las propiedades del movimiento y el microentorno [115].

En este capítulo, extendemos el concepto de MSD al movimiento de filamentos. En este caso estudiaremos su movimiento lateral (i.e. en la dirección perpendicular

a su orientación principal) en el plano de la imagen. Para evaluar este desplazamiento, calculamos la posición lateral (Pl) en cada cuadro como la posición media del segmento en esa dirección:

$$Pl = \frac{\sum_{k=1}^m y_k}{m} \quad (5.1)$$

donde m es el número total de coordenadas recuperadas e y_k es la posición vertical para cada punto x_k . Pl corresponde al centro de masa del segmento en la dirección transversal.

De esta forma, definimos el desplazamiento lateral cuadrático medio ($MLSD$) para una trayectoria de Pl :

$$MLSD(\tau) = \langle (Pl(t) - Pl(t + \tau))^2 \rangle \quad (5.2)$$

donde t es el tiempo absoluto y τ es el lapso de tiempo entre puntos estudiados (*time lag*), en este caso los corchetes $\langle \rangle$ representan un promedio temporal.

Para analizar la evolución del $MLSD$ para segmentos de microtúbulos en células melanóforas, ajustamos su comportamiento usando un modelo de difusión anómala [122, 125, 126]:

$$MLSD(\tau) = A \left(\frac{\tau}{\tau_0} \right)^\alpha + MLSD_0 \quad (5.3)$$

donde A representa un coeficiente de difusión generalizado, α es el exponente de difusión, τ es el lapso de tiempo, $\tau_0 = 1s$ y $MLSD_0$ es el valor residual del $MLSD$.

El parámetro α es un exponente que caracteriza al movimiento: $\alpha = 1$ corresponde a una trayectoria al azar y $\alpha = 2$ describe un movimiento procesivo con velocidad constante [127]. En estos casos límite, el factor pre-exponencial, A , es proporcional al coeficiente de difusión y la velocidad cuadrática, respectivamente.

En general, partículas difundiendo pasivamente en el citoplasma presentan valores del exponente $0 < \alpha < 1$, que representa un régimen sub-difusivo [128-130]. Por otra parte, aquellas moviéndose activamente en este tipo de medios muestran un comportamiento súper-difusivo ($1 < \alpha < 2$) [131, 132]. En estos casos, el factor pre-exponencial A es un coeficiente de transporte que combina información de las fuerzas dirigidas que generan el transporte y la respuesta viscoelástica del citoplasma [123, 126]. Este factor tiene unidades de distancia al cuadrado [126] lo cual permite comparar la movilidad efectiva de trayectorias con distintos valores de α .

5.1.1. Influencia de las redes de filamentos de actina y filamentos intermedios en el movimiento lateral de microtúbulos

Hemos mencionado en secciones anteriores que el citoesqueleto es una red interconectada, donde todos sus componentes interactúan entre sí. Esto nos hace suponer que los filamentos intermedios y de actina pueden afectar el movimiento de los microtúbulos.

Para explorar la influencia del resto de los componentes del citoesqueleto en el movimiento lateral de los microtúbulos dentro de las células, adquirimos películas confocales de regiones de células expresando EGFP-XTP con una resolución temporal relativamente alta (0.6-5 cuadros/s), durante 30 s.

Utilizando AFTER (capítulo 3), recuperamos las posiciones de segmentos de microtúbulos de 5 μm de longitud y calculamos la Pl en cada cuadro. Esta longitud resultó la más adecuada para realizar este análisis, ya que estos segmentos de presentan curvaturas pequeñas y funcionan como sondas locales del movimiento lateral del microtúbulo al cual pertenecen. Como veremos a continuación, controlamos *a posteriori* que los segmentos analizados no presenten cambios apreciables en su curvatura.

La evolución de Pl representa el desplazamiento lateral del segmento, únicamente en el caso de que el mismo no se deforme significativamente durante el tiempo de observación. Por este motivo, una vez recuperadas las coordenadas del segmento de microtúbulo, cuantificamos un índice de deformación (D) definido como el cociente entre la distancia lineal entre los extremos del segmento y su longitud total (L):

$$D = \frac{x_m - x_1}{\sum_{k=1}^m \Delta s_k} = \frac{x_m - x_1}{L} \quad (5.4)$$

En los siguientes análisis descartamos filamentos que presentaran una variación en $D > 7\%$.

La figura 5.1 muestra un ejemplo del análisis realizado sobre un segmento de microtúbulo. En el panel A se presentan las posiciones (x_k, y_k) recuperadas en distintos cuadros de la película estudiada; el valor de Pl se encuentra representado con círculos. La figura 5.1B muestra la variación temporal del índice de deformación durante el *tracking* y el panel C muestra la trayectoria de la Pl .

La figura 5.1D muestra un ejemplo de la evolución del $MLSD$ en función de τ calculada a partir de trayectoria ilustrada en el panel C. En esta figura graficamos también el comportamiento esperado para una trayectoria difusiva ($\alpha = 1$) y una trayectoria con velocidad constante ($\alpha = 2$).

Calculamos el $MLSD$ (ec. 5.2) para todas las trayectorias de Pl seleccionadas

según el criterio del índice de deformación mencionado y para $\tau < 10\%$ de la duración total de la trayectoria [127].

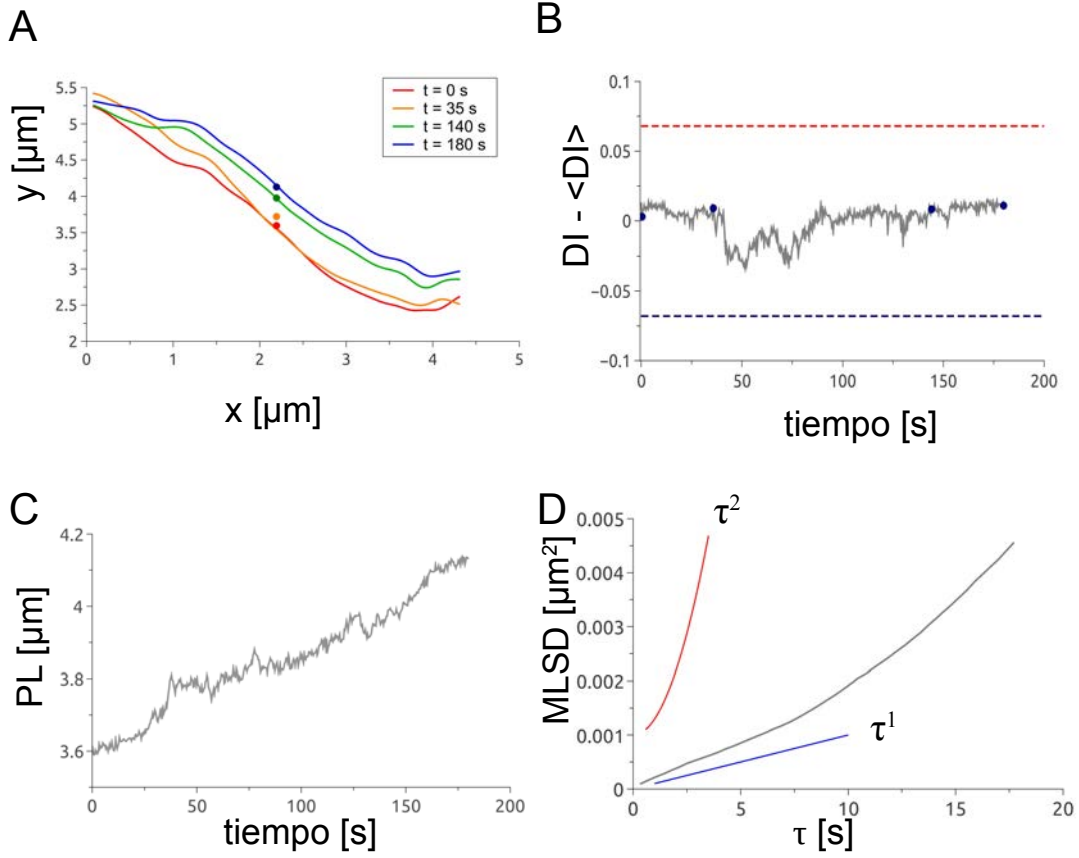


Figura 5.1: **Movimiento lateral de los microtúbulos:** Ilustración del análisis de segmentos de microtúbulos de $5 \mu\text{m}$ de longitud, aplicado a un segmento representativo. (A) Coordenadas de un segmento recuperadas con AFTER a distintos tiempos y valores de PL (●). (B) Evolución del índice de deformación para el mismo segmento, $\langle DI \rangle$ corresponde al valor medio, las líneas punteadas muestran el rango aceptable para las variaciones de DI y los círculos corresponden a los valores del índice en los cuadros graficados en A. (C) Evolución temporal de PL . (D) Movimiento lateral cuadrático medio en función de τ (—) para la trayectoria de PL . Se muestra un comportamiento difusivo con $\alpha = 1$ (—) y un movimiento balístico: $\alpha = 2$ (—)

Ajustamos los datos de las trayectorias de los segmentos al modelo de difusión anómala dado por la ec. 5.3 y obtuvimos los parámetros A y α . La figura 5.2 muestra que los valores de α se encuentran en el rango 0.5-1.5, sugiriendo que parte de los microtúbulos se encuentran parcialmente restringidos en su movimiento mientras que otros están sometidos a fuerzas activas.

El comportamiento promedio cercano a 1 sugiere un balance entre movimientos dirigidos por procesos activos y filamentos restringidos en un entorno altamente poblado.

Repetimos este análisis en células tratadas con latrunculina (-FA) o transfectadas con la dominante negativa mutante de vimentina (-FI), utilizada en el capítulo 4.

En todas las condiciones evaluadas, α toma valores en el rango 0.4-1.7 con valores medios similares al determinado en células control (figura 5.2B).

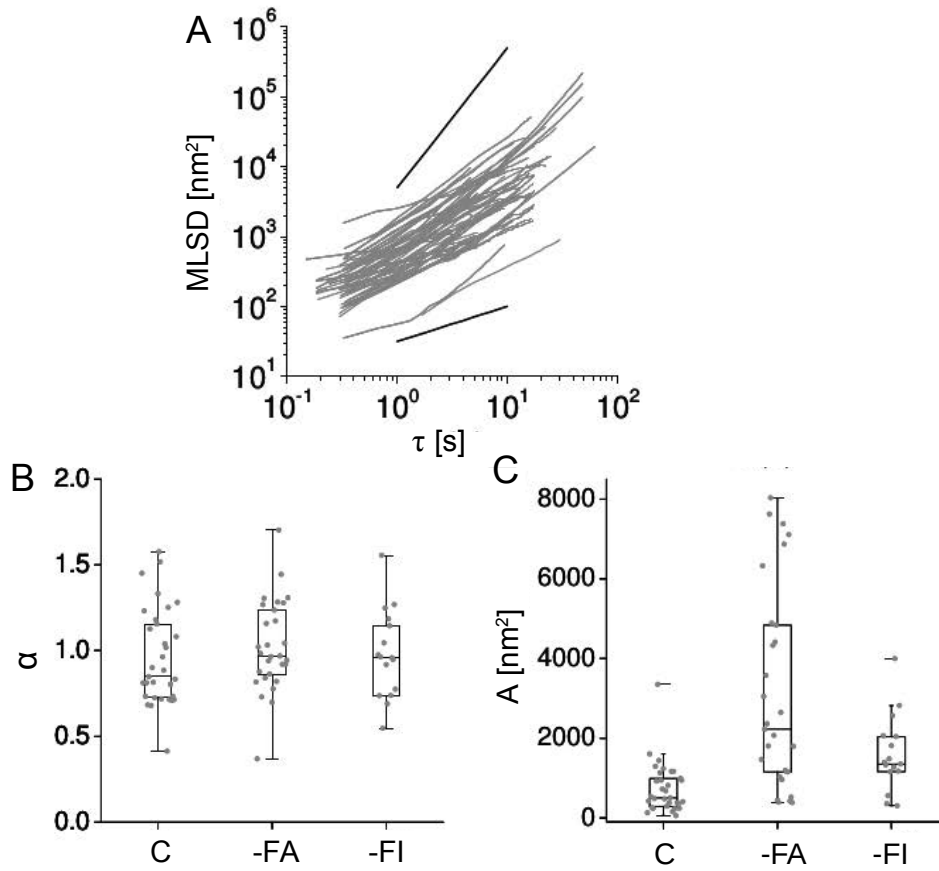


Figura 5.2: **Influencia de las redes del citoesqueleto en el movimiento lateral de los microtúbulos evaluada a partir del análisis del *MLSD***: Se analizaron segmentos de microtúbulos de 5 μm en células control y luego de depolimerizar selectivamente los filamentos de actina o los intermedios. (A) *MLSD* vs. τ para la condición control (–), como referencia las líneas negras muestran el comportamiento esperado para $\alpha = 0.5$ (abajo) y $\alpha = 2$ (arriba). (B-C) Boxplots del coeficiente de difusión anómala, α (B) y el factor pre-exponencial, A (C) obtenidos para células en condición control: C; sin filamentos de actina: -FA; y sin filamentos intermedios: -IF. Se muestran datos obtenidos para 80-110 filamentos de 15-50 células en cada condición experimental.

Por otra parte, los valores del factor A -asociado a la amplitud del movimiento- en células sin actina o filamentos intermedios son superiores a los control¹ (figura 5.3C). Las células tratadas con latrunculina presentaron un valor promedio de este factor mayor al de aquellas sin filamentos intermedios. Estos resultados indican que la depolimerización de las redes de actina o filamentos intermedios aumenta significativamente los desplazamientos locales de los microtúbulos, sugiriendo que

¹Según lo determinado mediante una prueba de Wilcoxon.

estas redes del citoesqueleto restringen el movimiento de los microtúbulos en células vivas.

5.1.2. Mapeo del movimiento de microtúbulos en células vivas

Hemos mencionado antecedentes que muestran que tanto fuerzas internas como externas a la célula actúan sobre y a través del citoesqueleto, afectando las propiedades mecánicas locales y globales de la célula [22, 90, 116, 133]. Por lo tanto, decidimos mapear cómo distintas regiones de la célula y, en consecuencia, el citoesqueleto sensa estas fuerzas para buscar comprender la repuesta mecánica de la célula.

Para mapear la dinámica de los microtúbulos dentro de la célula, adquirimos películas confocales de células expresando EGFP-XTP con una resolución temporal de 0.1-0.3 cuadros/s durante ~ 12 min. Tal como realizamos en la sección anterior, recuperamos las posiciones de los microtúbulos a lo largo del tiempo y computamos su movimiento lateral promedio. En este caso, seguimos el movimiento de filamentos de $4\ \mu\text{m}$ de longitud para poder obtener un mayor número de segmentos analizados en una célula y realizar un mapeo confiable. Este valor sigue siendo mayor que las longitudes medias de los tamaños típicos de las deformaciones de los filamentos pero no demasiado grandes, como para poder describir correctamente el desplazamiento del segmento mediante su Pl . Descartamos aquellos que presentan deformaciones en el tiempo utilizando el mismo criterio que en la sección anterior.

Para el análisis, consideramos filamentos ubicados en la región cortical o en la región perinuclear de la célula. Definimos las regiones dividiendo a la mitad la distancia del núcleo de la célula a su membrana. Llamamos cortical a la región del citoplasma que se encuentra cercana a la membrana (en general esto resultó en una distancia $<10\ \mu\text{m}$ de la membrana plasmática, aproximadamente) y perinuclear a la región cercana al núcleo, i.e. la parte central de la célula. La figura 5.3 muestra una imagen representativa de una célula con algunos microtúbulos analizados. Las flechas ilustran el movimiento lateral de los microtúbulos en la ventana temporal estudiada y su longitud es proporcional a la magnitud del desplazamiento total. La figura muestra que los segmentos se desplazan en direcciones arbitrarias, sugiriendo que la dinámica estudiada en esta célula representativa no se debe a un movimiento global de la misma. Procuramos tomar mediciones en células que cumplieran con esta característica.

La figura 5.3B-C muestra los valores recuperados de α y A obtenidos para cada sector de la célula. Los exponentes de difusión anómala medidos en ambos sectores fueron predominantemente mayores a 1, indicando que las fuerzas involucradas en el

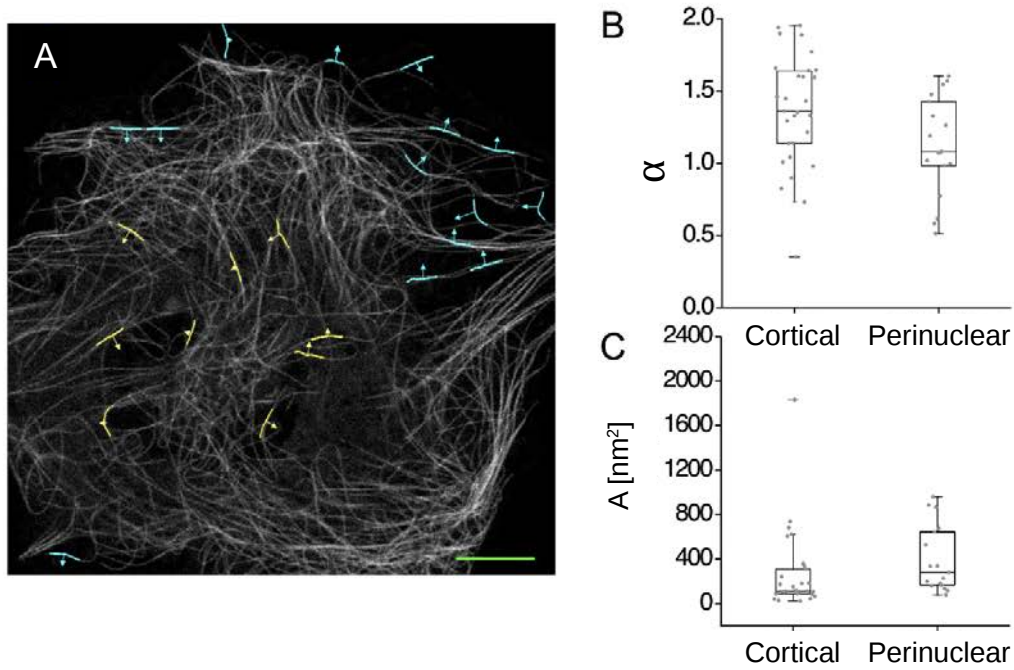


Figura 5.3: **Maapeo del movimiento lateral de los microtúbulos en células vivas:** (A) Imagen en escala de grises de una célula expresando EGFP-XTP mostrando algunos filamentos seguidos en la región perinuclear (amarillo) y cortical (cyan). Las flechas representan los vectores desplazamiento para cada segmento. Barra de escala $10 \mu\text{m}$. (B-C) Se ajustaron los datos de *MLSD* al modelo de difusión anómala. Se muestran boxplots de los valores obtenidos del exponente de difusión anómala (ec. 5.3), α (B) y del factor pre-exponencial, A (C). La figura incluye datos de 51 filamentos de 5 células diferentes.

desplazamiento de estos filamentos del citoesqueleto son activas, tanto en los bordes de la célula como en su región central.

Además, el valor de α determinado en la periferia celular fue significativamente mayor al obtenido en la zona perinuclear². Como los microtúbulos se encuentran interconectados a la corteza mediante motores moleculares [134], los valores mayores del exponente podrían reflejar fuerzas activas más intensas.

Al comparar estos datos con aquellos obtenidos en la sección anterior (5.2B) observamos que los valores de α fueron mayores en este caso (figura 5.3B). Esto puede deberse a que los experimentos realizados en esta sección tienen menor resolución temporal y barren una ventana temporal mayor. Esto sugiere que los procesos involucrados en el movimiento dirigido de los microtúbulos se desarrollan en ventanas temporales de segundos. En esta dirección, se demostró previamente que los eventos de flexión de microtúbulos en células vivas ocurrirían en esta misma escala temporal [34, 98].

En este punto, vale la pena mencionar que el MSD de distintas sondas en células

²Según el criterio de Wilcoxon.

vivas con frecuencia presenta transiciones entre distintos regímenes anómalos [98, 123, 131, 132, 135]. Estas transiciones son consecuencia de las distintas escalas temporales de los procesos subyacentes al movimiento de la partícula estudiada. Por ejemplo, una sonda de dimensiones micrométricas inmersa en el citoplasma puede presentar un movimiento difusivo a escalas cortas de tiempo, ciertos obstáculos microtmétricos como el citoesqueleto pueden confinar su movimiento a escalas temporales intermedias, para finalmente resumir un movimiento más dirigido a escalas mayores de tiempo debido a la remodelación activa del citoesqueleto [123, 131]. La ecuación propuesta en esta parte del trabajo (eq. 5.3, [136-138]) asume un comportamiento de ley de potencia con un único exponente, y por lo tanto representa el comportamiento anómalo promedio observado en una ventana temporal en particular.

Por otra parte, el factor pre-exponencial A es significativamente mayor en la zona central de la célula que en sus bordes, sugiriendo que la amplitud del movimiento es más reducido hacia la periferia. La red de microtúbulos se encuentra vinculada a la membrana plasmática. Esta interacción, junto con la interacción con la red de actina, podría ser responsable de la restricción del movimiento de los microtúbulos en esta zona, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la sección anterior.

En conjunto, estos resultados muestran que las fuerzas involucradas en el movimiento del citoesqueleto pueden ser de carácter activo y heterogéneas temporal y espacialmente.

5.2. Conclusiones

En este capítulo, estudiamos el movimiento lateral de la red de microtúbulos en células melanóforas de *X. laevis*. Este movimiento influye en el transporte intracelular de cargas [98]. Por este motivo, la caracterización dl mismo y de los factores que lo afectan es importante para desarrollar un modelo de transporte intracelular integral, incluyendo la dinámica de sus vías.

Al analizar el $MLSD$ de las trayectorias recuperadas en ventanas temporales pequeñas, determinamos que el exponente de difusión anómala tiene un valor medio ~ 1 (figura 5.2B). Este valor es característico de un proceso difusivo, en el cual actúan fuerzas térmicas. Sin embargo, lo que diferencia nuestros datos de un caso de movimiento Browniano es su dispersión y las magnitudes extremas alcanzadas. Los valores de α obtenidos representan fenómenos de distinta naturaleza: por un lado procesos activos para $\alpha > 1$; y por otro, procesos sub-difusivos con $\alpha < 1$. El hecho que el valor medio del exponente sea ~ 1 evidencia el equilibrio de procesos activos y no-activos dentro de las células.

Este balance deja de observarse al ampliar la ventana temporal al orden de los minutos, para el estudio del *MLSD*, condición en la cual el exponente adopta valores principalmente mayores a 1. Esto indica que los fenómenos observados a estas escalas temporales son primordialmente activos.

Al estudiar los efectos de las redes del citoesqueleto sobre el movimiento lateral de los microtúbulos, reportamos un aumento significativo en su movimiento en células sin filamentos de actina o intermedios con respecto a las células control (figura 5.2C). Esto sugiere que dichos componentes del citoesqueleto restringen el movimiento de los microtúbulos y contribuyen a la organización dinámica de su red.

El valor de A en células desprovistas de filamentos de actina resultó mayor que en las otras condiciones, sugiriendo una mayor restricción del movimiento de los microtúbulos por estos filamentos. Por otra parte, hallamos una menor dispersión de los valores de A en las células control respecto a aquellas en las cuales se depolimerizó actina o filamentos intermedios (figura 5.2C). Este resultado puede ser interpretado considerando la heterogeneidad de la distribución de las redes de actina y filamentos intermedios que, al ser depolimerizados, pueden liberar el movimiento de los microtúbulos en ciertas regiones pero no en otras.

La mayoría de los trabajos previos sobre la dinámica de microtúbulos en células vivas estaban basados en imágenes de microscopía de campo amplio de la red de microtúbulos [34, 35, 59, 139]. Aquí, utilizamos microscopía confocal para estudiar la dinámica de los microtúbulos en distintas regiones celulares. Combinando esta técnica con AFTER, que nos permite realizar el *tracking* de filamentos a bajos niveles de S/N, pudimos realizar el seguimiento de segmentos de microtúbulos en distintas regiones de la célula y mapear su movimiento.

A partir del estudio de trayectorias de segmentos de microtúbulos en distintas regiones celulares, determinamos que el movimiento de los filamentos en la región central es más rápido, pero menos direccionado que en la región periférica de la célula (figura 5.3). Teniendo en cuenta la aumentada densidad de la red de actina en la región periférica de las células podemos considerar que la interacción de este entramado de filamentos puede conducir a un movimiento global coordinado pero más restringido que en otras zonas de las células.

Capítulo 6

Deformación de microtúbulos y producción de fuerzas: estudio numérico

Uno de los aspectos menos estudiados de los microtúbulos y que ha cobrado relevancia en el último tiempo es la capacidad de estos biofilamentos de transmitir fuerzas mecánicas. Este fenómeno también se encuentra involucrado en la mecanotransducción, que es la capacidad que tienen las células de convertir estímulos mecánicos en señales químicas [140-142].

Con el objetivo de comprender la mecánica subyacente a este fenómeno, en este capítulo estudiamos un tipo de evento que ocurre frecuentemente en células vivas: el *buckling* de microtúbulos. Durante estos eventos, una región del microtúbulo sometido a fuerzas activas se curva súbitamente y luego de unos segundos relaja su forma [23, 90, 91].

Abordamos el estudio desde un punto de vista teórico: realizamos simulaciones de filamentos utilizando un modelo minimalista basado en el *worm-like chain model* (WLCM) para comprender cómo distintos mecanismos de fuerza podrían resultar en el *buckling* del filamento con distintas características.

Parte del trabajo presentado en este capítulo fue realizado en colaboración con el Dr. Alejandro G. Monasterio, de la UNES.

6.1. Los eventos de *buckling* ocurren frecuentemente en células vivas

La figura 6.1 muestra una secuencia temporal de imágenes en las que ocurre una deformación transiente y localizada de un microtúbulo en el entorno citosólico; superpuesto a las imágenes de microscopía, se graficaron las formas del segmento

recuperadas con AFTER. Este fenómeno se observa constantemente en células vivas, tanto en la periferia como en regiones centrales o perinucleares y será estudiado experimentalmente en el capítulo 7.

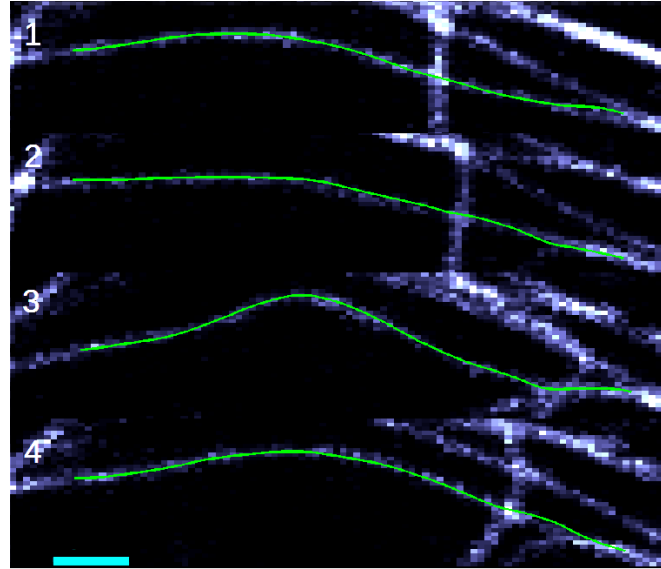


Figura 6.1: ***Buckling* de un microtúbulo *in vivo***:. Serie temporal de imágenes con-focales de una región celular con los microtúbulos marcados con EGFP-XTP, donde se presenta un evento de *buckling*. En verde se superponen las posiciones recuperadas con AFTER. Se puede observar como el filamento comienza con una leve curvatura, luego esta aumenta para después relajar una vez más. Se muestran cuadros a $t = 0, 15, 25$ y 40 s. Barra de escala: $1 \mu\text{m}$

Los fenómenos como el representado en las figura 6.1 son causados por el accionar de fuerzas sobre el microtúbulo [34, 95]. Estas fuerzas tienen su origen en procesos activos dentro de las células, es decir procesos fuera del equilibrio que requieren energía. Por lo tanto, el estudio de estos eventos podría ayudar a comprender cómo estas fuerzas regulan la organización del citoesqueleto y contribuyen a sus funciones.

