



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# **Dinámica del Calcio Intracelular: Análisis y Modelado de su Liberación y su Transporte**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires en el área Física

**Alejandra C. Ventura**

Director de Tesis: Dra. Silvina Ponce Dawson

Lugar de Trabajo: Departamento de Física, FCEyN, UBA

Buenos Aires, 2005

# DINÁMICA DEL CALCIO INTRACELULAR: ANÁLISIS Y MODELADO DE SU LIBERACIÓN Y SU TRANSPORTE

**Lic. Alejandra C. Ventura**

Tesis de Doctorado

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Director: **Dra. Silvina Ponce Dawson**

## **Resumen**

Esta tesis está dedicada al análisis y modelado matemático del transporte de calcio en el citosol celular. Su principal objetivo es la obtención de un conjunto de ecuaciones simplificadas que permitan describir ese transporte y puedan ser utilizadas para extraer información cuantitativa a partir de imágenes de fluorescencia.

## **Palabras clave**

Dinámica del calcio, ecuaciones de reacción-difusión, buffers, múltiples escalas en ecuaciones en derivadas parciales.

# INTRACELLULAR CALCIUM DYNAMICS: ANALYSIS AND MODELING OF ITS RELEASE AND ITS TRANSPORT

**Lic. Alejandra C. Ventura**

Advisor: **Dra. Silvina Ponce Dawson**

## **Abstract**

This thesis is dedicated to the analysis and mathematical modeling of the calcium transport in the cellular cytosol. Its main objective is to obtain a set of simplified equations that allow to describe that transport and can be used to extract quantitative information from fluorescence images.

## **Keywords**

Calcium dynamics, reaction-diffusion equations, buffers, multiple scales in partial differential equations.

*A Alejandro.*

*A mis padres.*



*La filosofia è scritta in questo grandissimo libro che continuamente ci sta aperto innanzi a gli occhi (io dico l'universo), ma non si può intendere se prima non s'impara a intender la lingua, e conoscer i caratteri, ne' quali è scritto. Egli è scritto in lingua matematica, e i caratteri son triangoli, cerchi, ed altre figure geometriche, senza i quali mezzi è impossibile a intenderne umanamente parola; senza questi è un aggirarsi vanamente per un oscuro laberinto.*

(La filosofía está escrita en este grandísimo libro que continuamente está abierto frente a los ojos (yo digo el Universo), pero no se lo puede comprender si primero no se aprende a entender su lengua y a conocer los caracteres con los cuales está escrito. Él está escrito en la lengua matemática, y los caracteres son triángulos, círculos, y otras figuras geométricas sin las cuales es imposible entender humanamente palabra alguna; sin éstos es vagar vanamente por un oscuro laberinto. )

*Galileo Galilei, 1623*

# Índice general

Índice General . . . . .	v
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1 Transporte de calcio en presencia de “buffers”: modelo matemático completo y aproximaciones varias derivadas del mismo</b>	<b>25</b>
1.1 Resumen . . . . .	25
1.2 Modelo matemático detallado para la dinámica del calcio intracelular . . . . .	26
1.3 Aproximaciones varias al modelo detallado . . . . .	28
<b>2 Aproximando el transporte de <math>\text{Ca}^{2+}</math> citosólico en presencia de “buffers” como un proceso puramente difusivo</b>	<b>34</b>
2.1 Resumen . . . . .	34
2.2 Aproximación difusiva al transporte de $\text{Ca}^{2+}$ en presencia de “buffers”: simulaciones numéricas . . . . .	35
2.3 Aproximación difusiva al transporte de $\text{Ca}^{2+}$ en ovocitos: análisis de “puffs sintéticos” . . . . .	38
2.4 Discusión . . . . .	45
<b>3 La aproximación de “buffers” rápidos</b>	<b>47</b>
3.1 Resumen . . . . .	47
3.2 Ondas de calcio . . . . .	48
3.2.1 Modelos matemáticos . . . . .	48
3.2.2 Métodos numéricos y parámetros de las simulaciones . . . . .	50
3.2.3 Herramientas para el análisis de las simulaciones numéricas . . . . .	51
3.2.4 Comparación de escalas temporales y análisis preliminar . . . . .	52
3.2.5 Resultados numéricos: análisis en términos de variables con dimensiones . . . . .	54
3.2.6 Resultados numéricos: análisis en términos de parámetros adimensionales . . . . .	64

3.3	Rango de validez de la aproximación de equilibrio . . . . .	68
3.4	Discusión . . . . .	69
3.5	Apéndice: Aproximación analítica para $\tau^*$ . . . . .	73
<b>4</b>	<b>Reducciones observacionales: una ecuación cerrada para el transporte de <math>\text{Ca}^{2+}</math> en presencia de “buffers” obtenida a partir de datos experimentales</b>	<b>76</b>
4.1	Resumen . . . . .	76
4.2	Ecuaciones de evolución . . . . .	77
4.3	Probando la aproximación . . . . .	78
4.3.1	Cómo obtener las funciones $f$ , $h$ y $k$ . . . . .	78
4.3.2	Pruebas numéricas . . . . .	79
4.4	Discusión . . . . .	83
<b>5</b>	<b>Usando la ecuación cerrada para el transporte de <math>\text{Ca}^{2+}</math> para determinar los flujos de <math>\text{Ca}^{2+}</math> en imágenes de fluorescencia</b>	<b>84</b>
5.1	Resumen . . . . .	84
5.2	Introducción . . . . .	85
5.3	Métodos . . . . .	86
5.3.1	El algoritmo: Hipótesis básicas . . . . .	86
5.3.2	El algoritmo: Implementación numérica . . . . .	88
5.3.3	Simulaciones numéricas . . . . .	94
5.3.4	Pruebas realizadas sobre el algoritmo . . . . .	96
5.3.5	Experimentos . . . . .	99
5.3.6	Procesamiento de señales experimentales . . . . .	100
5.3.7	Estimación de errores . . . . .	101
5.3.8	Datos cinéticos obtenidos de registros experimentales .	102
5.4	Resultados . . . . .	102
5.4.1	Tests numéricos para el algoritmo de reconstrucción . .	102
5.4.2	Reconstrucción de flujos en señales de calcio experimentales . . . . .	113
5.5	Discusión . . . . .	119
5.5.1	Resumen . . . . .	119
5.5.2	Verificación con datos sintéticos . . . . .	121
5.5.3	Aplicación a sparklets reales . . . . .	125
5.5.4	Conclusiones . . . . .	125
5.6	Apéndice: Descripción de cómo obtener las funciones $f$ , $g$ , $h$ y $k$ y sus errores . . . . .	127

<b>6</b>	<b>Reducciones observacionales: una ecuación cerrada para el transporte de calcio en presencia de “buffers” con solución analítica</b>	<b>130</b>
6.1	Resumen . . . . .	130
6.2	Introducción . . . . .	131
6.3	Por qué los mecanismos de remoción pueden aproximarse por una función de $[Ca^{2+}]$ : la importancia de la presencia de una fuente localizada de $Ca^{2+}$ . . . . .	132
6.4	Probando la reducción lineal con simulaciones numéricas . . .	137
6.5	Análisis de errores . . . . .	139
6.6	Un modelo que separa propiedades intrínsecas de corriente . .	148
6.7	Habilidad de la ecuación de evolución lineal para describir la dinámica observada experimentalmente en puffs y sparklets . .	151
6.8	Usando la nueva descripción dinámica para re-analizar los puffs sintéticos introducidos en el Cap. 2 . . . . .	153
6.9	Discusión y conclusiones . . . . .	158
<b>7</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>160</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>166</b>

# Introducción

Esta tesis está dedicada al análisis y modelado físico/matemático de un proceso biológico críticamente importante a nivel celular: la dinámica del ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dentro de la célula.

Al “modelar” sistemas naturales, al darle expresión matemática a una realidad particular, buscamos avanzar en el entendimiento de los fenómenos involucrados en esa realidad, de su interacción y organización espacio-temporal, que resulta en un determinado conjunto de observaciones experimentales. Por otro lado, buscamos también tener capacidad predictiva, tanto en lo que refiere a experimentos que aún no se han realizado como a aquéllos que no es posible realizar, ya sea por límites en la resolución de los dispositivos de medición o bien por la naturaleza invasiva que deberían tener los experimentos en cuestión. Con el modelado pretendemos, entonces, ENTENDER y PREDECIR, lo cual probablemente resume los objetivos de toda investigación científica. En el caso de esta tesis, las preguntas motivadoras nacen tanto desde el sistema biológico en estudio como de la física involucrada en el mismo, en particular en lo referente a sistemas de reacción-difusión, procesos de transporte, interacciones no-lineales y enfoques de dos escalas temporales.

Esta tesis combina estudios analíticos y numéricos, y una parte fundamental de la misma la constituye el análisis de observaciones experimentales (realizadas por el grupo de I. Parker, UC Irvine, con quien hemos desarrollado una colaboración interdisciplinaria). La construcción y el análisis de los modelos, que son deterministas y elaborados en base a ecuaciones diferenciales ordinarias o en derivadas parciales, usa algunas herramientas de la teoría de sistemas dinámicos y simulaciones numéricas.

## Motivación: dinámica del calcio

Una característica primordial de toda célula viva es su habilidad para comunicarse con el medio que la rodea [Lipp and Niggli, 1996]. Esta comunicación requiere un procesamiento de los estímulos externos, como consecuencia del cual la información entrante es transportada dentro de la célula por alguna sustancia portadora (un mensajero secundario) para su posterior “decodificación”. El calcio es un mensajero secundario universal que interviene en una infinidad de procesos biológicos [Berridge et al., 1998]: tiene un rol fundamental en las sinapsis neuronales, es el ion que abre las vesículas contenedoras de los neurotransmisores que permiten la comunicación interneuronal [Augustine and Charlton, 1986, Aidley, 1998]; participa en el acople entre la excitación eléctrica y la actividad mecánica en el músculo cardíaco [Lipp and Niggli, 1996]; está también involucrado tanto en el inicio de la vida como en la muerte celular, cuando el espermetazoide se ancla en el huevo, una o varias ondas de calcio indican el inicio del proceso de fertilización [Nuccitelli, 1994], esto ocurre en diversos tipos de organismos, entre ellos, los mamíferos. Si bien durante estos procesos el calcio es liberado dentro del citoplasma, es sabido que la permanencia en éste de altas concentraciones de calcio durante un tiempo prolongado lleva a la muerte celular [Berridge et al., 1998]. Dada su versatilidad en señalar el inicio de fenómenos tan distintos dentro de un mismo ámbito, podemos concluir que el calcio actúa como un componente multi-propósito dentro de la maquinaria celular. Surge entonces la pregunta de cómo puede hacerlo. Se supone que la información para iniciar uno u otro proceso está codificada en la dinámica espacio-temporal de la concentración de calcio.

1. ¿Por qué se supone que hay información codificada en la evolución temporal?

Se han observado, en distintos tipos de células, oscilaciones globales de la concentración de calcio [Goldbeter, 1996]. Este tipo de comportamiento global es usado para transmitir información a grandes distancias. Así como se han observado ondas de calcio dentro de una misma célula, también existen ondas intercelulares [Jung et al., 1998]. Se supone que, en este caso, la información está codificada en la frecuencia de las oscilaciones. Por otro lado, hace unos años, se identificó un mecanismo que actúa dentro de las células, capaz de decodificar la información contenida en la frecuencia de las oscilaciones del calcio [De Koninck and Schulmann, 1998]: la respuesta de esta maquinaria de importancia a nivel fisiológico depende de la frecuencia con la que oscila la concentración del calcio.

2. ¿Y por qué se supone que es importante la distribución espacial?

Un ejemplo muy interesante en este sentido tiene lugar en los músculos. Los músculos se contraen ante una elevación uniformemente distribuida de la concentración de calcio, mientras que se relajan cuando se los somete a elevaciones mayores pero localizadas espacialmente [Berridge et al., 1998]. Esto es debido a que las células son objetos inhomogéneos, por lo que la respuesta a una elevación local de calcio depende de los componentes que se encuentran cerca del lugar donde ocurrió la liberación.

Así es como, dentro de la amplia variedad de procesos oscilatorios que presentan los organismos vivos, las oscilaciones de la concentración de calcio citosólico han atraído mucha atención tanto de experimentalistas como de gente que hace modelado matemático [Goldbeter, 1996, Keener and Sneyd, 1998, Murray, 1989]. Es sabido que estas oscilaciones y su expresión en el dominio espacial, las ondas de calcio, son críticamente importantes en el control de un extenso conjunto de funciones celulares y que forman parte de un sistema de procesamiento de la información en las células de animales y plantas. En células grandes, como los ovocitos de *Xenopus laevis*, las ondas intracelulares desarrollan un alto grado de organización espacial, formando círculos concéntricos, ondas planas, y espirales múltiples [Lechleiter et al., 1991]. La velocidad de las ondas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  es notablemente similar ( $5-20 \mu\text{ms}^{-1}$ ) a través de un amplio rango de tipos celulares [Jaffe, 1991]. También se han observado ondas de calcio que se propagan entre células. Se cree que las ondas de calcio permiten la comunicación entre distintos sectores de la célula, o entre células, y que sirven para sincronizar una respuesta global, multicelular, a un estímulo local. Sin embargo, el mensaje exacto que transporta la onda no se conoce en la mayoría de los casos.

De todo esto se desprende la importancia de estudiar la dinámica espacio-temporal del calcio intracelular y de los mecanismos que la afectan. Por otro lado, dada la omnipresencia del calcio en una variedad tan grande de procesos fisiológicos, el interés en su estudio es enorme dentro del área biológica y biomédica. Esto ha dado lugar a una infinidad de resultados experimentales que buscan entender distintos aspectos de la dinámica del calcio y de su participación en distintos fenómenos. Un modelado adecuado y una evaluación correcta de la importancia relativa de los distintos procesos involucrados es indispensable para la interpretación de los resultados obtenidos. En esta tesis hemos avanzado en el modelado matemático de la dinámica del calcio intracelular y en el desarrollo de nuevos métodos de análisis de datos experimentales que permitan obtener información cuantitativa a partir de imágenes de fluorescencia.

## La maquinaria celular para el control de la concentración de calcio

Existen muchos mecanismos para el control de la concentración de calcio intracelular actuando en diferentes niveles, todos ellos diseñados para asegurar la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en cantidades suficientes como para que pueda llevar a cabo sus funciones, pero no muy elevadas dado que, como ya hemos mencionado, resultan tóxicas.

En vertebrados, la mayor cantidad de calcio es almacenada en los huesos, de donde se libera por estimulación hormonal, manteniendo una concentración extracelular de aproximadamente 1 mM, mientras que la concentración de calcio libre en el citosol está alrededor de 0.1  $\mu\text{M}$ . Por otro lado, la célula tiene compartimientos internos, tales como el retículo endoplasmático, que actúan como reservorios de calcio. En ellos las concentraciones son del orden del milimolar. Por esta razón, existe un gradiente de concentraciones pronunciado desde el exterior de la célula y desde el lumen del retículo hacia el citosol. Esto hace que la célula tenga la capacidad de aumentar rápidamente su concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]$ , mediante la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática y en la del retículo, y aprovechando el flujo pasivo que genera el gradiente de concentraciones. Sin embargo, también implica que se necesita consumir energía para poder mantener baja la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Así es como la célula tiene una delicada maquinaria que controla la entrada y remoción de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El influjo de iones de calcio al citosol se produce básicamente por dos vías: a través de la apertura de canales situados en la membrana plásmática o mediante la liberación desde compartimientos internos. Hay varios ejemplos de canales del primer tipo: en algunos la apertura es controlada por la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana plasmática (importantes en la generación de oscilaciones rápidas en células cardíacas y en los mecanismos de comunicación neuronal en la célula pre-sináptica), en otros por la unión de un ligando externo (como los receptores de NMDA presentes en sinapsis de algunas neuronas, importantes en la propagación de señales eléctricas e involucrados en procesos de plasticidad sináptica), y en otros es incluso controlada por estímulos mecánicos. Los reservorios internos más importantes que acumulan calcio son las mitocondrias, el retículo sarcoplasmático (SR), el retículo endoplasmático (ER) y gránulos secretorios. En estos casos la liberación se produce principalmente a través de dos tipos de canales ubicados en la membrana de los retículos sarco y/o endoplasmático: los receptores de rianodina y los receptores de inositol (1,4,5)-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). Los recep-



tores de rianodina juegan un papel importante en la contracción del músculo cardíaco. Los de  $IP_3$  se encuentran predominantemente en células no musculares y, en particular, son los responsables de la liberación desde el retículo endoplasmático en ovocitos. Uno de los fenómenos en los cuales este tipo de receptor está involucrado es en la fertilización del ovocito: la llegada de un espermatozoide induce la liberación de  $IP_3$  en un sitio cercano a la membrana plasmática, éste induce luego una onda macroscópica de calcio y posteriores oscilaciones o, dependiendo del organismo, elevaciones sostenidas de la concentración citosólica que se mantienen durante lapsos de horas y se cree que constituyen una señal relevante durante el proceso de fertilización [Keener and Sneyd, 1998].

En cuanto a la remoción del calcio citosólico, ocurre de diversas maneras, entre otras, llevándolo hacia el exterior de la célula o reinsertándolo en reservorios internos. Estos dos métodos requieren un gasto de energía ya que implican el transporte de una sustancia contra su gradiente de concentración. Uno de los mecanismos involucrados en este transporte es una proteína conocida como intercambiador  $Na^+-Ca^{2+}$ , que se encuentra en la membrana plasmática y remueve calcio usando la energía electroquímica almacenada en el gradiente de sodio a expensas de la entrada de iones  $Na^+$ . Otra proteína relevante en el control de la concentración de calcio en el citosol es la  $Ca^{2+}$ -ATPasa, que lleva a cabo la tarea de transportar calcio a través de una membrana en contra del gradiente de concentraciones mediante el consumo de energía entregado por la hidrólisis de moléculas de ATP. En ovocitos el mecanismo más importante lo constituye la  $Ca^{2+}$ -ATPasa del retículo endoplasmático, o bomba *SERCA* por sus siglas en inglés, que recaptura iones de  $Ca^{2+}$  presentes en el citosol hacia el retículo endoplasmático [Keener and Sneyd, 1998, Berridge et al., 1998]. La mitocondrias, por su parte, suelen comportarse como un dispositivo de seguridad: pueden acumular grandes cantidades de  $Ca^{2+}$  y proteger a la célula de niveles tóxicos. La acumulación de  $Ca^{2+}$  se da a través de una bomba que funciona a una tasa muy alta comparada con las de la bomba de la membrana plasmática, la bomba *SERCA* o los intercambiadores, de modo que la mitocondria juega un rol dominante. En algunas células se ha visto que la mitocondria se localiza muy próxima a los sitios de liberación del retículo, permitiéndole absorber muy rápidamente grandes cantidades del calcio liberado. Así es como las mitocondrias pueden modular espacial y temporalmente las señales de calcio [Falcke et al., 1999].

El mecanismo más rápido que tienen las células para disminuir la concentración de calcio citoplasmático libre es atraparlo por sustancias llamadas “buffers” y que son típicamente grandes proteínas que ligan  $Ca^{2+}$ . Se esti-

ma que el 99 % del calcio citoplasmático total se encuentra ligado a buffers. Estas sustancias controlan tanto la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  como su escala espacial de difusión. Proteínas de este tipo también están presentes dentro de los reservorios internos. En la Fig. 1 se esquematizan sólo algunos de los mecanismos involucrados en el control de la concentración de calcio citosólico.

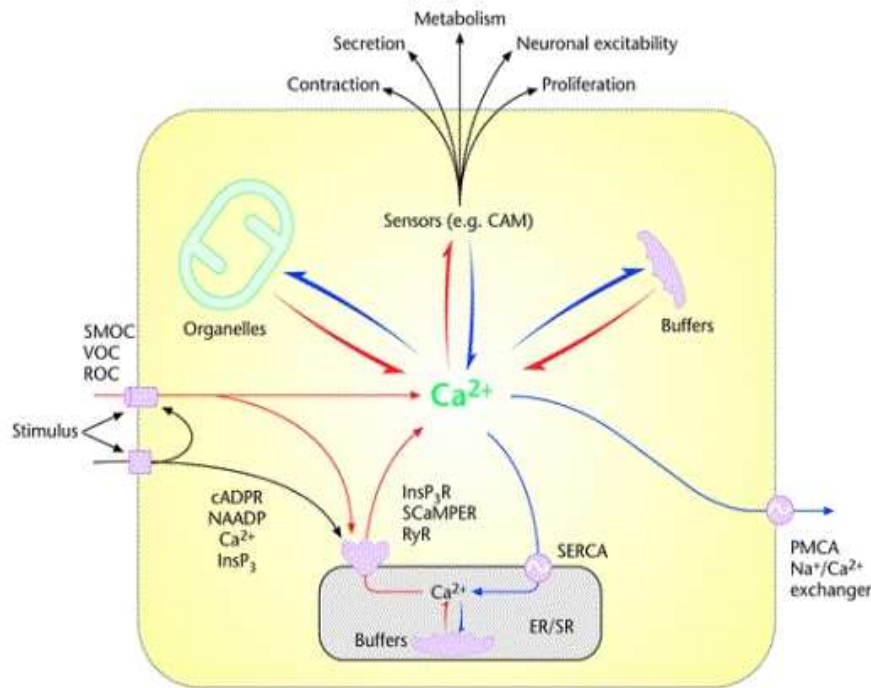


Figura 1: Diagrama de alguno de los mecanismos involucrados en el control de la concentración de calcio citosólico. Se indican ER/SR: retículos endo o sarcoplásmico; organelas y buffers (tanto dentro como fuera de ER/SR). En la membrana de ER/SR se esquematizan canales, entre ellos  $\text{IP}_3\text{R}$  y  $\text{RyR}$ , y la bomba SERCA. En la membrana plasmática se indican canales voltaje dependientes, bombas y el intercambiador  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ .

## Modelado matemático de la dinámica del calcio

En relación al modelado matemático podemos preguntarnos:

1. ¿Cómo construimos estos modelos?

2. ¿Por qué querríamos construir modelos? ¿Cómo y para qué vamos a usarlos?

Claramente la segunda pregunta es más difícil de responder, se intentará darle respuesta en forma general en esta Introducción y en forma particular en cada capítulo de la tesis. Nos ocupamos ahora de la primera de ellas.

En líneas generales hay dos enfoques opuestos para la construcción de un modelo: el que “incluye todo” y el que “desprecia todo”. Nuestro trabajo es conseguir un balance entre ambos. Incluir todo lo que se sabe no hace que el modelo sea más realista, no importa cuánto detalle se haya incluido, siempre se están dejando aspectos afuera. Finalmente se obtiene un sistema altamente complicado que continúa siendo una aproximación y con el que, además, es difícil de trabajar. Por otro lado, tampoco es de interés dejar afuera todas las complejidades. La construcción de un modelo es, entonces, una forma de arte. Es necesario decidir cuáles de los detalles resultan vitales para poder estudiar la pregunta bajo consideración. Por supuesto, esta elección dependerá de la pregunta particular, resulta entonces indispensable tener en claro cuál es la pregunta antes de comenzar el modelado. La idea sería no incluir detalles innecesarios, y en el mejor de los casos demostrar explícitamente que son innecesarios. Sin embargo, sí se busca incluir suficiente detalle de modo que el modelo pueda decir algo útil sobre la pregunta que se está considerando. Todo esto se decide en base a cada caso particular. A veces, un modelo altamente complejo resulta apropiado. Otras veces, el más simple de los modelos puede brindar enorme entendimiento (un ejemplo claro al respecto lo constituyen las ecuaciones de FitzHugh-Nagumo [Keener and Sneyd, 1998]).

Siempre hay algún grado de aproximación en el proceso de modelar una cierta realidad física como es el caso de un proceso biológico particular. El punto dentro del proceso de modelado en el cual se hace efectiva la aproximación determina qué tipo de esfuerzo (por ejemplo, analítico o computacional) se necesita en el proceso de solución y también afecta profundamente la confiabilidad de la respuesta final.

En esta tesis estamos interesadas en los procesos que tienen lugar cuando el calcio ya ha ingresado al citosol. Si bien la concentración de calcio libre basal es muy baja, ésta se eleva a valores del orden de  $70 \mu\text{M}$  (promediándola sobre un volumen  $\sim (20 \mu\text{m})^3$  alrededor de la boca del canal) para corrientes pequeñas del orden de la de canal único ( $\sim 0,07 \text{ pA}$ ). Una concentración de  $1 \mu\text{M}$  corresponde a  $\sim 75$  partículas en un volumen de  $\sim (0,5 \mu\text{m})^3$  (del orden del volumen sobre el que se recoge la luz en los experimentos

ópticos). Por lo tanto, optamos por un modelo matemático que prescriba la evolución temporal de la concentración de calcio citosólico,  $[\text{Ca}^{2+}](\mathbf{r}, t)$  (o equivalentemente, la densidad de probabilidad de encontrar un ion alrededor de un cierto punto).

Dada la concentración,  $u(\mathbf{r}, t)$ , de una sustancia, su cambio a lo largo del tiempo está descrito por una ecuación de la forma:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = f - \nabla \cdot \mathbf{J}, \quad (1)$$

donde  $\mathbf{J}$  es el flujo de dicha sustancia y  $f$  engloba la tasa de producción local, la remoción y la transformación de la sustancia en otras mediante reacciones químicas. En el caso del calcio citosólico, suponemos un flujo difusivo dado por la ley de Fick [Keener and Sneyd, 1998]:

$$\mathbf{J} = -D\nabla u, \quad (2)$$

donde  $D$  es el coeficiente de difusión, por lo que la Ec. (1) se transforma en:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D\nabla^2 u + f. \quad (3)$$

Esta descripción es adecuada ya que el calcio en el citoplasma actúa como el soluto de una solución diluida que, en promedio, está en reposo.

Para poder completar la descripción del modelo descrito por la Ec. (3) es necesario especificar los diferentes procesos que afectan el ingreso y la remoción del calcio hacia y desde el citosol. Tal como hemos mencionado, estos iones ingresan al citosol a través de los distintos canales presentes en las membranas que rodean al medio intracelular; y son continuamente recapturados por bombas como la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa. Existe también una cierta corriente pasiva “de pérdida” que permite el lento ingreso de los iones a través de las membranas a favor del gradiente de concentraciones. Adicionalmente ocurren reacciones con los diferentes buffers presentes en el citosol. La tasa a la que ocurren estas reacciones depende, a su vez, de la concentración de los buffers, la cual puede variar debido a la difusión de los mismos. El problema gana, así, complejidad convirtiéndose en un sistema no lineal de ecuaciones diferenciales en derivadas parciales, acopladas en un medio inhomogéneo. Es necesario, entonces, hacer diferentes aproximaciones para poder atacar este problema ya que, por un lado, no siempre los fenómenos involucrados están completamente caracterizados (por ejemplo, en lo que hace a las propiedades de los buffers), por otro, las no-linealidades presentes dificultan el uso de

métodos analíticos exactos y, además, las múltiples escalas temporales y espaciales hacen que los métodos numéricos sean sumamente costosos.

Dentro de los muchos enfoques que podrían haberse elegido para modelar la dinámica de liberación y transporte de calcio en el medio intracelular, hemos tomado la Ec.(3) como punto de partida de cada uno de los modelos que presentamos en esta tesis. Los ingredientes que se le agreguen dependerán de la pregunta particular que se esté queriendo responder en cada capítulo, pero los modelos son, en todos los casos, deterministas y continuos (es decir, en términos de concentraciones).

## Modelo biológico: señales de calcio en ovocitos

Entre las células en las que más se ha estudiado la dinámica espacio-temporal del calcio se encuentran los miocitos y ovocitos, en particular los ovocitos de *Xenopus laevis*, una especie de rana originaria de África que es usada como un sistema ventajoso en varias investigaciones experimentales biológicas. Los ovocitos de *Xenopus laevis* se caracterizan por poseer un gran tamaño, teniendo un diámetro medio del orden del milímetro, lo cual permite observar un amplio repertorio de señales macroscópicas. El ovocito es, entonces, el “modelo biológico” donde estudiamos las señales de calcio.

La variedad de señales observadas en ovocitos inmaduros, las que van desde comportamientos espacialmente localizados (llamados *blips* y *puffs*) [Sun et al., 1998] hasta ondas globales que se propagan por toda la célula [Callamaras et al., 1998], es consecuencia del hecho de que el calcio involucrado en las mismas es liberado desde reservorios internos a través de canales que están distribuidos de forma espacialmente inhomogénea. Uno de los rasgos más característicos de los canales involucrados en la liberación de calcio desde compartimientos intracelulares es el hecho de que su probabilidad de apertura es modulada por la concentración de calcio. Esto provee a la célula de un mecanismo no lineal de regulación que se manifiesta en un fenómeno conocido como “liberación de calcio inducida por calcio” (CICR). De este modo el citosol funciona como un medio excitable en lo que se refiere a la propagación de las señales de calcio.

Respecto de la organización espacial, diversos estudios han permitido concluir que, en algunas regiones del ovocito inmaduro de *Xenopus laevis*, los canales responsables de la liberación de calcio están organizados en conglomerados o *clusters* de aproximadamente 50 nm de lado [Swillens et al., 1999]

separados entre sí por entre 2 y 3 micrones. Estudios más recientes indican, además, que los mismos están principalmente concentrados en una región delgada (de unos 6 micrones de ancho) cercana a la membrana plasmática [Callamaras and Parker, 1999b]. Como el radio de estas células es del orden del mm, puede pensarse entonces que las fuentes de liberación de calcio están ubicadas en una región esencialmente bidimensional dentro de un medio tridimensional.

## El receptor de $IP_3$

La liberación de iones de calcio desde el retículo endoplasmático hacia el citosol, en ovocitos, ocurre a través de canales receptores de  $IP_3$ . El  $IP_3$  ( $C_6H_{15}O_{15}P_3$ ) es una pequeña molécula con un tamaño de algunos Angstroms [Alberts et al, 2002]. Los canales de calcio receptores de  $IP_3$  necesitan de la presencia de este compuesto para permitir el flujo de iones a través de ellos. Estos receptores tienen un tamaño aproximado del orden de los 10 nm y se cree que están compuestos por 4 subunidades que forman un pequeño poro por el que pueden fluir iones. Actualmente se conocen tres tipos de receptores de  $IP_3$  (tipos I-III) expresados de distintas maneras en diversos tipos de células y cuya principal diferencia consiste en la afinidad por el  $IP_3$ . En ovocitos los receptores de  $IP_3$  son principalmente del tipo I.

La dinámica de los receptores de  $IP_3$  aislados ha sido (y continúa siendo) estudiada en forma experimental usando distintas técnicas. Dado el difícil acceso a la región celular en donde se encuentran estos receptores, muchas observaciones se han realizado en bicapas lipídicas reconstituidas [Bezprozvanny et al, 1991, Watras et al., 1991]; recientemente se han obtenido registros electrofisiológicos de canal único usando la técnica de “patch-clamp” en núcleos aislados de ovocitos de *Xenopus laevis* [Mak et al., 2000, Mak et al., 1998]. Otras técnicas de observación no invasivas se encuentran también en desarrollo [Nguyen et al., 2001]. En todos estos experimentos se estudia la corriente eléctrica que fluye a través de los canales cuando se fijan las concentraciones de  $IP_3$  y de  $Ca^{2+}$ . Dado que la apertura de cada canal es un proceso estocástico, la comparación entre experimento y modelo se basa en propiedades estadísticas. Con este fin se ha estudiado la probabilidad estacionaria de apertura y se ha visto que tanto el  $IP_3$  como el  $Ca^{2+}$  funcionan como moduladores de la misma. A grandes rasgos, se ha demostrado que:

1. es necesaria la presencia de  $IP_3$  para que el canal pueda abrirse;

2. resulta relevante la concentración del calcio tanto en el lado citosólico del canal, como del lado luminal (es decir la concentración de calcio dentro del reservorio desde el cual es liberado);
3. la concentración de calcio en el citosol juega un papel dual: a bajas concentraciones promueve la apertura del canal, mientras que a altas concentraciones la inhibe [Bezprozvanny et al, 1991, Watras et al., 1991].

Este último aspecto juega un papel esencial en el hecho que el citosol se comporte como un medio excitable ya que, a bajas concentraciones la presencia de calcio puede inducir la liberación de más calcio, generándose un ciclo de realimentación positiva. En la Fig. 2 se muestra la probabilidad de apertura del receptor de  $IP_3$  en función de la concentración de calcio libre citosólico, para distintos valores de la concentración de  $IP_3$ .

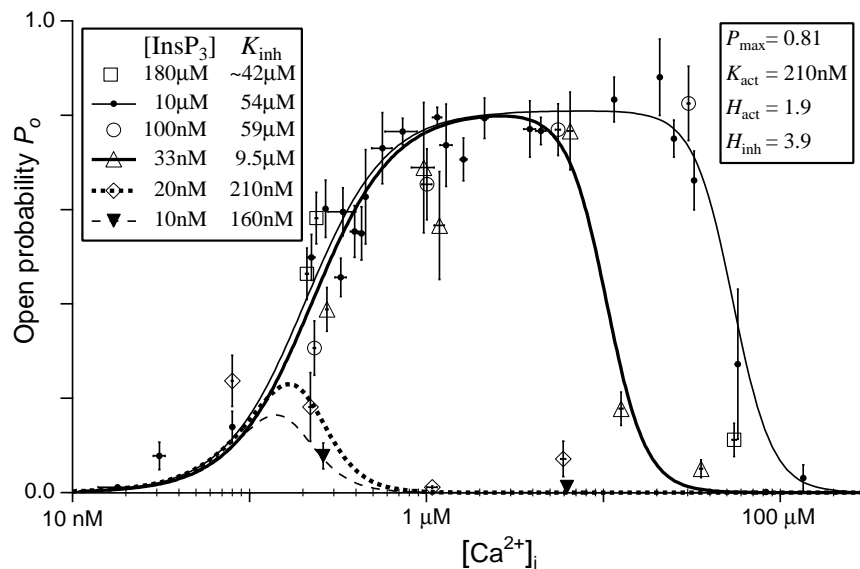


Figura 2: Probabilidad de apertura del receptor de  $IP_3$  en función de la concentración de calcio libre citosólico, indicado como  $[Ca^{2+}]_i$ , para diferentes valores de la concentración de  $IP_3$ . Los parámetros  $K_{inh}$ ,  $P_{max}$ ,  $K_{act}$ ,  $H_{act}$ ,  $H_{inh}$  se relacionan con las curvas de ajuste incluidas en la figura.

Desde el punto de vista del modelado, se han desarrollado modelos estocásticos del tipo Markoviano para poder dar cuenta de las observaciones experimentales. El grado de complejidad de los modelos ha crecido a lo largo del tiempo pero en todos los casos se considera que la acción dual del calcio, como factor activador e inhibidor al mismo tiempo, puede describirse pensando en que las subunidades del receptor poseen sitios para ligar iones  $\text{Ca}^{2+}$  y que estos sitios son básicamente de dos características: en un caso la presencia de calcio en un sitio es necesaria para la apertura del canal, mientras que en el otro tipo de sitios un ion calcio ligado lleva al canal a un estado que no permite el paso de iones.

## Escalas temporales y espaciales involucradas

En los ovocitos, los receptores de  $\text{IP}_3$  están organizados en clusters constituidos por unas decenas de canales ubicados sobre la superficie del retículo endoplasmático. La dinámica de estos grupos de receptores puede considerarse regida no sólo por la dinámica de cada canal, sino también por el acople entre los mismos dado por la distribución espacio-temporal del calcio liberado. En una escala más grande se produce la interacción entre distintos clusters, la cual nuevamente es mediada por la evolución del calcio citosólico y el fenómeno de liberación de calcio inducida por calcio. El proceso de generación de señales intracelulares de calcio constituye, así, un problema de múltiples escalas espaciales y temporales que cubren más de 6 órdenes de magnitud: desde microsegundos a minutos y desde nanómetros hasta milímetros.

En la Tabla 1 se muestran las escalas temporales y espaciales (aproximadas) asociadas a los distintos mecanismos, según una aproximación jerárquica al problema. En la Fig. 3 se presenta una ilustración esquemática de las escalas espaciales involucradas en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en ovocitos. Las señales correspondientes a los eventos más elementales ocurren en las escalas de la Fig. 3 A. Estas escalas van desde el tamaño del poro de cada canal al tamaño del cluster. La siguiente escala es la distancia media entre clusters,  $3 \mu\text{m}$ , como se muestra en la Fig. 3 B. Finalmente, la mayor escala corresponde al tamaño de toda la célula, como se muestra en la Fig. 3 C.

Esta tesis hace aportes en lo que concierne al comportamiento neto de un cluster, sin entrar en el detalle del comportamiento de sus unidades constituyentes (los receptores individuales), y a la propagación de ondas, en este caso sí considerando que las mismas se generan por la acción coordinada de la dinámica de los clusters.



Tabla 1: Múltiples escalas involucradas.

Mecanismo	Escala espacial (m)	Escala temporal (s)
Canal individual	$10^{-9}$	$10^{-6}$
Cluster de canales	$10^{-7}$	$10^{-3}$
Interacción entre clusters	$10^{-6}$	$10^{-2}$
Ondas globales	$10^{-3}$	$10^{-2}$ – $10^2$

## Jerarquía de eventos

Debido al ciclo de retroalimentación positiva de liberación de calcio inducida por calcio, a través del cual el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  desde un canal abierto favorece la apertura de más canales, y dependiendo de la cantidad de  $\text{IP}_3$  presente en el citosol, se observan distintos tipos de eventos [Berridge et al., 1998, Callamaras et al., 1998], todos los cuales se construyen a partir de “eventos elementales” que involucran la liberación desde un sólo canal abierto (“blips”). Estos eventos verdaderamente elementales son difíciles de observar experimentalmente, en ellos la retroalimentación se mantiene restringida a canales dentro de un cluster de modo que los sitios de liberación individuales funcionan autónomamente. Eventos un poco más extensos (“puffs”) que involucran la apertura coordinada de múltiples canales que forman un conglomerado o cluster y que aparecen frente a concentraciones moderadas de  $\text{IP}_3$ , resultan más fáciles de visualizar [Parker et al., 1996a]. Para mayores concentraciones de  $\text{IP}_3$  se observan ondas globales que se propagan de un modo saltatorio mediante el mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio (CICR). Esta jerarquía de eventos se esquematiza en la Fig. 4. Así, la actividad de sitios individuales sólo puede monitorearse en un estrecho rango de concentraciones de  $\text{IP}_3$ . Una alternativa para superar esta limitación es registrar los puffs en ovocitos previamente cargados con EGTA, un buffer lento de  $\text{Ca}^{2+}$  que inhibe la difusión del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre distancias del orden de micrómetros entre sitios de liberación [Roberts, 1994, Horne and Meyer, 1997, Song et al., 1998, Kidd et al., 1999], mientras mantiene el efecto regenerativo a corto rango entre receptores de  $\text{IP}_3$  dentro de un cluster [Callamaras and Parker, 2000]. En la Fig. 5 se muestran distintos tipos de señales intracelulares de calcio en ovocitos de *Xenopus laevis*: un puff y un blip correspondientes al mismo sitio de liberación, en *A*; una onda saltatoria en *B*; y una onda global en *C*. *A* y *B* corresponden a imágenes de fluorescencia adquiridas con un microscopio confocal (ver sección siguiente) y *C* a una foto bidimensional.

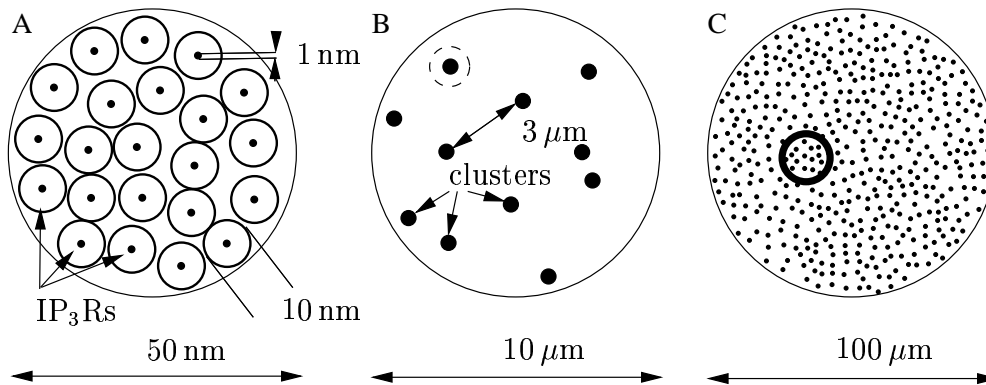


Figura 3: Jerarquía de escalas espaciales. (A) El tamaño de un cluster está en el orden de los 50 – 100 nm. Los círculos pequeños representan receptores individuales. El punto dentro de cada círculo es el poro del receptor, que tiene un diámetro de alrededor de 0,5 – 1 nm. Los círculos indican la dimensión lineal del receptor, que es del orden de los 10 nm. (B) La escala espacial entre clusters es de unos pocos micrones. Los puntos representan clusters de receptores y el círculo pequeño indica la escala de 50 nm utilizada en (A). (C) La escala de toda la célula es de cientos de micrones. Los puntos son clusters de receptores de  $IP_3$  y el círculo indica la escala de  $10 \mu\text{m}$  de (B).

## Experimentos usando técnicas ópticas e indicadores fluorescentes

Las observaciones estudiadas en esta tesis se obtienen combinando la técnica de microscopía confocal [Callamaras and Parker, 1999a] con el uso de indicadores fluorescentes de calcio [Takahashi et al., 1999]. En todos los casos, los datos analizados fueron obtenidos en el laboratorio del Dr. I. Parker (Laboratory of Cellular and Molecular Neurobiology, Department of Psychobiology, University of California Irvine). Se trata de imágenes de fluorescencia que brindan información espacio-temporal (aunque promediada) y constituyen una medida indirecta de la distribución de la concentración del calcio en el citosol [Horne and Meyer, 1997, Parker et al., 1997, Callamaras and Parker, 1999b].

Los indicadores de calcio son sustancias que adhieren calcio similarmente a como lo hacen los buffers endógenos, pero que poseen la propiedad de modificar su espectro de emisión de luz dependiendo de si tienen o no iones de  $Ca^{2+}$  ligados. Inyectando una cierta cantidad de indicador en el citosol, iluminando el medio intracelular con luz láser focalizada y recogiendo luego la señal lumínica emitida por esta sustancia, es posible seguir la evolución de la

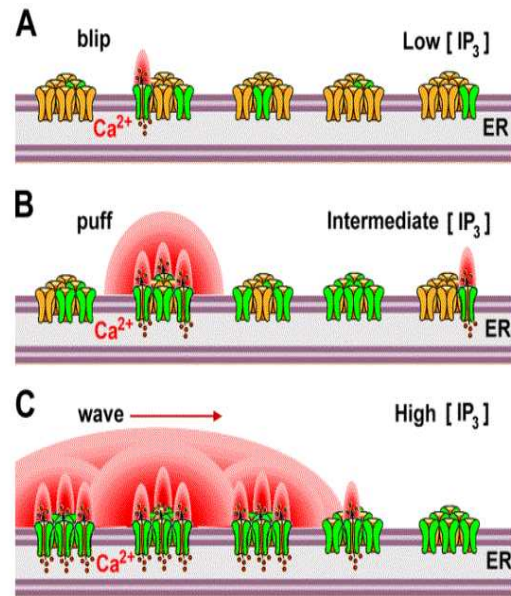


Figura 4: Esquema que muestra la actividad de canales y conglomerados o clusters de canales modulados por IP<sub>3</sub>, en presencia de concentraciones crecientes de dicha sustancia. (A) Para bajas concentraciones, pocos receptores ligan IP<sub>3</sub>, entonces la retroalimentación debida al calcio liberado por un sólo canal está restringida a ese canal, produciendo una señal de calcio pequeña y localizada (blip). (B) Para concentraciones intermedias de IP<sub>3</sub>, el calcio liberado a través de la apertura espontánea de un canal causa la apertura de muchos otros canales dentro del mismo cluster y origina un puff, pero no logra activar clusters adyacentes. (C) Altas concentraciones de IP<sub>3</sub> provocan ondas de propagación de calcio mediante el mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio (CICR).

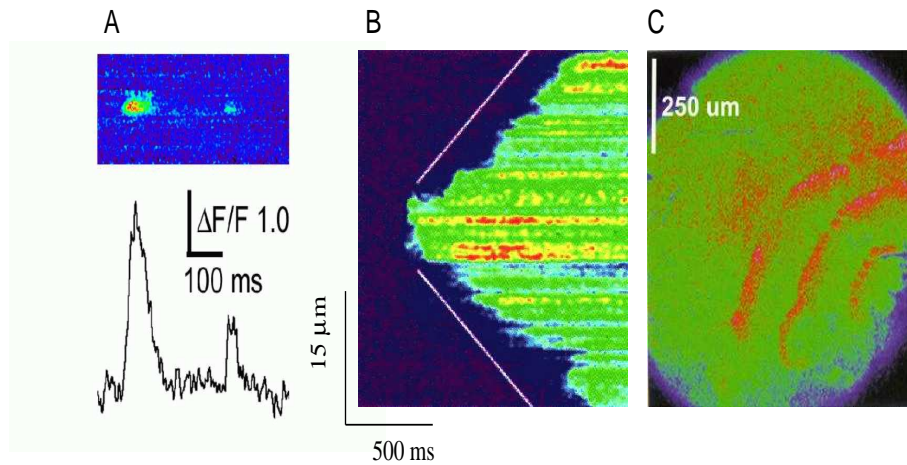


Figura 5: Distinto tipo de señales intracelulares de calcio en ovocitos de *Xenopus laevis*. (A) Un puff y un blip correspondientes al mismo sitio de liberación. Se muestra la imagen de fluorescencia, donde el tiempo avanza horizontalmente, el espacio se indica en el eje vertical y los colores cuantifican la intensidad en la fluorescencia, rojo corresponde a intensidades más altas. También se muestra un perfil temporal de la fluorescencia sobre el sitio de liberación. (B) Onda saltatoria, la señal se propaga gracias a la activación sucesiva de distintos sitios de liberación, lo cual se evidencia en el perfil escalonado de la señal. (C) Foto bidimensional de una onda global en un dado instante.

cantidad de calcio ligada al indicador dentro del medio intracelular, con una resolución espacial del orden del micrón y temporal de milisegundos. Esta técnica es esencialmente no invasiva, excepto por la presencia del indicador fluorescente. Uno de los inconvenientes asociados con la técnica es el hecho de que no provee información directa sobre la distribución de calcio libre, sino sobre la fracción que está ligada al indicador. El análisis de cómo deducir a partir de este tipo de datos, la distribución espacio-temporal de la concentración del calcio y los flujos de calcio que la generaron es un tema de investigación activo y constituye uno de los ejes principales de esta tesis.

En la Fig. 6 se presenta una imagen adquirida con microscopía confocal en modo de “barrido lineal” o “line-scan”, es decir que se observa la fluorescencia a lo largo de una línea. La imagen corresponde a la dinámica espacio-temporal del calcio en una región de un ovocito de *Xenopus laevis*, en una situación en la cual pueden observarse distintos “puffs” producidos por distintos clusters. En este tipo de imágenes de fluorescencia, el tiempo avanza horizontalmente, el espacio se indica en el eje vertical y la escala de colores cuantifica los valores de intensidad en la fluorescencia, rojo corresponde a intensidades más altas. Las señales de fluorescencia se expresan como cocientes ( $F/F_0$  ó  $\Delta F/F_0$ ) de la fluorescencia en cada pixel durante una respuesta ( $F$ ) relativa a la fluorescencia basal en ese pixel antes del estímulo ( $F_0$ ); se obtienen valores medios para  $F_0$  promediando sobre sucesivos barridos lineales anteriores al estímulo.

En esta tesis analizaremos tres tipos de experimentos: (1) puffs evocados por flashes de fotólisis de  $IP_3$  enjaulado, o “puffs reales” (Capítulo 6); (2) micro-inyecciones de  $Ca^{2+}$  través de una pipeta, o “puffs sintéticos” (Capítulos 2 y 6); y (3) entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales voltaje-dependientes de membrana, eventos conocidos como “sparklets” (Capítulos 5 y 6). En la Fig. 6 el estímulo corresponde a un flash que libera  $IP_3$  enjaulado introducido previamente en la célula. Ver [Parker et al., 1997, Callamaras and Parker, 1999b] para mayor detalle acerca de las imágenes con microscopio confocal y los flashes de fotólisis de  $IP_3$  enjaulado. En cuanto a los “puffs sintéticos”, se trata de una inyección ionofórica de  $Ca^{2+}$  a través de una micropipeta insertada en el ovocito, de modo que su punta se sitúe aproximadamente 5  $\mu m$  hacia adentro de la membrana celular, a la misma profundidad donde se encuentran los sitios de puffs. Finalmente, describiremos en detalle los experimentos de “sparklets” en el Capítulo 5.

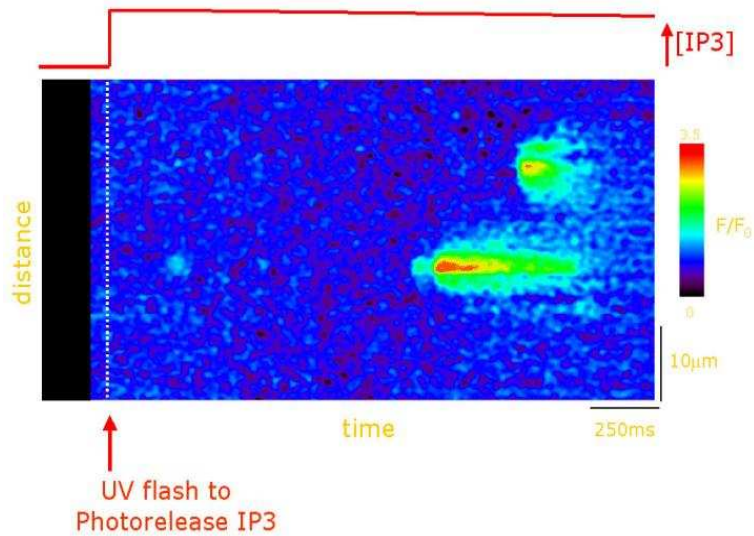


Figura 6: Una observación típica de *puffs* en un ovocito de *Xenopus laevis*. La flecha roja indica el momento en que el flash de luz ultravioleta se enfoca en la zona del ovocito bajo observación, de modo de liberar IP<sub>3</sub> enjaulado que había sido introducido previamente. El tiempo avanza horizontalmente, el espacio se indica en el eje vertical. La escala de colores cuantifica los valores de intensidad en la fluorescencia, rojo corresponde a intensidades más altas.

