



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTUDIO DE MOVIMIENTO DE CENTRIOLOS EN CELULAS VIVAS”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
F I S I C O
P R E S E N T A:
PABLO MEYER ROJAS



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARIA ESTER BRANDAN SIQUES

2002

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Estudio de movimiento de centriolos en células vivas"

realizado por MEYER ROJAS PABLO

con número de cuenta 9550453-7 , quién cubrió los créditos de la carrera de Física.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Propietario

Propietario

Suplente

Suplente

DRA. MARIA ESTER BRANDAN SIQUES

DR. RAMON PERALTA FABI

DR. TZUTZUY RAMIREZ HERNANDEZ

DR. ERNESTO BELMONT MORENO

DR. HECTOR MENDEZ LANGO

Ursula Este Brandan

Ramon Peralta Fabi

Tzutzuy Ramirez Hernandez

Hector Mendez L.

Consejo Departamental de Física

Patricia Goldstein Menache

DRA. PATRICIA GOLDSTEIN MENACHE

Coordinadora de Licenciatura

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Estudio del movimiento de centriolos

Presentación y agradecimientos:

Llevé a cabo el trabajo experimental de mi tesis en el INSTITUT CURIE (París Francia) de febrero a junio de 1999 con el grupo de Michel Bornens, en el Laboratorio de BIOLOGÍA DEL CICLO CELULAR.

Trabajé principalmente con Matthieu Piel, un estudiante de Física haciendo su doctorado en biología. En este laboratorio se estudia principalmente el centrosoma de células animales.

El centrosoma es un organelo celular que como su nombre lo indica se encuentra en el centro geométrico de la célula. Aún no se determina con certeza que es lo que le permite encontrarse en el centro y conservar esta posición, pero estudios en conjunto de física y biología han permitido comprender mejor sus propiedades.

Esto explica el trabajo que se realizó en conjunto con Olivier Cardoso y Virginie Emsellem de el Laboratorio de física estadística (LPS) de la ECOLE NORMALE SUPERIEURE, que tiene la ventaja de estar a una cuadra del Instituto Curie.

Maria Ester Brandan dirigió mi tesis y discutimos el modelo y los análisis de los experimentos hechos en Francia. Todo nació en Grenoble, en febrero del 99 y continuó durante visitas en viajes de Nueva York a México entre el 2000 y el 2002, mientras arreglaba papeles, me inmiscuí en la huelga del 99.

Quiero agradecerte Maria Ester tu paciencia y apoyo incondicional en estos años, además de perdonarme el número de veces que escribí tu nombre con aache "h".

Esto va en recuerdo a esos fenomenales años que pasé en la UNAM. Años que cambiaron para siempre mi vida y unieron mi futuro a México.

En recuerdo a los chanates-cuatro fantásticos (Enrico, Juan Valentín, Carlos, Gabo), a los chanates por adopción Javier, Carlos y Luis "tec", al acapulco Julio, al primo, al tuchik, a las locuras de Ernesto que lanzaba dardos a Cioran, a Cristian y Diego que plasmaron mis sentimientos(¿?) por Red en música... y claro a las florecitas de Ciencias, liliana (¿quién es liz?), isabel (cosquis), barbara (la prima), lorenza (gran maestra de baile) y thatali (la cafetera).

INDICE

Propósito	p.5
1. Introducción	p.6
1.1 Estructura del citoesqueleto	p.9
2. El Centrosoma, lugar de los centriolos	p.11
2.1 Definición-Función del centrosoma	p.11
2.2 Estructura del centrosoma	p.14
3.¿Cómo observar el movimiento de los centriolos ?	p.18
3.1 Sistema celular	p.19
3.2 Dispositivo de filmación	p.24
4.Resultados	p.26
4.1 Primeras observaciones: movimiento y asimetría	p.26
4.2 Asimetría estructural de los centriolos	p.30
4.3 Citoplastos con varios centriolos	p.34
4.4 Romper la asimetría	p.34
4.5 Otras fármacos: Taxol, Latrunculina, Bdm	p.41
4.6 Discusión	p.43

5. Modelo físico del movimiento	p.44
5.1 Los microtúbulos	p.44
5.2 Modelo físico de un centrosoma	p.49
5.3 Aplicación a los centriolos	p.53
6. Análisis de las trayectorias	p.57
6.1 Caracterización inicial de las trayectorias	p.57
6.2 Distribución angular de las trayectorias	p.59
6.3 Areas exploradas	p.67
6.4 Correlaciones entre los centriolos	p.67
7. Conclusión y perspectivas	p.69
Apéndices:	
Apéndice A: Videomicroscopía	p.71
Apéndice B: Cultivo de fibroblastos	p.72
Apéndice C: Anucleación de células	p.73
Apéndice D: Fijación e Inmunocitoquímica	p.73
Apéndice E: Programa de simulación	p.76
Apéndice F: Léxico	p.87
Bibliografía	p.91

Propósito

Los centriolos son dos estructuras cilíndricas sub-micrométricas que se encuentran en el centrosoma de las células eucariontes (células con núcleo). El centrosoma es el centro de nucleación de los microtúbulos. Estos son polímeros metastables que estructuran la célula y forman durante la división celular el huso bipolar en donde se alinean los cromosomas. A cada ciclo celular los centriolos se duplican de manera que las células resultantes heredan un par de centriolos. La división celular o mitosis no da inicio hasta que el ADN y los centriolos se hayan duplicado completamente.

Al iniciarse la mitosis los 4 centriolos forman dos polos (con dos centriolos cada uno) situados en las extremidades opuestas de la célula y de ahí irradian microtúbulos hacia el ecuador celular formando un entrelazamiento de microtúbulos llamado "huso bipolar". Los cromosomas migran a cada uno de estos polos de manera simétrica gracias a los microtúbulos y la división termina al separarse las células.

Hasta ahora éste había sido el papel conocido de los centriolos: centro de nucleación de microtúbulos y polos del huso mitótico. En este estudio nos proponemos buscar otros motivos de la existencia de estos organelos cilíndricos de estructura simétrica y cuya reproducción está perfectamente sincronizada con el ciclo celular.

La herramienta básica de este trabajo es la videomicroscopía fluorescente *in vivo*. Es decir filmar cultivos de células eucariontes cuyos centriolos han sido marcados con una proteína fluorescente (GFP) de manera a estudiar su comportamiento propio. Estudios preliminares que hemos hecho, nos muestran que estos centriolos se mueven notablemente.

La meta de esta tesis de física-biología es en una primera instancia utilizar fármacos que cambien la estructura de la célula (fármacos que actúan sobre el citoesqueleto) y en una segunda instancia herramientas de estadística para extraer las características y propiedades del movimiento de los centriolos además de explicar su origen con un modelo cinético basado en conceptos físicos.

1. Introducción

La aparición de vida en la Tierra data de alrededor de unos 3.85 billones de años, los primeros organismos que la poblaron tenían una capacidad metabólica y sistema genético muy simple y rudimentario. Sin embargo estos organismos invadieron todos los espacios sobre la Tierra, cambiando la atmósfera a un ambiente más propicio para que se desarrollaran otras formas de vida [Alb,1989]. En este proceso evolutivo, un hecho crucial que marcó la pauta para la aparición de un nuevo gran grupo de organismos fue la transición de los primeros procariontes u organismos sin núcleo a eucariontes (*fig. 1*) u organismos con núcleo, suceso que se dio hace 1 billón y medio de años. Para que se diera el paso de procarionte a eucarionte, sucedieron tres cambios fundamentales que revolucionaron y confirieron grandes ventajas a los nuevos organismos, estos fueron, la aparición: de un núcleo, de estructuras intermembranas y del citoesqueleto. Para un físico, la diferencia que salta a la vista es la del tamaño: Un procarionte mide en promedio 1 micra, y un eucarionte mide 30 micras. Esto implica una diferencia de escala importante en los fenómenos físicos. La innovación del núcleo, permitió la alta compartimentalización de la información genética, lo que a su vez confirió básicamente la independencia al medio y la capacidad interna preprogramada de regulación génica. Mientras que la aparición de estructuras internas permitió la compartimentalización de los procesos bioquímicos. La aparición del citoesqueleto permitió la coordinación entre el núcleo y el resto de las estructuras intermembranas, además de regular el transporte intra y extracelular [Alb,1989].

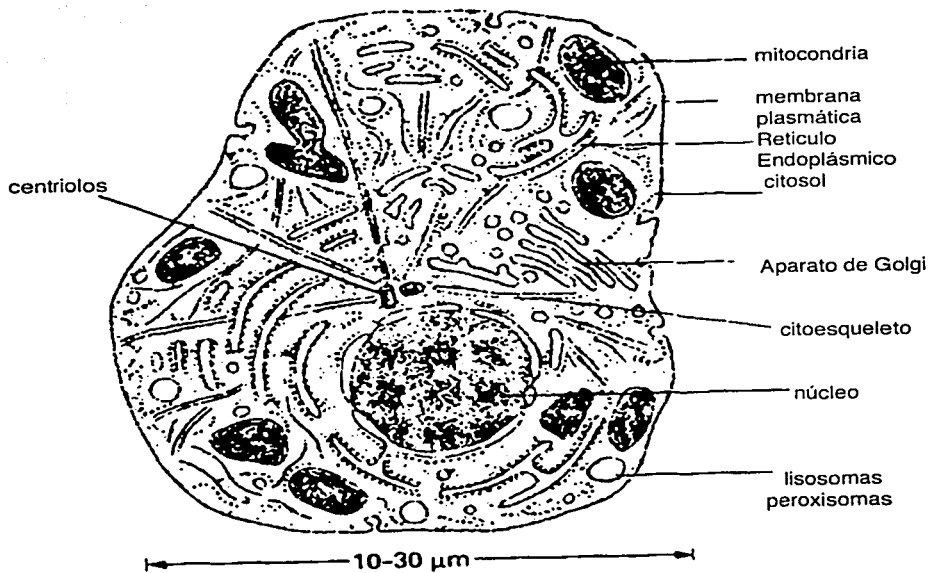


Figura 1. Célula Eucariote [Alb, 1989]

La organización interna de un eucarionte se podría esquematizar de la siguiente manera:

-En el primer nivel está el núcleo, donde se encuentra el ADN concentrado en cromosomas. Este núcleo resguarda la información genética necesaria para la fabricación de las proteínas.

-En el segundo nivel se encuentran los diferentes organelos y compartimentos de la célula:

Las **mitocondrias** que producen el ATP-energía química de la célula.

Dos organelos formados por membranas tubulares y vesículas,

El **retículo endoplásmico** que se extiende por todo el citoplasma de la célula y distribuye las proteínas fabricadas por los ribosomas.

El **aparato de Golgi** que regula el transporte de proteínas en vesículas.

El **centrosoma** que coordina y ayuda a la nucleación de los microtúbulos del citoesqueleto.

La coordinación entre estos dos niveles se da a través de

EL CITOESQUELETO:

Sobre el citoesqueleto se disponen y circulan los diferentes organelos celulares. Esta estructura es una red compleja de fibras proteicas que se extienden en el citoplasma, los componentes mayoritarios del citoesqueleto son tres tipos de fibras: Los microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos. Sin embargo, existen muchas otras proteínas que se asocian a las fibras básicas, para darle la verdadera funcionalidad al citoesqueleto.

El citoesqueleto organiza las diferentes estructuras de la célula eucarionte. Además permite una comunicación eficaz (transporte dirigido de las proteínas por el citoesqueleto) entre todas las *provincias* de la misma.

Esto permite que las reacciones de la célula no dependan sólo de la difusión, demasiado lenta para ser un proceso de transporte útil, y le permite implementar una respuesta rápida a cambios mecánicos o químicos (externos o internos).

El citoesqueleto es así la base estructural y dinámica de la célula eucarionte, equivalente a nuestro músculo y hueso.

1.1 Estructura del citoesqueleto

El citoesqueleto está compuesto por 3 tipos de fibras:

Los **microfilamentos de actina**, los **microtúbulos** y los **filamentos intermedios**.

Tienen en común el ser polímeros compuestos por proteínas globulares, actina y tubulina para los microtúbulos y microfilamentos, y por proteínas fibrosas como la keratina para los filamentos intermedios. La polimerización de los monómeros no es covalente como en los polímeros comunes, pero utiliza energía química-GTP (Guanidina Tri-Fosfato) y las fuerzas de Van der Waals. Por eso el término adecuado para este ensamble es más una agregación ordenada que polimerización. [Fyg,1997]

Los microfilamentos de actina y los microtúbulos, tienen en sus dos extremidades diferentes velocidades de polimerización-despolimerización de los monómeros y están por ende **polarizados** estructuralmente (lado + y lado -). A esto se le suma una **inestabilidad** constitutiva, que permite a estas fibras formar un conjunto de redes muy dinámicas y adaptables: Las fibras se mantienen en mayoría renovándose permanentemente. [Kir,1988]

Los microtúbulos (*fig.2*) son cilindros huecos (diámetro exterior 0.25 μm , interior 0.17 μm) y rectilíneos que radían a partir del **centrosoma** por todo el citoplasma formando un haz. La red de microtúbulos tiene además la propiedad de duplicarse de manera controlada a lo largo de cada ciclo celular, gracias a un mecanismo de duplicación del centrosoma. Así no sólo se conservan en cada célula resultante la cantidad microtúbulos, sino que durante la división celular (metafase y anafase) constituyen el huso mitótico formado por un doble polo de donde radían los microtúbulos y que permite separar simétricamente los cromosomas.

Los microfilamentos son fibras formadas de una proteína conocida como actina. Están concentradas principalmente bajo la membrana plasmática y forman una red interconectada por proteínas que se ligan a la actina. Esta red de gran plasticidad es llamada *el cortex celular*.

En este cortex las moléculas de actina polimerizan y despolimerizan continuamente generando protusiones en las superficies celulares que determinan los movimientos celulares y la transmisión de señales provenientes del exterior. Los microfilamentos juegan un papel importante en la *citocinesis* o separación final de las células hijas en la última etapa de la mitosis.

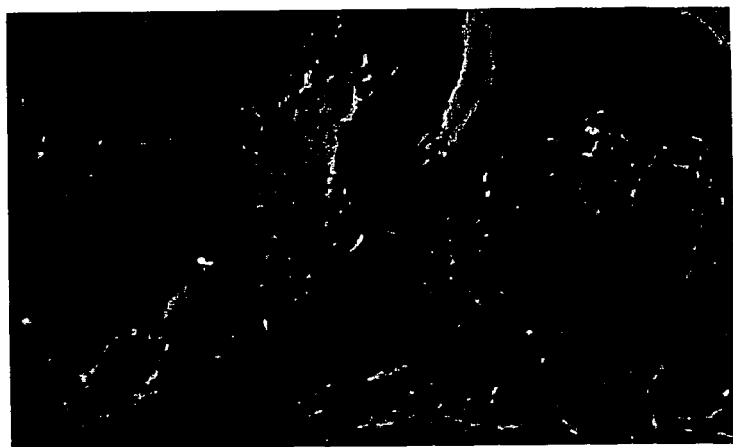


Figura 2. Imagen de microtúbulos en la célula

Los filamentos intermedios son fibras proteicas resistentes y duraderas que se encuentran en el citoplasma de la mayoría de las células eucariontes. Deben su nombre al hecho de que en las micrografías electrónicas su diámetro aparente es de 8-10 nm, que se encuentra entre el diámetro de los finos filamentos de actina y el de los gruesos filamentos de miosina de las células musculares. En la mayoría de las células animales, los filamentos intermedios se encuentran formando una extensa red que rodea al núcleo y se extiende desde esta zona hacia la periferia celular, donde interaccionan con la membrana plasmática. Los filamentos intermedios son particularmente abundantes en las células que están sometidas a tensiones mecánicas, como en los epitelios, donde forman parte de las uniones especializadas entre dos células vecinas, o a lo largo de los axones de las células nerviosas y en todos los tipos de células musculares. Están compuestos principalmente por las proteínas vinculina, queratina y laminina.

De la organización temporal, espacial y la regulación concertada de estos 3 tipos de fibras dependen la división celular, el tráfico intracelular, la polaridad, el movimiento y la morfogénesis de las células.

2. El Centrosoma, lugar de los centriolos

El Centrosoma es un organelo de 1µm de diámetro que como su nombre lo indica se encuentra al centro de la célula (cuando éste está en la *interfase* del ciclo celular). El nombre se debe a un biólogo del siglo XIX, Theodor Boveri. Paradójicamente el centrosoma, probablemente la primera estructura del citoplasma en ser identificada, es también un organelo cuya definición y utilidad sigue siendo discutida: Su estructura varía a lo largo de la evolución, y es inexistente en el caso de las células vegetales. Para una recopilación reciente sobre el centrosoma ver [Bor,2002].

2.1 Definición-Función del centrosoma

Además de distinguirse por su propiedades morfogenéticas y su papel en la división celular, la función más aceptada del centrosoma es la de ser el centro de nucleación de los microtúbulos, de ahí otra de las denominaciones utilizadas: **MTOC**, *Microtubule Organizing Center* [Kel,1994]. Estudios fisicoquímicos han demostrado que el paso limitante en la construcción de los microtúbulos es la nucleación de la tubulina, de tal forma que la función del centrosoma es disminuir la concentración de la nucleación gracias a algunas de las proteínas que lo componen (entre otras la γ -tubulina), lo que explicaría el porqué los microtúbulos radían de él [Wie,1999].

La duplicación del centrosoma está estrictamente ligada a la evolución del ciclo celular. El ciclo celular se compone de 4 etapas (*fig. 3*): La etapa G1 o interfase durante la cual la célula crece, la etapa S en donde se duplica el ADN dentro del núcleo, la etapa G2 que es una pausa antes del inicio de la división celular o mitosis (M). El centrosoma se duplica (durante la interfase o G1) y forma los polos de la red bipolar de microtúbulos llamada *huso mitótico*, para permitir la migración de los cromosomas a la placa metafásica. En esta etapa los microtúbulos tienen propiedades dinámicas muy diferentes, aumenta su velocidad de polimerización así como la actividad de nucleación del centrosoma (*ver tabla III*). Al inicio del anafase, los cromosomas homólogos atados a una de las extremidades de los microtúbulos se separan y gracias a la depolimerización de los microtúbulos, empiezan a migrar hacia los polos del huso mitótico.

El centrosoma aparece aquí como **centro dinámico** de la célula, ya que la formación del huso mitótico implica una profunda modificación de su actividad y la reorganización de los microtúbulos. [Rus,2001]

La función más impresionante del centrosoma es el **poder morfogenético**, ligado a su papel en la división celular [Kut,2000]. En las ranas de África del sur o *Xenopus laevis* es posible, tan sólo con inyectar un centrosoma en un ovocito, inducir la partenogénesis y obtener un individuo viable. Esto se explica porque los espermatozoides además de aportar la mitad de la información genética del nuevo individuo, también dan su centrosoma y desencadenan el proceso de división celular con la cual se inicia el desarrollo embrionario. Esto condujo a Boveri a llamar también al centrosoma el '*órgano importante de la división celular*'.