Más allá de la evidencia de que los eventos de *buckling* son generados por procesos activos, muchos aspectos relevantes de los mecanismos involucrados en estos fenómenos permanecen desconocidos, como por ejemplo la intensidad, dirección y sentido de las fuerzas involucradas. En este punto, las simulaciones numéricas son una buena herramienta para comprender el efecto de fuerzas locales aplicadas a microtúbulos [23, 59, 143].

6.2. Modelado del movimiento de un microtúbulo mediante simulaciones numéricas

Comenzamos el estudio de los eventos de *buckling* planteando un modelo simplificado de filamento, el citoplasma y las energías involucradas. Para un filamento

semiflexible inmerso en un medio puramente viscoso, la energía potencial (V) está compuesta por un término elástico (V_E) y un término de flexión, o *bending* (V_B):

$$V = V_E + V_B \quad (6.1)$$

$$V_E = \frac{1}{2}EA \int [|\mathbf{r}'(l)| - 1]^2 dl \quad (6.2)$$

$$V_B = \frac{1}{2}EI \int C^2(l)|\mathbf{r}'(l)|^2 dl \quad (6.3)$$

con

$$C(l) = \frac{|\mathbf{r}'(l) \times \mathbf{r}''(l)|}{|\mathbf{r}'(l)|^3} \quad (6.4)$$

donde C es la curvatura, l es la coordenada longitudinal a lo largo del filamento y $\mathbf{r}(l)$ es la posición en el espacio de la línea neutra, que separa la zona traccionada de la zona comprimida del filamento [144].

Utilizamos estas fórmulas para definir la energía del filamento en un modelo discreto conocido como *worm-like chain model* o modelo de cadena semi-flexible [145]. Este modelo considera al filamento como un conjunto de cuentas unidas por resortes (figura 6.2).

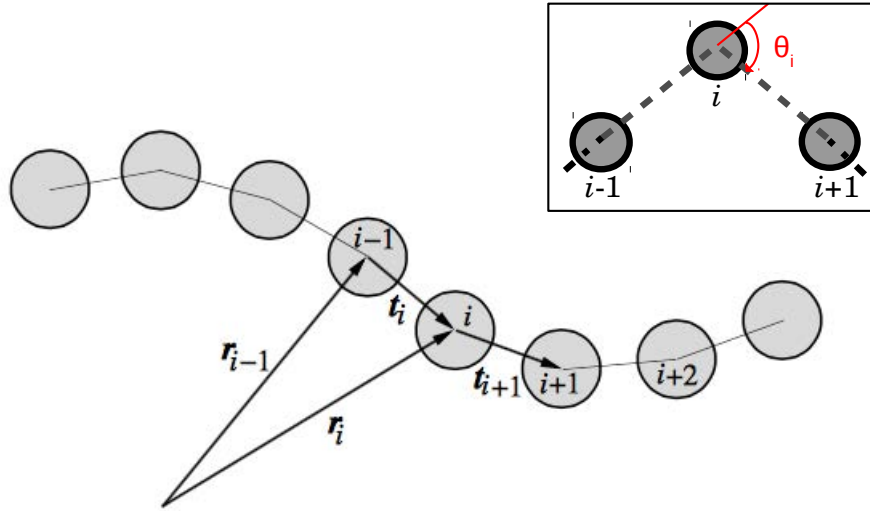


Figura 6.2: **Esquema de la cadena semi-flexible:** Se ilustran las posiciones de las cuentas (círculos grises) y los vectores tangentes a la cadena entre dos cuentas ($\mathbf{t}_i$). Figura adaptada de [144]. En el panel interno se esquematiza la determinación del ángulo θ_i , que determina también un versor perpendicular local en la cuenta i . Entre las cuentas, a lo largo del vector tangente, actúan fuerzas elásticas y en cada cuenta actúa una fuerza de *bending* en la dirección $-\hat{\theta}_i$.

Si la longitud natural es L , una discretización en N segmentos resulta en una

longitud de equilibrio de cada segmento $\Delta l = L/N$ y $N+1$ cuentas. La energía potencial del sistema depende de $N+1$ coordenadas independientes $\mathbf{r}_n$:

$$V_E = \frac{1}{2} \frac{EA}{\Delta l} \sum_{n=0}^{N-1} [|\mathbf{r}_{n+1} - \mathbf{r}_n| - \Delta l]^2 \quad (6.5)$$

$$V_B = \frac{EI}{\Delta l} \sum_{n=1}^{N-1} \left[1 - \frac{(\mathbf{r}_{n+1} - \mathbf{r}_n)(\mathbf{r}_n - \mathbf{r}_{n-1})}{|\mathbf{r}_{n+1} - \mathbf{r}_n| |\mathbf{r}_n - \mathbf{r}_{n-1}|} \right] \quad (6.6)$$

Derivando estas energías potenciales con respecto a r_n obtenemos las fuerzas elástica (F_{E_n}) y de *bending* (F_{B_n}) en cada cuenta, respectivamente [144]. Finalmente, se considera una fuerza viscosa dada por:

$$\overline{F_n^{vis}} = -c \overline{\Delta l \dot{r}_n} \quad (6.7)$$

donde c es el coeficiente de arrastre por unidad de longitud ($\gamma/\Delta l$). Para un cilindro, el coeficiente de arrastre en las direcciones perpendicular y longitudinal son del mismo orden de magnitud. Para las simulaciones tomamos [2]:

$$c = \frac{4\pi\eta}{\log(L/\Theta) + 0,84} \quad (6.8)$$

donde η y Θ representan la viscosidad del medio y el diámetro del filamento, respectivamente. Utilizamos la fuerza de arrastre de un cilindro y no el de cada cuenta esférica por separado para simular más precisamente un microtúbulo en un medio viscoso.

En la escala de los micrómetros y para los tiempos estudiados, podemos desprejir el término inercial en las ecuaciones de movimiento y definir las velocidades $\dot{r}_n$ de las cuentas a partir de la fuerza total actuando sobre ellas. Por lo tanto resolvemos la siguiente ecuación de movimiento para cada cuenta:

$$\dot{\mathbf{r}}_n = \frac{\mathbf{F}_{E_n}(n-1, n, n+1) + \mathbf{F}_{B_n}(n-2, n-1, n, n+1, n+2) + \mathbf{Fext}_n(n)}{c \Delta l} \quad (6.9)$$

donde $\mathbf{Fext}_n$ es una fuerza externa aplicada en la cuenta n .

Los parámetros utilizados en las simulaciones se encuentran en la Tabla 6.1:

Parámetro	Valor
Diámetro externo de los microtúbulos (Θ)	25 nm [2]
Rigidez flexural de los microtúbulos (EI)	$2 \cdot 10^7$ pN [70]
Constante elástica de los microtúbulos (EA)	10^5 pN [2]
Viscosidad del citoplasma (η)	$5 \cdot 10^{-6}$ pN.s/nm ² [52]

Tabla 6.1: **Parámetros de las simulaciones**

Simulamos filamentos de longitud total en reposo $L = 5000$ y 7000 nm divididos en 50 y 70 segmentos de 100nm, respectivamente. La longitud de los segmentos elegida permite obtener formas suaves, con un bajo costo computacional.

Por otra parte, consideramos cuatro escenarios distintos; tres incluyen fuerzas que deforman al filamento y uno modela su relajación tras la liberación total o parcial de la fuerza. Utilizamos condiciones de borde empujadas en todos los casos, salvo que se aclare lo contrario.

6.3. Deformación de un filamento en distintos escenarios

6.3.1. Fuerzas de compresión

6.3.1.1. Fuerza constante

En primer lugar, consideramos el caso de aplicar en algún punto del filamento una fuerza de compresión de magnitud constante en la dirección x (figura 6.3A).

Este escenario representaría una organela u otro tipo de carga unida al microtúbulo empujada mediante fuerzas activas (por ejemplo, por motores moleculares) en la dirección paralela al filamento. Si el filamento se encuentra anclado en algún punto, situación altamente frecuente dentro de las células debido a interacciones con otros filamentos, la membrana, el centrosoma u otro tipo de barreras, esta acción genera una fuerza de compresión sobre el filamento en cuestión (figura 6.3B).

En las simulaciones analizamos esta situación utilizando las siguientes condiciones de borde:

$$\left\{ \begin{array}{l} F = F_0 \hat{x}; \quad i = 0 \\ y_i = 0; \quad i = 0, 1, N - 1, N \\ \dot{x}_i = 0; \quad i = N \\ \dot{y}_i = 0; \quad i = 0, 1, N - 1, N \end{array} \right.$$

Recordemos que la fuerza crítica (F_c) a partir de la cual un filamento completamente relajado puede flexionarse depende de su longitud, L , EI y de las condiciones de borde (ec. 1.7). En particular, para un microtúbulo de longitud $5 \mu\text{m}$ con ambos extremos empujados $F_c = 32$ pN y con ambos extremos articulados $F_c = 8$ pN. Consideramos estos valores como límites inferiores a las fuerzas simuladas en cada condición, para poder observar la evolución en la forma del filamento.

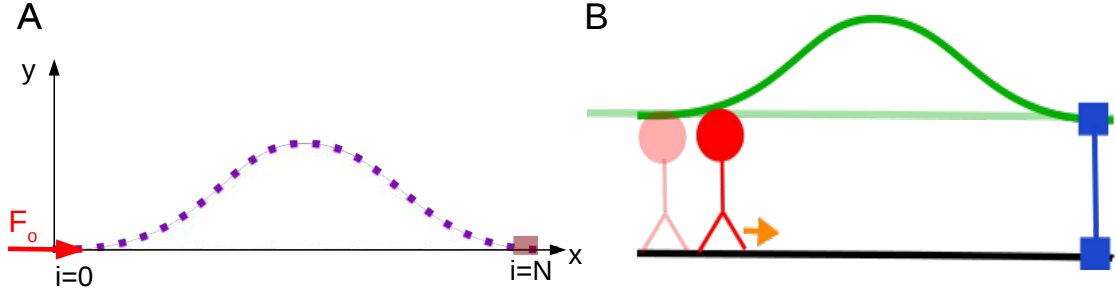


Figura 6.3: **Esquemas de las simulaciones de fuerza de compresión constante:** Filamentos de longitud $L = 5\mu\text{m}$; $F_c = 32\text{ pN}$ con condiciones de borde empotrada en la dirección y para el extremo móvil y el extremo fijo. (A) Esquema de la disposición de fuerzas y las cuentas sobre el filamento. (B) Fenómeno biológico representado: El filamento unido a un sustrato y a una organela (círculos), la cual es transportada activamente por un motor molecular. Los colores más claros representan la condición inicial y los más oscuros un tiempo posterior.

La condición inicial es $y = A_0 f(x)$. A tiempo $t = 0$ se aplica una fuerza horizontal constante $F_0 > F_c$ (figura 6.3). En consecuencia, la amplitud del filamento crece exponencialmente como:

$$A(t) = A_0 e^{t/\tau} \quad (6.10)$$

con un tiempo característico dado por [2]

$$\tau = \tau_0 \frac{F_c}{F - F_c} \quad (6.11)$$

donde

$$\tau_0 = \frac{c}{EI} (\gamma L)^4 \quad (6.12)$$

es el tiempo característico de relajación para un microtúbulo libre, c es el coeficiente de arrastre por unidad de longitud y γ depende de las condiciones de borde (figura 6.4).

No obstante, luego de un período de evolución rápida, el crecimiento de la amplitud se enlentece hasta alcanzar finalmente, un *plateau* de equilibrio. El filamento adquiere una forma estacionaria curvada que depende de la fuerza aplicada, mientras que la fuerza en el extremo móvil es equivalente a F_0 (figuras 6.4 y 6.5). La velocidad del extremo móvil también disminuye consecuentemente.

Realizamos las simulaciones con distintas amplitudes iniciales puesto que en células vivas observamos que los filamentos pueden tener amplitudes basales de incluso algunos micrómetros en el momento inicial del *buckling*. La figura 6.4 muestra la evolución de filamentos simulados con una misma F_0 , donde se modifica la amplitud

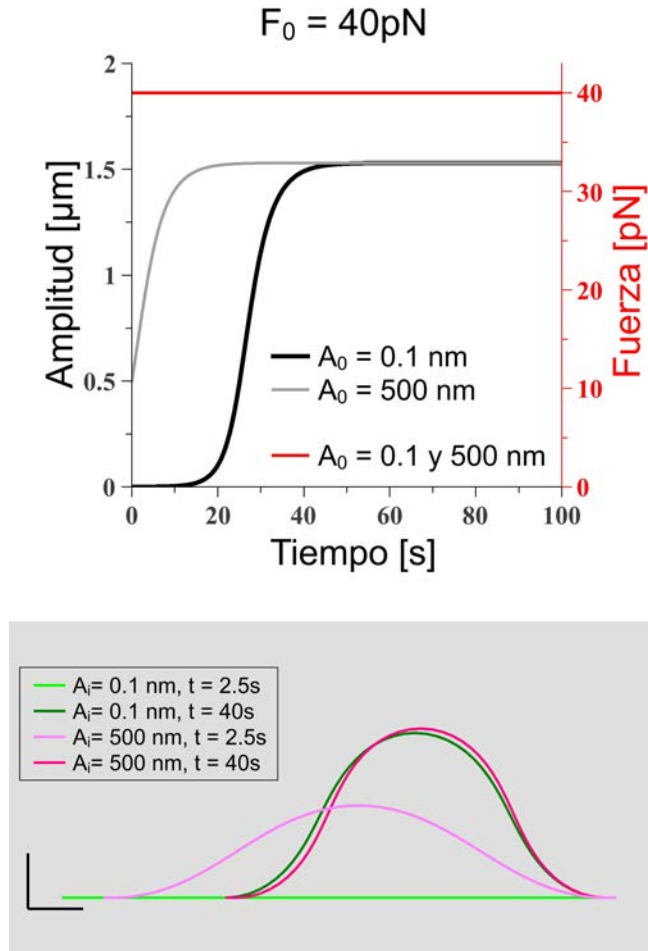


Figura 6.4: **Simulaciones de fuerza de compresión constante: efecto de la condición inicial.** Resultados obtenidos de las simulaciones para $F_0 = 40 \text{ pN}$ y distintas amplitudes iniciales. $L = 5 \mu\text{m}$ Arriba: Evolución temporal de la amplitud y de la fuerza en la dirección horizontal en el extremo móvil para filamentos con distintas amplitudes iniciales A_0 . Abajo: Formas de los filamentos recuperadas de la simulación obtenidas a dos tiempos representativos. Barras de escala = $1 \mu\text{m}$.

inicial (A_0). En esta figura y en las que seguirán en este capítulo, la evolución de la amplitud de la deformación se muestra en negro mientras que la fuerza en el extremo móvil del filamento en rojo. En el caso $A_0 = 0.1 \text{ nm}$, el filamento inicialmente mantiene una amplitud constante, prácticamente sin deformarse, debido a la compresión elástica de las cuentas. Luego la amplitud crece en forma exponencial hasta alcanzar un valor estacionario. Por otra parte, cuando la amplitud inicial es apreciable ($A_0 = 500 \text{ nm}$) no existe este período de latencia y se alcanza el equilibrio en forma más rápida. Las amplitudes de equilibrio y las formas finales son las mismas en ambos casos.

Las formas de equilibrio y el tiempo transcurrido hasta alcanzarlas dependen de la magnitud de la fuerza de compresión aplicada (figura 6.5). Observamos una disminución notable en la velocidad de crecimiento de la amplitud al aplicar fuerzas

cercanas a la crítica. Si quisiéramos continuar flexionando el filamento deberíamos aplicar una fuerza mayor. En este caso, la amplitud evoluciona hacia un nuevo valor estacionario sin pasar por el crecimiento exponencial inicial. Sin embargo, si la carga adicional supera cierto umbral el filamento no alcanza una forma estacionaria, sino que se pliega (línea punteada gris en la figura 6.5). Esto indica que existe un límite superior para la fuerza aplicada ($F_0 = F_u$), a partir del cual se dejan de recuperar formas y amplitudes de equilibrio.

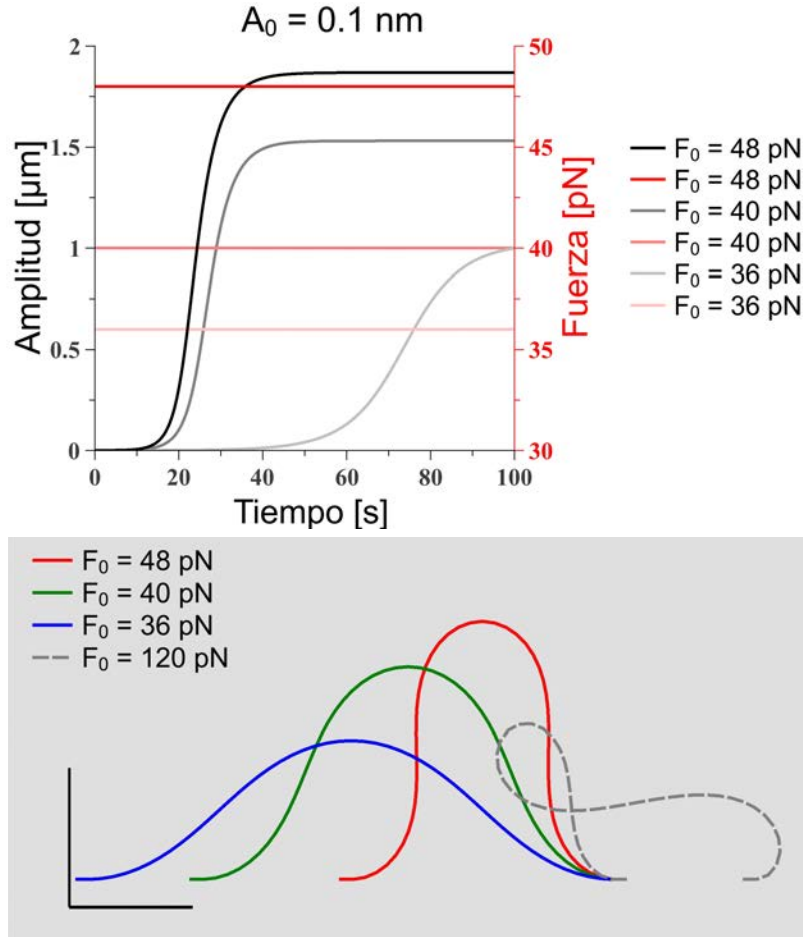


Figura 6.5: **Simulaciones de fuerza de compresión constante: efecto de la magnitud de la fuerza.** Resultados obtenidos de las simulaciones con amplitud inicial $A_0 = 0.1$ nm y distintas magnitudes de las fuerzas de compresión. $L = 5 \mu\text{m}$; $F_c = 32$ pN. Arriba: Evolución temporal de la amplitud y de la fuerza en la dirección horizontal en el extremo móvil para filamentos con distintas fuerzas aplicadas F_0 . Abajo: Formas finales de los filamentos recuperadas de la simulación. Barras de escala = $1 \mu\text{m}$.

6.3.1.2. Velocidad constante

En la figura 6.6 se considera una configuración similar a la recién descrita, pero en este caso el microtúbulo es comprimido hacia su extremo fijo a velocidad constante. Esta condición se puede asociar a la acción de un motor molecular unido

al microtúbulo e intentando avanzar contra una barrera que le impide trasladarse, generando pasos en falso. Esto generaría una inyección de material en el sentido opuesto a los pasos del motor con, en el caso ideal, una velocidad constante [23, 70].

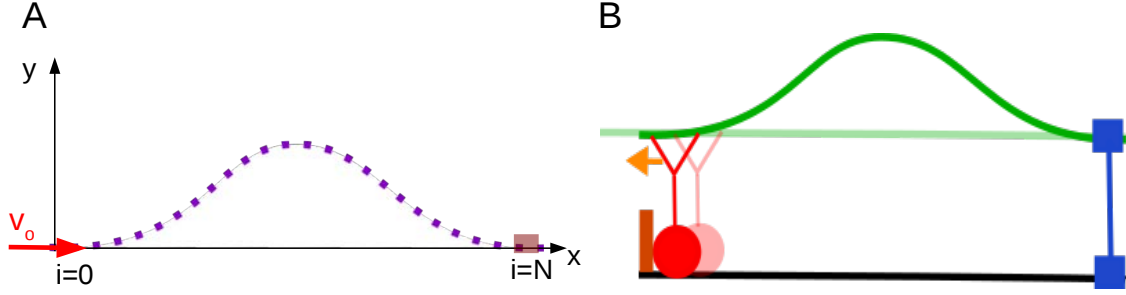


Figura 6.6: **Esquemas de las simulaciones de compresión a velocidad constante:** Filamento de longitud $L = 5 \mu\text{m}$; $F_c = 32\text{pN}$ con condiciones de borde empotrada en la dirección y para el extremo móvil y en el extremo fijo. (A) Esquema de la disposición de fuerzas y numeración de las cuentas sobre el filamento. (B) Fenómeno biológico representado: el filamento unido a un sustrato y un motor molecular intenta avanzar sobre el filamento con su movimiento limitado por una barrera externa. Los colores más claros representan la condición inicial y los más oscuros, un tiempo posterior.

Las condiciones de borde en este caso están dadas por:

$$\begin{cases} \dot{x}_i = v_0; & i = 0 \\ y_i = 0; & i = 0, 1, N-1, N \\ \dot{x}_i = 0; & i = N \\ \dot{y}_i = 0; & i = 0, 1, N-1, N \end{cases}$$

La figura 6.7 ilustra la evolución del filamento para casos con igual velocidad de compresión ($v_0 = 100 \text{ nm/s}$) y distintas amplitudes iniciales y la figura 6.8 muestra las evoluciones para filamentos con $A_0 = 0.1 \text{ nm}$ y distintas v_0 .

Este protocolo de simulación introduce un escenario interesante: si el microtúbulo se encuentra inicialmente relajado ($A_0 = 0.1 \text{ nm}$), el filamento explora formas ondulatorias transientes a medida que la compresión procede (figura 6.7). Esto no se observa en los casos de amplitud inicial mayor. En todos los casos la flexión del filamento progresa hasta que, eventualmente, el extremo móvil traspasa la posición del extremo fijo, enredándolo. No existe una forma estacionaria para ningún valor de $v_0 > 0$

Volviendo a la analogía biológica, la fuerza en el extremo móvil, que correspondería a la posición del motor molecular, presenta un crecimiento agudo para tiempos cortos asociados a bajos valores de la amplitud (figuras 6.7 y 6.8). El origen de esta

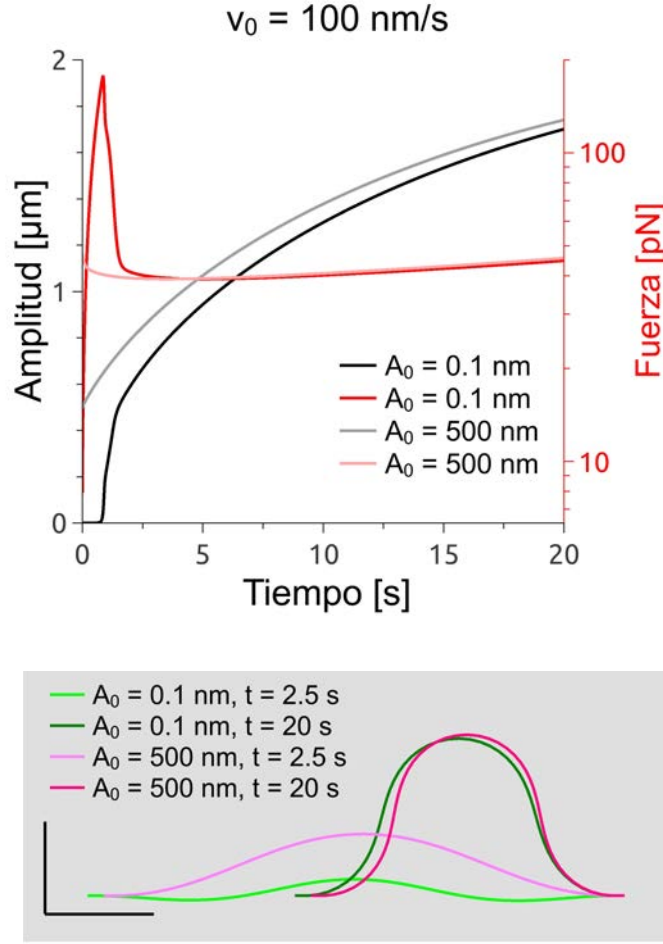


Figura 6.7: **Simulaciones de compresión a velocidad constante: efecto de la condición inicial.** Resultados obtenidos de las simulaciones para $v_0 = 100 \text{ nm/s}$ y distintas amplitudes iniciales. $L = 5 \mu\text{m}$; $F_c = 32 \text{ pN}$. Arriba: Evolución temporal de la amplitud y de la fuerza para filamentos con distintas amplitudes iniciales A_0 . Abajo: Formas de los filamentos recuperadas de la simulación obtenidas a dos tiempos representativos. En verde claro se muestra una forma ondulatoria transiente. Barras de escala = $1 \mu\text{m}$.

resistencia a la deformación puede ser atribuida a una compresión inicial cuasi-isoforme que almacena energía elástica. En la misma dirección y si el microtúbulo presenta una forma inicial flexionada, la fuerza de resistencia se reduce significativamente (figura 6.7). Cuando el filamento comienza a flexionarse la amplitud crece monótonamente y la fuerza relaja a valores menores, pero distintos de cero. Hallamos que para filamentos muy largos y/o velocidad bajas la amplitud presenta la siguiente dependencia funcional con el tiempo:

$$A(t) = A_0 t^{1/2} \quad (6.13)$$

El origen de esta dependencia está dada por una restricción geométrica ya que se puede probar que $A \propto \Delta^{1/2}$, donde $\Delta = L - L_x$.

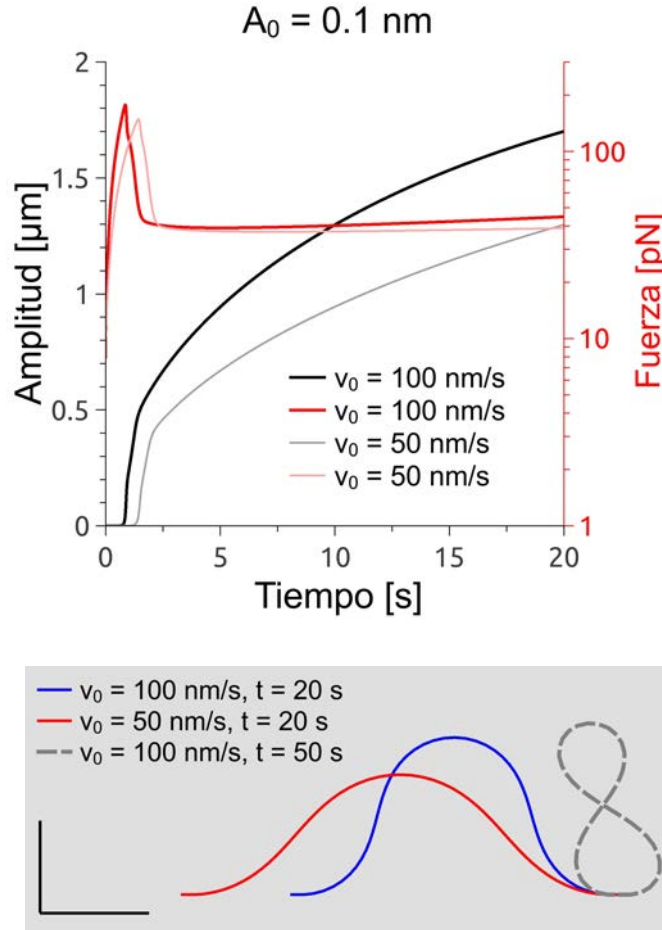


Figura 6.8: **Simulaciones de compresión a velocidad constante: efecto de la velocidad.** Resultados obtenidos de las simulaciones con para $A_0 = 0.1 \text{ nm}$ distintas velocidades de compresión. $L = 5 \mu\text{m}$; $F_c = 32 \text{ pN}$. Arriba: Evolución temporal de la amplitud y de la fuerza para filamentos con distintas velocidades de compresión. Abajo: Formas finales de los filamentos recuperadas de la simulación; se incluye una forma obtenida a tiempos largos de simulación para ilustrar la deformación del filamento. Barras de escala $= 1 \mu\text{m}$.