## “Buffers” de calcio

Las características espacio-temporales de las señales de calcio están fuertemente influenciadas por la acción de buffers de  $\text{Ca}^{2+}$  que cambian su movilidad efectiva y la concentración de iones libres. Esto resulta de importancia por lo menos en dos aspectos: (1) las células (particularmente las neuronas) contienen una amplia variedad de proteínas endógenas que ligan  $\text{Ca}^{2+}$ , que en general están expresadas en subpoblaciones específicas, pero que tienen funciones desconocidas; (2) los buffers exógenos de diferentes afinidades y cinéticas pueden ser utilizados como una herramienta experimental para perturbar las señales de calcio en tiempos y distancias inaccesibles para la visualización directa. Más aún, los indicadores fluorescentes adhieren calcio tal como lo hacen los buffers y cabría entonces preguntarse cuánto perturban las características de las señales que permiten medir.

La mayoría de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  que entran en el citosol son rápidamente capturados tanto por proteínas citosólicas móviles que ligan  $\text{Ca}^{2+}$  (CaBPs) como por buffers inmóviles de identidad desconocida. Complementariamente a reducir la disponibilidad de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  libres, los buffers inmóviles reducen el coeficiente efectivo de difusión del  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que los buffers móviles pueden aumentar la velocidad a la que difunde el  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de buffers inmóviles. Es así como las células utilizan las CaBPs para darle forma a las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  para funciones específicas. En la Fig. 7 se muestra la dependencia con la concentración de calcio libre del coeficiente de difusión efectivo debido a la interacción con los buffers. Esta figura corresponde a experimentos hechos en extractos citosólicos de ovocito de *Xenopus laevis* [Allbritton et al, 1992]. Vemos que el coeficiente aumenta desde 13 hasta  $64 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  cuando la concentración libre de calcio se incrementa desde 90 nM hasta 1  $\mu\text{M}$ . El hecho de que el coeficiente de difusión sea tan bajo para concentraciones dentro del rango fisiológico se debe a que el calcio se liga a buffers lentos o inmóviles. Los rangos efectivos del  $\text{Ca}^{2+}$  libre y del  $\text{Ca}^{2+}$  ligado a buffers, determinados en [Allbritton et al, 1992] a partir de su coeficiente efectivo de difusión y tiempo de vida son de 0,1  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$ , respectivamente, mientras que para  $\text{IP}_3$  es de 24  $\mu\text{m}$ . Esto indica que, para una fuente puntual del mensajero, en células menores a los 20  $\mu\text{m}$ ,  $\text{IP}_3$  se comporta como un mensajero global mientras que  $\text{Ca}^{2+}$  actúa en dominios muy restringidos.

Las CaBPs poseen diferentes versatilidades funcionales y son clasificadas de acuerdo a ello. Los “sensores de  $\text{Ca}^{2+}$ ”, tales como calmodulina, sufren cambios conformacionales al ligar  $\text{Ca}^{2+}$  que les permite ligarse a ciertas

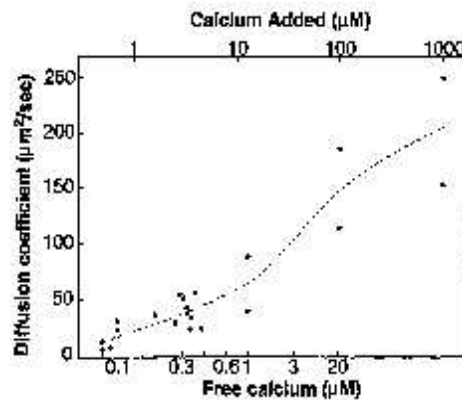


Figura 7: Dependencia del coeficiente de difusión para  $\text{Ca}^{2+}$  con la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre y la cantidad de calcio agregado (ver [Allbritton et al, 1992], de donde se ha tomado la figura).

proteínas y activarlas, de modo de trasladar cambios en  $[\text{Ca}^{2+}]$  intracelular a cascadas de señalización. Por otro lado, se cree que los “buffers de  $\text{Ca}^{2+}$ ” tales como parvalbúmina (PV) o calretinina (CR), actúan sólo como quelantes de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  (sin embargo, esta visión podría cambiar a medida que sepamos más acerca de su biología). A pesar de su aparente función pasiva, PV y CR despiertan gran interés, principalmente debido a su expresión específica en ciertas subpoblaciones de células nerviosas.

En relación a la acción de buffers exógenos como herramienta para perturbar las señales de calcio, en la Fig. 8 se comparan los efectos de dos buffers exógenos, con afinidades similares pero cinéticas muy diferentes, en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  provocadas por fotoliberación de  $\text{IP}_3$  en ovocitos. Un resultado sorprendente es que EGTA (un buffer con constante de reacción con  $\text{Ca}^{2+}$  relativamente lenta) favorece el efecto de “balcanización” de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$ , *i.e.*, en presencia de  $135 \mu\text{M}$  de EGTA intracelular, dejan de observarse ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ , y aún altas concentraciones de  $\text{IP}_3$  sólo provocan puffs autónomos en diferentes sitios de liberación. Contrariamente, el buffer rápido de calcio, BAPTA, favorece la globalización de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$ : no pueden distinguirse puffs individuales, y el nivel de calcio varía en forma gradual y espacialmente homogénea con  $[\text{IP}_3]$ . Resultados muy similares se obtienen con parvalbúmina (cinética lenta) y calretinina (cinética rápida), respectivamente [Dargan and Parker, 2004].



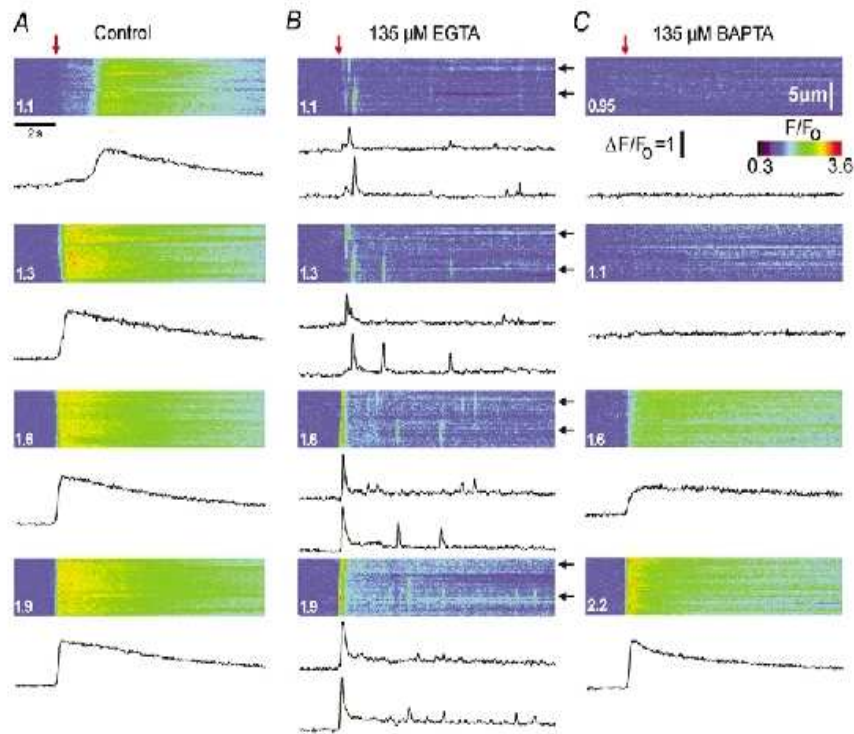


Figura 8: Efecto de buffers exógenos sobre las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  (tomado de [Dargan and Parker, 2003]). (A) imágenes de barrido lineal y perfiles de fluorescencia (promediando sobre regiones de  $4 \mu\text{m}$  que muestran las respuestas frente a pulsos (flechas rojas) de distinta intensidad (indicada en unidades normalizadas) que liberan  $\text{IP}_3$ , antes de inyectar buffer. (B) registros correspondientes al mismo ovocito luego de ser cargado con  $135 \mu\text{M}$  de EGTA. Para cada imagen se ilustran dos perfiles de fluorescencia representativos, registrados para diferentes sitios de puffs (flechas). (C) registros correspondientes a un ovocito diferente luego de ser cargado con  $135 \mu\text{M}$  de BAPTA. Los registros en este ovocito antes de ser cargado con BAPTA fueron similares a los de A.

## Marco general en el que se encuadra la tesis

El proyecto general en el cual se enmarca esta tesis busca dilucidar los comportamientos espacio-temporales que puede presentar la concentración de calcio intracelular, determinando de qué manera son modificados por diversos mecanismos. Para ello combinamos experimentos y modelado matemático. Por ahora no buscamos entender qué respuesta genera (en un sistema particular) cada tipo de comportamiento. El calcio provee a la célula de un lenguaje. Nuestro proyecto consiste en encontrar las “palabras” que lo componen, dejando para el futuro la comprensión de su significado.

Tal como hemos mencionado, las escalas temporales y espaciales asociadas a las señales intracelulares de calcio cubren más de 6 órdenes de magnitud. Es imposible resolver todas estas escalas simultáneamente en un mismo experimento. Más aún, las escalas más pequeñas no pueden ser resueltas por ninguno de los enfoques experimentales existentes al momento. El proyecto general busca, entonces, desarrollar un enfoque dual e integrado de modelado matemático y técnicas ópticas de alta resolución (que desarrollan nuestros colaboradores en biología) para avanzar en el entendimiento de los mecanismos que desencadenan los eventos elementales de calcio y cómo éstos se acoplan para producir señales de calcio. Este proyecto se lleva a cabo en un sistema celular bien caracterizado (el ovocito de *Xenopus*), pero los resultados pueden ser extendidos tanto a señales mediadas por  $IP_3$  en distintos tipos y especies celulares, como también a señales de calcio mediadas por receptores de rianodina. Combinando datos obtenidos con distintas técnicas experimentales (patch-clamp, superfusión y técnicas ópticas), que permiten “mirar” en más detalle alguna de las escalas espaciales involucradas, avanzamos en el desarrollo de modelos consistentes con las diferentes observaciones, que poseen valor predictivo y que se extienden a escalas espaciales y temporales cruciales pero experimentalmente inaccesibles (nm y  $\mu$ s). Más aún, el proyecto busca integrar la información en un modelo unificado que permita describir lo que ocurre en todas las escalas.

Como primer paso se ha avanzado en el modelado de los distintos niveles por separado: dinámica del canal individual, dinámica de un cluster y transporte de  $Ca^{2+}$ , para luego integrarlo en un modelo que tenga en cuenta la interacción entre clusters y que permita describir señales más globales. Sin embargo, el proceso de construcción del modelo no va en una sola dirección, empezando por lo más básico (el canal) para después hacer combinaciones y llegar al sistema global. Se desarrollan también modelos específicos para los distintos niveles sin usar el modelo del “nivel inferior”. La pregunta que

motiva esta búsqueda es: ¿cuál es el nivel de detalle necesario para describir y comprender los comportamientos observados en cada nivel? Suponemos que no es necesario un grado de detalle excesivo. Por eso buscamos descripciones simplificadas en cada nivel para luego comparar con las predicciones de modelos más sofisticados construidos en base a combinar los de los niveles inferiores.

En síntesis, el proyecto busca, desde la interdisciplina y el modelado, ayudar a contestar preguntas pendientes sobre la dinámica del calcio, encarando en tal proceso desafíos interesantes desde el punto de vista de la física y de la matemática. Dentro de este proyecto general, la investigación de la presente tesis se centra en la descripción del transporte del  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol.

## Esquema de la tesis

En el Capítulo 1 introducimos el conjunto completo de ecuaciones que describen la dinámica del calcio en presencia de buffers. También hacemos una breve descripción de los modelos simplificados aparecidos en la literatura, que se obtienen a partir del modelo detallado mediante aproximaciones analíticas válidas en distintos límites.

En el Capítulo 2 investigamos la posibilidad de aproximar el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de buffers como un proceso puramente difusivo y determinamos los límites de aplicabilidad de esta aproximación. Utilizamos la misma en un modelo para estudiar experimentos de puffs artificiales.

En el Capítulo 3 estudiamos la validez de una aproximación conocida para la dinámica del calcio intracelular, derivada a partir de un modelo detallado para esa dinámica en un límite particular: la aproximación de buffers rápidos. Investigamos si la misma brinda una descripción adecuada para el caso de propagación de ondas. Este capítulo es el único que hace aportes en lo referente a la propagación de señales globales, de ondas de calcio; los demás se concentran en señales locales. En este capítulo analizamos también las limitaciones de la hipótesis de equilibrio local en presencia de fuentes localizadas de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En el Capítulo 4 presentamos un nuevo enfoque para la obtención de descripciones matemáticas simplificadas de la dinámica del calcio intracelular. El mismo consiste en obtener un conjunto minimal de ecuaciones de evolución cuyas soluciones coincidan, dentro de cierto margen de error, con las

observadas experimentalmente o con las obtenidas a partir de simulaciones de modelos detallados. Llamaremos “reducciones observacionales” a este tipo de descripciones. Estudiamos la validez de esta reducción mediante simulaciones numéricas.

En el Capítulo 5 presentamos un algoritmo capaz de derivar el flujo de calcio a partir de una imagen de fluorescencia. El algoritmo se construye en base a las ideas del Capítulo 4. Lo novedoso de este enfoque, a diferencia de esfuerzos previos en el mismo sentido, es que el algoritmo no requiere conocimiento explícito de todos los procesos involucrados en la dinámica del calcio, sino tan sólo unas pocas hipótesis acerca de los mismos. El algoritmo es validado con imágenes generadas numéricamente y con imágenes experimentales, mostrando que reconstruye satisfactoriamente la magnitud y el curso temporal de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que dan lugar a una determinada señal fluorescente.

En el Capítulo 6 estudiamos la posibilidad de aproximar todos los mecanismos de captura del calcio intracelular mediante una función lineal de  $[\text{Ca}^{2+}]$ . En primer lugar investigamos por qué podría valer tal aproximación, luego analizamos las limitaciones de la misma mediante simulaciones numéricas y la utilizamos para describir señales experimentales y re-analizar los puffs artificiales del Capítulo 2, desarrollando un enfoque alternativo al del Capítulo 5 para obtener información cuantitativa sobre las corrientes de calcio que dan lugar a una imagen de fluorescencia.

Los Apéndices se incluyen dentro de cada capítulo y contienen material complementario específico. Por último, en la sección Conclusiones se sintetizan los resultados de la tesis, se presentan sus conclusiones generales y se discuten sus aplicaciones.

# Capítulo 1

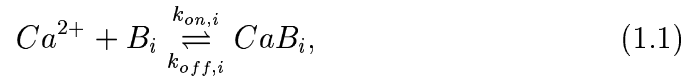
## Transporte de calcio en presencia de “buffers”: modelo matemático completo y aproximaciones varias derivadas del mismo

### 1.1 Resumen

Dilucidar el efecto de los buffers sobre el transporte del calcio citosólico no es sólo importante por el efecto que los mismos pueden tener para el funcionamiento de la célula, sino también para poder “deconvolucionar” el efecto de los indicadores fluorescentes utilizados para la observación. En esta tesis estudiamos cómo simplificar la descripción matemática de la dinámica del calcio en presencia de buffers. En este capítulo introducimos el conjunto completo de ecuaciones que describen esta dinámica en forma detallada. A continuación hacemos una breve descripción de los modelos simplificados aparecidos en la literatura, los que se obtienen a partir del modelo detallado mediante aproximaciones analíticas válidas en distintos límites.

## 1.2 Modelo matemático detallado para la dinámica del calcio intracelular

La evolución espacio-temporal de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico,  $[\text{Ca}^{2+}]$ , es el resultado de varios procesos: el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol a través de canales específicos o, en algunos experimentos, mediante una inyección controlada; la difusión del  $\text{Ca}^{2+}$ ; su interacción con buffers (entre ellos, el indicador fluorescente que es utilizado en experimentos ópticos), y su remoción mediante bombas e intercambiadores. Para describir la interacción con los buffers, consideramos que las reacciones con los mismos son de la forma:



donde  $k_{on,i}$  y  $k_{off,i}$  son las constantes cinéticas para la reacción del buffer  $B_i$  con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ca}B_i$  es el buffer  $B_i$  ligado a  $\text{Ca}^{2+}$ . Suponemos que a  $t = 0$  la concentración total de cada buffer,  $[B_i](t = 0) + [\text{Ca}B_i](t = 0)$ , está uniformemente distribuida en el espacio,  $[B]_{T,i} \equiv [B_i](t = 0) + [\text{Ca}B_i](t = 0)$ ; y que las formas libre y ligada del buffer,  $B_i$  y  $\text{Ca}B_i$ , respectivamente, difunden a la misma tasa,  $D_{B,i}$ . En este caso,  $[B_i] + [\text{Ca}B_i] = [B]_{T,i}$  para todo tiempo. Así, podemos trabajar con  $[\text{Ca}^{2+}](\mathbf{r}, t)$  y una sola variable por buffer, por ejemplo  $[\text{Ca}B_i](\mathbf{r}, t)$ . Para los mecanismos de remoción suponemos que los mismos pueden ser representados por una función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (suposición que discutimos más adelante) y representamos el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante un término genérico de fuente,  $Q_{Ca}$ . Las ecuaciones de evolución resultan entonces:

$$\frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} = \sum_{i=1}^N R_i + D_{Ca} \nabla^2[\text{Ca}^{2+}] + q_{rem}([\text{Ca}^{2+}]) + Q_{Ca}, \quad (1.2)$$

$$\frac{\partial[\text{Ca}B_i]}{\partial t} = -R_i + D_{B,i} \nabla^2[\text{Ca}B_i], \quad (1.3)$$

donde

$$R_i = -k_{on,i}[\text{Ca}^{2+}]( [B]_{T,i} - [\text{Ca}B_i] ) + k_{off,i}[\text{Ca}B_i] \quad (1.4)$$

es el término de reacción entre  $\text{Ca}^{2+}$  y cada buffer,  $B_i$ , y la suma en (1.2) recorre todos los buffers que afectan la dinámica del calcio citosólico ( $N$  en total);  $D_{Ca}$  es el coeficiente de difusión libre para  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\sim 220 \mu\text{m}^2/\text{s}$  [Allbritton et al, 1992]).

Las “fuentes” de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico son, típicamente, fuentes puntuales que representan el ingreso a través de un canal (o conjunto de canales) o la

inyección mediante una pipeta de diámetro muy pequeño. Por ejemplo, en el caso de un canal único, o de una pipeta de diámetro despreciable (ubicados en el origen de coordenadas), podemos suponer que

$$Q_{Ca} = qI_{Ca}\delta(\mathbf{r}), \quad (1.5)$$

donde  $I_{Ca}$  es la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal o la pipeta y  $q$  es un factor de proporcionalidad. Tanto  $q$  como  $I_{Ca}$  pueden depender del tiempo y, en el caso de canales, su variación puede verse afectada por la propia concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el caso de un canal,  $q(t)$  es proporcional a la probabilidad de que el canal esté abierto al tiempo  $t$ . Si este canal es un receptor de  $\text{IP}_3$ , por ejemplo, esta probabilidad depende de  $[\text{Ca}^{2+}](\mathbf{r}, t)$ . La corriente,  $I_{Ca}$ , por otro lado, depende del gradiente de concentraciones a través del canal. Por lo tanto, es una función no sólo de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, sino también de la concentración del otro lado de la membrana donde se encuentra el canal (en el caso de los  $\text{IP}_3\text{R}$ 's, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el lumen del retículo endoplasmático). Por lo tanto, una descripción completa de esta situación involucra acoplar el sistema (1.2)-(1.3) a ecuaciones describiendo la probabilidad de apertura de los canales involucrados y la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal y/o extra-celular. En esta tesis no estamos interesados en la descripción de los procesos que modulan la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa al citosol, sino en la del posterior proceso de transporte del  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de buffers. Por esta razón trabajamos, en la mayor parte de los capítulos, suponiendo una fuente de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $Q_{Ca}$ , de amplitud y dependencia temporal conocidas o a ser determinadas a partir del análisis de los experimentos. Por lo tanto, sólo tenemos en cuenta el sistema de ecuaciones (1.2)-(1.3). Sólo en el Capítulo 3 incluimos una descripción muy simplificada de la forma en que el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  se “enciende” dependiendo de la propia concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. En cuanto a la distribución espacial, en la mayor parte de la tesis consideramos fuentes localizadas, del tipo de fuentes puntuales o uniformemente distribuidas sobre una esfera de radio pequeño. En el Capítulo 3, sin embargo, utilizamos un arreglo unidimensional de fuentes puntuales.

En cuanto al término de remoción,  $q_{rem}$ , sólo tendremos en cuenta la debida a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa ubicada en la membrana del retículo endoplasmático. En general este tipo de bombas se modela con funciones de Hill, lo cual contempla su posible comportamiento cooperativo. Los parámetros en las funciones de Hill se determinan ajustándolos con datos experimentales, y se considera que el flujo a través de las bombas es función solamente de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , y no del tiempo. En otras palabras, lo que se considera es que cuando cambia  $[\text{Ca}^{2+}]$ , los flujos asociados a la bomba también cambian instantáneamente, sin necesitar de un intervalo de tiempo para ajustarse al nuevo valor de

$[Ca^{2+}]$ . Una expresión típica para  $q_{rem}$  es:

$$q_{rem} = \frac{k_1 [Ca^{2+}]^m}{k_2 + [Ca^{2+}]^m}, \quad (1.6)$$

donde  $k_1$  y  $k_2$  son constantes y el exponente  $m$  indica el grado de cooperatividad de la bomba. Para una descripción detallada acerca de funciones de Hill, cooperatividad y modelos de bombas activas, ver por ejemplo [Keener and Sneyd, 1998].

Se desprende de las Ecs. (1.2)-(1.3) que aún cuando el comportamiento espacio-temporal de los buffers en sí mismos no es de interés, se necesita conocer su distribución para poder determinar la del  $Ca^{2+}$ .

Las Ecs. (1.2)-(1.3) deben resolverse sujetas a condiciones de borde e iniciales para  $[Ca^{2+}](\mathbf{r}, t)$  y  $[CaB_i](\mathbf{r}, t)$ . Como condición inicial consideramos que todas las especies están en una distribución uniforme de equilibrio con la concentración de reposo del calcio,  $[Ca^{2+}]_{rest}$ . Como condiciones de borde, consideramos un fondo fijo de concentración de  $Ca^{2+}$  (y para el caso de una fuente puntual única, la situamos en el origen para aprovechar la simetría esférica del problema). Dado que no hay fuentes de buffers, se considera que los mismos permanecen en equilibrio con  $Ca^{2+}$  lejos de la fuente. Una última observación es que, para poder resolver el sistema completo dado por las Ecs. (1.2)-(1.3), se necesita un conocimiento completo de los parámetros cinéticos y las concentraciones involucradas en la Ec. (1.4) y una expresión para  $q_{rem}$  (desafortunadamente, esta información no está en general disponible o está muy pobremente caracterizada).

### 1.3 Aproximaciones varias al modelo detallado

Las Ecs. (1.2)-(1.3) representan la descripción completa del problema. Diferentes “reducciones analíticas” de este modelo matemático completo han sido derivadas en diferentes regímenes límite. Aquí presentamos un breve resumen de algunas de ellas antes de presentar nuestro enfoque original.

La *Aproximación de Buffers Rápidos (RBA)* se basa en la hipótesis de que no todos los procesos ocurren en la misma escala temporal y que las reacciones con los buffers son los procesos más rápidos durante la evolución,



es decir:

$$|k_{on,i}[Ca^{2+}][B]_{T,i} - [CaB_i]| \quad ; \quad |k_{off,i}[CaB_i]| \gg |D_{Ca}\nabla^2[Ca^{2+}]|; \\ |D_{B,i}\nabla^2[CaB_i]|; |Q_{Ca}|; |q_{rem}([Ca^{2+}])| \quad (1.7)$$

De este modo, se puede considerar que los buffers y el  $Ca^{2+}$  están localmente en equilibrio químico y, entonces, la dinámica del  $Ca^{2+}$  es descrita en términos de una ecuación de evolución cerrada para  $[Ca^{2+}]$ . Esta aproximación puede obtenerse como caso particular de la reducción perturbativa sistemática para sistemas de reacción-difusión con dos escalas temporales presentada en [Strier and Dawson, 2000]. La ecuación reducida resultante no es de tipo difusivo [Wagner and Keizer, 1994, Strier et al., 2002], sin embargo, puede reescribirse como una ecuación de reacción-difusión con un coeficiente de difusión dependiente de la concentración [Sneyd et al., 1998]. La validez de esta aproximación fue estudiada en muchos trabajos, entre ellos [Smith et al., 1996, Smith., 1996b, Smith et al., 2001, Strier et al., 2003]. Dentro del marco de la *RBA*, las Ecs. (1.2)-(1.3) pueden reducirse a [Wagner and Keizer, 1994]:

$$\frac{\partial[Ca^{2+}]}{\partial t} = \beta \left\{ \left( D_{Ca} + \sum_i \kappa_i D_{B,i} \right) \nabla^2[Ca^{2+}] - 2 \times \right. \\ \left. \left( \sum_i \frac{\kappa_i D_{B,i}}{K_{d,i} + [Ca^{2+}]} \right) \nabla[Ca^{2+}] \cdot \nabla[Ca^{2+}] + q_{rem} + Q_{Ca} \right\} \quad (1.8) \\ [CaB_i] = \frac{[B]_{T,i}[Ca^{2+}]}{K_{d,i} + [Ca^{2+}]}, \quad 1 \leq i \leq N \quad (1.9)$$

donde

$$\beta = \left( 1 + \sum_i \frac{K_{d,i}[B]_{T,i}}{(K_{d,i} + [Ca^{2+}])^2} \right)^{-1}, \quad (1.10)$$

$$\kappa_i = \frac{K_{d,i}[B]_{T,i}}{(K_{d,i} + [Ca^{2+}])^2}, \quad (1.11)$$

y  $K_{d,i} = k_{off,i}/k_{on,i}$  es la constante de disociación del buffer  $B_i$ . Se desprende de la Ec. (1.8) que el efecto de los buffers inmóviles ( $D_{B,i} = 0$ ) es reducir la concentración de  $Ca^{2+}$  y su coeficiente de difusión. En el caso de buffers móviles puede obtenerse una imagen similar re-escribiendo la Ec. (1.8) como [Sneyd et al., 1998]:

$$\frac{\partial w}{\partial t} = D_{eff}(c(w)) \left( \nabla^2 w + \frac{1}{D_{Ca}} (q_{rem}(c(w)) + Q_{Ca}) \right), \quad (1.12)$$

donde

$$w \equiv [Ca^{2+}] - \sum_i \frac{D_{B,i}[B]_{T,i}K_{d,i}}{D_{Ca}(K_{d,i} + [Ca^{2+}])}, \quad (1.13)$$

$[Ca^{2+}] \equiv c(w)$  es la inversa (positiva) de la Ec. (1.13), y

$$D_{eff}(c) = \beta \left( D_{Ca} + \sum_i \kappa_i D_{B,i} \right), \quad (1.14)$$

es un coeficiente de difusión efectivo (dependiente de la concentración). Dado que los buffers difunden más lentamente que el  $Ca^{2+}$  libre, este coeficiente efectivo resulta menor que  $D_{Ca}$ .

Otra “reducción analítica” del modelo, presentada por primera vez en [Neher, 1986] y luego en [Smith et al., 2001], es la denominada *Aproximación de Buffer en Exceso (EBA)*. Físicamente, la esencia de la *EBA* es que el buffer no es saturado, aún en la zona de la fuente. Altas concentraciones de buffer minimizan la saturación, pero la movilidad del buffer es también importante. Los buffers estacionarios, aún en muy altas concentraciones, eventualmente se verán saturados cerca de la fuente. La clave está en que suficiente buffer móvil pueda difundir hacia la región cercana a la fuente para recargar el buffer libre que pasa a estar ligado. Bajo estas hipótesis,  $[B_i] \approx [B_i]_{rest} \approx [B]_{T,i}$  ( $[B_i]_{rest}$  es la concentración de reposo del buffer en equilibrio químico con  $[Ca^{2+}]_{rest}$ :  $[B_i]_{rest} = [B]_{T,i}/([Ca^{2+}]_{rest}/K_{d,i} + 1)$ ). Se ha mostrado que esta aproximación es válida cuando hay altas concentraciones de buffers móviles y/o cuando la amplitud de la fuente es pequeña [Neher, 1986, Smith et al., 1996, Smith et al., 2001]. Bajo la aproximación *EBA*, la Ec. (1.2) se reduce a:

$$\begin{aligned} \frac{\partial [Ca^{2+}]}{\partial t} = & - \left( \sum_i k_{on,i}[B]_{T,i} \right) [Ca^{2+}] + D_{Ca} \nabla^2 [Ca^{2+}] + \\ & + q_{rem} + Q_{Ca}, \end{aligned} \quad (1.15)$$

Notemos que tanto la aproximación de buffers rápidos como la aproximación de buffer en exceso describen la dinámica del calcio citosólico en términos de una única ecuación diferencial para  $[Ca^{2+}]$ . Cuando  $q_{rem} \equiv 0$  y la fuente  $Q_{Ca}$  es puntual o está uniformemente distribuida sobre una esfera, la Ec. (1.15) puede resolverse analíticamente. Nos ocuparemos de una ecuación similar en el Capítulo 6.

Bajo hipótesis similares a las de la *EBA*, una aproximación mejor fue derivada en [Naraghi and Neher, 1997]. Las ecuaciones reducidas, en este caso, se obtienen linealizando alrededor de las soluciones de equilibrio. Nos

referiremos a esta reducción como la *Aproximación de Naraghi y Neher (NN)*. Definiendo  $\delta[Ca^{2+}] = [Ca^{2+}] - [Ca^{2+}]_{rest}$  y  $\delta[CaB_i] = [CaB_i] - [CaB_i]_{rest}$ , la versión linealizada de las Ecs. (1.2)-(1.3) es:

$$\frac{\partial \delta[Ca^{2+}]}{\partial t} = - \left( \sum_i \frac{\kappa_i}{\tau_i} \right) \delta[Ca^{2+}] + \sum_i \left( \frac{1}{\tau_i} \delta[CaB_i] \right) + D_{Ca} \nabla^2 \delta[Ca^{2+}] + Q_{Ca}, \quad (1.16)$$

$$\frac{\partial \delta[CaB_i]}{\partial t} = \frac{\kappa_i}{\tau_i} \delta[Ca^{2+}] - \frac{1}{\tau_i} \delta[CaB_i] + D_{B,i} \nabla^2 \delta[CaB_i], \quad (1.17)$$

donde hemos considerado  $q_{rem} \equiv 0$ ,  $\tau_i = 1/(k_{off,i} + k_{on,i}[Ca^{2+}])$  y  $\kappa_i$  fue definido en la Ec. (1.11). Ambos parámetros están ahora evaluados en  $[Ca^{2+}]_{rest}$ . Esta aproximación resulta válida siempre que:

$$|k_{on,i} \delta[Ca^{2+}] ([B]_{T,i} - [CaB_i]_{rest})| \quad ; \quad |(k_{on,i}[Ca^{2+}]_{rest} + k_{off,i}) \delta[CaB_i]| \gg |k_{on,i} \delta[Ca^{2+}] \delta[CaB_i]|. \quad (1.18)$$

Las Ecs. (1.16)-(1.17) pueden resolverse analíticamente para el caso de una fuente puntual, ver [Naraghi and Neher, 1997]. En particular, en el caso de un solo buffer, la solución estacionaria para el caso de una fuente permanentemente encendida de la forma  $Q_{Ca} = qI_{Ca} \delta(\mathbf{r})$  está dada, en coordenadas esféricas, por:

$$[Ca^{2+}]_s = \frac{qI_{Ca}}{4\pi r \left( D_{Ca} + \frac{[B]_T}{K_d} D_B \right)} \times \left( 1 + \frac{[B]_T D_B}{K_d D_{Ca}} \exp \left( -r \sqrt{\frac{k_{off} D_{Ca} + k_{on} D_B [B]_T}{D_B D_{Ca}}} \right) \right) \quad (1.19)$$

$$[B]_s = [B]_T - \frac{qI_{Ca}}{4\pi r \left( \frac{K_d}{[B]_T} D_{Ca} + D_B \right)} \times \left( 1 - \exp \left( -r \sqrt{\frac{k_{off} D_{Ca} + k_{on} D_B [B]_T}{D_B D_{Ca}}} \right) \right), \quad (1.20)$$

considerando  $[Ca] \rightarrow 0$ ,  $[B] \rightarrow [B]_T$ , lejos de la fuente. En la expresión anteriores,  $K_d \equiv k_{off}/k_{on}$ . Esta solución satisface las hipótesis de la aproximación (Ec. (1.18)) siempre que la fuente no sea demasiado intensa:

$$qI_{Ca} \ll 4\pi \sqrt{\frac{D_{Ca} D_B}{k_{on}}} \left( \frac{k_{off}}{k_{on}} D_{Ca} + D_B [B]_T \right). \quad (1.21)$$

Comparando la solución (1.19) con la solución estacionaria de la ecuación de difusión sin buffers y en presencia de la misma fuente,  $[Ca^{2+}]_s^{libre} = \frac{qI_{Ca}}{4\pi r D_{Ca}}$  podemos concluir que, mientras que para  $r \approx 0$  ambas soluciones son aproximadamente iguales, para  $r$  suficientemente grande  $[Ca^{2+}]_s < [Ca^{2+}]_s^{libre}$ . Esto muestra que la presencia de buffers restringe la zona donde la concentración de  $Ca^{2+}$  libre puede elevarse sobre el nivel basal a una región relativamente pequeña (dependiendo de las propiedades de los buffers) alrededor del punto donde el  $Ca^{2+}$  ingresa al citosol. De acuerdo a la *RBA* esta restricción es aún mayor, como se muestra en la Fig. 1.1 (tomada de [Naraghi and Neher, 1997]) donde se comparan las soluciones estacionarias dadas por *RBA* y por *NN* respectivamente, para una situación en la que hay 1 mM de BAPTA y una fuente puntual de calcio localizada en el origen. *RBA* subestima  $[Ca^{2+}]$  (y sobreestima  $[CaBAPTA]$ ) ya que considera que la reacción está equilibrada en lugares donde no lo está. Por otro lado, para distancias mayores, las soluciones de *RBA* y *NN* se encuentran, como se ve para  $r > 150nm$ . La aproximación *NN* resulta más adecuada que *RBA* para estudiar gradientes de calcio pronunciados.

La idea de este tipo de reducciones es que cuando, por ejemplo,:

1. hay una separación de escalas temporales en el sentido que las reacciones con los buffers ocurren mucho más rápido que los demás procesos (*RBA*); o
2. los buffers no se ven saturados ni siquiera en la región de la fuente (*EBA*); o
3. las contribuciones no lineales al término de reacción en la Ec. (1.4) pueden despreciarse al ser comparadas con las contribuciones lineales (*NN*);

es posible reemplazar la descripción completa por una simplificada que sólo es válida en un cierto régimen, donde la solución de la descripción reducida es una buena aproximación a la real. Este tipo de procedimiento acelera los cálculos y simplifica su interpretación. Sin embargo, aún siendo simplificadas, las ecuaciones reducidas requieren conocimiento detallado de procesos y parámetros que están pobremente caracterizados.

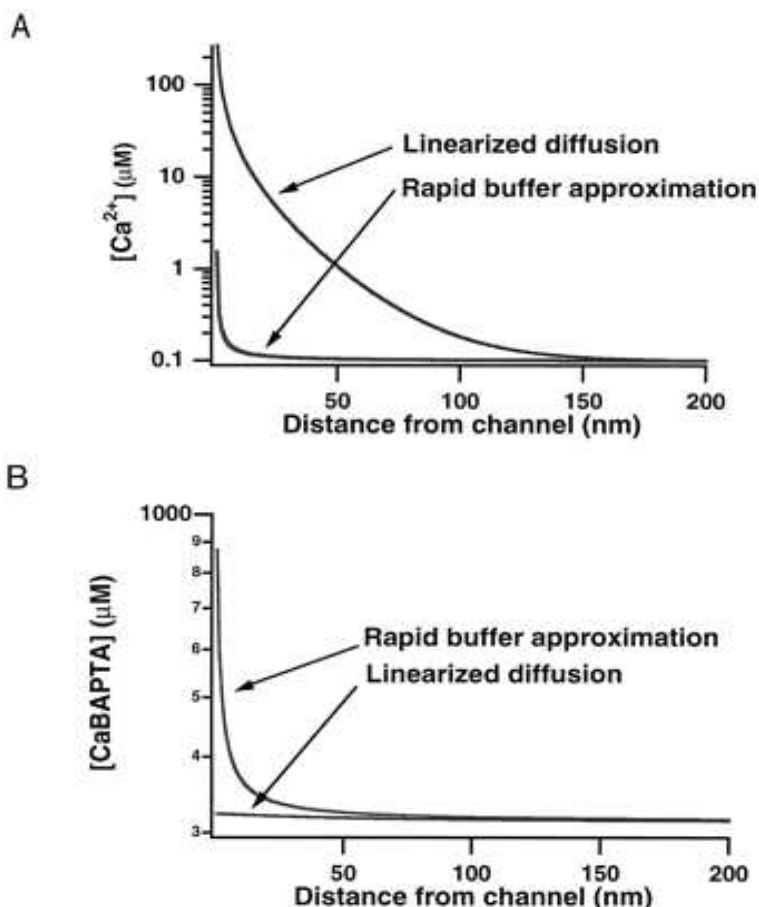


Figura 1.1: Comparación de los estados estacionarios dados por *RBA* y por *NN*. (A),  $[Ca^{2+}]$  y (B),  $[CaBAPTA]$  en función de la distancia en presencia de 1 mM de BAPTA y con una corriente de 150 fA. Dado que la *RBA* considera que hay equilibrio químico en todos lados,  $[Ca^{2+}]$  se ve notoriamente subestimada cerca del canal, donde no se alcanza dicho equilibrio. El enfoque *NN* tiene en cuenta explícitamente la cinética y, por lo tanto, no tiene ese problema. El problema también se refleja en (B), donde  $1,8 \mu M$  de  $[Ca^{2+}]$  saturan casi el 90% del buffer, mientras que se obtiene un aumento máximo en  $[CaBAPTA]$  de  $10 \mu M$  (*i.e.*, 1% del total de BAPTA), cerca del canal. Este defecto se debe a que la *RBA* no puede hacer frente al pronunciado gradiente de calcio provocado por BAPTA.

## Capítulo 2

# Aproximando el transporte de $\text{Ca}^{2+}$ citosólico en presencia de “buffers” como un proceso puramente difusivo

### 2.1 Resumen

Las consecuencias directas más relevantes de la presencia de buffers sobre la distribución del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico cuando ingresa a través de un solo canal son: *a)* la disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre y *b)* la limitación del rango espacial sobre el cual se distribuye el  $\text{Ca}^{2+}$  al ingresar al citosol. Esto último ocurre debido a que los buffers difunden más lentamente que el  $\text{Ca}^{2+}$  libre. A pesar de la no linealidad de las interacciones, es de interés, como primer abordaje, determinar si es posible aproximar el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de buffers endógenos como un proceso puramente difusivo. En este capítulo investigamos esta posibilidad y determinamos los límites de aplicabilidad de esta aproximación. Usando la solución analítica de la ecuación de difusión, analizamos una serie de experimentos de puffs artificiales y determinamos un coeficiente de difusión efectivo para el  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del citosol de ovocitos de *Xenopus laevis*. Los puffs artificiales son generados en estas células mediante la inyección, con una micro-pipeta, de una corriente ionofórica que contiene una cantidad desconocida de  $\text{Ca}^{2+}$ . Al usar la descripción puramente difusiva obtenemos una estimación para la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  que es mucho menor que

la esperada.

## 2.2 Aproximación difusiva al transporte de $\text{Ca}^{2+}$ en presencia de “buffers”: simulaciones numéricas

En esta sección buscamos determinar si es posible describir el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de buffers como un proceso puramente difusivo cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  ingresa a través de un canal, es decir, si la dinámica de  $[\text{Ca}^{2+}]$  puede ser descrita por una ecuación de la forma:

$$\frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} = f + D\nabla^2[\text{Ca}^{2+}], \quad (2.1)$$

donde tanto el término de fuente,  $f$ , como el coeficiente de difusión,  $D$ , son términos “efectivos” determinados no sólo por la inyección y transporte del  $\text{Ca}^{2+}$  libre, sino también por la interacción con los buffers (como, por ejemplo, en la *RBA*). En el caso de una fuente puntual ubicada en el origen que se enciende en  $t = 0$  ( $f = \sigma\delta(\mathbf{r})$  para  $t \geq 0$ , donde  $\sigma$  se vincula con la corriente,  $I$ , mediante  $\sigma = \frac{I}{p_{\text{Coulomb}}}$   $5,2 \times 10^3 \mu\text{M}\mu\text{m}^3$ ) la solución de (2.1) en un dominio infinito con  $[\text{Ca}^{2+}](t = 0) = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{rest}}$  para todo  $r$  y  $[\text{Ca}^{2+}] \rightarrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{rest}}$  para  $r \rightarrow \infty$  es:

$$[\text{Ca}^{2+}] = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{rest}} + \frac{\sigma}{4\pi Dr} \left( 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{r/\sqrt{4Dt}} e^{-u^2} du \right), \quad (2.2)$$

para  $t \geq 0$ . Derivando esta solución respecto del tiempo y tomando logaritmo obtenemos:

$$\log \left( \frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} \right) = \log \left( \frac{\sigma}{(4\pi Dt)^{3/2}} \right) - \frac{r^2}{4Dt} \quad (2.3)$$

Para determinar si la solución (2.2) provee una buena aproximación a la distribución de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de buffers, simulamos numéricamente las Ecs. (1.2)-(1.3) y analizamos si existen valores efectivos,  $D$  y  $\sigma$ , para los cuales la solución obtenida mediante la simulación numérica satisface la relación (2.3) en algún rango de distancias a la fuente. En otras palabras, analizamos si el gráfico de  $\log(\partial[\text{Ca}^{2+}]/\partial t)$  en función de  $r^2$  presenta alguna zona con comportamiento lineal. Si ése es el caso, es posible obtener los valores de  $D$  y  $\sigma$  de la pendiente y la ordenada de la función lineal de ajuste.

$D_{Ca}$	$220\mu m^2/s$	$D_{CaB}$	$50\mu m^2/s$
$D_{CaE}$	$113\mu m^2/s$	$[Ca^{2+}]_{rest}$	$0,05\mu M$
$[B]_T$	$40\mu M$	$[E]_T$	$1000\mu M$
$k_{on}^B$	$100,0\mu M^{-1}s^{-1}$	$k_{off}^B$	$400,0s^{-1}$
$k_{on}^E$	$1,5\mu M^{-1}s^{-1}$	$k_{off}^E$	$0,3s^{-1}$
$R_f$	$0,05\mu m$	$t_s$	$3ms$
$t_d$	$10ms$	$k_1$	$50,0\mu Ms^{-1}$
$k_2$	$0,184\mu M$	$m$	$3,9$
$R_t$	$1,5\mu m$	$T_t$	$20ms$
$\Delta r$	$0,01\mu m$	$\Delta t$	$10^{-7}s$

Tabla 2.1: Parámetros utilizados en las simulaciones de la sección Sec. 2.2.

La simulación de las Ecs. (1.2)-(1.3) se hizo en 3-D teniendo en cuenta dos buffers, a los que denominamos  $B$  y  $E$  respectivamente, un mecanismo de recaptura dado por la Ec. (1.6) y una fuente muy localizada de iones de calcio uniforme sobre una esfera de radio  $R_f$  y cuyo curso temporal es un “escalón”:

$$Q_{Ca} = \begin{cases} \alpha I_{Ca} & \text{si } r < R_f \text{ y } t_s < t < t_s + t_d, \\ 0 & \text{otro caso} \end{cases} \quad (2.4)$$

donde  $\alpha = 5,2 \times 10^3 \mu M \mu m^3 / (\frac{4}{3}\pi R_f^3 pC)$ , de modo que  $Q_{Ca}$  está en  $\mu M/s$  e  $I_{Ca}$  en  $pA$ . Todos los parámetros de las simulaciones se enumeran en la Tabla 2.1 (los parámetros del buffer  $B$  corresponden a los del indicador fluorescente fluo-4 dextran y los de  $E$  al buffer de calcio EGTA). Las simulaciones se iniciaron a partir de una distribución uniforme de equilibrio para todas las especies con el valor de reposo de la concentración de  $Ca^{2+}$  de  $50 nM$ . Se utilizó un esquema de diferencias finitas en una grilla con simetría esférica de longitud  $R_t = 1,5\mu m$ , con pasos espacial y temporal de  $0,01 \mu m$  y  $10^{-7}$  s, respectivamente. El tiempo total de integración fue de  $T_t = 20$  ms. Notar que  $I_{Ca}$ , o bien  $\sigma_{Ca}$ , son los valores de la corriente o de la tasa de entrada de iones de calcio, mientras que  $I$  y  $\sigma$  son los valores reescalados o efectivos. El mismo tipo de notación utilizamos para el coeficiente de difusión,  $D_{Ca}$  es el coeficiente de difusión libre del calcio ( $\sim 220\mu m^2/s$  [Allbritton et al, 1992]) y  $D$  es el coeficiente efectivo.

La Fig. 2.1 (a) corresponde al gráfico de  $\log(\partial[Ca^{2+}]/\partial t)$  en función de  $r^2$  para los resultados de la simulación de las Ecs. (1.2)-(1.3) con  $I_{Ca} = 0,1 pA$  (círculos) e  $I_{Ca} = 1,9 pA$  (cuadrados). Las curvas corresponden a  $t = 12,5$  ms. En ambos casos es posible distinguir una región donde el comportamiento



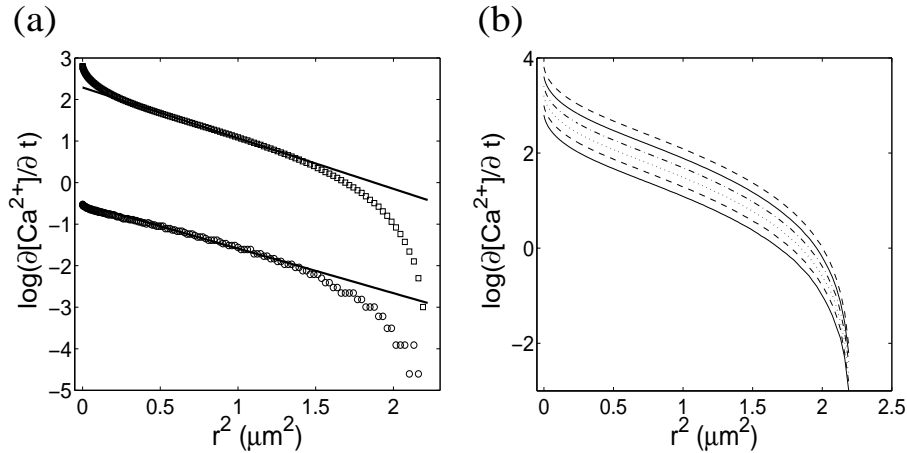


Figura 2.1: Validez de la aproximación puramente difusiva al transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de buffers. (a) Gráfico de  $\log(\partial[\text{Ca}^{2+}]/\partial t)$  en función de  $r^2$  para los resultados de la simulación de las Ecs. (1.2)-(1.3) con los parámetros de la Tabla 2.1 e  $I_{Ca} = 0,1 \text{ pA}$  (círculos),  $I_{Ca} = 1,9 \text{ pA}$  (cuadrados). Las curvas corresponden a  $t = 12,5 \text{ ms}$ . Las líneas llenas corresponden a ajustes lineales en las regiones donde el comportamiento es lineal. (b) Gráfico de  $\log(\partial[\text{Ca}^{2+}]/\partial t)$  en función de  $r^2$  para el caso  $I_{Ca} = 1,9 \text{ pA}$  para diferentes tiempos,  $t = 10; 10,5; 11; 11,5; 12$  y  $12,5 \text{ ms}$ , desde arriba hacia abajo respectivamente.

es lineal. Se incluyen ajustes lineales en esas regiones (líneas llenas). Muy cerca de la fuente o lejos de ella se pierde este comportamiento lineal, la no-linealidad cerca de la fuente es más pronunciada para la simulación con mayor valor de  $I_{Ca}$ . La Fig. 2.1 (b) corresponde al gráfico de  $\log(\partial[\text{Ca}^{2+}]/\partial t)$  en función de  $r^2$  para el caso  $I_{Ca} = 1,9 \text{ pA}$  para diferentes tiempos,  $t = 10; 10,5; 11; 11,5; 12$  y  $12,5 \text{ ms}$ , desde arriba hacia abajo respectivamente. En este gráfico se hace evidente que es posible realizar un ajuste lineal para cada una de esas curvas (en un rango de  $r^2$  para el que tenga sentido realizar tal ajuste) con rectas de la misma pendiente, es decir utilizando el mismo valor de  $D$ . Estas dos figuras nos permiten concluir que para este conjunto de simulaciones es posible describir el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  como un proceso puramente difusivo, con un coeficiente de difusión único durante un cierto intervalo de tiempo y dentro de un cierto rango de distancias a la fuente.

## 2.3 Aproximación difusiva al transporte de $\text{Ca}^{2+}$ en ovocitos: análisis de “puffs sintéticos”

En esta sección analizamos si la distribución de  $\text{Ca}^{2+}$  obtenida experimentalmente en “puffs sintéticos” puede ser modelada usando la solución (2.2). Los “puffs sintéticos” son generados mediante la microinyección ionoforética controlada de  $\text{Ca}^{2+}$  en ovocitos previamente cargados con el fluoróforo utilizado para registrar señales provocadas por  $\text{IP}_3$ . De este modo se genera una señal de fluorescencia similar a la observada cuando el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol ocurre a través de receptores de  $\text{IP}_3$  luego de la fotólisis de  $\text{IP}_3$  enjaulado. La idea original de este tipo de experimentos era comparar las imágenes obtenidas mediante microinyecciones con las evocadas por  $\text{IP}_3$ , para así obtener información cuantitativa de estas últimas. Sin embargo, el método no pudo ser aplicado directamente por la imposibilidad de determinar el porcentaje exacto de  $\text{Ca}^{2+}$  contenido en la corriente ionoforética  $I_T$  (el que se supone está entre el 5 y el 10 % del total). En la Fig. 2.2 mostramos imágenes reales y sintéticas obtenidas en el mismo ovocito de *Xenopus laevis*. La columna de la izquierda corresponde a blips y puffs reales provocados por fotólisis de  $\text{IP}_3$ , mientras que la columna de la derecha corresponde a inyecciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . En ambos tipos de eventos el ovocito fue previamente cargado con el indicador fluorescente Oregon green BAPTA-1 y con el buffer de  $\text{Ca}^{2+}$  EGTA, de modo de desacoplar los sitios de liberación en el caso de los puffs reales.

En esta sección nos concentraremos en un aspecto de las señales de puff sintéticos que caracteriza la forma en la que el  $\text{Ca}^{2+}$  se transporta en el citosol una vez que ingresa a través de la pipeta. Este es el así llamado “ancho completo para amplitud mitad” (FWHM por sus siglas en inglés) que se define como dos veces la distancia al punto de inyección para el que la amplitud de la fluorescencia es igual a la mitad del valor máximo observado en el instante en que se corta la inyección. Mostramos en la Fig. 2.3 (A) el FWHM determinado experimentalmente como función de la duración de la inyección para tres valores diferentes de la corriente ionoforética total: 400, 900 y 1900 pA (recordar que sólo una fracción de esta corriente corresponde a  $\text{Ca}^{2+}$ ). Mostramos en Fig. 2.3 (B) el FWHM determinado experimentalmente como función de la intensidad de la corriente ionoforética total para cinco valores de la duración: 10, 20, 50, 100 y 200 ms.