Es importante resaltar que dado la alta conservación del centrosoma en la evolución es posible inducir la partenogénesis en los ovocitos de *Xenopus* al inyectar centrosomas casi de cualquier especie, lo cual muestra que en la evolución la aparición del centrosoma fue tan exitosa, que su estructura y función se han conservado casi idénticas desde su origen hasta la actualidad.

El desarrollo y la morfogénesis celular se pueden ver como la interacción entre dos sistemas complementarios, uno característico de la especie, **el genoma**, y otro muy conservado, independiente de la especie, **el sistema microtúbulos-centrosoma**.

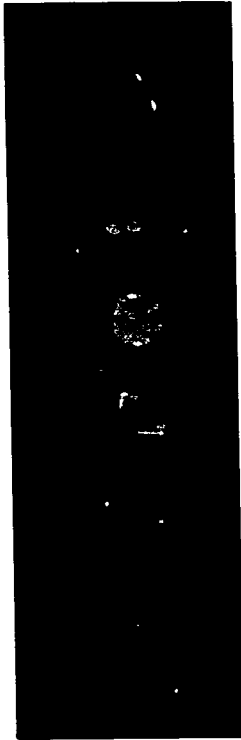


Figura 3. Imagen de microtubulos, ADN y centriolos a lo largo de la división celular o mitosis (profase,metafase, anafase, telofase y citocinesis)

La definición propuesta del Centrosoma insiste en 4 propiedades que lo diferencian de ser sólo un MTOC:

Además de nuclear los microtúbulos, ocupa y se mantiene en el centro geométrico de la célula cuando ésta se desplaza (o durante la interfase), está asociado al núcleo y se duplica de manera controlada a lo largo del ciclo celular para formar los dos polos del huso mitótico, además puede desencadenar la morfogénesis en ovocitos de rana.

2.2 Estructura del centrosoma

El centrosoma está compuesto por dos estructuras de naturaleza diferente: los centriolos y el material peri-centriolar (PCM).

Los centriolos

son una de las más increíbles, enigmáticas y conservadas estructuras celulares. Son un par de cilindros (*fig.4*) de 0.25 μm de diámetro y 0.5 μm de altura, cuyos bordes están compuestos por microtúbulos dispuestos estéticamente:

En la parte proximal forman 9 tercias y en la parte distal 9 pares.

Los centriolos se pueden distinguir entre ellos porque solo uno lleva un doble collar de 9 apéndices o brazos en la extremidad distal. A éste se le llama el *centriolo padre* y, claro, el otro es el hijo.

La tubulina de los centriolos tiene la propiedad de estar poliglutamilada [Bor,2002]. En el lumen de los centriolos se encuentra una proteína que nos interesa particularmente, la centrina.

Uno de los procesos intrigantes de los centriolos es su **duplicación**. En la parte proximal de cada uno de los centriolos 'crece' ortogonalmente a la superficie exterior otro centriolo. En la *figura 5* se ve claramente cómo a lo largo del ciclo crece este centriolo, y luego se desprende para formar dos centrosomas (cada uno con dos centriolos). Este proceso de duplicación es el único con el ADN que es semi-conservativo; es decir que en un centrosoma conteniendo dos centriolos siempre uno de los dos es un 'retoño' del otro (como dicho antes, uno es el centriolo 'hijo'). Esta duplicación cuyo proceso no es todavía entendido a nivel molecular pero en el que se piensa no intervienen ácidos nucleicos, se conoce paso por paso a nivel estructural.

Los centriolos son una enigma: ¿Cuál es el propósito de un elemento extremadamente conservado a lo largo de la evolución con una simetría y estructura compleja y cuya existencia no es indispensable? ¿No va esto contra la teoría evolutiva, en donde sólo se conserva lo que aporta ventajas selectivas? Durante largo tiempo se pensó simplemente que no servían para nada, ya que algunas células pueden pasarse de ellos. Tal vez eran sólo una reminiscencia barroca de organismos primarios con cilios. Y es que en las células flageladas, los centriolos sirven de raíz para el crecimiento del flagelo.

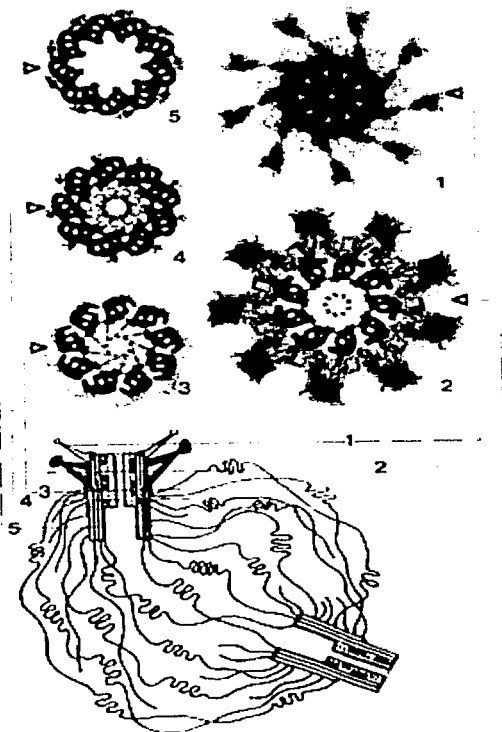


Figura 4. Microscopía electrónica de centriolos

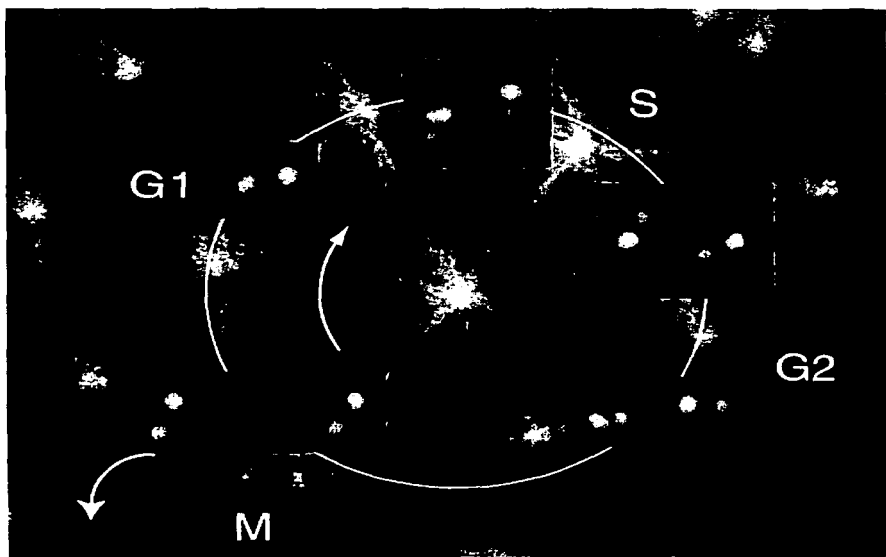


Figura 5. Imagen del ciclo de duplicación de los centriolos marcados con centrina-GFP.

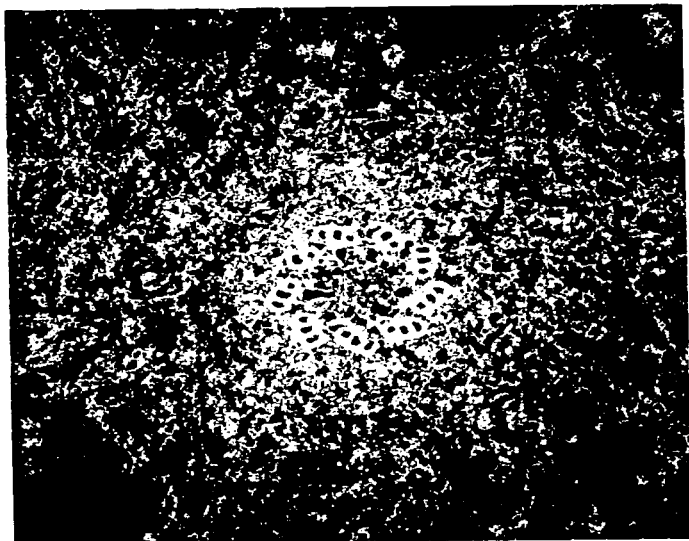


Figura 6. Centriolo rodeado por microtúbulos (Imagen M.Paintrand)

Pero esta visión va cambiando. Una de las funciones consensuales es que los microtúbulos se atan a los brazos distales del centriolo padre (*fig.6*). Este serviría de soporte a los microtúbulos radiales [Pie,2000].

También se ha demostrado [Bob,1998] que si se destruye los centriolos con un anticuerpo específico, el centrosoma desaparece, y el huso bipolar funciona con aberraciones (distribución defectuosa de los cromosomas, formación de varios polos). Así los centriolos servirían no sólo para atar a los microtúbulos, sino para estructurar a las demás proteínas del centrosoma que los rodean y que forman

El PCM o material peri-centriolar.

Es una estructura compuesta por grandes proteínas fibrilares (pericentrina de 12-15 nm de diámetro) y cuya frontera que es la que define la frontera del centrosoma no es clara. El PCM contiene elementos que nuclean y organizan a los microtúbulos. Uno de los elementos bien caracterizados es el anillo de γ -tubulina: La γ -tubulina es una proteína de la familia de la tubulina de los microtúbulos, que al juntarse con otras proteínas forma un anillo abierto cuyo diámetro es cercano al de los microtúbulos (25 nm). Así este anillo serviría de soporte para la nucleación de los microtúbulos.

Existen en el centrosoma unas 100 proteínas más. Uno de los mayores retos que ofrece es determinar la composición química y función de todas estas proteínas.

A lo largo del ciclo celular la cantidad de PCM varía, teniendo su máximo en la transición metafase-anafase y su mínimo en la telofase.

En centrosomas *in vitro* se ha observado que la distancia entre los centriolos varía, y que es influenciada por la concentración de Ca^{2+} . Se sabe que las fibras que forma la pericentrina en el PCM se contraen al aumentar la concentración de Ca^{2+} . Esto sugiere que la estructura del centrosoma es flexible, y es compatible con la existencia de movimientos de los centriolos. La existencia de este movimiento centriolar podría aclarar el verdadero papel de los centriolos.

3. ¿Cómo observar el movimiento de los centriolos ?

Para poder estudiar *in vivo* el movimiento de centriolos se necesita de un sistema de estudio que por un lado permita mantener vivas las células (¡¡obvio!!) y por otro, sea lo suficientemente plástico para realizar una serie de operaciones sobre éstas (utilización de fármacos, fijación para utilizar anticuerpos fluorescentes o para realizar imágenes en microscopio

electrónico....). El problema principal es ¿Cómo observar dos estructuras muy cercanas de 0.25 μm invisibles (pues transparentes) con microscopio de luz blanca?

El desarrollo vertiginoso de las técnicas de la genética permite marcar proteínas *in vivo*. Es decir que se introduce en la célula un plásmido de ADN que codifica la expresión de una proteína fluorescente en fusión (descubierta en un celenterado llamado *Aequorea victoria* [Mar, 1991]) con la proteína que se quiere marcar. Así un sistema de microscopía a epi-fluorescencia permite observar los centriolos marcados con la GFP, proteína que emite en el verde.

3.1 Sistema celular

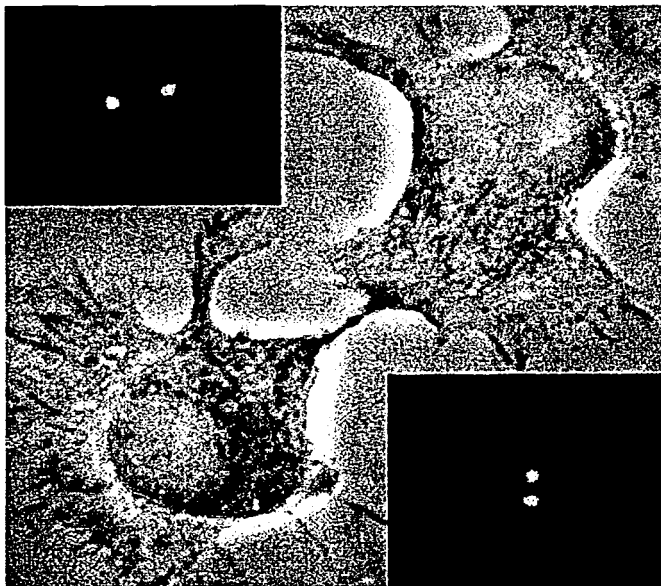
Las células

que utilizamos fueron fibroblastos de ratón (L929) inmortalizados (*fig.7*). Esto significa que contrariamente a las células normales, se dividen un gran número de veces antes de morir. Los fibroblastos se encuentran entre las células epiteliales y musculares, formando una capa celular intermedia. Son células que necesitan una *matriz extra-celular*, formada por las proteínas de fibronectina y colágeno entre otras, para extenderse: viven arraigadas a esta matriz que producen y secretan ellas mismas. Además al mantenerlas en cultura no se extienden más que en una sola capa, es decir que no se superponen unas sobre otras.

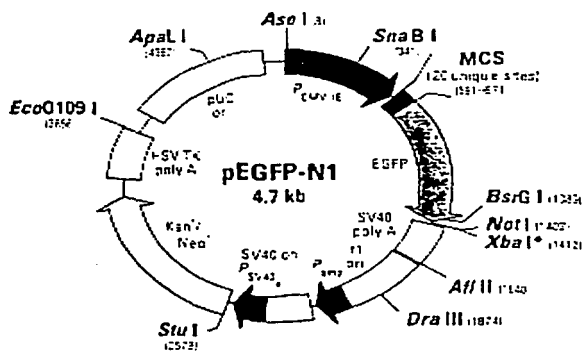
Como dijimos anteriormente, debemos marcar los centriolos de estas células con GFP. Para esto hay dos métodos, marcar de forma transitoria las células ; o lograr que las células integren el ADN en su genoma (cromosomas), obteniendo así un clon de expresión estable de la proteína fluorescente. Para

Expresar una proteína fluorescente

se tiene que introducir en las células un plásmido(*fig.8*) o ADN circular que contenga la secuencia de ADN de la proteína fluorescente, contigua a la secuencia de la proteína que nos interesa. La célula integrará el ADN del plásmido, y sintetizará una doble proteína-híbrida, fusión de la proteína que nos interesa observar y la GFP proteína fluorescente.



*Figura 7. Fibroblastos y detalle de centriolos
marcados con centrina-GFP*



131 154 177 200 223 246 269 292 315 338 361 384 407 430 453 476 500 523 546 569 592 615 638 661 684 707 730 753 776 800 823 846 869 892 915 938 961 984 1007 1030 1053 1076 1100 1123 1146 1169 1192 1215 1238 1261 1284 1307 1330 1353 1376 1400 1423 1446 1469 1492 1515 1538 1561 1584 1607 1630 1653 1676 1700 1723 1746 1769 1792 1815 1838 1861 1884 1907 1930 1953 1976 2000 2023 2046 2069 2092 2115 2138 2161 2184 2207 2230 2253 2276 2300 2323 2346 2369 2392 2415 2438 2461 2484 2507 2530 2553 2576 2600 2623 2646 2669 2692 2715 2738 2761 2784 2807 2830 2853 2876 2900 2923 2946 2969 2992 3015 3038 3061 3084 3107 3130 3153 3176 3200 3223 3246 3269 3292 3315 3338 3361 3384 3407 3430 3453 3476 3500 3523 3546 3569 3592 3615 3638 3661 3684 3707 3730 3753 3776 3800 3823 3846 3869 3892 3915 3938 3961 3984 4007 4030 4053 4076 4100 4123 4146 4169 4192 4215 4238 4261 4284 4307 4330 4353 4376 4400 4423 4446 4469 4492 4515 4538 4561 4584 4607 4630 4653 4676 4700 4723 4746 4769 4792 4815 4838 4861 4884 4907 4930 4953 4976 5000 5023 5046 5069 5092 5115 5138 5161 5184 5207 5230 5253 5276 5300 5323 5346 5369 5392 5415 5438 5461 5484 5507 5530 5553 5576 5600 5623 5646 5669 5692 5715 5738 5761 5784 5807 5830 5853 5876 5900 5923 5946 5969 5992 6015 6038 6061 6084 6107 6130 6153 6176 6200 6223 6246 6269 6292 6315 6338 6361 6384 6407 6430 6453 6476 6500 6523 6546 6569 6592 6615 6638 6661 6684 6707 6730 6753 6776 6800 6823 6846 6869 6892 6915 6938 6961 6984 7007 7030 7053 7076 7100 7123 7146 7169 7192 7215 7238 7261 7284 7307 7330 7353 7376 7400 7423 7446 7469 7492 7515 7538 7561 7584 7607 7630 7653 7676 7700 7723 7746 7769 7792 7815 7838 7861 7884 7907 7930 7953 7976 8000 8023 8046 8069 8092 8115 8138 8161 8184 8207 8230 8253 8276 8300 8323 8346 8369 8392 8415 8438 8461 8484 8507 8530 8553 8576 8600 8623 8646 8669 8692 8715 8738 8761 8784 8807 8830 8853 8876 8900 8923 8946 8969 8992 9015 9038 9061 9084 9107 9130 9153 9176 9200 9223 9246 9269 9292 9315 9338 9361 9384 9407 9430 9453 9476 9500 9523 9546 9569 9592 9615 9638 9661 9684 9707 9730 9753 9776 9800 9823 9846 9869 9892 9915 9938 9961 9984 10007

Figura 8. Plásmido pEGFP-C1 (clontech)

La gran ventaja de la GFP es que es pequeña e inerte, su fusión con otra proteína no afecta la función de ésta, y la célula vive normalmente. En nuestro caso queríamos marcar el centrosoma de manera precisa, para poder distinguir los dos centriolos. Para eso se tuvo que

Fabricar un plásmido.

La proteína que elegimos como marcador preciso de los centriolos fue la CENTRINA I (CEN 1), que se encuentra en su interior. La secuencia que codifica esta proteína fué insertada en el lado NH₂ terminal de la proteína **GFP** (*Green fluorescent protein sitio 671-1389* del plásmido), la cual es excitada a 488 nm y emite a 507 nm, es decir en verde.

Además de contener la CEN1 y la GFP, el plásmido contenía una secuencia de ADN (llamada **promotor ASE I sitio 8-341**) que permite la transcripción. Este tipo de promotor proviene de un virus (Citomegalovirus) que produce sus proteínas inmediatamente después de haber invadido el organismo (ciclo lítico del virus). Con este promotor aseguramos una expresión rápida e intensa de la proteína fluorescente.