6.3.2. Fuerzas Transversales

No sólo las fuerzas de compresión son responsables de curvar un filamento dentro de la célula. Cuando una fuerza lateral F_l es aplicada sobre un filamento, éste es arrastrado y deformado en consecuencia. Para explorar este escenario, simulamos un filamento sometido a una fuerza perpendicular central, y cuyos extremos son libres de desplazarse en la dirección x (figura 6.9A). Para implementar estas simulaciones impusimos las siguientes condiciones:

$$\begin{cases} F = F_l \hat{y}; & i = N/2 \\ y_i = 0; & i = 0, 1, N-1, N \\ \dot{y}_i = 0; & i = 0, 1, N-1, N \end{cases}$$

La figura 6.9B esquematiza una situación típicamente observada en células vivas: cuando una carga transportada mediante motores moleculares a lo largo de un microtúbulo intercepta otro filamento, este último es empujado lateralmente.

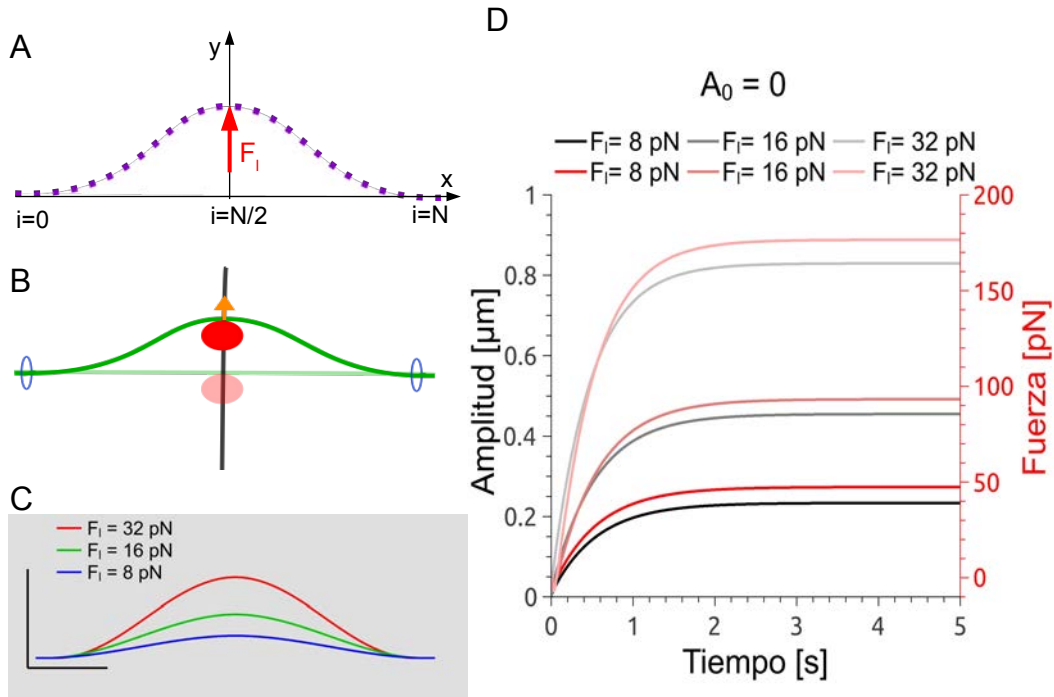


Figura 6.9: **Simulaciones de fuerza lateral:** Filamentos de longitud $L = 5 \mu\text{m}$ con condiciones de borde empotradas en la dirección $\hat{y}$ en ambos extremos, sometidos a fuerzas laterales (F_l) de distinta magnitud con $A_0 = 0$. (A) Esquema de la disposición de fuerzas y cuentas sobre el filamento. (B) Fenómeno biológico representado: una organela siendo transportada activamente a lo largo de un filamento se encuentra con un microtúbulo perpendicular a su movimiento, que actúa de barrera. Los colores más claros representan la condición inicial y los más oscuros un tiempo posterior. (C) Formas finales de los filamentos recuperadas de la simulación para distintas F_l . Barras de escala = $1 \mu\text{m}$ (D) Evolución temporal de la amplitud y de la fuerza en la dirección vertical en los extremos para las distintas fuerzas.

La figura 6.9C presenta las formas finales recuperadas de las simulaciones para distintas magnitudes de fuerzas aplicadas. Es importante destacar que en este caso no existe una cota inferior para la magnitud de fuerza aplicada para lograr la deformación del filamento. Tampoco se observa tiempo de latencia en la evolución inicial de la amplitud (figura 6.9D). Sin embargo, las amplitudes máximas de la deformación dependen del valor de la fuerza aplicada. Estudiamos la fuerza lateral en los extremos (figura 6.9D) puesto que ésta es la fuerza que se opone al desplazamiento del filamento y da una medida de la reacción a la fuerza aplicada. La figura muestra que la amplitud de la deformación final alcanzada y la fuerza en los extremos dependen de la fuerza aplicada. Los tiempos a los cuales se alcanza la forma de equilibrio

son similares en todos los casos presentados, a diferencia de lo observado en la figura 6.5.

En este caso, la amplitud crece como:

$$A(t) = A_{max} (1 - e^{-t/\tau_0}) \quad (6.14)$$

con τ_0 dado por la ec. 6.12. Debido a la ausencia de una fuerza crítica, la escala temporal del proceso no depende de la magnitud de la fuerza aplicada. Por el contrario, A_{max} varía linealmente con F_l :

$$A_{max} = \beta \frac{F_l L^3}{EI} \quad (6.15)$$

donde β depende de las condiciones de borde. Cuando la fuerza F_l es aplicada en el centro del filamento y ambos extremos están libres $\beta = 1/128$ y para ambos extremos empotrados $\beta = 1/192$ (Dr. A. Monastera, comunicación personal). Para un microtúbulo empotrado de $L = 5 \mu\text{m}$ y $F_l = 16 \text{ pN}$ la amplitud de *buckling* es aproximadamente $0.4 \mu\text{m}$ (figura 6.9D). En el caso de un filamento con extremos libres, la fuerza impone una traslación efectiva del filamento con una velocidad dada por [2]:

$$V_{drift} = \frac{F_l}{c L} \quad (6.16)$$

que es del orden de unos pocos nm/s para fuerzas en el rango 1-10 pN y filamentos de longitud 5-10 μm inmersos en un medio de viscosidad alta ($10^3 - 10^4$ veces la viscosidad del agua).

Por otra parte, si los extremos son incapaces de moverse en la dirección transversal, la amplitud de la deformación crece rápidamente en etapas tempranas y luego alcanza una meseta. Trazando una analogía biológica, podríamos decir que la fuerza del motor moviendo la carga que empuja al filamento se equilibra con la resistencia del microtúbulo a doblarse y a ser arrastrado.

6.3.3. Relajación del filamento

En cualquiera de los 3 casos considerados, si en algún momento la fuerza aplicada disminuye o desaparece, el filamento comenzará un proceso de relajación. En esta sección, estudiamos la dinámica de la relajación.

En la figura 6.10A mostramos las condiciones iniciales de las simulaciones. Partimos de un filamento ya deformado y en equilibrio con una fuerza F_0 . En $t = 0$, la fuerza toma un nuevo valor $F_f \in [0, F_0)$, donde F_0 es la fuerza que lo deformó. Formalmente, estas condiciones de borde se pueden escribir del siguiente modo:

$$\begin{cases} F = F_f \hat{x}; & i = 0 \\ y_i = 0; & i = 0, 1, N-1, N \\ \dot{x}_i = 0; & i = N \\ \dot{y}_i = 0; & i = 0, 1, N-1, N \end{cases}$$

La figura 6.10C muestra las evoluciones temporales de la amplitud y de la fuerza en el extremo móvil para distintos valores de F_f . Observamos que si $F_f < F_c$, el filamento relajará siempre a una forma de equilibrio de curvatura nula, mientras que si $F_f > F_c$ la amplitud final no es nula y depende de la magnitud de F_f . A partir de estos resultados, inferimos que cuando se libera la carga sobre un microtúbulo la forma relaja, alcanzando una nueva configuración de equilibrio dada por F_f , la carga residual.

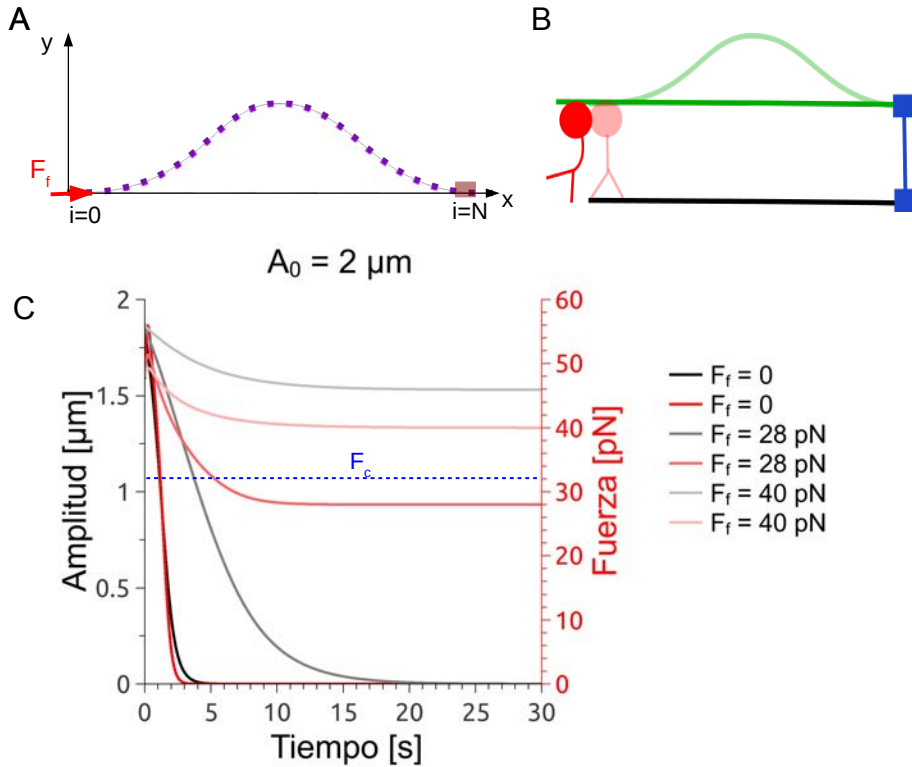


Figura 6.10: **Simulaciones de relajación de la forma:** Filamentos de longitud $L = 5 \mu\text{m}$ con condiciones de borde empotrada en la dirección y para el extremo móvil y el fijo ($F_c = 32 \text{ pN}$). (A) Esquemas de la disposición de fuerzas y cuentas sobre el filamento inmediatamente después de la liberación de la fuerza. (B) Fenómeno biológico representado: luego de verse sometido a la fuerza ejercida por un motor, el mismo se separa del filamento o sustrato y deja de ejercer fuerza. (C) Evolución temporal de la amplitud y la fuerza en el extremo móvil para un filamento con amplitud inicial $A_0 = 2 \mu\text{m}$ y fuerzas finales distintas.

Además, la amplitud decae exponencialmente con un tiempo característico dado por la ec. 6.11 con $F = F_f$. Si $F_f \approx F_c$, el tiempo de decaimiento diverge y el

filamento relajará su forma muy lentamente. Para longitudes en el rango $5\text{-}10\mu\text{m}$ y viscosidades típicas del entorno celular, los tiempos de relajación se encuentran entre $0.1\text{-}20\text{ s}$ [2].

6.3.4. Influencia de la longitud del filamento

No sólo las magnitudes y direcciones de las fuerzas externas aplicadas sobre un filamento definen las escalas temporales de los eventos de *buckling* y las deformaciones de los filamentos. La longitud del filamento tiene un efecto sobre F_c y τ_0 ; en este caso, la dependencia es explícita en las ecuaciones 1.7 y 6.12, respectivamente.

Decidimos estudiar la dependencia de la tasa de relajación, $1/\tau$, con la longitud del filamento. Comparamos simulaciones de filamentos de $L = 5$ y $7\mu\text{m}$, de acuerdo con longitudes típicas de segmentos de microtúbulos que experimentan eventos de *buckling* dentro de las células. En la figura 6.11 la fuerza crítica está dada por la intersección con $1/\tau = 0$. Tal como esperábamos, los valores de $1/\tau$ recuperados de las simulaciones, están de acuerdo con las dependencias presentadas por las ecs. 1.7 y 6.12: aumentar la longitud en un 40 % reduce la fuerza crítica a la mitad, aproximadamente. Los valores negativos indican la relajación de la forma, mientras que los valores positivos están asociados a aumentos exponenciales de la amplitud.

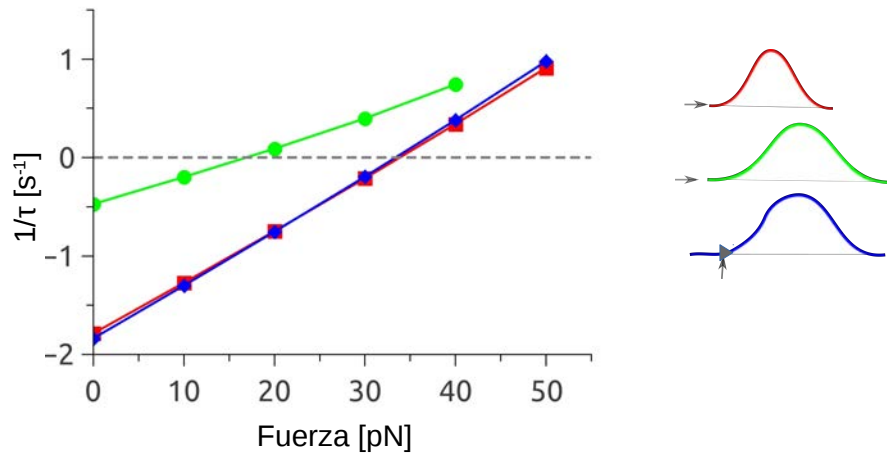


Figura 6.11: **Influencia de la longitud del filamento:** Gráfico de $1/\tau$ en función de la fuerza aplicada (F) para simulaciones de filamentos con condiciones de borde empotrada-empotrada variando su longitud y punto de aplicación de la fuerza. Los esquemas a la derecha ilustran cada condición. Se muestran resultados para las siguientes condiciones: Filamento de $L = 5\mu\text{m}$ con la fuerza aplicada en su extremo izquierdo. —■. Filamento de $L = 7\mu\text{m}$ con la fuerza aplicada en su extremo izquierdo. —●. Filamento de $L = 5\mu\text{m}$ con la fuerza aplicada a $2\mu\text{m}$ de su extremo izquierdo. —◆

Con el fin de explorar cómo el punto de aplicación de la fuerza influye en los resultados, realizamos una simulación de un filamento de $7\mu\text{m}$ de longitud total, con una fuerza de compresión aplicada a $2\mu\text{m}$ del extremo libre de moverse en x . Esto

resulta en una longitud efectiva de buckling de $5 \mu\text{m}$. En este caso, observamos que tanto la fuerza crítica como los tiempos característicos son prácticamente idénticos a los de un filamento de $5 \mu\text{m}$ de longitud deformándose en toda su extensión. Esto sugiere que la contribución de la región libre del filamento no es significativa.

6.3.5. Influencia de las condiciones de borde

Las condiciones de contorno también pueden tener un efecto importante sobre la dinámica y las formas de los microtúbulos [146]. Esta premisa se verifica en las ecuaciones 1.7 donde los coeficientes a y γ se relacionan con las condiciones de borde.

Por este motivo, decidimos explorar cómo se ve afectado el tiempo característico τ , dado por la ec. 6.11 por otras condiciones de borde distintas a las consideradas en las secciones anteriores.

Simulamos filamentos con ambos extremos articulados y una fuerza de compresión aplicada en un extremo o dos fuerzas iguales y opuestas en cada uno de los extremos. En todos los casos, los extremos en donde se aplica la fuerza son libres de moverse en la dirección horizontal.

La figura 6.12 muestra la dependencia de la tasa de relajación ($1/\tau$) con la fuerza tangencial aplicada en cada caso. Observamos que los casos que comparten la condición de contorno articulada tienen la misma fuerza crítica $F_c = 8 \text{ pN}$, dada por la intersección con $1/\tau = 0$, pero evolucionan con distintas velocidades, siendo el caso con las fuerzas simétricas el más lento. Por otra parte, el caso con ambos extremos empotrados, presenta una fuerza crítica mayor: $F_c = 32 \text{ pN}$. Los valores de fuerza crítica recuperados corresponden con la ec. 1.7 con $a = \pi^2$ para los casos con extremos articulados y $a = 4\pi^2$ para el caso con extremos empotrados.

Las simulaciones numéricas también reproducen el comportamiento de τ dado por la ec. 6.11. En suma, los valores de τ_0 recuperados, que corresponden al caso en el que la fuerza aplicada es nula, también están de acuerdo con los definidos por la ec. 6.12 con $\gamma = 0,2$ para el caso con ambos extremos empotrados, $\gamma = 1/\pi$ para el caso con extremos articulados y una fuerza aplicada en un extremo y $\gamma = 2/3\pi$ para el caso con extremos articulados y fuerzas simétricas (Dr. A. Monastra, comunicación personal).

En todos los casos estudiados en esta sección y la anterior, el tiempo característico diverge ($1/\tau \Rightarrow 0$) cuando la fuerza aplicada tiende a la fuerza crítica. Esto genera una evolución tan lenta que, a los tiempos estudiados, el microtúbulo parece estacionario.

Las simulaciones numéricas realizadas hasta aquí proveen una mirada amplia sobre la evolución de los eventos de deformación impulsados por diversos mecanismos de fuerza. Hallamos que filamentos semi-flexibles presentan distintos comportamien-

tos bajo la acción de fuerzas aplicadas en diferentes configuraciones. Otra observación interesante, es que, para los casos de compresión, la condición inicial tiene un efecto apreciable en la evolución de la amplitud a tiempos cortos (figuras 6.4 y 6.7).

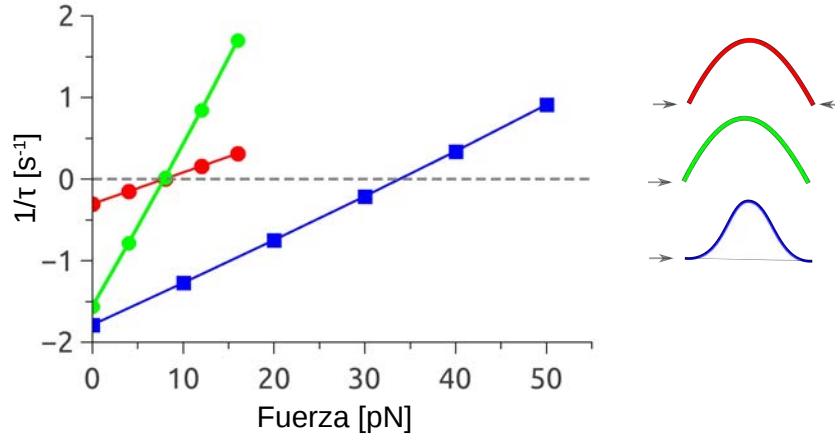


Figura 6.12: **Influencia de las condiciones de contorno:** Gráfico de $1/\tau$ en función de la fuerza aplicada para simulaciones de filamentos de $L = 5\mu\text{m}$ bajo compresión con distintas condiciones de borde. Los esquemas a la derecha ilustran cada condición. Se muestran resultados para las siguientes condiciones: Extremos en condición pivot-pivot con fuerzas simétricas de módulo $F/2$ aplicadas en ambos extremos, libres de moverse en x — ●. Extremos en condición pivot-pivot con una fuerza de módulo F aplicada en un extremo libres de moverse en x , mientras que el otro permanece fijo — ●. Extremos en condición empotrada-empotrada con una fuerza de módulo F aplicada en un extremo libres de moverse en x , mientras que el otro permanece fijo — ■

El siguiente paso en este trabajo es observar y caracterizar eventos de *buckling* en células vivas.

6.4. Conclusiones

Los microtúbulos en células vivas presentan eventos de flexión transitorios, de tamaños de algunos micrómetros, que son conocidos como *buckling*. Con el fin de comprender su formación dentro de las células y los posibles procesos activos involucrados, estudiamos estos eventos en forma teórica, utilizando un modelo numérico de los filamentos, basado en un modelo de cadena discreta (*worm-like chain model*).

El análisis de la evolución de la forma de los filamentos obtenida mediante las simulaciones numéricas nos permitió comprender en mayor profundidad los eventos que podrían producir el *buckling* de los microtúbulos en las células. En primer lugar, hallamos que la amplitud de *buckling* a tiempos cortos crece exponencialmente para filamentos con deformaciones iniciales pequeñas (figuras 6.4), de acuerdo con las

teorías de inestabilidad de *buckling* [2]. Por otra parte, observamos que la amplitud crece hasta una plateau cuando se aplica una fuerza de compresión constante o una fuerza lateral, mientras que el empuje con $v = cte$ no alcanza nunca una forma de equilibrio.

El modelo numérico también fue utilizado para analizar eventos de relajación, al eliminarse (o disminuir) la fuerza luego de una deformación. Por último, a partir del estudio del tiempo característico τ corroboramos que tanto la evolución temporal de la forma como la fuerza crítica dependen sensiblemente de L y de las condiciones de borde.

El estudio presentado en este capítulo aporta una idea más clara de las características y fenomenología de los eventos de *buckling* de filamentos en un medio con una viscosidad similar a la del citoplasma. Esto nos permite embarcarnos en un estudio experimental del *buckling* de microtúbulos en células vivas.

Capítulo 7

Buckling de microtúbulos en células vivas

El estudio numérico presentado en el capítulo anterior nos permitió evaluar la respuesta teórica de un filamento a distintas fuerzas en distintos escenarios. Para completar el estudio de la deformación y producción de fuerzas de los microtúbulos nos propusimos realizar experimentos biológicos para contrastar con los resultados de las simulaciones. De esta forma pretendemos enriquecer nuestra comprensión de los mecanismos por los cuales estos filamentos del citoesqueleto sensan, transmiten y responden a las fuerzas a las que se ven sometidos dentro de las células.

En este capítulo presentaremos resultados obtenidos a partir de experimentos en células vivas. A partir de películas confocales de células melanóforas marcadas con EGFP-XTP realizamos el *tracking* de microtúbulos flexionándose y pudimos caracterizar estos eventos espacial y temporalmente.

Por último, observamos simultáneamente la red de microtúbulos y endosomas fluorescentes que se encuentran transportados activamente. Esto nos permitió observar la acción de fuerzas locales sobre los filamentos en simultáneo con su deformación de forma mínimamente invasiva.

Parte de los experimentos presentados en este capítulo fueron realizados con la colaboración de la Dra. Diana Wetzler.

7.1. Eventos de *buckling* en células melanóforas de *X. laevis*

Adquirimos series temporales de imágenes confocales de células melanóforas de *X. laevis* expresando EGFP-XTP, con un tiempo entre cuadros de las películas se mantuvo en el rango 200-900 ms.

Al observar dichas películas notamos frecuentes eventos espontáneos de *buckling*.

Vale aclarar que no es posible predecir dónde ni cuándo ocurrirán estos eventos. Sin embargo, al tomar imágenes de una célula entera durante algunos minutos, es posible observar entre 1 y 15 eventos.

A modo de ejemplo, la figura 7.1A muestra una imagen representativa de la red de microtúbulos, donde se indican eventos de *buckling* localizados. La figura 7.1B captura 5 fotos de la serie que muestran la evolución del evento que ocurre en la región recuadrada.

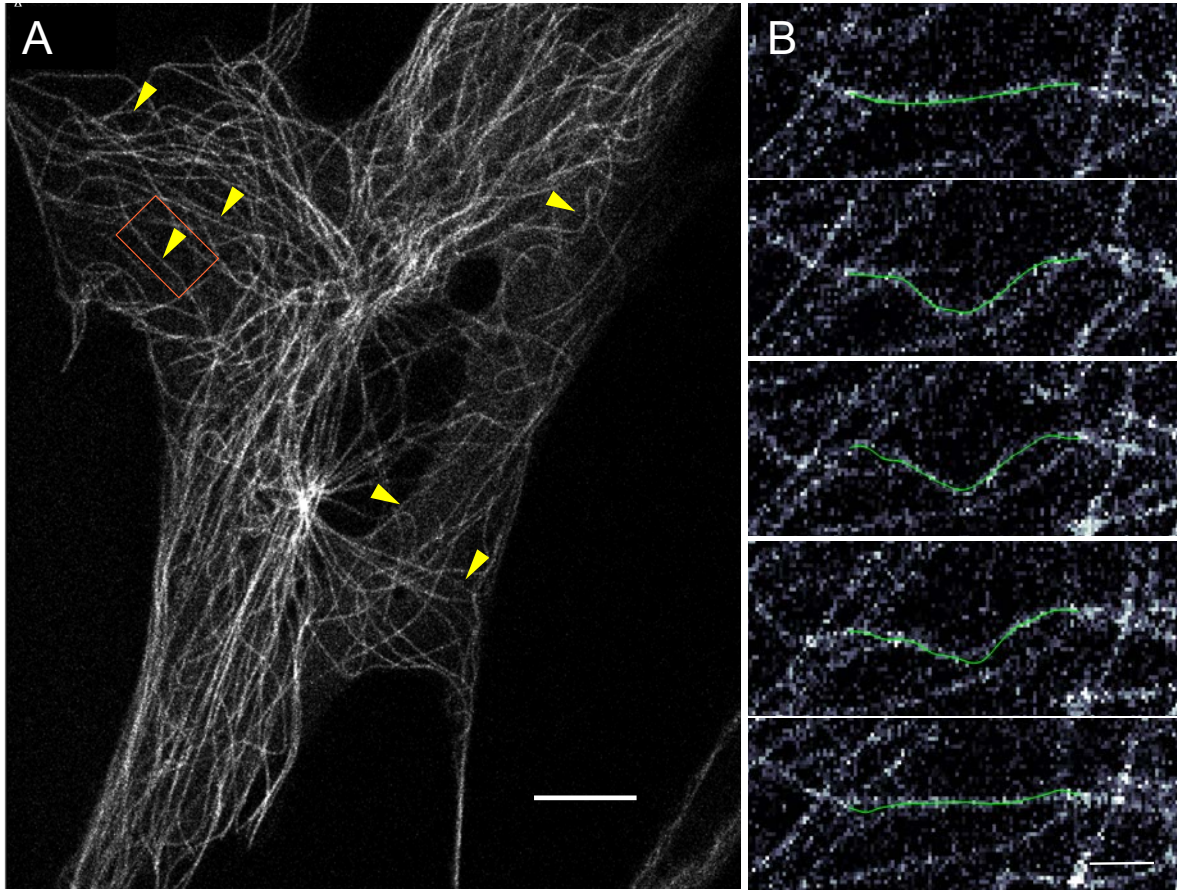


Figura 7.1: **Eventos de *buckling* en células melanóforas de *X. laevis*:** Se tomó una película confocal de una célula marcada con EGFP-XTP. (A) Imagen del primer cuadro de una película. Se marcaron con puntas de flechas los filamentos que presentan eventos de buckling localizados que pueden ser estudiados. Barra de escala = $10\mu\text{m}$. (B) Evolución temporal del filamento señalado en el recuadro del panel A. Se superpone a la imagen del microtúbulo las coordenadas recuperadas con AFTER. Los cuadros corresponden a $t = 0, 18, 53, 71$ y 89 segundos, respectivamente. Barra de escala = $1\mu\text{m}$.

Una vez recuperadas las posiciones (x, y) de los segmentos de interés se les aplica una transformación de rotación y traslación para que ambos extremos se encuentren sobre el eje x , de modo que la coordenada y en cada punto represente la amplitud

en esa posición. Definimos la amplitud de *buckling* en cada cuadro como el máximo valor de las amplitudes verticales en valor absoluto: $A = \max\{|y|\}$.