El objetivo ahora es determinar valores de  $D$  y  $\sigma$  que permitan reproducir los comportamientos observados en la Fig. 2.3 suponiendo que la dinámica

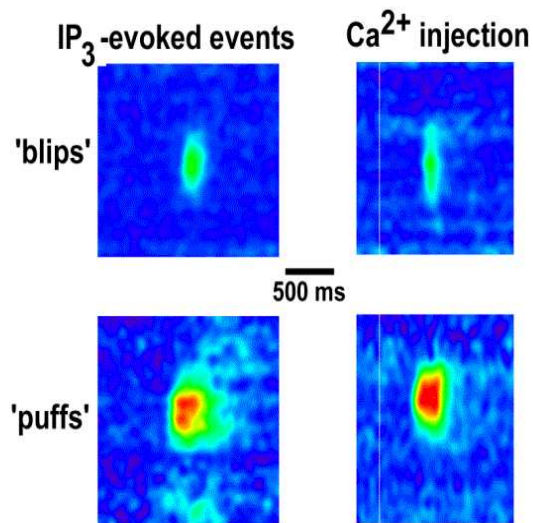


Figura 2.2: Blips y puffs reales (izquierda) y sintéticos (derecha) obtenidos en el mismo ovocito de *Xenopus laevis* previamente cargado con el indicador fluorescente Oregon green BAPTA-1 y con el buffer de  $\text{Ca}^{2+}$  EGTA. Se trata de imágenes de barrido lineal adquiridas a una tasa de 7,6 ms por línea. Los colores crecientemente más cálidos indican mayor intensidad de fluorescencia, el tiempo se representa horizontalmente mientras que la distancia sobre la línea de barrido se indica verticalmente.

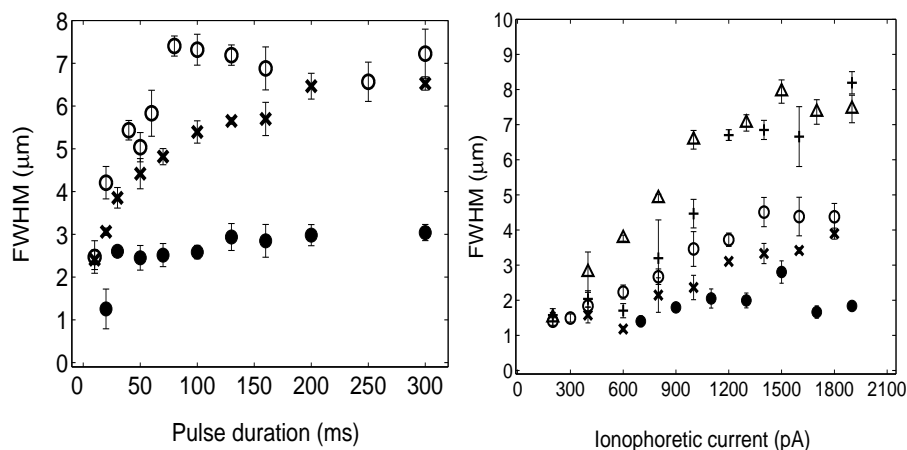


Figura 2.3: Puffs simulados mediante la ionoforesis de  $\text{Ca}^{2+}$  con amplitudes de corrientes constantes y duraciones de los pulsos variables (A) y con pulsos de duración constante y diferentes amplitudes de corriente (B). Los datos se adquirieron a 7,6 ms/línea sobre una línea de barrido de  $100 \mu m$ , con un tamaño de pixel de  $0,1314 \mu m$ . Los datos que se muestran corresponden a un mismo ovocito. Cada punto es el promedio de 3 puffs sintéticos representativos. Ancho completo para amplitud mitad (FWHM) como función de la duración del pulso (A) y como función de la corriente ionoforética total (B).

de la distribución de  $\text{Ca}^{2+}$  está regida por la Ec. (2.1) con una fuente puntual. Sin embargo, no está claro que la aproximación de fuente puntual sea totalmente adecuada en el caso de la pipeta, en particular, para determinar el máximo de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ligado al indicador (que ocurre para  $r = 0$  y que es necesario conocer para determinar el FWHM). Para tener en cuenta el ancho finito del extremo de la pipeta, es mejor trabajar con la solución de (2.1) con  $f$  una fuente uniforme sobre una esfera de radio  $R_f$ . Dado que tanto esta última solución como la dada por (2.2) tienden a la solución estacionaria correspondiente mientras la fuente está encendida, y que esta aproximación ocurre más rápidamente para puntos más cercanos a la fuente, para poder mantener la simplicidad de la solución (2.2) combinamos la solución estacionaria del caso de fuente esférica (para  $r \leq R_f$ ) con la solución dependiente del tiempo para fuente puntual (para  $r \geq R_f$ ). Es decir, aproximamos la distribución de  $\text{Ca}^{2+}$  por:

$$[Ca^{2+}] = \begin{cases} [Ca^{2+}]_{rest} + \frac{\sigma}{4\pi DR_f} \left( \frac{3}{2} - \frac{r^2}{2R_f^2} \right), & \text{si } r \leq R_f \\ [Ca^{2+}]_{rest} + \frac{\sigma}{4\pi Dr} \left( 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{r/\sqrt{4Dt}} e^{-u^2} du \right), & \text{si } r \geq R_f. \end{cases} \quad (2.5)$$

Ahora bien, los experimentos observan el incremento de la fluorescencia respecto del valor basal, el que puede considerarse proporcional a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ligado al indicador,  $[CaB_F]$ , al menos dentro de cierta aproximación (discutiremos este tema en más detalle en el Capítulo 5). Dentro de esta aproximación, el FWHM da lo mismo si se lo calcula a partir de la fluorescencia o de  $[CaB_F]$ . En este primer abordaje, suponemos que el colorante está localmente en equilibrio con el calcio libre, es decir, sus concentraciones se vinculan por la Ec. (1.9). Considerando que las tasas de reacción de  $\text{Ca}^{2+}$  con el indicador fluorescente usado en estos experimentos, Oregon Green, son aproximadamente como las de fluo-3,  $k_{on,F} = 80 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{off,F} = 90 \text{s}^{-1}$  (ver [Izu et al., 2001]), resulta  $K_{d,F} = k_{off,F}/k_{on,F} = 1,125 \mu\text{M} \approx 1 \mu\text{M}$ . Usando las Ecs. (2.5) y (1.9) podemos obtener  $[CaB_F]$  en función del tiempo y la posición y calcular el correspondiente FWHM (que corresponde a un valor  $r^* > R_f$ ). Claramente,  $[CaB_F]$  alcanza su máximo para  $r = 0$  y es:

$$[CaB_F]_{max} = \frac{3\sigma[B]_{T,F}}{8\pi DR_f K_{d,F} + 3\sigma}, \quad (2.6)$$

mientras que el valor de  $[CaB_F]$  en la posición de la amplitud mitad,  $r^*$ , puede obtenerse insertando la Ec. (2.2) en la Ec. (1.9). El ancho completo a amplitud mitad,  $\text{FWHM}=2r^*$ , puede entonces obtenerse de la ecuación

$[CaB_F](r^*) = [CaB_F]_{max}/2$ . De esta forma resulta:

$$r^* = \left( \frac{4R_f}{3} + \frac{\sigma}{4\pi DK_{d,F}} \right) \left( 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{r^*/\sqrt{4Dt}} e^{-u^2} du \right), \quad (2.7)$$

que es una ecuación implícita para  $r^*$ . La integral que aparece en (2.7) (incluyendo el prefactor  $2\sqrt{\pi}$ ) es la función error evaluada en el argumento  $r^*/\sqrt{4Dt}$ . Por lo tanto, tiende a 0 cuando el argumento tiende a 0 y tiende a 1 cuando el argumento tiende a infinito. Por supuesto, todas estas expresiones son válidas mientras la fuente está encendida. Así, si la fuente está encendida por un largo tiempo, el argumento de la función error se hará relativamente pequeño aún para valores relativamente grandes de  $r^*$ , en cuyo caso la integral en la Ec. (2.7) puede despreciarse. Esto explica por qué  $r^*$  irá hacia un valor asintótico ( $4R_f/3 + \sigma/4\pi DK_{d,F}$ ) al aumentar el tiempo de inyección, una característica que se observa en la Fig. 2.3 (A). A partir de esta ecuación también podemos observar que  $r^*$  crece con  $\sigma$ , como se observa en la Fig. 2.3 (B). Más aún, si derivamos la Ec. (2.7) con respecto a  $\sigma$ , obtenemos:

$$\frac{dr^*}{d\sigma} = \frac{1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{r^*/\sqrt{4Dt}} e^{-u^2} du}{4\pi DK_{d,F} + \frac{\sigma \exp(r^{*2}/4Dt)}{\pi\sqrt{Dt}}}. \quad (2.8)$$

Insertando la Ec. (2.7) en la Ec. (2.8), podemos reescribir esta última ecuación como:

$$\frac{dr^*}{d\sigma} = \frac{r^* - 4R_f/3}{\sigma} \left( 1 + \frac{\sigma \exp(r^{*2}/4Dt)}{4\pi^2 DK_{d,F} \sqrt{Dt}} \right)^{-1}. \quad (2.9)$$

Así, si comparamos dos experimentos hechos con la misma corriente de inyección pero con diferentes duraciones de pulso, la pendiente  $dr^*/dI$  con la cual  $r^*$  cambia con la corriente (que es proporcional a  $dr^*/d\sigma$  ya que  $\sigma$  es proporcional a la corriente,  $I$ ) aumenta con el tiempo de inyección. Esto puede deducirse de la Ec. (2.9), dado que  $r^*$  aumenta con  $t$ , alcanzando un valor asintótico, y entonces queda claro que el miembro derecho de la Ec. (2.9) eventualmente crecerá con el tiempo. Este cambio de pendiente está también de acuerdo con las observaciones.

Usando la expresión dada por la Ec. (2.7) para  $r^* = \text{FWHM}/2$ , es posible buscar los valores del radio de la fuente,  $R_f$ , la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $I$  (o bien de  $\sigma$ ), y del coeficiente de difusión,  $D$ , que mejor ajustan los datos experimentales. Recordemos que tanto  $I$  como  $D$  son valores efectivos reescalados por el efecto de los buffers endógenos, el buffer exógeno y el fluoróforo. El valor de  $R_f$  puede interpretarse como el tamaño efectivo de la boca de la

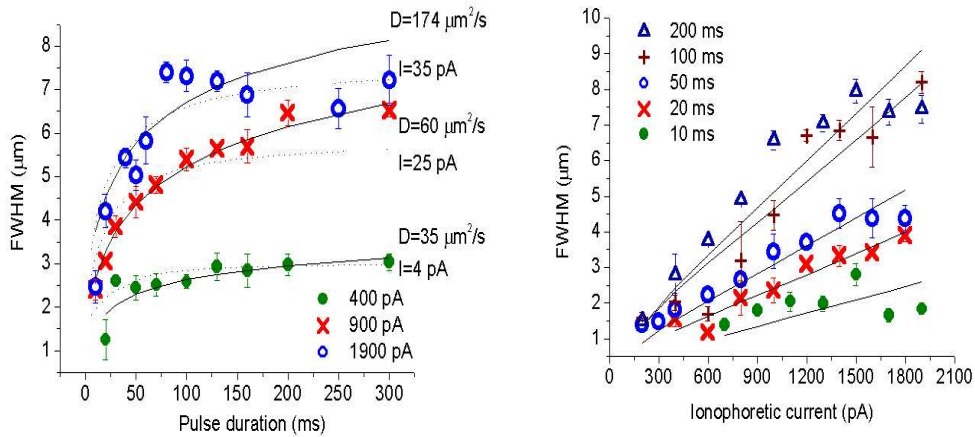


Figura 2.4: FWHM como función de la duración del pulso, para diferentes valores de la corriente inyectada (*A*) y como función de la corriente inyectada, para diferentes valores de la duración del pulso (*B*). Las líneas llenas corresponden al modelo y los puntos a los datos experimentales. El tiempo está medido en *ms*, FWHM en  $\mu\text{m}$  y la corriente en *pA*. En cada curva se indican los valores obtenidos para el coeficiente efectivo de difusión. Las líneas punteadas y los valores de corriente indicados sobre las mismas corresponden a simulaciones numéricas de un modelo más realista de la señal.

pipeta. El tamaño real de la boca de la pipeta está estimado en  $\sim 0,1 \mu\text{m}$ , sin embargo, se espera que  $R_f$  dé mayor a este valor debido a efectos de “blurring” óptico y a la resolución espacial del experimento. En la Fig. 2.4 se muestran las curvas de FWHM obtenidas a partir de la Ec. (2.7) usando los valores de  $R_f$ ,  $D$  e  $I$  que mejor ajustan los datos experimentales (líneas llenas) junto con los propios datos experimentales. En la Fig. 2.4 (*A*) se grafica FWHM en función de la duración del pulso para diferentes valores de la corriente inyectada (la corriente total que fluye a través de la pipeta): 400, 900 y 1900 pA. En la Fig. 2.4 (*B*), en cambio, se grafica FWHM en función de la corriente inyectada para diferentes duraciones del pulso: 10, 20, 50, 100 y 200 ms.

Nos ocupamos en primer lugar de la Fig. 2.4 (*A*). Ajustando los datos para las tres corrientes, 400, 900 y 1900 pA, con un mismo coeficiente de difusión efectivo, obtuvimos  $R_f = 0,89 \mu\text{m}$ ,  $D = 175 \mu\text{m}^2/\text{s}$  e  $I = 0,44$ ;  $0,92$  y  $2,30 \text{ pA}$ , respectivamente. Considerando que el coeficiente libre de difusión

del calcio es de  $220 \mu\text{m}^2/\text{s}$  [Allbritton et al, 1992] podemos determinar que el factor por el que los buffers lo “re-escalean” es de alrededor de 0,8. Si suponemos que el “re-escaleo” en el coeficiente de difusión y en la corriente son similares a los que se obtienen en la *RBA* para algún valor (promedio) de  $[\text{Ca}^{2+}]$  (ver Ec. (1.12)), vemos que  $D_{\text{Ca}}/D \leq I_{\text{Ca}}/I$  y que la igualdad vale en el caso de buffers inmóviles. En particular, si suponemos que  $D$  e  $I$  son reescalados por el mismo factor, determinamos que la fracción de la corriente ionoforética debida a  $\text{Ca}^{2+}$  es de  $\sim 0,13\%$ , un valor bastante más pequeño que el esperado de 5-10%. Por otro lado, si usamos las expresiones de  $D$  e  $I$  que se desprenden de Ec. (1.12) suponiendo un solo buffer (efectivo) de coeficiente de difusión,  $D_B$ , deducimos que:

$$\frac{I}{I_{\text{Ca}}} = \frac{D - D_B}{D_{\text{Ca}} - D_B}. \quad (2.10)$$

Notar que esta expresión está bien definida, es decir  $I/I_{\text{Ca}}$  da una cantidad positiva, dado que se satisface  $D_B < D_{\text{Ca}}$  y  $D_B < D$  (pues el coeficiente efectivo cumple  $D_B < D < D_{\text{Ca}}$ ). Por lo tanto, si tomamos, por ejemplo,  $D_B \sim 50 - 150 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  (del orden de los valores usados en la literatura para el coeficiente de difusión del indicador, fluo-3 [Soeller and Cannell, 2002, Smith et al., 1998]), obtenemos  $I_{\text{Ca}} \sim 0,60; 1,25$  y  $3,13$  pA para cada una de las curvas si  $D_B \sim 50 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  e  $I_{\text{Ca}} \sim 1,23; 2,58$  y  $6,44$  pA si  $D_B \sim 150 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ . Estos valores corresponden a  $\sim 0,15$  ó  $0,31\%$ , respectivamente, de la corriente ionoforética total. Independientemente del valor de  $I_{\text{Ca}}$ , las curvas de FWHM que se obtienen usando un único coeficiente de difusión,  $D$ , para todas ellas no son tan buenas como las que se obtienen usando un coeficiente diferente para cada una. Estas últimas son las que se muestran en la Fig. 2.4 (A) y corresponden a:  $D = 35, 60$  y  $174 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ,  $I = 0,07; 0,32; 1,85$  pA para las curvas de 400, 900 y 1900 pA, respectivamente. En este caso  $R_f = 1,72 \mu\text{m}$  y las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $I_{\text{Ca}}$  que se obtienen usando la Ec. (2.10) son 0,44; 1,17 y 2,34 pA si  $D_B = 0$  y 0,93; 1,60 y 2,40 si  $D_B = 20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ . Estos últimos valores corresponden a  $\sim 0,23; 0,18$  y  $0,13\%$ , respectivamente, de la corriente ionoforética total.

Usando estos coeficientes de difusión efectivos para las corrientes ionoforéticas respectivas e interpolando los valores linealmente para las corrientes no exploradas en la Fig. 2.4 (A), ajustamos los datos de FWHM en función de la corriente total inyectada que se muestran en la Fig. 2.4 (B). Los ajustes están superpuestos con línea llena sobre los datos experimentales. Los valores obtenidos para la corriente de calcio son del mismo orden de magnitud que los que arroja el ajuste de la Fig. 2.4 (A).



## 2.4 Discusión

Las simulaciones numéricas de la sección 2.2 muestran que, en presencia de una fuente muy localizada, es posible describir el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de buffers como un proceso puramente difusivo, con un coeficiente de difusión único durante un cierto intervalo de tiempo y dentro de un cierto rango de distancias a la fuente.

Los resultados de la sección 2.3 muestran que el modelo sencillo, construido en base a suponer un transporte puramente difusivo para el  $\text{Ca}^{2+}$ , es capaz de reproducir el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  observado en experimentos de puffs sintéticos, pero usando coeficientes de difusión que dependen (en forma creciente) de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto era de esperar, ya que el “re-escalado” que introducen los buffers depende de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , que a su vez es una función creciente de la corriente. Así, la aproximación de un coeficiente de difusión efectivo independiente de la concentración puede utilizarse para obtener estimaciones de los principales parámetros que describen la señal, pero la dependencia explícita con la concentración es necesaria para comparar señales de distintas amplitudes. Este es un problema de este abordaje ya que implica que el modelo tendrá parámetros diferentes dependiendo de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa al citosol. En los próximos capítulos avanzaremos en la obtención de modelos efectivos en los que todos los parámetros, salvo la corriente, sean intrínsecos a la célula (es decir, independientes de la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa al citosol).

Del procedimiento de ajuste de la sección 2.3 pudimos obtener valores razonables para el coeficiente de difusión efectivo,  $D$ ; sin embargo, considerando que el coeficiente libre de difusión de  $\text{Ca}^{2+}$  es  $220 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , y que  $D$  e  $I$  son reescalados por el mismo factor, obtenemos valores muy pequeños para la corriente de calcio: aproximadamente sólo el  $\sim 0,12\%$  de la corriente total inyectada se debe a calcio. Este porcentaje mejora un poco ( $\sim 0,23$ ;  $0,18$  y  $0,13\%$ , respectivamente) si usamos la Ec. (2.10) con  $D_B = 20\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ . Usando los valores de coeficiente de difusión efectivos en simulaciones numéricas que representan un modelado más realista de la señal, obtuvimos mejores estimaciones de la corriente (los ajustes y las estimaciones de la corriente se indican en la Fig. 2.4 (A) con línea punteada). Esto, junto con las comparaciones de la sección 2.2 nos muestran que tal vez las limitaciones del modelo sencillo para describir los experimentos de puffs no se encuentran en la hipótesis de que el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  puede aproximarse por una difusión pura sino en otras de las hipótesis del modelo. En particular, la otra hipótesis

principal del modelo es la de que el colorante y el  $\text{Ca}^{2+}$  libre están localmente en equilibrio en todo instante, de modo que la concentración de colorante ligado a  $\text{Ca}^{2+}$  puede calcularse a través de la Ec. (1.9). Como mostraremos en el Cap. 3, esta hipótesis falla, en el caso de fuentes puntuales, especialmente en la zona que se usa para medir el FWHM (el valor  $r^*$  definido anteriormente). En los próximos capítulos trataremos la interacción con el colorante de otro modo para superar esta limitación.

Este capítulo deja abiertos otros interrogantes. El primero está relacionado a lo que fue la motivación inicial de la técnica de puffs sintéticos: ¿cuándo dos imágenes de fluorescencia pueden considerarse equivalentes?; ¿existe una relación unívoca entre las propiedades de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  y las imágenes que los mismos generan? El segundo es: ¿cómo obtener el valor de la corriente a partir de su valor efectivo? En los próximos capítulos avanzaremos en contestar estas preguntas.

# Capítulo 3

## La aproximación de “buffers” rápidos

### 3.1 Resumen

En este capítulo estudiamos la validez de la aproximación de buffers rápidos. Nos concentramos en dos aspectos. Por un lado, analizamos su aplicabilidad para describir la propagación de ondas de calcio. Por el otro, analizamos las limitaciones de la hipótesis de equilibrio local en presencia de fuentes localizadas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Comenzamos el análisis de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  comparando las escalas temporales presentes en el problema. Luego presentamos una serie de estudios numéricos basados en un modelo preexistente, aunque modificado, de propagación de ondas. Encontramos que las diferencias entre la descripción completa y la *RBA* pueden dar lugar a errores que están por encima de la resolución experimental, aún para buffers relativamente rápidos, en el caso de ondas saltatorias. Contrariamente, en el caso de ondas continuas, la aproximación puede dar resultados adecuados aún para buffers relativamente lentos. Las ondas saltatorias se distinguen de las continuas por el hecho de que aparecen grandes gradientes de  $[\text{Ca}^{2+}]$  debido a la liberación desde sitios localizados. Motivados en esta observación, analizamos a continuación la validez de la hipótesis de equilibrio entre  $\text{Ca}^{2+}$  y buffer cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  ingresa a través de un canal único y obtenemos que la misma no es válida en un amplio rango de distancias a la fuente.

## 3.2 Ondas de calcio

Los mecanismos básicos que intervienen en la generación y propagación de las ondas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  son la liberación desde el lumen del retículo endo o sarcoplasmático a través de canales específicos (receptores de  $\text{IP}_3$  y/o de rianodina) y el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  entre sitios de liberación. Las ondas pueden mantenerse debido al mecanismo de CICR (liberación de calcio inducida por calcio), ya que tanto los receptores de  $\text{IP}_3$  como los de rianodina tienden a abrirse cuando aumenta el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Ahora bien, como dijimos en el capítulo anterior, el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol es a su vez alterado debido a las reacciones que ocurren con los buffers endógenos. Una forma simplificada de incluir estas reacciones es la que corresponde a la aproximación de buffers rápidos. En esta parte del capítulo analizamos las limitaciones de esta aproximación para describir la propagación de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Con este fin usamos el modelo *fire-diffuse-fire* introducido en [Dawson et al., 1999, Keizer et al., 1998]. Si bien se trata de un modelo muy sencillo para el estudio de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ , es capaz de brindar un entendimiento físico de los procesos involucrados. Acá agregamos explícitamente buffers al modelo *fire-diffuse-fire* original y luego realizamos la reducción standard que da lugar a la aproximación de buffers rápidos, para analizar los límites de aplicabilidad de esta última. Por simplicidad, consideramos que hay un solo buffer presente, pero el análisis es válido para casos con más buffers.

### 3.2.1 Modelos matemáticos

La descripción “detallada” de la dinámica en el caso de ondas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  está dada por las Ecs. (1.2)-(1.3) donde  $Q_{Ca}$  representa el flujo de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  ubicados en la membrana del retículo endo o sarco-plasmático (receptores de  $\text{IP}_3$  o de rianodina). Dado que consideramos que hay un solo buffer ( $N = 1$ ), sacamos el subíndice,  $i$ , que los individualiza para simplificar la notación. Para la mayoría de los buffers, es razonable considerar que la recaptura hacia reservorios internos y la pérdida permanente desde los mismos siempre ocurren mucho más lentamente que la reacción con los buffers (ver [De Young and Keizer, 1992] y [Smith et al., 1996]). Así, tal como está hecho en [Dawson et al., 1999], consideraremos  $q_{rem} = 0$ . Despreciando el efecto de bombas, podemos estudiar cómo el “primer” frente de onda se propaga, pero no podemos describir cómo [ $\text{Ca}^{2+}$ ] vuelve a su valor basal o el reingreso de las ondas. Así, nuestro estudio se

concentrará en distinguir si la dinámica del frente es correctamente descrita por la aproximación de buffers rápidos o no.

Siguiendo el modelo del fire-diffuse-fire [Dawson et al., 1999], nos concentramos en soluciones de onda plana y tratamos CICR en forma muy esquemática, considerando que el término de fuente,  $Q_{Ca}$ , es la siguiente suma de contribuciones desde los clusters (o sitios) de canales:

$$Q_{Ca} = \frac{\sigma}{d^2\tau} \sum_{i=-\infty}^{+\infty} \delta(x - x_i) \Theta(t - t_i) \Theta(t_i + \tau - t), \quad (3.1)$$

donde  $\delta$  es la delta de Dirac, los sitios están separados por una distancia  $d$  a lo largo de la dirección de propagación,  $x$  (*i.e.*,  $x_i = id$ ), y  $\Theta(x)$  es la función escalón, definida por  $\Theta(\xi) = 0$  si  $\xi < 0$ , y  $\Theta(\xi) = 1$  en otro caso. Así, el sitio  $i$ -ésimo se “enciende” o “dispara” en el tiempo  $t_i$ , (*i.e.*, empieza la liberación de  $Ca^{2+}$ ) cuando  $[Ca^{2+}]$  en el sitio alcanza por primera vez un valor umbral,  $[Ca^{2+}]_{th}$ . El sitio permanece, entonces, “encendido” durante una cantidad fija de tiempo,  $\tau$ , liberando una cantidad total de iones de  $Ca^{2+}$ ,  $\sigma$  [Dawson et al., 1999]. Es importante notar que los valores de  $t_i$  no son conocidos *a priori*: es la evolución del campo de concentraciones lo que determina esos valores en forma dinámica. Dada una condición inicial, puede no existir un valor finito de  $t_i$  para algunos valores de  $i$ . La no existencia de dicho valor finito implica una falla en la propagación.

Las ecuaciones de evolución pueden reescribirse con un número menor de parámetros libres, introduciendo cantidades adimensionales:  $[Ca^{2+}]_d \equiv d^3 ([Ca^{2+}] - [Ca^{2+}]_b) / \sigma$ ,  $[CaB]_d \equiv ([CaB] - [CaB]_b) / [B]_T$ ,  $T \equiv t / \tau$ , y  $x' \equiv x / d$ . Tomando  $Q_{Ca}$  dada por la Ec. (3.1), obtenemos:

$$\begin{aligned} \frac{\partial [Ca^{2+}]_d}{\partial T} &= -\kappa [Ca^{2+}]_d (1 - [CaB]_d) + \alpha \kappa' [CaB]_d + \beta_{Ca} \nabla'^2 [Ca^{2+}]_d \\ &+ \sum_{i=-\infty}^{+\infty} \delta(x' - i) \Theta(t' - t'_i) \Theta(t'_i + 1 - t') \\ &+ \frac{\kappa}{1 + \frac{\kappa'\phi}{\kappa}} [Ca^{2+}]_d - \frac{\kappa\alpha}{\phi} (1 - [CaB]_d) + \frac{\alpha}{1 + \frac{\kappa'\phi}{\kappa}} \left( \kappa' + \frac{\kappa}{\phi} \right) \quad (3.2) \\ \frac{\partial [CaB]_d}{\partial T} &= \frac{\kappa}{\alpha} [Ca^{2+}]_d (1 - [CaB]_d) - \kappa' [CaB]_d + \beta_B \nabla'^2 [CaB]_d \\ &- \frac{\kappa/\alpha}{1 + \frac{\kappa'\phi}{\kappa}} [Ca^{2+}]_d + \frac{\kappa}{\phi} (1 - [CaB]_d) - \frac{1}{1 + \frac{\kappa'\phi}{\kappa}} \left( \kappa' + \frac{\kappa}{\phi} \right) \quad (3.3) \end{aligned}$$

donde  $\nabla'$  significa que las derivadas son realizadas con respecto a la coordenada adimensional,  $x'$ ;  $t'_i$  es el menor tiempo,  $t'$ , tal que  $[Ca^{2+}]_d(i, t') =$

Tabla 3.1: Parámetros adimensionales del modelo.

---

Parámetros adimensionales

---


$$\Gamma = \frac{\sigma/d^3}{[Ca^{2+}]_{th} - [Ca^{2+}]_b}$$

$$\kappa = k_{on} \tau [B]_T$$

$$\kappa' = k_{off} \tau$$

$$\beta_{Ca} = \frac{\tau D_{Ca}}{d^2}$$

$$\beta_B = \frac{\tau D_B}{d^2}$$

$$\alpha = \frac{[B]_T d^3}{\sigma}$$

$$\phi = \frac{[B]_T}{[Ca^{2+}]_b}$$


---

$d^3([Ca^{2+}]_{th} - [Ca^{2+}]_b)/\sigma \equiv 1/\Gamma$ , y todos los otros parámetros son adimensionales y sus definiciones están dadas en la Tabla 3.1.

### 3.2.2 Métodos numéricos y parámetros de las simulaciones

Simulamos numéricamente las Ecs. (1.2)-(1.3) (*FDF* de ahora en adelante) y la Ec. (1.8) (*RBA* de ahora en adelante) para  $N = 1$ ,  $q_{rem} = 0$  y  $Q_{Ca}$  dado por Ec. (3.1), en una dimensión espacial, usando diferencias finitas tanto en el espacio como en el tiempo, con un tamaño de grilla de  $\Delta x = 0,33\mu m$  y un paso temporal  $\Delta t = 1\mu s$  en la mayoría de los casos. El método es explícito en el tiempo y se ha verificado que el tamaño de los pasos da resultados adecuados, comparando los mismos con aquéllos obtenidos usando pasos más pequeños. En la mayoría de las simulaciones continuas se utiliza un valor mayor de  $\Delta t$ , sin superar nunca  $\Delta t = 100\mu s$ . Se han utilizado condiciones de contorno de

flujo nulo y hay un único buffer por simulación. En las simulaciones se usa  $d = 3,3\mu m$ ,  $\sigma = 3,5 \times 10^{-12}\mu mol$ ,  $D_{Ca} = 220\mu m^2/s$  [Allbritton et al, 1992],  $[Ca^{2+}]_b = 0,05\mu M$ ,  $[Ca^{2+}]_{th} = 0,25\mu M$  y  $[B]_T = 100\mu M$ , a menos que se observe lo contrario.

Repetimos las simulaciones para distintos tipos de buffers, los que listamos en la Tabla 3.2. Uno de los buffers es denominado “tipo-Parvalbúmina” ya que comparte con esa proteína los valores de  $k_{off}$  y  $D_B$ . Para la constante de ligadura,  $k_{on}$ , tomamos un valor particular entre los varios que encontramos en la literatura. Las demás constantes corresponden a valores generalmente aceptados para los buffers BAPTA, Calbindina- $D_{28K}$  y EGTA. De este modo, hemos elegido parámetros que corresponden tanto a buffers rápidos como lentos, y endógenos como exógenos. También hemos explorado otros buffers endógenos, encontrando resultados equivalentes a aquéllos arrojados por buffers exógenos, siempre que las constantes cinéticas fueran similares.

Como condición inicial utilizamos funciones escalón para  $[Ca^{2+}]$  y  $[CaB]$ , de modo que  $[Ca^{2+}](x, t = 0) + [CaB](x, t = 0) = \sigma/d^3 + [Ca^{2+}]_b + [CaB]_b$  para  $x < x^*$  y  $[Ca^{2+}](x, t = 0) = [Ca^{2+}]_b$ ,  $[CaB](x, t = 0) = [CaB]_b$  para  $x > x^*$ , con  $[Ca^{2+}]$  y  $[CaB]$  vinculadas por la condición de equilibrio (1.9) en todos lados, para  $t = 0$ . Esta condición inicial satisface las condiciones de contorno de la solución tipo onda (que viaja hacia la derecha) del modelo completo:  $[Ca^{2+}] \rightarrow [Ca^{2+}]_{left}$  cuando  $x \rightarrow -\infty$  y  $[Ca^{2+}] \rightarrow [Ca^{2+}]_b$  cuando  $x \rightarrow +\infty$ , donde  $[Ca^{2+}]_b$  es el nivel basal de  $Ca^{2+}$  y  $[Ca^{2+}]_{left}$  es la solución de  $[Ca^{2+}]_{left} + [B]_T [Ca^{2+}]_{left} / ([Ca^{2+}]_{left} + K_d) = \sigma/d^3 + [Ca^{2+}]_b + [CaB]_b$ . La condición inicial no es muy importante dado que estamos interesados en la solución de onda asintótica, cuya forma y velocidad deberían ser independientes de dicha condición.

### 3.2.3 Herramientas para el análisis de las simulaciones numéricas

Hay dos cantidades importantes que caracterizan la dinámica del frente. Una de ellas es la velocidad de las ondas,  $v$ , y la otra es el número de sitios que están disparando simultáneamente,  $N$ . Calculamos estas dos cantidades para ambos conjuntos de simulaciones (*FDF* y *RBA*). La velocidad del frente es calculada como  $d/\delta_{t_i}$ , donde  $\delta_{t_i}$  es la diferencia entre los tiempos de activación de sitios ubicados en las posiciones  $i$  e  $i - 1$ , respectivamente. Para un

Tabla 3.2: Parámetros para los buffers de  $\text{Ca}^{2+}$  endógenos y exógenos utilizados en las simulaciones y sus correspondientes tiempos característicos.

Buffer	$k_{on} [\mu M^{-1} s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_d [\mu M]$	$D_B [\frac{\mu m^2}{s}]$	$\tau_R [s]$	$\tau_{D_B} [s]$
EGTA	1,5	0,3	0,20	113	$6,7 \times 10^{-3}$	0,096
tipo-Parvalbúmina	6	1	0,17	36	$1,7 \times 10^{-3}$	0,302
Calbindina-D <sub>28K</sub>	20	8,6	0,43	27	$5,0 \times 10^{-4}$	0,403
BAPTA	600	100	0,17	95	$1,7 \times 10^{-5}$	0,115

determinado conjunto de parámetros y una condición inicial, computamos el error relativo porcentual,  $100 \times (v_{FDF} - v_{RBA})/v_{FDF}$ , entre las velocidades de los dos modelos, para evaluar el comportamiento de la *RBA*.

Para comparar la forma de los frentes obtenidos con ambos modelos, dejamos que los sistemas alcancen la solución asintótica. Tomamos, entonces, un tiempo para ambas simulaciones tal que  $[\text{Ca}^{2+}] = [\text{Ca}^{2+}]_{th}$  en el sitio de liberación. Redefinimos los orígenes de tiempo y espacio fijando  $t = 0$  en aquel instante y  $x = 0$  en aquel sitio particular en ambas simulaciones. Esto nos permite estudiar cómo evolucionan en el tiempo las diferencias entre las dos soluciones.

### 3.2.4 Comparación de escalas temporales y análisis preliminar

Discutimos aquí si las hipótesis de la aproximación de buffers rápidos son correctas en el caso de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para hacer la reducción, primero necesitamos comparar el tamaño de los distintos términos que aparecen en la Ec. (1.2). La aproximación de buffers rápidos vale si  $k_{on}[\text{Ca}^{2+}][B]$  y  $k_{off}[\text{Ca}B]$  son mucho mayores que  $Q_{Ca}$  y  $D_{Ca}\nabla^2[\text{Ca}^{2+}]$ . El problema es que todas estas ecuaciones varían con el tiempo, y sus tamaños relativos pueden cambiar durante la evolución. Consideremos que, inicialmente, hay una distribución



espacialmente uniforme de buffers y  $\text{Ca}^{2+}$ , y que a  $t = 0$  se enciende la fuente  $Q_{\text{Ca}}$ . Consideremos también que la fuente permanece encendida una cantidad finita de tiempo,  $\tilde{\tau}$ , *i.e.*,  $Q_{\text{Ca}} = 0$  para  $t < 0$  y  $t > \tilde{\tau}$ , y  $Q_{\text{Ca}} = F(x)$  para  $0 \leq t \leq \tilde{\tau}$ . Claramente, las concentraciones iniciales deben corresponder a la solución de equilibrio espacialmente uniforme de las Ecs. (1.2)-(1.3). Describiremos en detalle el caso  $[\text{Ca}^{2+}](t = 0) = 0 = [\text{CaB}](t = 0)$ ,  $[B](t = 0) = [B]_T$ . Otros casos pueden ser tratados en forma similar. No consideraremos una fuente puntual sino una fuente que cambia en el espacio en una escala espacial  $\ell$ .

Inmediatamente después de que se apaga la fuente, el único término que es distinto de cero en el miembro derecho de la Ec. (1.2) es  $Q_{\text{Ca}}$ . Entonces, no puede ser despreciado frente a los términos relacionados a la reacción con los buffers (como se hace en [Wagner and Keizer, 1994, Strier and Dawson, 2000]). La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  comenzará, entonces, a cambiar debido a la presencia de esta fuente. Podemos considerar que, por lo menos durante las etapas iniciales,  $[\text{Ca}^{2+}] \sim Ft$ . Así, el término  $k_{on}[\text{Ca}^{2+}]( [B]_T - [\text{CaB}] )$  en la Ec. (1.2) estará dado aproximadamente por  $k_{on}Ft[B]_T$ . Por otro lado, dado que  $F$  depende del espacio, entonces la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  también dependerá del espacio. Esto significa que  $\nabla^2[\text{Ca}^{2+}]$  será distinto de cero. Considerando  $|\nabla^2 F| \sim F/\ell^2$ , podemos estimar el tamaño del término difusivo,  $D_{\text{Ca}}|\nabla^2[\text{Ca}^{2+}]|$ , como  $D_{\text{Ca}}Ft/\ell^2$ . Así, sólo si la escala espacial sobre la cual varía la fuente es lo suficientemente grande, podremos considerar que el término de reacción resulta mayor que el término difusivo luego de que se enciende la fuente. Dicho de otra manera,  $k_{on}[\text{Ca}^{2+}]( [B]_T - [\text{CaB}] ) \sim kFt[B] \gg D_{\text{Ca}}|\nabla^2[\text{Ca}^{2+}]| \sim D_{\text{Ca}}Ft/\ell^2$ , si la escala espacial típica de la fuente,  $\ell$ , satisface  $\ell^2 \gg D_{\text{Ca}}/k_{on}[B]$ . Tomando  $[B] \sim 100\mu\text{M}$ , obtenemos  $\ell \gg 0,33\mu\text{m}$  para Calbindina- $\text{D}_{28\text{K}}$  y  $\ell \gg 0,06\mu\text{m}$  para BAPTA. Esta condición nunca se cumple para un canal único, para el cual el ancho típico del poro es del orden de algunos Amstrongs [Hille, 2001]. Los eventos elementales que eventualmente dan lugar a señales globales, pueden deberse a la apertura coordinada de varios canales en un cluster [Parker et al., 1997, Callamaras and Parker, 2000]. Así, si despreciamos las pequeñas diferencias en los tiempos de apertura de los canales individuales que se abren dentro de un cluster, podemos considerar  $\ell$  como la escala espacial típica de un cluster, que ha sido estimada en 60nm en [Swillens et al., 1999]. Este número es aún demasiado pequeño. Así, inmediatamente después de que una de estas fuentes se enciende, la difusión actúa en una escala temporal más rápida que la de reacción con los buffers, y entonces la aproximación de buffers rápidos no puede ser aplicada. Esperamos, luego, que la aproximación de buffers rápidos falle en el caso de *ondas saltatorias*, para las cuales la liberación desde sitios individuales

es fácilmente observable. En el caso de *ondas continuas*, como la onda de fertilización en un huevo maduro [Nuccitelli, 1994], donde canales de varios clusters están liberando simultáneamente iones de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol [Dawson et al., 1999], podemos considerar que la escala espacial  $\ell$  es el tamaño típico de la región que tiene canales abiertos simultáneamente. En el caso de la onda de fertilización, este tamaño está dado por el ancho del frente de onda, que está estimado en  $47\mu\text{m}$  [Dawson et al., 1999]. Así, para esta situación, podemos considerar que los términos relacionados a la reacción con los buffers se hacen mayores que los términos de difusión, inmediatamente después de abiertos los canales, de modo que pueden ser tratados como actuando en una escala temporal más rápida. Tal como se mencionó anteriormente, la ecuación resultante (Ec. (1.8)) puede reescribirse en términos del coeficiente de difusión efectivo de la Ec. (1.14). Este coeficiente de difusión dependiente de la concentración tiende a generar frentes más pronunciados [Sneyd et al., 1998], *i.e.*, mayores gradientes de concentración, que los del caso equivalente con coeficiente constante. Así, la validez de la aproximación de buffers rápidos debe ser reanalizada una vez que se ha obtenido la solución en este caso.

Concluimos, entonces, que la aproximación de buffers rápidos puede dar lugar a una descripción incorrecta de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, especialmente en el caso saltatorio, para el cual la liberación desde regiones muy localizadas es notoria. En las secciones siguientes presentamos los resultados de varias simulaciones numéricas con las cuales analizamos las limitaciones de esta aproximación.

### 3.2.5 Resultados numéricos: análisis en términos de variables con dimensiones

Presentamos aquí los resultados obtenidos con simulaciones numéricas de los modelos *FDF* y *RBA*. En primer lugar nos concentramos en cómo las diferencias entre ambos modelos dependen de las relaciones entre las escalas temporales relevantes del problema. Podemos distinguir cuatro escalas temporales en la descripción completa: una asociada a la fuente,  $\tau$ , una asociada a las reacciones,  $\tau_R$ , y dos asociadas a la difusión,  $\tau_{D_{Ca}} = d^2/D_{Ca}$  and  $\tau_{D_B} = d^2/D_B$ . La definición de una escala temporal de difusión depende de la elección de una escala espacial. Hemos elegido dicha escala espacial como la distancia entre sitios,  $d$ . La limitación de esta definición se hará evidente más adelante. Una escala temporal adecuada asociada a la reacción con el buffer,  $\tau_R$ , se puede obtener linealizando los términos correspondientes alrededor de

la solución de equilibrio, como en [Wagner and Keizer, 1994]. Siguiendo este procedimiento se llega a  $\tau_R = 1/(k_{off} + k_{on}([Ca^{2+}] + [B]))$ . Dado que la concentración de buffer es alta comparada con  $[Ca^{2+}]$ , podemos despreciar la dependencia con la concentración de  $Ca^{2+}$  y definir  $\tau_R = 1/(k_{off} + k_{on}[B])_T$ . Esto es suficientemente bueno para nuestros propósitos, y simplifica el análisis. Limitaremos nuestro estudio a casos en los cuales  $\tau_R < \tau_{D_{Ca}} < \tau_{D_B}$ . El hecho de que  $\tau_{D_{Ca}} < \tau_{D_B}$  es una consecuencia de  $D_B < D_{Ca}$ . Esta condición es físicamente razonable dado que los iones de  $Ca^{2+}$  son más pequeños y livianos que las moléculas de buffer. Por lo tanto, variando  $\tau$  en las simulaciones, podemos explorar los siguientes regímenes:

$$\begin{aligned} \text{(I)} \quad & \tau < \tau_R < \tau_{D_{Ca}} < \tau_{D_B}; & \text{(II)} \quad & \tau_R < \tau < \tau_{D_{Ca}} < \tau_{D_B}; \\ \text{(III)} \quad & \tau_R < \tau_{D_{Ca}} < \tau < \tau_{D_B}; & \text{(IV)} \quad & \tau_R < \tau_{D_{Ca}} < \tau_{D_B} < \tau. \end{aligned} \quad (3.4)$$

Los primeros dos casos corresponden a comportamientos saltatorios, y los dos últimos, a comportamientos continuos. Que  $\tau_R$  sea la escala temporal más pequeña del problema es una condición necesaria para poder sostener la aproximación de buffers rápidos. Así, no esperamos que la aproximación funcione adecuadamente para el caso (I).

En la Fig. 3.1 mostramos el error relativo porcentual,  $100 \times (v_{FDF} - v_{RBA})/v_{FDF}$ , en función de  $\tau$  para los cuatro buffers de la Tabla 3.2. Los otros tiempos característicos,  $\tau_R$ ,  $\tau_{D_B}$ , y  $\tau_{D_{Ca}}$ , están indicados en las figuras. Podemos observar que los errores mayormente decrecen cuando  $\tau$  crece, aún cuando las curvas no presentan un comportamiento monótono para EGTA o Calbindina-D<sub>28K</sub>. En líneas generales, vemos que los errores aumentan cuando la escala temporal asociada a la reacción,  $\tau_R$ , aumenta, aunque el error para Parvalbúmina es levemente mayor que el correspondiente a EGTA para valores pequeños de  $\tau$ . En el caso de Calbindina-D<sub>28K</sub>, el error decrece notablemente para algún valor de  $\tau$  que es algo menor que un orden de magnitud más chico que  $\tau_R$ . A pesar de esta caída, permanece relativamente alto ( $\sim 20\%$ ) aún para  $\tau \gg \tau_R$ . En (A)–(C) el error cae abruptamente (a un valor muy bajo) cuando  $\tau$  se hace mayor que los tiempos de difusión entre sitios,  $\tau_{D_{Ca}}$  y  $\tau_{D_B}$ . Para el buffer más rápido, BAPTA, el error está alrededor del 30% para  $\tau = \tau_R$  y cae debajo del 10% cuando  $\tau$  se hace un orden de magnitud mayor que  $\tau_R$ . Como en el caso de Calbindina-D<sub>28K</sub>, para valores altos de  $\tau$ , el error permanece en un nivel que es relativamente insensible a cambios en  $\tau$ , hasta que  $\tau$  se hace mayor que  $\tau_{D_{Ca}}$  y  $\tau_{D_B}$ , situación para la cual el error pasa a ser despreciable.

Tal como se discute en [Dawson et al., 1999], la relación entre  $\tau$  y el tiempo de difusión entre sitios controla si la propagación es saltatoria o con-

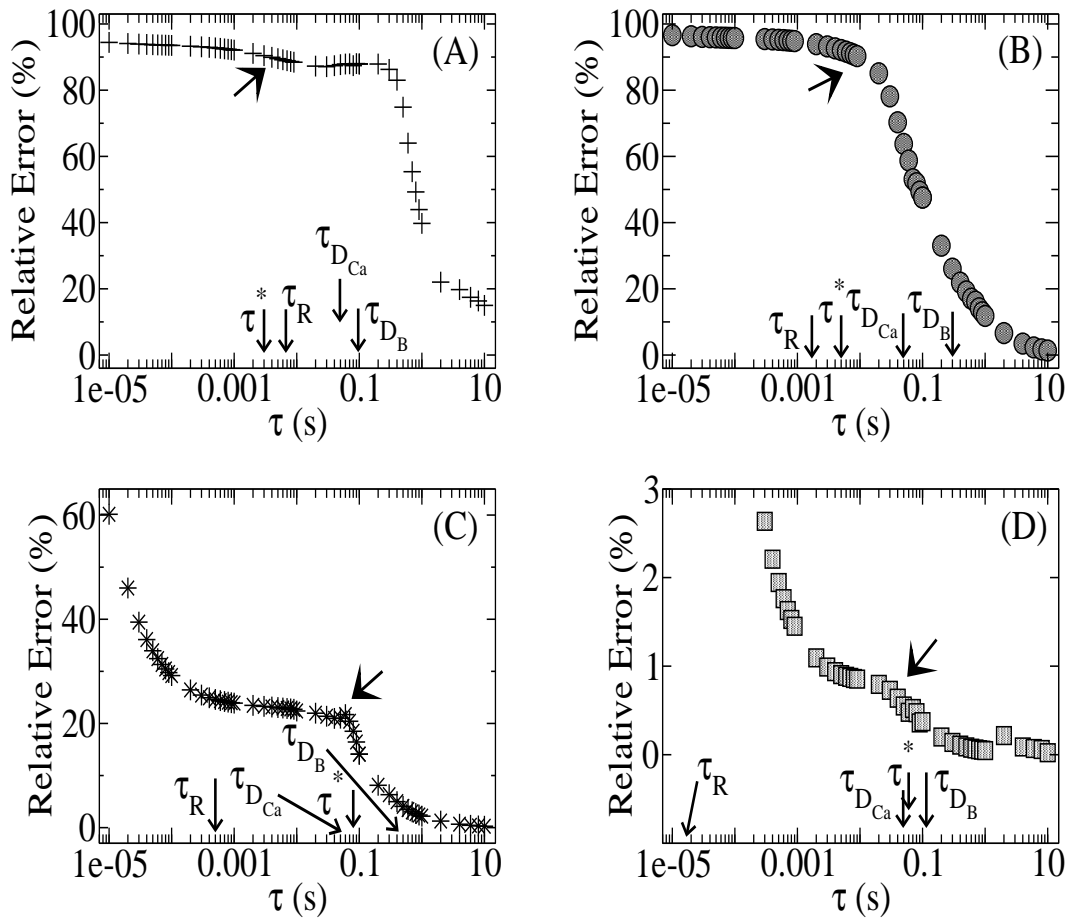


Figura 3.1: Error relativo porcentual entre los modelos *FDF* y *RBA*, en función de  $\tau$ , para los cuatro buffers de la Tabla 3.2: EGTA (A), tipo-Parvalbúmina (B), Calbindina- $D_{28K}$  (C) y BAPTA (D). Las escalas temporales relevantes, además de  $\tau$ , están indicadas como  $\tau_R$ ,  $\tau_{D_{Ca}}$  y  $\tau_{D_B}$ . La flecha grande señala el menor valor de  $\tau$  en la simulación *FDF*,  $\tau^*$ , para el cual hay por lo menos dos sitios disparando simultáneamente durante la propagación de la onda. Los valores de los parámetros están dados en el texto principal.

tinua. Las ondas saltatorias y continuas están caracterizadas por tener diferente número de sitios disparando simultáneamente. Las flechas grandes en la Fig. 3.1 señalan el menor valor de  $\tau$  para el cual hay (en la simulación del modelo *FDF*) por lo menos dos sitios disparando en forma simultánea en el frente. Llamamos  $\tau^*$  a este valor de  $\tau$ . En el Apéndice de este capítulo presentamos una estimación analítica de  $\tau^*$ . Existe un cambio de comportamiento en el error, asociado a esta transición, *i.e.*, cuando hay un salto desde la “dimensión de fuente puntual” ( $\ell \sim 0$ ) a la distancia intersitios ( $\ell \sim d$ ). Esto también muestra que, para propagación muy saltatoria, los tiempos de difusión que deben ser comparados con  $\tau_R$  son más pequeños que  $\tau_{D_{Ca}}$  y  $\tau_{D_B}$ . Así, aún si  $\tau_R < \tau_{D_{Ca}}, \tau_{D_B}$ , la *RBA* puede no ser una buena aproximación. Cuando el número de sitios que disparan simultáneamente aumenta, la escala espacial relevante pasa de ser casi 0 a ser  $d$ , y los tiempos de difusión que deben ser comparados con  $\tau_R$  pasan a ser  $\tau_{D_{Ca}}$  y  $\tau_{D_B}$ . De la Fig. 3.1 podemos concluir que, a menos que exista una separación muy grande entre  $\tau_R$  y las otras escalas temporales (como en el caso de *BAPTA*), la señal necesita volverse más o menos continua para garantizar que la *RBA* provea una buena descripción. Sorprendentemente, se puede observar una caída abrupta en el error también en el caso de los buffers más lentos ((A) y (B)). Sin embargo, en el caso de *EGTA*, (Fig. 3.1 (A)), ocurre para un valor mayor del cociente entre  $\tau$  y los tiempos de difusión que para los otros buffers. El perfil del frente en este caso indica que aún para  $\tau = 0,1s > \tau^*$ , los sitios individuales de liberación son fácilmente distinguibles: la concentración de calcio está más o menos localizada alrededor de los sitios de disparo y, aunque hay varios sitios activos, la propagación no luce continua. La señal no está desparramada suavemente en el espacio y estos gradientes importantes son los que provocan diferencias entre las predicciones de ambos modelos, como describiremos más adelante. Entonces, no es sólo el número de sitios que disparan en forma simultánea lo que marca la transición a que la *RBA* resulte una mejor aproximación, sino la “continuidad” o “discretitud” espacial de la señal, lo cual está también determinado por  $\tau_{D_{Ca}}$  y  $\tau_{D_B}$ . Comparando los cuatro buffers de la Fig. 3.1, podemos concluir que, si  $\tau^* \gg \tau_R$ , el valor  $\tau = \tau^*$  da una buena estimación del punto para el cual ocurre la transición hacia una propagación más continua o, equivalentemente, para el cual el error de *RBA* cae abruptamente. Para los buffers más lentos para los cuales la condición  $\tau^* \gg \tau_R$  no vale, el error de *RBA* puede llegar a ser muy pequeño si  $\tau$  es mucho mayor que las otras escalas temporales, incluida  $\tau_{D_B}$ .