Tomando en cuenta que no todas las células son capaces de incorporar el plásmido, debíamos seleccionar aquellas que los hubiesen logrado. El gen que se encuentra a partir del sitio STU I (*sitio 2579*) es el de la neomicina/kanamicina. Este gen les permite resistir al antibiótico G418 (geneticina) y de esta manera las células que no integraron el plásmido mueren. Las otras secuencias del plásmido sirven para obtener copias de este al amplificarlo en bacterias (*sitio 4362* ApaL I).

El punto delicado es hacer entrar el plásmido a la célula, por lo cual utilizamos

La electroporación.

No se sabe bien a bien porqué, pero el hacer pasar una corriente eléctrica en el medio de cultivo de las células permite la integración del plásmido al citoplasma, y posteriormente al núcleo celular.

Se cree que se abren poros en la membrana citoplasmática por eso se le llama electroporación. La eficiencia de este proceso varía mucho (de 10% a 80%) y depende del tipo de célula en la que se efectúa. Otra posibilidad para transfectar células es utilizar lípidos mezclados con el plásmido que atraviesan las membranas con facilidad.

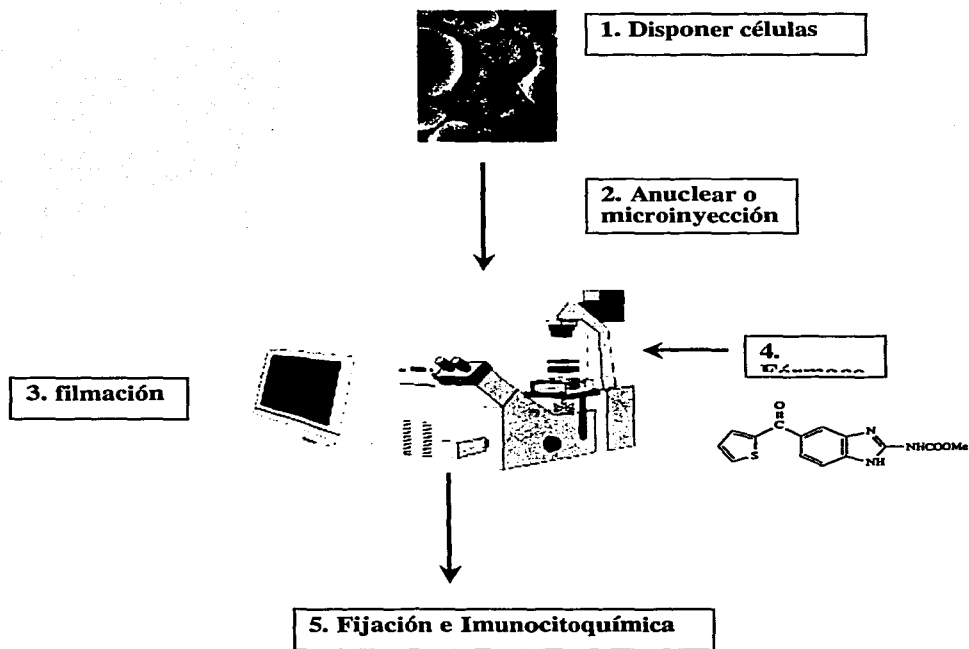


Figura 9. Diagrama del dispositivo de filmación (los datos técnicos del material utilizado se encuentran al final)

Con esta construcción genética se creó una descendencia estable de células que expresaban de manera constitutiva la GFP-CEN1, por lo que los centriolos de éstas células al ser excitados con luz azul, brillaban de color verde.

Después de describir el elemento básico de estudio, las células, y sin dilatarme en el cuidado cotidiano que exigían (para detalles ver los protocolos...), describiré el sistema que nos permitía observar los centriolos *in vivo*.

3. Dispositivo de filmación

Una vez que se tuvo una clona de células que expresaban CEN1-GFP, se inició el estudio del movimiento para lo cual se utilizó un dispositivo de filmación (fig.9) para lo cual

1. Primero se dispusieron las células sobre un cubre-objetos de vidrio, sobre el cual estaba grabada una diminuta rejilla con letras y números que permitía localizar las células y evitaba perderlas. A estos cubre-objetos se les daba un tratamiento previo para que las células se extendiesen rápidamente (bastaban unas horas).

2. A estas células se les podían efectuar varios tratamientos antes de filmarlas:

- Se podían **anuclear**, afin de obtener un sistema más sencillo donde el ciclo celular se detiene (¡ ya no hay ADN! pues ya no hay núcleo ni cromosomas). Estas células sin núcleo, llamadas **citoplastos**, viven unas 72 horas hasta que se les acaban las proteínas.

- Se les podía **microinyectar** alguna proteína marcada con un fluorocromo, como la tubulina-rhodamina para marcar los microtúbulos de rojo y seguir su actividad *in vivo*, paralelamente a la de los centriolos.

3. El siguiente paso era la filmación en sí, para la cual se usó un video-microscopio a epi-fluorescencia con objetivos (x100, x63, x40) y un sistema motorizado que le permitía mover el soporte en el plano X-Y-Z. El sistema de movimiento en Z es un piezoeléctrico controlado por un galvanómetro que permite tomar 10 imágenes/seg. Esto se debe a la rapidez del piezoeléctrico, y a una rápida velocidad de adquisición. Las células sobre el cubre-objetos se montan sobre un porta-objetos y se ponen en una cámara de plástico transparente, donde se regula el CO₂ a 5% y se mantiene la temperatura en 37 grados en un medio de cultivo DMEM + 20mM Hepes.

Se utilizaron objetivos x100 ó x63. Por regla se tomaron de 6 a 10 imágenes secuenciales en el eje Z con pasos de 0.5 µm cada 2 a 30 segundos. En cada paso se tomaba una imagen con un filtro fluorescente y otra con luz de contraste de fase.

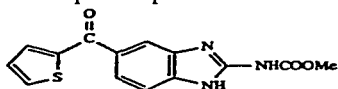
Al final se conservaron sólo 2 imágenes (una de fluorescencia y otra de contraste de fase) que son la superposición de las otras. Se obtiene así una proyección plana de la célula y de los centriolos.

La duración de las películas era de hasta 3 o 4 horas como máximo, después de este lapso las células o citoplastos se dañan debido a demasiada iluminación.

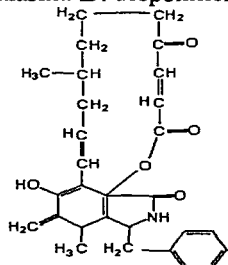
Gracias a un sistema de espejos, se podía intercambiar rápidamente los filtros y tomar imágenes casi-simultáneas con dos colores de fluorescencia además del contraste de fase.

4. Para influenciar el movimiento de los centriolos utilizamos varias fármacos que actuaban sobre el citoesqueleto celular.

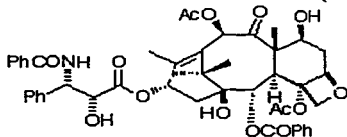
-Nocodazol: impide la polimerización de la tubulina



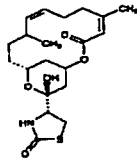
-Citocalasina-D: despolimeriza la actina



-Taxol: estabiliza los microtúbulos (se usa como antineoplásico)



-Latrunculina: impide la polimerización de la actina



Se podían introducir los fármacos sin interrumpir la filmación, de este modo se observaba desde un principio su efecto.

5. Después de filmar recuperábamos el cubre-objetos con las células y *enseguida* hacíamos una fijación (ver *Apéndice D*). Esto nos permitía reconocer los centriolos posteriormente, pues no tenían tiempo de moverse y bastaba reconocerlos con la última imagen adquirida. Así podíamos observar los microtúbulos, el Golgi, el PCM o la actina cortical; después de haber filmado los centriolos cuyo brillo de GFP no desaparecía después de la fijación. También podíamos tomar imágenes al microscopio electrónico de transmisión, a fin de observar estructuras de los centriolos.

6. La etapa siguiente fue obtener la información de las películas tomadas. Para esto se utilizó un programa para determinar las posiciones de los centriolos en cada imagen. Con estas informaciones se pudieron trazar las trayectorias, calcular las distancias recorridas y la velocidad media, buscar direcciones privilegiadas de desplazamiento, analizar el perfil de las trayectorias...

4. Resultados

Como cada vez que se empieza algo, las primeras observaciones se hacen al tanteo, por no decir *a ciegas*: Hay que formarse una idea global para luego notar los detalles; de lo general a lo particular...para pasar a lo universal.

4.1 Primeras observaciones: movimiento y asimetría

Al filmar tomando imágenes a intervalos de 10 segundos una de las primeras preguntas que surgió fue

¿Qué etapa del ciclo celular observar? o Movimiento de centriolos a lo largo del ciclo celular

Los fibroblastos son células que se mueven mucho. La interacción entre la actina cortical y la matriz extracelular (Colágeno + Fibronectina) vía las

integrinas es la causa del movimiento; las células miden los gradientes de nutrientes y se desplazan hacia los máximos. Dado que la velocidad de las células llega a ser de algunos micrómetros por minuto, entonces, para evitar que el movimiento de los centriolos se confunda con el movimiento global de la célula, se filmó justo después de la citocinesis en la etapa llamada G1. En esta etapa la célula, que acaba de dividirse y apenas se vuelve a extender sobre la matriz extracelular, se mueve poco. También se filmó en G2 justo antes de entrar en mitosis, ya que la célula se vuelve redonda al desprenderse un poco de la matriz exterior y deja de moverse. Como los citoplastos no se desplazan, este problema no existe.

Tabla I. *Movimiento de centriolos a lo largo del ciclo celular*
 En esta tabla el 'No' significa que hay poco movimiento, y el 'Sí' que hay mucho.

	Movimiento del centriolo 'Padre'	Movimiento del centriolo 'Hijo'	Simetría del movimiento
Célula G1	No	Sí	Asimetría
Célula G2	No	No	Simetría

De las primeras películas que se hicieron (Tabla I) se demostró que efectivamente existe un movimiento de los centriolos en el plano X-Y paralelo al plano del porta-objetos. El movimiento en el eje Z vertical es mínimo y se reduce a unos cuantos nanómetros.

Además este movimiento en X-Y no es el mismo en los dos centriolos, no es simétrico: uno de ellos se mueve más que el otro. Esta asimetría no se conserva a lo largo del ciclo, y depende de la etapa de maduración del centrosoma. En la etapa G2 se vuelve simétrico y disminuye el movimiento. Estas propiedades aparecen obvias en la *fig. 10*.

En seguida surge la siguiente pregunta ¿Qué provoca la asimetría en el movimiento de los centriolos?

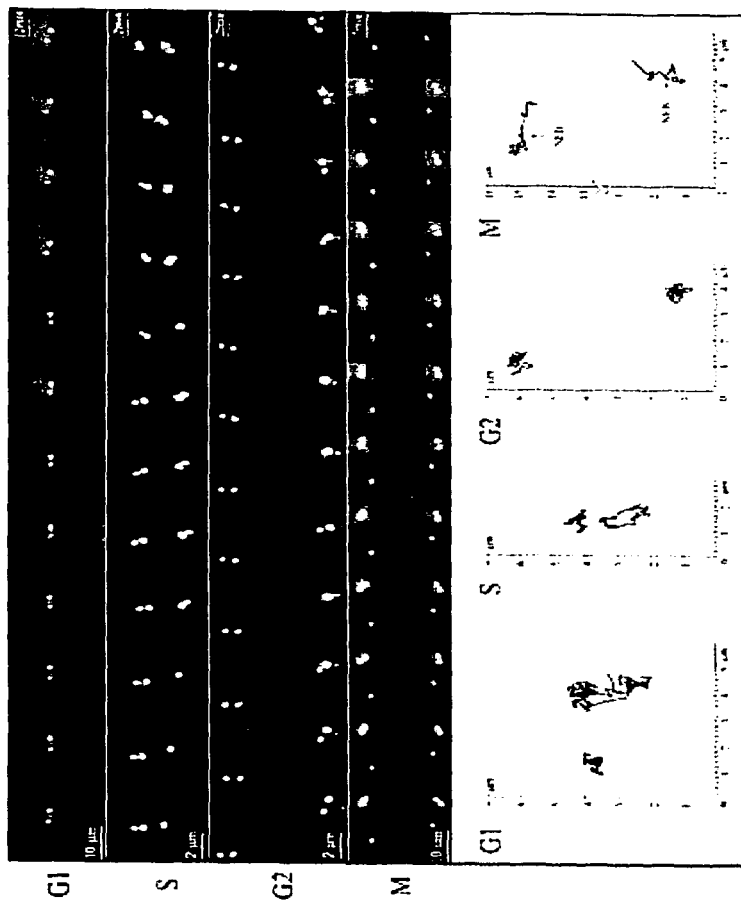


Figura 10. Movimiento de centriolos a lo largo del ciclo celular (G1, S, G2, M-mitosis, NEB Nuclear Enveloppe Breakdown-ruptura del núcleo) Imagen cada 10 segundos.

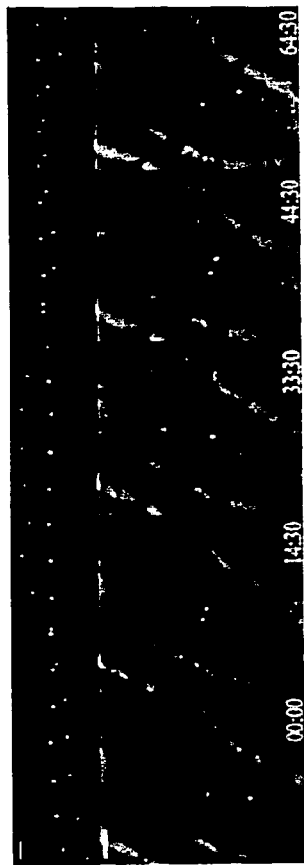


Figura 11. Movimiento asimétrico de centriolos en citoplastos

4.2 Asimetría estructural de los centriolos

Lo primero que se nos ocurrió podría causar esta asimetría fue el núcleo: Tal vez uno de los dos centriolos estaba ligado a la gran masa nuclear, lo que le impedía moverse. Por eso anucleamos las células y filmamos citoplastos (*fig.11*). El resultado fue el mismo: uno de los centriolos se movía más que el otro. La fuente de la asimetría no proviene del núcleo.

Para entender el origen de la asimetría, marcamos diversas estructuras de la célula mientras filmabamos el movimiento de los centriolos. Marcamos el apartato de Golgi con el fragmento-B (*fig.12*) de la toxina de la bacteria de shiga acoplada a la molécula fluorescente cy3. Esta toxina es internalizada por la célula y queda retenida en el Golgi el tiempo suficiente como para poder filmar nuestras células.

-El centriolo que se movía menos era el que **tenía a su alrededor más aparato de Golgi y más PCM.**

Marcamos también los microtúbulos microinyectando tubulina-rodamina en la célula (*fig.13*).

-El centriolo que se movía menos se encontraba al centro de un **haz de microtúbulos**, y el que se movía más no.

Después de estos resultados se puede afirmar lo que ya estaba dicho en la **Tabla I**; es decir que **el centriolo que NO se mueve es el centriolo padre**, el centriolo que lleva las apéndices donde se anclan los microtúbulos. Imágenes de microscopia electronica refuerzan este resultado, ya que se ven los brazos o apéndices en el centriolo que no se mueve (*fig.14*).

El siguiente resultado es una prueba más de que el problema del centriolo agitado tiene que ver con la filiación entre los centriolos.

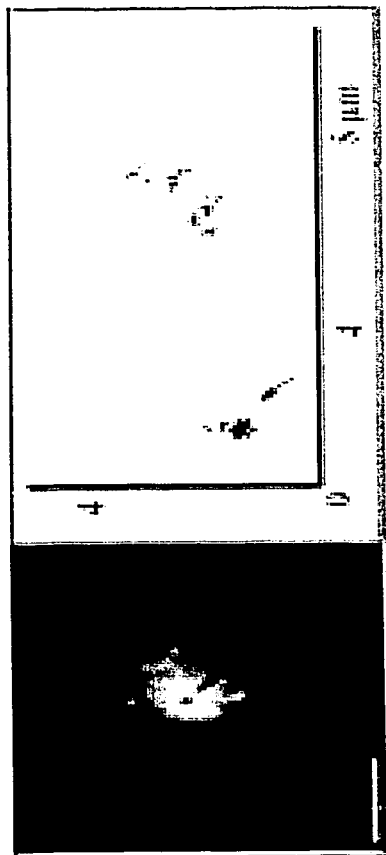


Figura 12. Movimiento de centriolos en una célula marcada con fragmento B de la toxina de shiga acoplada a cy3 (marca el Golgi). Nótese que el Golgi se encuentra mayoritariamente alrededor del centriolo más estático

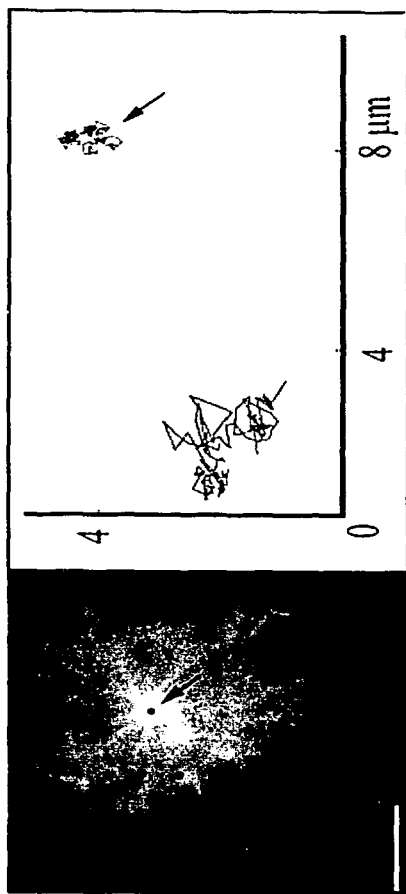
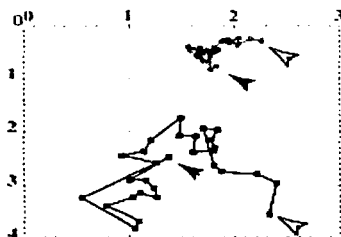
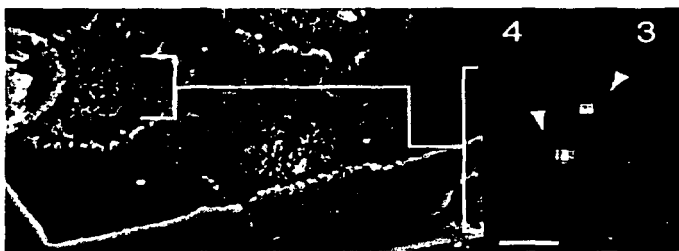


Figura 13. Movimiento de centriolos en una célula donde se microinyecta tubulina-rodamina



trayectoria de centriolos 3 (arriba) y 4 (abajo)

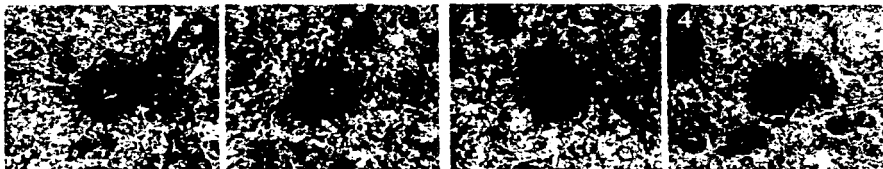


Figura 14. Dos imágenes de Microscopía electrónica a diferente altura de los centriolos 3 y 4 después de haber filmado las trayectorias. El centriolo que se mueve menos (3) es el que tiene los apéndices (indicadas por las flechas blancas)

4.3 Citoplastos con varios centriolos

Quisimos probar si la asimetría en el movimiento de los centriolos se conservaba en células polinucleadas.