La evolución temporal de A permite definir un evento de *buckling*: cuando la misma crece abrupta y persistentemente el filamento se está flexionando. Similarmente, cuando la amplitud decrece en el tiempo definimos el período de relajación. En general, buscamos eventos completos caracterizados por la deformación y posterior relajación. Sin embargo, también analizamos casos en donde sólo se pudo detectar uno de los dos tramos de la evolución, como veremos más adelante.

Los filamentos suelen presentar amplitudes basales no nulas, por lo que consideramos cauto sólo considerar como eventos de *buckling* aquellos en los que la amplitud variaba al menos 200 nm respecto de la basal.

7.2. Caracterización espacial de eventos de *buckling*

Para cuantificar la escala espacial de los eventos, ajustamos la forma del filamento en el cuadro de máxima deformación (por ejemplo, el correspondiente al tercer cuadro de la figura 7.1B) a una función gaussiana (figura 7.2A-B). La elección de la función gaussiana fue arbitraria, sin embargo, se obtuvieron resultados similares utilizando una función coseno (no se muestran). Asociamos la amplitud de la interpolación al tamaño del *buckling* (A_{max}) y definimos la longitud característica de buckling como $L_c = 2\sigma$, donde σ es la desviación estándar.

Calculamos valores medios de estas propiedades para 77 eventos y obtuvimos $\langle L_c \rangle = (3.0 \pm 0.3)\mu\text{m}$ y $\langle A_{max} \rangle = (1.3 \pm 0.08)\mu\text{m}$ (promedio $\pm$ error estándar). Las distribuciones correspondientes se muestran en la figura 7.2C-D. Tamaños similares fueron reportados para microtúbulos en otros sistemas, tales como miocitos cardíacos de rata, células Cos7 [91] y conos de crecimiento neuronales [90].

Nos preguntamos qué factores podrían estar gobernando la longitud característica de estos eventos. Para un filamento libre se espera $L_c \propto L$, pero esta no es la condición hallada dentro de las células ya que los filamentos se encuentran inmersos en un medio viscoelástico e interactúan con otros componentes celulares, incluyendo otros filamentos. Algunos autores sugieren que L_c depende de la relación entre la rigidez flexural de los filamentos y la constante elástica del medio [91]. Otros trabajos relacionan estas escalas espaciales con componentes del citoesqueleto actuando como puntos de estacamiento [23]. Tampoco se pueden descartar otro tipo de obstáculos físicos, tales como organelas limitando el movimiento de los microtúbulos.

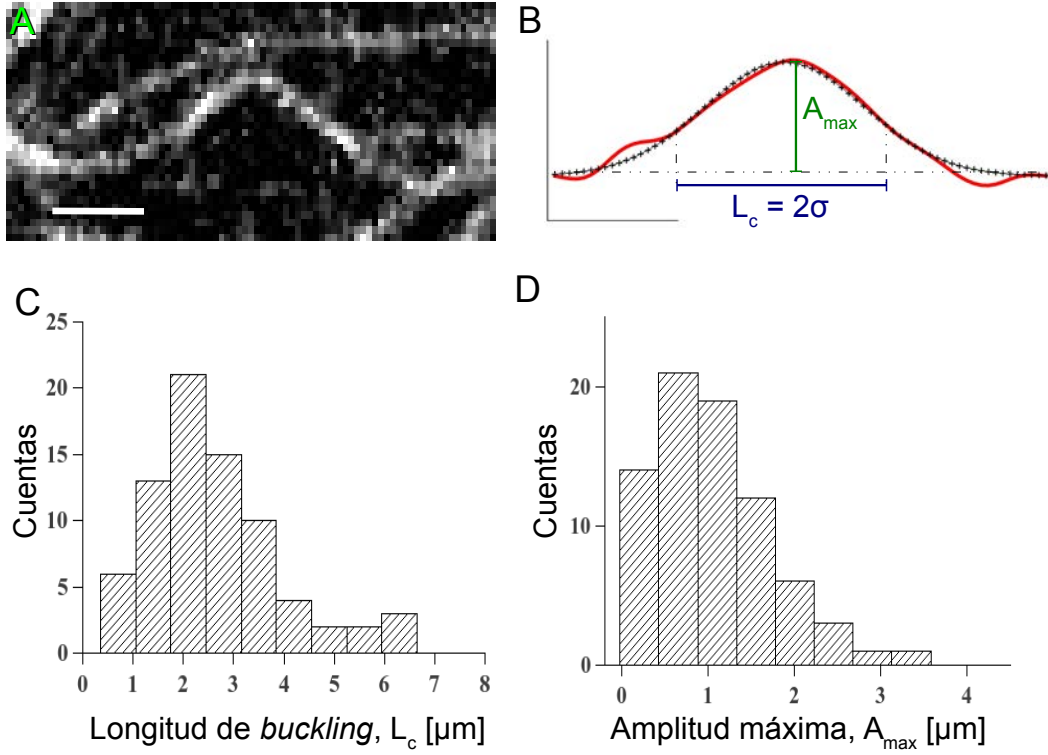


Figura 7.2: **Caracterización espacial de los eventos de buckling en células vivas:** (A) Imagen de un segmento de microtúbulo durante un evento de *buckling*, se muestra el cuadro de su máxima deformación. (B) Coordenadas recuperadas de la imagen mostrada en (A) (–) y el ajuste gaussiano realizado a esas coordenadas (+). (C-D) Histogramas de longitudes características (C) y amplitudes máximas (D) recuperadas a partir de ajustes como el ilustrado en (B), para $N = 77$ eventos. Barras de escala: $1 \mu\text{m}$

7.3. Fuerzas activas dentro de la célula

Con el fin de estudiar la naturaleza de las fuerzas subyacentes a estos eventos, tratamos las células con azida sódica (NaN_3), una droga que afecta los mecanismos de producción de ATP de la célula y, por ende, elimina la fuente de energía. Registramos el comportamiento de la red de microtúbulos tanto en células tratadas como en células control. Las células desprovistas de ATP no registraron eventos de *buckling*, lo cual refuerza resultados anteriores [34, 35] que reportan que las fuerzas que originan estos eventos rápidos de deformación son no-térmicas.

Para estudiar si las fuerzas de polimerización son responsables de los eventos de *buckling*, realizamos experimentos en los cuales inhibimos este proceso. Para esto, estudiamos la red de microtúbulos en células tratadas con vinblastina que, como mencionamos en el Capítulo 4, inhibe la polimerización y depolimerización de microtúbulos [103].

La figura 7.3 muestra la frecuencia de eventos de buckling en células control y tratadas con vinblastina. En estas últimas, los eventos de *buckling* tienen una frecuencia de 3.1 ± 1 eventos/min, que es indistinguible de la frecuencia observada

en células control: 3.4 ± 0.7 eventos/min. Este resultado sugiere que las fuerzas de polimerización de microtúbulos no contribuyen significativamente al *buckling* de los filamentos, en la misma dirección que lo reportado en estudios previos [34]. Este resultado nos lleva a postular que estos eventos son producidos, en su mayoría, por fuerzas generadas por motores moleculares.

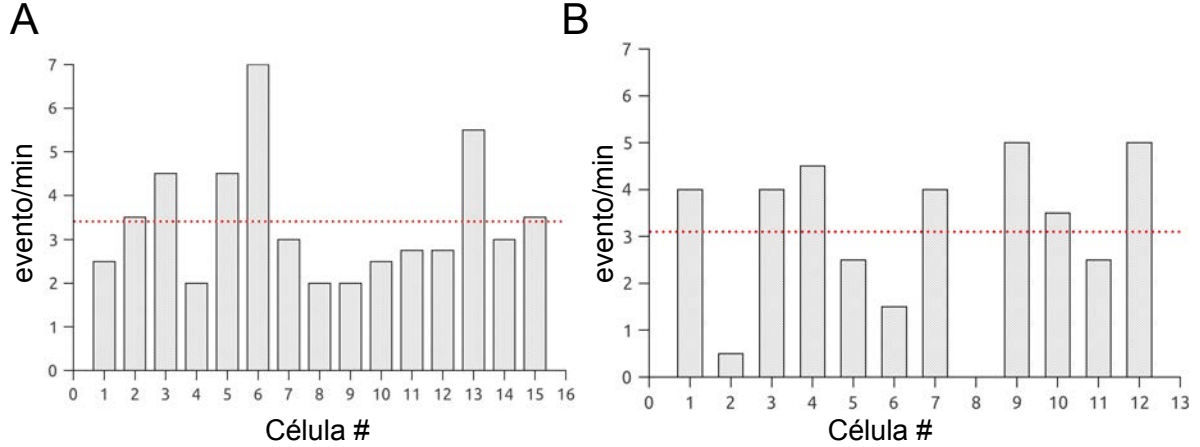


Figura 7.3: **Efecto de las fuerzas de polimerización en la incidencia de eventos de *buckling***: Número de eventos registrados en (A) células control (N = 15 células) y (B) células tratadas con vinblastina 10 nM (N = 12 células). Las líneas punteadas indican el promedio en cada caso.

7.3.1. Influencia de las fuerzas de polimerización y depolimerización en las características espaciales de los eventos de *buckling*

En la sección anterior describimos que la frecuencia de eventos de *buckling* no varía al inhibir la polimerización/depolimerización de microtúbulos. Sin embargo, nos preguntamos si sus propiedades (i.e. L_c y A_{max}) dependen de dichos procesos.

En particular, en el capítulo 4 reportamos una disminución de la lp^* de los microtúbulos al tratar las células con vinblastina. Esto implica un cambio en la rigidez flexural aparente de los filamentos, lo cual podría resultar en una modificación en las características de su deformación.

Con el fin de explorar esta posibilidad, estudiamos eventos de *buckling* en células en las que estos procesos se encuentran inhibidos y realizamos una caracterización espacial de los mismos.

La figura 7.4 muestra que la longitud característica promedio obtenida en células tratadas con vinblastina ($\langle L_c \rangle = (4.4 \pm 0.1)\mu\text{m}$) fue significativamente mayor

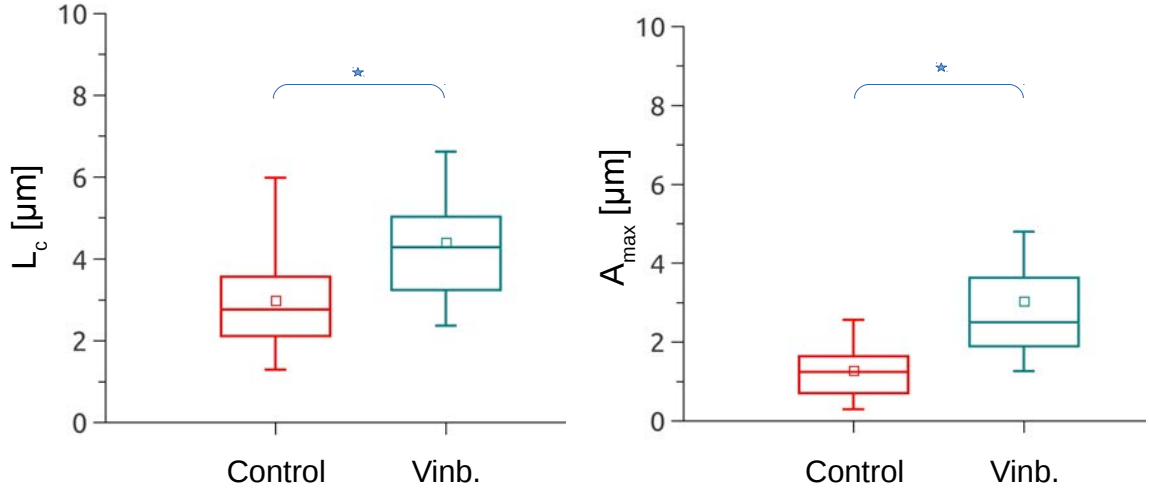


Figura 7.4: **Efecto de las fuerzas de polimerización en las características espaciales de los eventos de *buckling***: Comparación entre células control y tratadas con vinblastina. Las muestras fueron comparadas con un test de est de kolmogorov smirnov dos muestras [147], diferencia significativa ($P < 0.05$) (★).

que la obtenida para células control. La amplitud máxima de *buckling* también resultó significativamente mayor luego de inhibir la plolimerización/depolimerización ($\langle A_{\text{max}} \rangle = (3,4 \pm 0,4)\mu\text{m}$). Por otro lado, en el capítulo anterior mostramos que la amplitud de *buckling* aumenta con la magnitud de la fuerza aplicada (figura 6.5). Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis planteada en el capítulo 4 que plantea que la depolimerización sería un mecanismo liberador de la compresión de un microtúbulo; al inhibir este proceso, los filamentos estarían sometidos a compresiones mayores.

7.4. Evolución temporal de los eventos de *buckling*

Para analizar la evolución temporal de estos eventos, recuperamos las coordenadas de los segmentos de microtúbulos involucrados en cada cuadro de película, tales como la ilustrada en la figura 7.1, y determinamos la amplitud en función del tiempo.

A partir de estos gráficos identificamos tres etapas, esquematizadas en la figura 7.5: crecimiento, equilibrio y relajación. Las mismas se encuentran delimitadas por los instantes que definimos como tiempo inicial (t_i), tiempo de equilibrio (t_{eq}) y tiempo final (t_f). Definimos el tiempo inicial de *buckling* como el correspondiente

al primer dato a partir del cual la amplitud presentaba un crecimiento sostenido. Llamamos tiempo de equilibrio al instante en el cual la amplitud deja de aumentar, o bien para comenzar el proceso de relajación o para estabilizarse en una forma curvada durante un tiempo. Por último, el tiempo final corresponde al fin de la relajación, luego de decrecer la amplitud hasta estabilizarse en una forma de curvatura menor que puede o no corresponderse con la que tenía el filamento antes de comenzar todo el proceso.

Una vez definidos estos tiempos característicos, definimos los períodos de tiempo de crecimiento ($\Delta t_{\text{crecimiento}}$) y tiempo de relajación ($\Delta t_{\text{relajacion}}$) como los lapsos entre el tiempo inicial y de equilibrio y entre el tiempo de equilibrio y final, respectivamente.

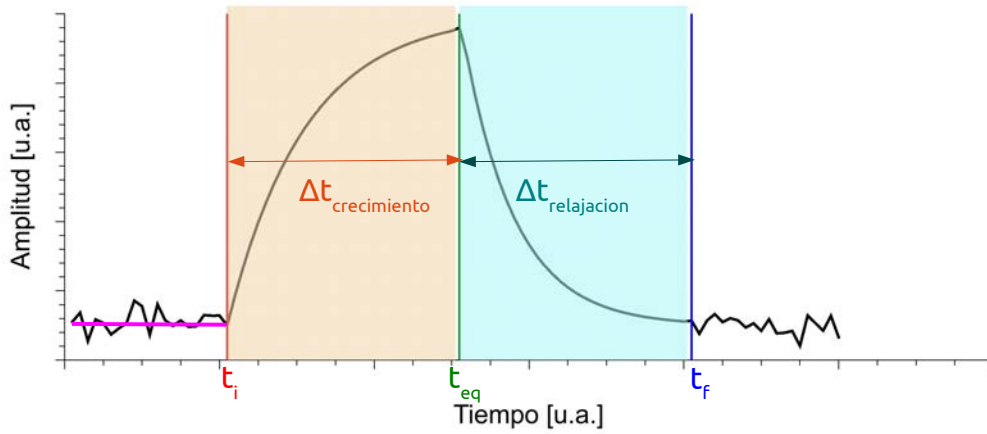


Figura 7.5: **Identificación de un evento de *buckling***: Esquema representativo de la evolución de la amplitud de un evento de *buckling* donde se han marcado los tiempos inicial (t_i), de equilibrio (t_{eq}) y final (t_f); la duración de la deformación ($\Delta t_{\text{crecimiento}}$) y de la relajación ($\Delta t_{\text{relajacion}}$). La línea magenta muestra la amplitud basal promedio (—)

La figura 7.6A muestra la evolución temporal de la amplitud para un evento representativo, donde pueden distinguirse las etapas descriptas. Podemos distinguir un tiempo anterior al evento durante el cual la amplitud fluctúa alrededor de un valor al que llamamos amplitud basal (A_0) y se relaciona con la curvatura previa o intrínseca del segmento analizado.

El análisis de $N = 72$ eventos mostró que la amplitud basal (A_0) era significativa en muchos de los casos (figura 7.6B) y abarcaba valores entre 1-80 % de la máxima amplitud del correspondiente evento. Como mencionamos anteriormente, los microtúbulos raramente se encuentran totalmente rectos dentro de las células y presentan, en general, curvaturas inferiores a $2\mu\text{m}^{-1}$ (figura 4.8). Estas curvaturas corresponden a deformaciones cuyas amplitudes presentan un valor medio de $\langle A_0 \rangle = (0.45 \pm 0.07)\mu\text{m}$, para segmentos de longitud $8\mu\text{m}$, similares a los presentados en la figura 7.6B. La curvatura previa facilita la flexión del filamento ya que se requiere

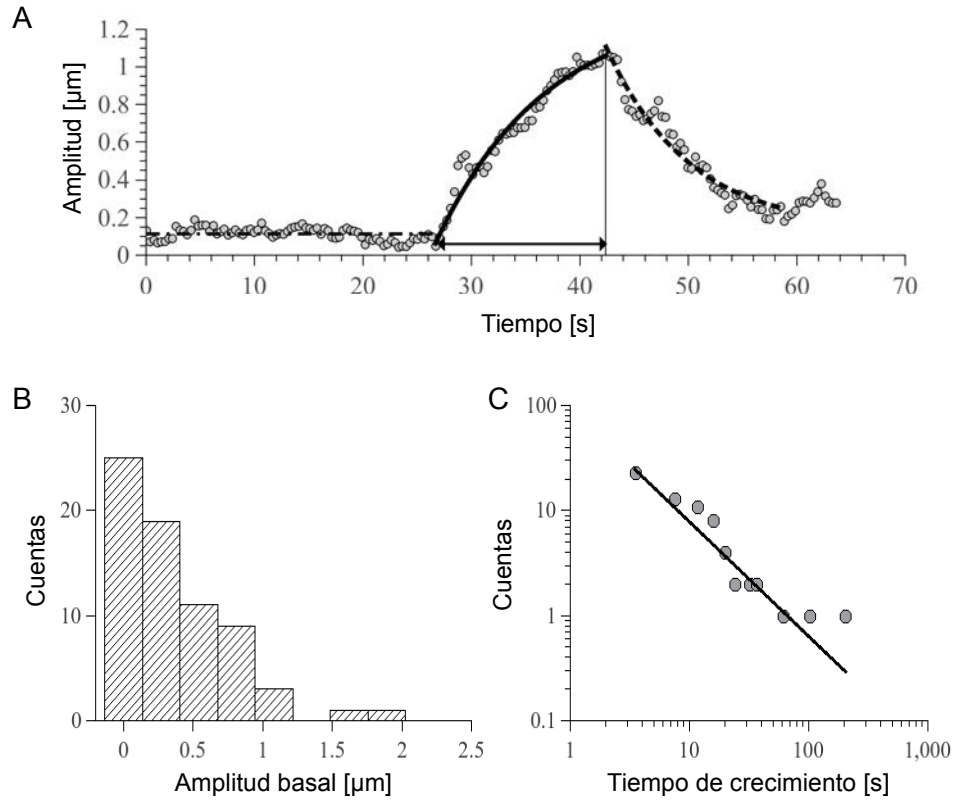


Figura 7.6: **Análisis de la evolución de los eventos de *buckling*:** (A) Evolución temporal de la amplitud para un evento completo de *buckling* medido. Se superponen a los datos experimentales los ajustes a la ec. 7.1 realizados en la etapa de crecimiento (—) y de la ec. 7.2 para la relajación (- -). La flecha indica el tiempo de crecimiento y la (— .) la A_0 . (B) Histograma de la amplitud basal de los filamentos antes de comenzar a deformarse. (C) Ajuste a una ley de potencias (—) del histograma (●) de los tiempos de crecimiento. Exponente obtenido $\alpha = (-1,01 \pm 0,05)$.

poca fuerza extra para continuar la deformación [2, 90], como vimos también en las simulaciones (figuras 6.4 y 6.7).

Por otra parte, a diferencia de lo observado respecto a la localización espacial de los eventos de *buckling*, hallamos que la duración de estos eventos, $\Delta t_{\text{crecimiento}}$, se extiende dos órdenes de magnitud: entre 1-200 segundos (figura 7.6C). Pudimos ajustar su distribución a una ley de potencias, con exponente $\alpha = -1$, indicando que no es posible definir un factor de escala para determinar una duración característica [148].

A continuación, estudiaremos en detalle las etapas de crecimiento y relajación.

7.4.1. Crecimiento

Teniendo en cuenta la forma de $A(t)$ consideramos el siguiente *ansatz* para ajustar las etapas de crecimiento [2]:

$$A(t) = A_{eq} + [A_0 - A_{eq}] e^{-(t-t_i)/\tau} \quad (7.1)$$

donde A_0 y A_{eq} son las amplitudes basal y máxima, respectivamente, t_i es el tiempo inicial del *buckling* y τ es el tiempo característico dado por la ec. 6.11.

Analizamos un total de 72 eventos de crecimiento y encontramos que el 55,6 % (40/72) de los datos ajustaron correctamente a la expresión dada por la ec. 7.1. Sin embargo, el 12,5 % (9/72) de los datos ajusta mejor a un crecimiento con exponente positivo dado por la ec. 6.10. El restante 32 % (23/72) de los datos no ajustaron correctamente a ninguno de los modelos propuestos, pese a que presentaban un crecimiento de la amplitud.

La figura 7.7 muestra un ejemplo experimental de cada caso con su ajuste respectivo, mostrando también el *tracking* del microtúbulo a distintos tiempos donde se ve el cambio de la forma completa del filamento en el tiempo de crecimiento.

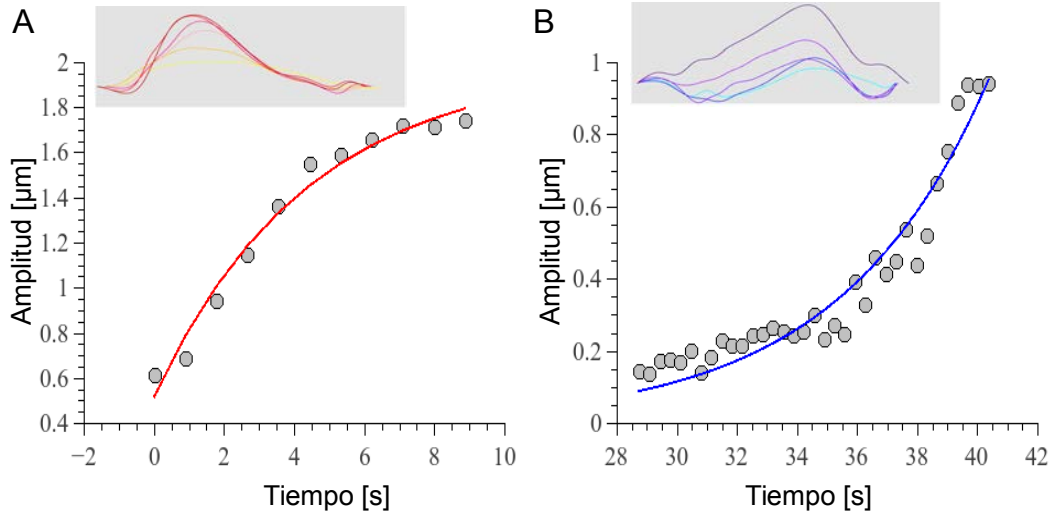


Figura 7.7: **Ajustes de la evolución de la amplitud de *buckling*:** Ejemplos representativos de eventos de crecimiento ajustados con la ec. 7.1 (A) o con la ec. 6.10 (B). En ambos casos los círculos representan los datos experimentales y las líneas sólidas los ajustes. Los paneles internos muestran la evolución temporal de la forma, presentando las posiciones recuperadas de los filamentos partiendo de t_i con $dt = 1.8$ s (A) y 2.1 s (B).

En las simulaciones numéricas realizadas en el capítulo anterior observamos que la evolución de la amplitud al iniciar el *buckling* depende A_0 (figuras 6.4 y 6.7). En particular, mostramos que si A_0 es chica, la amplitud presenta un período de latencia y luego se dispara exponencialmente. Estos resultados sugieren que las diferencias mostradas en la figura 7.7 podrían estar relacionadas con la amplitud basal de los

filamentos. Para evaluar esta hipótesis, analizamos las amplitudes basales obtenidas para los 9 filamentos que ajustaron a un crecimiento exponencial (ec. 6.10) y hallamos que se encuentran en el rango 60-360nm, menor a $\langle A_0 \rangle$. Con el fin de determinar si estas pequeñas amplitudes iniciales podrían haber sido casuales, utilizamos un procedimiento de *bootstrapping* (descrito en el capítulo 2) para computar la probabilidad de obtener valores de $A_i \leq 360\text{nm}$ al elegir 9 eventos al azar de la distribución dada en la figura 7.6C. La probabilidad hallada a partir de esta prueba fue pequeña, $< 3\%$, lo cual sugiere que hay una relación entre el comportamiento exponencial de estos eventos y sus amplitudes iniciales pequeñas.

7.4.2. Relajación

Después de alcanzar la máxima amplitud, los microtúbulos suelen relajarse hasta presentar una forma cuasi-estacionaria. Podemos interpretar esta relajación como una liberación de la carga. Ajustamos la dependencia temporal de la amplitud durante el período de relajación ($\Delta t_{relajacion}$) a un decaimiento exponencial dado por la siguiente expresión:

$$A(t) = A_f + [A_{eq} - A_f] e^{-(t-t_{eq})/\tau} \quad (7.2)$$

donde A_{eq} y A_f son las amplitudes máxima y luego de relajar, respectivamente y t_{eq} es el momento de máxima amplitud (figura 7.8).

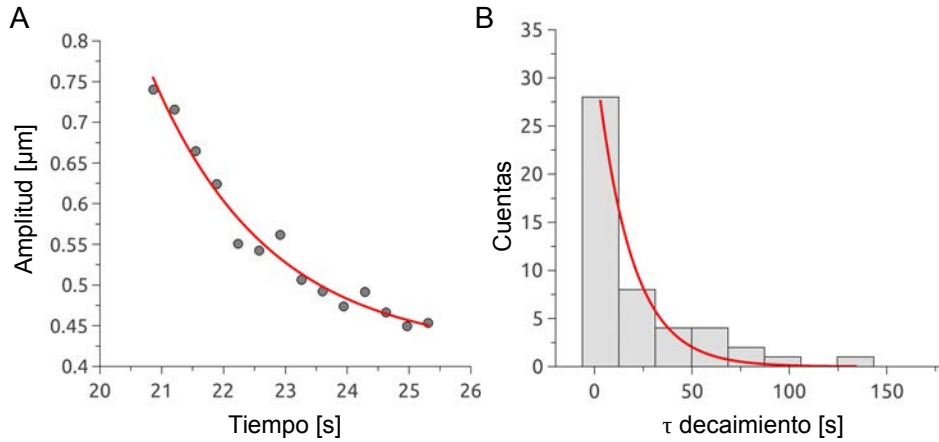


Figura 7.8: **Relajación de los eventos de *buckling***: (A) Ejemplo representativo de un evento de relajación (círculos) con su ajuste de la ec. 7.2 (línea continua) (B) Histograma de los tiempos característicos de decaimiento obtenidos. La línea continua representa el ajuste de una función de decaimiento exponencial.

Obtuvimos una distribución exponencial de τ , con tiempos característicos de decaimiento medios de (18 ± 3) s. Estos valores son consistentes con los obtenidos

para la relajación libre de microtúbulos de longitudes entre 5-15 μm , en un medio con una viscosidad 5000 veces la del agua (0.64-44 s) [2].

Por otra parte, la distribución de amplitudes estacionarias de los filamentos al finalizar el *buckling* no fue significativamente diferente a la distribución de amplitudes basales, según se desprende del test de Kolmogorov-Smirnov. Este resultado sugiere que los microtúbulos dentro de las células se encuentran intrínsecamente curvados.

7.5. *Tracking* simultáneo de endosomas transportados activamente y microtúbulos

En los experimentos en células vivas presentados hasta aquí es difícil, sino imposible, determinar qué fuerzas están actuando sobre los microtúbulos. Por lo tanto, escogimos un diseño experimental que nos permita observar la respuesta del microtúbulo a la acción de fuerzas locales en su entorno fisiológico.