Para explorar más profundamente las razones por las cuales mejora la aproximación de buffers rápidos cuando se cruza el valor  $\tau = \tau^*$ , comparamos en la Fig. 3.2 los frentes que obtenemos con ambos modelos para tres

valores de  $\tau$ . Los parámetros utilizados para las simulaciones son los mismos que los de la Fig. 3.1 (C) (Calbindina- $D_{28K}$ ), excepto por  $[B]_T = 170\mu M$  y  $[Ca^{2+}]_{th} = 0,07\mu M$ , para los cuales  $\tau^* = 0,06s$ . Incluimos en la Fig. 3.2 (A) un gráfico del error en función de  $\tau$ , donde los valores utilizados para las simulaciones en (B-E) están indicados con recuadros. Mostramos en la Fig. 3.2 (B-E) los perfiles obtenidos con los modelos *FDF* (líneas llenas) y *RBA* (líneas cortadas) para tres tiempos durante la evolución, usando  $\tau = 0,03s$  (B-C),  $\tau = 0,1s$  (D) y  $\tau = 10s$  (E). Los valores de  $\tau$  elegidos corresponden a errores decrecientes de la *RBA* desde (B-C) hacia (E) (ver Fig. 3.2 (A)). En todos los casos las líneas punteadas corresponden a los perfiles para  $t = 0$ , cuando  $[Ca^{2+}](x = 0, t = 0) = [Ca^{2+}]_{th}$ , para ambas simulaciones (*FDF* y *RBA*). Los dos tiempos siguientes están indicados como  $t_1$  and  $t_2$ . Vemos en (D) que a  $t = 0$  el frente dado por *RBA* es más abrupto que el dado por *FDF*. Algo similar ocurre en (B), aunque no puede observarse dada la resolución de la figura. En (B) y (D) vemos que a  $t = t_1$  (inmediatamente después de que se enciende la fuente), el pico de concentración es más alto para el modelo *FDF* que para *RBA*. Esto se debe a que el modelo *FDF* tiene un tiempo asociado a buffers que es finito. Eventualmente *RBA* “alcanza” a *FDF*. Cuando los sitios dejan de liberar  $Ca^{2+}$ , la señal se esparce sobre una región más ancha en *FDF* que en *RBA*. Esto se hace evidente en tiempos posteriores, como  $t_2$ , en la Fig. 3.2 (B). Este comportamiento, junto con la existencia de un frente más abrupto para *RBA* a  $t = 0$ , puede ser interpretado en términos del coeficiente de difusión efectivo definido en la Ec. (1.14). De acuerdo con esa ecuación,  $Ca^{2+}$  difunde más rápido en regiones de mayor  $[Ca^{2+}]$ , lo que provoca frentes más abruptos que los que aparecerían si la difusión fuera igual en todos los lados. Así, *RBA* tiende a generar frentes más abruptos que los que se obtienen con el modelo completo. Estos frentes corresponden a mayores gradientes de concentración, que hacen que el modelo *RBA* funcione peor. En el caso de propagación muy saltatoria (B), esta diferencia en la inclinación del frente resulta en una diferencia apreciable entre los intervalos de tiempo que separan dos disparos sucesivos en los modelos *RBA* y *FDF*: mientras que para  $t_2$  el sitio en  $x \approx 3\mu m$  ya está disparando de acuerdo a *FDF*, no ha empezado aún a disparar según *RBA*. Esto da lugar a errores en la propagación de la onda que resultan en frentes que se separan al transcurrir el tiempo, como se muestra en Fig. 3.2 (C), donde graficamos los frentes que predicen *FDF* y *RBA* para tiempos muy posteriores. Cuando la propagación se hace más continua, los frentes comienzan a comportarse en forma similar, como se observa comparando las Figs. 3.2 (B) y (D). Aunque en la Fig. 3.2 (D), para  $t = t_2$ , el sitio en  $x \approx 3\mu m$  está disparando según *FDF* mientras que, de acuerdo a *RBA* está a punto de empezar a hacerlo, la concentración pico para  $x \approx 3\mu m$  es más pequeña que en la Fig. 3.2 (B). Así, la diferencia en-

tre ambas simulaciones en este caso es menor que en la Fig. 3.2 (B). En el ejemplo de la Fig. 3.2 (D), el segundo sitio empieza a disparar antes de que el primero haya dejado de hacerlo, y el gradiente en el sitio que alcanza el umbral es levemente menor que en (B). Finalmente, en el caso muy continuo, las diferencias entre *RBA* y *FDF* son imperceptibles, como se muestra en la Fig. 3.2 (E), donde se grafican las soluciones de ambos modelos para tres tiempos, siendo imposible distinguirlas.

De esta discusión podemos concluir que el error en *RBA* es mayormente sensible a la escala espacial típica sobre la que hay liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Hay otros parámetros, además de  $\tau$ , que también afectan el modo en el cual el frente se esparce en el espacio. Entre ellos, la relación entre el coeficiente de difusión efectivo de  $\text{Ca}^{2+}$  y la tasa a la cual los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  son inyectados en el citosol,  $\sigma/\tau$ . El número de sitios que disparan simultáneamente también depende del valor umbral para el disparo,  $[\text{Ca}^{2+}]_{th}$ . En la Fig. 3.3 analizamos el efecto de estos parámetros, graficando el error relativo porcentual en función de  $\tau$ , para simulaciones realizadas con las constantes de reacción de Calbindina- $\text{D}_{28K}$  y varios valores de  $\sigma$  ((A) y (E)),  $D_{Ca}$  (B),  $D_B$  (C),  $[\text{Ca}^{2+}]_{th}$  (D) y  $[B]_T$  (F). En las figuras en las cuales el parámetro correspondiente no fue variado, utilizamos  $\sigma = 3,5 \times 10^{-12} \mu\text{mol}$ ,  $D_{Ca} = 220 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $D_B = 27 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_{th} = 0,25 \mu\text{M}$  y  $[B]_T = 100 \mu\text{M}$ , excepto para (D), para el cual usamos  $\sigma = 5,5 \times 10^{-12} \mu\text{mol}$ . Las escalas temporales de reacción en las Figs. 3.3 (A)-(D) son las mismas que en la Fig. 3.1 (C).

En la Fig. 3.3 (A) mostramos cómo se ve afectado el error por el número total de iones liberados en un sitio,  $\sigma$ . En este caso, los tiempos característicos de difusión son los mismos que los de la Fig. 3.1 (C). Vemos que, para un dado valor de  $\tau$ , el error aumenta cuando  $\sigma$  aumenta. Esto puede asociarse al hecho de que se generan mayores gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  cerca de una fuente encendida si un número mayor de iones son liberados durante la misma cantidad de tiempo ( $\tau$ ). Mayores gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  implican que el “desparramo” difusivo del  $\text{Ca}^{2+}$  es mayor que la tasa a la cual el  $\text{Ca}^{2+}$  es consumido por la reacción con el buffer, rompiendo así la hipótesis básica de la aproximación de buffers rápidos. Esto parece contradecir algunos de los resultados reportados en [Smith et al., 1996]. En la última sección discutiremos cómo conciliar ambos conjuntos de observaciones. En la Fig. 3.3 (A) también observamos que  $\tau^*$  decrece cuando aumenta  $\sigma$ . Esto es razonable dado que un mayor valor de  $\sigma$  implica mayor  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el medio, lo cual, para un umbral fijo,  $[\text{Ca}^{2+}]_{th}$ , permite que los sitios disparen simultáneamente para valores de  $\tau$  menores. Correlacionado con este comportamiento, el valor de  $\tau$  para el cual el error cae abruptamente también decae al aumentar  $\sigma$ . También observamos que

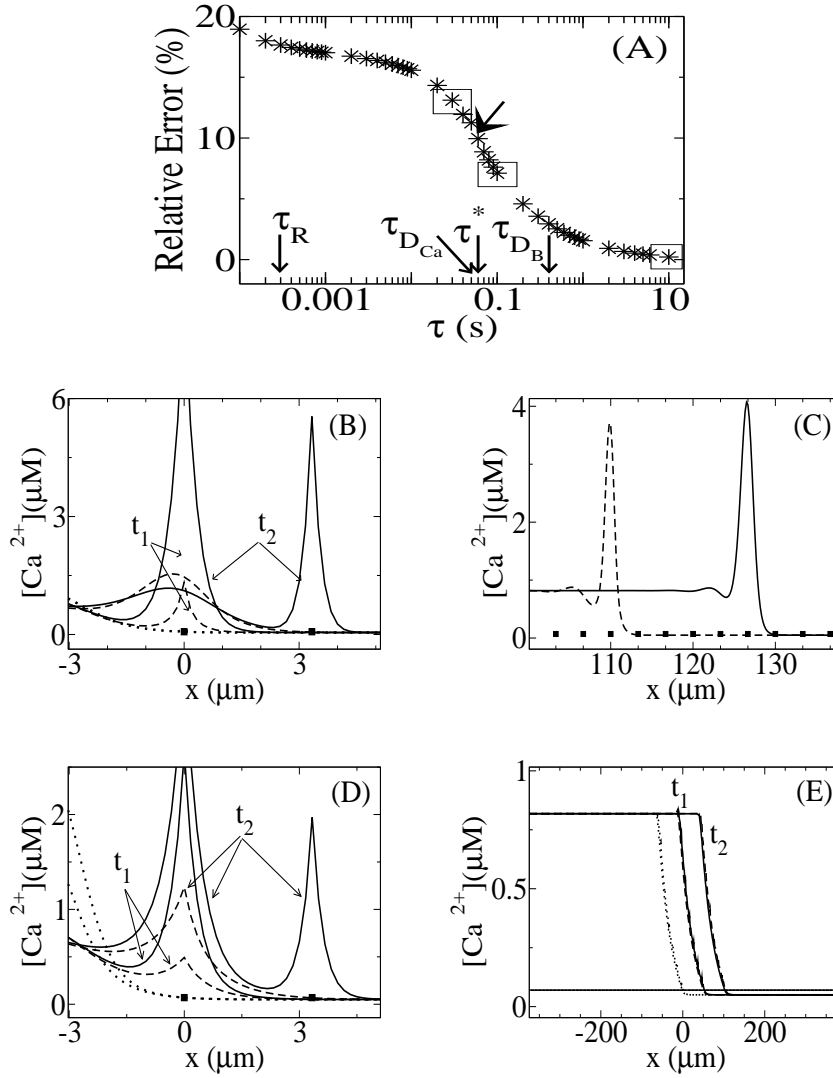


Figura 3.2: Comparación de los perfiles obtenidos con los modelos *FDF* (curva llena) y *RBA* (curva cortada) (B-E) para Calbindina- $D_{28K}$  con los mismos parámetros de la Fig. 3.1 (C), excepto por  $[B]_T = 170\mu M$  y  $[Ca^{2+}]_{th} = 0,07\mu M$ ; y error relativo porcentual en función de  $\tau$  para los mismos parámetros (A).  $\tau = 0,03s$  (B-C),  $\tau = 0,1s$  (D) y  $\tau = 10s$  (E). En todos los casos la línea punteada corresponde a los perfiles a  $t = 0$ . Los otros tiempos graficados son:  $t_1 = 0,020s$ ,  $t_2 = 0,166s$  (B);  $t = 22s$  (C);  $t_1 = 0,120s$ ,  $t_2 = 0,336$  (D) y  $t_1 = 68s$ ,  $t_2 = 136s$  (E). Los cuadrados en (B-E) representan los sitios de liberación. Los recuadros en (A) corresponden a los valores de los parámetros en las simulaciones (B-E).



cuando  $\tau$  es mayor que los tiempos característicos de difusión, el error se vuelve prácticamente independiente de valor de  $\sigma$ .

En la Fig. 3.3 (B) mostramos cómo el error se ve afectado por la tasa a la cual difunde el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $D_{Ca}$ . Esto no es simplemente un ejercicio matemático (el cual, con todo, proporciona información sobre la física del problema). Desde el punto de vista biológico, tener un valor diferente de  $D_{Ca}$  puede asociarse con el efecto de otros buffers que no han sido incluidos explícitamente en el modelo. En la Fig. 3.3 (B) podemos ver que, para un valor dado de  $\tau$ , el error aumenta cuando  $D_{Ca}$  aumenta. Esto resulta razonable dado que al aumentar  $D_{Ca}$  disminuye el tiempo característico de difusión, haciéndolo cercano al asociado con la reacción. Sin embargo, el error puede ser considerablemente grande aún cuando  $\tau_R \ll \tau_{D_{Ca}} < \tau$ . En esta figura,  $\tau_{D_{Ca}}$  es 0,218s para la curva inferior, 0,049s para la del medio y 0,036s para la superior, mientras que  $\tau_R = 5 \times 10^{-4}s$ . Como se esperaba, el valor de  $\tau^*$  decrece cuando  $D_{Ca}$  aumenta (dado que un valor mayor de  $D_{Ca}$  favorece el hecho de que varios sitios disparen simultáneamente). Consecuentemente, el valor de  $\tau$  para el cual el error cae abruptamente también decrece al aumentar  $D_{Ca}$ . Así, el aumento de  $D_{Ca}$  juega un rol dual: vuelve menos confiable la *RBA* porque hace que el tiempo característico de difusión sea menor y más cercano al asociado a la reacción; sin embargo, al mismo tiempo facilita el hecho de que varios sitios disparen en forma simultánea, lo cual mejora la capacidad predictiva de la *RBA*. Como en el caso anterior, cuando la *RBA* comienza a funcionar, el error se vuelve independiente del valor de  $D_{Ca}$ .

En la Fig. 3.3 (C) mostramos cómo el error es afectado por la tasa a la cual difunde el buffer,  $D_B$ . Contrariamente al caso de  $D_{Ca}$ , dado un valor de  $\tau$ , el error decrece cuando  $D_B$  crece (si  $D_B < D_{Ca}$ ). Esto ocurre porque el aumento de  $D_B$  tiende a homogeneizar las distribuciones, suavizando gradientes pronunciados y favoreciendo la existencia de frentes espacialmente esparcidos, sin afectar el tamaño relativo de los distintos términos involucrados en la ecuación de evolución para  $[\text{Ca}^{2+}]$  (como sí hace  $D_{Ca}$ ).  $\tau_{D_B}$  vale 0,054s para la curva inferior, 0,403s para la del medio y tiende a infinito para la superior. Contrariamente al caso anterior, cuando la aproximación comienza a funcionar, el error pasa a ser más sensible al valor de  $D_B$ .  $\tau^*$  decrece cuando  $D_B$  aumenta, por las mismas razones por las cuales decrece cuando  $D_{Ca}$  aumenta.

En la Fig. 3.3 (D) mostramos cómo el error se ve afectado por la concentración umbral para el disparo,  $[\text{Ca}^{2+}]_{th}$  (*i.e.*, la excitabilidad del medio). En este caso, para un dado valor de  $\tau$ , el error decrece cuando  $[\text{Ca}^{2+}]_{th}$  aumenta.

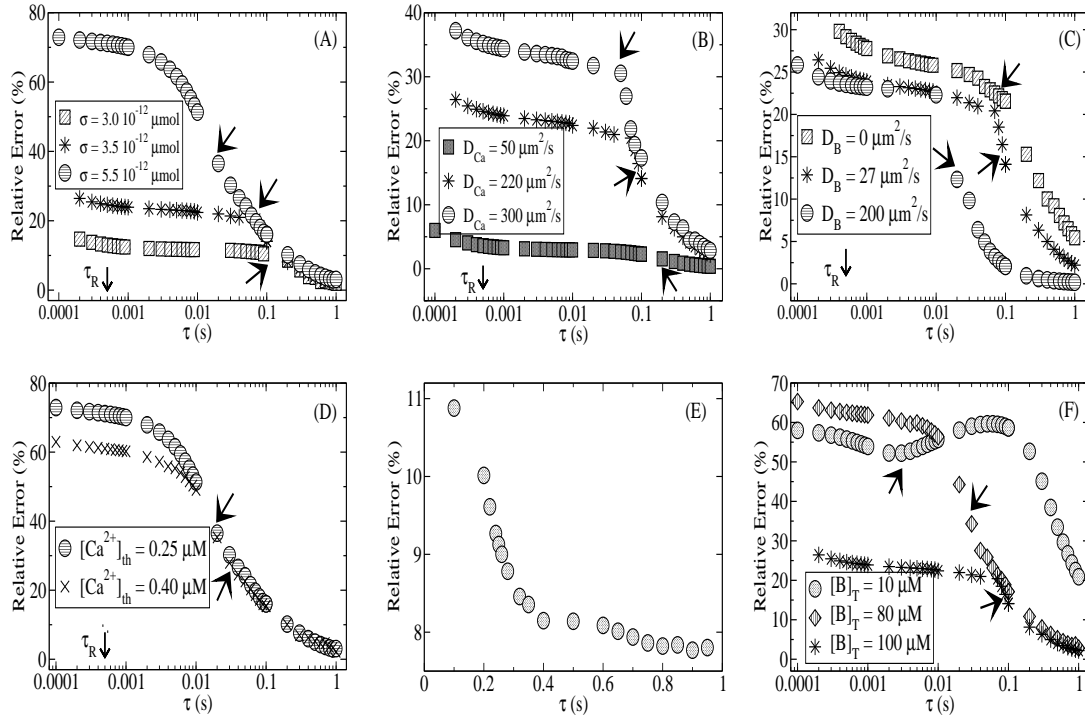


Figura 3.3: Error relativo porcentual entre los modelos *FDF* y *RBA* en función de distintos parámetros:  $\sigma$  (A),  $D_{Ca}$  (B),  $D_B$  (C),  $[Ca^{2+}]_{th}$  (D),  $\tau$  y  $\sigma$  cuando  $\sigma/\tau$  es constante (E) y  $[B]_T$  (F). Todas las simulaciones fueron realizadas con Calbindina- $D_{28K}$  como único buffer. Para más detalles, ver texto principal.

Un mayor valor de  $[Ca^{2+}]_{th}$  implica que le costará más a una señal que empiece en un sitio particular, “encender” el sitio siguiente. Esto puede resultar en un gradiente de  $[Ca^{2+}]$  menor, mejorando entonces el funcionamiento de la *RBA*. Como se muestra en la sección siguiente, introducir parámetros adimensionales brinda un mejor entendimiento de por qué el error decrece al aumentar  $[Ca^{2+}]_{th}$ . Como se esperaba, el valor de  $\tau^*$  aumenta con  $[Ca^{2+}]_{th}$ . Como en (A) y (B), el error se hace insensible a  $[Ca^{2+}]_{th}$  cuando la aproximación funciona.

La cantidad  $\tau$  está involucrada en dos parámetros que tienen un claro significado físico: la tasa a la cual son inyectados los iones de  $Ca^{2+}$ ,  $\sigma/\tau$ , y el tiempo durante el cual un sitio permanece abierto,  $\tau$ . Aumentar la tasa de inyección dejando fijo el tiempo de apertura, es equivalente a aumentar  $\sigma$ , algo que se ilustra en el Fig. 3.3 (A). Como se esperaba, esto vuelve menos confiable a la *RBA*. Ahora, el hecho de que los errores de la *RBA* decrezcan sistemáticamente cuando  $\tau$  aumenta, puede estar vinculado a una tasa de inyección menor o a un mayor tiempo de apertura. En realidad, ambos cambios pueden mejorar la aproximación: un valor menor de  $\sigma/\tau$  permite que el buffer alcance el equilibrio con  $Ca^{2+}$  más fácilmente, mientras que una duración mayor facilita el hecho de haya varios sitios disparando simultáneamente. Para poder distinguir entre estas dos situaciones, en la Fig. 3.3 (E) comparamos una serie de simulaciones realizadas variando tanto  $\sigma$  como  $\tau$ , pero de modo que  $\sigma/\tau = 30 \times 10^{-12} \mu mol/s$  para todas las simulaciones. Podemos observar que *RBA* mejora cuando la duración de la liberación aumenta, aún cuando hay un único sitio disparando. Esto está de acuerdo con las observaciones reportadas en [Smith et al., 1996] sobre la validez de la aproximación de buffers rápidos en presencia de una única fuente puntual, como se discute en la última sección.

Finalmente, en la Fig. 3.3 (F) estudiamos cómo se ve afectado el error por la concentración total de buffer,  $[B]_T$ . Vemos que el error varía en forma no monótona con  $[B]_T$ : cuando la propagación es muy saltatoria, el error es mayor para  $[B]_T = 80 \mu M$  que para  $[B]_T = 10 \mu M$  ó  $[B]_T = 100 \mu M$ . Discutimos este comportamiento más adelante. También vemos que  $\tau^*$  aumenta con  $[B]_T$ . Esto puede entenderse de la siguiente manera. Al aumentar  $[B]_T$  aumenta el peso relativo de  $D_B$  con respecto a  $D_{Ca}$  en la determinación de la tasa efectiva a la cual difunden los iones de  $Ca^{2+}$  (ver Ec. (1.14)). Como  $D_B < D_{Ca}$ , aumentar  $[B]_T$  hace que disminuya el coeficiente efectivo de difusión de  $Ca^{2+}$ , favoreciendo de esta manera la propagación saltatoria sobre la continua, lo cual se refleja en un valor mayor de  $\tau^*$ . Finalmente, podemos observar que, para propagación más continua, (valores mayores de  $\tau$ ) el error es

una función monótonamente decreciente de  $[B]_T$ . Como discutimos después, esto es así porque en este régimen el modo en el cual el error se comporta con los distintos parámetros está dominado por cómo éstos afectan el gradiente de concentración (con el error decreciendo a medida que los gradientes se suavizan).

### 3.2.6 Resultados numéricos: análisis en términos de parámetros adimensionales

Aunque intuitiva, la discusión en la sección anterior tiene la complicación del alto número de parámetros que afectan el comportamiento de la *RBA*. Así, resulta difícil explorar el espacio de parámetros para determinar la región de validez de la aproximación. Por otro lado, el mismo parámetro puede tener diferentes efectos dependiendo de los valores de los demás parámetros. Para trabajar con un número mínimo de parámetros, decidimos introducir cantidades adimensionales y replantear la discusión sobre la validez de la *RBA* en términos de un conjunto menor de parámetros (adimensionales). Este nuevo planteo nos permite obtener resultados que son independientes del buffer particular que fue utilizado en la simulación. También nos permite entender cómo las combinaciones de parámetros, que en general tienen un significado físico, afectan la validez de *RBA*. En términos de variables adimensionales, las soluciones de onda que viajan hacia la derecha satisfacen:  $[Ca^{2+}]_d + \alpha[CaB]_d \rightarrow 1$ , cuando  $x \rightarrow -\infty$  y  $[Ca^{2+}]_d \rightarrow 0$  cuando  $x \rightarrow \infty$ . Entonces, estas soluciones quedan caracterizadas por los siete parámetros de la Tabla 3.1.

Algunos de los parámetros adimensionales son cocientes de tiempos característicos con respecto a  $\tau$ .  $\beta_{Ca}$  y  $\beta_B$  son tasas de difusión adimensionales de  $Ca^{2+}$  y de buffer, respectivamente.  $\kappa$  y  $\kappa'$  son tasas de reacción adimensionales, a partir de las cuales es posible definir, como antes, un tiempo característico asociado a la reacción, adimensional,  $\tau'_R = 1/(\kappa + \kappa')$ . Variando dos de estos tiempos característicos adimensionales, podemos explorar los regímenes (II)–(IV) definidos en la Ec. (3.4), visualizando los errores en un único gráfico bidimensional. Dado que se espera que la *RBA* no funcione en el régimen (I), este modo de analizar el problema brinda una descripción completa de los casos para los cuales el rango de validez de la *RBA* no es conocida *a priori*. Mostramos este gráfico en la Fig. 3.4 (A), donde el error relativo porcentual está graficado usando una escala de colores, en función de  $\beta_{Ca}$  y  $\beta_B$ . Hay tres curvas superpuestas a la figura:  $\beta_{Ca} = 1$ ,  $\beta_B = 1$  y

$\beta_{Ca} = \beta_B$ . Estas curvas dividen el plano  $\beta_{Ca} - \beta_B$  en regiones que corresponden a diferentes regímenes en la Ec. (3.4), como se indica en la figura. Tal como se ha explicado, sólo las regiones sobre la curva  $\beta_{Ca} = \beta_B$  poseen significado fisiológico. Por otro lado, como  $\tau'_R = 5 \times 10^{-3}$  para esta figura, el tiempo característico asociado a la reacción es, por lo menos, dos órdenes de magnitud menor que las otras escalas temporales. Dado que  $\Gamma$ ,  $\kappa$ ,  $\kappa'$ ,  $\alpha$  y  $\phi$  permanecen constantes en esta figura, este plano  $\beta_{Ca} - \beta_B$  sólo da lugar a comparaciones entre buffers con la misma constante de disociación,  $K_d = k_{off}/k_{on}$ .

Movernos en la Fig. 3.4 (A) a través de una línea horizontal de izquierda a derecha, es equivalente a aumentar  $D_B$ , dejando fijos los demás parámetros. Podemos observar que el error se hace más pequeño, siempre que se permanezca dentro de la región con significado fisiológico,  $\beta_{Ca} > \beta_B$ . Movernos a lo largo de una línea vertical, desde abajo hacia arriba, corresponde a aumentar  $D_{Ca}$ . Podemos ver que el error aumenta. Así, si nos movemos a lo largo de una línea recta de la forma  $\beta_{Ca} = m\beta_B$ , con  $m > 0$ , el error puede aumentar o disminuir, dependiendo del valor de  $m$ . Más aún, puede presentar un comportamiento no monótono dependiendo de  $m$ , como se indica en la Fig. 3.4 (B). Aumentar  $\tau$  dejando fijos los demás parámetros, es de algún modo similar a moverse a lo largo de una línea recta con  $m = D_{Ca}/D_B > 1$ . Si tomamos  $D_B$  igual al coeficiente de difusión de Calbindina- $D_{28K}$ , por ejemplo, el error no se comporta monótonamente. Creemos que el comportamiento no monótono observado en las Figs. 3.1 (A) y (C) es consecuencia del cociente particular entre los coeficientes de difusión que se obtiene para EGTA y para Calbindina- $D_{28K}$ .

En la Fig. 3.5 presentamos un gráfico similar al anterior, pero en el plano  $\beta_{Ca} - \Gamma$ , y como resultado de variar tres parámetros,  $\beta_{Ca}$ ,  $\Gamma$  y  $\alpha$ , de tal modo que  $\alpha = 500/\Gamma$ . Como en [Dawson et al., 1999],  $\Gamma$  es el cociente entre la “concentración de liberación”,  $\sigma/d^3$ , y la diferencia entre las concentraciones umbral y basal,  $[Ca^{2+}]_{th} - [Ca^{2+}]_b$ . Por lo tanto, da una medida de cuán difícil resulta “encender” un sitio con otro. El hecho de que  $[Ca^{2+}]_{th}$  entre en la ecuación sólo a través del parámetro adimensional  $\Gamma$ , significa que la concentración umbral afecta la validez de la *RBA* dependiendo de cómo se compara con la concentración de liberación, en particular, con  $\sigma$ . Entonces, aumentar  $[Ca^{2+}]_{th}$  dejando fijos los otros parámetros equivale a disminuir  $\Gamma$ . De la Fig. 3.5 concluimos que aumentar  $[Ca^{2+}]_{th}$  reduce el error. El análisis del problema en términos de parámetros adimensionales nos permite relacionar este comportamiento con la mejora de la *RBA* cuando  $\sigma$  disminuye. Ahora bien,  $\sigma$  entra en las ecuaciones no sólo a través de  $\Gamma$ , sino también a través

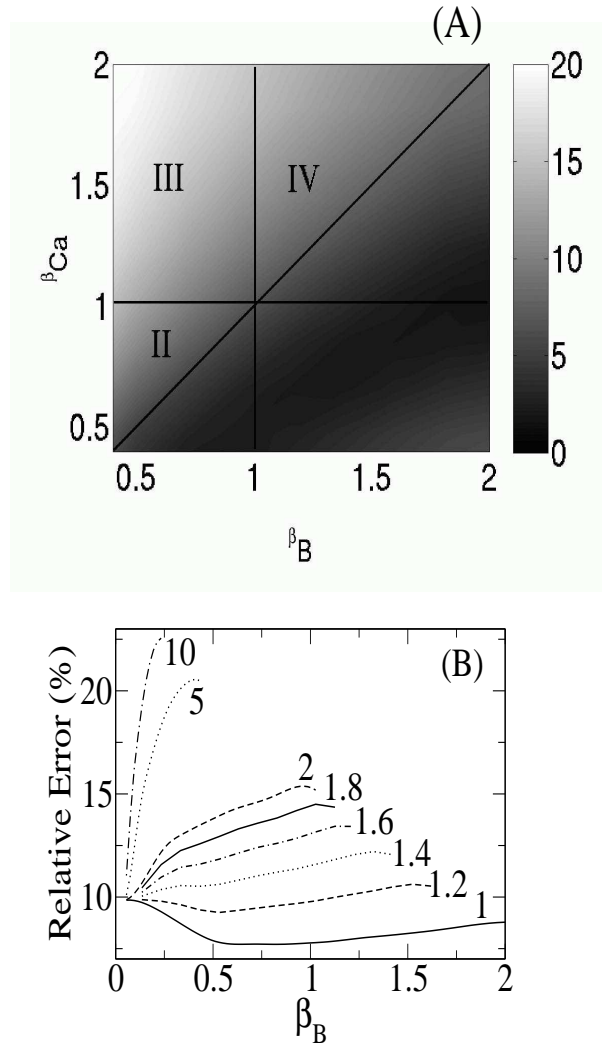


Figura 3.4: (A) Error relativo porcentual en el plano  $\beta_{Ca} - \beta_B$ . Los otros parámetros adimensionales son:  $\Gamma = 2000$ ,  $\kappa = 200$ ,  $\kappa' = 0,86$ ,  $\alpha = 0,25$  y  $\phi = 2000$ . Se han incluido tres curvas en la figura:  $\beta_{Ca} = 1$ ,  $\beta_B = 1$  y  $\beta_{Ca} = \beta_B$ , que dividen al plano en las regiones definidas en la Ec. (3.4). (B) Error relativo en función de  $\beta_B$  cuando tanto  $\beta_{Ca}$  como  $\beta_B$  son variadas a lo largo de una línea recta,  $\beta_{Ca} = m\beta_B$ , en (A). Las curvas están distinguidas por el valor de la pendiente,  $m$ .

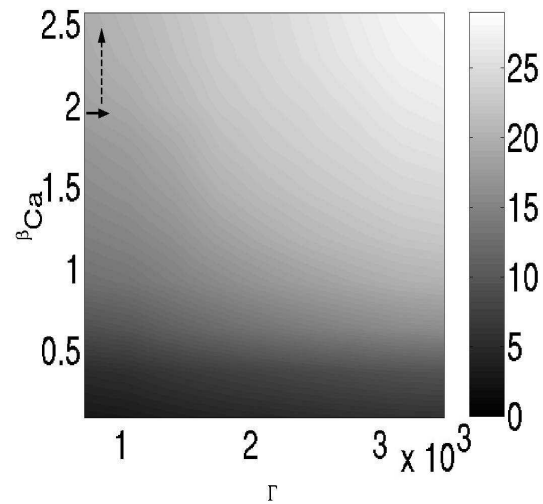


Figura 3.5: Similar a Fig. 3.4 pero en un plano  $\beta_{Ca} - \Gamma$ . Los otros parámetros adimensionales son:  $\alpha = 500/\Gamma$ ,  $\beta_B = 0,24$ ,  $\kappa = 200$ ,  $\kappa' = 0,86$  y  $\phi = 2000$ . Las flechas corresponden a algunos de los resultados en Fig. 3.3. Moverse a lo largo de la flecha llena es equivalente a moverse de una curva a otra para un valor fijo de  $\tau$ , en la Fig. 3.3 (A). Moverse a lo largo de la flecha cortada es equivalente a moverse de una curva a otra para un valor fijo de  $\tau$ , en la Fig. 3.3 (B).

de  $\alpha$ , el cociente entre la concentración total de buffer y la concentración de liberación. Entonces, si  $\alpha$  es o muy grande o muy chica, y el error es aproximadamente insensible a cambios en su valor; el modo en el cual los errores se comportan con  $\Gamma$ , junto con la definición de  $\Gamma$ , implica que aumentar  $[Ca^{2+}]_{th}$  tendrá un efecto similar al de disminuir  $\sigma$ . Disminuir  $\sigma$  resulta en menores gradientes de  $[Ca^{2+}]$  y, por tanto, errores menores. Por lo tanto, la mejora cuando aumenta  $[Ca^{2+}]_{th}$  se debe a la ocurrencia de gradientes de  $[Ca^{2+}]$  más pequeños.

### 3.3 Rango de validez de la aproximación de equilibrio

En la *RBA* se supone que la concentración de buffer ligado a  $Ca^{2+}$  y la de  $Ca^{2+}$  libre se encuentran localmente en equilibrio en cada instante, es decir, están vinculadas a través de la Ec. (1.9). Esta misma hipótesis fue usada para vincular la concentración de  $Ca^{2+}$  libre con la de  $Ca^{2+}$  ligado al indicador fluorescente en el Capítulo 2. En esta sección buscamos determinar hasta qué punto es posible hacer esta suposición cuando la fuente de  $Ca^{2+}$  es puntual. Con este fin realizamos simulaciones numéricas de las Ecs. (1.2)-(1.3) teniendo en cuenta dos buffers, una fuente esférica de iones de calcio dada por la Ec. (2.4) y un mecanismo de recaptura de la forma (1.6), tal como se describió en detalle en la Sec. 2.2 del Capítulo 2. Los parámetros de las simulaciones son los indicados en la Tabla 2.1. Para determinar los límites de aplicabilidad de la hipótesis, no sólo comparamos la concentración  $[CaB_i]$  obtenida de la simulación numérica con la dada por la Ec. (1.9), sino que también estudiamos el comportamiento de  $\log([CaB_i]/[B]_{T,i})$  como función de  $[Ca^{2+}]$ , el que, si la Ec. (1.9) es válida, debe variar de acuerdo a:

$$\log\left(\frac{[CaB_i]}{[B]_{T,i}}\right) = -\log\left(1 + \frac{K_{d,i}}{[Ca^{2+}]}\right). \quad (3.5)$$

En la Fig. 3.6 presentamos los resultados de la comparación, con el buffer *B* (recordemos que las simulaciones involucran dos buffers que hemos llamado *B* y *E* respectivamente). Las figuras (a) y (c) corresponden a una simulación en la cual  $I_{Ca} = 0,1pA$  y las figuras (b) y (d), a  $I_{Ca} = 1,9pA$ . Los parámetros restantes son los mismos en ambas simulaciones. En las figuras (a) y (b) comparamos perfiles espaciales para un tiempo correspondiente a  $t = 10$  ms, con línea llena se grafica  $[CaB]$  dada por la simulación y con línea punteada,



el resultado de suponer que  $[CaB]$  está en equilibrio con el valor de  $[Ca^{2+}]$  dado por la simulación. En las figuras (d) y (d) graficamos  $\log([CaB]/[B]_T)$  en función de  $\log(1 + K_d/[Ca^{2+}])$  para las concentraciones  $[Ca^{2+}]$  y  $[CaB]$  dadas por las simulaciones (círculos) y superpuesta, la relación de equilibrio. El asterisco corresponde al valor de  $r$ ,  $r^*$ , para el cual  $[CaB]$  toma un valor igual a la mitad de su valor máximo, los círculos a la izquierda del mismo corresponden a valores menores de  $r$ . De la figura (a) vemos que la hipótesis de equilibrio falla especialmente cerca de la fuente, en particular falla notablemente para  $r^*$ . Al incrementar el valor de la corriente, el rango de validez de la hipótesis de equilibrio se amplía, como vemos en la figura (b), pero nuevamente vemos que en la zona de  $r \lesssim r^*$  la aproximación sigue sin valer. Este análisis muestra la necesidad de buscar una forma más eficiente de relacionar las concentraciones  $[Ca^{2+}]$  y  $[CaB]$ , cosa que haremos en detalle en los Capítulos 5 y 6.

### 3.4 Discusión

En muchas situaciones, una forma rápida de obtener alguna estimación de cuánto calcio permanece libre al ingresar al citosol consiste en suponer que el  $Ca^{2+}$  se encuentra en equilibrio con los buffers citosólicos. Si bien esta aproximación puede ser válida si la velocidad de las reacciones entre calcio y buffers es suficientemente alta (la hipótesis fundamental para obtener la *RBA*), esta velocidad debe ser comparada con la de la difusión y esta última depende del gradiente de concentraciones. En este capítulo vimos que, en presencia de altos gradientes de concentraciones, la hipótesis de equilibrio entre calcio y buffers deja de valer. En particular, encontramos que en el caso de una fuente muy localizada, la distribución de calcio ligado a buffer prescripta por la hipótesis de equilibrio puede diferir hasta casi en un orden de magnitud respecto de la verdadera y esta diferencia es más notable más cerca de la fuente (y cuanto mayor es el gradiente de  $[Ca^{2+}]$ ). Esto implica que no es bueno suponer, como lo hicimos en el Cap. 2, que  $Ca^{2+}$  y el colorante están localmente en equilibrio. La importancia del gradiente de  $[Ca^{2+}]$  en determinar la validez o no de la hipótesis de equilibrio se refleja también en el estudio que hicimos de las ondas de  $Ca^{2+}$ .

Las ondas intracelulares de  $Ca^{2+}$  se propagan en forma regenerativa gracias a la liberación de iones de  $Ca^{2+}$  a través de poros muy angostos en los canales de  $Ca^{2+}$ . Aunque la propagación se ve afectada por la presencia de buffers, en general la dinámica de estos buffers no es de interés. La aprox-

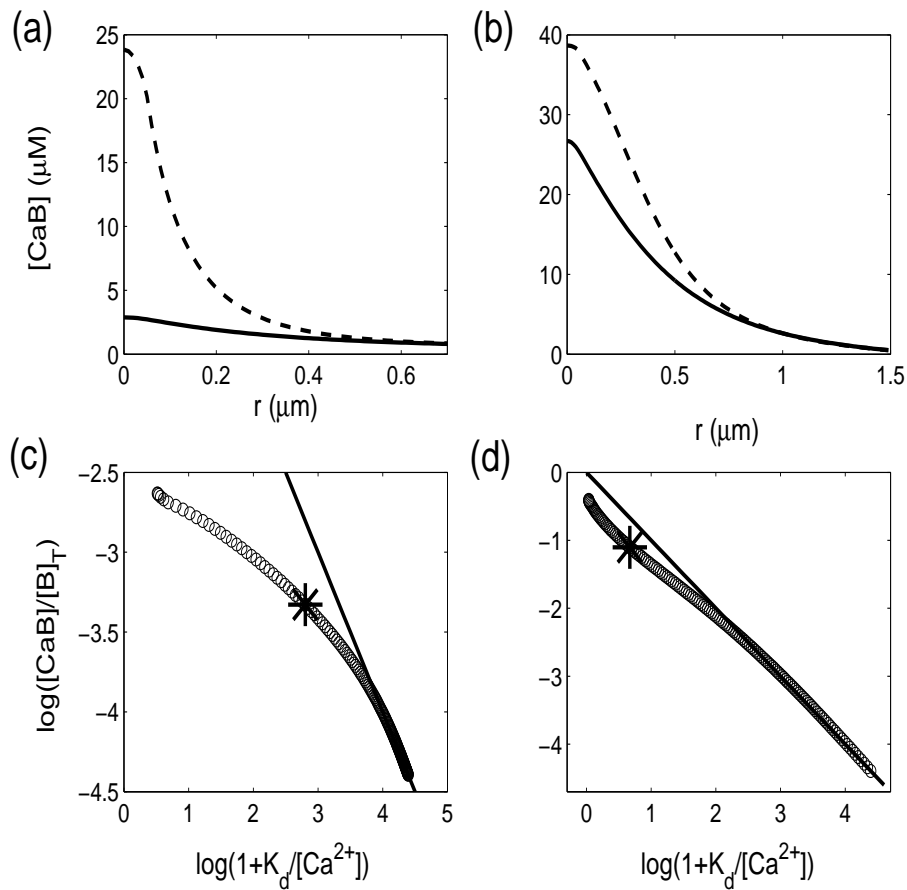


Figura 3.6: Validez de la relación de equilibrio entre calcio y un buffer con el que reacciona, para una simulación con  $I_{Ca} = 0,1 pA$  ((a) y (c)) y otra con  $I_{Ca} = 1,9 pA$  ((b) y (d)). (a)-(b) Perfiles espaciales de la concentración de calcio ligado al buffer  $B$ ; con línea llena el resultado de integrar numéricamente el sistema, con línea punteada el resultado de suponer que  $[CaB]$  está en equilibrio con  $[Ca^{2+}]$  obtenida de integrar numéricamente. Los perfiles corresponden a  $t = 10$  ms. (c)-(d) Gráficos de  $\log([CaB]/[B]_T)$  en función de  $\log(1 + K_d/[Ca^{2+}])$ , correspondientes a  $t = 10$  ms. Los círculos son el resultado de integrar numéricamente el sistema, la línea llena representa la solución de equilibrio y el asterisco indica el valor de  $r$ ,  $r^*$ , para el cual  $[CaB]$  toma un valor igual a la mitad de su valor máximo para el tiempo indicado.

imación de buffers rápidos provee una descripción de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  en términos de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , que es válida cuando la reacción con los buffers ocurre mucho más rápidamente que todos los demás procesos involucrados [Wagner and Keizer, 1994]. Sin embargo, la naturaleza localizada de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  es capaz de quebrar las hipótesis que sustentan la aproximación. En este capítulo hemos analizado la validez de la aproximación de buffers rápidos utilizando una extensión del modelo fire-diffuse-fire [Dawson et al., 1999], en el cual la dinámica de un buffer es incluida en forma explícita. Hemos observado que la escala espacial de la región con liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  juega un rol fundamental, en particular que la validez de la aproximación mejora cuando esta escala aumenta. La misma está determinada por el número de sitios que liberan  $\text{Ca}^{2+}$  en forma simultánea. Así, la aproximación mejora cuando la propagación pasa de ser saltatoria a continua. Aumentar el coeficiente de difusión de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $D_{Ca}$ , no es suficiente para producir esta transición. Más aún, la aproximación de buffers rápidos empeora cuando  $D_{Ca}$  aumenta ya que esto hace que la difusión se convierta en un proceso rápido. Aumentar el coeficiente de difusión del buffer, manteniendo  $D_B < D_{Ca}$ , favorece la transición hacia propagación continua y, entonces, mejora la aproximación.

Entender el comportamiento de la aproximación con  $[B]_T$ ,  $D_B$  y la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  es más sutil. Para  $[B]_T = 0$ , el error es cero porque las descripciones *FDF* y *RBA* son idénticas. Así, el error aumenta con  $[B]_T$ , para  $[B]_T$  suficientemente pequeño. Esto está de acuerdo con lo observado en [Smith et al., 1996], donde se estudia numéricamente la validez de la aproximación de buffers rápidos cerca de una única fuente puntual. Sin embargo, la tasa a la cual ocurren las reacciones con los buffers, aumenta con  $[B]_T$  y esto podría resultar en errores menores. En realidad, hemos mostrado en este capítulo que el error depende no monótonamente de  $[B]_T$ . Este comportamiento es más evidente cuando  $\tau$ , un parámetro que determina tanto la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  como el tiempo durante el cual el canal está abierto, es pequeño (*i.e.* con corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  altas pero breves). En [Smith et al., 1996] se estudia también el efecto que tienen en la aproximación, diferentes corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . En particular, se muestra que el error se hace máximo para corrientes intermedias. Nosotros no hemos encontrado este tipo de comportamiento. Sin embargo, los autores de [Smith et al., 1996] computan los errores principalmente en la región alrededor de la fuente puntual. Los buffers pueden estar saturados en esta región y ésta puede ser la razón detrás del comportamiento no monótono del error con la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ . A saber, para corrientes pequeñas, el error es pequeño porque los gradientes de  $[\text{Ca}^{2+}]$  son pequeños. Cuando la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  es muy grande, el buffer se satura cerca de la fuente y la mayor parte del  $\text{Ca}^{2+}$  está libre. En ese límite, tanto la aproxi-

mación de buffers rápidos como el modelo completo se reducen a la ecuación de difusión pura y el error se hace cero nuevamente. Mientras que la aproximación puede mejorar cerca de la fuente cuando la corriente aumenta, empeora lejos de ella, donde el buffer no está saturado. Éste es el comportamiento que obtenemos de nuestro análisis en el caso de propagación saltatoria, para el cual la aproximación de buffers rápidos falla en predecir la velocidad de la onda si la corriente es muy grande. El hecho de que la saturación del buffer juegue un rol en la validez de la aproximación cerca de una fuente puntual, es también reflejado en que el error en esa región es mayor para buffers móviles que para inmóviles [Smith et al., 1996]. Los buffers móviles rellenan regiones espacialmente localizadas donde su concentración ha disminuido, haciendo menos favorable la saturación. Los resultados en [Smith et al., 1996] también muestran que, por otro lado, los errores lejos de la fuente son mayores para buffers inmóviles que para buffers móviles. Esto coincide con nuestra observación de que el error decrece cuando aumenta la difusividad del buffer. Las diferencias en el comportamiento de la aproximación cerca y lejos de la fuente, explican también el modo en el cual el error se comporta en función de la concentración y el coeficiente de difusión del buffer, para valores de los parámetros para los cuales la propagación es menos saltatoria. Para propagación continua, el comportamiento está completamente dominado por el gradiente de concentración en la región que tiene sitios que disparan en forma simultánea. Por lo tanto, aumentar la concentración de buffer o su coeficiente de difusión, mejora la aproximación, ya que ayuda a suavizar los gradientes de concentración sobre dicha región. En la región con pocos sitios que disparan simultáneamente, la aproximación es más sensible a los valores de estos parámetros, exactamente por esta razón.

Combinando los resultados de [Smith et al., 1996] y los nuestros, podemos concluir que, cerca de una fuente puntual, la aproximación de buffers rápidos mejora al alcanzarse un situación de “difusión libre” (*i.e.*, cuando la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta y la concentración de buffer disminuye, siendo esto último favorecido si el buffer es inmóvil). Lejos de la fuente puntual, la aproximación mejora cuando los gradientes de concentración disminuyen, algo que se alcanza para corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  más pequeñas y concentraciones mayores de buffers con más movilidad. En el caso de ondas saltatorias, el comportamiento de los errores lejos de la fuente es lo que más importa para determinar la eficiencia de la aproximación en predecir la velocidad de la onda. La aproximación mejora cuando los gradientes se suavizan y las ondas se hacen más continuas.

Los resultados presentados en este capítulo muestran que la clasificación

de buffers en lentos o rápidos es de algún modo delicada en el caso de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que la escala temporal de difusión relevante contra la cual hay que comparar la escala temporal de reacción, puede ser arbitrariamente pequeña. Hemos observado que en el caso de propagación saltatoria, los errores en la velocidad de la onda pueden permanecer por encima de la resolución experimental aún cuando los tiempos característicos de la reacción sean mucho menores a los de difusión entre sitios. Contrariamente, hemos observado que la aproximación funciona bastante bien, incluso para buffers lentos, si la región con liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  activa decae sobre una escala espacial suficientemente larga. Los gradientes de concentración juegan un rol fundamental en la determinación de validez de la aproximación. Sin embargo, gradientes importantes son inducidos por el coeficiente de difusión dependiente de la concentración, dado por la aproximación de buffers rápidos. En algún sentido, la aproximación tiene en sí misma la semilla para su propia destrucción. Es, entonces, importante determinar *a priori* las posibles fuentes de error al usar la aproximación. En este capítulo hemos presentado las escalas espaciales y temporales relevantes que necesitan ser comparadas a tal fin.