Es posible obtener citoplastos con varios centriolos (ver *Apéndice C*), a partir de células enormes polinucleadas y con varios centrosomas. Nosotros utilizamos citoplastos con 2 y 4 centrosomas (resp.) es decir con 4 y 8 centriolos (resp.).

¿Qué esperamos ?

Como existe una filiación entre el centriolo que se mueve y el que no esperamos lo siguiente:

En los citoplastos provenientes de las células tratadas con citocalasina-D, se tienen dos centrosomas enteros y bien separados. Se espera por lo tanto que **dos centriolos se muevan mucho y dos se muevan poco**. Correspondiendo respectivamente al padre y al hijo de cada centrosoma.

En la *figura 15* se puede ver que dos centriolos recorren distancias grandes (negro), y dos no (gris). La siguiente etapa fue tratar de perturbar la asimetría existente interviniendo con fármacos.

4.4 Romper la asimetría

La reacción al encontrarse con una simetría o una asimetría simple es tratar de romperla (utilizando el vocabulario querido por los físicos de *ruptura de simetría*), para entender de donde proviene.

La primera idea que tuvimos, y que es la idea principal de nuestro modelo físico, es que la asimetría del movimiento proviene del número diferente de microtúbulos que rodean los dos centriolos. Como vimos anteriormente (*párrafo 4.2*).

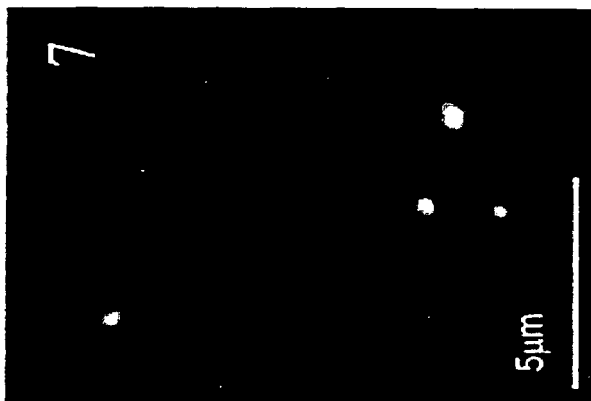
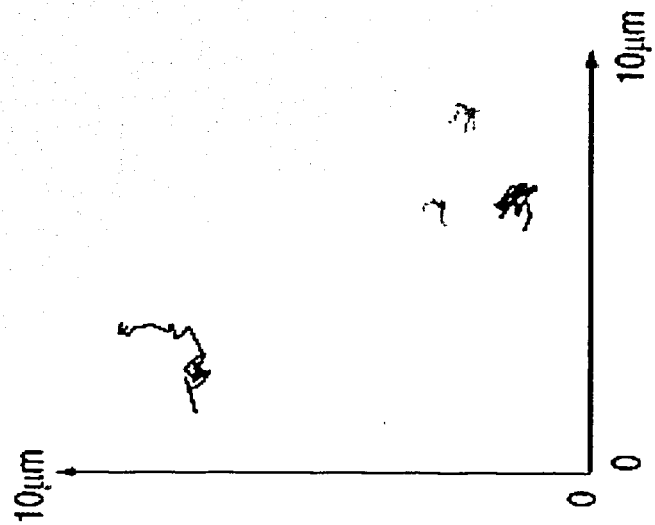


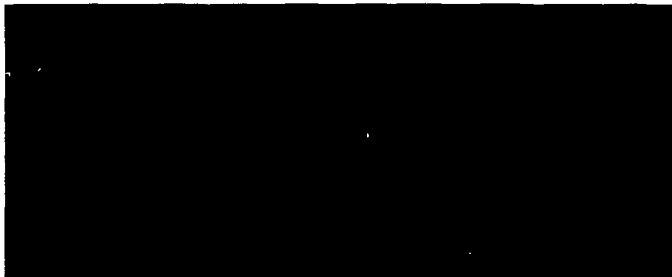
Figura 15. Movimiento de 4 centriolos en una célula



microtúbulos con 5 minutos de nocodazol



microtúbulos con 10 minutos de nocodazol



microtúbulos con 15 minutos de nocodazol

Figura 16. Efectos de diferentes tiempos de aplicación de 10 μ M Nocodazol

El aster de microtúbulos

está centrado en el centriolo padre: el que se mueve menos y que lleva los apéndices o brazos.

Utilizamos un fármaco (nocodazol) para *despolimerizar los microtúbulos* y romper así la asimetría debida a la distribución del haz. El nocodazol era insuficiente porque este fármaco sólo impide la polimerización de la tubulina, afectando así únicamente a los microtúbulos inestables y no a aquellos estabilizados por las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs).

Para quitar de un tajo los microtúbulos (*fig.16*), se necesita poner nocodazol a una concentración 10-5 mol/l, y poner a 4°C por 45 minutos. Esta es una propiedad especial de los microtúbulos, pues al enfriarlos en lugar de estabilizarse por una entropía térmica menor, se desensamblan. Después de este tratamiento pusimos a las células en la cámara de filmación en un medio nutritivo a 37°C que tenía la misma concentración de la fármaco. Esto último para evitar toda polimerización de la tubulina.

Como se ve en la *fig.17*, y a nuestra gran sorpresa e incredulidad de los físicos, **la asimetría no desaparecía**, y uno de los centriolos seguía moviéndose muy despreocupado.

Para estar seguros de que los microtúbulos desaparecieron, después de filmar realizamos un inmunomarcaje con un anticuerpo anti-tubulina. El resultado fue positivo: ¡no había microtúbulos, pero sí había movimiento!

El siguiente paso para romper la asimetría fue actuar sobre

La actina cortical

Pese a que no hay asimetría visible en la relación entre los centriolos y la actina cortical, decidimos actuar sobre ésta. La idea es que como la actina es esencial para el movimiento de los fibroblastos [Loi, 1999], tanto como lo son los microtubulos y como existen interacciones entre estos dos sistemas [Goo, 2000], afectar alguno de los dos puede influenciar ambos.

Utilizamos citocalasina-D en dosis de 1 µg/ml para despolimerizar la actina. Suprimir la actina filamentososa tiene un efecto drástico sobre los citoplastos: La membrana exterior forma burbujas, que desaparecen al quitar la fármaco.

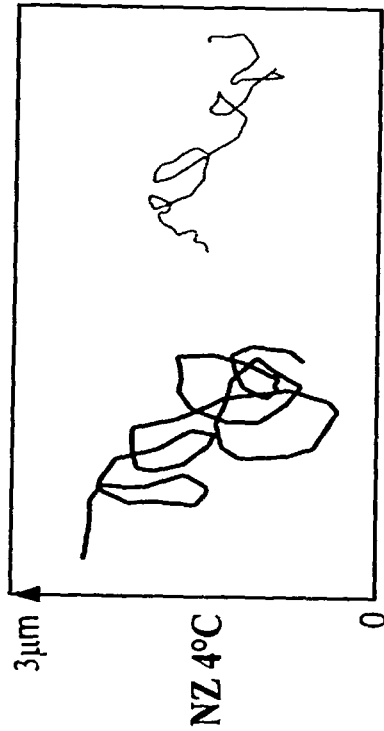


Figura 17. Movimiento de centriolos con nocodazol (sin microtúbulos).

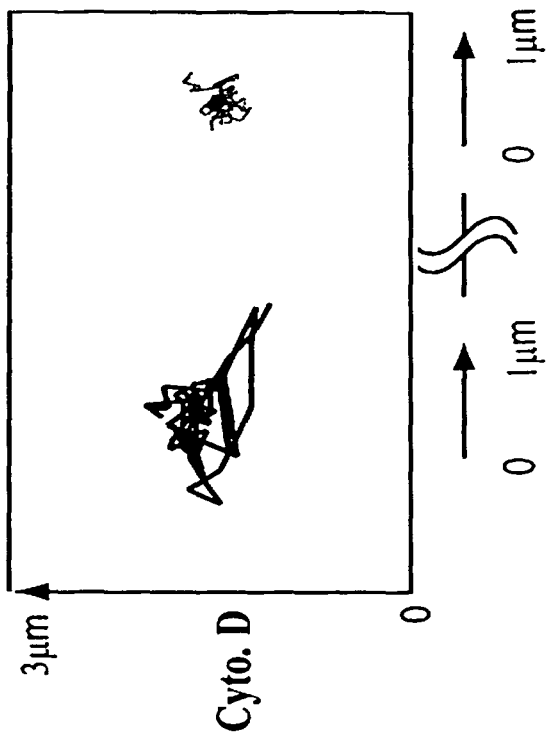


Figura 18. Movimiento de centriolos con citocalasina (sin actina)

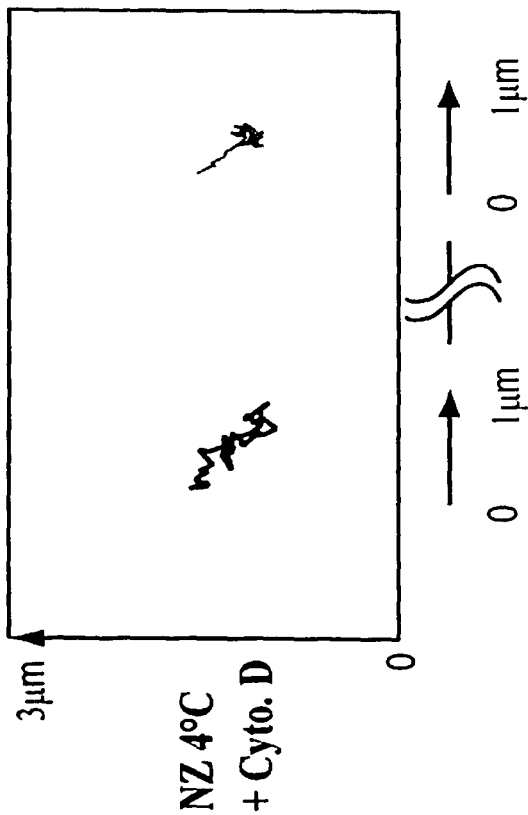


Figura 19. Movimiento de centriolos con citocalasina y nocodazol (sin microtúbulos y actina)

Esto no afectaba el movimiento de los centriolos, ni su asimetría: A pesar de la destrucción de las fibras de actina, **el movimiento de cada centriolo seguía siendo diferente**. Uno se movía, el que no tiene las apéndices no.

El paso siguiente fue afectar a los dos sistemas al mismo tiempo. Primero despolimerizábamos los microtúbulos y filmábamos para verificar que había movimiento. Luego a estos mismos citoplastos y al mismo medio nutritivo con nocodazol le sumábamos citocalasina-D para deshacer las fibras de actina. Todo en las mismas dosis que antes. Cabe señalar que los citoplastos se encontraban en bastante mal estado, pero su actividad de membrana nos mostraba que seguían vivos.

Finalmente actuando sobre estos dos sistemas, logramos suprimir el movimiento de los centriolos, que se reducía a una diminuta vibración.

	Movimiento del Padre	Movimiento del Hijo	Simetría del sistema
Célula (con núcleo)	No	Sí	Asimetría
Citoplasto (sin núcleo)	No	Sí	Asimetría
Sin microtúbulos	No	Sí	Asimetría
Sin Actina	No	Sí	Asimetría
Sin Actina y microtúbulos	No	No	Simetría

Tabla II. *Recapitulación del movimiento de los centriolos*

4.5 Otras fármacos: Taxol, Latrunculina, Bdm

El **Taxol** es un elemento único extraído de la familia de plantas *Taxus* que ha mostrado una gran actividad antitumorífica. Esto lo logra estabilizando y ligando los microtúbulos, impidiendo de este modo el desarrollo de la mitosis. En presencia de tubulina purificada, el taxol disminuye la concentración crítica de nucleación de los microtúbulos.

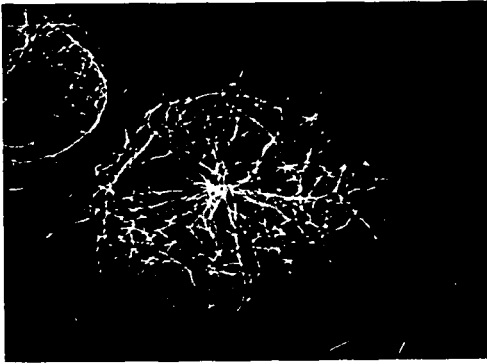


Figura 20. abajo Microtúbulos en una célula con Taxol (90mn, 10 μ M), arriba control

Lo que se ve en la *fig.20* del citoplasto donde se marcaron la actina y los microtúbulos es que el taxol provoca un **reacomodo total de los microtúbulos**.

Se crea un espacio vacío en el centro del citoplasto donde se encuentran los centriolos, y alrededor se organizan radialmente los microtúbulos formando una corona de espinas.

Tomamos algunas películas con intervalos de 30 segundos entre cada toma de imágenes, y donde filmábamos antes, durante y después de haber puesto la fármaco. Los efectos en las trayectorias de los centriolos no son obvios.

La **Latrunculina** es una toxina muy potente y venenosa que proviene de la esponja roja de mar *Latrunculia magnifica*. Es capaz al ser diluída en un acuario de matar a un pez en menos de 5 minutos. El interés para nosotros es que afecta la actina.

El **Bdm** es un inhibidor del motor molecular miosina (este es el motor que permite el movimiento muscular al asociarse con la actina). Se usó este compuesto para probar si en el movimiento de los centriolos estaba implicado algun motor. El resultado fue que se encontró el mismo efecto que cuando se usa citocalasina. El movimiento de los centriolos provocado por la actina se debe a **motores moleculares**.

4.6 Discusión

No se ha descrito cuantitativamente el movimiento de los centriolos, esto se hará en la proxima sección. Lo único que se puede decir hasta ahora, es que el movimiento se percibe como una pequeña agitación alrededor de un punto estable (el centriolo cubre al moverse un espacio reducido), y de vez en vez saltos en una dirección determinada.

En las primeras observaciones que hicimos al filmar los centriolos notamos dos cosas:

Que existe un **movimiento de los centriolos** y que no es el mismo para los dos; uno se mueve más que el otro.

Sabiendo que el núcleo y el centrosoma están relacionados, la asimetría en el movimiento podía explicarse porque alguno de los centriolos estaba ligado al núcleo. Este no fue el caso pues al extraer el núcleo centrifugando las células (obteniendo citoplastos), la diferencia en el movimiento persistía.

Pensando que una gran masa, como es el haz de microtúbulos, anclados a un centriolo podía estabilizar su movimiento, eliminamos este haz.

El resultado es sorprendente porque un centriolo sigue moviéndose y hasta parece agitarse más, mientras el otro sigue en su imperturbable estabilidad.

Decidimos afectar el cortex de actina. Este sistema no se cree estar directamente ligado a los centriolos, pero debido a su importancia en el desplazamiento de las células y su interacción con los microtúbulos es un buen candidato en la creación de la asimetría del movimiento. El despolimerizar la actina tampoco afectó la diferencia entre los movimientos de los centriolos, aunque sí la naturaleza del movimiento (comparar los diagramas de citocalasina fig.17 y nocodazol fig.16).

La siguiente idea y la más natural, es anular tanto los microtúbulos como la actina cortical. Aquí también la sorpresa fue grande: ¡No había ya movimiento! La asimetría se había roto, pero el movimiento había casi desaparecido. Esto ofrece dos interpretaciones:

La primera es que los dos sistemas actúan sobre los centriolos independientemente, y cada uno por su lado acentúa la asimetría del movimiento. Así al neutralizar uno de los dos sistemas como hicimos, la asimetría seguía pues el otro la mantenía. En esta hipótesis el centriolo padre, que tiene un doble collar de apéndices, ligaría con unos (los inferiores) los microtúbulos, y con otros (los superiores) se arraigaría a la actina cortical.

La segunda es que existe un tercer sistema que conecta el sistema microtubular al sistema de actina cortical y que provoca la asimetría al interactuar con los centriolos. Este sistema dejaría de actuar sobre los centriolos sólo si se suprimen los dos anteriores, pues esto causaría su propia desmantelación. Un candidato a ser parte de este tercer sistema sería la *centrina*, pues se sabe que en algunos organismos como en las algas se organiza en fibras nanométricas, además de que se encuentra en el PCM y en los centriolos.

5. Modelo físico del movimiento

En esta parte es donde se justifica la naturaleza híbrida (Físico-Biología) de este trabajo de tesis. Aunque tal vez el simple hecho de estudiar el movimiento de un cuerpo sea ya un problema de física, que no necesita justificación.

5.1 Los microtúbulos

Los físicos se han interesado desde hace ya varios años al citoesqueleto y en modelar el funcionamiento de sus componentes: Tanto la **actina** en organismos modelo como la bacteria *Listeria monocitogenes* [Loi,1999], como la modelización de **motores moleculares** [Mag,1993] [Mag,1994], y el estudio de las propiedades de los **microtúbulos in vitro** [Fyg,1997]. Nuestro modelo se basa justamente en las propiedades de estos últimos, por eso empezaremos con una detallada

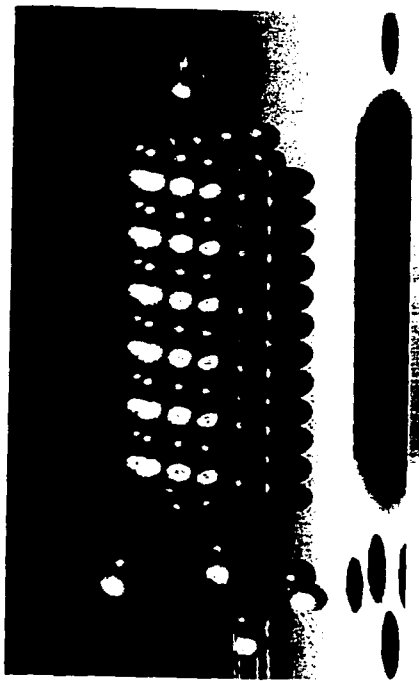


Figura 21. Diagrama de microtúbulo (α -tubulina en verde y β -tubulina en azul)

Descripción de los microtúbulos.