Para esto, utilizamos FM4-64, una sonda fluorescente que se intercala en la membrana y genera endosomas fluorescentes rojos (ver capítulo 2). Los endosomas son transportados mediante mecanismos activos dentro de la célula y en su recorrido pueden encontrarse con filamentos del citoesqueleto. Registramos en simultáneo el transporte de los endosomas marcados con FM4-64 y eventos de deformación de los microtúbulos, en células expresando EFGP-XTP.

Este método experimental permite distinguir el punto de acción, la dirección y sentido de la fuerza que deforma un microtúbulo, pero no permite cuantificar su magnitud. La figura 7.9 muestra una imagen en dos colores de una célula entera con la red de microtúbulos marcada en verde y los endosomas en rojo.

Nuevamente, como mencionamos en la sección 7.1, no es posible predecir cuándo o dónde podremos observar un evento de *buckling* asociado a uno de transporte. Debido a la resolución espacio-temporal necesaria para analizar estos datos, nos vimos limitados a registrar pequeñas regiones dentro de la célula, lo cual reduce la probabilidad de capturar eventos. Sin embargo, pudimos apreciar eventos claros y prácticamente ideales en situaciones privilegiadas, tal como la representada en la figura 7.10. Allí podemos observar un endosoma (indicado por una flecha amarilla) moviéndose de manera procesiva a lo largo del microtúbulo vertical (primario). En un punto de su camino, el endosoma intersecta con el microtúbulo horizontal (secundario) y tras deformarlo, se detiene. En ese momento observamos la deformación del filamento principal. De 170 películas pudimos identificar 45 eventos que vinculaban directamente el *buckling* de un microtúbulo con el transporte del endosoma.

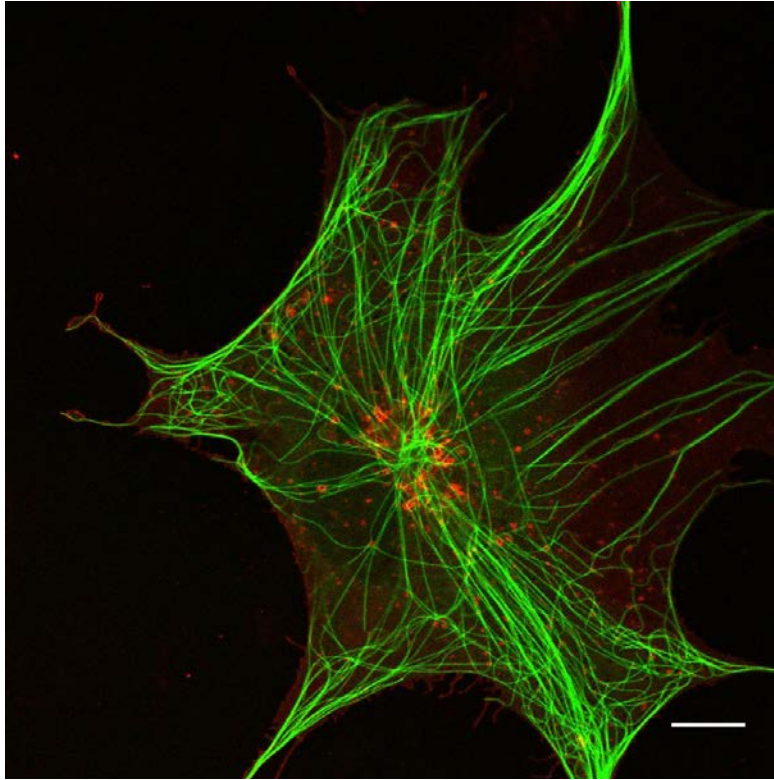


Figura 7.9: **Registro simultáneo de endosomas y microtúbulos:** Imagen representativa de una célula melanófora de *X. laevis* con la red de microtúbulos marcada con EGFP-XTP (verde) en superposición con endosomas fluorescentes marcados con de FM4-64 (rojo). Barra de escala: 10 μm

Con el fin de obtener una mirada más amplia sobre el proceso, generamos una matriz de intensidad (*kymograph*) que muestra la fluorescencia en cada cuadro sobre las coordenadas del filamento principal (figura 7.11A). En este ejemplo en particular, el canal verde muestra regiones de alta intensidad, correspondientes a la intersección con el filamento secundario (punta de flecha en la figura 7.10A). Superpusimos la intensidad registrada en el canal rojo, que corresponde al endosoma moviéndose sobre el microtúbulo primario. Se puede observar claramente que el microtúbulo secundario se deforma cuando el endosoma lo alcanza (similar a la condición presentada en la figura 6.9). La figura 7.10 también exhibe un *buckling* del filamento principal mientras el endosoma está en contacto con el secundario.

En pos de correlacionar estos eventos de *buckling* con el movimiento del endosoma, computamos la amplitud de ambos filamentos en el tiempo tal como fue descrito en las secciones 7.2 y 7.4 y la velocidad del endosoma a partir del *kymograph* del canal rojo. La figura 7.11B muestra que la amplitud del filamento secundario aumenta repentinamente cuando el endosoma alcanza la intersección. En ese momento la organela disminuye su velocidad, sugiriendo que el microtúbulo secundario actúa como una barrera elástica en contra del movimiento del endosoma transportado. En simultáneo, el microtúbulo principal comienza a flexionarse, lo cual es revelado

por un crecimiento leve en su amplitud. En el momento en el que el endosoma se detiene completamente, comienza el evento de *buckling* del microtúbulo principal. Finalmente, el endosoma retoma su transporte y ambos microtúbulos relajan con escalas temporales similares.

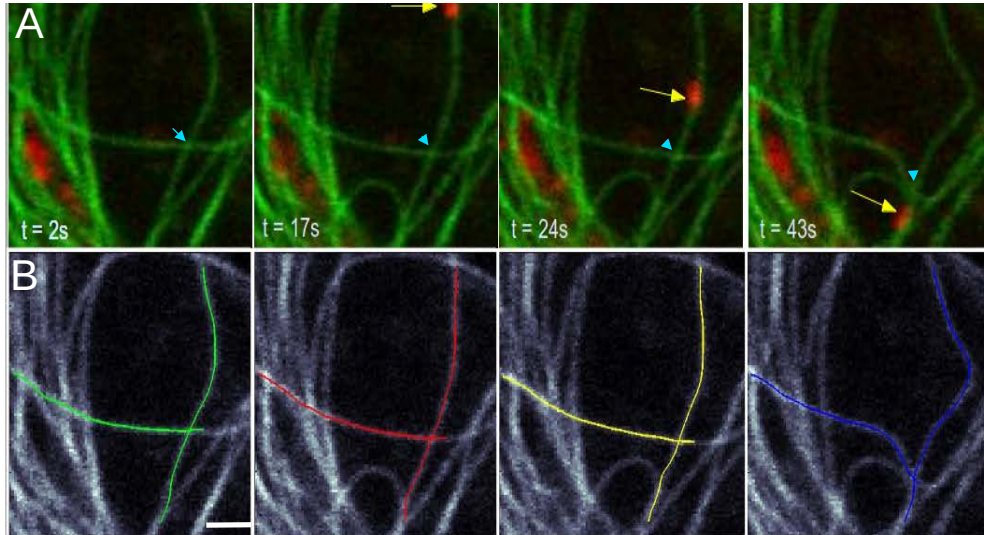


Figura 7.10: **Evento simultáneo de transporte y *buckling***: Cuadros no consecutivos de una película confocal de una región de una célula expresando EGFP-XTP para ilustrar la deformación de los microtúbulos y el transporte del endosoma marcado con FM4-64. Barra de escala: 1 μm (A) Superposición de los dos canales de fluorescencia mostrando los micorúbulos en verde y los endosomas en rojo. La flecha amarilla indica el endosoma transportado activamente a lo largo de un microtúbulo (primario) y la flecha celeste indica la intersección entre los filamentos primario y secundario. (B) Los mismos cuadros que en A, pero en este caso se muestra solamente el canal verde en escala de grises y las posiciones recuperadas usando AFTER de los filamentos primario y secundario.

En el ejemplo mostrado en la figura 7.10, el endosoma enlentece su movimiento y empuja al microtúbulo transversal. En este punto, suponemos que los motores moleculares no se detienen tras el encuentro, sino que continúan dando pasos sobre el microtúbulo primario [70]. Como el endosoma se encuentra atrapado en la intersección, los motores empujan su vía de transporte, deslizando al filamento hacia atrás (como en el ejemplo presentado en la figura 6.6), llamamos a este caso “evento de tipo I”.

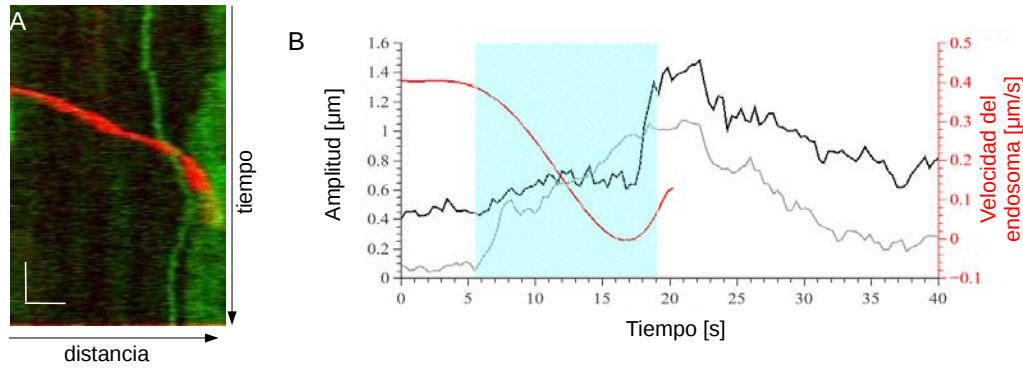


Figura 7.11: **Bucklings causados por transporte de cargas:** Análisis del transporte y deformación de los microtúbulos del evento simultáneo presentado en la figura 7.10. (A) Superposición de las matrices de intensidad de fluorescencia a lo largo del filamento principal. En rojo se muestra la matriz del canal correspondiente a los endosomas y en verde la del canal donde se observan los microtúbulos. Cada fila representa la intensidad de fluorescencia a lo largo de las coordenadas recuperadas del microtúbulo a lo largo del cual se transporta el endosoma (primario). Barras de escala vertical (5 s) y horizontal (1 μm). (B) Evolución temporal de la velocidad del endosoma a lo largo del filamento (—), la amplitud del filamento primario (—) y la del secundario (—). El área celeste indica el tiempo durante el cual el endosoma se encuentra en contacto con el filamento secundario.

Observamos otros dos tipos de casos. Por un lado, se presentaron eventos en los cuales los endosomas, al llegar a la intersección, deforman elásticamente al microtúbulo secundario pero no logran sobrepasarlo y revierten el sentido de su movimiento (“evento tipo II”, figura 7.12). Finalmente, observamos casos en los que al encontrarse con la barrera, los endosomas cambian su dirección y comienzan a ser transportados a lo largo del microtúbulo secundario (“evento tipo III”, figura 7.13).

Exploramos y analizamos 45 eventos, estudiando la posición relativa del camino del endosoma y el microtúbulo afectado; 15 de ellos (33 %) pudieron ser asociados con deslizamiento de filamento o fuerzas tangenciales, mientras que el resto (77 %) reveló componentes importantes de fuerzas transversales, reforzando nuestra observación del comportamiento del microtúbulo como obstáculo al transporte.

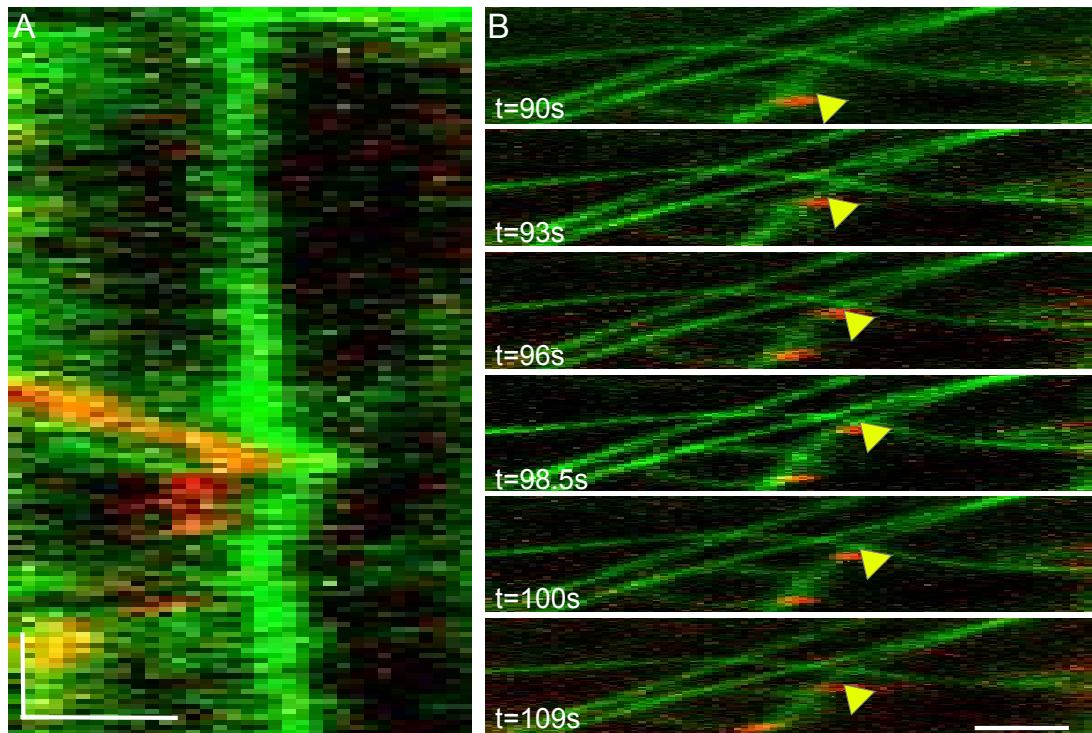


Figura 7.12: **Interacción transporte-*buckling* tipo II:** Evento en el cual el endosoma no logra superar la barrera del microtúbulo secundario y revierte su movimiento sobre el microtúbulo primario. (A) Superposición de las matrices de intensidad de fluorescencia en un cuadro a lo largo del filamento primario. En rojo, se muestra la matriz del canal correspondiente a los endosomas y en verde a los microtúbulos. Barras de escala vertical (5.2 s) y horizontal ($1\ \mu\text{m}$). (B) Cuadros no consecutivos de la película confocal de la cual se extrajo la información para trazar el kimograma de A. Superposición de los dos canales de fluorescencia mostrando los microtúbulos en verde y los endosomas en rojo. La flecha amarilla indica el endosoma transportado activamente a lo largo del microtúbulo primario inicialmente y luego sobre el secundario. Barra de escala: $1\ \mu\text{m}$.

Los ejemplos mostrados en esta sección destacan la relevancia de las fuerzas generadas por motores moleculares para moldear a los microtúbulos en células vivas. También revelan un rol secundario de los microtúbulos en el transporte activo de cargas: actúan como vías para el transporte pero también como barreras al mismo.

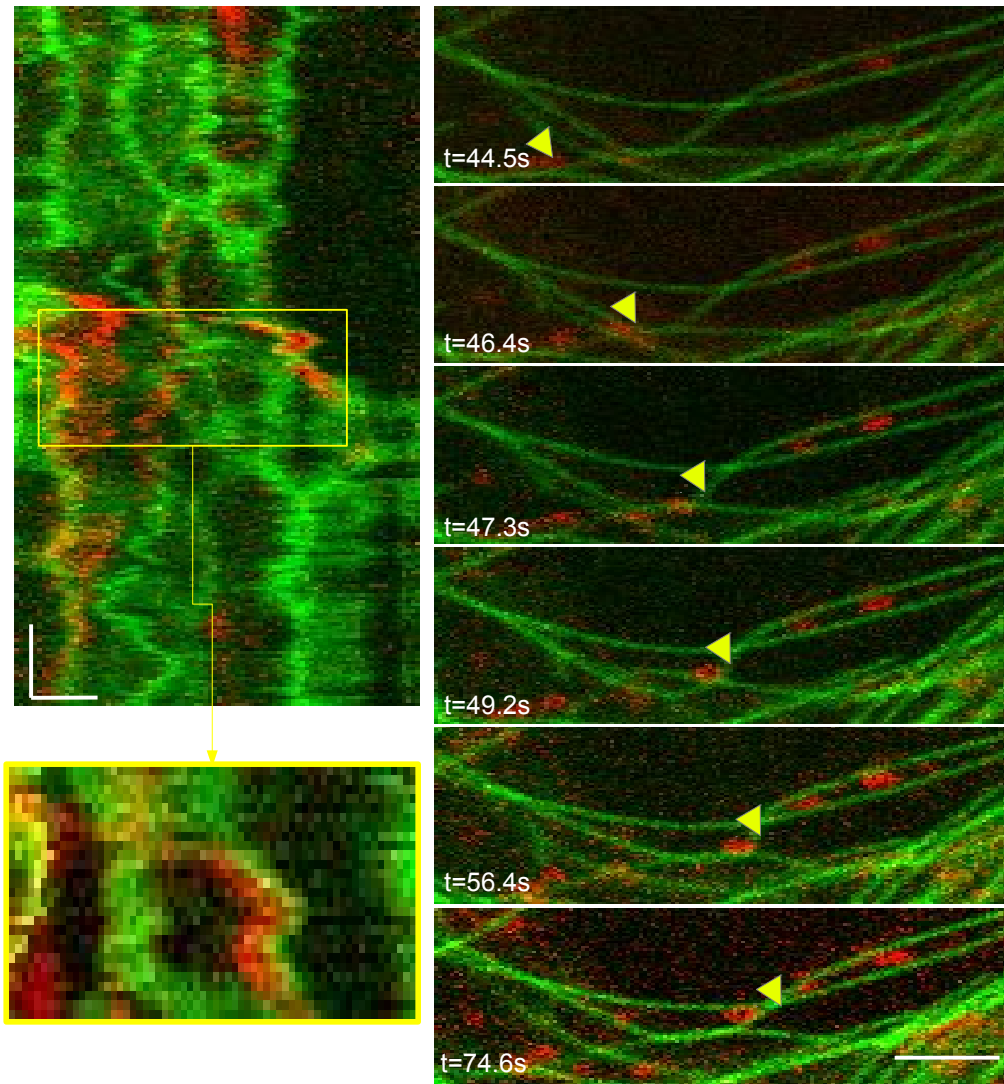


Figura 7.13: **Interacción transporte-*buckling* tipo III:** Evento en el cual el endosoma cambia el filamento sobre el cual realiza el transporte. (A) Superposición de las matrices de intensidad de fluorescencia a lo largo del filamento principal. En rojo se muestra la matriz del canal correspondiente a los endosomas y en verde el de los microtúbulos. Cada fila representa la intensidad de fluorescencia a lo largo de las coordenadas recuperadas del microtúbulo a lo largo del cual se transporta el endosoma. El panel inferior muestra la zona recuadrada en el kimograma completo aumentada. En este sector se observa el contacto del endosoma con el microtúbulo secundario. Barras de escalas vertical (11.6 s) y horizontal ($1.2\mu\text{m}$). (B) Cuadros no consecutivos de la película confocal de la cual se extrajo la información para trazar el kimograma de A. Superposición de los dos canales de fluorescencia mostrando los microtúbulos en verde y los endosomas (generados por la endocitosis de FM4-64) en rojo. La flecha amarilla indica el endosoma transportado activamente a lo largo de un microtúbulo (primario) Barra de escala: $1\mu\text{m}$

7.6. Conclusiones

Las células melanóforas de *Xenopus laevis* resultan un sistema atractivo para estudiar el *buckling* y deformación de microtúbulos *in vivo* debido a su tamaño

relativamente grande ($40\mu\text{m}$ de diámetro en promedio) y su forma aplanada. La extensión permite la existencia de filamentos largos que pueden contener más de un segmento donde se observe un evento de *buckling*. La geometría, prácticamente plana en gran parte de su superficie, combinada con técnicas de microscopía confocal, facilita el seguimiento de filamentos individuales con alta precisión utilizando AFTER [120].

En este capítulo, analizamos la deformación de los microtúbulos durante eventos de *buckling* a partir de la evolución de su amplitud. En primer lugar, caracterizamos la morfología de los eventos de *buckling* midiendo sus tamaños, los cuales se encuentran confinadas a valores en el rango $1\text{--}7\ \mu\text{m}$ y sus amplitudes, las cuales resultaron $\leq 4\mu\text{m}$ (figura 7.2). Las longitudes características calculadas resultaron menores que las longitudes típicas de los microtúbulos en estas células, sugiriendo que los filamentos pueden anclarse en puntos intermedios transitoriamente, tal como fue propuesto previamente [23].

Debido a su rigidez alta, la deformación de los microtúbulos requiere de la acción de fuerzas activas dentro de la célula. Pudimos verificar esta hipótesis al observar la ausencia de eventos de *buckling* en células desprovistas de ATP, confirmando la necesidad de energía para generarlos. Por otra parte, pudimos determinar que las fuerzas de polimerización/depimerización no son la fuente principal de fuerzas compresivas dentro de las células (figura 7.3).

Por otro lado, el tratamiento con vinblastina tuvo una incidencia en las características espaciales de los eventos, resultando en *bucklings* de mayor tamaño y amplitud, en promedio (figura 7.4). Nuestro análisis se encuentra en la línea de lo argumentado en el capítulo 4. Vinblastina elimina la posibilidad de depimerización de un filamento al encontrarse con una barrera, anulando un mecanismo a través del cual los microtúbulos liberan compresión. De esta manera, obtenemos filamentos con una compresión acumulada a lo largo de su extensión, lo cual podría resultar en que segmentos mayores de los mismos involucrados en eventos de *buckling* con amplitudes mayores, en promedio.

Los eventos de *buckling* se caracterizan por un rápido aumento en la amplitud de la deformación, seguido de un proceso de relajación, después del cual el microtúbulo en general recupera su forma original. Pudimos analizar tanto el crecimiento de la amplitud como la relajación con modelos que surgieron a partir del estudio de las simulaciones numéricas. La duración promedio de un proceso de *buckling* es de aproximadamente $10\ \text{s}$ (figura 7.6). Sin embargo, llegamos a registrar eventos de minutos de duración, y no pudimos asignar una escala a los tiempos típicos de estos eventos, corroborando que su distribución se comportaba según una ley de potencias.

Consideramos que los motores moleculares proveen las fuerzas necesarias para flexionar los microtúbulos directa (al moverse a lo largo del filamento) o indirecta-

mente (a través de la carga que transportan). Se ha demostrado que el transporte de cargas puede ser producido por equipos de múltiples motores [122, 149-151]. Por lo tanto, esperaríamos que equipos con más motores puedan soportar fuerzas opuestas mayores, resultando en eventos de *buckling* de mayor duración, mientras que un único motor se disocia rápidamente del filamento generando eventos de corta duración. De esta forma, explicamos la gran variabilidad en las duraciones de los eventos de *buckling* mediante la variedad de equipos de transporte con distintos números de motores involucrados.

Al ser una de las vías mediante las cuales se realiza el transporte activo de cargas, los microtúbulos pueden tener un efecto dicho transporte, y el destino final de la carga. Específicamente, Kulic et al. [98], observaron eventos de *buckling* asociados al transporte de organelas, sugiriendo que los mismos motores que generan el transporte proveen las fuerzas necesarias para deformar los filamentos. Aquí utilizamos una técnica para observar estos eventos (*buckling* y transporte) en simultáneo, utilizando microscopía confocal en dos canales (figura 7.10).

Observamos que la interacción de una organela transportada con otro filamento puede generar un evento de *buckling* que a su vez puede afectar la direccionalidad del transporte. Además, estos experimentos sugieren cuál o cuáles podrían ser los mecanismos que provoquen la terminación de un evento y la ulterior relajación del filamento. Recordando los resultados de las simulaciones numéricas, en los casos mostrados en las figuras 6.4, 6.5 y 6.9 proponemos que las fuerzas alcanzadas aumentarían la probabilidad del motor de desvincularse del microtúbulo [152], liberando la compresión y relajando la forma del filamento. Por otra parte, el caso de la velocidad constante discutido en el capítulo 6 resulta más intrigante, ya que presenta un rápido aumento de fuerza, lo cual aumenta ampliamente la probabilidad del motor de desprenderse antes de que se pueda apreciar algún tipo de flexión del filamento. Sin embargo, esta resistencia se reduce súbitamente una vez comenzada la flexión y se equilibra en valores menores. Este último escenario predice la existencia de eventos de duración extremadamente larga para equipos de motores robustos que superen la fuerza inicial.

Capítulo 8

Influencia del citoesqueleto en las características invasivas de células de cáncer de próstata

La migración celular tiene un papel fundamental en diversos procesos fisiológicos y patológicos [153]. En particular, las células metastáticas presentan alteraciones de esta función. Hemos mencionado en la introducción (capítulo 1) que las propiedades migratorias de las células se encuentran íntimamente relacionadas con el citoesqueleto. Por otra parte, se ha demostrado que las células de cáncer de próstata presentan una expresión anormal de proteínas asociadas al citoesqueleto, resultando en una capacidad aumentada de resistir a la quimioterapia y colonizar órganos lejanos [153, 154].

A raíz del desarrollo e implementación de las técnicas de análisis de filamentos del citoesqueleto descritas en los capítulos anteriores, iniciamos una colaboración con el grupo de investigación de las Dras. Elba Vázquez y Geraldine Gueron que se dedica al estudio de cáncer de próstata a nivel celular.

En este capítulo exploramos las propiedades mecánicas de los microtúbulos y la reorganización de la red de actina en células de cáncer de próstata humano (PC3). Nuestro objetivo es cuantificar estas características del citoesqueleto y evaluar si un tratamiento que eleva los niveles de hemo-oxigenasa 1 en la célula tiene algún efecto sobre las redes del citoesqueleto.

La hemo-oxigenasa 1 (HO-1) es una enzima que limita la tasa de degradación del grupo hemo [155, 156]. Es una proteína de respuesta al estrés y un mediador crítico de la homeostasis celular [157]. A pesar de que el papel de HO-1 en cáncer es controvertido [158], nuestras colaboradoras han demostrado que el aumento de su expresión está asociada a un fenotipo menos agresivo de cáncer de próstata [159]. HO-1 inhibiría la proliferación, migración e invasión celular [154]. También impediría el crecimiento y angiogénesis tumoral *in vivo* y reduciría la expresión de genes

asociados a la inflamación [154, 160]. Por otra parte, HO-1 se encuentra implicada en la modulación de la adhesión celular en células de cáncer de próstata, elevando la expresión de E-cadherina y β -catenina y relocalizándolas en la membrana celular [159], favoreciendo un fenotipo más epitelial. Sin embargo, no es claro cuáles son los interactores de HO-1 y cómo regula la organización del citoesqueleto.

Nuestro grupo colaborador había demostrado que HO-1 se encuentra involucrada en la regulación de la morfología celular en células de cáncer de próstata. Luego, realizaron un estudio proteómico que sugirió que el citoesqueleto se encontraría relacionado con la acción de HO-1 [7].

Esto motivó el inicio de nuestra colaboración en la cual exploramos si HO-1 afecta la morfología del citoesqueleto.

8.1. Patrones migratorios de células PC3 bajo la expresión forzada de HO-1

Para estudiar si la asociación de HO-1 con proteínas implicadas en la integridad de la red de actina tenía algún impacto sobre las trayectorias migratorias de células de cáncer de próstata, particularmente PC3, nuestras colaboradoras evaluaron cuantitativamente el movimiento de estas células en un estudio denominado *wound-healing assay*. Este experimento consiste en realizar una herida lineal a lo largo del plato de cultivo, capturar imágenes de las células y cuantificar su movimiento hacia la herida. En este caso, tomaron imágenes cada 20 minutos utilizando microscopía de contraste de fase, durante 48 horas. Analizaron trayectorias bidimensionales de célula única (figura 8.1A), tanto para la condición control como para las células tratadas durante 24 hs con hemina 80 μ M, un inductor específico de HO-1 [154].