### 3.5 Apéndice: Aproximación analítica para $\tau^*$

El número de sitios que disparan en forma simultánea juega un rol fundamental en la validez de la *RBA*. En el modelo fire–diffuse–fire original, la transición de uno a varios sitios disparando simultáneamente está regida por un único cociente de escalas temporales,  $\tau/\tau_D$ , siendo  $D$  un coeficiente de difusión “efectivo” para  $\text{Ca}^{2+}$ . En nuestro caso, hay dos tiempos característicos asociados a la difusión entre sitios y, entonces, dos cocientes que regulan esa transición, haciendo más complicada la estimación del valor de  $\tau$  para el cual ocurre la misma ( $\tau^*$ ). Hasta aquí hemos calculado  $\tau^*$  numéricamente, pero quisiéramos tener una estimación *a priori* de su valor. En este Apéndice presentamos una aproximación analítica simple para  $\tau^*$ . A tal fin consideramos la Ec. (1.2) sin bombas ni buffers, con un coeficiente de difusión efectivo,  $D$ , y con un único sitio disparando a  $t = 0$ , que permanece encendido:

$$\frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} = \frac{\sigma}{d^2\tau} \delta(x)\Theta(t) + D\nabla^2[\text{Ca}^{2+}], \quad (3.6)$$

con  $[Ca^{2+}](\mathbf{r}, t = 0) = 0$ ,  $[Ca^{2+}] \rightarrow 0$  as  $|x| \rightarrow \infty$ . Una buena aproximación a la solución de la Ec. (3.6) es:

$$\begin{aligned} [Ca^{2+}] &= \frac{\sigma}{d^2\tau} \left( \sqrt{\frac{t}{2D}} + \frac{x}{2D} \right), \quad \text{para } -\frac{2Dd^2\tau}{\sigma} \leq x \leq 0, \\ [Ca^{2+}] &= \frac{\sigma}{d^2\tau} \left( \sqrt{\frac{t}{2D}} - \frac{x}{2D} \right), \quad \text{para } 0 \leq x \leq \frac{2Dd^2\tau}{\sigma}, \\ [Ca^{2+}] &= 0, \quad \text{para } |x| > \frac{2Dd^2\tau}{\sigma}. \end{aligned} \quad (3.7)$$

Esta aproximación tiene la misma dependencia espacial que la solución estacionaria de la Ec. (3.6) y una dependencia temporal que da el número correcto de iones inyectados (satisface  $\int_0^t dt' \int_{-\infty}^{\infty} dx' [Ca^{2+}](x', t') = \sigma t / (d^2\tau)$ ). Más aún, satisface  $[Ca^{2+}] \geq 0$  para todo punto espacial y temporal. Con esta aproximación para  $[Ca^{2+}](x, t)$ , podemos encontrar el tiempo  $t^*$  para el cual  $[Ca^{2+}](d, t^*) = [Ca^{2+}]_{th}$ . Si pensamos que la fuente proviene de uno de los sitios del modelo fire–diffuse–fire model, y consideramos que hay otro sitio en  $x = d$ , entonces  $t^*$  es el instante para el cual la segunda fuente empieza a liberar iones de  $Ca^{2+}$ . Así, eligiendo el tiempo durante el cual la primera fuente está encendida,  $\tau$ , igual a  $t^*$ , obtenemos el valor de  $\tau$ ,  $\tau^*$ , para el cual ocurre la transición entre tener un único sitio disparando en el frente, a tener dos. Procediendo de esa manera obtenemos:

$$\tau^* = \left( \frac{d\sqrt{\frac{2}{D}}}{1 + \sqrt{1 - \frac{4[Ca^{2+}]_{\tau}}{\sigma/d^3}}} \right)^2. \quad (3.8)$$

Esta expresión depende del coeficiente de difusión efectivo,  $D$ . Para incluir información de la reacción con el buffer, calculamos  $D$  como

$$D = \frac{\int_{[Ca^{2+}]_b}^{[Ca^{2+}]_{left}} D_{eff}(c) dc}{[Ca^{2+}]_{left} - [Ca^{2+}]_b} \quad (3.9)$$

donde  $[Ca^{2+}]_{left} = \lim_{x \rightarrow -\infty} [Ca^{2+}]$  y  $D_{eff}(c)$  están dados por la Ec. (1.14). En la Tabla 3.3 mostramos los valores de  $\tau^*$  estimados usando la Ec. (3.8) ( $\tau_{pred}^*$ ) y aquellos obtenidos de simulaciones numéricas ( $\tau_{num}^*$ ). El acuerdo entre ambos es muy bueno. Entonces, la estimación de  $\tau^*$  puede ser utilizada para determinar *a priori* si la *RBA* puede dar una buena descripción de la dinámica o no.

Tabla 3.3: Predicción y cálculo numérico de  $\tau^*$  (menor valor de  $\tau$  para el cual hay por lo menos dos sitios disparando simultáneamente en el frente) para diferentes valores de  $\sigma$  y  $[Ca^{2+}]_{th}$ . La estimación del coeficiente de difusión efectivo para  $[Ca^{2+}]$ ,  $D_{eff}$ , también ha sido tabulada.

$\sigma [\times 10^{-12} \mu mol]$	$[Ca^{2+}]_{th} [\mu M]$	$D_{eff} [\mu m^2 s^{-1}]$	$\tau_{pred}^* [s]$	$\tau_{fd}^* [s]$	$\tau_{rba}^* [s]$
5,5	0,25	190,6	0,028	0,02	0,04
3,5	0,25	94,1	0,06	0,08	0,2
3,0	0,25	46,2	0,12	0,1	0,2
5,5	0,40	190,5	0,029	0,03	0,05

# Capítulo 4

## Reducciones observacionales: una ecuación cerrada para el transporte de $\text{Ca}^{2+}$ en presencia de “buffers” obtenida a partir de datos experimentales

### 4.1 Resumen

En este capítulo introducimos un nuevo abordaje para la obtención de descripciones matemáticas simplificadas de la dinámica del calcio intracelular. Este nuevo abordaje consiste en obtener un conjunto minimal de ecuaciones de evolución cuyas soluciones coincidan, dentro de cierto margen de error, con las observadas experimentalmente o con las obtenidas a partir de simulaciones de modelos detallados. Llamamos “reducciones observacionales” a este tipo de descripciones. En este capítulo sólo probamos el método con simulaciones numéricas.



## 4.2 Ecuaciones de evolución

En el conjunto completo de ecuaciones (1.2)-(1.3) (del Capítulo 1) para describir la dinámica del calcio citosólico, consideremos el caso en que no hay una fuente de calcio,  $Q_{Ca}$ , todos los buffers son endógenos y el efecto de las bombas se puede escribir como función de  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Llamemos  $M$  a:

$$M = \sum_i R_i + q_{rem}([\text{Ca}^{2+}]), \quad (4.1)$$

que depende de  $[\text{Ca}^{2+}]$  y de las concentraciones de sustancias distintas del calcio. Para poder conocer  $[\text{Ca}^{2+}](\mathbf{r}, t)$  es necesario resolver el conjunto completo de ecuaciones acopladas. Supongamos que, o bien resolvemos ese conjunto completo de ecuaciones, o que tenemos acceso a determinar experimentalmente  $[\text{Ca}^{2+}]$  como función del punto del espacio  $\mathbf{r}$  y del tiempo  $t$ . Es decir, conocemos  $[\text{Ca}^{2+}](\mathbf{r}, t)$  para alguna condición inicial. Entonces, podemos resolver separadamente cada ecuación de la forma (1.3) para obtener  $[B_i](\mathbf{r}, t)$  (si conocemos  $[B_i](t = 0)$ ). Así, cada valor de  $[B_i](\mathbf{r}, t)$  es función de una colección de valores,  $[\text{Ca}^{2+}]$ , para todos los puntos espaciales y en los tiempos previos, *i.e.*, de  $\{[\text{Ca}^{2+}](\mathbf{r}', t') \forall \mathbf{r}', t' \leq t\}$ . Resulta fácil escribir explícitamente esta dependencia en casos en los cuales el buffer no difunde:

$$[B_i](\mathbf{r}, t) = \exp\left(-k_{off,i}t - k_{on,i} \int_0^t [\text{Ca}^{2+}](\mathbf{r}, t') dt'\right) [B_i](\mathbf{r}, 0) + k_{off,i} [B]_{T,i} \int_0^t \exp\left(-k_{off,i}(t-t') - k_{on,i} \int_{t'}^t [\text{Ca}^{2+}](\mathbf{r}, t'') dt''\right) dt', \quad (4.2)$$

o cuando la Ec. (1.3) puede linealizarse, por ejemplo, si  $[\text{Ca}^{2+}][B_i] \approx [\text{Ca}^{2+}][B]_{T,i}$  en (1.3):

$$[B_i](\mathbf{r}, t) = [B_i](\mathbf{r}, 0) + [B]_{T,i} \times \int d\mathbf{r}' \int_0^t dt' (k_{off,i} - k_{on,i}[\text{Ca}^{2+}](\mathbf{r}', t')) e^{-k_{off,i}(t-t')} \frac{e^{-\frac{(\mathbf{r}-\mathbf{r}')^2}{4D_{B,i}(t-t')}}}{(4\pi D_{B,i}(t-t'))^{3/2}}. \quad (4.3)$$

Ahora bien, la dependencia de  $[B_i](\mathbf{r}, t)$  con  $\{[\text{Ca}^{2+}](\mathbf{r}', t')\}$  es de memoria “finita” tanto en el espacio como en el tiempo:  $[B_i](\mathbf{r}, t)$  depende más fuertemente de  $[\text{Ca}^{2+}](\mathbf{r}', t')$  en puntos cercanos,  $\mathbf{r}' \approx \mathbf{r}$ , y tiempos próximos,  $t' \approx t$ , que de los más distantes. Esto se debe a la naturaleza disipativa de las ecuaciones de evolución y al acoplamiento espacial difusivo. Se refleja en las

exponenciales decrecientes que aparecen en (4.2) y en (4.3), que son máximas para  $t = t'$  y  $\mathbf{r} = \mathbf{r}'$ . Esta “memoria finita” se translada a la dependencia de  $M$  con  $\{[Ca^{2+}](\mathbf{r}', t')\}$ . Si esta dependencia es sólo relevante en vecindades suficientemente pequeñas (tanto en el espacio como en el tiempo), entonces, usando una expansión de Taylor, podemos escribir a todas las concentraciones  $[B_i](\mathbf{r}, t)$  en términos de  $[Ca^{2+}](\mathbf{r}, t)$  y derivadas de  $[Ca^{2+}]$  de bajo orden en el espacio y el tiempo, calculadas en  $(\mathbf{r}, t)$ . Análogamente, la suma de términos  $M(\mathbf{r}, t) \equiv \sum_i R_i + g([Ca^{2+}])$  que entra en la Ec. (1.2), también podrá ser escrita en términos de  $[Ca^{2+}](\mathbf{r}, t)$  y sus derivadas. Si suponemos que todas las soluciones de interés tienen simetría esférica, entonces las derivadas de  $[Ca^{2+}]$  de orden más bajo compatibles con esta simetría son  $|\nabla[Ca^{2+}]|^2$  y  $\nabla^2[Ca^{2+}]$ . Es decir, podemos suponer que

$$M \cong g \frac{\partial[Ca^{2+}]}{\partial t} + f \nabla^2[Ca^{2+}] + h |\nabla[Ca^{2+}]|^2 + k, \quad (4.4)$$

donde  $g$ ,  $f$ ,  $h$  y  $k$  son funciones de  $[Ca^{2+}]$ .

### 4.3 Probando la aproximación

Aquí evaluamos hasta qué punto el ansatz (4.4) es capaz de capturar la evolución dinámica de la concentración de calcio debida a aquellos procesos intracelulares que típicamente están pobremente caracterizados y que incluimos en  $M$ . A tal fin, consideremos que la evolución de la concentración de calcio inmediatamente después de que el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol se ha detenido. Así, la ecuación de evolución, Ec. (1.2) está determinada por los términos “desconocidos” que agrupamos en  $M$ , más la difusión. Considerando que  $M$  puede aproximarse con el ansatz (4.4), la Ec. (1.2) puede reescribirse como:

$$\frac{\partial[Ca^{2+}]}{\partial t} = f^* \nabla^2[Ca^{2+}] + h^* |\nabla[Ca^{2+}]|^2 + k^*, \quad (4.5)$$

donde  $f^* \equiv (f + D_{Ca})/(1 - g)$ ,  $h^* \equiv h/(1 - g)$  y  $k^* \equiv k/(1 - g)$ . De ahora en más, en este capítulo, vamos a omitir los asteriscos de las funciones  $f^*$ ,  $h^*$  y  $k^*$  para simplificar la notación.

#### 4.3.1 Cómo obtener las funciones $f$ , $h$ y $k$

Aquí describimos brevemente cómo determinar las funciones  $f$ ,  $h$ , y  $k$  de la Ec. (4.5), a partir de la distribución espacio-temporal de la concentración de

calcio,  $[\text{Ca}^{2+}](x, t)$  ( $x$  es la coordenada espacial utilizada en los ejemplos de este capítulo, corresponde a la coordenada radial en el caso de los experimentos que analizaremos en el Capítulo 5). Tanto a partir de simulaciones numéricas, como se hará en este caso, como a partir de experimentos reales, como se verá en el Capítulo 5, es posible obtener  $[\text{Ca}^{2+}]$  en función del espacio y el tiempo. Partiendo de  $[\text{Ca}^{2+}](x, t)$ , se calculan las derivadas espaciales y temporales que indica el ansatz (4.5). En los ejemplos de este capítulo, lo hacemos con los resultados de las simulaciones numéricas. La derivación numérica introduce errores, no discutiremos este aspecto aquí, recomendamos al lector interesado recurrir al Capítulo 5. Una vez calculadas las derivadas, tenemos  $[\text{Ca}^{2+}]$ ,  $\partial[\text{Ca}^{2+}]/\partial t$ ,  $\partial[\text{Ca}^{2+}]/\partial x$ , y  $\partial^2[\text{Ca}^{2+}]/\partial x^2$ , para cada punto espacio-temporal,  $(x, t)$ . Podemos, entonces, hallar  $C_{a_{max}} \equiv \text{máx}_{(x,t)}[\text{Ca}^{2+}](x, t)$  y  $C_{a_{min}} \equiv \text{mín}_{(x,t)}[\text{Ca}^{2+}](x, t)$ , y particionar el intervalo  $[C_{a_{min}}, C_{a_{max}}]$  en un número finito de valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Luego, determinamos todos los puntos,  $\zeta_i \equiv (x, t)$ , tales que  $[\text{Ca}^{2+}](\zeta_i)$  están en el  $i$ -ésimo compartimiento de  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Tenemos, entonces, tantas ecuaciones de la forma (4.5) por compartimiento, como puntos en el mismo,  $\zeta_i$ . A partir de este sistema sobredeterminado, es posible obtener las funciones  $f$ ,  $h$  y  $k$  para el conjunto discreto de valores de la concentración de calcio en los cuales dividimos el intervalo  $[C_{a_{min}}, C_{a_{max}}]$ . Una vez hecho esto, podemos interpolar este conjunto de valores discretos por funciones suaves  $f$ ,  $h$  y  $k$ . Dado que necesitamos determinar tres funciones desconocidas, necesitamos por lo menos tres puntos,  $\zeta_i$ , por compartimiento. Sin embargo, el método funciona mejor si el sistema está sobredeterminado. Esto impone ciertas restricciones en la elección del tamaño del compartimiento. Típicamente, trabajamos con aproximadamente 10 puntos,  $\zeta_i$ , por compartimiento de  $[\text{Ca}^{2+}]$ . De este modo, el método ha funcionado satisfactoriamente con nuestras simulaciones numéricas. En el Capítulo 5 describiremos este proceso con mucho más detalle, tanto en el caso de datos simulados como en el de datos experimentales.

### 4.3.2 Pruebas numéricas

Para averiguar la validez de esta aproximación, consideraremos ahora que, luego de su liberación, el calcio difunde en presencia de un único buffer,  $B$ , y bajo el efecto de una bomba descrita por la Ec. (1.6) con  $m = 3,9$  [Soeller and Cannell, 2002].

Para determinar si las Ecs. (1.2)-(1.3) y la Ec. (4.5) pueden predecir distribuciones espacio-temporales similares para  $[\text{Ca}^{2+}]$ , realizamos dos tipos

#### 4. Reducciones observacionales: una ecuación cerrada para el transporte de $\text{Ca}^{2+}$ en presencia de “buffers” obtenida a partir de datos experimentales 80

de simulaciones numéricas de las Ecs. (1.2)-(1.3), en una dimensión espacial. La primera, con un buffer rápido de parámetros  $k_{on} = 100 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{off} = 1000 \text{ s}^{-1}$ ,  $D_B = 50 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  y  $[B]_T = 114 \mu\text{M}$  y una bomba con  $k_1 = 50,0 \mu\text{M}\text{s}^{-1}$  y  $k_2 = 0,184 \mu\text{M}$ , y la segunda con un buffer lento de parámetros  $k_{on} = 1,5 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{off} = 0,3 \text{ s}^{-1}$ ,  $D_B = 50 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  y  $[B]_T = 40 \mu\text{M}$  y una bomba con  $k_1 = 10,0 \mu\text{M}\text{s}^{-1}$  y  $k_2 = 0,184 \mu\text{M}$ . Para ambos conjuntos de simulaciones, utilizamos  $D_{Ca} = 225 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ , y un perfil inicial gaussiano para  $\text{Ca}^{2+}$  (máximo  $[\text{Ca}^{2+}] = 1,78 \mu\text{M}$  y ancho =  $5 \mu\text{m}$  en el caso del buffer rápido y máximo  $[\text{Ca}^{2+}] = 2,55 \mu\text{M}$  y ancho =  $10 \mu\text{m}$  en el caso del buffer lento) superpuesto a un fondo uniforme ( $[\text{Ca}^{2+}] = 0,1 \mu\text{M}$ ). Este perfil inicial se encuentra en equilibrio con el buffer en el caso del buffer rápido. Para el buffer lento, sólo el fondo se halla en equilibrio con el buffer.

El objetivo aquí es determinar si existen funciones  $f$ ,  $g$ , y  $h$  tales que la evolución espacio-temporal de  $[\text{Ca}^{2+}]$  dada por las Ecs. (1.2)-(1.3) puede también ser descrita por una ecuación cerrada de la forma (4.5). En el caso del buffer rápido, esperamos que esto sea posible, dado que, de acuerdo a la aproximación de buffers rápidos [Wagner and Keizer, 1994, Strier and Dawson, 2000] y tal como ya hemos mencionado, las Ecs. (1.2)-(1.3) pueden reducirse a la Ec. (4.5) con:

$$f = \beta(D_{Ca} + \gamma D_B), \quad (4.6)$$

$$h = -2\beta\gamma D_B / (K_d + [\text{Ca}^{2+}]), \quad (4.7)$$

$$k = -\beta q_{uptake}, \quad (4.8)$$

donde  $\beta^{-1} = 1 + K_d[B]_T / (K_d + [\text{Ca}^{2+}])^2$ ,  $\gamma = K_d[B]_T / (K_d + [\text{Ca}^{2+}])^2$  y  $K_d = k_{off} / k_{on}$ . Esta aproximación falla en el caso de buffers lentos. Sin embargo, mostraremos aquí que, aún en ese caso, existen funciones  $f$ ,  $h$ , y  $k$  que hacen que la evolución dada por (1.2)-(1.3) pueda ser calculada en la forma cerrada (4.5). Para realizar estos análisis, resolvemos las Ecs. (1.2)-(1.3) y luego aplicamos un procedimiento de ajuste tendiente a determinar las funciones  $f$ ,  $h$ , and  $k$ , tal como ya hemos explicado.

En la Fig. 4.1 presentamos los resultados obtenidos en el caso del buffer rápido. En este caso, la evolución es correctamente descrita por la aproximación de buffers rápidos, tal como se observa en la Fig. 4.1 (a), donde mostramos la concentración de calcio libre obtenida para varios tiempos mediante simulaciones numéricas de las Ecs. (1.2)-(1.3) (líneas cortadas) y utilizando la aproximación de buffers rápidos (línea llena). El procedimiento de ajuste da por resultado funciones  $f$ ,  $h$ , y  $k$  que están de acuerdo con aquellas dadas por esta aproximación, como se observa en las Figs. 4.1 (b)-(d), donde

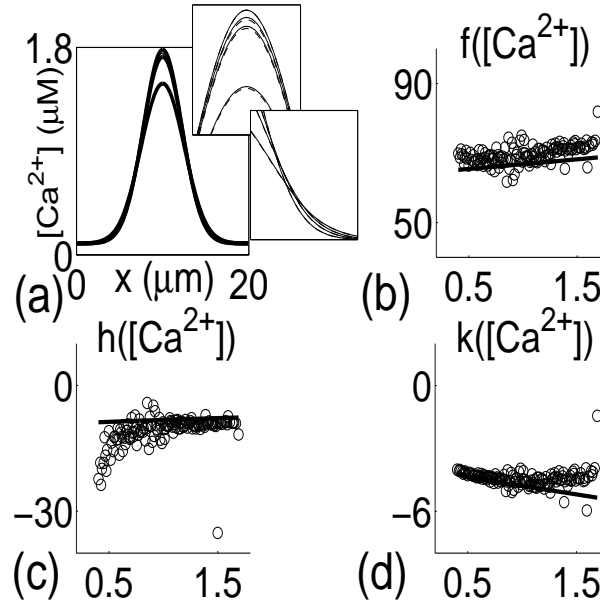


Figura 4.1: Simulaciones con un buffer rápido. (a) Perfiles de la concentración de calcio para tiempos  $t = 0$ ,  $t = 0,0013 \text{ s}$ ,  $t = 0,0025 \text{ s}$  y  $t = 0,0125 \text{ s}$ , obtenidos resolviendo las Ecs. (1.2)-(1.3) (líneas cortadas) y la ecuación cerrada, Ec. (4.5), obtenida en la aproximación de buffers rápidos (líneas llenas). (b)–(d) Versión discreta de las funciones  $f$ ,  $h$  y  $k$  (círculos) obtenida del procedimiento de ajuste (ver Sec. 4.3.1) y las funciones suaves de la aproximación de buffers rápidos (líneas llenas).

graficamos las discretizaciones de las funciones  $f$ ,  $h$  y  $k$  que da el procedimiento de ajuste (círculos) y las funciones que predice la aproximación de buffers rápidos (líneas llenas).

En la Fig. 4.2 presentamos los resultados obtenidos en el caso del buffer lento. Como antes, mostramos en las Figs. 4.2 (a)–(c) discretizaciones de las funciones  $f$ ,  $h$  y  $k$ , obtenidas a través del procedimiento de ajuste (círculos) y funciones suaves que aproximan razonablemente bien esas discretizaciones (líneas llenas). Utilizando esas funciones suaves, integramos la Ec. (4.5), obteniendo una evolución para la concentración de calcio que es muy similar a la que se obtiene con el conjunto completo de ecuaciones, como se indica en la Fig. 4.2 (d). En esta figura graficamos la concentración de calcio libre obtenida para varios tiempos mediante integración numérica de las Ecs. (1.2)-(1.3) (líneas cortadas) y la Ec. (4.5) (líneas llenas), utilizando las funciones suaves de las Figs. 4.2 (a)-(c).

4. Reducciones observacionales: una ecuación cerrada para el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de “buffers” obtenida a partir de datos experimentales 82

---

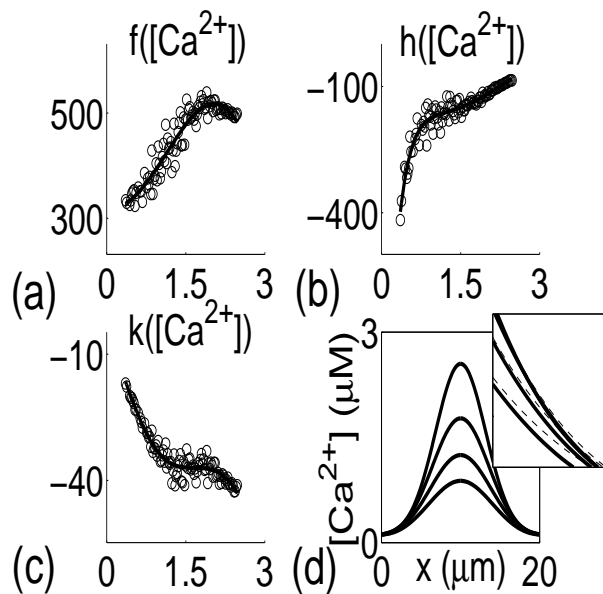


Figura 4.2: Simulaciones con un buffer lento. (a)–(c) Versión discreta de las funciones  $f$ ,  $h$  and  $k$  (círculos) obtenida del procedimiento de ajuste (ver Sec. 4.3.1) y la funciones interpolantes suaves (líneas llenas). (b) Perfiles de la concentración de calcio para tiempos  $t = 0$ ,  $t = 0,006\text{ s}$ ,  $t = 0,012\text{ s}$  y  $t = 0,018\text{ s}$ , obtenidos resolviendo las Ecs. (1.2)-(1.3) (líneas cortadas) y la ecuación cerrada, Ec. (4.5), con las funciones suaves  $f$ ,  $h$  y  $k$  de (a)–(c).

## 4.4 Discusión

Estas pruebas nos muestran que los términos de interacción con buffers tanto rápidos como lentos pueden ser re-escritos como funciones de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y de sus derivadas. Lo que vamos a suponer de ahora en más es que la forma funcional en la que depende  $M$  de  $[\text{Ca}^{2+}]$  y sus derivadas no depende fuertemente de la condición inicial, sino que está principalmente determinada por los parámetros que caracterizan a las reacciones con los buffers y al proceso de recaptura contenidos en el término  $M$ . Es de esperar que esto se cumpla, al menos luego de un transitorio, dada la naturaleza disipativa de las ecuaciones. Ahora bien, nosotros vamos a ir más allá y vamos a suponer que la forma funcional de  $M$  persiste aún cuando haya otros procesos actuando sobre la dinámica del calcio citosólico, en particular, corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresan al citosol o la presencia de buffers exógenos como el fluoróforo. Es decir que el término  $M$  en la Ec. (1.2) ( $M$  está dado por la Ec. (4.1)) puede ser reemplazado por una expresión de la forma de la Ec. (4.4) donde las funciones  $g$ ,  $f$ ,  $h$  y  $k$  son independientes de  $Q_{Ca}$ , lo que permite pasar de  $N+1$  ecuaciones de movimiento a una sola. Por otro lado, si se agrega un buffer adicional al sistema (por ejemplo, un fluoróforo) cuya reacción no está contenida en  $M$ , vamos a suponer  $M$  no se ve alterado y que, por lo tanto, la descripción del sistema está dada por:

$$\frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} = M + Q_{Ca} + D_{Ca}\nabla^2[\text{Ca}^{2+}] + R_F, \quad (4.9)$$

$$\frac{\partial[\text{Ca}B_F]}{\partial t} = -R_F + D_{B,F}\nabla^2[\text{Ca}B_F], \quad (4.10)$$

donde  $R_F$  es el término de reacción con el fluoróforo. Éste es el supuesto básico del algoritmo que presentamos en el capítulo siguiente para determinar corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de imágenes de fluorescencia. De este modo superamos la limitación del Capítulo 2 (en donde todos los parámetros de la descripción dependían de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ ).

# Capítulo 5

## Usando la ecuación cerrada para el transporte de $\text{Ca}^{2+}$ para determinar los flujos de $\text{Ca}^{2+}$ en imágenes de fluorescencia

### 5.1 Resumen

Los experimentos ópticos con indicadores fluorescentes permiten tener una idea de la dinámica espacio-temporal del calcio citosólico. Sin embargo, resulta difícil inferir cuál es la magnitud y el curso temporal de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que generan una dada imagen, dado que la distribución de  $\text{Ca}^{2+}$  ligado al indicador fluorescente es afectada por varios procesos endógenos pobremente caracterizados. Numerosos métodos han sido propuestos con anterioridad para derivar el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de imágenes fluorescentes, pero todos ellos requieren un modelo detallado al estilo del presentado en el Capítulo 3. En este capítulo presentamos un algoritmo novedoso, basado en el enfoque del Capítulo 4. Probando el algoritmo tanto con datos de “imágenes” generadas numéricamente, como con imágenes experimentales de “sparklets” resultantes del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales voltaje-dependientes en ovocitos, mostramos que el mismo reconstruye satisfactoriamente la magnitud y el curso temporal de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  subyacentes.



## 5.2 Introducción

Varios métodos para estimar los flujos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  han sido presentados en la literatura; especialmente en el caso de *sparks*, que es el equivalente del *puff* pero en músculo cardíaco, esquelético y liso. Como se describe en [Rios and Brum, 2002], pueden ser clasificados en dos categorías.

1. Cálculos del tipo “*forward*”, en los cuales se simula numéricamente un modelo para la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y, luego, las “imágenes fluorescentes” que dicho modelo produce son comparadas con observaciones experimentales (ver, por ejemplo, [Smith et al., 1998, Baylor et al., 2002, Izu et al., 2001]).

2. Cálculos del tipo “*backward*”, en los cuales, empezando de una dada imagen, se computa la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  subyacente (ver, por ejemplo, [Blatter et al., 1997, Rios et al., 1999, Rios and Brum, 2002, Soeller and Cannell, 2002]).

Cualquiera sea el enfoque, todos estos métodos requieren un modelo para la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Más aún, se necesitan datos cuantitativos acerca de la cinética y las concentraciones de buffers endógenos y bombas [Smith et al., 1998, Izu et al., 2001, Rios and Brum, 2002, Soeller and Cannell, 2002, Blatter et al., 1997, Lukyanenko et al., 1998, Rios et al., 1999]; en muchos casos, éstos han sido obtenidos a partir de estudios experimentales independientes, y, en menor medida, a partir del ajuste de parámetros del modelo que den el mejor acuerdo con las observaciones [Blatter et al., 1997, Timmer et al., 1998]. En la mayor parte de los tipos celulares, sin embargo, la caracterización de los buffers de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares es mucho menos completa que en las células musculares, de modo que estos enfoques no son aplicables en forma general.

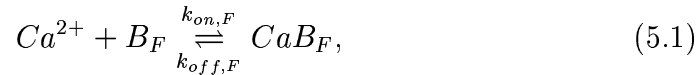
Proponemos aquí, un algoritmo novedoso, independiente del modelo, para obtener los flujos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de imágenes intracelulares de fluorescencia. El método se basa en el enfoque presentado en el Capítulo 4 y es aplicable cuando la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  está claramente localizada en el espacio y el tiempo. Sólo necesita información *a priori* sobre los parámetros cinéticos y de difusión del colorante, y requiere ciertas hipótesis geométricas que permiten extrapolar información del “barrido lineal” del microscopio en información en todo el espacio. No necesita, sin embargo, ninguna información previa acerca de buffers endógenos, bombas o pérdidas presentes en el sistema experimental. El concepto subyacente es que las

series espacio-temporales de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  tienen inherentemente información sobre cómo estos numerosos procesos afectan su evolución, una idea que proviene de la teoría de análisis de series temporales [Packard et al., 1980, Mindlin et al., 1990, Gouesbet, 1992, Mindlin et al., 1998]. En este capítulo presentamos una descripción detallada del algoritmo, y estudiamos su validez probándolo tanto con “imágenes” generadas numéricamente como con señales fluorescentes adquiridas experimentalmente con un microscopio confocal, que representan imágenes del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales únicos voltaje-dependientes expresados en ovocitos de *Xenopus*.

## 5.3 Métodos

### 5.3.1 El algoritmo: Hipótesis básicas

Las imágenes de fluorescencia brindan información sobre la distribución de  $\text{Ca}^{2+}$  ligado al colorante,  $[\text{CaB}_F]$ . Dado que estamos interesadas en imágenes obtenidas en ovocitos, consideramos que el colorante sólo reacciona con  $\text{Ca}^{2+}$  de acuerdo al siguiente esquema cinético:



donde  $k_{\text{on},F}$  y  $k_{\text{off},F}$  son las constantes cinéticas a partir de las cuales se obtiene la constante de disociación,  $K_{d,F} \equiv k_{\text{off},F}/k_{\text{on},F}$ . Consideramos que el mismo está inicialmente distribuido uniformemente en el espacio, que no hay fuentes o sumideros de colorante durante el curso temporal del experimento y que su coeficiente de difusión no cambia cuando se le liga  $\text{Ca}^{2+}$ . Entonces, la ecuación de evolución para  $[\text{CaB}_F]$  está dada por la Ec. (4.10). De ahora en adelante, para simplificar la notación omitiremos el subíndice  $F$  al referirnos al indicador fluorescente y a sus constantes cinéticas.

Podemos calcular las derivadas temporal y espacial de  $[\text{CaB}]$  a partir de los datos experimentales. En esta sección consideraremos que las mismas pueden ser calculadas con perfecta precisión y discutiremos sus errores más adelante. Ahora, las imágenes de barrido lineal sólo contienen datos en una dimensión espacial,  $x$ . Consideramos, entonces, que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene simetría esférica (esto se satisface, en particular, si la liberación ocurre sobre una región muy pequeña que puede ser tratada como puntual) y que no hay nada más alrededor capaz de romper esta simetría. Con estas hipótesis,

la solución siempre tiene simetría esférica, (*i.e.*, sólo depende del tiempo y de la distancia,  $r$ , desde el sitio de liberación). Si la línea de barrido del microscopio pasa sobre el centro de la región de liberación, podemos calcular  $\nabla^2[CaB]$  utilizando sólo la información a lo largo de la dirección  $x$ . Luego analizaremos qué sucede si la línea de barrido no pasa exactamente por el centro del sitio de liberación. Calculando  $\nabla^2[CaB]$  y  $\partial[CaB]/\partial t$ , podemos obtener de la Ec. (4.10) el valor de  $R$  para todo punto en el espacio y el tiempo. Usando la Ec. (1.4), obtenemos la serie espacio-temporal de la variable de interés,  $[Ca^{2+}]$ . Hasta este punto, nuestro método es similar a algunos anteriores [Blatter et al., 1997]. Es también similar al método recientemente propuesto en [Soeller and Cannell, 2002], aunque difiere de él en el hecho de que aquí consideramos que el colorante sólo reacciona con  $\text{Ca}^{2+}$ .

Luego de su liberación, el  $\text{Ca}^{2+}$  difunde, reacciona con buffers y es recapturado por diferentes bombas. De todos estos procesos, queremos seleccionar tres; conocemos detalles de dos de ellos, la reacción con el colorante y la difusión; el tercer proceso es aquél que buscamos calcular, la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $Q_{Ca}$ . De esta manera, escribimos la ecuación de evolución para  $\text{Ca}^{2+}$  como:

$$\frac{\partial[Ca^{2+}]}{\partial t} = R + D_{Ca}\nabla^2[Ca^{2+}] + M + Q_{Ca}, \quad (5.2)$$

donde  $D_{Ca}$  es el coeficiente de difusión libre para  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\sim 220\mu\text{m}^2/\text{s}$  [Allbritton et al, 1992]) y el término  $M$  representa la suma de todos los procesos cuyos detalles son vagamente conocidos en cada experimento, que usualmente dependen de las particularidades de la célula que está siendo observada.

Siguiendo el planteo del Capítulo 4, supondremos que  $M$  puede ser aproximado por un ansatz de la forma de la Ec. (4.4). Aún si insertamos la Ec. (4.4) en (5.2), la Ec. (5.2) conserva la incógnita que queremos determinar: la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $Q_{Ca}$ . El hecho de que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  sea localizada en el espacio y el tiempo implica que  $Q_{Ca}$  se anula lejos de la fuente y en todo punto del espacio donde cese la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, hay puntos dentro del registro experimental donde  $Q_{Ca} = 0$  y  $M$  es, entonces, el único término incógnita de la Ec. (5.2). Utilizando el ansatz de la Ec. (4.4), podemos obtener aproximaciones numéricas para las funciones desconocidas  $g$ ,  $f$ ,  $h$  y  $k$ , a partir de los puntos del registro para los cuales  $Q_{Ca} = 0$ . Una vez obtenidas estas funciones, conocemos  $M$  como función de  $[Ca^{2+}]$  y sus derivadas. Por lo tanto, el único término desconocido de la Ec. (5.2) es ahora  $Q_{Ca}$ . Entonces, calculando las derivadas espaciales y temporales que se necesitan, en los puntos donde  $Q_{Ca} \neq 0$ , podemos obtener  $Q_{Ca}$  a partir de (5.2), simplemente haciendo  $Q_{Ca} = -R - D_{Ca}\nabla^2[Ca^{2+}] - M + \partial[Ca^{2+}]/\partial t$ . En este método está implícita

la hipótesis de que el modo en el cual los “otros procesos” afectan el comportamiento espacio-temporal de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , pueden ser escritos uniformemente a través del citosol como función de  $[\text{Ca}^{2+}]$  y sus derivadas. Esto es equivalente a decir que la distribución de bombas y las concentraciones totales de buffers son uniformes en el citosol. Estas hipótesis están siempre presentes en los métodos de tipo “backward” utilizados para obtener la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de imágenes fluorescentes.

### 5.3.2 El algoritmo: Implementación numérica

Describimos ahora el algoritmo que hemos desarrollado siguiendo las ideas expuestas en la sección previa. Tiene seis pasos principales que son ilustrados en la Fig. 5.1. Las imágenes en la Fig. 5.1 corresponden a “experimentos generados numéricamente” obtenidos simulando las Ecs. (1.2)-(1.3) con una fuente de la forma (2.4), con  $R_f = 0,15 \mu\text{m}$ ,  $t_s = 3\text{ms}$  y  $t_d = 10\text{ms}$ . El “experimento” en las figuras superiores tiene  $I_{Ca} = 0,1\text{pA}$  y el de las figuras inferiores,  $I_{Ca} = 0,3\text{pA}$ .

*Paso 1: Obtención de  $[\text{CaB}]$  a partir de los datos de fluorescencia.*

Consideramos que existe una relación lineal entre la fluorescencia,  $F$ , y  $[\text{CaB}]$  de la forma

$$[\text{CaB}](x_j, t_k) = [B]_T \frac{\frac{F(x_j, t_k)}{F_{min}} - 1}{\frac{F_{max}}{F_{min}} - 1}, \quad (5.3)$$

siendo  $F(x_j, t_k)$  la fluorescencia en el pixel  $(j, k)$ , de coordenadas  $x_j = j\Delta x$  y  $t_k = k\Delta t$ , donde  $\Delta x$  y  $\Delta t$  son las resoluciones espacial y temporal del experimento, respectivamente, y la coordenada  $x$  es la distancia a lo largo de la línea de barrido.  $F_{min}$  y  $F_{max}$  son los valores mínimo y máximo de fluorescencia correspondientes a tener el colorante libre de  $\text{Ca}^{2+}$  o saturado con  $\text{Ca}^{2+}$ , respectivamente. El cociente  $F_{max}/F_{min}$  puede ser determinado *a priori*, para cada condición experimental. La información significativa está contenida en los puntos con  $x > 0$  ó con  $x < 0$ , siendo el punto  $x = 0$  el que coincide con el centro de la fuente. Así, hay información redundante si la hipótesis de simetría esférica es correcta. Promediamos, entonces, la información en cada punto  $x > 0$  con la información del valor negativo correspondiente ( $x < 0$ ) y trabajamos con la mitad de la imagen de la señal .

La Fig. 5.1 *A* muestra la evolución espacio-temporal de la fluorescencia, como se obtiene típicamente en imágenes de barrido lineal, para dos experimentos numéricos. La Fig.5.1 *B* presenta la distribución,  $[CaB]$ , calculada a partir de la Ec. (5.3) usando la distribución de fluorescencia de la Fig. 5.1 *A* luego de tomar el promedio de  $F$  en más y menos  $x$ , para cada  $x$ . Utilizamos una escala de colores para cuantificar los valores de concentración: rojo corresponde a las concentraciones más altas mientras que azul corresponde a concentraciones basales.

*Paso 2: Obtención de la concentración de calcio libre.*

Una vez obtenida  $[CaB]$ , calculamos el término de reacción  $R$  a partir de la Ec. (4.10):

$$R = D_B \nabla^2 [CaB] - \frac{\partial [CaB]}{\partial t}. \quad (5.4)$$

$[Ca^{2+}](r, t)$  es calculado usando las Ecs. (1.4) y (5.4):

$$[Ca^{2+}] = \frac{k_{off}[CaB] - R}{k_{on}([B]_T - [CaB])}. \quad (5.5)$$

Notar que la Ec. (5.5) contiene un término de la forma  $([B]_T - [CaB])$  en el denominador. Por lo tanto, el método funcionará si ese término es lejano a cero, condición que se satisface cuando el colorante no está saturado. Ésta es exactamente la condición bajo la cual se realizan estos experimentos ópticos: se evita la saturación del colorante de modo de seguir, tanto como sea posible, los cambios en  $[Ca^{2+}]$  (comparar, por ejemplo, el valor máximo de  $[CaB]$  en las Figs. 5.1 y 5.7, con la concentración total de colorante,  $[B]_T = 40\mu M$ ). Notar también que obtener  $R$  y  $[Ca^{2+}]$  implica realizar derivadas numéricas con respecto al tiempo y al espacio. Dado que la diferenciación numérica es muy sensible al ruido en la señal de entrada, se pueden utilizar filtros para minimizar la amplificación del ruido. Como se ha explicado anteriormente, para el cálculo del Laplaciano consideramos simetría esférica alrededor del centro de la fuente.

*Paso 3: Obtención de  $M$  lejos de la fuente.*

Utilizando la Ec. (5.2), se determina  $M(r, t)$  localmente en regiones apartadas de la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$ , *i.e.*, donde  $Q_{Ca} = 0$ . La región grillada que se muestra en la Fig. 5.1 *D*, representa la región donde consideramos que no hay fuente.

Así, para los puntos dentro de esta zona tenemos:

$$M = \frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} - R - D_{\text{Ca}} \nabla^2[\text{Ca}^{2+}]. \quad (5.6)$$

En el caso de la Fig. 5.1 sabemos que la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  se extiende sobre una región de radio  $0,15 \mu\text{m}$ , se enciende en  $t = 3 \text{ ms}$  y permanece encendida 10 ms. Sin embargo, para datos experimentales, en este punto es necesario realizar estimaciones *a priori* sobre la distribución espacio-temporal de la fuente de liberación, ya que en general no se conoce la morfología precisa de la misma. En estos casos, descartamos una región del registro espacio-temporal que sobreestima el tamaño típico de la fuente y su duración, tratando de conservar suficientes datos, en las regiones grilladas, con concentraciones diferentes a la basal. Si hay  $N_{tot}$  puntos dentro de las regiones grilladas, tenemos  $N_{tot}$  igualdades de la forma (5.6) a partir de las cuales podemos obtener  $M$  en función de  $(r, t)$  para valores de  $r$  y  $t$  tales que  $Q_{\text{Ca}}(r, t) = 0$ . Como se explica en el siguiente paso,  $N_{tot}$  debe ser relativamente grande para que el algoritmo funcione.

*Paso 4: Compartimentalización de los valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$  alcanzados en una serie de experimentos.*

El paso anterior da  $M$  en función de  $(r, t)$  para valores de  $r$  y  $t$  tales que  $Q_{\text{Ca}}(r, t) = 0$ . Sin embargo, necesitamos  $M$  en función de  $[\text{Ca}^{2+}]$  y sus derivadas, de modo de poder usar el ansatz (4.4) para determinar las cuatro funciones (de  $[\text{Ca}^{2+}]$ ) incógnitas,  $f$ ,  $g$ ,  $h$  y  $k$ . A tal fin, identificamos los valores mínimo y máximo de  $[\text{Ca}^{2+}]$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_{min}$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_{max}$ , que se alcanzan en regiones con  $Q_{\text{Ca}} = 0$ , para el conjunto completo de experimentos que vamos a utilizar (todos los puntos en las regiones grilladas de la Fig. 5.1 *D*). Luego, dividimos el intervalo  $[[\text{Ca}^{2+}]_{min}, [\text{Ca}^{2+}]_{max}]$  en un conjunto finito de valores. Así, definimos un vector de valores de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre:

$$C_i = [\text{Ca}^{2+}]_{min} + \Delta C, \quad 1 \leq i \leq n, \quad (5.7)$$

donde  $\Delta C \equiv ([\text{Ca}^{2+}]_{max} - [\text{Ca}^{2+}]_{min})/n$  y  $n$  es el número de divisiones en los valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$  que consideraremos. Luego determinamos todos los puntos,  $\zeta_{j,k}(C_i) \equiv (r_j, t_k)(C_i)$ , en las regiones grilladas de las imágenes tales que  $C_i \leq [\text{Ca}^{2+}](r_j, t_k)(C_i) < C_{i+1}$ . Claramente, hay más de un dato,  $\zeta_{j,k}(C_i)$ , para cada valor de  $C_i$ . Esto se ilustra en la Fig. 5.1 *E*, donde graficamos el número total de puntos de grilla,  $N$ , (provenientes de todos los experimentos que están siendo utilizados) cuyos valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$  están contenidos en la

división de concentración,  $C$ . Cuando  $C$  aumenta,  $N$  disminuye significativamente. En particular,  $N(C) \geq 4$ , de modo de poder aplicar el algoritmo. Por lo tanto, se descartan todos los valores de  $C$  tales que  $N(C) < 4$ . La flecha en la Fig. 5.1  $E$  indica este corte y el detalle en la figura muestra una ampliación de la misma alrededor del valor de corte en este ejemplo. Como se describirá luego en más detalle, el valor de  $\Delta C$  debe ser elegido de forma de garantizar la aplicabilidad del algoritmo para un rango considerable de valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

*Paso 5: Obtención de las funciones  $g$ ,  $f$ ,  $h$  y  $k$ .*

La división de los valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$  reduce las funciones  $f$ ,  $g$ ,  $h$  y  $k$  a vectores definidos por:  $f_i = f(C_i)$ ,  $g_i = g(C_i)$ ,  $h_i = h(C_i)$ ,  $k_i = k(C_i)$ ,  $1 \leq i \leq n$ . Por lo tanto, ahora buscamos aproximaciones a esos vectores. Para cada valor de  $C_i$ , tenemos tantas versiones “compartimentalizadas” de la Ec. (4.4) de la forma:

$$M(\zeta_{j,k}(C_i)) = g_i \frac{\partial [\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} |_{\zeta_{j,k}(C_i)} + f_i \nabla^2 [\text{Ca}^{2+}] |_{\zeta_{j,k}(C_i)} + h_i |\nabla [\text{Ca}^{2+}] |_{\zeta_{j,k}(C_i)}^2 + k_i, \quad (5.8)$$

como puntos  $\zeta_{j,k}(C_i)$ . Las únicas incógnitas en la Ec. (5.8) son  $f_i$ ,  $g_i$ ,  $h_i$ ,  $k_i$ ,  $1 \leq i \leq n$ . Así, para determinar sus valores necesitamos por lo menos cuatro puntos,  $\zeta_{j,k}(C_i)$  para cada  $i$ ,  $1 \leq i \leq n$ . Esto impone algunas restricciones en los valores permitidos de  $\Delta C$ . Elegimos  $\Delta C$  de modo que el sistema (5.8) esté sobredeterminado (el número de datos,  $\zeta_{j,k}(C_i) \geq 4$ , para cada  $i$ ). De este modo,  $f_i$ ,  $g_i$ ,  $h_i$  y  $k_i$  pueden ser encontrados utilizando técnicas standard de minimización o de “singular value decomposition” (ver Apéndice de este capítulo). Una vez encontrados  $g_i$ ,  $f_i$ ,  $h_i$  y  $k_i$ , se realiza un ajuste global de la dependencia de cada función con  $[\text{Ca}^{2+}]$  (Fig. 5.1  $F$ ). A tal fin, utilizamos redes neuronales que proveen un ajuste no lineal en términos de tangentes hipérbolicas. Esto nos permite interpolar los valores de  $M$  para cualquier concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del rango  $[C_{min}, C_{max}]$ . Como se explicará en la sección de Resultados, al trabajar con registros de experimentos reales, una proporción muy pequeña del registro tiene valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$  que están más allá de  $C_{max}$  y son utilizados sólo para la estimación de las funciones  $f$ ,  $g$ ,  $h$  y  $k$ .

*Paso 6: Reconstrucción de la liberación de calcio.*

Finalmente, una vez conocidas las funciones  $g$ ,  $f$ ,  $h$  y  $k$ , es posible calcu-

lar  $M$  para cualquier punto espacial y cualquier tiempo utilizando la Ec. (4.4), aún donde y mientras hay liberación, dado que tanto  $[\text{Ca}^{2+}]$  como sus derivadas espaciales y temporales son conocidas para todo punto,  $(r, t)$ . Ahora, en un dado experimento,  $[\text{Ca}^{2+}]$  será mayor en la región con  $Q_{\text{Ca}} \neq 0$  que en la región donde no hay fuente. Sin embargo, la “tabla” de valores de  $M$  como función de  $[\text{Ca}^{2+}]$  y sus derivadas, es obtenida en la región con  $Q_{\text{Ca}} = 0$ . Si utilizamos datos de un experimento con un sólo evento de liberación, no tendremos información directa de los valores de  $M$  para los valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$  más grandes que ocurren en la región con  $Q_{\text{Ca}} \neq 0$ . Una posibilidad para superar esta dificultad es extrapolar las funciones,  $f$ ,  $g$ ,  $h$  y  $k$ , para obtener estimaciones de sus valores para estos valores altos de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , utilizando las expresiones obtenidas para concentraciones menores. La otra posibilidad es determinar estas funciones utilizando varias regiones espacio-temporales, provenientes tanto de diferentes sitios de liberación como de diferentes experimentos realizados en la misma célula (como se ilustra en la Fig 5.1 A, donde la imagen superior corresponde a una corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  menor y la imagen de más abajo, a una corriente mayor). De este modo, la información que proviene de la región alrededor del sitio con la mayor liberación, será utilizada sólo para determinar  $g$ ,  $f$ ,  $h$  y  $k$ . El algoritmo será entonces aplicado para obtener el flujo en las regiones con menor liberación. Seguiremos principalmente el último enfoque. Así, no podemos obtener una estimación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  subyacente en el sitio de mayor liberación. Como se discute en el Apéndice de este capítulo, obtuvimos mejores estimaciones de la corriente fijando  $f = g = h = 0$  durante toda la reconstrucción y usando sólo  $k \neq 0$ . Todas las figuras de este capítulo, excepto la Fig. 5.1, fueron realizadas de esta manera.