La proteína que constituye los microtúbulos es llamada tubulina. Es un dímero compuesto de proteínas globulares muy similares, la α -tubulina y la β -tubulina (con un peso de 55kD o 55kg/mol). El dímero mide 40 Å de diámetro y 80 Å de largo y es difícil de disociar. Su forma cristalizada se acaba de obtener.

Como su nombre lo indica, el microtúbulo es un tubo hueco de diámetro exterior 250 Å e interior de 170 Å cuyas paredes están formadas por líneas de dímeros, el lado α con el lado β agarrados como trenecito. Entre cada línea o protofilamento hay un traslade de 10 Å entre los dímeros, lo que da al tubo una estructura de hélice polarizada (un lado α y un lado β). Por microscopía electrónica se pueden contar 13 protofilamentos, en un sistema *in vitro* este número puede variar.

Los microtúbulos se ensamblan espontáneamente o a partir de sitios de nucleación a condición de encontrarse en una solución con Ph neutro ($6.3 < \text{pH} < 7.0$), una temperatura adecuada ($10^\circ\text{C} < T < 40^\circ\text{C}$) y un exceso de GTP (guanosina tri-fosfato) y iones Mg^{++} (este último sólo para el ensamble). El GTP es una fuente de energía común en los seres vivos. Cuando uno de los enlaces de fosfato se rompe o *hidroliza*, se libera energía y el GTP da GDP (guanosina di-fosfato). Al estar ligado a la α -tubulina el GTP no se hidroliza ni se intercambia con el GTP en solución. Al estar ligado a la β -tubulina sí se hidroliza e intercambia, pero una vez hidrolizado la β -tubulina GDP no se intercambia más y se queda ligado mientras el dímero forme parte del microtúbulo: La catálisis del GTP es regulada por el ensamble de los microtúbulos, pero no es necesaria para realizarlo pues al utilizar GTP no hidrolizable, los microtúbulos se ensamblan pero no se desensamblan. Así el GTP es **indispensable** para la

inestabilidad dinámica de los microtúbulos

Al monitorear un microtúbulo durante varios minutos su tamaño varía macroscópicamente de manera errática. A este fenómeno se le llama

inestabilidad dinámica.

La transición abrupta de crecimiento a caída es llamada '**catástrofe**'. Su contraparte, es decir una transición de despolimerización a polimerización es llamada '**rescate**'. El lado que tiene la β -tubulina crece más rápido y es llamado el **lado +**. El lado de la α -tubulina crece menos rápido, pero tiene menos catástrofes y más rescates y es llamado el **lado -**. Hasta ahora no se ha podido determinar si las catástrofes y rescates están relacionados entre ellos, ya que es muy difícil seguir la cinética de un microtúbulo por mucho tiempo (a lo más 10 ciclos de catástrofes/rescates). Pero algunos modelos se han hecho sobre las

causas de la inestabilidad dinámica

Lo único realmente seguro es que requiere la hidrólisis de GTP, lo demás es suposición. La idea es la siguiente [Arn,2000]:

La tubulina con el GTP anclado a su monómero β (GTP-tubulina) se ensambla a una extremidad del microtúbulo formando un cilindro abierto (*fig 22 a*). El cilindro se cierra y queda la GTP-tubulina en la extremidad del microtúbulo (*fig 22 b*). Cuando el GTP es hidrolizado y la GTP-tubulina se vuelve GDP-tubulina, la energía liberada cambia la conformación del dímero. En este nuevo estado, la GDP-tubulina tiene más chance de encontrarse en solución, y en algún momento abandona el microtúbulo. Pero si antes de la hidrólisis el dímero se encuentra no a una extremidad pero dentro del microtúbulo, no podrá safarse de éste y se quedará ahí.

Así el microtúbulo se describe como una **estructura inestable** (*fig 22 e*) hecha de GDP-tubulina con un 'gorro' de GTP-tubulina a una extremidad que lo estabiliza.

La pérdida de este *gorro* provoca la exposición de la GDP-tubulina y por ende la despolimerización del microtúbulo: Es decir la pérdida del *gorro* provoca la catástrofe (*fig 22 d*). El rescate no es explicado por este modelo.

Sistema	l+ (μm)	l- (μm)	v+ ($\mu\text{m}/\text{min}$)	v- ($\mu\text{m}/\text{min}$)
célula	8.5	6.5	7.2 +/- 0.3	17.3 +/- 0.7
interfase				
célula		= 7	14.3 +/- 1.2	= 16
prometafas				
e				
extracto de Xenopus	9.0 +/- 2.3	7.8 +/- 2.0	6.5 +/- 0.3	9.3 +/- 0.5
interfase				
extracto de Xenopus	11.4 +/- 3.5	> 27	8.9 +/- 0.4	16 +/- 2
mitosis				
tubulina pura	= 10	= 10	= 2	= 20

Tabla III. Resumen de propiedades de los microtúbulos:

v+ es la velocidad de crecimiento, v- la de caída, l+ y l- son el tamaño característico de un microtúbulo en crecimiento (l+) y caída (l-) tales que : $l+ = v+ / f+-$ y $l- = v- / f-+$ donde f+- es la frecuencia de transición de crecimiento a achique y f-+ es la frecuencia de transición de achique a crecimiento.

Con estos datos tenemos una idea mucho más precisa de lo que es un microtúbulo y de cómo se comporta.

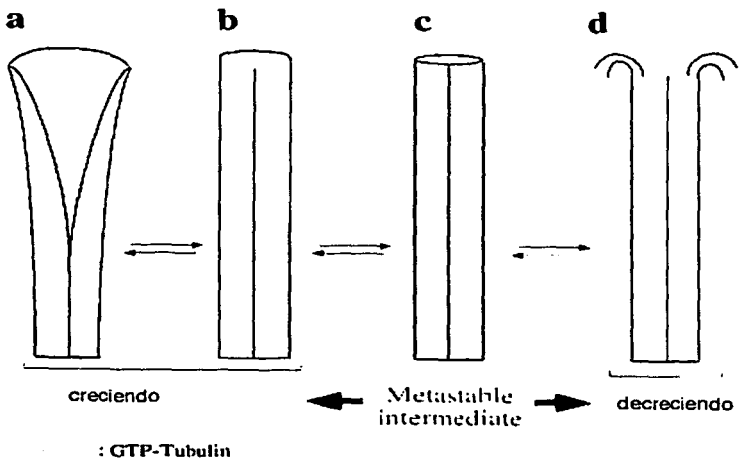


Figura 22. Modelo de la dinámica del microtúbulo

5.2 Modelo físico de un centrosoma

Idea general

Podría parecer ingenuo querer modelar de manera simple el movimiento de centriolos dentro de una célula, a sabiendas que implica una gran cantidad de variables e involucra fenómenos complejos (difusión, dinámica de flúidos, motores moleculares, interacción entre proteínas). La idea a raíz de este modelo proviene de la propiedad que define al centrosoma: Se encuentra de manera estable al centro de la célula. ¿Qué manera más natural para describir un fenómeno estable que un pozo de potencial? El propósito de este modelo es dar una explicación al origen de la estabilidad del centrosoma (origen del pozo de potencial) y al movimiento de los centriolos (oscilación en un pozo de potencial).

Con los datos de la *tabla.III* y con el modelo de inestabilidad resumimos las propiedades físicas importantes para nuestro modelo de los microtúbulos :

Son polímeros lineales rígidos con una cierta velocidad de crecimiento v_+ y de v_- , con dos probabilidades diferentes de pasar de un estado de crecimiento a uno de achique f_{+-} y vice-versa f_{-+} .

En una visión simplificada, un centrosoma es un MTOC (centro de nucleación de microtúbulos) y una célula es plana (sólo dos dimensiones). En nuestro modelo el centrosoma será un punto que se encuentra en el centro de una área delimitada por un círculo (es decir en el centro de un citoplasto delimitado por una membrana) y de donde emergen microtúbulos lineales radiando en todas las direcciones. Cuando los microtúbulos que crecen y decrecen tocan la membrana, ejercen una fuerza sobre ésta que a su vez empuja el centrosoma hacia la dirección opuesta. El movimiento del centrosoma se debe a la suma de los efectos de los microtúbulos.

Programa de simulación (Olivier Cardoso fué el principal programador)

En el programa hicimos las **hipótesis** siguientes:

-Los microtúbulos se reparten de manera radial y homogénea manteniendo un cierto ángulo constante entre cada uno de ellos.

-Los microtúbulos tienen un ángulo preferencial θ^0 . Al tocar la membrana los microtúbulos pueden quedar anclados (i.e durante varias iteraciones tocan la membrana) a pesar de que el centrosoma se mueva. Esto cambia el ángulo original y al desviarse de éste quedan sometidos a una fuerza elástica E proporcional al ángulo en el que se apartaron:

$$E = 1/2 k (\theta - \theta^0)^2$$

Donde k es la "constante del resorte"

-Los microtúbulos crecen con una velocidad constante v^+ y l es su longitud. Si $l < l^0$ y con una velocidad $v^+ = v^0 \exp(l^0 - l)$ si $l > l^0$ donde l^0 es el radio de la célula.

Es decir que al tocar la membrana la velocidad de crecimiento disminuye exponencialmente con la fuerza aplicada al microtúbulo.

Los microtúbulos decrecen con la velocidad v^- .

- Las catástrofes y rescates ocurren con una probabilidad f^- y f^+ respectivamente.

-La fuerza aplicada por la membrana sobre el microtúbulo se modeliza como una energía de compresión E' de constante k' :

$$E' = 1/2 k' (l - l^0)^2$$

-Los microtúbulos son rígidos y se supone que no se doblan.

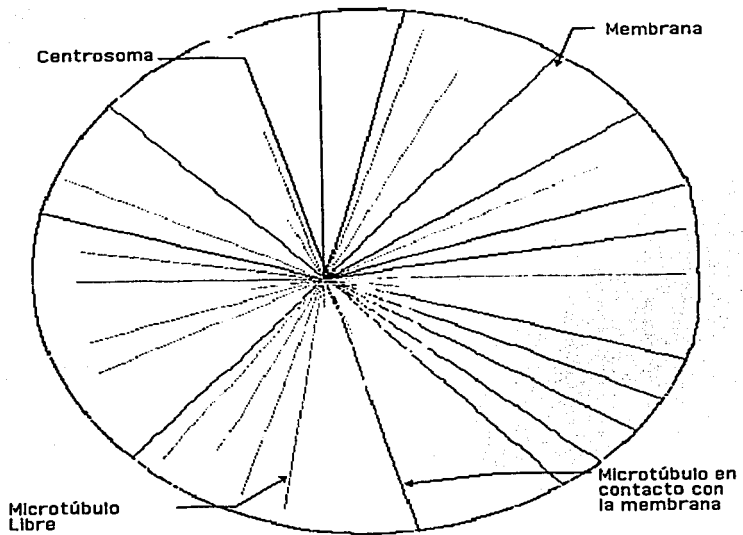


Figura 23. Imagen del modelo de un centrosoma en una célula

Los parámetros importantes en el modelo son así:

f_{+-} , f_{-+} , v_{-} , v_{+} parámetros que definen la actividad de los microtúbulos, k parámetro que depende de la viscosidad del citoplasma, k' depende de la rigidez de la membrana y de los microtúbulos, y n es el número de microtúbulos.

Con estos parámetros se escogen las condiciones iniciales para la posición del centrosoma y a cada paso temporal de duración dt se hace lo siguiente:

1. Los microtúbulos

- Se distinguen los microtúbulos cuyo tamaño aumenta de aquellos cuyo tamaño disminuye.

- Se realiza un tiraje aleatorio para cada microtúbulo. Este tiraje tiene una probabilidad f_{+-} de que el microtúbulo que crece sea sometido a una catástrofe y disminuya. Del mismo modo hay una probabilidad f_{-+} de que los microtúbulos que disminuyen sean rescatados y aumenten. De lo contrario es decir si no hay catástrofe (resp. rescate), siguen creciendo (resp. disminuyendo).

- La variación del tamaño del microtúbulo está dada por $v_{-} \cdot dt$ si disminuye ó $v_{+} \cdot dt$ si aumenta.

Después de haber hecho variar los microtúbulos, se calcula el cambio de energía total del sistema sumando el cambio de energía elástica y de compresión de cada uno de los microtúbulos.

2. El centrosoma

Se define una zona rectangular alrededor del centrosoma, y se escogen aleatoriamente en esta zona 100 puntos.

Se desplaza artificialmente a cada uno de estos puntos el centrosoma con todos los microtúbulos cuyo tamaño acabamos de hacer variar, y se calcula la energía de cada una de las 100 configuraciones. La posición final del centrosoma será aquella dada por la configuración cuya energía es mínima.

3. Iteración

Se repiten estas operaciones (descritas en 1 y 2) a cada paso, el número de pasos deseado.

El programa graba además las coordenadas de la posición a cada paso, y hace al mismo tiempo la gráfica del proceso.

5.3 Aplicación del modelo a los centriolos

Una de las conclusiones importantes que surgió de las gráficas obtenidas a partir de las películas es que el movimiento de cada uno de los dos centriolos es muy diferente. Por eso en un modelo simple, se puede considerar que los centriolos son totalmente independientes. Otra de las características que observamos es que uno de los dos centriolos se encuentra en el centro de un haz más importante de microtúbulos. Así la

Idea para modelar

el movimiento de los dos centriolos, es utilizar dos veces el programa sin cambiar los parámetros, salvo el número n de microtúbulos. En su propósito inicial el programa modeliza el movimiento del centrosoma. Aquí asimilamos el centrosoma a un solo centriolo, y se utiliza el programa dos veces para modelar la trayectoria de cada uno de los dos centriolos.

Obtenemos así dos trayectorias totalmente independientes, cada una de ellas es la de un centriolo (uno con muchos microtúbulos otro con menos, representando al centriolo "padre" y al "hijo") y no la de un centrosoma como en el párrafo anterior.

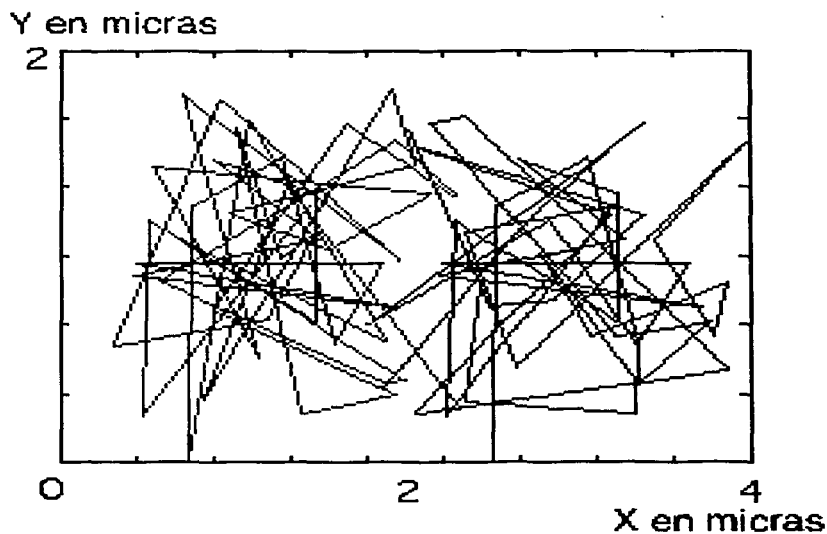
Al juntar estas trayectorias obtenemos el movimiento de dos centriolos que no interactúan para nada entre ellos pero uno tiene un haz de microtúbulos mayor.

Observaciones y discusión

Al ver las trayectorias obtenidas saltan a la vista dos cosas:

- La trayectoria de los centriolos se queda en una zona restringida (rectángulo de 4 micras) centrada y no 'exploran' toda la superficie de la célula que mide 20 micras de radio.

- El centriolo con más microtúbulos recorre una distancia 12% inferior.



*Figura 24. Trayectoria de centriolos (modelo)
 la escala es en micras En gris es el centriolo con 50 microtúbulos
 y en negro el centriolo con 150 microtúbulos ($f_+=2, f_-=3, v_+/v_-=1.5, k=1e-5, k'=1e-2$)*

distancia en micras

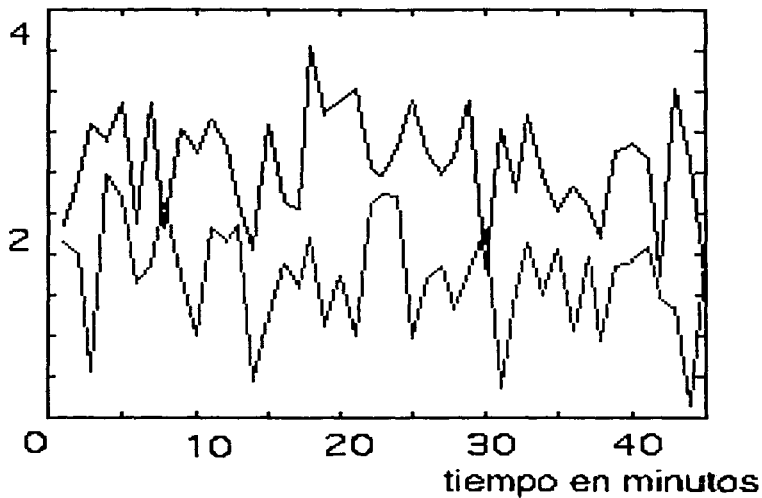


Figura 25. Distancia con respecto al centro (en micras) de cada centriolo. En gris es el centriolo con 50 microtúbulos y en negro el centriolo con 150 microtúbulos.

Al ver las trayectorias obtenidas saltan a la vista dos cosas:

- La trayectoria de los centriolos se queda en una zona restringida (rectángulo de 4 micras) centrada y no 'exploran' toda la superficie de la célula que mide 20 micras de radio.

- El centriolo con más microtúbulos recorre una distancia 12% inferior.

Este modelo sencillo logra reproducir las propiedades dinámicas esenciales del centrosoma:

- El hecho que los centriolos se muevan en una área restringida cercana al centro es reconfortante, pues reproduce la característica esencial del centrosoma: Permanecer al centro de la célula.