La figura 8.1B muestra el desplazamiento cuadrático medio (MSD) obtenido para ambas condiciones. Observamos que el comportamiento de las células control y las tratadas con hemina es similar hasta $\tau \approx 800$ minutos; a partir de dicho valor, el MSD de las células tratadas es significativamente menor. Este resultado implica que la inducción de HO-1 reduce significativamente el área explorada por las células en la ventana temporal estudiada y sugiere que las células tratadas con hemina podrían presentar menor invasividad.

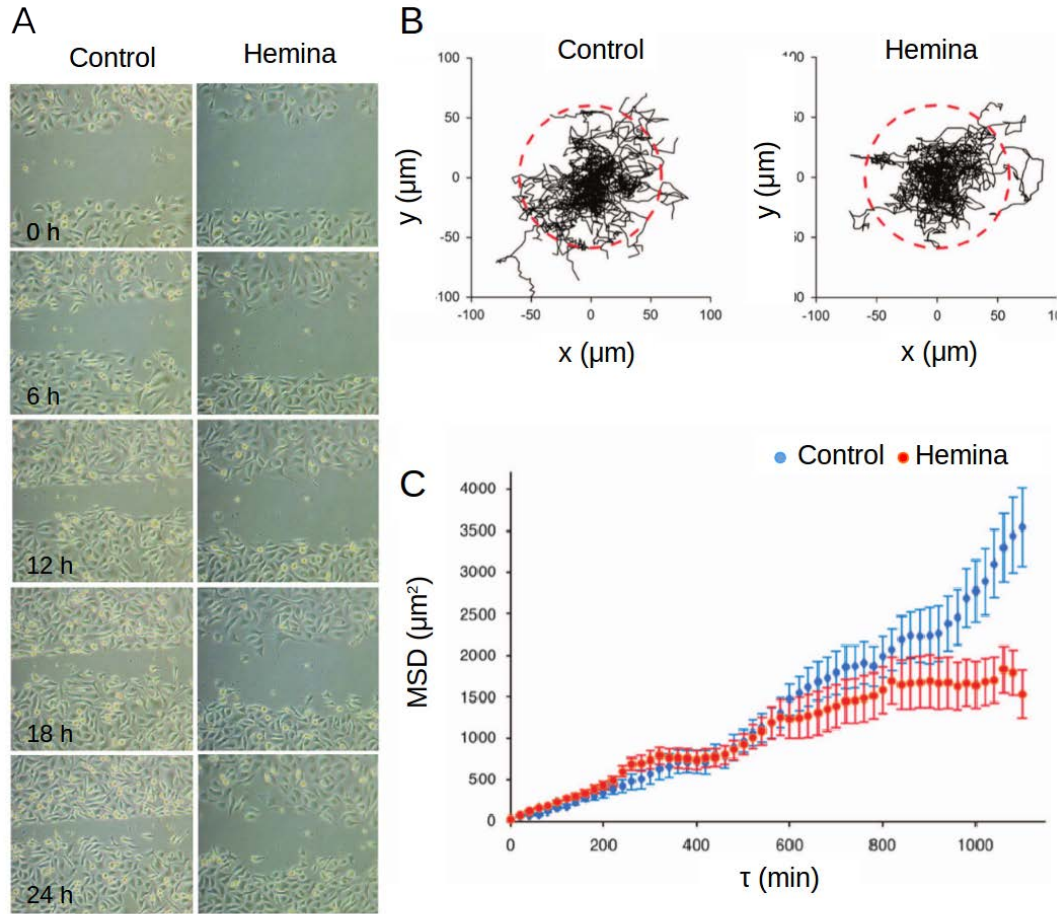


Figura 8.1: **HO-1 limita las trayectorias migratorias de células PC3:** (A) Las células PC3 control y tratadas con hemina fueron cultivadas hasta la confluencia. Se realizó una herida lineal a lo largo del diámetro del plato y se colectaron imágenes de microscopía de contraste de fase cada 20 min durante 48 hs. (B) Trayectorias celulares representativas obtenidas para células control y tratadas con hemina. Los círculos rojos discontinuos representan el área promedio explorada por las células control luego de 18 horas. (C) Las trayectorias fueron analizadas como se indica en la sección 5.1 para obtener el MSD. El gráfico presenta el MSD promedio $\pm$ error estándar vs. τ para ambas condiciones. $N_{trayectorias} = 78$ (control) y 70 (hemina).

8.2. Distancias entre células

Para evaluar si los resultados descriptos se relacionan con variaciones en las interacciones intercelulares, analizamos las distribuciones de distancias a primeros vecinos en células PC3 control y tratadas con hemina.

Con este fin, fijamos las células y las tratamos con C-laurdan, una sonda fluorescente que se intercala en las membranas plasmáticas y membranas internas [161]. Esta marcación permite delimitar las células con buena relación S/N (figura 8.2).

Registramos imágenes de fluorescencia con un microscopio de campo amplio usando un objetivo 10x (NA=0.3). De esta forma, obtuvimos campos con ~ 20 -

30 células cada uno (figura 8.2A). Para determinar las distancias entre las células utilizamos algoritmos escritos en Matlab.

Brevemente, aplicamos una rutina de binarización a las imágenes mediante la aplicación de un umbral de intensidades, generado automáticamente para cada imagen (figura 8.2B). Una vez obtenida la imagen binaria, utilizamos la función *bwmorph* para eliminar conjuntos muy pequeños de píxeles aislados y completar los agujeros” (píxeles faltantes) en los conjuntos de píxeles restantes (figura 8.2C). En la imagen resultante, llamamos *grupo* a los conjuntos de píxeles positivos conectados y los etiquetamos (figura 8.2D).

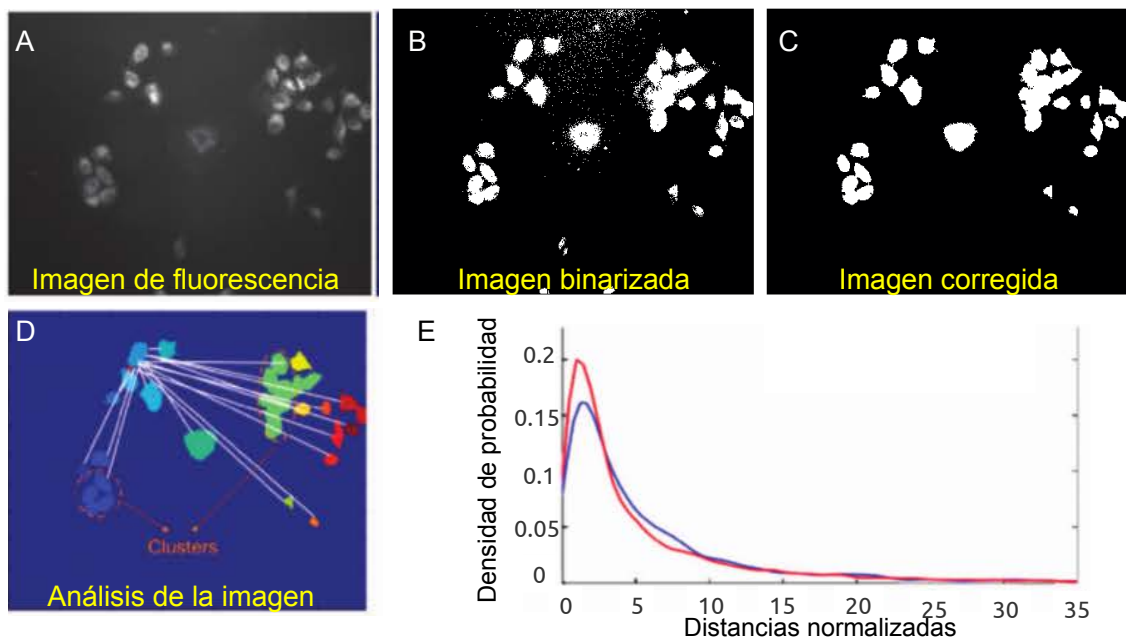


Figura 8.2: HO-1 reduce las distancias a primeros vecinos en células PC3: Adquirimos imágenes de campo amplio de células marcadas con C-laurdan y con magnificación pequeña para poder observar campos con varias células (~ 20 -30 células/imagen). Flujo del análisis de las imágenes implementado: (A) La imagen en escala de grises obtenida del microscopio. (B) Se binariza la imagen mediante la aplicación de un umbral automático. (C) Utilizando la función *regionprops* se corrige la imagen eliminando píxeles aislados y rellenando los *grupos*. (D) Se analiza la imagen procesada, etiquetando los *grupos* y separándolos en células únicas y clusters celulares (elipses naranjas discontinuas) y se mide la distancia entre cada grupo y los demás (líneas blancas), adjudicando al mínimo de éstas, la distancia al primer vecino (línea roja). (E) Distribución de distancias a primer vecino graficada para células PC3 control y tratadas con hemina. Las distancias entre células vecinas fueron normalizadas al radio celular promedio. Datos obtenidos para $N \approx 2000$ células ó *clusters* celulares en cada condición.

Ordenamos los *grupos* por tamaño, separando los que corresponden a células únicas con los que abarcan más de una célula, que llamamos *clusters*. Hicimos esto

a partir de la distribución de áreas de los *grupos* de cada condición ($N \approx 2000$), asignamos al 50 % de los *grupos* de menor tamaño a células únicas. Este porcentaje fue tomado por defecto, de esta forma nos aseguramos no contabilizar ningún *cluster* como célula, verificamos que esto se cumpla visualmente, observando las imágenes etiquetadas. Para estimar el diámetro de las células, utilizamos la función *regionprops* que ajusta una elipse a cada célula y promediamos los valores de sus ejes mayor y menor. El diámetro celular promedio obtenido en cada condición estudiada será utilizado como escala espacial en los análisis subsecuentes.

Finalmente, para obtener la distancia de cada célula a su vecina más cercana (primera vecina) medimos las distancias euclídeas entre cada *grupo* y todos los demás e identificamos la menor de éstas.

A partir del análisis de las imágenes obtenidas en cada condición computamos una probabilidad de hallar las células a una dada distancia de su primera vecina. La figura 8.2E muestra que la probabilidad medir distancias a primeros vecinos es distinta en células control y tratadas, para distancias pequeñas. Reportamos una mayor probabilidad de encontrar las células tratadas con hemina a distancias menores. Comparamos estos datos con un test de dos muestras de Smirnov-Kolmogorov y obtuvimos que las distribuciones son separables ($P < 0.05$) para distancias ≤ 2 radios celulares. Los resultados muestran que la inducción de HO-1 en células PC3 reduce significativamente las distancias entre una célula y su vecina más cercana.

8.3. Modificación del citoesqueleto bajo inducción de HO-1

Los resultados mostrados en las secciones anteriores sugieren un cambio en la interacción de las células de cáncer de próstata al ser farmacológicamente inducidas a producir HO-1. En esta sección nos propusimos estudiar diferencias mecánicas y morfológicas del citoesqueleto en estos casos.

8.3.1. Longitud de persistencia aparente de los microtúbulos

Considerando que los microtúbulos son los componentes más rígidos del citoesqueleto, y por ende proveen el mayor soporte mecánico a las células, nos preguntamos si se observarían cambios mecánicos en el citoesqueleto que pudieran relacionarse con las diferencias halladas entre células control y tratadas con hemina.

Con este fin, aplicamos las herramientas descritas en el capítulo 4 para calcular lp^* de los microtúbulos en células PC3 control o tratadas con hemina. Nuestras

colaboradoras fijaron células y realizaron una inmunomarcación de tubulina con un anticuerpo anti-tubulina y uno secundario conjugado con Alexa-Fluor647. Tomamos imágenes confocales de las células en ambas condiciones (figura 8.3A).

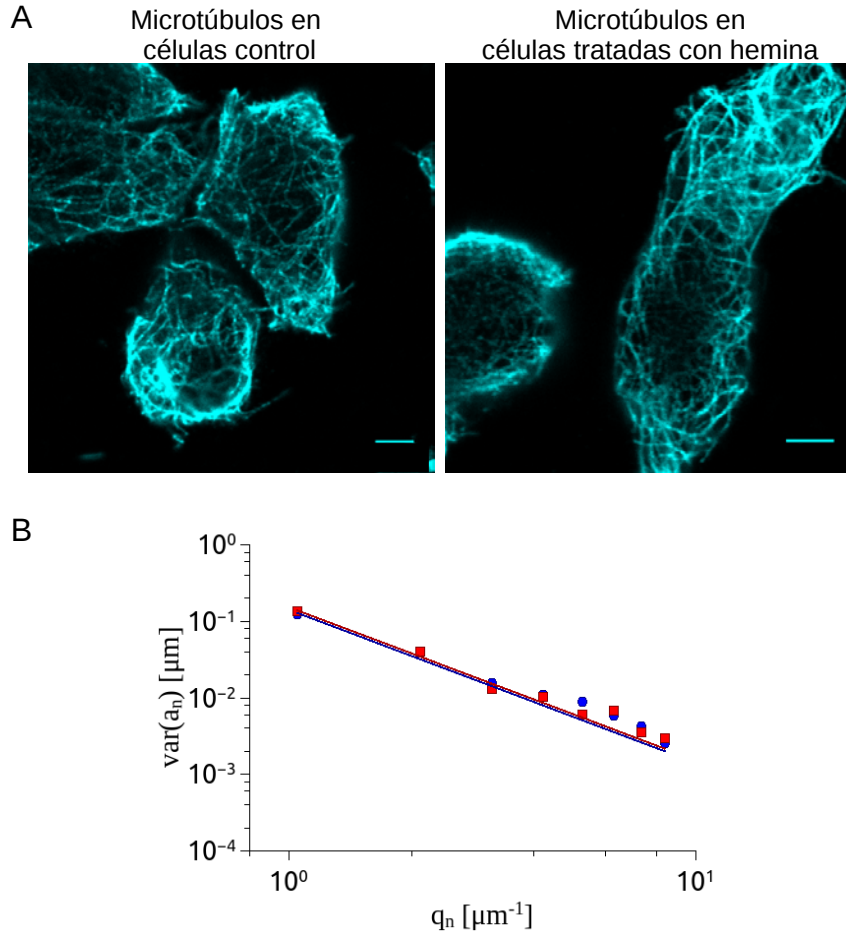


Figura 8.3: Red de microtúbulos de células PC3 control y tratadas con hemina: (A) Imágenes confocales representativas de células PC3 en las cuales los microtúbulos fueron sometidos a inmunomarcación. Barras de escala: 5 μm . (B) Varianza de las amplitudes de los modos de Fourier en función del número de onda, para segmentos de microtúbulos de 3 μm de longitud. Las líneas continuas muestran el ajuste de los datos al modelo térmico (ec. 1.16). $N_{\text{control}} = 159$ y $N_{\text{hemina}} = 163$.

Los filamentos fueron analizados con el método de Fourier utilizado anteriormente (sección 1.5.6, Introducción), tomando segmentos de 3 μm de longitud. Analizamos segmentos de menor tamaño que en el caso de *X. laevis* (8 μm) ya que las células PC3 son más chicas (10-20 vs. 40-50 μm de diámetro) y no es posible hallar una cantidad suficiente de filamentos más largos para tener la estadística necesaria para el análisis. La figura 8.3B muestra la varianza de las amplitudes de los modos de Fourier en función del número de onda, q_n . Los datos siguen una forma funcional de tipo q_n^{-2} (comportamiento símil-térmico), tal como el observado para las células melanóforas (figura 4.8B). Este resultado permitió aplicar el modelo térmico definido

por la ec. 1.16 para calcular la longitud de persistencia aparente de los microtúbulos, del cual obtuvimos $lp^* = (5.2 \pm 0.3)\mu\text{m}$ para células control y $lp^* = (5.5 \pm 0.4)\mu\text{m}$ para células tratadas con hemina. Estos resultados sugieren que la inducción de HO-1 no modifica la rigidez aparente de los microtúbulos en células PC3.

Los valores de lp^* calculados en esta línea celular fueron significativamente menores que los obtenidos en las células melanóforas ($lp^* \sim 20\mu\text{m}$). Esta diferencia podría estar relacionada con la diferencia en el tamaño de las células, como discutiremos más adelante.

8.3.2. Modificaciones en la red de actina: análisis de los contactos entre células

Hemos mencionado que nuestras colaboradoras realizaron un estudio proteómico cuyo resultado sugiere que HO-1 interactúa con proteínas asociadas a la organización del citoesqueleto [7]. Dado que esta enzima regula la adhesión celular y morfología [159] y luego de observar que los microtúbulos no presentaban modificaciones significativas en su lp^* , nos preguntamos si los efectos observados en presencia de hemina se deben a cambios en la red de actina.

Mencionamos previamente (capítulo 1) que los filamentos de actina tienen un diámetro menor al de los microtúbulos y en general se agrupan en manojos de filamentos [3]. Por este motivo, el estudio de las formas de filamentos individuales *in vivo* no es posible con las técnicas de microscopía utilizadas en este trabajo.

Como primer paso para estudiar la red de actina en células PC3, tomamos imágenes confocales de células control o tratadas con hemina, fijadas y marcadas con rodamina-faloidina, un marcador fluorescente conjugado con una toxina con alta afinidad a la actina [162] (figura 8.4).

Las células presentan claros contactos a través de prolongaciones o protrusiones tipo-filopodias, que de aquí en adelante llamaremos filopodias. Considerando que estos contactos pueden mediar una interacción entre las células, nos preguntamos si el tratamiento con hemina los modifica.

Para cuantificar el número de contactos en las distintas condiciones estudiadas, diseñamos un método que consiste en el análisis de perfiles de intensidad entre las células.

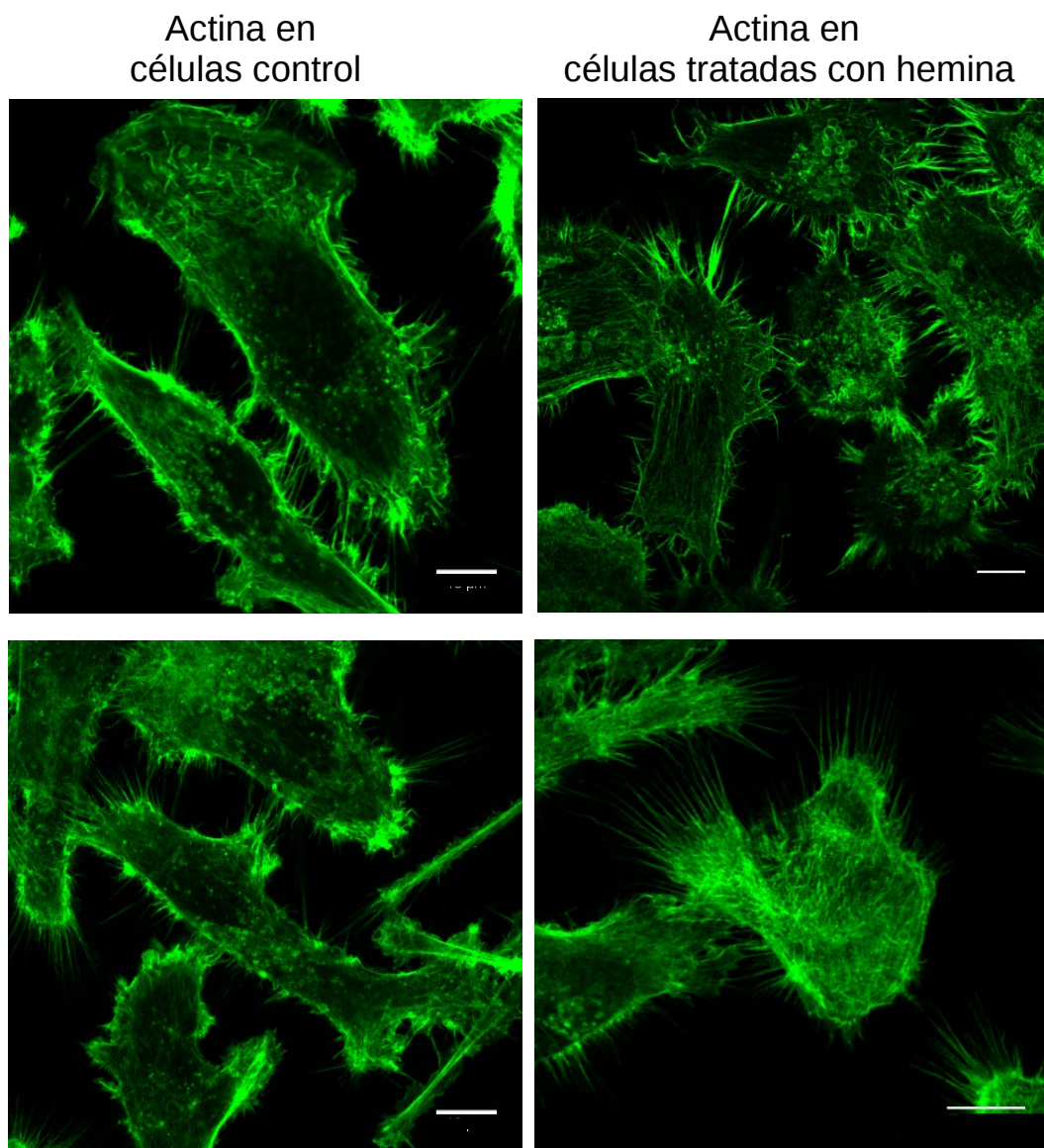


Figura 8.4: **Imágenes de la red de actina de células PC3:** Imágenes confocales de células PC3 control (izquierda) y tratadas con hemina (derecha) fijadas y marcadas con rodamina-faloidina. Barras de escala: 10 μm

Seleccionamos las regiones donde las filopodias de dos células vecinas se contactan y llamamos *contacto* a cada una de las filopodias que se extienden de una célula a otra (figura 8.5A). Luego, dividimos cada una de estas regiones en zonas donde la distancia entre ambas células fuese aproximadamente constante. Descartamos del análisis las regiones donde las células se encontraban en contacto directo o superpuestas ya que la comunicación entre las células en estas regiones no será igual a aquella en la cual las células sólo comparten *contactos* (figura 8.5A). Para cada zona seleccionada, obtuvimos un perfil de intensidades equidistante a ambas membranas, ilustrado por la línea amarilla en la figura 8.5A.

Analizamos los perfiles de intensidades con un algoritmo de Matlab, que los

suaviza y extrae las posiciones de los máximos de intensidad correspondientes a filopodias (figura 8.5B), para luego computar la densidad de contactos sobre ese perfil como el número de picos contabilizados sobre la longitud del perfil.

La figura 8.5C muestra un aumento en la densidad de contactos en las células tratadas con hemina con respecto a las control ($p < 0.001$, test de dos muestras de Smirnov-Kolmogorov). Obtuvimos una densidad de contactos promedio de $(0.56 \pm 0.02) \mu m^{-1}$ para células control y $(0.77 \pm 0.02) \mu m^{-1}$ para células tratadas. Este resultado nos llevó a preguntarnos si el aumento en la densidad de contactos es consecuencia de un aumento del número de filopodias/célula.

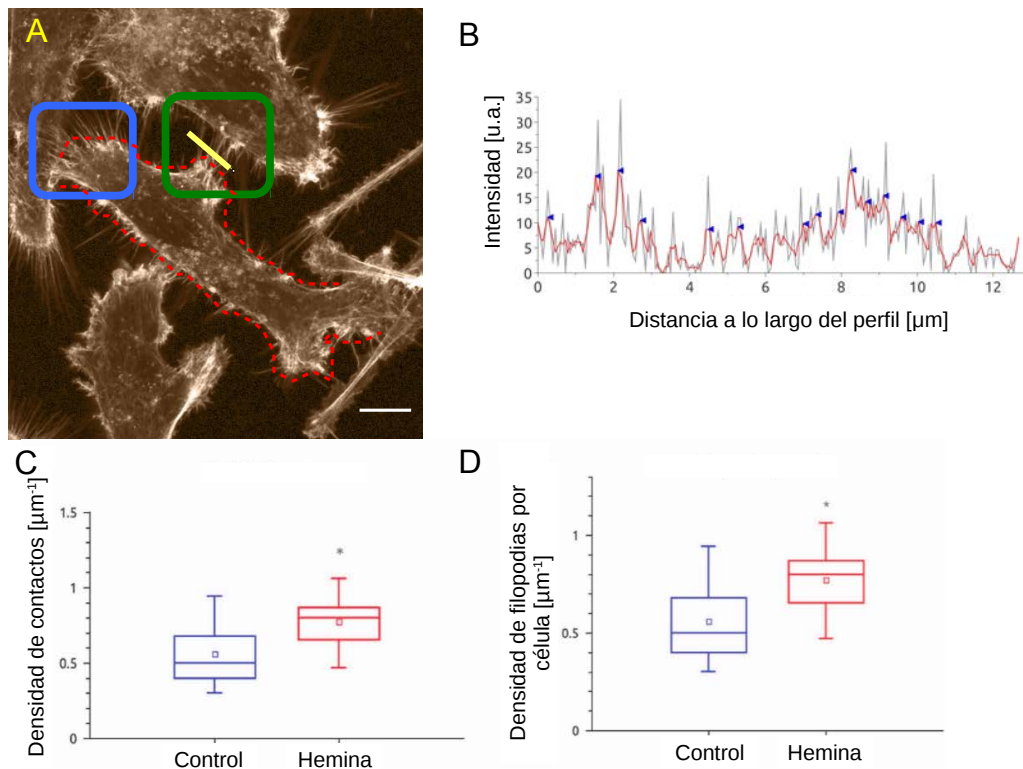


Figura 8.5: Cuantificación de contactos en células control y tratadas con hemina: (A) Imagen confocal representativa, los recuadros marcan zonas de interés. Se destacan las regiones analizadas (recuadro verde) mediante el análisis de un perfil de intensidades equidistante a ambas células (amarillo). Se descartaron las zonas donde las células se encontraban en contacto directo (recuadro azul). Para el estudio de la relación número de filopodias/célula se analizó el perfil de intensidades inmediatamente fuera de la célula (línea roja punteada). Barra de escala: 10 μm . (B) Análisis de un perfil de intensidades, se muestra un perfil extraído sin procesar (—), el perfil suavizado (—) y los picos contabilizados como filopodias independientes ($\blacktriangle$) (C) Boxplot comparando la densidad de contactos en células control (N= 91) o tratadas (N=75). (D) Boxplot comparando la densidad filopodias/célula en células control (N= 83) o tratadas (N=75). *Diferencia significativa, $P \leq 0.001$

Para responder esta pregunta, adaptamos el método descripto previamente para cuantificar la densidad de filopodias por célula. En este caso, extraemos un perfil

de intensidades en la zona inmediatamente exterior de la célula y lo analizamos de la misma forma que los perfiles de contactos. A partir de estos datos, calculamos la densidad filopodia/célula como el cociente entre el número de filopodias y la longitud del perfil.

Pudimos verificar que la densidad filopodias/célula es mayor para las células tratadas con respecto a las control (figura 8.5D), sugiriendo que HO-1 induce directa o indirectamente la formación de filopodias en células PC3. Esta propiedad podría facilitar que las células exploren un entorno mayor y entren en contacto con otras células. De esta forma, podría generarse un mayor anclaje, resultando en conjuntos de células más cercanas entre sí y con menor capacidad migratoria.