Una vez que tenemos  $M$  para todo  $(r, t)$  para un experimento particular, podemos volver a la Ec. (5.2) y resolver para  $Q_{\text{Ca}}$ :

$$Q_{\text{Ca}} = \frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} - R - D_{\text{Ca}}\nabla^2[\text{Ca}^{2+}] - M. \quad (5.9)$$

La Ec. (5.9) da la distribución de la fuente en el espacio y el tiempo en unidades de concentración por unidad de tiempo, por ejemplo,  $\mu\text{M}/\text{s}$  (Fig. 5.1 G). Integrando  $Q_{\text{Ca}}$  sobre el volumen sobre el cual no es despreciable, podemos también obtener el número de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  que entran en la región por unidad de tiempo, lo cual puede ser expresado como una corriente eléctrica,  $I_{\text{Ca}}$ , usando la información conocida sobre la carga del ion. Si  $Q_{\text{Ca}}(r, t)$  está en  $\mu\text{M}/\text{s}$ , entonces la corriente será obtenida, en  $\text{pA}$ , como:

$$I_{\text{Ca}}(t) = \gamma \int_0^{r_{\text{source}}} Q_{\text{Ca}}(r, t) 4\pi r^2 dr, \quad (5.10)$$



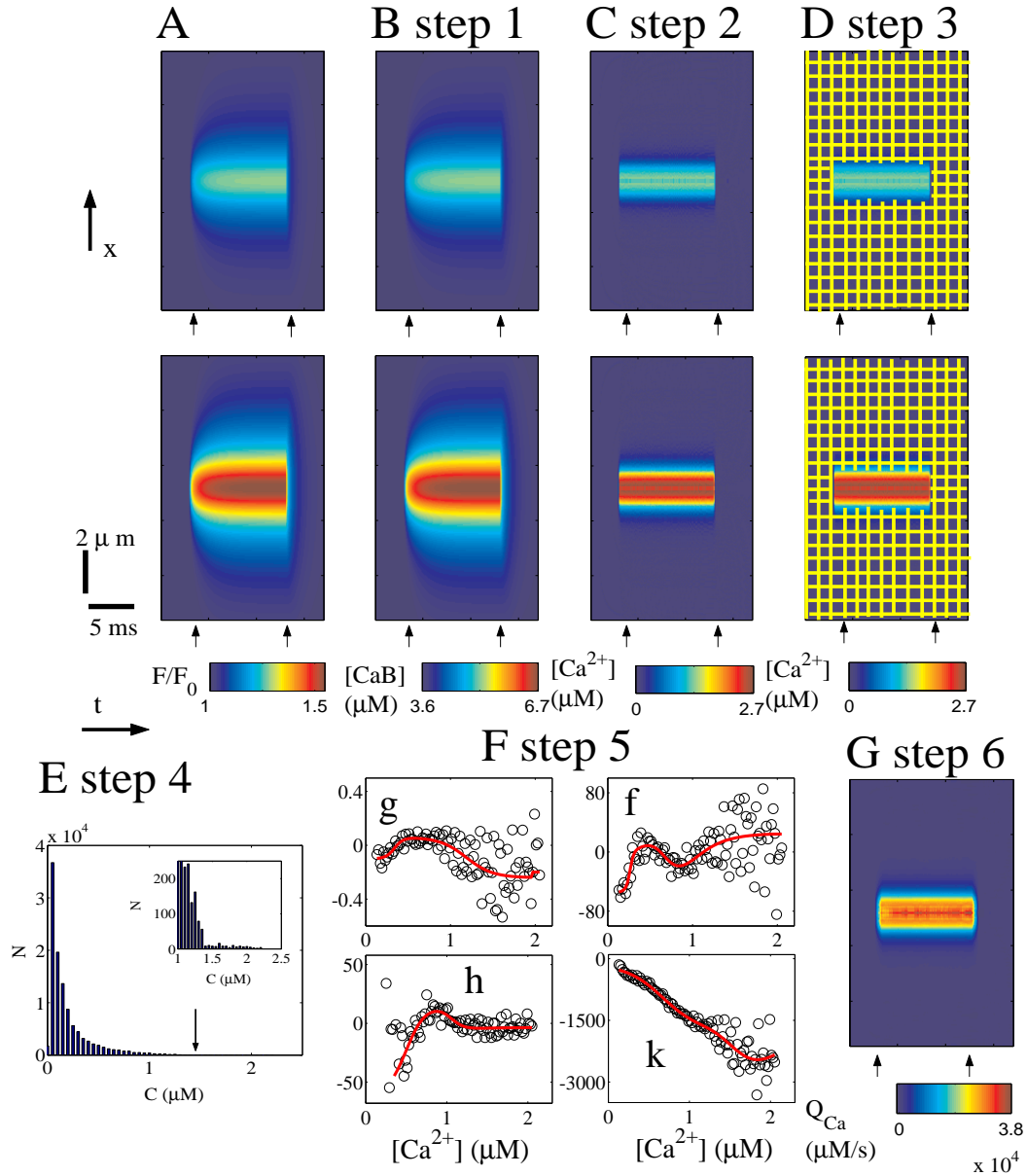


Figura 5.1: Esquema de los pasos principales del algoritmo. (A) Gráfico espacio-temporal de la distribución de fluorescencia de los dos experimentos (generados numéricamente) con los cuales trabajaremos. (B) y (C)  $[\text{CaB}]$  y  $[\text{Ca}^{2+}]$  con las mismas escalas espacio-temporales de (A). (D) Como (C) pero con una grilla superpuesta en las regiones donde  $Q_{\text{Ca}} = 0$ . (E) Número de puntos,  $(r_i, t_i)$ , en las regiones grilladas de (D) en función de  $C_i$ . (F) Funciones  $g$  (sin dimensiones),  $f$  (en unidades de  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ),  $h$  (en unidades de  $\mu\text{m}^2/(\mu\text{M}\text{s})$ ) y  $k$  (en unidades de  $\mu\text{M}/\text{s}$ ), en función de  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Los círculos corresponden a las soluciones que minimizan la función de mérito (5.23) para cada valor segmentado de  $[\text{Ca}^{2+}]$  (ver Apéndice ). Las curvas suaves corresponden a ajustes de los círculos, usando polinomios de grado 5. (G) Gráfico espacio-temporal de  $Q_{\text{Ca}}$  para el experimento de arriba en (A).

donde  $\gamma = 1,92 \times 10^{-4} pC/\mu m^3$  y elegimos  $r_{source}(t)$  de modo que

$$\int_{r_{source}}^{(1+\zeta)r_{source}} Q_{Ca}(r, t) r^2 dr \leq \kappa \int_0^{r_{source}} Q_{Ca}(r, t) r^2 dr, \quad (5.11)$$

con  $\zeta = 0,5$ , and  $\kappa = 0,3$ .

### 5.3.3 Simulaciones numéricas

La mayor parte de las simulaciones numéricas que utilizamos para probar la habilidad del método de reconstrucción corresponden a un modelo con  $\text{Ca}^{2+}$ , colorante y un buffer extra. Es decir, resolvemos las Ecs. (1.2)-(1.3) con  $N=2$  y  $q_{rem}$  dado por la Ec. (1.6), usando diferencias finitas en una grilla con simetría esférica, con pasos espacial y temporal de  $0,01 \mu m$  y  $10^{-7} s$ , respectivamente. Los parámetros del modelo están listados en la Tabla 5.1 (donde  $B$  corresponde al colorante, fluo-4 dextran y  $E$ , al buffer extra que es EGTA). Para algunos experimentos numéricos utilizamos  $q_{rem} = 0$ . El sistema simulado no es un modelo realista de la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula, pero resulta útil para probar el algoritmo. Para el término de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $Q_{Ca}$ , consideramos que es distinto de cero en una esfera de radio  $R_f$  ( $0,15 \mu m \leq R_f \leq 1,0 \mu m$  en las distintas simulaciones numéricas). El curso temporal de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  es, o bien un escalón “cuadrado” como el de la Ec. (2.4) o bien un escalón con caída exponencial:

$$Q_{Ca} = \begin{cases} \alpha I_{Ca} & \text{si } r < R_f \text{ y } t_s < t < t_s + t_d, \\ \alpha I_{Ca} \exp\left(-\frac{t-(t_s+t_d)}{\tau}\right) & \text{si } r < R_f \text{ y } t > t_s + t_d, \\ 0 & \text{otro caso} \end{cases} \quad (5.12)$$

donde  $\alpha = 5,2 \times 10^3 \mu M \mu m^3 / (\frac{4}{3} \pi R_f^3 pC)$ , de modo que  $Q_{ca}$  está en  $\mu M/s$  e  $I_{Ca}$  en  $pA$ . Todas estas simulaciones fueron iniciadas con una distribución uniforme para todas las especies en equilibrio con la concentración basal de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $50 nM$ .

En condiciones ideales, los registros de fluorescencia (generados numéricamente) no contienen “blurring” y representan mediciones tomadas justo sobre el centro del sitio de liberación. El concepto de blurring significa la degradación de una imagen, que puede estar causada por diferentes factores, entre ellos por el hecho de que cada punto de una imagen contiene luz de regiones vecinas. En los experimentos reales con los que hemos trabajado, cada punto de la imagen contiene luz proveniente de una región cuyas distancias

características, medidas como ancho completo para altura mitad (FWHM), son de  $\Delta_{xy} \sim 300nm$  sobre el plano focal y  $\Delta_z \sim 500 - 700nm$  en la dirección perpendicular al plano focal,  $z$ . Por otro lado, el sistema de adquisición de datos impone limitaciones sobre la frecuencia con que pueden tomarse los registros: la separación espacial entre dos puntos experimentales sucesivos es de  $\sim 150nm$ . Para estudiar la influencia de la resolución finita del microscopio y del proceso de adquisición de datos, se le aplicó un “coarse-graining” a las señales simuladas numéricamente. Computamos una fluorescencia con “coarse-graining”,  $F$ , a partir de la que tiene buena resolución numérica,  $\mathcal{F}$ , para puntos espaciales separados por  $d = 150nm$  a lo largo de la línea de barrido, ( $x_k = kd, y = 0, z = 0$ ), a través de la convolución de  $\mathcal{F}$  con una Gaussiana:

$$F(x_k, 0, 0, t) = \frac{1}{(2\pi)^{3/2} \sigma_{xy}^2 \sigma_x} \int dx dy dz \mathcal{F}(x, y, z, t) \times \quad (5.13)$$

$$\times \exp \left[ - \left( \frac{(x - x_k)^2 + y^2}{2\sigma_{xy}^2} + \frac{z^2}{2\sigma_z^2} \right) \right] \quad (5.14)$$

donde  $\sigma_w = \frac{\Delta_w}{\sqrt{(8 \ln(2))}}$  ( $w = xy, z$ ). En algunos casos, para analizar los efectos del procedimiento de blurring, aplicamos la Ec. (5.14) a cada punto de la simulación, (*i.e.* usando  $d$  igual a la resolución espacial de la simulación en lugar de  $150nm$ ). En otros casos, también aplicamos un procedimiento de deblurring a los datos con blurring, usando la inversa de la Ec. (5.14). También analizamos el efecto que un ruido de amplitud realista tiene sobre la aplicación del algoritmo a simulaciones numéricas. A tal fin realizamos simulaciones numéricas como se describió anteriormente y los datos resultantes sufrieron, luego, un proceso de blurring de acuerdo a la Ec. (5.14), conservando datos con las resoluciones espacial ( $d = 0, 15\mu m$ ) y temporal ( $\Delta t = 8ms$ ) de los experimentos. A los datos con blurring se les agregó ruido de distribución normal con desviación standard 0,12 en unidades de fluorescencia reescalada (ver Ec. (5.18)). Esta magnitud de ruido resulta similar a la observada en los registros experimentales que analizamos en este capítulo.

Las hipótesis sobre la simetría esférica de la señal y acerca de que la línea de barrido,  $x$ , corresponde a la dirección radial, son válidas sólo si la línea de barrido pasa por el centro del sitio de liberación. Aunque experimentalmente se ajusta el plano focal de modo que la liberación provenga de él, siempre hay pequeños errores y se puede esperar cierto corrimiento,  $d_o$ . Para estudiar cómo se comporta el algoritmo si la línea de barrido no pasa por el centro del sitio de liberación, tomamos los resultados de las simulaciones (hechas con simetría esférica), a una cierta distancia o corrimiento,  $d_o$ , del centro

de la fuente, para representar “datos fuera de foco”. Aplicamos, entonces, el algoritmo para estos datos fuera de foco generados numéricamente.

Finalmente, también realizamos algunas pruebas en un modelo más realista de la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, más específicamente, en una versión modificada del modelo presentado en [Baylor et al., 2002] para describir sparks de  $\text{Ca}^{2+}$  en músculo esquelético de rana. Las modificaciones que introducimos están relacionadas con el modo con el que tratamos al colorante y las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ . En primer lugar, consideramos que el colorante sólo reacciona con  $\text{Ca}^{2+}$ . Como sucede corrientemente, nuestro método no es capaz de tratar con situaciones en las cuales cantidades significativas de colorante se ligan a proteínas y emiten fluorescencia. Además, usamos la Ec. (1.6) para la recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia reservorios internos [Soeller and Cannell, 2002]. Más allá de esto, conservamos todas las reacciones consideradas en [Baylor et al., 2002], como se describe en la Tabla 5.2, y usamos una fuente de la forma (2.4) con  $R_f = 0,15\mu\text{m}$ ,  $t_d = 10\text{ms}$  y diferentes valores de  $I$ . El principal objetivo de estas simulaciones es probar la aplicabilidad del algoritmo en presencia de numerosos buffers de cinéticas diferentes, y este modelo modificado es útil para este propósito.

### 5.3.4 Pruebas realizadas sobre el algoritmo

En los casos de imágenes simuladas numéricamente, los resultados pueden ser comparados fácilmente con información disponible de las simulaciones. En particular, comparamos el curso temporal de la corriente total,  $I_{Ca}(t)$ , obtenido de la Ec. (5.10) y el promedio temporal de su magnitud:

$$\overline{I_{Ca}} \equiv \frac{1}{t_d} \int_{t_s}^{t_s+t_d} dt I_{Ca}(t), \quad (5.15)$$

usando la fuente que predice el algoritmo y la utilizada en la simulación. En el caso de fuentes de la forma (2.4), también calculamos el promedio temporal:

$$\overline{Q_{Ca}} \equiv \frac{1}{t_d} \int_{t_s}^{t_s+t_d} dt Q_{Ca}(r, t), \quad (5.16)$$

usando la fuente obtenida por el algoritmo y la utilizada en la simulación. Esto da información sobre cómo determina el algoritmo la distribución espacial de la fuente.

Tabla 5.1: Parámetros utilizados en las simulaciones con colorante y un buffer extra.

Biofísicos		Computacionales	
$D_{Ca}$	$220 \mu\text{m}^2/s$	$\Delta r$	$0,01 \mu\text{m}$
$D_{CaB}$	$50 \mu\text{m}^2/s$	$\Delta t$	$10^{-7} s$
$D_{CaE}$	$113 \mu\text{m}^2/s$	$R_f$	$0,15 - 1,0 \mu\text{m}$
$[Ca^{2+}]_{rest}$	$0,05 \mu\text{M}$	$t_d$	$1 - 15 \cdot 100^{-3} s$
$[B]_T$	$40 \mu\text{M}$		
$[E]_T$	$1000 \mu\text{M}$		
$k_{on}^B$	$100,0 \mu\text{M}^{-1} s^{-1}$		
$k_{off}^B$	$400,0 s^{-1}$		
$k_{on}^E$	$1,5 \mu\text{M}^{-1} s^{-1}$		
$k_{off}^E$	$0,3 s^{-1}$		
$k_1$	$200 \mu\text{M} s^{-1}$		
$k_2$	$0,184 \mu\text{M}$		
$m$	$3,9$		

Tabla 5.2: Parámetros y reacciones del modelo con varios buffers.

Especie	Concentración en reposo	Coeficiente de Difusión		
$[Ca^{2+}]_{libre}$	$0,05\mu M$	$319\mu m^2/s$		
$[Mg^{2+}]_{libre}$	$1000\mu M$	–		
<i>ATP</i>	$8000\mu M$	$149\mu m^2/s$		
<i>Troponina</i>	$360\mu M$	0		
<i>Parvalbumina</i>	$1500\mu M$	$15,9\mu m^2/s$		
<i>B(colorante)</i>	$40 - 1000\mu M$	$50\mu m^2/s$		

Reacción	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$
$Ca^{2+} + ATP \rightleftharpoons CaATP$	$15,6\mu M^{-1}s^{-1}$	$34467s^{-1}$	$2200\mu M$
$Ca^{2+} + B \rightleftharpoons CaB$	$100\mu M^{-1}s^{-1}$	$400s^{-1}$	$4\mu M$
$Ca^{2+} + Parv \rightleftharpoons CaParv$	$47,9\mu M^{-1}s^{-1}$	$0,574s^{-1}$	$0,012\mu M$
$Mg^{2+} + Parv \rightleftharpoons MgParv$	$0,379\mu M^{-1}s^{-1}$	$3,45s^{-1}$	$91\mu M$
$Ca^{2+} + Trop \rightleftharpoons CaTrop$	$101,7\mu M^{-1}s^{-1}$	$132s^{-1}$	$1,3\mu M$

### 5.3.5 Experimentos

Describimos aquí los experimentos sobre los que trabajamos, que fueron realizados en el laboratorio del Dr. I. Parker. Los experimentos corresponden a ovocitos defoliculados de *Xenopus laevis* que expresan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N, activados por voltaje (ver [Demuro and Parker, 2003]). Brevemente, 2-4 días después de la inyección de mRNA, los ovocitos son inyectados con el indicador fluorescente fluo-4 dextran (concentración final intracelular de  $40 \mu\text{M}$ ) y 1 h después son ubicados en un compartimiento bañado en solución de Ringer que contiene 6 mM de calcio. La señal fluorescente es detectada a través de un orificio confocal con resoluciones lateral y axial de alrededor de 300 y 500 nm, respectivamente. Los experimentos se realizaron en modo de barrido lineal ( $0,15 \mu\text{m}/\text{pixel}$ ;  $8\text{ms}/\text{line}$ ) y las imágenes cercanas a la membrana fueron construidas y analizadas usando rutinas escritas en el lenguaje de programación IDL. El voltaje de membrana normalmente se fijó en -60 mV usando la técnica convencional de dos electrodos para fijar voltaje, y las señales transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron evocadas llevando el voltaje de membrana del ovocito a valores más positivos que -25 mV. Fuertes depolarizaciones de hasta +30 mV provocaron señales de fluorescencia espacialmente homogéneas que progresivamente se hicieron más localizadas, tipo escalón, durante escalones de voltaje más débiles, alcanzando -25 mV. Sobre la evidencia presentada en [Demuro and Parker, 2003], consideramos estas señales pulsátiles como provenientes del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un único canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N, y nos referimos a ellas como “sparklets”.

Todos los datos presentados aquí fueron obtenidos usando el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  fluo-4 dextran. Este colorante de baja afinidad presenta baja fluorescencia para niveles basales de  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre y grandes incrementos en la señal en presencia de altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , tales que pueden producirse señales locales de fluorescencia,  $(\Delta F/F)$ , de cinco órdenes de magnitud o mayores. Los parámetros que consideramos para fluo-4 dextran (baja afinidad,  $K_d \sim 4\mu\text{M}$ ) son:  $F_{max}/F_{min} \sim 20$  en el ovocito,  $k_{on} = 100\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{off} = 400\text{s}^{-1}$ , mientras que  $D = 50\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ . La concentración de colorante en el ovocito es de aproximadamente  $40\mu\text{M}$  y la concentración de reposo de  $\text{Ca}^{2+}$  es considerada como  $[\text{Ca}^{2+}]_{rest} \approx 50\text{nM}$ .

### 5.3.6 Procesamiento de señales experimentales

En el caso de señales experimentales, el punto de partida (a menos que se aclare lo contrario) es la distribución suavizada de fluorescencia que se obtiene promediando la señal en bruto para cada punto espacio-temporal con sus ocho primeros vecinos. Computamos, entonces, la fluorescencia (teórica) basal promedio,  $F_{rest}$ , invirtiendo la Ec. (5.3), usando la concentración basal  $[CaB]_{rest} = [Ca^{2+}]_{rest}[B_T]/(K_d+[Ca^{2+}]_{rest})$  que corresponde a  $[Ca^{2+}]_{rest}=50nM$ ,  $K_d = 4\mu M$  y  $[B_T] = 40\mu M$ . Esto da

$$\frac{F_{rest}}{F_{min}} = 1,23 \quad (5.17)$$

Calculamos luego la fluorescencia basal media en la posición  $x_j$  sobre la línea de barrido,  $\overline{F_{rest}}(x_j)$ , como el promedio temporal del valor de la fluorescencia en el punto espacial,  $x_j$ , antes de que haya liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . En ausencia de inhomogeneidades, y considerando que  $[Ca^{2+}]_{rest}=50nM$  antes de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , debería valer  $F_{rest} = \overline{F_{rest}}(x_j)$  y esto debería ser independiente de  $(x_j)$ ; *i.e.*  $\overline{F_{rest}}(x_j) = \langle F_{rest} \rangle = F_{rest}$ . En cualquier experimento real, esta igualdad es sólo aproximada. Así, colocando  $F_b/\overline{F_{rest}}(x_j) \approx 1$  en la Ec. (5.17), obtenemos

$$\frac{F(x_j, t_k)}{F_{min}} \approx \frac{F(x_j, t_k)}{\overline{F_{rest}}(x_j)} \frac{F_{rest}}{F_{min}} = 1,23 \frac{F(x_j, t_k)}{\overline{F_{rest}}(x_j)}. \quad (5.18)$$

Utilizamos esta aproximación para calcular  $[CaB]$  a partir de la Ec. (5.3). El cociente  $F(x_j, t_k)/\overline{F_{rest}}(x_j)$  en (5.18) es la fluorescencia reescalada,  $F/F_0$ , que mostramos en los gráficos de señales experimentales.

Para averiguar hasta qué punto los resultados del algoritmo son afectados por la presencia de ruido, suavizamos las imágenes experimentales aún más, utilizando una función de ajuste no lineal del MATLAB Neural Network Toolbox (The Mathworks, Natick, MA). Los parámetros del ajuste, que pueden escribirse en términos de tangentes hiperbólicas, minimizan el error cuadrático medio entre la función suave y los datos. Comparamos los resultados que se obtienen empezando con estas imágenes suavizadas con aquéllos obtenidos de imágenes en las cuales sólo se realizó el pre-procesamiento de 8 vecinos. Mostramos las comparaciones en la sección Resultados.



### 5.3.7 Estimación de errores

Para estimar el error involucrado en la Ec. (5.18), computamos la fluorescencia basal promedio sobre todos los pixeles de la imagen,  $N_{pixels}$ , previo a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\langle F_{rest} \rangle \equiv \sum_j \sum_k (F(x_j, t_k) / N_{pixels})$ , y su desviación standard,  $\overline{\sigma_F} = (\sum_j \sum_k (F(x_j, t_k) - \langle F_{rest} \rangle)^2 / N_{pixels})^{1/2}$ . Consideramos que  $\langle F_{rest} \rangle = F_{rest}$ . Luego consideramos que la desviación standard del nivel de fluorescencia basal, para cualquier punto (anterior a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ ), está dada por  $\sigma_F = \overline{\sigma_F} / \sqrt{N_{pixels}}$ . Por lo tanto, consideramos que el error en aproximar  $\frac{F(x_j, t_k)}{F_{min}}$  por la Ec. (5.18) es  $\frac{F(x_j, t_k)}{F_{rest}(x_j)} \frac{\sigma_F}{F_{min}}$ . Más aún, la medición de la fluorescencia siempre acarrea un error,  $\Delta F$ . Teniendo en cuenta estas dos fuentes de error y usando las Ecs. (5.17), (5.3) y  $F_{rest} = \langle F_{rest} \rangle$ , estos errores se propagan a un error en  $[CaB]$  dado por:

$$\Delta[CaB] = \frac{1,23[B]_T}{\frac{F_{max}}{F_{min}} - 1} \left( \frac{F(x_j, t_k)}{F_{rest}(x_j)} \frac{\sigma_F}{\langle F_{rest} \rangle} + \frac{\Delta F}{F_{rest}} \right). \quad (5.19)$$

Para las señales experimentales consideramos que el proceso de conteo de fotones es un proceso de Poisson, de modo que la raíz cuadrada de la desviación standard y el número medio de fotones contados para un evento de un dado tamaño, son iguales. Así, consideramos que  $\Delta F / \sqrt{F} = \sigma_F / \sqrt{F_{rest}}$ . La Ec. (5.19) con  $\Delta F = \sigma_F \sqrt{F / F_{rest}}$  es el punto de partida para el cálculo de errores en el caso de señales experimentales. Para el caso de simulaciones numéricas con ruido, en las cuales se agrega en forma directa ruido con distribución normal a  $[CaB]$  con “blurring”, usamos la Ec.(5.19) con  $\Delta F / \sqrt{F_{rest}} = 0,12$  y  $\sigma_F = 0$ . En el caso de simulaciones numéricas libres de ruido, consideramos que  $[CaB]$  no tiene errores.

Una vez conocida  $[CaB]$ , el paso siguiente en el algoritmo requiere el cálculo de derivadas temporales y espaciales. Para calcular la derivada primera de una función,  $\Phi$ , a un tiempo  $t_i$ , tomamos un total de 3 puntos,  $\Phi(t_{i-1})$ ,  $\Phi(t_i)$ ,  $\Phi(t_{i+1})$  y calculamos la pendiente de la recta que da el mejor ajuste a esos tres puntos, usando cuadrados mínimos. De este modo, también obtenemos un error asociado a la derivada. Derivadas espaciales y derivadas de órdenes superiores son calculadas similarmente. Estos errores se propagan, entonces, de modo de obtener los errores en todas las cantidades de interés. El procedimiento de ajuste en el *Paso 5* del algoritmo introduce nuevos errores. Como se explica en el Apéndice, este ajuste es realizado minimizando, para cada valor compartimentalizado de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $C_i$ , la suma de la raíz cuadrada de la diferencia entre los miembros izquierdo y derecho de la

Ec. (5.8). Como resultado de este proceso, los errores en  $g_i$ ,  $f_i$ ,  $h_i$  y  $k_i$ , son determinados del modo standard (ver Apéndice). Estos errores son, luego, propagados para obtener el error en  $M$ , que también se propaga en un error para  $Q_{Ca}$  y, consecuentemente, para la corriente dada por el algoritmo.

### 5.3.8 Datos cinéticos obtenidos de registros experimentales

Los registros experimentales permiten visualizar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde aperturas individuales de los canales. Así, dada la serie temporal de la corriente reconstruida,  $I$ , es posible obtener cierta información cinética, como los tiempos medios de subida, de apertura y de cerrado de los canales. En este capítulo nos concentraremos en el tiempo de apertura,  $t_o$ , el cual, para cada evento, es calculado como  $t_o = t_2 - t_1$ , donde  $I(t_2) = I(t_1) = \text{máx}(I)/2$ , siendo  $\text{máx}(I)$  el máximo valor alcanzado por la corriente durante el evento de interés. Para establecer una comparación, también lo calculamos usando las series temporales de la fluorescencia promediada sobre una región de  $0,45\mu\text{m}$  alrededor del centro de liberación, como se hace en [Demuro and Parker, 2003].

## 5.4 Resultados

### 5.4.1 Tests numéricos para el algoritmo de reconstrucción

Mostramos aquí los resultados de aplicar el algoritmo a imágenes simuladas numéricamente, para las cuales conocemos todos los detalles, de modo que podemos comparar las estimaciones dadas por el algoritmo con los valores reales utilizados en las simulaciones. En particular, investigamos cuán bien el algoritmo puede determinar el tamaño y geometría de la fuente, el curso temporal de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y la corriente total. Las simulaciones numéricas fueron realizadas con las resoluciones detalladas en las Tabla 5.1. Sin embargo, para las imágenes y reconstrucciones sólo se conservaron puntos separados por  $10^{-4}\text{s}$  en el tiempo, a menos que se aclare lo contrario.

### Fuente (única) tipo escalón

El primer conjunto de tests corresponde a simulaciones de las Ecs. (1.2)-(1.3) con liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de la forma (2.4). Este ejemplo es como el descrito en la Fig. 5.1, para la cual  $R_f = 0,15\mu\text{m}$ ,  $t_s = 3\text{ms}$  y  $t_d = 10\text{ms}$ . Podemos ver en la Fig. 5.1 *G* que el algoritmo determina la distribución espacial de la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  y su curso temporal razonablemente bien: la fuente desaparece para radios mayores que  $0,15\mu\text{m}$  y tiempos mayores que  $13\text{ms}$ . También podemos ver que las funciones de ajuste  $f$ ,  $g$  y  $h$  son relativamente pequeñas para  $[\text{Ca}^{2+}]$  suficientemente grande, y que los valores individuales,  $f_i$ ,  $g_i$  y  $h_i$ , obtenidos para cada valor compartimentalizado de  $[\text{Ca}^{2+}]$  están dispersos alrededor del valor medio que provee el ajuste global. Por esta razón, probamos el algoritmo fijando  $g = f = h = 0$  y obtuvimos estimaciones de corriente que son un 20% mejores (ver Apéndice). Todas las figuras que mostramos en este capítulo fueron obtenidas de esta manera (salvo la Fig. 5.1).

En la Fig. 5.2 mostramos un gráfico de la magnitud de la corriente reconstruida obtenida mediante las Ecs. (5.10) y (5.15) en función de la corriente utilizada en las simulaciones,  $I_{Ca}$ , para simulaciones hechas con  $R_f = 0,15\mu\text{m}$ ,  $t_s = 3\text{ms}$  y  $t_d = 10\text{ms}$ . La pendiente del ajuste lineal es de  $0,96 \pm 0,04$ . Esta figura fue realizada usando simulaciones con  $I_{Ca}$  hasta  $3,9\text{pA}$ .

Analizamos, ahora, la capacidad que tiene el algoritmo para distinguir entre diferentes radios y duraciones de la fuente. A tal fin, realizamos simulaciones con distintos radios de la fuente o distintas duraciones de liberación, y aplicamos el *Paso 6* para obtener  $Q_{Ca}$ , usando las funciones  $g$ ,  $f$ ,  $h$ , y  $k$  obtenidas para simulaciones similares pero con  $R_f = 0,15\mu\text{m}$  y  $t_d = 10\text{ms}$  fijos. En la Fig. 5.3 *A* mostramos las corrientes obtenidas con el algoritmo y la utilizada en las simulaciones, que fueron hechas con  $I_{Ca} = 1\text{pA}$ ,  $R_f = 0,15\mu\text{m}$ , y tres valores diferentes de  $t_d$ . Observamos que el algoritmo captura muy adecuadamente los tiempos para los cuales la corriente se enciende (flechas hacia arriba) y se apaga (flechas hacia abajo), dando una correcta estimación de la corriente de liberación. Similarmente, en la Fig. 5.3 *B* mostramos el cociente entre el promedio temporal de la fuente obtenida con el algoritmo y la amplitud de la fuente utilizada en las simulaciones, que fueron hechas con  $t_d = 10\text{ms}$  y tres valores de  $I_{Ca}$  y  $R_f$ , conservando constante la magnitud de  $Q_{Ca}$ . Observamos que el algoritmo reconoce diferentes tamaños de fuente y estima correctamente su radio. Esta prueba brinda también una

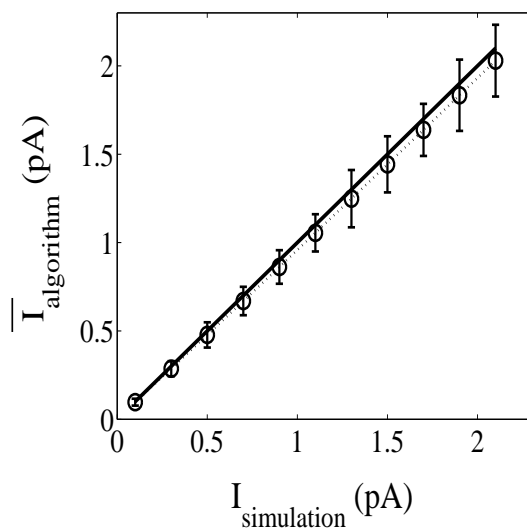


Figura 5.2: Aplicación del algoritmo a datos generados por integración numérica de las Ecs. (1.2)-(1.3) con una fuente de la forma (2.4). Las corrientes obtenidas con el algoritmo se muestran en función de las utilizadas en las simulaciones. También se grafican el mejor ajuste lineal para estos datos, pendiente  $0,96 \pm 0,04$  (línea punteada) y la función identidad (línea llena).  $I$  corresponde a  $I_{Ca}$ .

validación para nuestra hipótesis de que las funciones  $g$ ,  $f$ ,  $h$  y  $k$  no dependen de los parámetros de la fuente, pero sí de las condiciones del medio que rodea a la fuente.

### Fuente (única) con decaimiento exponencial

El segundo conjunto de tests corresponde a simulaciones de las Ecs. (1.2)-(1.3) con liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de la forma (5.12),  $q_{rem} = 0$ ,  $R_f = 0,15\mu m$ ,  $t_d = 5ms$ ,  $I_{Ca} = 1pA$  y  $\tau = 2ms$ . El objetivo aquí es averiguar cuán bien el algoritmo captura el comportamiento temporal de la fuente cuando ésta no se apaga en forma abrupta. En la Fig. 5.3 *C* mostramos la corriente utilizada en las simulaciones (línea llena) y la obtenida con el algoritmo (línea punteada). Observamos que el algoritmo es capaz de detectar el decaimiento exponencial de la liberación, logramos estimar su constante de tiempo con error inferior al 1%, como se muestra en la Fig. 5.3 *D*.

### Fuente tipo escalón con aperturas múltiples

Estudiamos ahora si el algoritmo es capaz de distinguir sucesivas aperturas y cerrados de una única fuente esférica. La Fig. 5.4 *A* muestra la distribución de  $\text{Ca}^{2+}$  ligado al colorante, a partir de una simulación de las Ecs. (1.2)-(1.3) con liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de la forma (2.4), con  $R_f = 0,15\mu m$  e  $I_{Ca} = 1pA$ , pero donde la fuente se abre y se cierra tres veces, con pulsos de duraciones 1; 2,5 y 1ms, respectivamente. Entre el cerrado y la apertura sucesiva, no hay actividad. En este caso, sólo se utilizaron puntos con  $r > 0,15\mu m$  (para todos los tiempos) para implementar los *Pasos 4* y *5* del algoritmo. La Fig. 5.4 *B* muestra la fuente reconstruida, donde puede verse lo bien que el algoritmo distingue entre regiones activas e inactivas. El algoritmo también reconoce las tres aperturas sucesivas y la duración de los pulsos, como se observa en la Fig. 5.4 *C*, donde se comparan la corriente obtenida con el algoritmo (línea punteada) y la utilizada en la simulación (línea llena). Como se evidencia en la figura, la magnitud de la corriente es estimada con la misma exactitud, independientemente de la duración del evento de liberación.

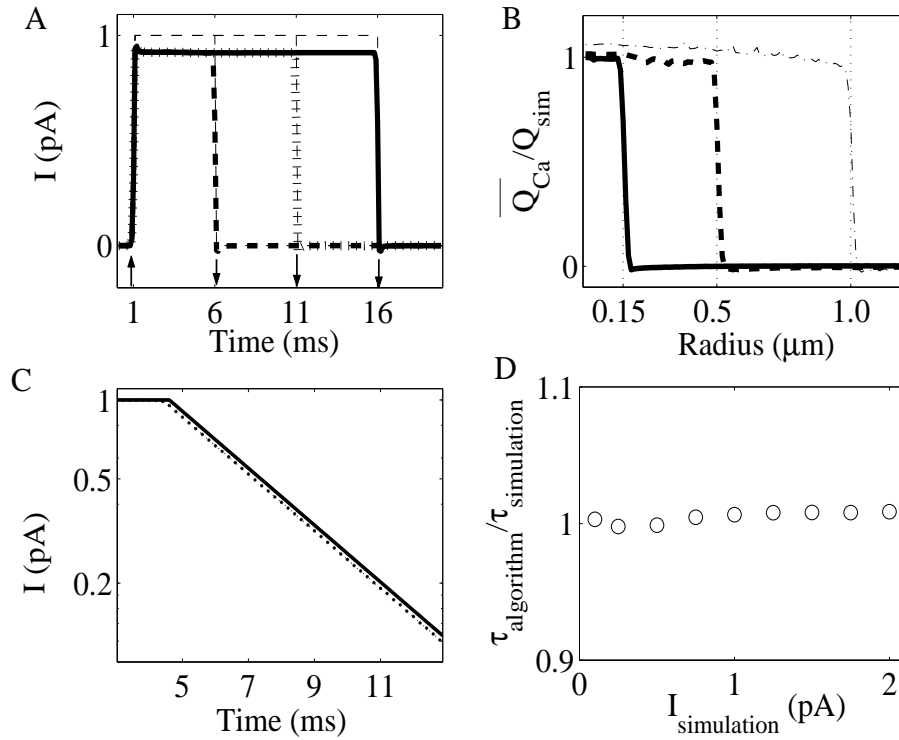


Figura 5.3: Capacidad del algoritmo de distinguir diferentes parámetros de la fuente. Los datos simulados corresponden a una fuente de la forma (2.4) (A-B), o a una fuente de la forma (5.12) con  $R_f = 0,15\mu\text{m}$ ,  $t_d = 5\text{ms}$ ,  $\tau = 2\text{ms}$  y  $k_1 = 0$  (C-D). (A) Corrientes en función del tiempo, obtenidas con el algoritmo (línea cortada de trazo grueso, línea cortada y punteada y línea llena) y utilizadas en las simulaciones (líneas cortadas de trazo fino). Simulaciones hechas con  $I_{Ca} = 1\text{pA}$ ,  $R_f = 0,15\mu\text{m}$ ,  $t_s = 1\text{ms}$  (indicado por una flecha hacia arriba) y  $t_d = 5, 10, 15\text{ms}$ , respectivamente (indicado por una flecha hacia abajo). (B) Cociente entre el promedio temporal de la fuente obtenida con el algoritmo,  $\overline{Q_{Ca}}$ , y la amplitud de la fuente utilizada en la simulación, en función del espacio. Las simulaciones fueron hechas con  $t_d = 10\text{ms}$  e  $I_{Ca} = 0,1\text{pA}$  y  $R_f = 0,15\mu\text{m}$ ;  $I_{Ca} = 3,7\text{pA}$  y  $R_f = 0,5\mu\text{m}$ ; e  $I_{Ca} = 29,6\text{pA}$  y  $R_f = 1\mu\text{m}$ , respectivamente (los radios de la fuente están indicados con líneas punteadas). (C) Corriente utilizada en las simulaciones (línea llena) y obtenida con el algoritmo (línea punteada), en función del tiempo, para un caso con decaimiento exponencial e  $I_{Ca} = 1\text{pA}$ . (D) Cociente entre las constantes de decaimiento obtenidas con el algoritmo y aquellas utilizadas en las simulaciones, en función de  $I_{Ca}$ . En las figuras,  $I$  corresponde a  $I_{Ca}$ .

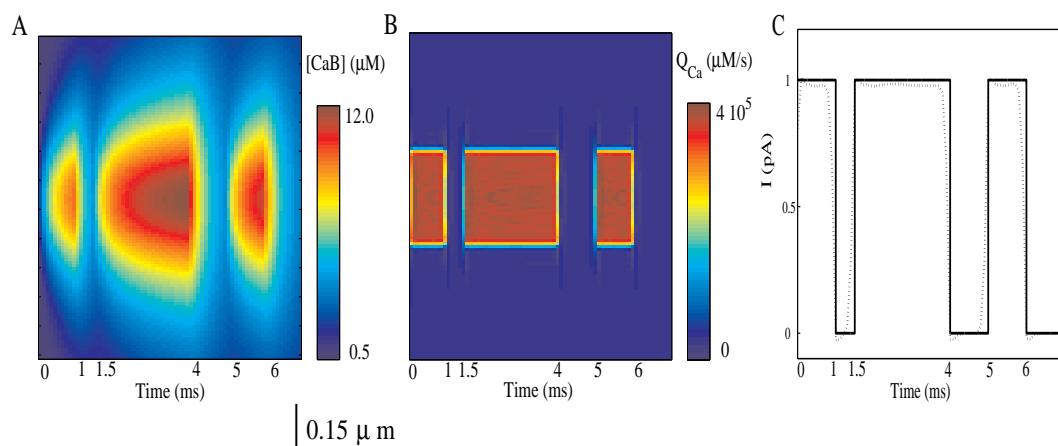


Figura 5.4: Capacidad del algoritmo para reconocer aperturas y cerrados sucesivos de la fuente. Los datos simulados corresponden a fuentes de la forma (2.4) con  $R_f = 0,15\mu\text{m}$ ,  $I_{Ca} = 1\text{pA}$  y  $t_s = 0$ ,  $t_d = 1\text{ms}$ ;  $t_s = 1,5\text{ms}$ ,  $t_d = 2,5\text{ms}$ ;  $t_s = 5\text{ms}$ ,  $t_d = 1\text{ms}$ ; respectivamente. (A) Distribución de calcio ligado a colorante obtenida de la simulación. (B) Fuente reconstruida. (C) Corrientes utilizadas en las simulaciones (línea llena) y reconstruidas (línea punteada), en función del tiempo.  $I$  corresponde a  $I_{Ca}$ .

### Efectos de las mediciones fuera de foco y del blurring óptico

En la Fig. 5.5 *A* presentamos los resultados obtenidos cuando aplicamos el algoritmo a datos fuera de foco, generados numéricamente (datos con un corrimiento o “defocus”,  $d_o$ ). Las simulaciones fueron realizadas con los mismos parámetros que en la Fig. 5.2. Los círculos corresponden a resultados en foco ( $d_o = 0$ , pendiente= $0,96 \pm 0,04$ ), los cuadrados a  $d_o = 0,0707\mu m$  (pendiente= $0,81 \pm 0,04$ ); diamantes a  $d_o = 0,1118\mu m$  (pendiente= $0,71 \pm 0,04$ ) y asteriscos a  $d_o = 0,1414\mu m$  (pendiente= $0,50 \pm 0,03$ ). La línea llena es la función identidad,  $I_{Ca \text{ algorithm}} = I_{Ca \text{ simulation}}$ . Como se esperaba, la corriente reconstruida se hace menor cuando  $d_o$  aumenta. Sin embargo, esta tendencia se atenúa cuando se agrega blurring realista (usando la Ec. (5.14) con  $\Delta_{xy} = 0,3\mu m$ ,  $\Delta_z = 0,7\mu m$ , y  $d = 0,01\mu m$ ). En la Fig. 5.5 *B* mostramos una comparación de las curvas que obtenemos sin efectos fuera de foco o blurring (círculos abiertos), sólo con blurring realista (cuadrados), con blurring y defocus con  $d_o = 0,1414\mu m$  (triángulos) y con sólo defocus con  $d_o = 0,1414\mu m$  (asteriscos). Las pendiente en este caso son 0,96; 0,85; 0,71 y 0,50, respectivamente. Cuando trabajamos con imágenes reales generadas por fuentes altamente localizadas, podemos tratar el problema de tener cierto “offset”, pre-analizando la distribución de  $[\text{Ca}^{2+}]$ . La solución estacionaria de la ecuación de difusión para  $[\text{Ca}^{2+}]$  en presencia de una fuente puntual de corriente,  $I$ , situada en el origen, está dada por  $[\text{Ca}^{2+}]_s = 414 \frac{I}{D_{Ca} r} \frac{\mu M \mu m^3}{pC}$ . Si tomamos una “línea de barrido” de esta solución a lo largo de la dirección  $x$ , sin offset, entonces la distribución  $[\text{Ca}^{2+}]_s(x)$  para  $y = 0 = z$  está fuertemente localizada alrededor de  $x = 0$ . Si tomamos la “línea de barrido” con un offset  $d_o \equiv \sqrt{y^2 + z^2}$ , el ancho mitad de  $[\text{Ca}^{2+}]_s(x)$  es  $\sqrt{3}d_o$ . Así, si estamos tratando de reconstruir fuentes que están contenidas dentro de un pixel de la imagen, entonces, cada vez que obtengamos una distribución de  $[\text{Ca}^{2+}]$  cuyo ancho mitad sea mayor que dos pixeles, podemos concluir que el offset es mayor que el tamaño del pixel. Luego, podemos utilizar este pre-procesamiento para acotar el valor del offset o para descartar ciertas imágenes.

En las Figs. 5.5 *C-F* mostramos los efectos del blurring óptico y de la resolución espacial finita cuando no hay offset. Las simulaciones fueron realizadas como antes, pero luego tienen un blurring de acuerdo a la Ec. (5.14). En la Fig. 5.5 *C* conservamos todos los puntos de la simulación ( $x_k$  con  $d = 0,01\mu m$  en (5.14)), y en el resto, conservamos puntos cada  $0,15\mu m$ , para simular la resolución espacial del equipo experimental de adquisición de datos. Dado que hay menos puntos disponibles cuando  $d = 0,15\mu m$ , sólo un subconjunto de las corrientes reconstruidas en *C* pueden ser reconstru-



idas en  $D$ . En las Figs. 5.5  $C$  y  $D$ , el algoritmo de reconstrucción se aplica directamente a los datos con blurring, sin hacerles un “deblurring” previo. Los círculos corresponden a datos limpios, los cuadrados a  $\Delta_{xy} = 0,3\mu m$ ,  $\Delta_z = 0,7\mu m$  (el blurring esperado en experimentos reales) y los diamantes a  $\Delta_{xy} = 0,5\mu m$ ,  $\Delta_z = 0,9\mu m$ . En todos estos casos, la relación entre la corriente reconstruida y la real es aproximadamente lineal, con pendientes de 0,96 y 0,76 (círculos); 0,85 y 0,56 (cuadrados) y 0,78 y 0,48 (diamantes), en  $C$  y  $D$ , respectivamente. En el caso del blurring realista, también aplicamos el algoritmo luego de emplear un proceso de deblurring, obteniendo una relación lineal de pendiente 0,99 para  $d = 0,01\mu m$  y 0,73 para  $d = 0,15\mu m$  (datos no mostrados). Así, el blurring realista cambia sólo levemente la pendiente (de 0,96 a 0,85) si se conserva la resolución (alta) de la simulación numérica. La pendiente cambia en aproximadamente 30 % cuando se conservan sólo datos con la resolución de un experimento real ( $d \sim 0,15\mu m$ ) y el algoritmo se aplica directamente a los datos con blurring. Sin embargo, haciendo un deblurring previo de los datos, obtenemos una pendiente que difiere sólo en un 4 % de la obtenida usando los datos limpios (sin blurring) y con alta resolución. En el caso de señales experimentales, no aplicamos ningún procedimiento de deblurring, ya que el mismo introduce demasiado ruido y, tal como se mostró en la Fig. 5.5  $B$ , si hay offset, trabajar con la imagen con blurring puede dar mejores estimaciones de la corriente.

En la Fig. 5.5  $E$  mostramos el promedio temporal de la fuente utilizada en la simulación (línea punteada), y de las obtenidas aplicando el algoritmo a datos simulados sin blurring y con  $d = 0,15\mu m$  (línea llena de trazo fino), a datos simulados a los que se les ha agregado blurring usando la Ec. (5.14) con  $d = 0,15\mu m$  (línea llena de trazo grueso), y a los mismos datos pero luego de aplicarles un proceso de deblurring mediante la inversa de la Ec. (5.14) (línea cortada). También aplicamos el algoritmo a datos, también sometidos al proceso de deblurring, pero conservando todos los puntos de la simulación, obteniendo una fuente que es indistinguible de la obtenida usando datos limpios (datos no mostrados). Concluimos, entonces, en que las diferencias entre la fuente obtenida a partir de datos sin blurring (línea llena de trazo fino) y la obtenida a partir de datos con blurring más un proceso de deblurring (línea cortada) son consecuencia directa de la resolución espacial de  $0,15\mu m$ . La Fig. 5.5  $F$  es similar a  $E$  pero para  $Q_{Ca}$  en el centro de la región de liberación ( $x = 0$ ) como función del tiempo. La línea punteada corresponde a la fuente simulada y la línea llena de trazo fino a la obtenida aplicando el algoritmo a datos simulados sin blurring. Observamos en la Fig. 5.5  $F$  que el algoritmo sobreestima levemente el valor de  $Q_{Ca}(x = 0)$ , pero esto es compensado por una subestimación en otros puntos del espa-

cio. También podemos observar que la característica que más diferencia a la fuente reconstruida de la usada en las simulaciones es su distribución espacial. Por otro lado, el algoritmo de reconstrucción obtiene muy satisfactoriamente los perfiles temporales en todos los casos, tanto para tiempos para los cuales la fuente está encendida como para tiempos para los cuales está apagada.

### Efectos del ruido y la resolución temporal finita

Las Figs. 5.5 *G-H* muestran el efecto del ruido y la resolución temporal finita cuando hay blurring realista y pero no offset. Las simulaciones están hechas como en las Figs. 5.5 *C-F*, agregando blurring a los datos simulados, con  $\Delta_{xy} = 0,3\mu\text{m}$ ,  $\Delta_z = 0,7\mu\text{m}$ , y conservando puntos cada  $0,15\mu\text{m}$  en el espacio y cada  $8\text{ms}$  en el tiempo. Los datos con ruido corresponden a haber agregado ruido con distribución normal a la fluorescencia con blurring, como se explica en la sección Métodos. En la Fig. 5.5 *G* mostramos la magnitud de las corrientes reconstruidas en función de las utilizadas en las simulaciones, cuando se aplica el algoritmo a datos sin ruido (círculos) y a datos con ruido (diamantes). Las pendientes son  $1,05 \pm 0,08$  y  $1,02 \pm 0,18$ , respectivamente. La línea llena es la función identidad. Como se puede ver, no hay diferencias significativas en la magnitud de las corrientes reconstruidas para los casos sin y con ruido. Cabe aclarar que la estimación de la corriente es mejor a la obtenida en la Fig. 5.5 *D* debido a que el criterio dado por la Ec. (5.11) prescribe un valor mayor para  $r_{source}(t)$ , para datos con resolución temporal de  $8\text{ms}$ . En la Fig. 5.5 *H* se presentan dos ejemplos en los cuales se comparan la magnitud y el curso temporal de las corrientes obtenidas aplicando el algoritmo a datos con ruido (líneas llenas) con las utilizadas en las simulaciones (líneas cortadas). Es posible distinguir los eventos de liberación en ambos casos, aún cuando el nivel de ruido uniforme que hemos agregado -que es relativamente grande en las regiones con bajo  $[\text{Ca}^{2+}]$ - “borronea” algunos de los eventos en el caso con  $0,1\text{pA}$ .