- Nuestro modelo muestra cuál pudiera ser el origen del movimiento de los centriolos: El efecto global de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos.

- El hecho que el centriolo con más microtúbulos se mueve menos va en el sentido de la hipótesis que el haz de microtúbulos lo estabiliza: El efecto de cada microtúbulo sobre el movimiento del centriolo es brusco y aleatorio, pero al aumentar el número de microtúbulos este efecto es suavizado por el de los demás, y el movimiento disminuye.

Sobre las trayectorias en sí no diremos gran cosa aquí, salvo que no se puede distinguir a ojo una gran diferencia con las trayectorias filmadas en las células. Claro, está lejos de ser perfecto e indicaré enseguida los defectos principales:

- Es difícil definir la viscosidad del citoplasma, lleno de membranas y vesículas circulando. El parámetro k (y k') es difícil de cuantificar.

- La definición de la zona de exploración del centrosoma y la manera en que se calcula la energía mínima del sistema. En efecto ¿qué determina el tamaño de la zona explorada? además no se considera en los 100 puntos escogidos aleatoriamente en esta zona la distancia que los separa de la posición anterior del centrosoma. Se debería al escoger la configuración de energía mínima introducir un parámetro (relacionado con la viscosidad del citoplasma) que considere la distancia entre las posiciones inicial y final del centrosoma.

Para mejorar el modelo se podría:

- Introducir una energía de curvatura de los microtúbulos, permitiendo que éstos se doblen.

- Introducir una interacción entre centriolos, bajo la forma de un oscilador armónico.

-Introducir una interacción entre cada haz de microtúbulos de los dos centriolos.

-Introducir el efecto de los filamentos de actina en el movimiento.

En conclusión podemos estar satisfechos a pesar de la sencillez del modelo, del uso de conceptos y herramientas físicas (minimizar la energía a cada paso, energías de compresión, tirajes aleatorios) para buscar una explicación a un fenómeno biológico complejo como el movimiento de los centriolos y las propiedades del centrosoma. Nuestro modelo logra reproducir las propiedades básicas del centrosoma y dar una explicación cualitativa a los resultados de nuestros experimentos (movimiento y asimetría del movimiento).

6. Análisis de las trayectorias

Este análisis estadístico sistemático tiene el propósito de determinar las características principales del movimiento de los centriolos. En total se analizaron **952** puntos para células sin fármacos, **301** puntos para células con nocodazol y **1053** para células con citocalasina.

6.1 Caracterización inicial de las trayectorias

Vale la pena recordar la ahora trivialidad de que los centriolos se muevan, además de eso uno de ellos (el centriolo hijo) se mueve notablemente más que el otro (el centriolo padre). El movimiento del centriolo hiperkinético está caracterizado por “saltos”, es decir momentos en que la distancia recorrida se duplica y llega a ser hasta de $3\mu\text{m}$. En las *fig.26* y *fig.27* se pueden ver cómo cuatro de estos saltos suceden esporádicamente, en un lapso de tiempo de una hora

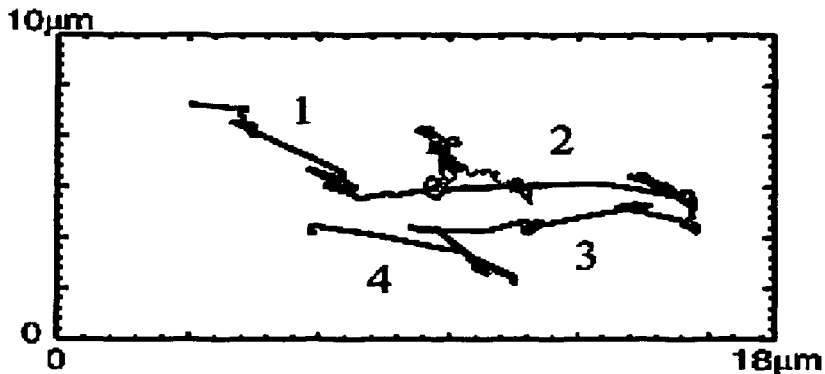


Figura 26. Trayectoria de centriolos (los números representan saltos del centriolo hiperkinético). La imagen representa una trayectoria típica.

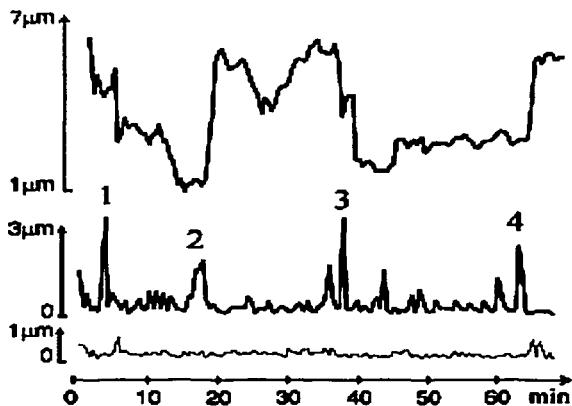


Figura 27. Distancia entre los centriolos de la figura 26 (Arr.)
Distancia recorrida por cada centriolo entre cada imagen (Abajo)

Estos saltos cambian de manera brusca la distancia entre los dos centriolos que después quedan por un tiempo estables alrededor de una posición, como se puede ver en la *fig.27*. La separación llega a ser hasta de $7\mu\text{m}$ y se reduce hasta menos de $1\mu\text{m}$. Durante estos "saltos" no aumenta la velocidad de movimiento del centriolo, sino que por un lapso de tiempo (que puede ser varios minutos) el centriolo no cambia de dirección. Por eso parece que el centriolo salta, aunque en realidad lo que hace es dirigirse hacia una dirección. Este movimiento dirigido es un poco enigmático, pues ¿cual es la causa y la necesidad de tal movimiento? La causa como se verá en el párrafo **6.3** involucra los microtúbulos.

Hablamos de estos saltos del centriolo hijo en los que la dirección de movimiento no cambia, pero ¿qué pasa entre los saltos? Esto es válido para los dos centriolos: Al parecer cambian erráticamente de dirección y no se desplazan de manera absoluta aunque la distancia que recorren siga siendo la misma. En la siguiente sección estudiaremos este cambio en la dirección de movimiento de los centriolos.

6.2 Distribución angular de las trayectorias

Si comparamos las gráficas de las trayectorias de los centriolos con nocodazol, y con citocalasina (*figuras 17 y 18*) notamos una diferencia en cuanto a la naturaleza de las curvas: La curva con nocodazol (sin microtúbulos) es mucho más suave que la curva con citocalasina (sin actina). Dicho de otro modo, hay una mayor cantidad de cambios de dirección abruptos (180° con respecto a la dirección previa) en la trayectoria de los centriolos de una célula con microtúbulos.

Para probar que este resultado se puede generalizar, calculamos la distribución de los ángulos formados por dos segmentos consecutivos de las trayectorias de cada centriolo:

$$\text{Entonces } \cos\theta = \frac{\vec{C_{i-1}C_i} \cdot \vec{C_iC_{i+1}}}{\|\vec{C_{i-1}C_i}\| \|\vec{C_iC_{i+1}}\|}$$

$$\text{Así } \cos\theta = \frac{(X_i - X_{i-1})(X_{i+1} - X_i) + (Y_i - Y_{i-1})(Y_{i+1} - Y_i)}{\{(Y_i - Y_{i-1})^2 + (X_i - X_{i-1})^2\} \{(Y_{i+1} - Y_i)^2 + (X_{i+1} - X_i)^2\}^{1/2}}$$

Los ángulos varían entre 0 y π .

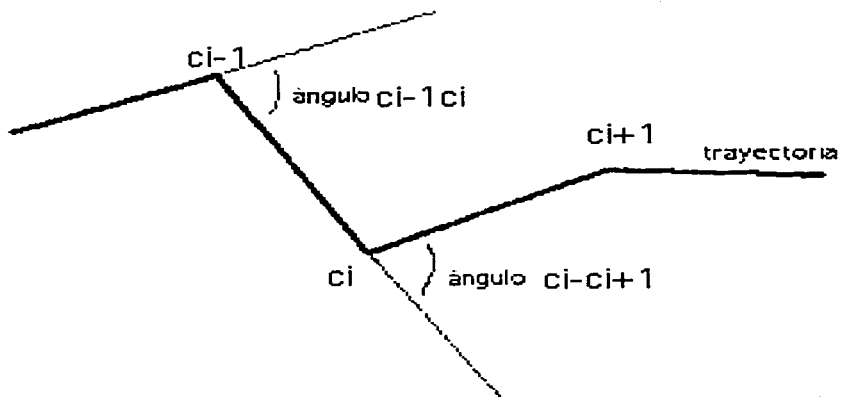


Figura 28. Diagrama de trayectoria de un centriolo
 Sea $ci-1(X_{i-1}, Y_{i-1})$, $ci(X_i, Y_i)$, $ci+1(X_{i+1}, Y_{i+1})$ y θ el ángulo $ci-ci+1$

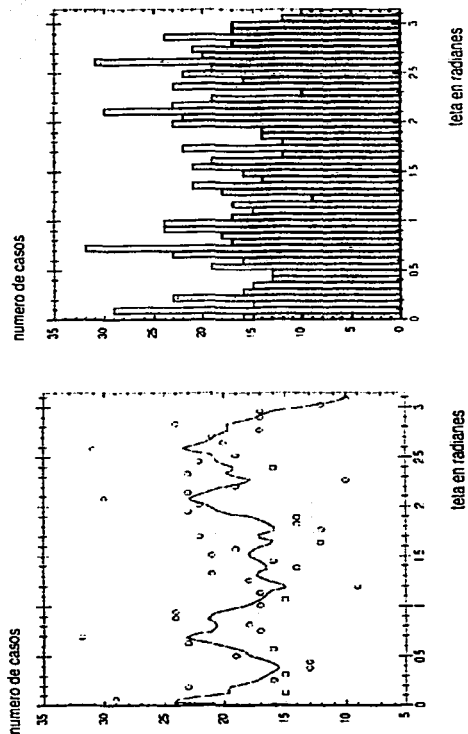


Figura 29. Distribución angular (histograma) de los centriolos sin fármacos (izq.) y gráfica aproximada de la distribución (der.) (abscisa $(0,\pi)$)

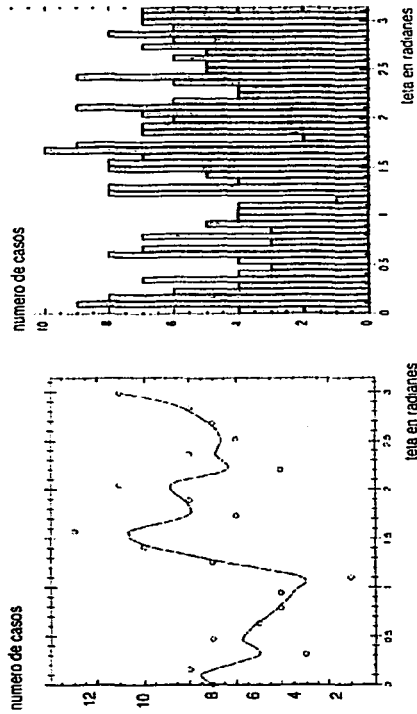


Figura 30. Distribución angular (histograma) de los centriolos bajo Nocodazol (izq.) y gráfica aproximada de la distribución (der.) (abscisa $(0, \pi)$)

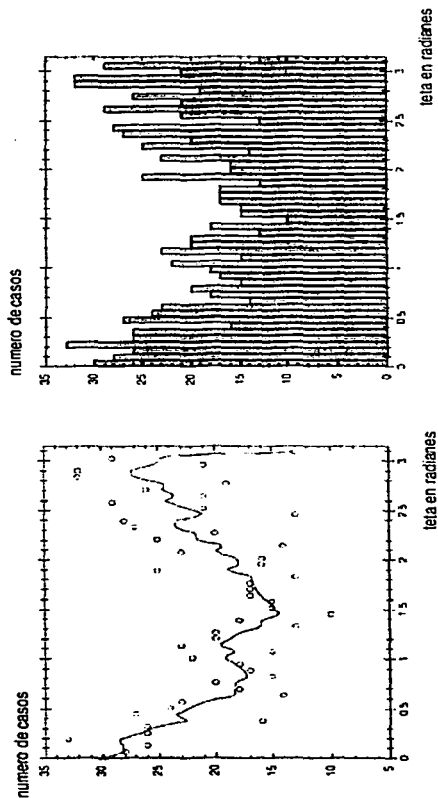


Figura 31. Distribución angular (histograma) de los centriolos bajo Citalasina (izq.) y gráfica aproximada de la distribución (der.) (abscisa $(0, \pi)$)

Las *fig. 30* y *31* nos muestran claramente que la distribución angular para una célula con nocodazol (sin microtúbulos) es simétrica con respecto a $\pi/2$ (ángulo recto) con tendencia a los grandes ángulos, mientras que la de una célula con citocalasina (sin actina, ni acción de motores de actina) se distribuye entre 0 y π formando dos hombros simétricos.

Una célula sin fármacos tiene una distribución angular (ver *fig. 29*) con propiedades menos claras, pero se puede distinguir una similitud mayor a la distribución de la *fig. 31* -célula con citocalasina- con dos "hombros" hacia 0 y π .

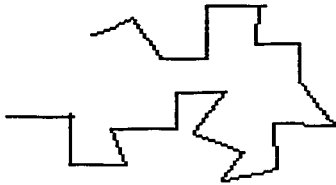
Al parecer, los microtúbulos determinan en una célula no sometida a fármacos la distribución angular y por ende el tipo de movimiento de los centriolos.

En una distribución en donde los ángulos son mayoritariamente 0 y π (*fig. 31*), los centriolos tienen tendencia a moverse en la misma dirección (ángulo 0 o π), pero invirtiendo alternativamente el sentido de su movimiento (cuando el ángulo es π). El sumar a este vaivén un pequeño cambio angular nos da una trayectoria quebrada (*fig. 32b*).

Una trayectoria con una distribución angular centrada alrededor de $\pi/2$ (*fig. 30*) tendrá una forma más suave (*fig. 32a*).

Calcular las distribuciones angulares, nos permitió cuantificar una propiedad cualitativa de la acción de los fármacos sobre el movimiento de los centriolos. Esto nos lleva directamente a la siguiente sección en donde medimos las áreas exploradas por el centriolo hijo en diferentes condiciones de la célula.

a



b



Figura 32. Descripción esquemática de trayectorias representativas.
a. Trayectoria con ángulo más probable $\pi/2$
b. Trayectoria con ángulo más probable 0 y π

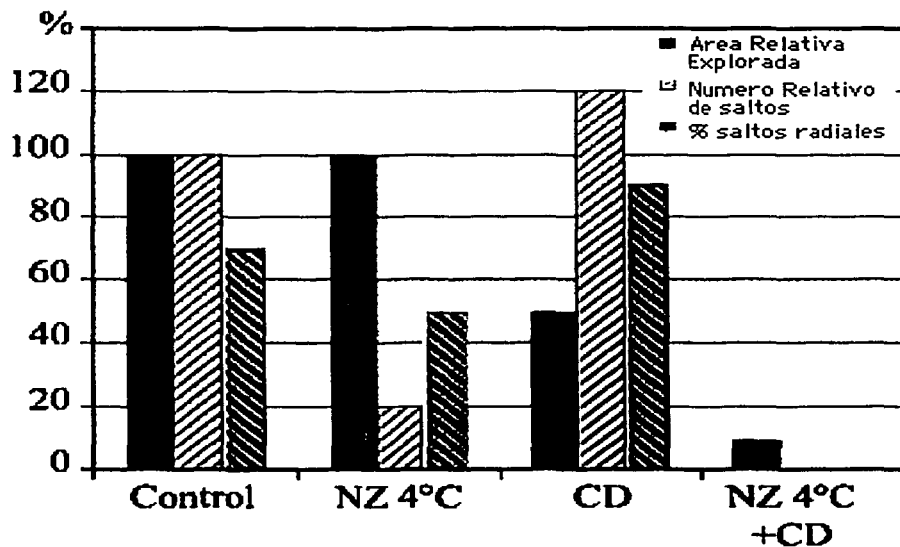


Figura 33. Area relativa explorada por los centriolos, número relativo de saltos, y % de saltos radiales con respecto al centriolo padre. NZ-nocodazol; CD-citocalasina D; 4°C-temperatura

6.3 Areas exploradas

En la *fig. 33* notamos que al afectar el sistema de actina disminuye el área relativa explorada por los centriolos.

La despolimerización de los microtúbulos con nocodazol disminuye drásticamente los movimientos rápidos o "saltos" (ya descritos en la *fig. 23*), y la citocalasina aumenta el número relativo de "saltos".

Recordamos que cuando un centriolo "salta" en realidad es que conserva su dirección de movimiento.

Esta observación es compatible con que la distribución angular de los cambios de dirección de los centriolos esté centrada alrededor de $\pi/2$ para una célula con nocodazol y 0 ó π para una célula con citocalasina. Una distribución angular alrededor de $\pi/2$ (*nocodazol*) es un cambio de dirección constante es decir **menos saltos radiales**, mientras que una alrededor de 0 ó π (*citocalasina*) es una conservación de la dirección es decir **más saltos radiales** (ver *fig. 30*). Finalmente para explicar que el porcentaje de saltos radiales sea mayor en el centriolo de una célula con citocalasina, hay que estudiar más las correlaciones entre centriolos.

6.4 Correlaciones entre los centriolos

Tratar de cuantificar la evidente correlación entre los centriolos es la parte más ardua y poco fructífera de este trabajo. En la *fig.17* es evidente que ese movimiento circular periódico de cada uno de los centriolos de manera simultánea indica una interacción física entre los centriolos (como se puede ver en el diagrama de la *fig.4*). La periodicidad del mismo movimiento es aún más evidente en la *fig. 34*.

Notese en la *fig.34* la diferencia de fase que existe entre el centriolo padre y el hijo, como si este último fuese llevado por aquél.

Este mismo fenómeno pudo notarse al calcular la distribución angular de los cambios de dirección de los centriolos, pero ahora tomando en cuenta la orientación del ángulo, y no el valor absoluto de éste (*fig.35*).

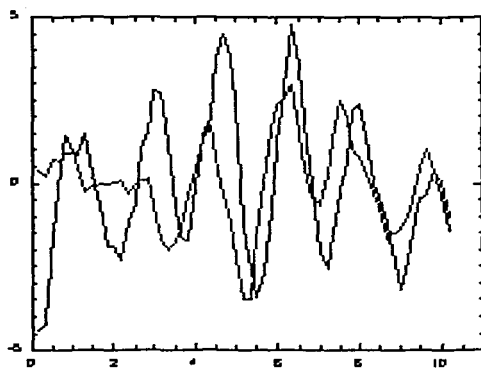


Figura 34. Distancia entre cada centriolo (gris-padre, negro-hijo) y el origen en μm , a lo largo del tiempo en minutos bajo nocodazol.