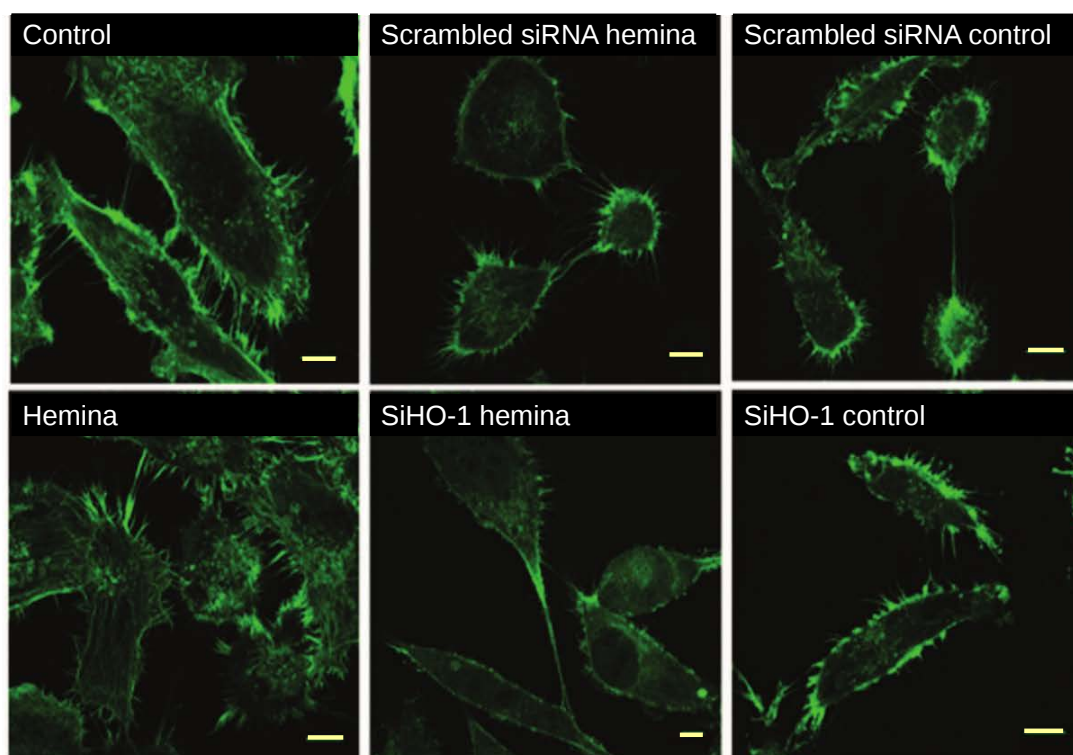


Figura 8.6: Filopodias bajo la inducción de HO-1 y controles biológicos: Imágenes confocales representativas de cada condición estudiada, incluyendo los controles. Células PC3 transfectadas con un siRNA específico a HO-1 (siHO-1) o con un siRNA inespecífico (scrambled siRNA) fueron luego tratadas o no hemina. Luego se las fijó y marcó con rhodamina-faloidina. Barras de escala: 10 μ m

Con el fin de corroborar que los resultados obtenidos de las células tratadas con hemina se debieran efectivamente a la inducción de HO-1 generada con esta droga, nuestras colaboradoras realizaron una serie de controles (figura 8.6) que luego analizamos con el método descrito anteriormente. En primer lugar, realizamos mediciones sobre células tratadas con hemina a las cuales se les inhibe genéticamente la producción de la enzima. Estos experimentos deben ser contrastados con controles de silenciamiento de HO-1 en células sin tratamiento y silenciamientos no específicos,

para asegurar que este tratamiento experimental no incide en los resultados.

En la figura 8.6 mostramos ejemplos de células con su red de actina marcada para cada condición experimental medida.

Para inhibir la producción de HO-1, nuestras colaboradoras utilizaron un RNA de silenciamiento específico a HO-1 (siHO-1), que es un tipo de RNA interferente y altamente específico que inhibe la expresión de HO-1. Prepararon células transfectadas con siHO-1 sin tratamiento (siHO-1 control) y tratadas con hemina (siHO-1 hemina), que luego analizamos para cuantificar la densidad de *contactos* y de filopodia/célula

La inhibición genética de HO-1 revirtió el aumento de densidad de contactos y de filopodia por célula, para las células tratadas con hemina (figura 8.7).

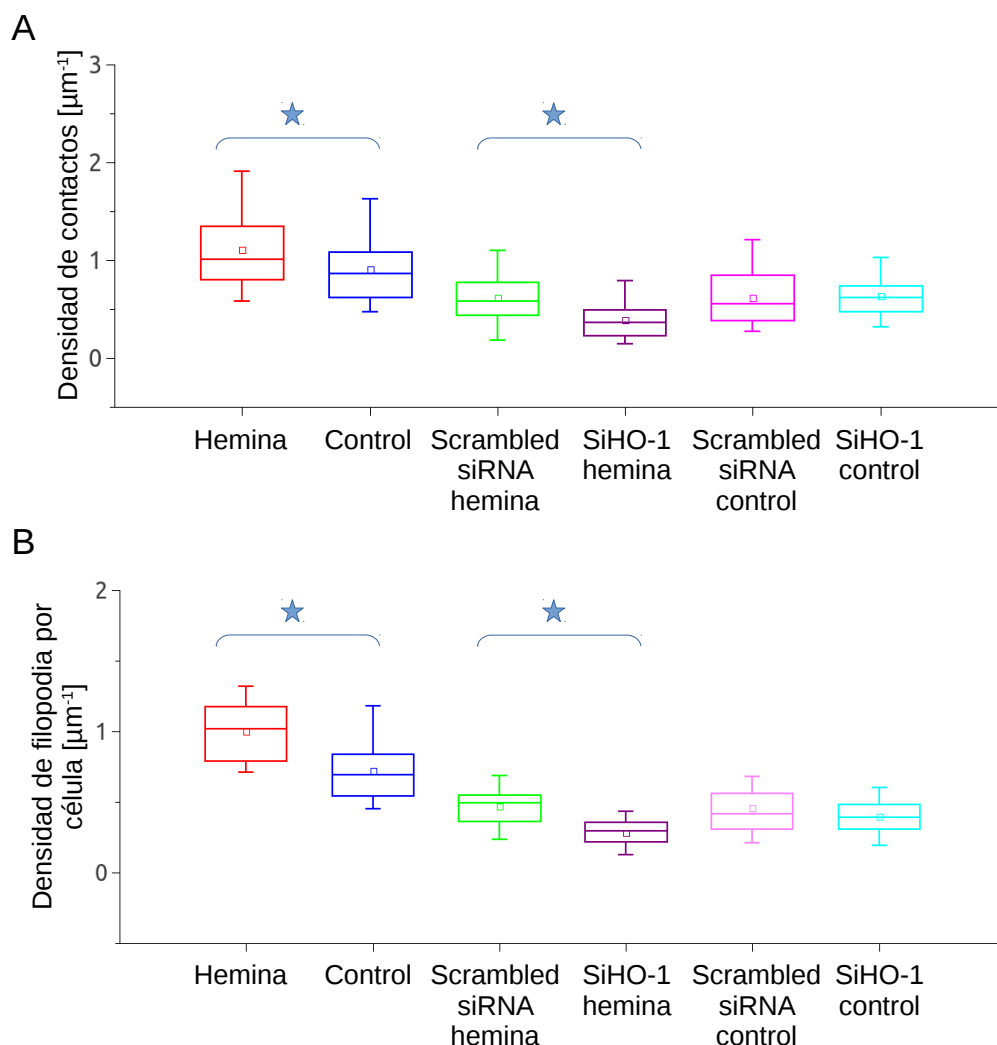


Figura 8.7: **Efecto de la inducción de HO-1 en la densidad de filopodias** (A) Boxplot comparando la densidad de contactos entre células para cada condición. (B) Boxplot comparando la densidad de filopodias por célula para cada condición. ★ diferencia significativa $P \leq 0.001$

Finalmente, nuestras colaboradoras realizaron un control de silenciamiento de

HO-1 transfectando células con un siRNA con igual composición de nucleótidos, pero en distinta secuencia (Scrambled siRNA). Al comparar las densidades de filopodias entre las células siHO-1 hemina con las scrambled siRNA hemina, obtuvimos que las segundas presentan un aumento significativo tanto en lo que respecta a la interacción entre las células como a su producción de protrusiones con actina, como se puede apreciar en los boxplots de la figura 8.7 [7].

8.3.3. Análisis de las protrusiones celulares de cáncer de próstata en la presencia de medio condicionado

Los resultados obtenidos del análisis de la red de actina de las células PC3, sugieren que HO-1 se encuentra involucrado en el anclaje de las células, reduciendo su capacidad migratoria. En suma, el análisis bioinformático realizado por nuestras colaboradoras mostró mayor desregulación de proteínas del citoesqueleto en la etapa metastática del cáncer de próstata. Por lo tanto decidimos explorar la influencia de HO-1 en la invasión de las células a otros tejidos. Como el hueso es el sitio más común y frecuente para la progresión del cáncer de próstata [163], nuestras colaboradoras diseñaron un arreglo experimental biológico con medios condicionados (CM, por sus siglas en inglés) de sistemas de co-cultivo *trans-well* de células PC3 y MC3T3. MC3T3 es una línea celular precursora de osteoblastos, derivada de bóveda craneal de ratones ([164]).

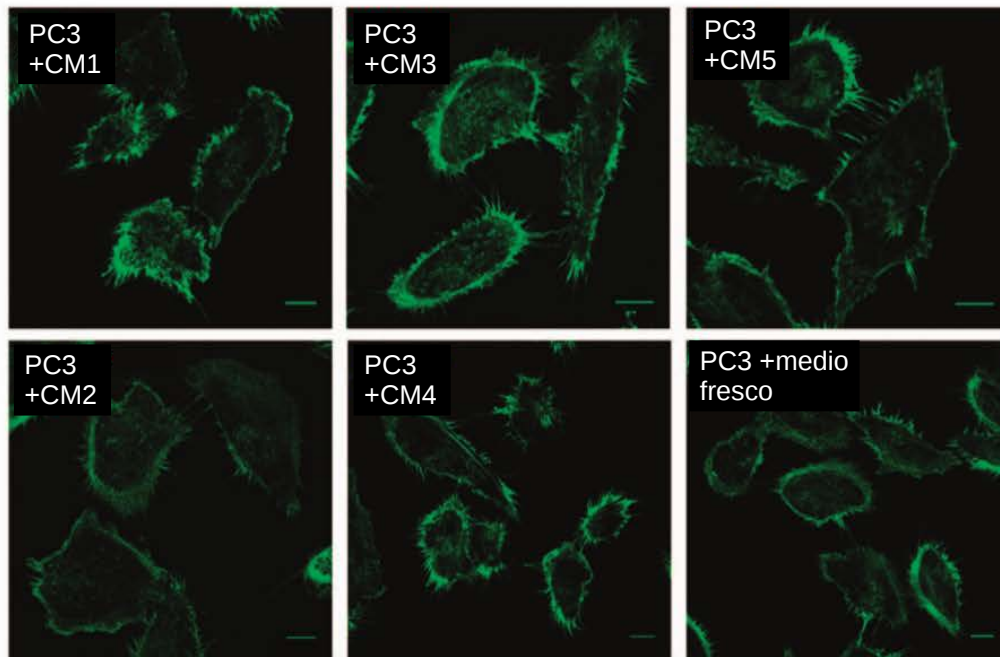


Figura 8.8: **Co-cultivo, medios condicionados** Imágenes confocales representativas de células PC3 cultivadas en distintos medios condicionados, luego fijadas y marcadas con rhodamina-faloidina. Barras de escala: 10 μ m

Las células PC3 pre-tratadas o no con hemina fueron co-cultivadas con y sin MC3T3. Luego se obtenía el medio condicionado de cada una de las condiciones experimentales y se cultivaban nuevas células PC3 con ese medio. Los medios condicionados obtenidos fueron clasificados según las condiciones experimentales a las que habían sido expuestos y se encuentran descriptos en la tabla de la figura 8.9.

Las células fueron luego fijadas, marcadas con rodamina-faloidina y colectamos imágenes de microscopía confocal con las que realizamos el análisis de los contactos y filopodias descripto anteriormente. La figura 8.8 muestra imágenes representativas de cada condición experimental.

A partir del estudio de la densidad de contactos celulares hallamos que el medio condicionado proveniente de células en co-cultivo reduce la densidad de contactos con respecto del proveniente de células PC3 solas (figura 8.9A, comparando PC3 + CM1 con PC3 + CM2) y que el pre-tratamiento con hemina evita dicha disminución (figura 8.9A, comparando PC3 + CM4 con PC3 + CM2).

Con respecto a la densidad de filopodia/célula, los resultados nos indican que el medio condicionado de sistemas en co-cultivo impactan negativamente en la densidad de filopodias de membrana en células PC3 (figura 8.9B, comparando PC3 + CM2 con PC3 + CM1). Nuevamente, notamos que este efecto era revertido cuando el medio condicionado provenía de células pre-tratadas con hemina (figura 8.9B, comparando PC3 + CM4 con PC3 + CM2)

Estos resultados sugieren que la expresión inducida de HO-1 en células PC3 altera los factores solubles liberados al medio condicionado en los sistemas de co-cultivo. A su vez, esto afecta la generación de filopodias e interconectividad de las células. De esta forma se obtendría un fenotipo de células tumorales más adherente y potencialmente con menor probabilidad de extravasación e invasión a otros órganos.

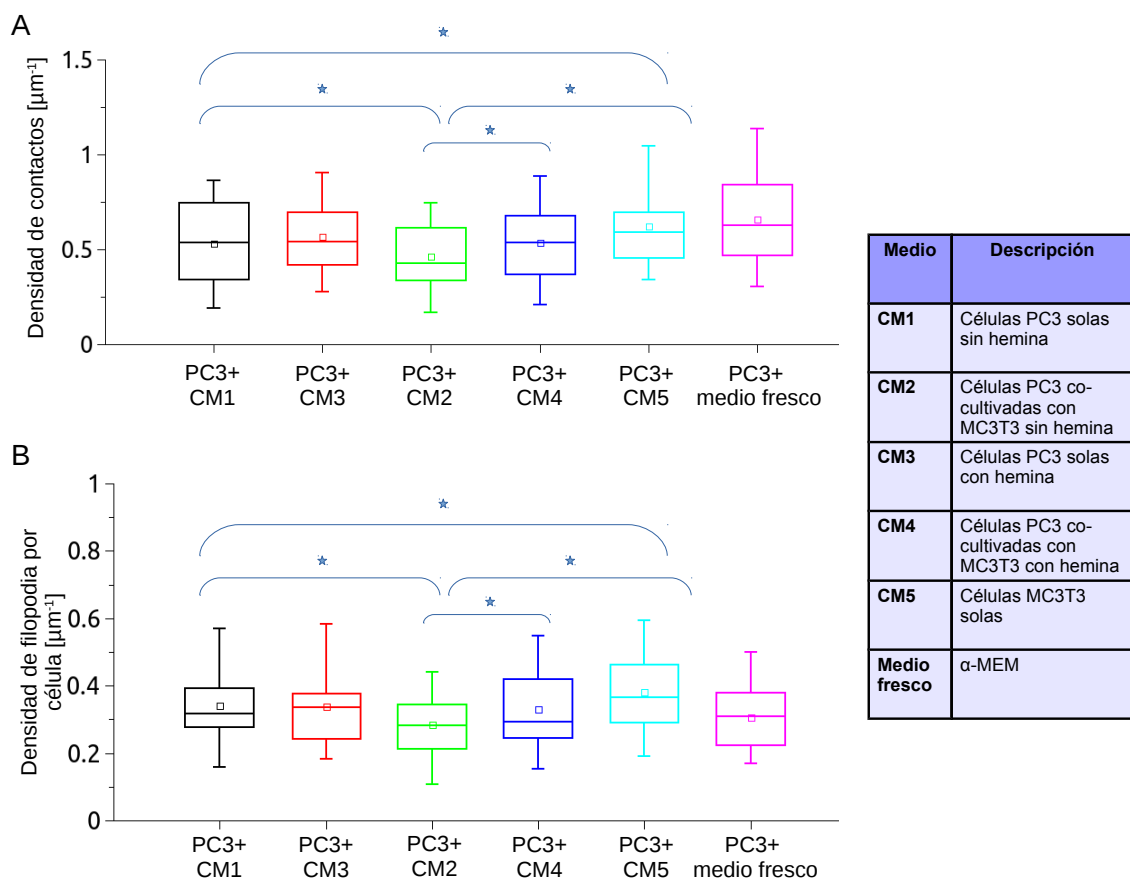


Figura 8.9: **Resultados del análisis de filopodias para células en co-cultivo** (A) Boxplot comparando la densidad de *contactos* entre células para cada condición. (B) Boxplot comparando la densidad de filopodias por célula para cada condición. En la tabla se describen los medios utilizados. ★ diferencia significativa $P \leq 0.001$.

8.4. Conclusiones

En este capítulo presentamos el estudio del citoesqueleto en células de cáncer de próstata humano, PC3. Estas células son especialmente invasivas y suelen migrar con gran facilidad.

En una primera instancia, pudimos concluir que las células tratadas con hemina, inductor farmacológico de HO-1, se encuentran más cercanas entre sí que aquellas no inducidas (figura 8.2).

La migración y adhesión celular son procesos íntimamente ligados al citoesqueleto. Por lo tanto decidimos estudiar estas redes de filamentos en búsqueda de cambios que pudieran explicar las diferencias en movilidad celular observadas bajo la inducción de HO-1. Al estudiar las formas de microtúbulos individuales, los datos ajustaron bien al modelo térmico (figura 8.3), sin embargo no obtuvimos diferencias significativas de lp^* entre células control y tratadas con hemina. La longitud de persistencia de segmentos de $3 \mu\text{m}$ de longitud ronda los $5 \mu\text{m}$, significativamente menor a la obtenida en células melanóforas.

La adhesión intercelular es esencial para el desarrollo, diferenciación y mantenimiento de tejidos y las células epiteliales requieren esta interacción para promover su función de barrera [165]. La disminución en estas interacciones provee una ventaja considerable a la progresión del carcinoma, visto que es necesario el desprendimiento de las células de la matriz extra-celular y la abolición de sus interacciones para su invasión y metástasis [166]. Estos eventos se encuentran fuertemente asociados a los componentes del citoesqueleto [167]. Los filamentos de actina son componentes principales de varias estructuras celulares asociadas a la adhesión, tales como las filopodias, lamelopodias y fibras de estrés. Por lo tanto nos resultó importante desarrollar técnicas para observar y medir diferencias en la red de actina en estas células.

Mediante el análisis de imágenes confocales de células PC3 fijadas, cuantificamos y comparamos la red de filamentos de actina en los bordes de las células. Observamos que la inducción de HO-1 aumenta tanto los contactos entre las células como en la densidad de filopodias por célula (figura 8.7). Esto sugiere que el tratamiento con hemina induce el remodelamiento de la arquitectura de la red de actina en estas protrusiones, resultando en un fenotipo más adhesivo y menos invasivo. Sin embargo, HO-1 no presenta marcación en las filopodias (no mostrado), lo cual sugiere que su acción se manifiesta indirectamente mediante la regulación de la red de actina presente en las protrusiones.

Por último, observamos que las células PC3 expuestas a medios condicionados de sistemas de co-cultivo con osteoblastos (MC3T3) presentan una menor densidad de contactos y de filopodias por célula. Estos efectos se pudieron revertir bajo el pre-tratamiento con hemina (figura 8.9). La retracción de las protrusiones puede ser un indicador de que las células se están volviendo menos adhesivas en presencia de MC3T3 e iniciando un proceso de extravasación. El cáncer de próstata presenta mayormente metástasis osteoblásticas en hueso, lo cual es la principal causa de mortalidad de la enfermedad [163], nuestros resultados sugieren que HO-1 previene la extravasación e invasión de células de cáncer de próstata hacia otros órganos.

Capítulo 9

Conclusiones generales y perspectivas

Las redes de filamentos son los elementos básicos que intervienen en la construcción de ciertas estructuras biológicas dinámicas que pueden ajustar su fuerza, elasticidad y respuesta [78]. En particular, en la escala celular esta red se denomina citoesqueleto y se compone por tres familias de filamentos semiflexibles: filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos. Las propiedades mecánicas de las células se definen principalmente a través del citoesqueleto. Además, esta estructura es responsable de la migración y remodelación celular, y se encuentra involucrada en la división celular y el transporte intracelular de cargas.

En los últimos años ha cobrado importancia el estudio del citoesqueleto y su relación con distintos procesos celulares. Se han propuesto modelos de red para comprender cómo los microtúbulos soportan las compresiones necesarias para mantener la estructura celular [121, 168] y diversos trabajos se concentraron en estudiar el rol de la actina en la migración celular.

Por estos motivos en esta tesis estudiamos en profundidad las propiedades mecánicas y dinámicas del citoesqueleto, haciendo hincapié en los microtúbulos. Desarrollamos y aplicamos nuevas técnicas para estudiar al citoesqueleto.

La rutina AFTER, presentada en el capítulo 3, fue creada a la par de la realización de experimentos biológicos, lo cual facilitó la sintonía entre el desarrollo computacional y el sistema al cual sería aplicado. De esta forma, logramos un algoritmo de *tracking* de filamentos *in vivo* que permite recuperar las coordenadas de microtúbulos individuales a partir de imágenes confocales con una precisión de ~ 9 nm durante cientos de cuadros (figura 3.12).

Utilizando este algoritmo, determinamos la longitud de persistencia efectiva de los microtúbulos en células y evaluamos el efecto que tienen las otras redes del citoesqueleto sobre esta magnitud (figura 4.8). Observamos una disminución en la lp^* en células sin filamentos intermedios, lo cual sugiere que estos filamentos inter-

actúan con los microtúbulos afectando su rigidez aparente dentro de las células. A pesar de que las células son un sistema fuera del equilibrio, encontramos que las formas de los microtúbulos se ajustan correctamente a un modelo térmico, con una $lp^* \ll lp$ medida *in vitro*. Interpretamos este comportamiento como un balance de fuerzas activas dentro de las células, i.e. procesos activos distribuidos aleatoriamente. Pudimos comprobar la ruptura de este equilibrio al eliminar las fuerzas de polimerización/depimerización de los filamentos (figura 4.13).

Además, estudiamos dos aspectos de la dinámica de los microtúbulos: el movimiento lateral y los eventos de *buckling*. En el caso del movimiento lateral, observamos una vez más la manifestación de eventos de origen activo organizados de forma térmica: el análisis de trayectorias laterales de segmentos de microtúbulos con un modelo de difusión anómala a escalas de tiempo pequeñas resultó en un exponente con una gran dispersión y valores medios cercanos a 1 (figura 5.2), indicando que los microtúbulos están sometidos a procesos activos y pasivos.

Pudimos evaluar también el efecto de las redes del citoesqueleto sobre el movimiento lateral de los microtúbulos y concluimos que tanto los filamentos de actina como los filamentos intermedios confinan su movimiento, siendo los filamentos de actina los que tienen mayor efecto (figura 5.2).

Al mapear el movimiento en regiones de la célula hallamos que los microtúbulos en la periferia celular, donde la densidad de la red de actina es mayor, tienen un movimiento más dirigido pero a su vez presentan una mayor restricción en el área recorrida (figura 5.3).

Ambos resultados sugieren que los filamentos de actina se encuentran ligados a los microtúbulos, a tal punto que restringen su movimiento. Por otra parte, el comportamiento superdifusivo hallado en escalas temporales mayores son un claro indicador de que los microtúbulos son dirigidos por fuerzas activas dentro de las células.

El estudio de los eventos de *buckling* de microtúbulos tuvo dos abordajes. Por un lado realizamos un estudio numérico, basado en simulaciones de filamentos deformándose bajo la acción de distintas fuerzas. Este estudio permitió analizar en detalle las diferencias en la evolución de la deformación en función de la magnitud, punto de aplicación y dirección de las fuerzas a las que se ve sometido el filamento (figuras 6.4, 6.5, 6.7, 6.8, 6.9 y 6.10). También evaluamos la influencia de la longitud del filamento (figura 6.11) y las condiciones de borde (figura 6.12) en las tasas de relajación.

A partir de los resultados de las simulaciones numéricas, propusimos estudiar eventos de *buckling* de microtúbulos en células vivas en búsqueda de indicios que nos sugieran el origen de las fuerzas que los generan. Logramos caracterizar estos eventos tanto espacial como temporalmente, y observamos comportamientos en la evolución

de la amplitud de acuerdo con lo observado en las simulaciones. Corroboramos que los procesos de polimerización/depimerización no tienen una influencia significativa en la generación de eventos de *buckling*. Sin embargo, hallamos que la eliminación de estos procesos afecta las características espaciales de dichos eventos, resultando en *bucklings* de mayor amplitud y dimensión.

Para explorar en profundidad estos eventos, decidimos utilizar una técnica de microscopía de dos canales para correlacionar eventos de transporte activo de endosomas con eventos de *buckling*. Notamos que los filamentos pueden actuar como barreras para el transporte, ante las cuales puede darse una reversión o incluso un cambio de filamento a lo largo del cual se lleva a cabo el transporte. Esta interacción entre los filamentos y las cargas no había sido reportado hasta donde sabemos.

Por último, extendimos los estudios del citoesqueleto al análisis de células cáncer de próstata. En este punto, estudiamos la influencia de la inducción de HO-1 en las propiedades mecánicas y en la organización del citoesqueleto en células PC3. Hallamos que las células bajo la inducción de HO-1 se encuentran más cercanas a sus vecinas (figura 8.2). Este resultado sugiere que existe una mayor interacción entre las células, lo cual podría disminuir la invasión.

Al explorar el efecto de HO-1 en las redes del citoesqueleto concluimos que los microtúbulos no presentan modificaciones en sus propiedades mecánicas (figura 8.3), pero los filamentos de actina parecen organizarse en forma diferente en la periferia celular (figura 8.4). Las células de cáncer de próstata presentan filopodias que en muchos casos se extienden de una célula a otra. Nuestros resultados mostraron un claro aumento en la cantidad de filopodias y contactos entre células al ser tratadas con hemina (figura 8.7). A partir de esta observación concluimos que HO-1 tiene un efecto indirecto sobre la red de actina en células PC3, induciendo la formación de más filopodias que no sólo anclarían a las células al medio extracelular sino que también aumentarían la interacción entre células. Estos cambios morfológicos disminuirían las probabilidades de migración e invasión de células individuales.

A partir del trabajo realizado en esta tesis surgieron preguntas e hipótesis que pueden ser exploradas en trabajos futuros.

Por un lado, continuando el estudio de las propiedades mecánicas de los filamentos, sería interesante determinar la lp^* de los filamentos de actina e intermedios en células vivas. La morfología de dichas redes hace prácticamente imposible poder identificar filamentos individuales dentro de las células con técnicas de microscopía óptica convencionales. Por este motivo, la combinación de AFTER con la extensión para analizar imágenes de superresolución, como STORM, resulta una herramienta ideal para analizar filamentos de actina y filamentos intermedios individuales.

Por otra parte, queda por explorar en más profundidad cómo diversas fuerzas activas influyen en la lp^* y en el comportamiento símil-térmico de las formas de los filamentos dentro de la célula. Eliminando selectivamente distintas fuerzas activas, podríamos alejarnos de este equilibrio aparente y evaluar la influencia de cada actor por separado.

A partir de los resultados obtenidos en células en las cuales inhibimos los procesos de polimerización y depolimerización de microtúbulos desarrollamos una hipótesis con respecto a la influencia de dichos procesos en las propiedades mecánicas y en la compresión acumulada en los filamentos. Adjudicamos los cambios observados en la lp^* y en las características espaciales de los eventos de *buckling* a la eliminación de los procesos de depolimerización. Los microtúbulos experimentan catástrofes repentinas cuando su extremo positivo se enfrenta con una barrera, de esta forma evitan estar sometidos a compresiones demasiado altas. Un aumento en la compresión de los filamentos podría explicar los cambios observados. Sería interesante explorar esta hipótesis, distinguiendo el efecto de la polimerización del de la depolimerización.

Los microtúbulos y filamentos de actina son las vías por las cuales se conduce el transporte intracelular mediado por motores moleculares. Por este motivo, una visión integral del fenómeno de transporte debería incluir la dinámica del citoesqueleto. Observamos que la dinámica de *buckling* de microtúbulos se encuentra asociada al transporte de cargas y que a su vez, en muchos de estos eventos de *buckling* ciertos filamentos actúan como barrera para el transporte. Por estos motivos, sería importante unificar los estudios del citoesqueleto con aquellos de transporte intracelular en un futuro cercano.