### Efectos de la presencia de “buffers” endógenos con diferentes cinéticas

Estudiamos ahora la aplicabilidad del algoritmo cuando se lo aplica a un modelo con varios buffers endógenos con diferentes cinéticas. Utilizamos el modelo de [Baylor et al., 2002] con las modificaciones descritas en la sección Métodos y los parámetros de la Tabla 5.2, con  $[\text{Ca}^{2+}]_{rest} = 0,05\mu\text{M}$  siempre, independientemente de la cantidad total de colorante utilizada. Se trata de un

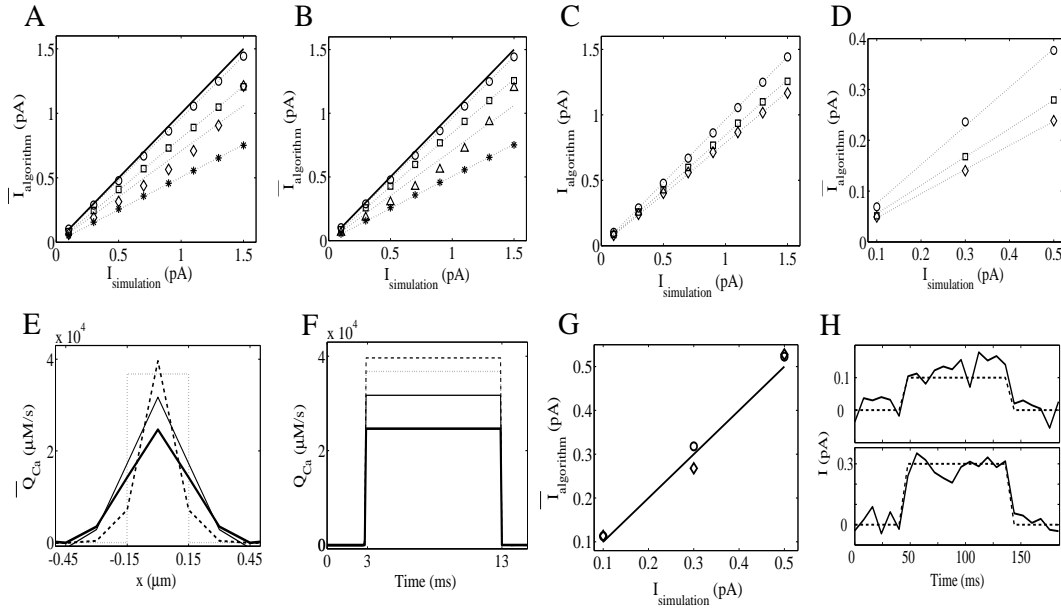


Figura 5.5: Efectos de mediciones fuera de foco, de blurring, de la resolución espacial y temporal finita y del ruido. Las simulaciones corresponden a fuentes de la forma (2.4) con  $R_f = 0,15\mu m$ ,  $t_d = 10ms$  (excepto por  $G$  y  $H$ , donde  $t_d = 100ms$ ) y diferentes valores de  $I_{Ca}$ . Sólo las simulaciones en  $G$  y  $H$  tienen agregado ruido. (A) Efectos de defocus sin blurring. Los offsets son:  $d_o = 0$  (círculos),  $d_o = 0,0707\mu m$  (cuadrados),  $d_o = 0,1118\mu m$  (diamantes), y  $d_o = 0,1414\mu m$  (asteriscos). La línea llena es el valor esperado para la corriente. (B) Efectos combinados de blurring y defocusing. Resultados sin defocusing o blurring (círculos), sólo con blurring realista (cuadrados), con blurring y defocusing de  $d_o = 0,1414\mu m$  (triángulos) y con sólo defocusing de  $d_o = 0,1414\mu m$  (asteriscos). (C)-(D) Efectos del blurring y la resolución espacial sin defocusing. Resultados con cero blurring (círculos), con  $\Delta_{xy} = 0,3\mu m$ ,  $\Delta_z = 0,7\mu m$  (cuadrados) y con  $\Delta_{xy} = 0,5\mu m$ ,  $\Delta_z = 0,9\mu m$  (diamantes). En (C) se utilizaron todos los puntos de la simulación, mientras que en (D) se utilizaron sólo puntos separados por  $0,15\mu m$ . Las pendientes de los mejores ajustes lineales son: 0,96 (círculos), 0,85 (cuadrados), 0,78 (diamantes) en (C) y 0,76 (círculos), 0,56 (cuadrados), 0,48 (diamantes) en (D). (E) Promedio temporal de la fuente utilizada en la simulación en función de la coordenada en la cual se hace el barrido lineal (línea llena de trazo fino), y las fuentes correspondientes obtenidas aplicando el algoritmo a datos simulados luego de que se les agregó blurring con  $d = 0,15\mu m$  (línea llena de trazo grueso), y luego de que fue subsiguientemente sometida a un proceso de deblurring (línea cortada). (F) Similar a (E) pero para  $Q_{Ca}(x = 0)$  en función del tiempo. (G) Efectos del ruido y la resolución temporal finita, en la magnitud de la corriente reconstruida. Comparación de los resultados con blurring realista, resoluciones espaciales y temporales finitas sin ruido (círculos) y con ruido (diamantes). La línea llena es el valor esperado para la corriente. (H) Efectos del ruido y la resolución temporal finita en el curso temporal de la corriente reconstruida. Corrientes reconstruidas (línea llena) y perfiles utilizados en las simulaciones (línea cortada) para un ejemplo con  $0,1pA$  (panel superior) y uno con  $0,3pA$  (panel inferior). En las figuras,  $I$  corresponde a  $I_{Ca}$ .

modelo con grandes cantidades de ATP y Parvalbúmina, lo que provoca una captura rápida de  $\text{Ca}^{2+}$ . En estos casos, el algoritmo es capaz de determinar la duración y la extensión espacial de la fuente en forma tan adecuada como en los casos presentados en la Fig. 5.3 (no se muestran los datos). Sin embargo, debido a la captura efectiva de  $\text{Ca}^{2+}$  por ATP y Parvalbúmina, la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  puede resultar subestimada en mayor o menor medida, dependiendo de la concentración de colorante. En la Fig. 5.6 presentamos un gráfico de las corrientes que da el algoritmo en función de las utilizadas en las simulaciones para diferentes valores de la concentración total de colorante. Observamos que, para una concentración total de colorante  $[\text{B}]_T = 40\mu\text{M}$ , la corriente estimada es el 67% de la simulada (cuadrados) y para  $[\text{B}]_T = 1\text{mM}$  (asteriscos), la corriente es el 74% de la simulada. Si  $[\text{B}]_T$  no es suficientemente grande, el colorante no puede competir con todos los buffers y, entonces, no es capaz de sensor los cambios rápidos en  $[\text{Ca}^{2+}]$  posteriores a la liberación. Dado que el algoritmo se basa en la información que puede extraerse de  $[\text{CaB}]$ , la corriente de liberación queda subestimada. Sin embargo, si la dinámica de la concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]$  puede describirse correctamente por la Ec. (5.2) con  $M$  dado por el ansatz (4.4), entonces la forma de las funciones  $f$ ,  $g$ ,  $h$  y  $k$  debería ser independiente de las propiedades del colorantes (incluyendo su concentración total) y de la liberación,  $Q_{Ca}$ . Sin embargo, cuando el colorante no puede sensor las variaciones rápidas de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , las funciones  $f$ ,  $g$ ,  $h$  y  $k$  obtenidas de su correspondiente distribución de  $[\text{CaB}]$ , no son determinadas correctamente y cambian al cambiar esas propiedades. Esto resulta en una determinación pobre de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , para la cual se puede estimar un factor de corrección mediante el análisis de los cambios de las funciones  $f$ ,  $g$ ,  $h$  y  $k$  con las propiedades de las cuales deberían ser independientes. Si las funciones están correctamente determinadas, esperamos que el algoritmo brinde relativamente buenas estimaciones de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para comprobar esto, utilizamos las funciones obtenidas para  $[\text{B}]_T = 1\text{mM}$  de modo de analizar las simulaciones hechas con otros valores de  $[\text{B}]_T$ . Así, aplicamos los *Pasos 1-5* del algoritmo al conjunto de imágenes simuladas numéricamente, generadas con  $[\text{B}]_T = 1\text{mM}$  y la función  $k$  obtenida es este caso (fijamos  $f = g = h = 0$ ). Luego utilizamos esta función para aproximar  $M$  (Ec. (4.4)) y, usando esta expresión para  $M$ , aplicamos el *Paso 6* del algoritmo a las imágenes generadas numéricamente con  $[\text{B}]_T = 40\mu\text{M}$ . En la Fig. 5.6 mostramos las corrientes que obtenemos de este modo, en función de las utilizadas en las simulaciones (cuadrados), que pueden ajustarse mediante una relación lineal de pendiente 0,74. La mejora en la determinación del valor de la corriente (de 67 a 74% del valor real) significa que el ansatz (4.4) es capaz de capturar la dinámica de los procesos pobremente caracterizados, aún en presencia de numerosos buffers con diferentes cinéticas, pero

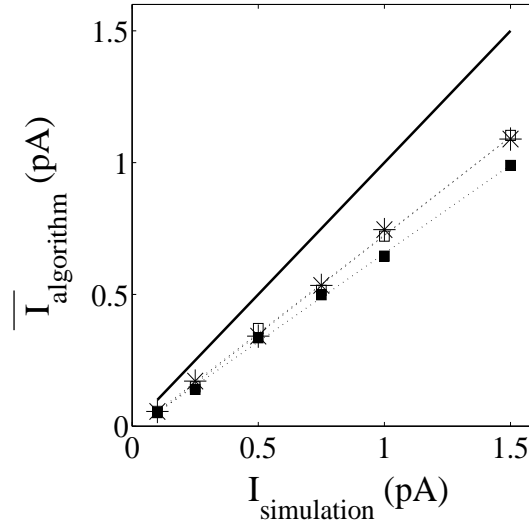


Figura 5.6: Aplicación del algoritmo a simulaciones numéricas del modelo de la Tabla 5.2, con una fuente de la forma (2.4) con  $R_f = 0,15 \mu m$ ,  $t_d = 10 ms$  y varios valores de  $I_{Ca}$ . Las corrientes reconstruidas se muestran en función de las utilizadas en las simulaciones para casos con  $[B]_T = 40 \mu M$  (cuadrados) y  $[B]_T = 1000 \mu M$  (asteriscos). Los cuadrados llenos corresponden a la aplicación del algoritmo usando la función  $k$  determinada a partir de las simulaciones con  $[B]_T = 40 \mu M$  y los cuadrados huecos a haber utilizado la función determinada a partir de simulaciones con  $[B]_T = 1 mM$ . Los mejores ajustes lineales a estos datos tienen pendientes 0,67 y 0,74 (líneas punteadas); también se grafica la función identidad (línea llena). Por claridad no se muestran los errores en las corrientes ( $\sim 15\%$ ).  $I$  corresponde a  $I_{Ca}$ .

que las funciones que lo definen sólo pueden ser determinadas con precisión adecuada si la concentración del colorante es lo suficientemente alta como para poder sensar cambios rápidos en  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

### 5.4.2 Reconstrucción de flujos en señales de calcio experimentales

Describimos ahora los resultados de aplicar el algoritmo a señales de  $\text{Ca}^{2+}$  experimentales (“sparklets”) obtenidas promediando sobre 8 vecinos en el registro espacio-temporal, como se describe en la sección Métodos. La Fig. 5.7 A ilustra sparklets que aparecen autónomamente en un sitio localizado en re-

puesta a una depolarización débil ( $-20mV$ ) que da baja probabilidad de apertura del canal [Demuro and Parker, 2003]. El recuadro indica la región de la imagen cuyo análisis describimos en detalle en el resto de la figura. Realizamos los *Pasos 1-5* del algoritmo de reconstrucción en imágenes que contienen 20 sparklets. Utilizamos las resoluciones espacial ( $0,15\mu m$ ) y temporal ( $8ms$ ) del microscopio y obtuvimos  $Q_{Ca}$  (*Paso 6*) para 17 de ellos. Los valores máximos de  $[\text{Ca}^{2+}]$  para los 3 registros para los cuales  $Q_{Ca}$  no pudo obtenerse son  $7,01\mu M$ ,  $10,79\mu M$  y  $18,58\mu M$ , mientras que el máximo valor de  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el resto de los registros es de  $5,25\mu M$  y las funciones  $f$ ,  $g$ ,  $h$  y  $k$  se pudieron obtener hasta  $[\text{Ca}^{2+}]=6,2\mu M$ . Fue posible determinar las funciones hasta ese valor de  $[\text{Ca}^{2+}]$  aún sin utilizar el registro que alcanza  $[\text{Ca}^{2+}]=18,58\mu M$ . Esto muestra que el máximo valor de  $[\text{Ca}^{2+}]$  en los registros para los cuales la corriente puede inferirse, es del orden de la mitad del máximo valor en aquellos registros que sólo fueron utilizados para la determinación de las funciones  $f$ ,  $g$ ,  $h$  y  $k$ . Esto implica que este aspecto del algoritmo no es demasiado restrictivo, dado que se han observado fluctuaciones mayores en la fluorescencia pico tanto en sparks cardíacos [Izu et al., 2001] como en puffs en ovocitos [Sun et al., 1998]. En nuestras aplicaciones, el número de registros para los cuales  $Q_{Ca}$  no puede ser determinado, es una proporción pequeña del número total de registros utilizados.

El dispositivo experimental impone otras limitaciones. La extensión espacial de la fuente no puede ser resuelta dado que el tamaño del poro de un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N es menor que  $1nm$  [Hille, 2001] y la resolución espacial de los experimentos es de  $\sim 150nm$ . Debido a posibles offsets, pre-analizamos la distribución de  $[\text{Ca}^{2+}]$  para las imágenes y determinamos que en la mayoría de ellas el ancho mitad de  $[\text{Ca}^{2+}]$  es de dos pixeles, con algunos pocos en los que resultó ser de tres. Teniendo en cuenta que el efecto de blurring óptico puede aumentar el tamaño aparente de la fuente en un pixel (dado que el tamaño de un pixel,  $\sim 0,15\mu m$ , es del orden de la mitad del ancho completo de la “caja de blurring”,  $\Delta_{xy} \sim 0,3\mu m$ ) pensamos que, si hay algún offset durante el proceso de adquisición, entonces no es mucho más grande que el tamaño del pixel.

Las Figs. 5.7 *B* y *C* muestran la distribución  $\text{Ca}^{2+}$  ligado al colorante,  $[\text{CaB}]$ , y del término  $-M$  determinado por el algoritmo, respectivamente. La Fig. 5.7 *D* contiene la curva  $M = k([\text{Ca}^{2+}])$  y su ajuste suave y la Fig. 5.7 *E* muestra la fuente reconstruida,  $Q_{Ca}$ . Comparando las Figs. 5.7 *C* y *E*, observamos que  $-M$  es  $\sim 25\%$  del término de fuente,  $Q_{Ca}$ , por lo menos en las regiones donde  $Q_{Ca}$  es significativa. Usando el ajuste suave en la Fig. 5.7 *D* y una versión simplificada, constante por tramos (en el espacio y el tiempo), de

$Q_{Ca}$ , elegida de modo de obtener una corriente media similar a la dada por el algoritmo (ver Fig. 5.7 *F*), realizamos una integración de la Ec. (5.2). La distribución espacio-temporal del complejo  $\text{Ca}^{2+}$  ligado al colorante,  $[\text{CaB}]_s$ , que se obtiene de este modo, se muestra en la Fig. 5.7 *G*. Aún siendo que en la integración mencionada no se ha agregado ruido y que la versión simplificada de la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  está limitada por las resoluciones temporal y espacial de los registros experimentales (ver Fig. 5.7 *F*), la distribución de  $[\text{CaB}]_s$  se compara razonablemente bien con la obtenida directamente de registros experimentales,  $[\text{CaB}]$ , tanto en su magnitud como en su comportamiento temporal y espacial. El ancho de la señal en la mitad de su valor máximo para ambas distribuciones difiere en  $\sim 10ms$  al mirar la extensión temporal y en  $\sim 0,2\mu m$  al mirar la espacial. Ambas diferencias son muy cercanas a las resoluciones temporal ( $8ms$ ) y espacial ( $0,15\mu m$ ) de los registros experimentales (y son menores que el 30% de los anchos experimentales). Las diferencias alcanzadas en los valores máximos, por otro lado, son de  $\sim 14\%$  y  $\sim 6\%$  para cada uno de los eventos que se ven en la Fig. 5.7.

La Fig. 5.7 *H* presenta el perfil temporal de la fluorescencia promediada sobre una región de  $0,45\mu m$  (3 pixeles) centrada alrededor del punto de liberación (línea cortada) y de la corriente reconstruida,  $I_{Ca}$ , obtenida a partir de la integración en volumen de  $Q_{Ca}$  (Ec. (5.10)) sobre una región semi-esférica de radio  $r \sim 0,225 \mu m$  (línea llena). Para poder comparar, el modo en el cual se computa la curva cortada es similar al modo en que se procesan los datos en [Demuro and Parker, 2003] (un promedio sobre 3 puntos). La corriente máxima obtenida con nuestro algoritmo a lo largo del curso temporal de cada evento está dentro de los valores esperados por extrapolación de los datos de patch clamp obtenidos usando  $\text{Ba}^{2+}$  en lugar de  $\text{Ca}^{2+}$  como ion permeable [Demuro and Parker, 2003]. De hecho, mediante la aplicación del algoritmo a los 17 sparklets estudiados, obtenemos una corriente media de  $I_{Ca} = (0,139 \pm 0,012)pA$  con desviación standard de  $0,040pA$ . En base a nuestros resultados previos, este valor medio podría estar representando una cota inferior al valor real de la corriente, dependiendo de la exactitud con la cual puedan ser determinadas las funciones  $f$ ,  $g$ ,  $h$  y  $k$ . El efecto del offset en este valor no es tan preciso como en la Fig. 5.5, dado que se trata de un valor medio sobre 17 eventos que tienen, muy probablemente, diferentes offsets y, en muchos casos, con un offset que está contenido en el mismo pixel que el centro de liberación. Si corregimos el valor medio por el factor que obtuvimos en el caso con blurring y offset de  $\sim 0,14\mu m$ , esta estimación de la corriente para ser de  $0,2pA$ , del orden del límite superior de las estimaciones ya mencionadas [Demuro and Parker, 2003]. Esto, junto con los resultados de la integración mostrada en la Fig. 5.7 *G*, es una indicación

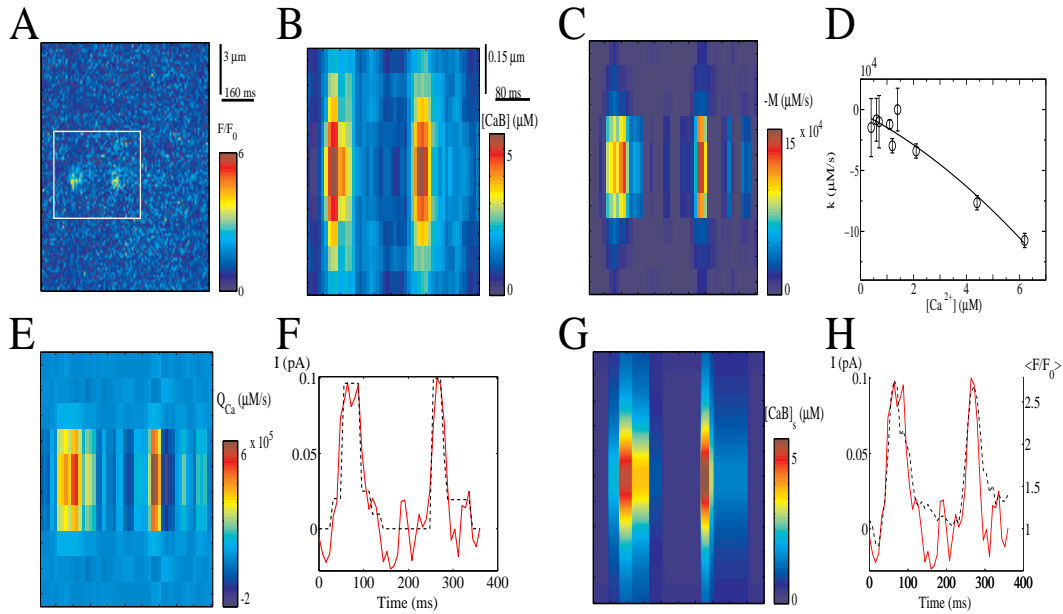


Figura 5.7: Sparklets experimentales. (A) Imagen de barrido lineal con eventos de canal único (sparklets) que surgen en respuesta a un pulso depolarizante de 3s de duración. (B) Distribución espacio-temporal de calcio ligado al colorante para los eventos indicados en el recuadro en A. La barra de colores en B es también válida para C, E y G. (C) Distribución espacio-temporal de  $-M$ . (D) Curva  $M = k([\text{Ca}^{2+}])$  y su ajuste suave. (E) Fuente obtenida con el algoritmo. (F) Perfiles temporales de la corriente reconstruida que predice el algoritmo, obtenida integrando en volumen (Ec. (5.10)) sobre una región semi-esférica de radio  $r \sim 0,225 \mu\text{m}$  (línea llena) y de la corriente derivada de la versión simplificada, constante por tramos, de la fuente  $Q_{\text{Ca}}$ , utilizada en la integración de las ecuaciones de evolución (líneas cortadas). (G) Distribución espacio-temporal del complejo  $\text{Ca}^{2+}$  ligado al colorante,  $[\text{CaB}]_s$ , obtenido mediante la integración numérica de la Ec. (5.2) con  $M(\text{Ca}^{2+})$  dado por la curva suave presentada en (D) y la fuente simplificada de la cual se obtiene la línea cortada en (F). (H) Perfil temporal de la corriente reconstruida (línea llena) y de la fluorescencia medida promediada sobre un región de  $0,45 \mu\text{m}$  alrededor del centro de liberación (línea cortada). Por razones de claridad el error de la corriente reconstruida ( $\sim 27\%$ ) no se ha incluido.  $I$  corresponde a  $I_{\text{Ca}}$ .



de que, en este caso, el *ansatz* (4.4) pudo ser determinado correctamente a partir de los datos. Para comprobar esta afirmación, también reanalizamos todos los registros usando la función  $k$  determinada mediante la aplicación de los *Pasos 1-5* del algoritmo (fijando  $g = f = h = 0$ ) para 2 subconjuntos de imágenes experimentales, cada uno conteniendo eventos de diferente duración. Ni las funciones ni la estimación de la corriente cambió en forma significativa (obtuvimos  $I_{Ca} = (0,130 \pm 0,012)pA$  e  $I_{Ca} = (0,135 \pm 0,010)pA$  usando cada subconjunto).

Con respecto al perfil temporal de la corriente, aún cuando no obtuvimos una forma cuadrada perfecta, podemos observar en la Fig. 5.7  $H$  que la escala temporal de variación de la fluorescencia cuando comienza o termina la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  es (levemente) más lenta que la de  $Q_{Ca}$  o la de  $I_{Ca}$ . Esta resolución temporal más aguda en la corriente reconstruida permite una mejor determinación del tiempo medio de apertura del canal, que es cercano al valor obtenido en experimentos de patch clamp. En particular, presentamos en la Fig. 5.8 un gráfico del tiempo de apertura,  $t_o$ , calculado usando el curso temporal de la fluorescencia promediada sobre 3 pixeles ( $t_o(F)$ ) en función del calculado usando la corriente reconstruida ( $t_o(I_{Ca})$ ). Podemos relacionar ambos tiempos linealmente con una pendiente de  $1,58 \pm 0,55$ . Como se describe en [Demuro and Parker, 2003], los eventos que pueden observarse con esta técnica óptica están contenidos en la cola de la distribución de tiempos de apertura (*i.e.*, los eventos muy breves resultan inobservables). Haciendo estadística sobre muchos eventos, es posible ajustar las observaciones con una distribución exponencial que da información sobre los tiempos medios de la población total de eventos [Demuro and Parker, 2003]. En el caso de nuestros datos no podemos realizar este análisis estadístico directamente, dado que no contamos con suficientes eventos. Sin embargo, usando la relación lineal  $t_o(F) \sim 1,58t_o(I_{Ca})$ , podemos transformar el tiempo medio de apertura,  $t_o(F)$ , obtenido en [Demuro and Parker, 2003] en un tiempo medio de apertura para la corriente. Obtenemos  $t_o(I_{Ca}) \approx (17,8 \pm 6,2)ms$ , que resulta similar al valor obtenido con experimentos de patch clamp,  $t_o = 11,5ms$  [Demuro and Parker, 2003].

Los resultados presentados en las Figs. 5.7 y 5.8 fueron obtenidos a partir de registros en los cuales los datos adquiridos fueron promediados sobre 8 primeros vecinos. Este proceso de suavizado es muy leve, las imágenes conservan bastante ruido. Para poder acotar los errores que el ruido introduce cuando se aplica el algoritmo a datos experimentales reales, hemos aplicado un segundo proceso de suavizado (más fuerte) a los registros, antes de aplicar el algoritmo, como se explica en la sección Métodos. En la Fig. 5.9  $A$  presen-

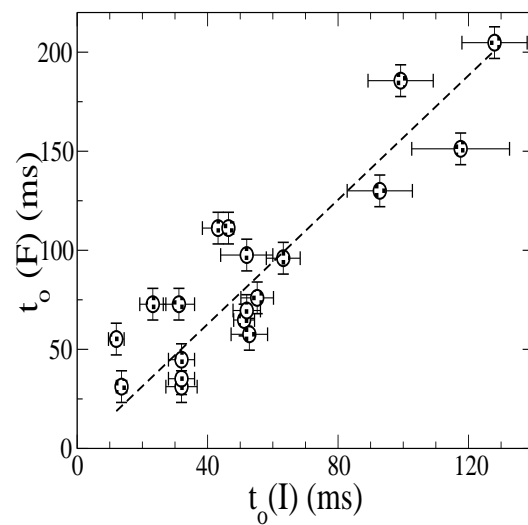


Figura 5.8: Tiempo de apertura obtenido de las series temporales de fluorescencia en función de los obtenidos usando la corriente reconstruida para todos los eventos cuya corriente pudo ser determinada utilizando el algoritmo. La relación es aproximadamente lineal con pendiente 1,58.  $I$  corresponde a  $I_{Ca}$ .

tamos el perfil temporal de la fluorescencia para un registro con ruido (línea de trazo fino) y el correspondiente suavizado (línea de trazo grueso) y en la Fig. 5.9 *B* el perfil temporal de la corriente obtenida aplicando el algoritmo a ambos tipos de registros. En la Fig. 5.9 *C* graficamos el máximo de la corriente obtenida usando registros suavizados ( $\text{máx}(I_{Ca\ s})$ ) en función del máximo obtenido usando registros con ruido ( $\text{máx}(I_{Ca\ n})$ ), para 14 de los registros experimentales. Existe una relación lineal entre estas dos cantidades, de pendiente 1,06 y ordenada -0,01. Más aún, si asociamos a cada punto del registro suavizado un error dado por el valor absoluto de la diferencia con respecto al valor correspondiente en el registro con ruido y propagamos este error como se explica en el Apéndice de este capítulo,  $\Delta I_{Ca\ s}$ , en las corrientes suavizadas,  $I_{Ca\ s}$ , tal que la corriente con ruido,  $I_{Ca\ n}$  satisface  $I_{Ca\ s} - \Delta I_{Ca\ s} \leq I_{Ca\ n} \leq I_{Ca\ s} + \Delta I_{Ca\ s}$  para todo tiempo. Esto confirma las conclusiones de la Fig. 5.7 que muestran que el algoritmo es estable frente al ruido. También podemos observar en *A-B* que cambios temporales relativamente rápidos en la señal con ruido se traducen en eventos de aperturas y cerrados breves si trabajamos con la señal con ruido, y desaparecen al trabajar con la señal suavizada. Esto no es un problema particular del algoritmo, es común al analizar cualquier tipo de registro con ruido. Se necesita un tratamiento especial para distinguir entre aperturas reales y fluctuaciones cuando las aperturas son muy cortas, pero esto excede el alcance de esta tesis.

## 5.5 Discusión

### 5.5.1 Resumen

La principal contribución del algoritmo introducido en este capítulo es el hecho de que no necesita un modelo explícito de la dinámica del calcio intracelular. Así, puede ser fácilmente aplicado sin importar el tipo celular. El algoritmo está basado en la hipótesis de que la dinámica “futura” de una dada variable puede ser inferida de su evolución temporal previa, aún si su evolución resulta de la interacción con otras variables [Packard et al., 1980, Mindlin et al., 1990, Gouesbet, 1992, Mindlin et al., 1998]. Considerando que los efectos de los buffers endógenos y la recaptura son de relativamente corto alcance en el espacio y el tiempo, usamos el ansatz dado por la Ec. (4.4) en lugar de un modelo cinético detallado para describir sus efectos. Las funciones en este ansatz se determinan directamente de las imágenes experimentales. En

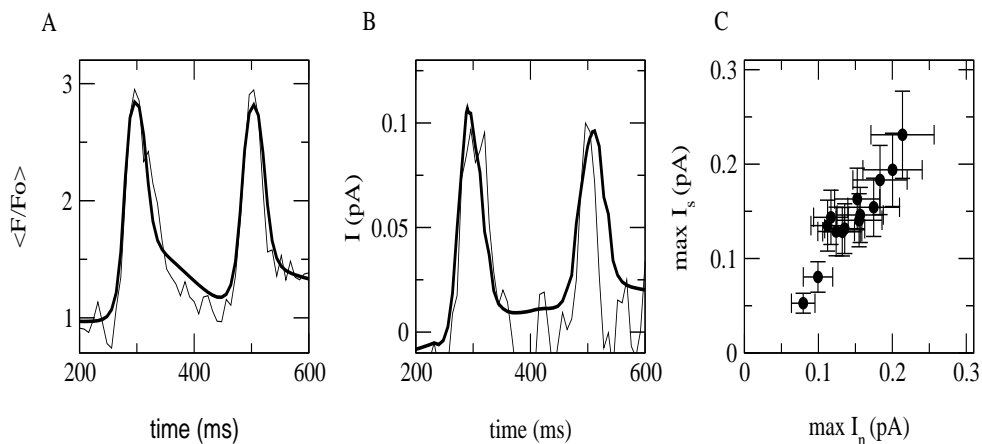


Figura 5.9: Comparación de la aplicación del algoritmo a registros con ruido obtenidos mediante un promediado de 8 vecinos sobre los datos adquiridos, y sobre registros con un suavizado mayor realizado con una función de ajuste no lineal (ver sección Métodos). *A*: Perfil temporal de la fluorescencia para registros con ruido (línea de trazo fino) y suavizados (línea de trazo grueso). *B*: Similar a *A* pero para el perfil temporal de la corriente obtenida con el algoritmo. *C*: Máximo valor de la corriente obtenida aplicando el algoritmo a los registros suavizados,  $\max(I_{Ca\ s})$ , en función del máximo valor obtenido aplicándolo a registros con ruido,  $\max(I_{Ca\ n})$ . Observamos una relación lineal de pendiente 1,06.  $I$  corresponde a  $I_{Ca}$ .

el Capítulo 4 mostramos que el *ansatz* de la Ec. (4.4) describe correctamente la dinámica espacio-temporal de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de un colorante y una bomba, aún cuando el colorante sea lento y la aproximación adiabática no valga [Ventura et al., 2004]. Sin embargo, como se ilustra en algunas de las simulaciones de este capítulo, si la captura del  $\text{Ca}^{2+}$  ocurre muy rápidamente luego de su liberación y el colorante no es capaz de detectar esos cambios rápidos en  $[\text{Ca}^{2+}]$ , el algoritmo subestima la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este problema se atenúa usando registros obtenidos con una concentración suficientemente alta de colorante.

El algoritmo tiene otras hipótesis que son comunes a la mayoría de los métodos presentes en la literatura. Consideramos que la liberación ocurre en una región espacialmente localizada, que el colorante sólo reacciona con  $\text{Ca}^{2+}$  de acuerdo al esquema (5.1) (en [Soeller and Cannell, 2002] y en [Smith et al., 1998] se considera también la interacción del colorante con otras especies) y que el colorante y el  $\text{Ca}^{2+}$  basal están inicialmente distribuidos uniformemente a través del citosol. Aún cuando la validez de esta última hipótesis es difícil de determinar en experimentos reales, el pre-procesamiento descrito en la sección Métodos tiene como objetivo obtener la imagen “equivalente” a la real, que se hubiera obtenido si el colorante y el  $\text{Ca}^{2+}$  basal hubieran estado uniformemente distribuidos.

### 5.5.2 Verificación con datos sintéticos

Al ser aplicado a datos “sintéticos”, libres de ruido, el algoritmo reconstruye adecuadamente la cinética de la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$ ; tanto para cambios tipo escalón en el flujo, que simulan la apertura y cerrado de un canal único (Figs. 5.3 *A* y 5.5 *F*) como flujos que decaen exponencialmente, donde determina en forma adecuada la constante de tiempo de interés (Figs. 5.3 *C*, *D*). También es posible determinar en forma correcta el aspecto morfológico de la fuente (esféricamente simétrica) (Fig. 5.3 *B*). El requerimiento de simetría no es una limitación inherente al algoritmo, es consecuencia del método de barrido lineal utilizado para obtener las imágenes. El algoritmo también es capaz de identificar aperturas y cerrados múltiples en un dado sitio de liberación (Figs. 5.4 y 5.7).

La precisión con la cual el algoritmo predice la corriente total liberada depende de cuán bien se pueden determinar, a partir del experimento, las funciones  $g$ ,  $f$ ,  $h$  y  $k$  que definen el *ansatz* (4.4), algo que puede hacerse ra-

zonablemente bien, en condiciones ideales, si la concentración de colorante es lo suficientemente alta. Pero aún cuando la magnitud de la corriente resulta subestimada, la relación entre la corriente real y la reconstruida es lineal en todos los casos. La aplicación del algoritmo a imágenes generadas numéricamente (sin efectos de offset), generadas con un modelo simple con fluo-4 dextran, un buffer extra y una bomba, da una relación lineal entre la corriente real y la reconstruida, con una pendiente que puede resultar muy cercana a 1, dependiendo del modo en que se realiza el procedimiento de optimización. Notamos que los valores de  $f$ ,  $g$  y  $h$  son relativamente pequeños y algunos de ellos altamente fluctuantes en la región de altas  $[\text{Ca}^{2+}]$  (Fig. 5.1 *F*). Fijando estas funciones iguales a cero y determinando solamente  $k$ , pudimos obtener resultados más limpios y estimaciones de corriente que resultaron ser un 20 % mejores. Por este motivo, decidimos presentar sólo los resultados obtenidos de este modo en todos los casos excepto en la Fig. 5.1.

Tomando como punto de partida las simulaciones de la Fig. 5.2, observamos que la estimación de la corriente liberada empeora cuando trabajamos con una imagen para la cual la línea de barrido no pasa por el centro de liberación sino que tiene un cierto offset (Fig. 5.5 *A*). La estimación mejora cuando se incluyen efectos de blurring y offset, debido a que la luz proviene ahora de un volumen finito y no de un punto (Fig. 5.5 *B*). La pendiente no decrece demasiado cuando sólo se considera blurring, si conserva la resolución espacial (alta) de las simulaciones (Fig. 5.5 *C*), pero decrece en un 30 % cuando sólo se conservan datos con la resolución de un experimento real ( $d \sim 0,15\mu\text{m}$ ) (Fig. 5.5 *D*). Este efecto se puede revertir aplicando un proceso de deblurring a los datos que ya tienen blurring, obteniendo una pendiente que difiere en un 7,5 % de la que se obtiene con datos limpios y con alta resolución. Si hay offset, aplicarle un deblurring a los datos puede dar una estimación de la corriente peor que la que se obtiene aplicando el algoritmo directamente a la imagen con blurring (Fig. 5.5 *B*). Por estas razones, aplicamos el algoritmo a señales experimentales reales sin usar un proceso previo de deblurring. El pre-análisis de la distribución de  $[\text{Ca}^{2+}]$  nos permite acotar el valor del offset para las imágenes experimentales en las cuales la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  está contenida dentro de un pixel. Usando este tipo de análisis, es posible o bien descartar las imágenes o corregirlas estimando el valor del offset. El problema del offset es inherente a los registros de barrido lineal, técnica de imágenes que es comunmente utilizada debido a su buena resolución temporal. Sin embargo, otras modalidades tales como la microscopía de reflexión total interna [Demuro and Parker, 2004] brindan imágenes bidimensionales de alta resolución temporal. Nos queda pendiente la implementación del algoritmo para este tipo de datos.

Al ser probado con datos “sintéticos” a los que se les ha agregado ruido de amplitud realista, el algoritmo predice muy bien la amplitud de las corrientes y relativamente bien su curso temporal (Figs. 5.5 *G, H*). Cabe notar, sin embargo, que los tiempos de apertura y cerrado se ven afectados si la amplitud del ruido es muy grande y la corriente es muy pequeña, teniendo esto consecuencias en la fidelidad temporal de la corriente reconstruida. Este problema es común a todo tipo de análisis de series temporales con ruido. Una discusión más profunda acerca de cómo distinguir entre eventos de liberación “verdaderos” y “falsos” en estas circunstancias, escapa al alcance del presente estudio.

La competencia entre los procesos que afectan la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y la interacción con el colorante tiene consecuencias sobre la determinación de las funciones que definen el ansatz (4.4). Cuando el colorante no es capaz de detectar los cambios rápidos en  $[\text{Ca}^{2+}]$ , las funciones no quedan correctamente determinadas y la corriente de liberación resulta subestimada. Este problema es atenuado si se incrementa la concentración de colorante (Fig. 5.6). Más aún, si las funciones que definen el ansatz (4.4) son determinadas para concentraciones de colorante suficientemente altas, entonces pueden ser utilizadas para analizar registros que fueron obtenidos con cantidades menores de colorante, dando así mejores estimaciones de la corriente liberada (Fig. 5.6). El hecho de trabajar con cantidades mayores de colorante puede limitar el conjunto de experimentos que pueden ser analizados, dado que el máximo valor de  $[\text{Ca}^{2+}]$  para el cual se determina el ansatz (4.4) puede hacerse muy pequeño. En las simulaciones de la Fig. 5.6, sin embargo, la máxima corriente que se necesitó para construir el ansatz y la máxima corriente que pudo inferirse con una precisión del 75 %, no fueron muy diferentes (3 pA y 1 pA, respectivamente). Podemos analizar qué significa una “concentración de colorante suficientemente alta” para cada tipo celular analizando si las funciones  $f$ ,  $g$ ,  $h$  y  $k$  cambian significativamente con aspectos de los cuales deberían ser independientes, entre ellos, la concentración de colorante o la duración de la liberación. A tal fin, no es necesario usar grandes cantidades de colorante. Alcanza con comparar las funciones obtenidas con dos concentraciones de colorante suficientemente distintas. Si las funciones permanecen aproximadamente iguales (algo que puede ser validado utilizando técnicas estadísticas), podemos concluir que la cantidad de colorante es suficiente para capturar completamente la dinámica desconocida. Si cambian significativamente, entonces, un análisis de este cambio, lo cual va más allá del alcance de este estudio, podría ser utilizado para estimar la “capacidad buffer” de la célula y para mejorar la estimación de la corriente. Se puede realizar un análisis similar en términos de la duración del evento de liberación. En este

caso, los registros experimentales se pueden agrupar en dos conjuntos, de acuerdo a la duración de la liberación. Si las funciones reconstruidas,  $f$ ,  $g$ ,  $h$  y  $k$ , son muy diferentes para los dos grupos, entonces deberíamos concluir que el colorante no está siguiendo correctamente la dinámica de  $[\text{Ca}^{2+}]$  y que hay que utilizar una mayor concentración de colorante para mejorar la determinación de las funciones  $f$ ,  $g$ ,  $h$  y  $k$ . Este enfoque es el que seguimos en el análisis de sparklets reales. De todos modos, aún en aquellos casos en los cuales las funciones determinadas son sólo útiles para describir la dinámica lenta de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , la relación entre las corrientes reconstruida y real es siempre lineal. Esta característica notable implica que los cocientes de corrientes subyacentes a distintos eventos son determinadas correctamente por el algoritmo bajo cualquier circunstancia y que alcanza con calibrar un sólo evento para determinar la corriente real de todos ellos.

Estos resultados indican que no se necesitan modelos muy detallados, con gran cantidad de parámetros generalmente desconocidos, para reproducir la dinámica de  $[\text{Ca}^{2+}]$  intracelular. Aunque el tipo de modelo simplificado que utilizamos en este estudio (en términos del *ansatz* (4.4)) no es adecuado para inferir los detalles de los procesos que se llevan a cabo en la célula, resulta bueno para estimar las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de imágenes de fluorescencia, siempre que el *ansatz* (4.4) pueda ser determinado correctamente. Al validar métodos de reconstrucción usando imágenes simuladas numéricamente, la mayoría de los métodos de tipo “backward” presentados en la literatura usan el mismo conjunto de ecuaciones para la generación numérica de imágenes y para el algoritmo de reconstrucción. Diferencias menores entre ambos modelos afectan la corriente estimada [Soeller and Cannell, 2002]. En [Rios et al., 1999] se investiga el efecto que tiene variar los parámetros del modelo en el cálculo de la liberación. La corriente promedio determinada sobre 157 sparks es de  $16,9\text{pA}$  para el conjunto de parámetros de partida, decrece a  $8,05\text{pA}$  si todas las concentraciones de buffers se reducen en  $1/3$  y aumenta a  $26,9$  cuando la tasa (hacia adelante) de la reacción entre el colorante y  $\text{Ca}^{2+}$  o el coeficiente de difusión del colorante se modifican en un factor 3. Esto muestra la importancia que tiene el desarrollo de un algoritmo con la menor cantidad de información *a priori*. Ésta es la principal contribución de nuestro enfoque. Aunque está limitado por la resolución temporal de los registros experimentales y la cantidad de colorante que se utiliza, hay modos de superar estas limitaciones. La utilización de grandes cantidades de colorante es una de ellas.



### 5.5.3 Aplicación a sparklets reales

La aplicación del algoritmo a registros experimentales de sparklets generados por corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales voltaje dependientes de tipo N brinda una descripción adecuada tanto de la cinética del canal como de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Usando la distribución de fluorescencia “en bruto”, el tiempo medio de apertura ha sido estimado en  $t_o \approx 28ms$  en [Demuro and Parker, 2003]. Usando el algoritmo pudimos inferir un valor de  $t_o(I_{Ca}) \approx (17,8 \pm 6,2)ms$  que se compara mucho mejor con los valores obtenidos en experimentos de patch-clamp ( $t_o = 11,5ms$ ). El valor medio de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  obtenido con el algoritmo ( $I_{Ca} = (0,139 \pm 0,012)pA$ ) y el que resulta de la aplicación del factor de corrección debido a los efectos de blurring y offset ( $\sim 0,2pA$ ) están también dentro del valor estimado para su límite superior. La corriente de canal único de estos canales hasta ahora sólo ha sido medida utilizando  $\text{Ba}^{2+}$  como el ion permeable, dado que las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  no son detectables con la técnica de patch clamp [Demuro and Parker, 2003, Lee, 1999]. En base a estos resultados, se esperaba que la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  estuviera debajo del umbral de ruido,  $0,2pA$  [Demuro and Parker, 2003]. El valor obtenido por el algoritmo está lo suficientemente cerca de este límite superior como para considerar que el colorante es capaz de seguir adecuadamente los cambios en  $[\text{Ca}^{2+}]$  intracelular en este caso. Hemos probado también la exactitud de la corriente reconstruida mediante la integración de la ecuación dinámica (5.2), usando la forma funcional suave para  $M$  (Ec (4.4)) dada por el algoritmo (Fig. 5.7 D) y una versión simplificada de la corriente reconstruida (Fig. 5.7 F), la cual está limitada por la resolución temporal y espacial del registro experimental. Aunque la simulación numérica no tiene agregado ruido, la distribución espacio-temporal resultante del complejo de  $\text{Ca}^{2+}$  ligado al colorante difiere de la obtenida directamente del registro experimental en menos de 14 % en amplitud y en cantidades del orden de las resoluciones temporal y espacial de los registros experimentales, en las extensiones temporal y espacial.

### 5.5.4 Conclusiones

El algoritmo que hemos presentado tiene varios puntos en común con otros métodos del tipo “backward” [Blatter et al., 1997, Rios et al., 1999, Rios and Brum, 2002, Soeller and Cannell, 2002], compartiendo con ellos algunas de sus limitaciones. En particular, requiere el cálculo de derivadas espaciales y temporales, que están limitadas por la resolución de las imágenes. Más aún,

las derivadas numéricas introducen errores que tienden a amplificar el ruido inevitable que aparece en cualquier señal experimental. Sin embargo, hemos probado el comportamiento del algoritmo cuando se lo aplica a simulaciones numéricas con ruido Gaussiano, encontrando que la amplitud de la corriente reconstruida no se altera. El curso temporal de la corriente se ve más afectado debido a que los tiempos de apertura y cerrado se “borrorean” en presencia de altos niveles de ruido, un problema común a todos los métodos de tipo “backward”. En relación a este punto, sería importante desarrollar una herramienta de análisis que permita distinguir los eventos de liberación “verdaderos” de los “falsos”.

En relación al efecto del ruido, obtuvimos mayor confianza en los resultados del algoritmo mediante la comparación de las distribuciones de  $\text{Ca}^{2+}$  ligado al colorante determinadas a partir de los experimentos reales (que tienen ruido) con las obtenidas mediante simulaciones numéricas (libres de ruido) de la ecuación para la dinámica efectiva dada por el algoritmo. Las extensiones espacial y temporal de ambas distribuciones difieren en cantidades que son del orden de la resolución temporal y espacial de los experimentos, y la amplitud, en menos de un 15%. Probamos más aún la robustez del algoritmo frente a la presencia de ruido mediante la aplicación de una fuerte reducción del nivel del mismo en las imágenes experimentales, encontrando resultados que permanecen “cerca” de aquellos obtenidos utilizando datos iniciales con ruido.

Un problema adicional de nuestro enfoque es el hecho de que la resolución temporal del proceso de adquisición impone limitaciones en las escalas temporales que pueden resolverse, resultando en una subestimación de la corriente cuando no pueden seguirse los procesos rápidos. Este problema no es una particularidad de nuestro algoritmo, es ubicuo en todas las técnicas de imágenes: están limitadas por las escalas temporales características del colorante y su habilidad para seguir cambios en  $[\text{Ca}^{2+}]$ . La principal limitación de nuestro algoritmo es la capacidad de obtener una estimación del ansatz (4.4) que capture la dinámica de los procesos rápidos “desconocidos”, algo que puede hacerse si la cantidad de colorante es lo suficientemente grande. Pero aún si (4.4) se determina usando imágenes para las cuales la cantidad de colorante no es muy grande, el algoritmo es capaz de determinar las extensión espacial y el comportamiento temporal de la liberación en forma bastante exacta, dando una relación lineal entre las corrientes reconstruida y real. Esto implica que es necesario determinar el factor de subestimación de la corriente para un sólo valor de corriente. Esto puede hacerse usando registros con altas concentraciones de colorante para obtener las funciones

en (4.4). Otras posibilidades incluyen el análisis de los resultados obtenidos usando registros con dos concentraciones diferentes de colorante o diferentes duraciones de liberación.

Otras limitaciones experimentales (blurring, resolución espacial finita y offset) también conducen a resultados en los cuales la corriente está subestimada. Todavía es necesario realizar más trabajo tendiente a calibrar el método [Zou et al., 2004]. Otra limitación del algoritmo es el hecho de que requiere más de un evento para ser implementado y que los eventos con mayores valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$  no pueden analizarse. Sin embargo, trabajando con experimentos reales pudimos concluir que no es necesario que el máximo valor de  $[\text{Ca}^{2+}]$  de los distintos registros sea muy diferente y sólo una pequeña proporción de dichos registros es utilizada sólo con propósitos de “calibración”. Además, el algoritmo puede ser fácilmente automatizado: por ejemplo, el análisis completo de un conjunto de 30 eventos demanda  $< 30$  minutos en una PC Pentium 3.

## 5.6 Apéndice: Descripción de cómo obtener las funciones $f$ , $g$ , $h$ y $k$ y sus errores

Llamemos  $N_i$  al número de puntos,  $\zeta_{j,k}(C_i) \equiv (r_j, t_k)(C_i)$ , tales que  $C_i \leq [\text{Ca}^{2+}](r_j, t_k)(C_i) < C_{i+1}$ . Etiquetemos estos puntos,  $\zeta_{j,k}(C_i)$ , con el subíndice  $\ell$  (*i.e.*, cada  $\ell$  es un número entero asociado a cada uno de los puntos,  $\zeta_{j,k}(C_i)$ ; por lo tanto,  $1 \leq \ell \leq N_i$ , para cada  $C_i$ ). En realidad, deberíamos usar la notación  $\ell(i)$ , pero para simplificarla, nos olvidamos de la dependencia de  $\ell$  con  $i$ . Entonces, siguiendo la notación de [Press et al., 1992], definimos:

$$y_\ell^{(i)} \equiv M(\zeta_{j,k}(C_i)) = \frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]}{\partial t}|_{\zeta_{j,k}(C_i)} - R(\zeta_{j,k}(C_i)) - D_{\text{Ca}} \nabla^2[\text{Ca}^{2+}]|_{\zeta_{j,k}(C_i)}, \quad (5.20)$$

$$a_1^{(i)} \equiv g_i, \quad a_2^{(i)} \equiv f_i, \quad a_3^{(i)} \equiv h_i, \quad a_4^{(i)} \equiv k_i, \quad (5.21)$$

$$\begin{aligned} X_{\ell 1}^{(i)} &\equiv \frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]}{\partial t}|_{\zeta_{j,k}(C_i)}, & X_{\ell 2}^{(i)} &\equiv \nabla^2[\text{Ca}^{2+}]|_{\zeta_{j,k}(C_i)}, \\ X_{\ell 3}^{(i)} &\equiv |\nabla[\text{Ca}^{2+}]|_{\zeta_{j,k}(C_i)}^2, & X_{\ell 4}^{(i)} &= 1. \end{aligned} \quad (5.22)$$

Llamemos  $\sigma_\ell^{(i)}$  al error de  $y_\ell^{(i)}$ , que puede ser calculado propagando el error en el miembro derecho de la Ec. (5.20). Entonces, definimos la función de

*mérito* para cada valor de  $C_i$  como:

$$\chi_i^2 = \sum_{\ell=1}^{N_i} \left( \frac{y_{\ell}^{(i)} - \sum_{n=1}^4 a_n^{(i)} X_{\ell n}^{(i)}}{\sigma_{\ell}^{(i)}} \right)^2. \quad (5.23)$$

Para cada valor compartimentalizado de la concentración  $[\text{Ca}^{2+}]$ ,  $C_i$ , los mejores valores de  $\{a_n^{(i)}\}_{n=1}^4$  son aquéllos que minimizan  $\chi_i^2$ . Realizamos esta minimización a través de una “singular value decomposition” de la matriz  $X_{\ell n}^{(i)}/\sigma_{\ell}^{(i)}$  [Press et al., 1992]. Para cada  $n = 1, \dots, 4$ , necesitamos el conjunto de valores,  $\{a_n^{(i)}\}_{n=1}^4$ , para aproximar funciones continuas,  $\{a_n[\text{Ca}^{2+}]\}_{n=1}^4$  (las funciones  $g$ ,  $f$ ,  $h$ , y  $k$ ). Para garantizar continuidad, utilizamos el valor obtenido para  $a_n^{(i)}$  como la semilla inicial para comenzar el proceso de minimización que determina  $a_n^{(i+1)}$ . Para determinar los errores de los valores  $\{a_n^{(i)}\}_{n=1}^4$  obtenidos de este modo, seguimos [Press et al., 1992]. Definimos la matriz de *diseño*,  $\mathbf{A}^{(i)}$ , como la matriz de  $N_i \times 4$ , cuyos elementos están dados por  $A_{\ell m}^{(i)} = X_{\ell m}^{(i)}/\sigma_{\ell}^{(i)}$ . Llamamos  $\alpha^{(i)} = (\mathbf{A}^{(i)})^T \cdot \mathbf{A}^{(i)}$ , que es una matriz cuadrada, y  $c^{(i)} = (\alpha^{(i)})^{-1}$ , su inversa. Así, los elementos de la diagonal de  $c^{(i)}$  son las varianzas (incertezas al cuadrado) de los parámetros ajustados,  $\{a_n^{(i)}\}$ ,  $1 \leq n \leq 4$  [Press et al., 1992]. Tomando la raíz cuadrada de estas varianzas obtenemos los errores,  $\{\Delta a_n^{(i)}\}$ ,  $1 \leq n \leq 4$ . Una vez que tenemos estimaciones de  $\{a_n^{(i)}\}$ ,  $1 \leq n \leq 4$ , para cada uno de los valores compartimentalizados de  $[\text{Ca}^{2+}]$ ,  $C_i$ , tenemos entonces una aproximación para los valores que las funciones  $f$ ,  $g$ ,  $h$ , y  $k$  toman sobre estos valores compartimentalizados (que son  $a_2^{(i)}$ ,  $a_1^{(i)}$ ,  $a_3^{(i)}$  y  $a_4^{(i)}$ , respectivamente). Buscamos, entonces, funciones continuas que pasen por estos valores, ajustando los puntos con una curva no lineal obtenida usando una red neuronal. Ilustramos aquí el modo en que estimamos el error de esta interpolación con la función  $g$ , procedimos similarmente con las otras funciones. Para cada  $C_i$  definimos  $E_+^{(i)} = |a_1^{(i)} + \Delta a_1^{(i)} - g(C_i)|$  y  $E_-^{(i)} = |a_1^{(i)} - \Delta a_1^{(i)} - g(C_i)|$ , donde  $g$  es la función suave  $[\text{Ca}^{2+}]$ -dependiente que obtuvimos ajustando el conjunto discreto de puntos  $g_i$ . Entonces, para  $[\text{Ca}^{2+}] \in (C_i, C_{i+1})$  definimos  $\Delta g([\text{Ca}^{2+}]) \equiv \max\{E_+, E_-\}$ .