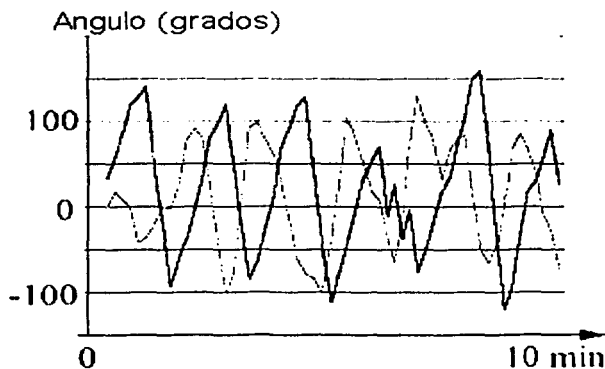


Figura 35. Correlación entre los movimientos del centriolo padre (gris) e hijo (negro) en una célula tratada con nocodazol. Cada curva representa la variación temporal del ángulo entre dos segmentos consecutivos de trayectoria.

Intentamos varios metodos para generalizar estas observaciones, y calcular el periodo de oscilación del movimiento de los centriolos, y la escala característica de este movimiento. Cada uno de estos métodos conllevaba sus bemoles. Al calcular transformadas de Fourier para obtener la frecuencia característica, nos topamos con una alta frecuencia proveniente del ruido en las mediciones, además de tener problemas por la poca cantidad de datos disponibles (en promedio 50 puntos por célula). Intentamos calcular funciones de correlación y autocorrelación del tipo $F(\tau) = \langle d(t)d(t+\tau) \rangle / \langle d(t=0)^2 \rangle$ para obtener la escala característica de la interacción, pero nos topamos con el mismo tipo de problemas que con la transformada de Fourier (baja estadística, ruido). La idea de deducir la escala temporal de la interacción nos hubiera dado una indicación de qué tipo de interacción podía ser, sobre la dimensión topológica del entorno en donde se mueve el centriolo, sobre el tamaño de la malla de la red de actina o de microtúbulos sobre el que se encuentra...

7. Conclusión y perspectivas

La complejidad de los sistemas biológicos, i.e de la vida, hacen que parezca una empresa aventurada para un físico lanzarse al estudio de un problema de biología. Lo cierto es que últimamente el desarrollo de la biología molecular ha permitido a estas dos disciplinas acercarse mucho. Se podría decir que la aportación concreta en 1953 del físico Francis Crick en cuanto a la resolución de la estructura del ADN y la aportación teórica 10 años antes de Erwin Schroedinger en su libro clásico “¿Qué es la vida?” donde predecía el tamaño de los genes son un preámbulo a la hoy creciente interacción entre física y biología. Los campos son diversos y se expanden cada vez más, desde el análisis estadístico de datos provenientes de “chips de ADN”, hasta modelos de desarrollo morfológico de vegetales [Dou,1996], pasando por modelos de ADN, pliegue de proteínas, biología celular, neurociencia[Sig,2000], y lo que nosotros hicimos.

Utilizando las técnicas de biología molecular creamos una fusión entre una proteína centriolar y la proteína fluorescente GFP de manera a poder observar los centriolos en una célula que integró el ADN de esta proteína. Se pensaba que los centriolos eran dos estructuras cilíndricas perpendiculares entre ellas y sin movimiento alguno [Sch,2000]. En nuestro estudio [Pie,2000] demostramos que los centriolos se movían y que uno de ellos (el centriolo hijo) recorría toda la célula en un movimiento muy pronunciado. Al buscar el origen de este movimiento encontramos que tanto los microtúbulos como la actina eran la causa: Los motores moleculares de myosina que generan la fuerza de los músculos, están involucrados en el movimiento de los centriolos. Como intentamos demostrarlo con la pequeña simulación del centrosoma, la

componente al movimiento por parte de los microtúbulos proviene de sus propiedades intrínsecas (la inestabilidad dinámica).

El análisis detallado de las trayectorias de los centriolos nos permitió determinar cuantitativamente y demostrar que la contribución de la actina y de los microtúbulos a las componentes del movimiento eran de diferente naturaleza: La distribución angular de los movimientos estaba centrada alrededor de $\pi/2$ para la actina y de $0, \pi$ para los microtúbulos. Un análisis más complejo es necesario para el estudio de las interacciones entre los centriolos.

Una interpretación al movimiento y a la asimetría de los centriolos puede ser la siguiente: El centriolo padre queda anclado a sus microtúbulos que lo estabilizan en el centro de la célula, el centriolo hijo ayuda a la nucleación de los microtúbulos pero no los sujeta, y dependiendo de su localización al soltar los microtúbulos ayuda a la polarización de la célula. El centrosoma es pues bicéfalo: Un centriolo tiene el verdadero papel de centrosoma al quedarse en el centro de la célula con el Golgi y el PCM, el otro sirve para polarizar la célula y determinar la citocinesis [Pie,2001].

Nuestro estudio muestra el interés que hay en que físicos se involucren en problemas de biología. El punto de vista y los instrumentos de análisis que aportamos nos permiten acercar de diferentes maneras un problema. Para los biólogos los centriolos no se movían. Los físicos dirían como mi compadre Galileo "*eppur si muove*" [Sob,1999].

Apéndices

Apéndice A:

Videomicroscopía

Para evitar que el medio cree radicales libres que puedan afectar a las células (desencadenando la apoptosis), se utiliza un medio nutritivo (DMEM) sin phenol rojo al que se le agrega 20 mMol de Hepes.

El material utilizado para filmar las células va más allá de un simple microscopio. Primero se necesita un dispositivo para que las células sigan viviendo.

Es decir un regulador del CO2 ambiente a 5% (CTI Controller 3700), y una incubadora que mantenga las células en su temperatura de 37 grados. Todo esto está conectado por unos tubos a una cámara de plástico transparente que envuelve al portaobjetos donde están las células listas para ser filmadas por el dispositivo de observación.

Este consta de la parte meramente óptica

- Microscopio Leica DM IRBE de epi-fluorecencia y contraste de Fase invertido .
- Varios objetivos de 100x y 63x sumergidos en aceite, o de 40x al aire libre.
- Lampara de 50 Watts
- Filtros FITC (excitación azul-emisión verde) , Rhodamina (excitación verde -emisión rojo), DAPI (excitación UV- emisión azul). El funcionamiento del microscopio de epi-fluorecencia se encuentra en el esquema....

De una parte Mecánica, de adquisición de datos y control del sistema

- Soporte motorizado en X-Y, al que se le añadió una motorización en Z.
- Shutter
- Cámara CCD MicroMax 5 MHz; Roper Scientific de 12-bits con sistema de enfriamiento.

- Interfase-micro Max Princeton instruments
- Controlador del microscopio Leica DM STC
- PC con 128 MB de RAM y 8 GB de Memoria dura, que controla el shutter, el soporte motorizado, la cámara de adquisición.
- Programa "METAMPORPH" para adquisición y tratamiento de imágenes, Así como para la programación de "macros" de adquisición.

Apéndice B :

Cultivo de los fibroblastos

Los fibroblastos se dividen en promedio una vez al día. Es necesario cambiar la caja petri de cultura cada 3 días diluyendo a la décima parte las células. El procedimiento es el siguiente.

En una caja petri se pone 5 ml de una solución de colágeno tipo I (extraído de cola de rata) de concentración 20 microg/ml y fibronectina a 1 microg/ml. Se deja en la incubadora a 37 grados una hora de tal manera que estas fibras polimerisen.

Por otro lado se lava la antigua caja petri que contiene las células con PBS, y luego se le agrega Tripsina + PBS (1/2). Las células se despegan de las paredes de la caja, pues la Tripsina digiere las proteínas. Después de 5 minutos se agrega un poco de medio nutritivo (DMEM Dubelco Medium Eagle Modified= BSF 1%+ L-glutamina 1% +streptomcina/Penicilina 1%) que elimina el efecto de la tripsina saturando de proteínas la solución. Se centrifuga 3 mn a 1500 Rpm a 37 grados y se recuperan las células al fondo del tubo.

Se les agrega medio nutritivo DMEM y diluye. Las células en solución son contadas y finalmente puestas en las cajas en donde polimerizaban las fibras. Ahí se les echa el antibiótico (geneticina; G418) que mata las células no transfectadas (pues no tienen gen de resistencia), y se les pone finalmente en la incubadora.

Apéndice C :

Anucleación de células

Se cultiva la células en unos portaobjetos de vidrio, donde se hizo polimerizar previamente colágeno I (20 microg/ml) y fibronectina (5 microg/ml).

Se prepara un tubo con soportes verticales para el porta-objetos. A este se le añade una solución de medio nutritivo DMEM + Citocalasina-D de concentración 1,5 microg/ml, de tal manera que el portaobjetos este totalmente cubierto y las células no queden al aire.

Se deja esto en el incubador media hora, de tal manera que la Citocalasina-D despolimerize parcialmente la Actina de la membrana citoplásmica.

Se pone a girar en una centrifugadora a 10000 RPM (10 000 g) y 37 grados, durante 40 minutos.

Debido a que el núcleo es más denso que el citoplasma y los organelos que lo componen, este es extraído de la célula por la centrifugación. Dejando más o menos intacto el resto de la célula (centrosoma, Golgi, RE, mitocondrias...). Así se obtienen pues los citoplastos.

Citoplastos con varios centriolos

Diluyendo citocalasina-D en el medio nutritivo celular (a una concentración de 1.5 µg/ml), despolimerizando un poco la actina cortical y evitando así la citocinesis. El resultado es que la célula sigue su ciclo normalmente, duplica su ADN y sus proteínas, pero no se divide.

Es posible obtener así células enormes polinucleadas y con varios centrosomas, basta para ello dejar pasar el número de ciclos deseados. Nosotros dejamos 24 y 48 horas las células antes de enuclearlas, obteniendo citoplastos con 2 y 4 centrosomas (resp.) es decir con 4 y 8 centriolos (resp.).

Apéndice D :

Fijación e inmunocitoquímica:

En este trabajo fijamos las células de 3 maneras diferentes:

- Ya sea poniendo el porta-objetos con las células 30s en metanol a -20°C para deshidratarlas. Se deja corto tiempo para que la CEN2-GFP no bliche demasiado, pero lo suficiente para estabilizar las proteínas.

- Ya sea fijando con PFA /0.1% glutaraldehído (PFA = Paraformal-aldheydo) entre 15 y 20 minutos. Esta fijación permite que la célula guarde su volumen, pues las interacciones entre los aldehídos son electrostáticas. Además la fijación es reversible.

Como los grupos carbonilos de los aldeidos (C=O) son muy fluorescentes, introducen mucho ruido a la preparación. Para evitar esto se reducen estos grupos con una solución de NaBrH₄ (0.1%) diluida en PBS durante 10 mn.

- Ya sea con glutaraldeido puro diluido en cacodilato durante 20 mn. Aquí las interacciones son covalentes y la reacción es no-reversible.

Imunofluorecencia:

Principio:

Esta técnica se utiliza para marcar proteínas específicas con fluoroforos. La propiedad intrínseca de los anticuerpos es reconocer y ligarse a una proteína en específica. Hay dos tipos de anticuerpos, los monoclonales (que provienen de una célula) y los policlonales (que provienen de muchas células y se extraen del suero de algún animal, en general conejos o cabras). El procedimiento tiene dos etapas:

-Se marca la proteína con el anticuerpo correspondiente llamado anticuerpo "primario".

-Dependiendo si el anticuerpo que se liga a la proteína es monoclonal (ratón) o policlonal (conejo) se utiliza un anticuerpo anti-ratón (/conejo) para reconocerlo. A este anticuerpo "secundario" se le añadió un fluoroforo, y así se puede ver la proteína marcada.

Cabe decir que se pueden hacer "dobles marcajes " es decir se marcan dos proteínas al mismo tiempo con diferentes colores. Para esto se deben usar anticuerpos primarios de diferente naturaleza (un monoclonal y un policlonal), para que así los anticuerpos secundarios marquen específicamente su proteína y no se crucen.

Detalles técnicos:

Se lavan los cubre-objetos en una solución Twin-PBS (0.1% Twin) durante 5 mn.

Luego se pone 50 µl del(/los) anticuerpo(s) primario(s) diluido en una solución PBS-BSA 3% a la concentración ad-hoc, durante 30 mn. La BSA (Suero de Bovino fetal) sirve para eliminar las interacciones no específicas de los anticuerpos.

Se lava en la misma solución Twin-PBS durante 5 mn.

Se agrega 50 µl del(/los) anticuerpo(s) secundario(s) diluidos como en la primera etapa.

Se deja reposar media hora para que los anticuerpos interactuen.

Se enjuaga una vez más durante 10 minutos en PBS-Twin.

Se lava en etanol puro para quitar el PBS y evitar formación de cristales.

Se monta el cubre-objetos sobre una gota de "citifluor" glicerol-PBS que evita el "blicheo" de los fluoroforos.

Todo esto se conserva a 4 grados.

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

anticuerpos primarios:

Monoclonales:

-alfa-tubulina T12 para marcar los Microtubulos.

-CTR 453 para el PCM

Policlonales:

-alfa-tubulina T13 para marcar los microtúbulos

-GMAP210 para marcar el Golgi

- A24 para marcar el PCM

-Gamma-tubulina para marcar el PCM

anticuerpos secundarios:

- LRSC (Lissamina-Rhodamina) Anti-ratón IgG + IgM utilizado al 1/600 de la concentración inicial 1.4 mg/ml.

-AMCA Anti-ratón IgG + IgM, AMCA Anti-conejo IgG (H+L) utilizados a 1/50 de la concentración inicial 1.5 mg/ml.

-TRSC Texas Red Anti-conejo IgG (H+L) utilizado a 1/200 de la solución inicial 1.5 mg/ml.

Apéndice E: Programa de simulación (Olivier Cardoso fué el principal programador)

ENTRÉE.CP

```
#ifndef __entree__
#define __entree__

#include <stdio.h>

void InitEntree();
void CloseEntree();
void LisFloat(float *f, char *st);
void LisInt(int *f, char *st);
void LisDouble(double *lf, char *st);
void Sort(char *st);

static char Chaine[255];

#endif
```

CENTROSOMA.CP

```
#include <iostream.h>
#include <string.h>
#include <math.h>
#include <stdlib.h>
#include "entree.h"
#include "centrosoma.h"
#include "graph.h"

#define MaxTest 100
#define Ampl 0.01

// inicialización de las variables estaticas

int Centrosoma::N=0; // numero de
microtubulos en el centrosoma
float Centrosoma::PosX = 0;
float Centrosoma::PosY = 0;
float Centrosoma::Time = 0;

long Centrosoma::nstat = 0;
float Centrosoma::xm = 0;
float Centrosoma::ym = 0;
float Centrosoma::x2m = 0;
```

```

float Centrosoma::y2m = 0;

int Centrosoma::DrawWhat = 0;
int Centrosoma::DumpWhat = 0;

// Le constructeur
Centrosoma::Centrosoma()
{
    int i;
    for (i=0; i<N; i++)
    {
        sites[i].StartX = PosX ;
        sites[i].StartY = PosY ;
        sites[i].Theta0 = i * 2 * PI / N ;
        sites[i].Theta = sites[i].Theta0 ;
        sites[i].LO = 0.1 * (1.0* rand()) / RAND_MAX ;
        sites[i].L = sites[i].LO ;
        sites[i].EndX = sites[i].StartX + sites[i].L *
cos(sites[i].Theta);
        sites[i].EndY = sites[i].StartY + sites[i].L *
sin(sites[i].Theta);
        sites[i].Anclaje= FALSE;
        sites[i].Etat = ( rand() > 0.3);
    }
}

// Le destructeur
Centrosoma::~Centrosoma()
{
}

void Centrosoma::Affiche(int Efface)
{
    int i;

    SetColor(0,0,0);
    if (Efface) {
        EraseGraph();
        PaintMode();
        DrawCircle(0,0,1);
    }
    else
    {
        sprintf(Chaine,"Temps : %f",Time);
        AfficheString(10,Taille+15,Chaine);

        sprintf(Chaine,"xm : %f",xm);
        AfficheString(10,Taille+30,Chaine);
        sprintf(Chaine,"ym : %f",ym);
        AfficheString(210,Taille+30,Chaine);
        sprintf(Chaine,"x2m : %f",sqrt(x2m));
        AfficheString(10,Taille+45,Chaine);
    }
}

```



```

        sprintf(Chaine,"y2m : %f",sqrt(y2m));
        AfficheString(210,Taille+45,Chaine);
    }

    switch (DrawWhat) {
    case 1 : // microtubulos
        for (i=0; i<N;i++) {
            sites[i].Affiche(Efface);
        }
        break;
    case 2 : // centrosoma
        SetColor(0,0,0xFFFF);
        DrawPoint(PosX,PosY);
    }
}

void Centrosoma::Sortie(int Efface)
{
    int i;

    if (Efface) {
        switch (DrawWhat) {
        case 1 : // microtubulos + centrosoma
            break;
        case 2 : // centrosoma
            sprintf(Chaine,"X\tY\t");
            Sort(Chaine);
            break;
        }
    } else {
        switch (DrawWhat) {
        case 1 : // microtubulos + centrosoma
            sprintf(Chaine,"%f\t%f\t",PosX,PosY);
            Sort(Chaine);
            for (i=0; i<N;i++)
            {
                sites[i].Sortie(Efface);
            }
            break;
        case 2 : // centrosoma
            sprintf(Chaine,"%f\t%f\t",PosX,PosY);
            Sort(Chaine);
        }
    }
}

float Centrosoma::Energia(float X, float Y)
{
    float E;
    int i;

    E=0;
    for(i=0;i<N;i++){

```

```

        E += sites[i].TestEnergia(X,Y);
    }
    return (E);
}

// posición inicial del centrosoma
// por ej la posición actual

void Centrosoma::Minimise(float *X, float *Y)
{
    float tx,ty,E,ME;
    int i;

    ME = Energia(PosX,PosY);
    for(i=0;i<MaxTest;i++){
        do {
            tx = PosX + ((1.0*rand()/RAND_MAX)- 0.5)*Ampl;
            ty = PosY + ((1.0*rand()/RAND_MAX)- 0.5)*Ampl;
        } while ( (tx*tx + ty*ty) > 1);

        E = Energia(tx,ty);
        if (E < ME ) {
            ME = E;
            *X = tx;
            *Y = ty;
        }
    }
}

void Centrosoma::Avance(float dt)
{
    int i;
    float X;
    float Y;

    for (i=0; i<N;i++)
    {
        sites[i].Avance(dt);
    }

    X = PosX;
    Y = PosY;

    Minimise(&X,&Y);

    for (i=0; i<N;i++)
    {
        sites[i].PoseStart(X, Y);
    }
}