Apéndice

Apéndice A

Abreviaturas usadas

ATP	Trifosfato de adenosina ($C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$)
ADP	Difosfato de adenosina ($C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$)
DIC	Microscopía de Contraste Diferencial interferencial
EGFP	Proteína verde fluorescente
GDP	Difosfato de guanosina ($C_{10}H_{15}N_5O_{11}P_2$)
GTP	Trifosfato de guanosina ($C_{10}H_{16}N_5O_{14}P_3$)
LB	Caldo de Lisogenia
MAP	Proteína asociada a microtúbulos
NA	Apertura numérica
ON	Durante toda la noche
PBS	Buffer fosfato salino
PEG	Polietilenglicol ($C_{2n+2}H_{4n+6}O_{n+2}$)
PFA	Paraformadeihdo ($HO(CH_2O)_nH$)
PSF	Función de dispersión de punto
PTU	Fenilurea ($C_7H_8N_2S$)
S/N	Relación señal a ruido
STORM	<i>Stochastic Optical Reconstruction Microscopy</i>
XTP	Proteína tipo-tau de <i>Xenopus laevis</i>

Bibliografía

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Ra, M, Roberts, K. *y col. Molecular Biology of the Cell*. (Garland Science Taylor & Francis Group, 2002).
2. Howard, J. *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton* (Sinauer Associates Sunderland, 2001).
3. Cooper, G. M. y Hausman, R. E. *The cell* (Sinauer Associates Sunderland, 2000).
4. Nürnberg, A., Kitzing, T. y Grosse, R. Nucleating actin for invasion. *Nature reviews. Cancer* **11**, 177 (2011).
5. Pollard, T. D., Blanchoin, L. y Mullins, R. D. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **29**, 545-576 (2000).
6. Lo, C.-M., Wang, H.-B., Dembo, M. y Wang, Y.-l. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical journal* **79**, 144-152 (2000).
7. Paez, A. V. *y col.* Heme oxygenase-1 in the forefront of a multi-molecular network that governs cell – cell contacts and filopodia-induced zippering in prostate cancer. *Nature Publishing Group* **7**, e2570-16. ISSN: 2041-4889 (2016).
8. Lietha, D. *y col.* Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell* **129**, 1177-1187 (2007).
9. Fuchs, E. y Weber, K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annual review of biochemistry* **63**, 345-382 (1994).
10. Strelkov, S. V., Herrmann, H. y Aebl, U. Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* **25**, 243-251 (2003).
11. Chang, L. y Goldman, R. D. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 601 (2004).
12. Fruleux, A. y Hawkins, R. J. Physical role for the nucleus in cell migration. *Journal of Physics: Condensed Matter* **28**, 363002 (2016).

13. Akhmanova, A. y Steinmetz, M. O. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 309 (2008).
14. Desai, A. y Mitchison, T. J. Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology* **13**, 83-117 (1997).
15. Shaw, S. L., Kamyar, R. y Ehrhardt, D. W. Sustained microtubule treadmilling in Arabidopsis cortical arrays. *Science* **300**, 1715-1718 (2003).
16. Mitchison, T., Kirschner, M. y col. Dynamic instability of microtubule growth. *nature* **312**, 237-242 (1984).
17. Dixit, R. y Cyr, R. Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through angle-dependent modifications of microtubule behavior. *The Plant Cell* **16**, 3274-3284 (2004).
18. Chi, Z. y Ambrose, C. Microtubule encounter-based catastrophe in Arabidopsis cortical microtubule arrays. *BMC Plant Biology* **16**, 18. ISSN: 1471-2229 (2016).
19. Janson, M. E., De Dood, M. E. y Dogterom, M. Dynamic instability of microtubules is regulated by force. *Journal of Cell Biology* **161**, 1029-1034. ISSN: 00219525 (2003).
20. Mandelkow, E. y Mandelkow, E.-M. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Current opinion in cell biology* **7**, 72-81 (1995).
21. Pringle, J. y col. Microtubule organization by kinesin motors and microtubule crosslinking protein MAP65. *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal* **25**, 374103. ISSN: 1361-648X (sep. de 2013).
22. Köhler, S., Schaller, V. y Bausch, A. R. Collective dynamics of active cytoskeletal networks. *PloS one* **6**, e23798. ISSN: 1932-6203 (ene. de 2011).
23. Kent, I. A., Rane, P. S., Dickinson, R. B., Ladd, A. J. y Lele, T. P. Transient pinning and pulling: a mechanism for bending microtubules. *PloS one* **11**, e0151322 (2016).
24. Clark, E. A., Brugge, J. S. y col. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-*, 233-233 (1995).
25. Samsonov, A., Yu, J.-Z., Rasenick, M. y Popov, S. V. Tau interaction with microtubules in vivo. *Journal of Cell Science* **117**, 6129-6141 (2004).
26. Felgner, H., Frank, R. y Schliwa, M. Flexural rigidity of microtubules measured with the use of optical tweezers. *Journal of cell science* **109**, 509-516 (1996).

27. Mickey, B y Howard, J. Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents. *The Journal of cell biology* **130**, 909-17. ISSN: 0021-9525 (ago. de 1995).
28. Portran, D y col. MAP65/Ase1 promote microtubule flexibility. *Molecular biology of the cell* **24**. ISSN: 1939-4586. doi:10 . 1091 /mbc . E13 - 03 - 0141 (2013).
29. Rodionov, V., Yi, J., Kashina, A., Oladipo, A. y Gross, S. P. Switching between microtubule-and actin-based transport systems in melanophores is controlled by cAMP levels. *Current Biology* **13**, 1837-1847 (2003).
30. Gross, S. P. y col. Interactions and regulation of molecular motors in *Xenopus* melanophores. *The Journal of cell biology* **156**, 855-865 (2002).
31. Langford, G. M. Actin-and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Current opinion in cell biology* **7**, 82-88 (1995).
32. Morris, R. y Hollenbeck, P. Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *The Journal of cell biology* **131**, 1315-1326 (1995).
33. Apodaca, G. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* **2**, 149-159 (2001).
34. Bicek, A. D. y col. Anterograde Microtubule Transport Drives Microtubule Bending in LLC-PK1 Epithelial Cells. *Molecular biology of the cell* **20**, 2943-2953 (2009).
35. Brangwynne, C. P., MacKintosh, F. C. y Weitz, D. a. Force fluctuations and polymerization dynamics of intracellular microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 16128-33. ISSN: 0027-8424 (oct. de 2007).
36. Longoria, R. a. y Shubeita, G. T. Cargo transport by cytoplasmic Dynein can center embryonic centrosomes. *PloS one* **8**, e67710. ISSN: 1932-6203 (ene. de 2013).
37. Oakes, P., Banerjee, S., Marchetti, M. y Gardel, M. Geometry Regulates Traction Stresses in Adherent Cells. *Biophysical Journal* **107**, 825-833. ISSN: 00063495 (2014).
38. Nascimento, A. a., Roland, J. T. y Gelfand, V. I. Pigment cells: a model for the study of organelle transport. *Annual review of cell and developmental biology* **19**, 469-91. ISSN: 1081-0706 (ene. de 2003).

39. Vale, R. D. y Milligan, R. A. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* **288**, 88-95 (2000).
40. Alberts, B. *Molecular biology of the cell* (Garland science, 2017).
41. Mallik, R. y Gross, S. P. Molecular motors: strategies to get along. *Current Biology* **14**, R971-R982 (2004).
42. Wells, A. L., Lin, A. W., Li-Qiong, C., Safer, D. y col. Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* **401**, 505 (1999).
43. Vale, R. D. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467-480 (2003).
44. Mandelkow, E. y Hoenger, A. Structures of kinesin and kinesin-microtubule interactions. *Current opinion in cell biology* **11**, 34-44 (1999).
45. Woehlke, G. y Schliwa, M. Directional motility of kinesin motor proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1496**, 117-127 (2000).
46. Schnitzer, M. J. y Block, S. M. Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature* **388**, 386 (1997).
47. Toba, S., Watanabe, T. M., Yamaguchi-Okimoto, L., Toyoshima, Y. Y. e Higuchi, H. Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 5741-5745 (2006).
48. Reck-Peterson, S. L. y col. Single-molecule analysis of dynein processivity and stepping behavior. *Cell* **126**, 335-348 (2006).
49. Gennerich, A., Carter, A. P., Reck-Peterson, S. L. y Vale, R. D. Force-induced bidirectional stepping of cytoplasmic dynein. *Cell* **131**, 952-965 (2007).
50. Gennerich, A. y Vale, R. D. Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. *Current opinion in cell biology* **21**, 59-67 (2009).
51. Rock, R. S. y col. Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 13655-13659 (2001).
52. Yamada, S., Wirtz, D. y Kuo, S. C. Mechanics of living cells measured by laser tracking microrheology. *Biophysical Journal* **78**, 1736-1747 (2000).
53. Schnitzer, M. J., Visscher, K. y Block, S. M. Force production by single kinesin motors. *Nature cell biology* **2**, 718 (2000).
54. Svoboda, K. y Block, S. M. Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell* **77**, 773-784 (1994).

55. Mallik, R., Carter, B. C., Lex, S. A., King, S. J. y Gross, S. P. Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. *Nature* **427**, 649 (2004).
56. Leidel, C., Longoria, R. A., Gutierrez, F. M. y Shubeita, G. T. Measuring molecular motor forces in vivo: implications for tug-of-war models of bidirectional transport. *Biophysical journal* **103**, 492-500 (2012).
57. Vershinin, M., Carter, B. C., Razafsky, D. S., King, S. J. y Gross, S. P. Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 87-92 (2007).
58. Levi, V., Serpinskaya, A. S., Gratton, E. y Gelfand, V. Organelle transport along microtubules in *Xenopus melanophores*: evidence for cooperation between multiple motors. *Biophysical journal* **90**, 318-327 (2006).
59. Wu, J. y col. Effects of dynein on microtubule mechanics and centrosome positioning. *Molecular biology of the cell* **22**, 4834-41. ISSN: 1939-4586 (dic. de 2011).
60. Hell, S. W., Lindek, S., Cremer, C. y Stelzer, E. H. K. Confocal microscopy with an increased detection aperture: type-B 4Pi confocal microscopy. *Opt. Lett.* **19**, 222-224 (1994).
61. Joo, C., Balci, H., Ishitsuka, Y., Buranachai, C. y Ha, T. Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 51-76 (2008).
62. Wayne, R. O. *Light and video microscopy* (Academic Press, 2013).
63. Webb, R. H. Confocal optical microscopy. *Reports on Progress in Physics* **59**, 427 (1996).
64. Inoué, S. en *Handbook of biological confocal microscopy* 1-19 (Springer, 2006).
65. Rust, M. J., Bates, M. y Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature methods* **3**, 793-796 (2006).
66. Rust, M. J., Bates, M. y Zhuang, X. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) provides sub-diffraction-limit image resolution. *Nature methods* **3**, 793 (2006).
67. Bates, M., Jones, S. A. y Zhuang, X. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM): a method for superresolution fluorescence imaging. *Cold Spring Harbor Protocols* **2013**, pdb-top075143 (2013).
68. Cheezum, M. K., Walker, W. F. y Guilford, W. H. Quantitative Comparison of Algorithms for Tracking Single Fluorescent Particles. *Biophysical journal* **81**, 2378-2388 (2001).

69. Yildiz, A. *y col.* Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *science* **300**, 2061-2065 (2003).
70. Gittes, F, Mickey, B, Nettleton, J y Howard, J. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *The Journal of cell biology* **120**, 923-34. ISSN: 0021-9525 (feb. de 1993).
71. Käs, J *y col.* F-actin, a model polymer for semiflexible chains in dilute, semi-dilute, and liquid crystalline solutions. *Biophysical journal* **70**, 609-25. ISSN: 0006-3495 (feb. de 1996).
72. Janson, M. E. y Dogterom, M. A bending mode analysis for growing microtubules: evidence for a velocity-dependent rigidity. *Biophysical journal* **87**, 2723-36. ISSN: 0006-3495 (oct. de 2004).
73. Brangwynne, C. P. *y col.* Bending dynamics of fluctuating biopolymers probed by automated high-resolution filament tracking. *Biophysical journal* **93**, 346-59. ISSN: 0006-3495 (jul. de 2007).
74. Valdman, D., Atzberger, P. J., Yu, D., Kuei, S. y Valentine, M. T. Spectral analysis methods for the robust measurement of the flexural rigidity of biopolymers. *Biophysical journal* **102**, 1144-1153 (2012).
75. Ruhnnow, F., Zwicker, D. y Diez, S. Tracking single particles and elongated filaments with nanometer precision. *Biophysical journal* **100**, 2820-8. ISSN: 1542-0086 (jun. de 2011).
76. Ben Avraham, D. y Tirion, M. M. Dynamic and elastic properties of F-actin: a normal-modes analysis. *Biophysical Journal* **68**, 1231-1245 (1995).
77. Landau, L. D. y Lifshitz, E. Theory of Elasticity, vol. 7. *Course of Theoretical Physics* **3**, 109 (1986).
78. Pritchard, R. H., Shery Huang, Y. Y. y Terentjev, E. M. Mechanics of biological networks: from the cell cytoskeleton to connective tissue. *Soft Matter* **10**, 1864. ISSN: 1744-683X (2014).
79. Brinkers, S., Dietrich, H. R., de Groote, F. H., Young, I. T. y Rieger, B. The persistence length of double stranded DNA determined using dark field tethered particle motion. *The Journal of chemical physics* **130**, 06B607 (2009).
80. Lodish, H. *y col.* Molecular cell biology 4th edition. *National Center for Biotechnology Information's Bookshelf* (2000).
81. Inagaki, M. *y col.* Regulation of assembly-disassembly of intermediate filaments in vitro. *Cell structure and function* **14**, 279-286 (1989).

82. Heins, S. *y col.* The rod domain of NF-L determines neurofilament architecture, whereas the end domains specify filament assembly and network formation. *The Journal of cell biology* **123**, 1517-1533 (1993).
83. Hohenadl, M., Storz, T., Kirpal, H., Kroy, K. y Merkel, R. Desmin filaments studied by quasi-elastic light scattering. *Biophysical journal* **77**, 2199-2209 (1999).
84. Cameron, L. A., Svitkina, T. M., Vignjevic, D., Theriot, J. A. y Borisy, G. G. Dendritic organization of actin comet tails. *Current Biology* **11**, 130-135 (2001).
85. Berro, J., Sirotkin, V. y Pollard, T. D. Mathematical modeling of endocytic actin patch kinetics in fission yeast: disassembly requires release of actin filament fragments. *Molecular biology of the cell* **21**, 2905-2915 (2010).
86. Kamasaki, T., Osumi, M. y Mabuchi, I. Three-dimensional arrangement of F-actin in the contractile ring of fission yeast. *J Cell Biol* **178**, 765-771 (2007).
87. Van Mameren, J., Vermeulen, K. C., Gittes, F. y Schmidt, C. F. Leveraging single protein polymers to measure flexural rigidity. *The Journal of Physical Chemistry B* **113**, 3837-3844 (2009).
88. Reif, F. *Statistical thermal physics* (Mcgraw-Hill Kogakusha, 1965).
89. Bicek, A. D., Tüzel, E., Kroll, D. M. y Odde, D. J. Analysis of microtubule curvature. *Methods in cell biology* **83**, 237-68. ISSN: 0091-679X (ene. de 2007).
90. Rauch, P., Heine, P., Goettgens, B. y Käs, J. a. Forces from the rear: deformed microtubules in neuronal growth cones influence retrograde flow and advancement. *New Journal of Physics* **15**, 015007. ISSN: 1367-2630 (ene. de 2013).
91. Brangwynne, C. P. *y col.* Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *The Journal of cell biology* **173**, 733-41. ISSN: 0021-9525 (jun. de 2006).
92. Dogterom, M., Bernard, Y. y Dogterom, M. Bernard, Y. Measurement of the Force-Velocity Relation for Growing Microtubules. *Science* **278**, 856-860. ISSN: 00368075 (1997).
93. Fygenson, D. K., Marko, J. F. y Libchaber, A. Mechanics of microtubule-based membrane extension. *Physical review letters* **79**, 4497 (1997).
94. Dogterom, M., Kerssemakers, J. W., Romet-Lemonne, G. y Janson, M. E. Force generation by dynamic microtubules. *Current opinion in cell biology* **17**, 67-74 (2005).

95. Brangwynne, C., Koenderink, G., MacKintosh, F. y Weitz, D. Nonequilibrium Microtubule Fluctuations in a Model Cytoskeleton. *Physical Review Letters* **100**, 118104. ISSN: 0031-9007 (mar. de 2008).
96. Gupton, S. L., Salmon, W. C. y Waterman-Storer, C. M. Converging populations of f-actin promote breakage of associated microtubules to spatially regulate microtubule turnover in migrating cells. *Current biology* **12**, 1891-1899 (2002).
97. Gittes, F, Meyhöfer, E, Baek, S y Howard, J. Directional loading of the kinesin motor molecule as it buckles a microtubule. *Biophysical journal* **70**, 418-29. ISSN: 0006-3495 (ene. de 1996).
98. Kulić, I. M. y col. The role of microtubule movement in bidirectional organelle transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 10011-10016 (2008).
99. Jolly, A. L. y Gelfand, V. I. Cytoplasmic microtubule sliding: An unconventional function of conventional kinesin. *Communicative & integrative biology* **3**, 589-591 (2010).
100. Schaap, I. A., Carrasco, C., de Pablo, P. J., MacKintosh, F. C. y Schmidt, C. F. Elastic response, buckling, and instability of microtubules under radial indentation. *Biophysical journal* **91**, 1521-1531 (2006).
101. Rogers, S. L. y Gelfand, V. I. Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. *Current biology : CB* **8**, 161-4. ISSN: 0960-9822 (ene. de 1998).
102. Rodionov, V. I., Hope, A. J., Svitkina, T. M. y Borisy, G. Functional coordination of microtubule-based and actin-based motility in melanophores. *Current Biology* **8**, 165-169 (1998).
103. Dhamodharan, R., Jordan, M. A., Thrower, D., Wilson, L. y Wadsworth, P. Vinblastine Suppresses Dynamics of Individual Microtubules in Living Interphase Cells. *Molecular Biology of the Cell* **6**, 1215-1229. ISSN: 1059-1524 (1995).
104. Robert, A., Herrmann, H., Davidson, M. W. y Gelfand, V. I. Microtubule-dependent transport of vimentin filament precursors is regulated by actin and by the concerted action of Rho-and p21-activated kinases. *The FASEB Journal* **28**, 2879-2890 (2014).
105. Kural, C. y col. Tracking melanosomes inside a cell to study molecular motors and their interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 5378-5382 (2007).

106. Chang, L. *y col.* The dynamic properties of intermediate filaments during organelle transport. *Journal of cell science* **122**, 2914-23. ISSN: 0021-9533 (ago. de 2009).
107. Ausubel, F. M. *y col.* Short protocols in molecular biology (1992).
108. Wilcoxon, F. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin* **1**, 80-83. ISSN: 00994987 (1945).
109. Kulesa, A., Krzywinski, M., Blainey, P. y Altman, N. Points of significance: sampling distributions and the bootstrap. *Nature Methods* **12**, 477-478 (2015).
110. Freedman, D. y Diaconis, P. On the histogram as a density estimator:L2 theory. *Zeitschrift für Wahrscheinlichkeitstheorie und Verwandte Gebiete* **57**, 453-476. ISSN: 1432-2064 (1981).
111. Wasserman, P. D. *Advanced methods in neural computing* (John Wiley & Sons, Inc., 1993).
112. Haykin, S. *Neural networks: a comprehensive foundation* (Prentice Hall PTR, 1994).
113. Blanter, Y. M. y Büttiker, M. Shot noise in mesoscopic conductors. *Physics reports* **336**, 1-166 (2000).
114. Thompson, R. E., Larson, D. R. y Webb, W. W. Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes. *Biophysical Journal* **82**, 2775-2783 (2002).
115. Levi, V. y Gratton, E. Exploring dynamics in living cells by tracking single particles. *Cell biochemistry and biophysics* **48**, 1 (2007).
116. Fletcher, D. A. y Mullins, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485 (2010).
117. Goldstein, D., Elhanan, T., Aronovitch, M. y Weihs, D. Origin of active transport in breast-cancer cells. *Soft Matter* **9**, 7167-7173 (2013).
118. Tsutsui, H., Ishihara, K. y Cooper IV, G. Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Science* **260**, 682-688 (1993).
119. Tsutsui, H. *y col.* Role of microtubules in contractile dysfunction of hypertrophied cardiocytes. *Circulation* **90**, 533-555 (1994).
120. Pallavicini, C. *y col.* Lateral motion and bending of microtubules studied with a new single-filament tracking routine in living cells. *Biophysical Journal*. ISSN: 15420086. doi:10.1016/j.bpj.2014.04.046 (2014).

121. Wang, N y col. Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7765-70. ISSN: 0027-8424 (jul. de 2001).
122. De Rossi, M. C., Bruno, L., Wolosiuk, A., Despósito, M. A. y Levi, V. When size does matter: organelle size influences the properties of transport mediated by molecular motors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1830**, 5095-5103 (2013).
123. Brangwynne, C. P., Koenderink, G. H., MacKintosh, F. C. y Weitz, D. A. Intracellular transport by active diffusion. *Trends in cell biology* **19**, 423-427 (2009).
124. McMaster, M. L., Kristinsson, S. Y., Turesson, I., Bjorkholm, M. y Landgren, O. NIH Public Access. *Clinical Lymphoma* **9**, 19-22. ISSN: 1878-5832 (2010).
125. Brunstein, M., Bruno, L., Desposito, M. y Levi, V. Anomalous dynamics of melanosomes driven by myosin-V in *Xenopus laevis* melanophores. *Biophysical journal* **97**, 1548-1557 (2009).
126. Bruno, L, Levi, V, Brunstein, M y Despósito, M. Transition to superdiffusive behavior in intracellular actin-based transport mediated by molecular motors. *Physical Review E* **80**, 011912 (2009).
127. Saxton, M. J. y Jacobson, K. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **26**, 373-399 (1997).
128. Tolić-Nørrelykke, I. M., Munteanu, E.-L., Thon, G., Oddershede, L. y Berg-Sørensen, K. Anomalous diffusion in living yeast cells. *Physical Review Letters* **93**, 078102 (2004).
129. Wong, I. y col. Anomalous diffusion probes microstructure dynamics of entangled F-actin networks. *Physical review letters* **92**, 178101 (2004).
130. Gal, N. y Weihs, D. Experimental evidence of strong anomalous diffusion in living cells. *Physical Review E* **81**, 020903 (2010).
131. Metzner, C, Raupach, C, Zitterbart, D. P. y Fabry, B. Simple model of cytoskeletal fluctuations. *Physical Review E* **76**, 021925 (2007).
132. Robert, D., Aubertin, K., Bacri, J.-C. y Wilhelm, C. Magnetic nanomanipulations inside living cells compared with passive tracking of nanoprobe to get consensus for intracellular mechanics. *Physical Review E* **85**, 011905 (2012).
133. Gardel, M. L., Kasza, K. E., Brangwynne, C. P., Liu, J. y Weitz, D. a. Chapter 19: Mechanical response of cytoskeletal networks. *Methods in cell biology* **89**, 487-519. ISSN: 0091-679X (ene. de 2008).

134. Brito, D. A. *y col.* Pushing Forces Drive the Comet-like Motility of Microtubule Arrays in Dictyostelium. *Molecular biology of the cell* **16**, 3334-3340 (2005).
135. Caspi, A., Granek, R. y Elbaum, M. Diffusion and directed motion in cellular transport. *Physical Review E* **66**, 011916 (2002).
136. Tolić-Nørrelykke, I. M., Munteanu, E.-L., Thon, G., Oddershede, L. y Berg-Sørensen, K. Anomalous diffusion in living yeast cells. *Physical Review Letters* **93**, 078102 (2004).
137. Raupach, C. *y col.* Stress fluctuations and motion of cytoskeletal-bound markers. *Physical Review E* **76**, 011918 (2007).
138. Bursac, P. *y col.* Cytoskeleton dynamics: fluctuations within the network. *Biochemical and biophysical research communications* **355**, 324-330 (2007).
139. Zhou, F.-Q., Waterman-Storer, C. M. y Cohan, C. S. Focal loss of actin bundles causes microtubule redistribution and growth cone turning. *The Journal of cell biology* **157**, 839-49. ISSN: 0021-9525 (mayo de 2002).
140. Wang, N., Butler, J. P. e Ingber, D. E. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 1124-1127 (1993).
141. Katsumi, A., Orr, A. W., Tzima, E. y Schwartz, M. A. Integrins in mechanotransduction. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 12001-12004 (2004).
142. Biswas, A., Manivannan, M y Srinivasan, M. A. Vibrotactile sensitivity threshold: Nonlinear stochastic mechanotransduction model of the Pacinian corpuscle. *IEEE transactions on haptics* **8**, 102-113 (2015).
143. Shekhar, N. *y col.* Fluctuating motor forces bend growing microtubules. *Cellular and molecular bioengineering* **6**, 120-129 (2013).
144. Gauger, E. y Stark, H. Numerical study of a microscopic artificial swimmer. *Physical Review E* **74**, 021907 (2006).
145. Kratky, O y Porod, G. Röntgenuntersuchung gelöster fadenmoleküle. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **68**, 1106-1122 (1949).
146. Jin, M. y Ru, C. Localized buckling of a microtubule surrounded by randomly distributed cross linkers. *Physical Review E* **88**, 012701 (2013).
147. Pratt, J. W. y Gibbons, J. D. en *Concepts of Nonparametric Theory* 318-344 (Springer, 1981).
148. Newman, M. E. Power laws, Pareto distributions and Zipf's law. *Contemporary physics* **46**, 323-351 (2005).

149. Berger, F., Keller, C., Mueller, M. J., Klumpp, S. y Lipowsky, R. *Co-operative transport by molecular motors* 2011.
150. Gross, S. P., Vershinin, M. y Shubeita, G. T. Cargo transport: two motors are sometimes better than one. *Current Biology* **17**, R478-R486 (2007).
151. Beeg, J. y col. Transport of beads by several kinesin motors. *Biophysical journal* **94**, 532-541 (2008).
152. Hendricks, A. G., Holzbaur, E. L. F. y Goldman, Y. E. Force measurements on cargoes in living cells reveal collective dynamics of microtubule motors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 18447-52. ISSN: 1091-6490 (nov. de 2012).
153. Le Clainche, C. y Carlier, M.-F. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological reviews* **88**, 489-513 (2008).
154. Gueron, G. y col. Critical role of endogenous heme oxygenase 1 as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells. *Molecular cancer research* **7**, 1745-1755 (2009).
155. Matsumoto, H., Ishikawa, K., Itabe, H. y Maruyama, Y. Carbon monoxide and bilirubin from heme oxygenase-1 suppresses reactive oxygen species generation and plasminogen activator inhibitor-1 induction. *Molecular and cellular biochemistry* **291**, 21-28 (2006).
156. Otterbein, L. E., Soares, M. P., Yamashita, K. y Bach, F. H. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends in immunology* **24**, 449-455 (2003).
157. Keyse, S. M. y Tyrrell, R. M. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 99-103 (1989).
158. Jozkowicz, A., Was, H. y Dulak, J. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxidants & redox signaling* **9**, 2099-2118 (2007).
159. Gueron, G. y col. Heme-oxygenase-1 implications in cell morphology and the adhesive behavior of prostate cancer cells. *Oncotarget* **5**, 4087 (2014).
160. Ferrando, M y col. Heme oxygenase 1 (HO-1) challenges the angiogenic switch in prostate cancer. *Angiogenesis* **14**, 467-479 (2011).
161. Kim, H. M. y col. A Two-Photon Fluorescent Probe for Lipid Raft Imaging: C-Laurdan. *ChemBioChem* **8**, 553-559 (2007).

162. Cooper, J. A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of cell biology* **105**, 1473-1478 (1987).
163. Mohamedali, K. A. *y col.* Inhibition of prostate cancer osteoblastic progression with VEGF121/rGel, a single agent targeting osteoblasts, osteoclasts, and tumor neovasculature. *Clinical Cancer Research* **17**, 2328-2338 (2011).
164. Sudo, H., Kodama, H.-A., Amagai, Y., Yamamoto, S. y Kasai, S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *The Journal of cell biology* **96**, 191-198 (1983).
165. Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M. y Fuchs, E. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* **100**, 209-219 (2000).
166. Bowser, J. L. *y col.* Loss of CD73-mediated actin polymerization promotes endometrial tumor progression. *The Journal of clinical investigation* **126**, 220 (2016).
167. Stevenson, R. P., Veltman, D. y Machesky, L. M. Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance. *J Cell Sci* **125**, 1073-1079 (2012).
168. Fan, H. y Li, S. Modeling microtubule cytoskeleton via an active liquid crystal elastomer model. *Computational Materials Science* **96**, 559-566. ISSN: 09270256 (2015).