```

```

PosX = X;
PosY = Y;
Time += dt;

xm = (xm * nstat + X) / (nstat+1);
ym = (ym * nstat + Y) / (nstat+1);

x2m = (x2m * nstat + X*X) / (nstat+1);
y2m = (y2m * nstat + Y*Y) / (nstat+1);

nstat++;
}

```

MICROTUBULO.CP

```

#include <iostream.h>
#include <string.h>
#include <math.h>
#include "microtubulo.h"
#include "graph.h"
#include "pos.h"
#include "entree.h"

// inicialización de los miembros estaticos de clase
Microtubulo

float    Microtubulo::ck = 0;           // constante de
torsion para la pareja relativa a la constante elástica
float    Microtubulo::Kkr = 0;         // Force
caracteristica de disminución de la velocidad de polimerización
relativo a una fuerza de compresión
float    Microtubulo::vd = 0;         // disminución de
la velocidad de crecimiento de los microtubulos relativamente a
la la velocidad de disminución
float    Microtubulo::fcd = 0;        //
frecuencia de paso de un estado de crecimiento a un estado de
disminución relativamente al tiempo caracterísitco
float    Microtubulo::fdc = 0;

Microtubulo::Microtubulo()           // le
constructeur
{
}

Microtubulo::~~Microtubulo()         // le
destructeur
{
}

float DistanceAuCentre(float SX,float SY,float Lo,float T)
{
    float EX;

```

```

float EY;

EX = SX + Lo * cos(T);
EY = SY + Lo * sin(T);

return ( EX*EX + EY*EY );
}

float LongueurAvantMembrana(float SX,float SY,float T)
{
float b;
float c;
float delta;
float r1,r2;

b = SX * cos(T) + SY * sin(T);
c = SX * SX + SY * SY - 1;
delta = b*b - c;
r1 = -b + sqrt(delta) ;
r2 = -b - sqrt(delta) ;
if (r2>0) return r2; else return r1;
}

float Microtubulo::Energia(float tL,float tT) // determina
la energía asociada al microtubulo
{
float Ek,Et;
float Dt;

Ek = (tL-L0) * (tL-L0); // Energia
elástica

Dt = fabs(tT-Theta0);
while (Dt>PI) {
Dt -= 2*PI;
}
Dt = fabs(Dt);
Et = ck * Dt*Dt; // copla de
anclaje al centrosoma

return Ek + Et ;
}

float Microtubulo::TestEnergia(float X, float Y)
// determina la energía asociada al microtubulo
{
float tL,tT;

if (DistanceAuCentre(X,Y,L0,Theta) <1 ) {
return 0;
} else { // Se toca la membrana
if (Anclaje) { // Il y a Anclaje

```

```

EndY));
        tL = sqrt((X-EndX) * (X-EndX) + (Y-EndY) * (Y-
        tT = atan2((EndY-Y),(EndX-X));
        return Energia(tL,tT);
    } else { // On touche mais sans Anclaje
        tL = LongueurAvantMembrana(X,Y, Theta);
        return Energia(tL,Theta);
    }
}
}

```

```

void Microtubulo::PoseStart(float X, float Y)
{

```

```

    StartX = X;
    StartY = Y;

    if (DistanceAuCentre(X,Y,L0,Theta) <=1 ) {
        L = L0;
        Anclaje = false;
    } else { // Se toca la membrana
        if (Anclaje) { // Il y a Anclaje
            L = sqrt((X-EndX) * (X-EndX) + (Y-EndY) * (Y-
EndY));
            if (L==0) {
                Theta = 0;
            } else {
                Theta = atan2((EndY-Y),(EndX-X));
            }
        } else { // Se toca sin Anclaje
            L = LongueurAvantMembrana(X,Y, Theta);
        }
        Anclaje = true;
    }
}

```

```

// determina la energia asociada al microtubulo

```

```

void Microtubulo::Affiche(int first) // permite
graficar el microtubulo
{
    PaintMode();
    if ( !first) {
        SetColor(0xFFFF,0xFFFF,0xFFFF);
        DrawLine(LSX,LSY,LEX,LEY);
    }
    if (Anclaje==1) {
        SetColor(0xFFFF,0,0);
    } else {
        SetColor(0,0xFFFF,0);
    }
    DrawLine(StartX,StartY,EndX,EndY);
}

```

```

    LSX = StartX;
    LSY = StartY;
    LEX = EndX;
    LEY = EndY;
}

void Microtubulo::Sortie(int first) // permite
sacar el resultado en un documento standard
{
    if ( first) {
        sprintf(Chaine,"L\tL0\tTheta\t");
        Sort(Chaine);
    } else {
        sprintf(Chaine,"%f\t%f\t%f\t",L,L0,Theta);
        Sort(Chaine);
    }
}

void Microtubulo::Avance(float dt) // permet de
hacer avanzar el microtubulo
{
    float r;

    // test para saber si se cambia de estado
    r = 1.0 * rand() / RAND_MAX;
    if (Etat == 1){ // crecimiento
        if (r < fcd * dt) {
            Etat = 0;
        }
    } else { // disminución
        if (r < fdc* dt) {
            Etat = 1;
        }
    }

    if (Etat == 1){ // crecimiento
        L0 = L0 + dt * exp( (L-L0) /Kkr) ;
    } else { // disminuye
        L0 = L0 - dt * vd;
        if (L0 <0) {
            L0 = 0;
        }
    }

    L = L0;

    EndX = StartX + L * cos(Theta);
    EndY = StartY + L * sin(Theta);

    r = EndX*EndX+EndY*EndY;

    if (r>1) { // se toca la membrana
        L = LongueurAvantMembrana(StartX,StartY,Theta);
    }
}

```

```

EndX = StartX + L * cos(Theta);
EndY = StartY + L * sin(Theta);

Anclaje = true;
} else { // no se toca la membrana
Theta = Theta0;
Anclaje = false;
}
}

```

POS.CP

```

#include "centrosoma.h"
#include "microtubulo.h"
#include "pos.h"
#include "graph.h"
#include "entree.h"
#include "divers.h"

void LectureParametres();

float dt;
float dtdump;
float dtdraw;

void LectureParametres()
{
// Lectura de los parametros genéricos para un microtubulo
LisFloat(&Microtubulo::ck, "ck");
LisFloat(&Microtubulo::Kkr, "Kkr");
LisFloat(&Microtubulo::vd, "vd");
LisFloat(&Microtubulo::fcd, "fcd");
LisFloat(&Microtubulo::fdc, "fdc");

// Lectura de los parametros para un centrosoma
LisFloat(&Centrosoma::PosX, "PosX");
LisFloat(&Centrosoma::PosY, "PosY");
LisInt(&Centrosoma::N, "N");

// Lectura de los parametros para la simulación
LisFloat(&dt, "dt");
LisFloat(&dtdump, "dtdump");
LisFloat(&dtdraw, "dtdraw");
LisInt(&Centrosoma::DumpWhat, "DumpWhat");
LisInt(&Centrosoma::DrawWhat, "DrawWhat");
}

```

```

    sprintf(Chaine, "\n");
    Sort(Chaine);
}

int main()
{
    Centrosoma *theCentrosoma;
    float t;
    float tdump;
    float tdraw;

    OpenGraph();
    InitEntree();
    LectureParametres();

    theCentrosoma = new Centrosoma;
    theCentrosoma->Affiche(TRUE);
    theCentrosoma->Sortie(TRUE);

    t = 0;
    tdump = 0;
    tdraw = 0;

    do {
        theCentrosoma->Avance(dt);
        t += dt;

        if (t>tdraw) {
            theCentrosoma->Affiche(FALSE);
            tdraw += dtdraw;
        }

        if (t>tdump) {
            theCentrosoma->Sortie(FALSE);
            tdump += dtdump;
        }

    } while (! CommandPeriod());

    CloseGraph();
    CloseEntree();

    return 0;
}

```

DIVERS.CP

```
#include "divers.h"
```



```

/* manejar el tablero */
short CommandKeyDown(){
    long km[4];
    GetKeys( km);
    return ( BitAnd( km[1],32768) != 0);
}

short OptionKeyDown(){
    long km[4];
    GetKeys( km);
    return ( BitAnd( km[1],4) != 0);
}

short ShiftKeyDown(){
    long km[4];
    GetKeys( km);
    return ( BitAnd( km[1],1) != 0);
}

short ControlKeyDown(){
    long km[4];
    GetKeys( km);
    return ( BitAnd( km[1],8) != 0);
}

short CommandPeriod(){
    long km[4];
    GetKeys( km);
    return ( BitAnd( km[1],0x808000) == 0x808000);
}

short SpaceBarDown(){
    long km[4];
    GetKeys( km);
    return ( BitAnd( km[1],512) != 0);
}

```

Apéndice F : léxico

A

Actina cortical: Red de filamentos de actina interconectados por proteínas que se encuentran pegados a la membrana citoplasmica interior y que debido a su densidad y rigidez estructuran la célula.

ADN: Acido desoxiribonucleico

Anafase: Tercera etapa de la mitosis, en la que los cromosomas migran hacia los dos polos, jalados por los microtúbulos.

Anticuerpo: Es una proteína producida por el sistema inmunitario (células B) que tiene una afinidad específica hacia elementos externos al organismo (antígenos).

Apoptosis: Muerte celular programada. Cadena de reacciones que la célula inicia para darse la muerte (¡suicidio!).

ARN:

Acido Ribonucleico (ARN). Se encuentran generalmente 3 tipos de ARN, mARN, rARN y tARN. El mARN es el resultado de la "transcripción" del ADN y sale del núcleo para ser "traducido" por los ribosomas.

El rARN forma parte de la estructura del ribosoma. El tARN carga el amino acido correspondiente a su codón de nucleótidos, que a su vez se asociará al mARN en el ribosoma.

ATP: Adenosina-Tri-Fosfato, Base nucleica con tres fosfatos que sirve como fuente de energía principal de la célula al hidrolizarse: $ATP \rightarrow ADP + \text{Energía}$
La reacción inversa es producida por las mitocondrias.

C

Centrosoma : Organelo de los eucariontes compuesto por un par de centriolos y más de 100 proteínas, que organiza y nuclea los microtúbulos. A lo largo del ciclo celular el centrosoma se duplica de manera controlada.

Centriolo : Organelo integrante del centrosoma con forma de cilindro hueco (.25 micras x .5 micras) cuyas paredes están compuestas por 9 tercias de microtúbulos. Cada célula tiene dos centriolos y estos se duplican a lo largo del ciclo celular.

Célula : Unidad basica de un organismo complejo.

Citoplasma: Todo lo que se encuentra entre la membrana nuclear y la membrana exterior de una célula (si es una célula procarionte, es todo lo que se encuentra dentro de la segunda membrana)

Cromosomas: Conjunto de ADN y proteínas que se forma durante la mitosis.

Citoesqueleto: Conjunto de polímeros dinámicos que estructuran la célula eucarionte.

Citocinesis: Última etapa de la mitosis en la que se corta el contacto (midbody) entre las dos células hijas.

Ciclinas: Familia de proteínas que son necesarias para pasar los diferentes “checkpoints” (de G1 a S y de G2 a M) del ciclo celular y cuyos niveles oscilan a lo largo del ciclo (de ahí su nombre).

Clón: Organismos que tienen el mismo genoma

Citoplasto: Célula sin núcleo

Código genético: Relación que asigna a cada triplete de ADN su amino ácido correspondiente.

Codón/Anti-codón: Secuencia de tres bases del ADN que lleva la información correspondiente a un amino ácido. ej: ATG corresponde al amino ácido Methionina.

El anti-codon es las tres bases complementarias del codón. Ej: ATG es el codon y TAC es el anticodón correspondiente.

D

División celular (*ver* Mitosis)

E

Endocitosis: Proceso en el que una parte de la membrana externa de la célula se internaliza, formando una vesícula conteniendo elementos del exterior (proteínas, bacterias, nutrientes...)

Eucariontes: Organismos evolutivamente avanzados con núcleo que miden ~40mm y que tienen una estructura interna compleja (citoesqueleto, compartimientos internos...)

Expresión (de una proteína):

Se dice que una proteína es “expresada” cuando hay producción de la proteína, es decir traducción de ARN en proteína por el ribosoma.

F

Fijación: Proceso químico para conservar intacta la estructura de una célula o un tejido (en general se usa metanol, glutaraldeído o para-formaldeído (PFA)).

G

Golgi (Aparato de): Organelo formado por membranas vesiculares y tubulares, que se extiende al rededor del núcleo y regula el tránsito de vesículas en la célula. Su interior es topológicamente equivalente al exterior de la célula.

Gen: Pedazo de ADN cuya secuencia de bases codifica una proteína.

Genoma: Conjunto de genes de un organismo

H

Histona: Proteína que compacta el DNA para formar un cromosoma

Huso cromático: Plano de la célula eucarionte en donde se alinean los cromosomas durante la metafase de la mitosis.

I

In Vitro: Experimentos que se realizan a partir de productos reconstituidos o purificados, conociendo perfectamente su composición y cantidad.

In Vivo: Experimentos que se efectúan en el organismo vivo, o utilizando productos no identificados provenientes de organismos.

K

Keratina: Proteína fibrosa que forma estructuras rígidas como pelo y uñas.

M

Map: Microtubule associated protein. La familia proteica de las Maps está conformada por todas las proteínas que se asocian a los microtúbulos, cambiándoles sus propiedades dinámicas.

Matriz extracelular: Conjunto de proteínas estructurales secretadas por la célula.

Metafase: Segunda etapa de la mitosis, en la que los cromosomas homólogos se alinean por pares en el huso acromático.

Microtúbulos: Polímeros tubulares huecos formados por dos proteínas globulares α y β -tubulina. Forman a partir del centrosoma un aster que se extiende por toda la célula.

Mitosis: Conjunto de etapas por las que pasa una célula al dividirse. Hay cuatro: Profase, Metafase, Anafase y Telofase

Mitocondrias: Fábrica de energía de la célula. Organelos con doble membrana y ADN propio que se encuentran en el citoplasma y tienen por principal función sintetizar ATP a partir de ADP.

Meiosis: Conjunto de dos divisiones celulares al hilo con una sola duplicación de ADN que forma las células reproductivas.

O

Organelo/Organelo: Estructura micrométrica de la célula.

Ovocito: Célula reproductiva femenina generalmente muy grande cuyo ciclo celular se encuentra detenido en metafase II de la meiosis.

P

Partenogénesis: Procesos que llevan a la formación de un organismo multicelular

Plásmido: ADN circular.

PCM (material peri-centriolar): Conjunto de proteínas que rodea a los centriolos.

Procariontes: Organismos unicelulares sin núcleo evolutivamente primarios, que no tienen ni citoesqueleto ni organelos (ej: las bacterias)

Profase: Primera etapa de la mitosis en la que se forman los cromosomas y se rompe la membrana nuclear.

Proteína: Secuencia de amino ácidos sintetizada por todo organismo vivo. Una proteína tiene dos extremidades diferentes: el lado N y el lado C, que corresponden al lado donde se encuentra la amina o el carbono.

Promotor: Se le llama a una secuencia de ADN que permite la expresión de un gen.

R

Reticulo Endoplasmico(RE): Organelo ubicuo en el citoplasma, conformado por membranas tubulares. La función principal del RE es plegar adecuadamente las proteínas recién sintetizadas y distribuirlas al lugar que les corresponde en la célula. Su interior es topológicamente equivalente al exterior de la célula.

Ribosoma: Partícula formada por proteínas y rARN que sintetiza las proteínas a partir de mARN y tARN. Esta compuesta por dos unidades (de coeficiente de sedimentación 40s y 60s cada una) que se juntan al iniciar la traducción.

T

Telofase: Cuarta etapa de la mitosis, en la que se forma el núcleo y se cierra el contacto físico entre las dos células hijas.

Transfección: Proceso para que el ADN pase la membrana citoplásmica y se integre a la célula.

Tubulina: Proteína globular descubierta en los microtubulos. Hasta ahora se han encontrado 4 tipos (a y b que forman los microtubulos, g y d que se encuentran en los centriolos)

Bibliografía

- [Alb,1989] Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts, Watson
Molecular Biology of the cell *Second Edition* (1989) GP editors
- [Arn,2000] Arnal I. Et al *J. Cell Biol.* (2000) **149**: 767-774
- [Bob,1998] Bobinnec Y *J Cell Biol*, (1998); **143**:1575-1589
- [Bor,2002] Michel Bornens *Current Opinion in Cell Biology* (2002); **14**:25-34
- [Dou,1996] Douady S. and Couder Y., *J. theor. Biol* (1996); **178**:132-40
- [Fyg,1997] Deborah Fygenon **Phd thesis** Princeton U. (1997)
- [Goo,2000] Good *et al Curr Opin Cell Biol.* (2000); **12**(1):63-71
- [Kell,1994] Kellogg DR *Annu Rev Biochem* (1994); **63**: 639-74
- [Kir,1988] Kirschner M. *et al Nature.* (1988); **334**(6180):356-9
- [Kut,2000] Kuntziger T. and Bornens M. (2000) **The centrosome and parthenogenesis.**
In: Palazzo R.E. and Schatten G.R. (Eds) *Centrosome in Cell Replication and Early Development.* (Vol. 49) (pp. 1-25) San Diego: Academic Press
- [Loi,1999] Loisel *et al Nature* (1999); **401** 6753 Page 613 - 616
- [Mag,1993] Magnasco MO *Phys Rev Lett.* (1993); **6**;71(10):1477-1481
- [Mag,1994] Magnasco MO *Phys Rev Lett.* (1994); **72**(16):2656-2659
- [Mar,1991] Marn, J. And Hastings, J. *J. Cell Physiol*; (1991) **77**:313-8.
- [Pie,2000] Piel M, Meyer P, Khodjakov A , Bornens M, *J. Cell Biol.* (2000); **149**: 317-330

- [Pie,2001] Piel M *et al Science* (2001); **291**: 1550-1553.
- [Rus,2001] Rusan NM *et al Mol Biol Cell* (2001); **12**(4):971-80
- [Sch,2000] Schliwa M, *Nature* (2000); **405**, 292
- [Sig,2000] Sigman M., *et al PNAS* (2000); **98**: 1935-1940
- [Sob,1999] Sobel Dava "Galileo's daughter" penguin books p277
- [Wie,1999] Wiese C. and Zheng Y. *Curr Opin Struct Biol.* (1999); (2):250-9