El término  $M$  que estamos tratando de determinar con este procedimiento de optimización está mayormente dado por las reacciones con los buffers que no son el colorante (ver Capítulo 4). Entonces, esperamos que un *ansatz* similar (pero con diferentes funciones  $f_R$ ,  $g_R$ ,  $h_R$  y  $k_R$ ) sea válido para  $R$ , el término debido a la reacción con el colorante, definido en (1.4). Por lo tanto, insertando el *ansatz* para  $R$  en (5.2) vemos que hay una solución trivial para el *ansatz* de  $M$ :  $g = 1 - g_R$ ,  $f = -D_{Ca} - f_R$ ,  $h = -h_R$  y  $k = -k_R$ . Este no es el *ansatz* que estamos buscando dado que sólo sirve en regiones con

$Q_{Ca} = 0$ . Así, no hay una solución única para nuestro procedimiento de optimización, y esto introduce algunas dificultades. Para estudiar este problema, minimizamos  $\chi_i^2$  en (5.23) usando diferentes tolerancias, y obtuvimos siempre el mismo resultado. Sin embargo, como se muestra en la Fig. 5.1 *F*, vemos que  $f$ ,  $g$  y  $h$  son relativamente pequeñas y que  $f$  y  $g$  fluctúan considerablemente para altos valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , como si el proceso de optimización estuviera convergiendo a diferentes mínimos para valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$  levemente diferentes. Más aún, las magnitudes de los tres primeros términos ( $g \frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]}{\partial t}$ ,  $f \nabla^2[\text{Ca}^{2+}]$  y  $h |\nabla[\text{Ca}^{2+}]|^2$ ) en la Ec. (4.4) son menores o iguales al 20% de la magnitud de  $k$ . Por esta razón, decidimos minimizar  $\chi_i^2$  fijando  $f = g = h = 0$  y determinar sólo  $k$ . Obtuvimos resultados más limpios y mejores estimaciones de la corriente y éstos son los resultados que presentamos en este capítulo (excepto en la Fig. 5.1). La posibilidad de ajustar  $M$  usando sólo una función de  $[\text{Ca}^{2+}]$  está relacionada a las propiedades matemáticas de las soluciones de las ecuaciones dinámicas en presencia de corrientes localizadas, y no a las ecuaciones dinámicas en general. Discutiremos en detalle las propiedades matemáticas de estas soluciones en el Capítulo 6.

# Capítulo 6

## Reducciones observacionales: una ecuación cerrada para el transporte de calcio en presencia de “buffers” con solución analítica

### 6.1 Resumen

La aplicación del algoritmo descrito en el Capítulo 5 tanto a señales experimentales como a aquéllas generadas numéricamente mostró que bastaba con mantener solamente la función  $k([\text{Ca}^{2+}])$  en el ansatz (4.4) para poder describir la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$ . Más aún,  $k([\text{Ca}^{2+}])$  no se alejaba demasiado de una función lineal (ver Figs. 5.1 *F* y 5.7 *D*). En este capítulo investigamos el por qué de este comportamiento y concluimos que está vinculado con el hecho de que el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  ocurre a través de un canal o cluster muy localizado de canales únicos. Estudiamos a continuación las limitaciones de aproximar  $k([\text{Ca}^{2+}])$  por una función lineal de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , comparándola con la *RBA* y la aproximación de Naraghi y Neher discutidas en el Capítulo 1. A pesar de sus limitaciones, la aproximación lineal tiene la enorme ventaja de contar con una solución analítica, que usamos tanto para describir las señales experimentales analizadas en el Capítulo 5 como para re-analizar los puffs sintéticos del Capítulo 2.

## 6.2 Introducción

En el Capítulo 5 supusimos que la evolución de  $[Ca^{2+}]$  estaba determinada por la Ec. (5.2), en donde los términos debidos a la reacción con el colorante ( $R$ ) y a las reacciones con los otros buffers (incluidos en  $M$ ) están separados. Por otro lado, supusimos que  $M$  podía aproximarse por la Ec. (4.4). Sin embargo, de la aplicación del algoritmo observamos que bastaba con sólo incluir la función  $k$  dentro de  $M$  para ajustar los datos (es decir, suponer  $f = g = h = 0$ ). Más aún, como se desprende de las Figs. 5.1  $F$  y 5.7  $D$ , vimos que  $k([Ca^{2+}])$  era aproximadamente lineal. Ahora bien, el colorante no es distinto de los otros buffers incluidos en  $M$ , por lo que también esperamos que  $R$  (el término de reacción con el colorante) pueda aproximarse por una función (lineal) de  $[Ca^{2+}]$ . Efectivamente, comprobamos esto tanto en las simulaciones numéricas presentadas en el Capítulo 5 como en diversos datos experimentales. Mostramos en la Fig. 6.1 un gráfico del término  $M$  (en el que incluimos también el término de reacción con el colorante) como función de  $[Ca^{2+}]$ , para dos conjuntos de datos experimentales. En ambos casos, el término  $M$  fue determinado como se explica en el Capítulo 5 a partir de las imágenes de fluorescencia correspondientes (obtenidas con microscopio confocal y barrido lineal). Los datos de la Fig. 6.1 (a) corresponden a los sparklets analizados en el Capítulo 5. Los datos de la Fig. 6.1 (b) corresponden a puffs de  $Ca^{2+}$  mediados por  $IP_3$  obtenidos en ovocitos de *Xenopus laevis* utilizando el protocolo descrito en [Dargan and Parker, 2003, Dargan and Parker, 2004].

Podemos observar en la Fig. 6.1 que, en estos casos, el conjunto total de reacciones (incluyendo la interacción con el colorante) y otros mecanismos de remoción de  $Ca^{2+}$  presentes en el citosol pueden describirse matemáticamente por un término que depende exclusivamente de  $[Ca^{2+}]$ . En la sección siguiente analizamos las razones para que esto ocurra. En las otras secciones analizamos las limitaciones de aproximar este término mediante una función lineal de  $[Ca^{2+}]$ , tanto en simulaciones numéricas como en datos experimentales. Finalmente, re-analizamos los puffs sintéticos del Cap. 2 a la luz de esta nueva aproximación. De ahora en más, incluiremos el término de reacción con el colorante dentro del término  $M$  (es decir,  $M = \sum R_i + q_{rem}$ ).

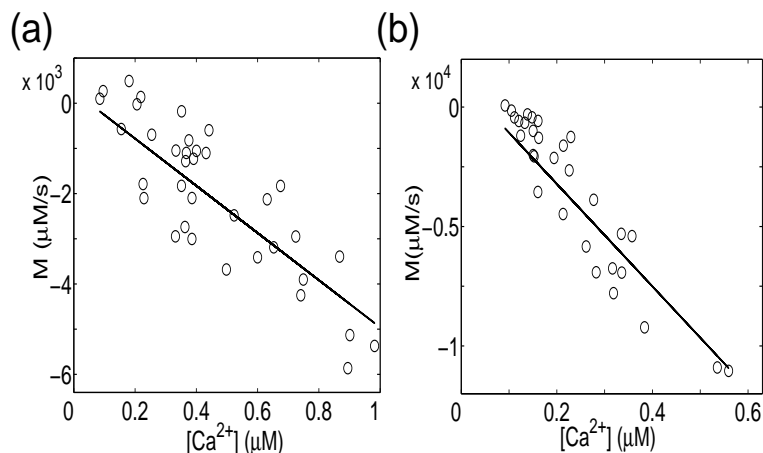


Figura 6.1:  $M$  en función de la concentración de calcio libre,  $[Ca^{2+}]$ , para diferentes conjuntos de datos experimentales (círculos) y sus respectivos ajustes lineales (líneas llenas). (a) Datos experimentales correspondientes a sparklets en ovocitos de *Xenopus*. (b) Datos experimentales correspondientes a puffs de  $Ca^{2+}$  mediados por  $IP_3$ , también en ovocitos de *Xenopus*.

### 6.3 Por qué los mecanismos de remoción pueden aproximarse por una función de $[Ca^{2+}]$ : la importancia de la presencia de una fuente localizada de $Ca^{2+}$

Todas las señales analizadas en el Capítulo 5 corresponden a situaciones en las que puede distinguirse el ingreso de  $Ca^{2+}$  a través de un único canal o cluster de canales (un punto en la imagen de fluorescencia). Esto hace que, al menos localmente, la concentración,  $[Ca^{2+}]$ , tenga un máximo en el punto de ingreso de  $Ca^{2+}$ , al que identificamos con el origen de coordenadas, y decaiga monótonamente con la distancia al mismo,  $r$ . Esto también ocurre con las situaciones analizadas en el Capítulo 4, en las que se parte de una condición inicial con un máximo de  $[Ca^{2+}]$  en el origen de coordenadas. En estas situaciones, si nada dependiera del tiempo, tanto  $M$  como  $[Ca^{2+}]$  serían sólo funciones de  $r$ , dada la simetría esférica del problema. El hecho de que  $[Ca^{2+}](r)$  sea una función monótona decreciente implica que es posible invertir  $r([Ca^{2+}])$  y, por lo tanto, cualquier función de  $r$  puede escribirse como una función de  $[Ca^{2+}]$ . Por lo tanto, en el caso estacionario podría escribirse



a  $M$  como función de  $[Ca^{2+}]$ .

Frente a la presencia de fuentes de reactivos muy localizadas, los sistemas de reacción-difusión se comportan aproximándose a una situación estacionaria muy rápidamente cerca de la fuente (mientras la fuente está “encendida”). Esto se ve claramente en el caso en que sólo hay difusión, en el que la evolución está dada por la Ec. (2.1) y cuya solución es (2.2). De esta solución se desprende que, para cada valor de  $r$ , existe un tiempo  $t^*(r)$ , para el que el término con la integral se vuelve despreciable frente a 1. A partir de ese tiempo, que se obtiene a partir de la condición  $r/(\sqrt{4Dt^*}) \ll 1$ ,  $[Ca^{2+}](r, t)$ , permanece prácticamente constante para ese valor de  $r$ . Por ejemplo, si  $r/(\sqrt{4Dt^*}) = 0,05$ , el error que se comete al aproximar  $[Ca^{2+}](r, t \geq t^*)$  por  $[Ca^{2+}]_{rest} + \frac{\sigma}{4\pi Dr}$  está alrededor del 5%. Supongamos que podemos usar la Ec. (2.1) para describir la dinámica del  $Ca^{2+}$  citosólico en presencia de buffers y de una fuente puntual,  $f = \sigma\delta(\mathbf{r})$ , donde  $f$  y  $D$  corresponden a valores efectivos de intensidad y difusión, como se discutió en el Capítulo 2. Si  $r = 0,6 \text{ nm}$ , que es aproximadamente el tamaño del poro de un  $IP_3R$ ,  $t^* = 0,00072 \text{ ms}$  para  $D = 50 \mu m^2/s$  mientras que  $t^* = 0,00012 \text{ ms}$  para  $D = 300 \mu m^2/s$ . Si tomamos como  $r$  el tamaño de un cluster de  $IP_3Rs$ ,  $r = 50 \text{ nm}$ , obtenemos  $t^* = 0,005 \text{ ms}$  para  $D = 50 \mu m^2/s$  y  $t^* = 0,83 \text{ ms}$  para  $D = 300 \mu m^2/s$ . Si tenemos en cuenta que la resolución temporal usual en un experimento de barrido lineal es  $\approx 8 \text{ ms}$  [Demuro and Parker, 2003] -puede ser incluso  $\approx 2 \text{ ms}$  utilizando un sistema de adquisición muy rápido- y que las duraciones típicas de los eventos elementales de calcio están en el rango de decenas de milisegundos, las estimaciones recién expuestas nos indican que cuando se están adquiriendo datos en la segunda línea del barrido lineal, el sistema ya se encuentra en su estado estacionario. Lo mismo ocurre con la solución en presencia de una fuente esférica.

No es posible describir el caso más complicado en que la evolución de  $[Ca^{2+}]$  está dada por Ecs. (1.2)–(1.3) mediante soluciones analíticas. Sin embargo, a partir de simulaciones numéricas observamos el mismo tipo de comportamiento, es decir, una tendencia a la solución estacionaria en las inmediaciones de la fuente puntual, luego de un (corto) transitorio. Ilustramos esto con las Figs. 6.2 (a) y (b) donde mostramos el resultado de simulaciones numéricas de las Ecs. (1.2)–(1.3) para el caso de un único buffer cuyas constantes de reacción son  $k_{on} = 1 \mu M^{-1}s^{-1}$  y  $k_{off} = 10 s^{-1}$ , sin bombas y con una fuente de la forma (2.4) con  $I_{Ca} = 0,5 pA$ ,  $R_f = 0,5 \mu m$  y  $t_d$  mayor que el tiempo final de la simulación.

En la Fig. 6.2 (a) mostramos los perfiles temporales de  $[Ca^{2+}]$  para tres

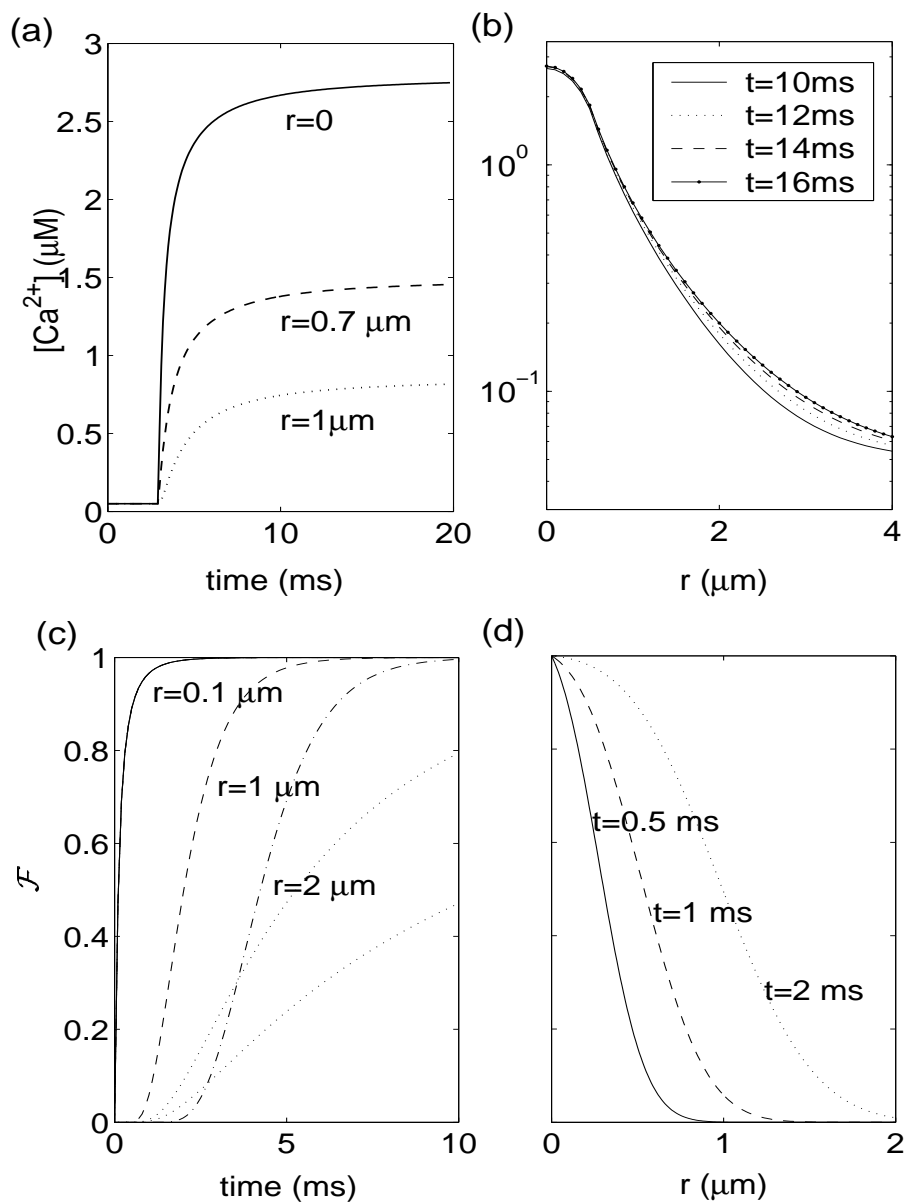


Figura 6.2: (a)-(b) Concentración de calcio obtenida a partir de una simulación numérica con una fuente que está uniformemente distribuida sobre una esfera de radio  $R_f = 0,5 \mu m$ . (a) Perfiles temporales para tres radios diferentes,  $r = 0$  (línea llena),  $r = 0,7 \mu m$  (línea cortada) y  $r = 1 \mu m$  (línea punteada). (b) Perfiles espaciales para cuatro tiempos diferentes,  $t = 10 ms$ ,  $t = 12 ms$ ,  $t = 14 ms$  y  $t = 16 ms$ . Notar que el eje vertical está en escala logarítmica. (c)-(d) Perfiles temporales y espaciales, respectivamente, de la función  $\mathcal{F}(r, t)$  definida en la Ec. (6.4), con  $D_{Ca} = 50 \mu m^2/s$  y  $\mu = 1000 s^{-1}$ . Sobre las curvas se indican los radios o tiempos, según el caso, a los que corresponden los perfiles. Las curvas punteadas en (c) corresponden a  $r = 0,1 \mu m$  pero usando  $\mu = 100 s^{-1}$  (curva superior) y  $\mu = 10 s^{-1}$  (curva inferior), y el mismo valor de  $D_{Ca}$ .

valores diferentes de  $r$  ( $r = 0$ ,  $r = 0,7 \mu m$  y  $r = 1 \mu m$ , respectivamente). De este gráfico vemos que para cada  $r$  existe un tiempo después del cual  $[Ca^{2+}]$  permanece prácticamente constante. En la Fig. 6.2 (b) graficamos los perfiles espaciales de  $[Ca^{2+}]$  para cuatro tiempos diferentes ( $t = 10 ms$ ,  $t = 12 ms$ ,  $t = 14 ms$  y  $t = 16 ms$ ). El eje vertical está en escala logarítmica para poder distinguir las pequeñas diferencias entre perfiles sucesivos. Vemos entonces que para  $t \approx 10ms$ ,  $[Ca^{2+}(r, t)]$  es prácticamente estacionaria para  $r \leq 1\mu m$ . Este resultado, que corresponde a  $I_{Ca} = 0,5 pA$ , se obtiene también para otros valores de corriente. La solución se aproxima a la estacionaria más rápidamente cuanto más débil sea la fuente localizada de  $Ca^{2+}$ . Como se desprende de la Fig. 6.2 (b), la solución estacionaria  $[Ca^{2+}]_s$  decrece monótonamente con la posición,  $r$ , como en el caso de difusión pura. Esto permite invertir la función  $[Ca^{2+}]_s(r)$  para obtener  $r([Ca^{2+}]_s)$  y así escribir cualquier función de  $r$  como una función de  $[Ca^{2+}]_s$ . Dado que  $[Ca^{2+}](r, t) \approx [Ca^{2+}]_s$ , para tiempos muy cortos suficientemente cerca de la fuente, y que lo mismo sucede con las concentraciones de todos los buffers que interactúan con  $Ca^{2+}$ , podemos escribir a  $M$  (el término definido en (4.1) que contiene todos los mecanismos de remoción de  $Ca^{2+}$ , incluyendo las bombas y las reacciones con los buffers) como función de  $[Ca^{2+}]$ . Es decir, suficientemente cerca de la fuente y luego de un tiempo relativamente corto puede suponerse que  $M(r, t) \approx M(r([Ca^{2+}])) = M([Ca^{2+}])$ . Por lo tanto, para fuentes suficientemente localizadas, la solución,  $[Ca^{2+}](\mathbf{r}, t)$ , de las ecuaciones (1.2)-(1.3) puede aproximarse por una solución de la ecuación:

$$\frac{\partial [Ca^{2+}]}{\partial t} = M([Ca^{2+}]) + D_{Ca} \nabla^2 [Ca^{2+}] + Q_{Ca}. \quad (6.1)$$

donde ahora  $M$  incluye las reacciones del calcio con todos los buffers, incluido el indicador fluorescente.

Como mostramos en la Fig. 6.1,  $M([Ca^{2+}])$  es, en muchos casos, aproximadamente lineal, por lo que la Ec. (6.1) puede aproximarse por

$$\frac{\partial [Ca^{2+}]}{\partial t} = -\mu([Ca^{2+}] - [Ca^{2+}]_0) + D_{Ca} \nabla^2 [Ca^{2+}] + Q_{Ca}, \quad (6.2)$$

donde  $\mu$  y  $[Ca^{2+}]_0$  son parámetros constantes que se determinan a partir de los datos experimentales (o simulados). La Ec. (6.2) es aparentemente similar a la ecuación obtenida dentro de la aproximación de buffer en exceso, Ec. (1.15) (ver Capítulo 1). Sin embargo, hay dos diferencias entre ellas. La primera es que en la *EBA* sólo se reemplaza  $\sum_i R_i$  por una función lineal de la concentración de calcio, mientras que aquí estamos reemplazando todos los mecanismos de captura. La segunda y principal diferencia es que en

nuestro abordaje  $M$  se obtiene a partir de ajustar los datos experimentales o simulados (y no a partir de una aproximación analítica a las ecuaciones originales del modelo).

La mayor ventaja de la Ec. (6.2) es que posee una solución analítica en presencia de una fuente puntual ubicada en el origen,  $Q_{Ca} = \sigma_{Ca} \delta(\mathbf{r}) = (5,2 \times 10^3 \mu M \mu m^3 / pC) I_{Ca} \delta(\mathbf{r})$ , que se enciende en  $t = 0$  y permanece encendida. La misma está dada por (ver por ejemplo, [Pape et al, 1995, Pape et al, 1998]):

$$[Ca^{2+}] = [Ca^{2+}]_{rest} + \frac{\sigma_{Ca}}{4\pi D_{Ca} r} \times \exp(-r/\lambda) \times \mathcal{F}(r, t), \quad (6.3)$$

donde  $\lambda = \sqrt{D_{Ca}/\mu}$  y

$$\mathcal{F}(r, t) = \frac{1}{2} \left[ \operatorname{erfc} \left( \frac{r}{\sqrt{4D_{Ca}t}} - \sqrt{\mu t} \right) + \exp\left(\frac{2r}{\lambda}\right) \times \operatorname{erfc} \left( \frac{r}{\sqrt{4D_{Ca}t}} + \sqrt{\mu t} \right) \right]. \quad (6.4)$$

$\mathcal{F}(r, t) = 0$  para  $t = 0$  (corresponde a  $[Ca^{2+}] = [Ca^{2+}]_{rest}$ ) y  $\mathcal{F} \rightarrow 1$  cuando  $t \rightarrow \infty$ . Si  $\mathcal{F} = 1$  en el miembro derecho de la Ec. (6.3), obtenemos la solución estacionaria de la Ec. (6.2). Si  $\mu = 0$ , entonces  $\lambda \rightarrow \infty$  y la Ec. (6.3) se reduce a la Ec. (2.2). En la Fig. 6.2 (c)-(d) graficamos  $\mathcal{F}(r, t)$  utilizando  $D_{Ca} = 50 \mu m^2/s$  y  $\mu = 1000 s^{-1}$ . En (c) presentamos perfiles temporales para tres radios diferentes y en (d) perfiles espaciales para tres tiempos diferentes. Vemos que muy cerca de la fuente, para  $r = 0,1 \mu m$  (línea llena),  $\mathcal{F}$  se acerca rápidamente a 1, es decir que  $[Ca^{2+}]$  va también muy rápidamente a su solución estacionaria. La rapidez con la que  $\mathcal{F} \rightarrow 1$  disminuye al mirar puntos más alejados de la fuente, como se ve para  $r = 1 \mu m$  (línea cortada) y  $r = 2 \mu m$  (línea cortada y punteada). Las líneas punteadas en (c) corresponden a perfiles temporales de  $\mathcal{F}$ , para  $r = 0,1 \mu m$  pero con  $\mu = 100 s^{-1}$  (curva punteada superior) y  $\mu = 10 s^{-1}$  (curva punteada inferior). Se ve así que para un mismo valor de  $r$  la velocidad con la que  $[Ca^{2+}]$  se acerca a la solución estacionaria disminuye al disminuir  $\mu$ . Los perfiles de la figura (d) indican que al pasar más tiempo con la fuente encendida, el calcio que se libera en el origen va llegando a puntos cada vez más lejanos, apartándolos de  $[Ca^{2+}]_{rest}$ .

La solución de la Ec. (6.2) en el caso de una fuente que está uniformemente distribuida sobre una esfera puede encontrarse, por ejemplo, en [Cong et al, 2004].

$D_{Ca}$	$220 \mu m^2/s$	$D_{CaB}$	$50 \mu m^2/s$
$[B]_T$	$100 \mu M$	$[Ca^{2+}]_{rest}$	$0,05 \mu M$
$k_{on}^B$	$100,0 - 1,0 \mu M^{-1} s^{-1}$	$k_{off}^B$	$1000,0 - 10,0 s^{-1}$
$R_f$	$0,5 \mu m$	$t_s$	$3 ms$
$t_d$	$10 ms$	$I_{Ca}$	$0,5 pA$
$R_t$	$6,0 \mu m$	$T_t$	$20 ms$
$\Delta r$	$0,1 \mu m$	$\Delta t$	$10^{-5} s$

Tabla 6.1: Parámetros utilizados en las simulaciones con un único buffer correspondientes a la Fig. 6.3.

## 6.4 Probando la reducción lineal con simulaciones numéricas

Exploramos ahora, numéricamente, en qué régimen de parámetros la reducción lineal (6.2) da resultados adecuados y cómo es su comportamiento comparado con las “reducciones analíticas” que mencionamos en la Sec. 1.3 del Capítulo 1. Con este fin simulamos numéricamente las Ecs. (1.2)-(1.3) en presencia de un único buffer, sin otro mecanismo de remoción ( $q_{rem} = 0$ ) y para una fuente de la forma (2.4). Realizamos tres conjuntos de simulaciones variando los parámetros  $k_{on}^B$  y  $k_{off}^B$ :  $k_{on}^B = 100 \mu M^{-1} s^{-1}$ ,  $k_{off}^B = 1000 s^{-1}$  para el “Set A”;  $k_{on}^B = 10 \mu M^{-1} s^{-1}$ ,  $k_{off}^B = 100 s^{-1}$  para el “Set B” y  $k_{on}^B = 1 \mu M^{-1} s^{-1}$ ,  $k_{off}^B = 10 s^{-1}$  para el “Set C”. Los otros parámetros, que se mantuvieron constantes, se enumeran en la Tabla 6.1. Las simulaciones se iniciaron a partir de una distribución uniforme de equilibrio para todas las especies con el valor de reposo de la concentración de  $Ca^{2+}$  de  $50 nM$ . Las ecuaciones del modelo se resolvieron numéricamente utilizando un esquema de diferencias finitas en una grilla con simetría esférica de longitud  $R_t = 6 \mu m$ , con pasos espacial y temporal de  $0,1 \mu m$  y  $10^{-5} s$ , respectivamente. El tiempo total de integración es de  $T_t = 20 ms$ .

Cada columna en la Fig. 6.3 corresponde a uno de los tres conjuntos de simulaciones numéricas mencionados anteriormente. En la primera fila graficamos  $M$  en función de  $[Ca^{2+}]$  (tanto  $M$  como  $[Ca^{2+}]$  son graficados con una resolución espacial igual a  $\Delta r$ , es decir  $0,1 \mu m$ , y con una resolución temporal de  $10 \times \Delta t$ , es decir  $0,1 ms$ ), mientras la fuente está encendida ( $3 ms \leq t \leq 13 ms$ ). Para mostrar la aproximación a la solución estacionaria (la que es más evidente en la Fig. 6.3 (a)), no interpolamos los puntos graficados. La curva con líneas cortadas en la Fig. 6.3 (a) corresponde a la solución

estacionaria respecto de la cual la diferencia con la simulación numérica es del orden de 17% para  $t \approx 12,8$  ms y  $r \leq 0,5\mu m$ . A partir de todos los puntos contenidos en la Fig. 6.3 (a) se determinó la recta que mejor aproximara la relación entre  $M$  y  $[Ca^{2+}]$ . Como hay muchos más puntos cerca de la solución estacionaria, la recta obtenida es la que se indica en la figura con la palabra “linear”. Se procedió análogamente con las Figs. 6.3 (b) y (c). A partir de ese ajuste lineal, se obtuvieron los parámetros  $\mu$  y  $[Ca^{2+}]_0$  que aparecen en la Ec. (6.2). Se obtuvieron parámetros similares (que diferían en 7%) si en lugar de ajustar sólo los puntos de la simulación para tiempos durante los cuales la fuente está encendida, se incluían también tiempos para los cuales ya estaba apagada. Cuantificaremos mejor estas diferencias en la sección siguiente. Por comparación, se grafica también la relación lineal dada por la Ec. (1.15) que se obtiene en la aproximación *EBA*. Usando  $M = -\mu([Ca^{2+}] - [Ca^{2+}]_0)$  con los valores determinados a partir de las Figs. 6.3 (a)–(c) y la fuente de la simulación numérica original, integramos numéricamente la Ec. (6.2). Los resultados de estas simulaciones se muestran en las Figs. 6.3 (d)–(i) con líneas cortadas de trazo grueso. Los perfiles temporales corresponden a  $r = 0\mu m$  y los perfiles espaciales, a  $t = 12,8$  ms. En todas estas figuras hay cinco curvas diferentes: con línea llena, el resultado de integrar las Ecs. (1.2)–(1.3), lo que denominamos *RDE*; con líneas punteadas, el resultado de integrar la Ec. (1.8), denominado *RBA*; con líneas finas cortadas, el resultado de integrar la Ec. (1.15), denominado *EBA*; con línea punteada y cortada, el resultado de integrar las Ecs. (1.16)–(1.17), denominado *NN*; y finalmente, con línea cortada de trazo grueso, el resultado de integrar la Ec. (6.2), denotada como *linear*.

Los tres conjuntos de simulaciones corresponden a un buffer con igual constante de disociación,  $K_d^B = k_{off}^B/k_{on}^B = 10\mu M$ , y tasas de reacción decrecientes al ir de izquierda a derecha en la Fig. 6.3. Puede verse entonces que la aproximación de la Ec. (6.2) mejora cuando el buffer es más lento. Lo mismo ocurre con la *EBA*. Por otro lado, como era de esperar, la *RBA* empeora cuando el buffer es más lento. En todos los casos, la aproximación *NN* es la que provee la mejor descripción. Al ir de izquierda a derecha en la Fig. 6.3, disminuye el tiempo que le lleva a  $[Ca^{2+}]$  alcanzar su solución estacionaria (estando encendida la fuente). ¿Qué es lo que hace que, dados dos buffers con el mismo  $K_d$ , el sistema con el buffer de cinética más lenta sea el que tiende más rápidamente a la solución estacionaria? Este resultado puede interpretarse en términos de la discusión de la Sec. 6.3. Si consideramos que el sistema puede describirse en forma aproximada por la Ec. (2.1) (donde el término de fuente y el coeficiente de difusión son términos “efectivos”), cuya solución está dada por la Ec. (2.2), vimos que la condición

para alcanzar el estado estacionario para un dado valor de  $r$  está dada por  $r/(\sqrt{4Dt^*}) \ll 1$ , siendo  $t^*(r)$  el tiempo a partir del cual la integral en (2.2) se vuelve despreciable frente a 1. Por otro lado hemos mencionado que el valor del coeficiente efectivo de difusión depende de la concentración de calcio libre (ver Fig. 7 en la Introducción). Al ser menores los valores de  $k_{on}$  y  $k_{off}$ , la concentración de calcio libre alcanza niveles más altos (notar la diferencia de escala en los ejes horizontales, y también en los verticales, de las Figs. 6.3 (a), (b) y (c)), por lo tanto se espera un valor promedio mayor para el coeficiente efectivo de difusión,  $D$ , y un tiempo menor en alcanzarse el estado estacionario. Ahora bien, ¿cómo se explica entonces que la aproximación lineal funcione mejor cuando el buffer es más lento? En la Fig. 6.2 (c) hemos descrito el comportamiento de la solución analítica de la Ec. (6.2) al variar el parámetro  $\mu$ , vimos que el mismo regula la velocidad con la que la solución tiende al estacionario. Al ser menores los valores de  $k_{on}$  y  $k_{off}$ , no sólo aumenta la concentración de calcio libre sino que también disminuye la magnitud del término  $M$  (que en el caso de la figura que estamos analizando está determinado exclusivamente por la reacción con el único buffer presente en las simulaciones), lo que hace que el valor de  $\mu$  decrezca notablemente de izquierda a derecha ( $\mu = 3091, 1; 798, 7$  y  $96, 5$ , respectivamente). Así es como la simulación a la que le corresponde mayor valor de  $\mu$  (Fig. 6.3 (a)), y que por lo tanto irá más rápidamente al estacionario dentro de la aproximación lineal que estamos estudiando, es la que en realidad tarda más en alcanzar dicho estacionario y esto explica por qué la aproximación mejora al ir de izquierda a derecha en la Fig. 6.3. Una explicación similar es aplicable en el caso de la *EBA* en donde  $\mu$  es reemplazado por  $k_{on}[B]_T$ .

## 6.5 Análisis de errores

Al principio de este capítulo presentamos un argumento para explicar por qué, tanto en simulaciones numéricas como en datos experimentales, la suma de todos los términos de remoción, incluidos los de reacción con los buffers ( $M$ ), puede escribirse como una función sólo de  $[Ca^{2+}]$ . Este argumento está fuertemente ligado a la presencia de una fuente de  $[Ca^{2+}]$  (encendida) y localizada espacialmente. Sin embargo, la Fig. 6.3 indica que la Ec. (6.2) con parámetros  $\mu$  y  $[Ca^{2+}]_0$  fijos, puede describir la dinámica espacio-temporal de  $[Ca^{2+}]$  no sólo mientras la fuente localizada está encendida y “cerca” de la solución estacionaria, sino también una vez que se apaga la fuente. Por esta razón, investigamos, en primer lugar, qué rango de datos conviene usar para

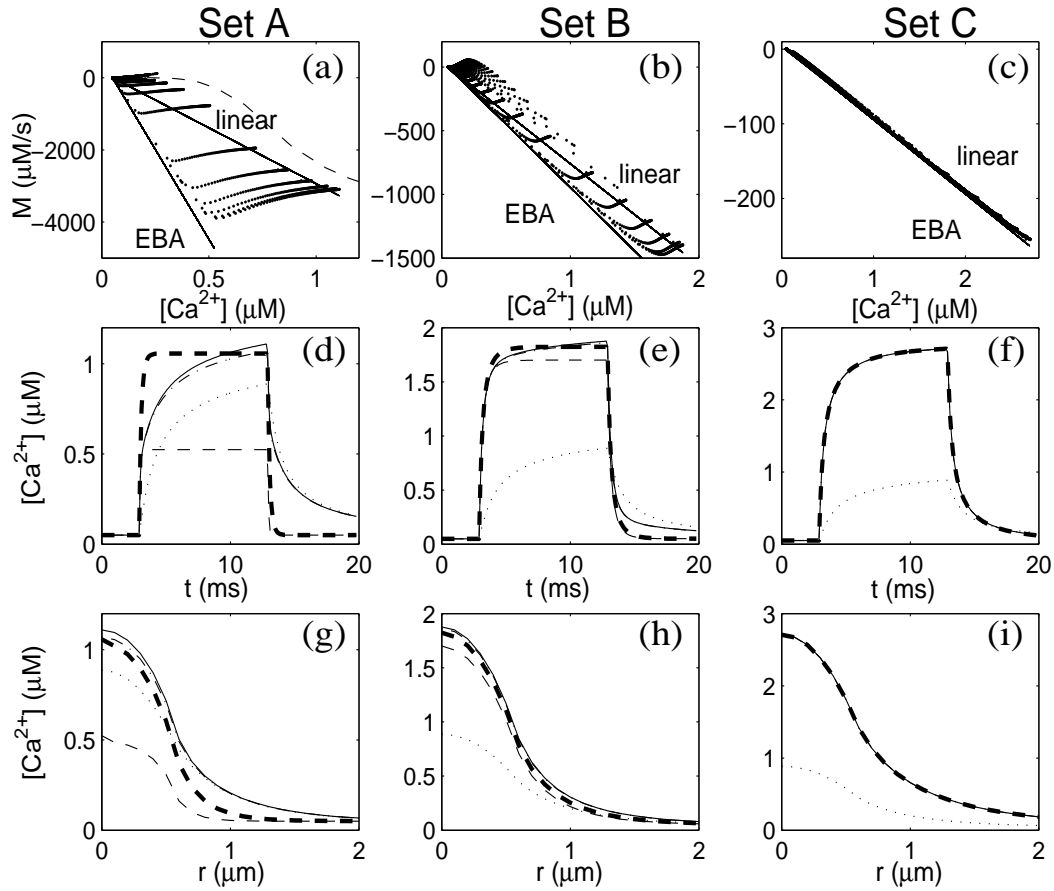


Figura 6.3: Secuencia de gráficos comparativos para diferentes conjuntos de simulaciones numéricas con un único buffer y una fuente de la forma (2.4) que se enciende en  $t = 3$  ms y se apaga en  $t = 13$  ms. (a), (d), (g):  $k_{on}^B = 100 \mu M^{-1} s^{-1}$ ,  $k_{off}^B = 1000 s^{-1}$ ; (b), (e), (h):  $k_{on}^B = 10 \mu M^{-1} s^{-1}$ ,  $k_{off}^B = 100 s^{-1}$ ; (c), (f), (i):  $k_{on}^B = 1 \mu M^{-1} s^{-1}$ ,  $k_{off}^B = 10 s^{-1}$ . Para los demás valores de los parámetros, ver Tabla 6.1. (a)–(c):  $M$  en función de  $[Ca^{2+}]$  (puntos), su ajuste lineal (“linear”) y la relación  $-k_{on}^B[B]_T[Ca^{2+}]$  prescrita por la *EBA*, ambas con línea llena. En (a) se muestra también la solución estacionaria (línea cortada). Perfiles temporales en  $r = 0 \mu m$  ((d)–(f)) y espaciales en  $t = 12,8$  ms ((g)–(i)) de  $[Ca^{2+}]$  para *RDE* (líneas llenas), *RBA* (líneas punteadas), *EBA* (líneas cortadas de trazo fino), *NN* (líneas cortadas y punteadas) y aproximación lineal (líneas cortadas de trazo grueso).



determinar  $M$  como función de  $[Ca^{2+}]$  y hasta qué punto el ajuste obtenido mientras la fuente está prendida sirve para describir la dinámica una vez que se apaga la fuente. Repetimos este análisis para los tres conjuntos de simulaciones descritos en la Tabla 6.1. En la Fig. 6.4 presentamos los resultados correspondientes al “Set A” ( $k_{on}^B = 100\mu M^{-1}s^{-1}$ ,  $k_{off}^B = 1000s^{-1}$ ), siendo ahora  $t_d = 80 ms$ .

En la Fig. 6.4 (a) graficamos  $M$  en función de  $[Ca^{2+}]$  (con una resolución espacial igual a  $\Delta r$ , es decir  $0,1 \mu m$ , y con una resolución temporal de  $10 \times \Delta t$ , es decir  $0,1 ms$ ), tanto mientras la fuente está encendida (puntos) como cuando se apaga (cruces). La fuente permanece encendida para  $3 ms \leq t \leq 83 ms$ . Las curvas (rojas) sobre los datos son los distintos ajustes de  $M([Ca^{2+}])$ , el objetivo de este análisis es comparar la eficiencia de cada uno de ellos. 1 (línea llena de trazo fino) es un ajuste lineal de los datos correspondientes a tiempos para los cuales la fuente está encendida (puntos), tal como se hizo en las Figs. 6.3 (a)–(c); 2 (línea cortada) es un ajuste lineal de todos los datos (puntos y cruces); 3 (línea cortada y punteada) corresponde al ajuste lineal solamente de datos correspondientes a tiempos para los cuales la fuente está encendida y aproximadamente se ha alcanzado el estado estacionario (desde  $t = 63 ms$  hasta  $t = 83 ms$ ); 4 (línea punteada) es un ajuste lineal de datos correspondientes a un instante posterior al apagado de la fuente; 5 (línea llena de trazo grueso) es un ajuste del estado estacionario mediante un polinomio de orden 5. Para el caso de ajustes lineales, se obtuvieron los parámetros  $\mu$  y  $[Ca^{2+}]_0$  que aparecen en la Ec. (6.2) y se integró numéricamente esta ecuación. Para el caso 5, en el cual la función de ajuste es un polinomio, se reemplazó  $M = -\mu([Ca^{2+}] - [Ca^{2+}]_0)$  en la Ec. (6.2) por un polinomio de orden 5 en  $[Ca^{2+}]$ . Los resultados de estas simulaciones se muestran en la Fig. 6.4 (b), donde comparamos perfiles temporales de  $[Ca^{2+}]$ , para  $r = 0 \mu m$ , para los diferentes ajustes de la figura (a) (se utiliza el mismo tipo de línea que en esa figura) y para el resultado de integrar las Ecs. (1.2)–(1.3), lo hemos denominado *RDE*. No se incluye el caso 4 por claridad: con ese ajuste  $[Ca^{2+}]$  alcanza valores de  $\approx 2,7 \mu M$  y eso dificulta la visualización de las diferencias entre los demás perfiles. Se hace evidente que las curvas provenientes de los distintos ajustes alcanzan el estado estacionario mucho más rápidamente que la curva *RDE* y que, luego de apagada la fuente,  $[Ca^{2+}]$  decae a su valor basal también más rápidamente para los ajustes que para *RDE*. El ajuste 5 (ajusta el comportamiento no lineal de  $M$  en función de  $[Ca^{2+}]$  en el estacionario) es el que mejor aproxima el valor estacionario de  $[Ca^{2+}]$  y el que da una caída más lenta posterior al apagado. No hay diferencias notables entre los resultados de los ajustes 1 y 2, que utilizan sólo los puntos correspondiente a fuente encendida o todos los

puntos, respectivamente. Éste es un resultado positivo dado que en el análisis de experimentos no es posible distinguir exactamente cuándo ha finalizado la liberación y, por lo tanto, el ajuste de  $M$  en función de  $[Ca^{2+}]$  será del tipo del ajuste 2. El ajuste 3 aproxima mejor el valor estacionario de  $[Ca^{2+}]$ , brinda mejores resultados que 1 y 2 pero no que 5, aunque comparándolo con este último, conserva la ventaja de ser un ajuste lineal, y con esto, la Ec. (6.2) tiene solución analítica.

Para cuantificar las diferencias entre el cálculo completo,  $RDE$ , y los distintos ajustes, calculamos el error relativo  $\Delta = |([Ca^{2+}]_{RDE} - [Ca^{2+}]_{approx})|/[Ca^{2+}]_{RDE}$ . En todos los casos (salvo en el del ajuste 4) el error relativo aumenta con la distancia a la fuente, mientras la fuente está encendida, y a la altura del “ancho a amplitud mitad” es menor al 10%. El error relativo calculado de este modo se hace muy grande en los tiempos para los cuales la fuente está apagada (entre 1,5 y 2). Sin embargo, es del orden de 0,3 si se compara la diferencia  $[Ca^{2+}]_{RDE} - [Ca^{2+}]_{approx}$  con el valor máximo que alcanza  $[Ca^{2+}](r = 0)$  a lo largo del tiempo. El error relativo es mayor en la zona de la fuente, mientras la fuente está encendida, para el ajuste 5 que para los ajustes 1, 2 y 3, pero es menor cuando la fuente está apagada. Por otro lado, los ajustes 1, 2 y 3 describen con igual eficiencia la solución en la zona de la fuente, aunque el ajuste 3 produce mayores errores en la zona fuera de la fuente antes de que se alcance el estado estacionario. Haciendo un balance de los errores en los distintos tiempos y regiones espaciales, concluimos que los ajustes 1 y 2 son los mejores. No presentan diferencias significativas entre sí y sus errores son mayores en la zona fuera de la fuente antes de que se alcance el estado estacionario y en los tiempos posteriores al apagado.

Este análisis nos permite concluir que, al menos para el rango de parámetros explorados hasta ahora, da prácticamente lo mismo ajustar  $M$  usando todos los datos de una dada simulación o sólo aquéllos que corresponden a tiempos durante los cuales la fuente está encendida. Todos los ajustes que analizaremos a continuación fueron hechos tomando todos los puntos de cada simulación por separado, como en el ajuste 2 (es decir, determinamos una función  $M([Ca^{2+}])$  por simulación, a menos que se indique lo contrario).

Definimos a continuación una nueva estimación del error para cuantificar las diferencias entre el cálculo completo,  $RDE$ , y el reducido lineal:

$$\epsilon(t) = \frac{\int |[Ca^{2+}]_{RDE} - [Ca^{2+}]_{linear}| dr}{\int [Ca^{2+}]_{RDE} dr}. \quad (6.5)$$

A diferencia del error relativo definido anteriormente, este error integra las

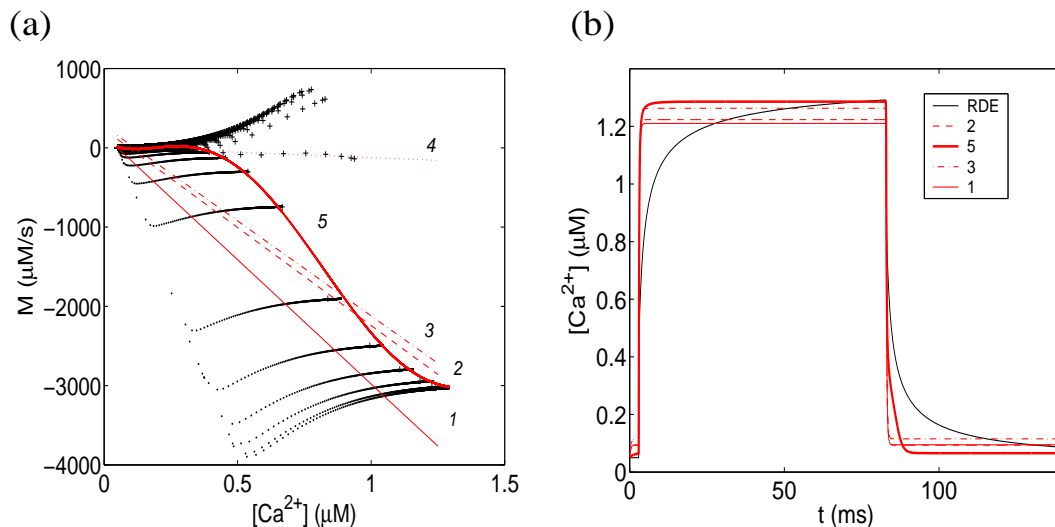


Figura 6.4: (a)  $M$  como función de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , los puntos corresponden a tiempos para los cuales la fuente está encendida, las cruces a tiempos para los cuales la fuente está apagada. Las curvas (rojas) sobre los datos son distintos ajustes de los mismos: 1 (línea llena de trazo fino) ajuste lineal de los datos correspondientes a fuente encendida (puntos); 2 (línea cortada) ajuste lineal de todos los datos (puntos y cruces); 3 (línea cortada y punteada) ajuste lineal de datos correspondientes a tiempos para los cuales la fuente está encendida y aproximadamente ha alcanzado el estado estacionario (desde  $t = 63$  ms hasta  $t = 83$  ms); 4 (línea punteada) ajuste lineal de datos correspondientes a un instante posterior al apagado de la fuente; 5 (línea llena de trazo grueso) ajuste del estado estacionario mediante un polinomio de orden 5. (b) Comparación de los perfiles temporales de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , en  $r = 0 \mu\text{m}$ , para *RDE* (líneas negras llenas) y para los distintos ajustes, para los que se utiliza el mismo tipo de línea que en (a). No se incluye el caso 4 por claridad: con ese ajuste  $[\text{Ca}^{2+}]$  alcanza valores de  $\approx 2,7 \mu\text{M}$  y eso dificulta la visualización de las diferencias entre los demás perfiles. La fuente se enciende en  $t = 3$  ms y se apaga en  $t = 83$  ms.

diferencias espaciales. Por lo tanto, provee una medida promediada de la distancia entre la solución completa y la aproximada.

A continuación investigamos la eficacia de la Ec. (6.2) en describir la dinámica de  $[Ca^{2+}]$  para distintos valores de los varios parámetros que intervienen en los modelos. Con este fin, realizamos simulaciones numéricas de los mismos modelos que en el Capítulo 5 (Tablas 5.1 y 5.2), dejando todos los parámetros fijos en los valores de la Tabla 5.1 o 5.2 salvo dos de ellos, que se varían para determinar la sensibilidad de la aproximación al valor numérico de esos parámetros. Las Figs. 6.5, 6.6 corresponden al modelo con  $Ca^{2+}$ , un indicador fluorescente y un buffer extra (Tabla 5.1) y la Fig. 6.7 al modelo modificado de [Baylor et al., 2002] (Tabla 5.2). En la mayoría de las figuras, el análisis de errores se presenta como líneas de contorno que indican el valor de  $\epsilon(t)$  definido en Ec. (6.5) para algún valor especificado de  $t$ , en un dado espacio de parámetros. A menos que se indique lo contrario, la integral espacial en  $\epsilon(t)$  se hace para todo el largo de la grilla, *i.e.*, desde  $r = 0$  hasta  $r = R_t = 1,5 \mu m$ . Las líneas de contorno definen regiones de validez para la reducción lineal, dependiendo de cuánto error pueda tolerarse según la aplicación particular.

En la Fig. 6.5 analizamos la dependencia del error con las constantes de reacción del indicador fluorescente,  $k_{on}^B$  y  $k_{off}^B$ . Estos dos parámetros fueron variados desde 100 hasta 1000, en las unidades correspondientes ( $\mu M^{-1} s^{-1}$  para  $k_{on}^B$  y  $s^{-1}$  para  $k_{off}^B$ ). Los otros parámetros de las simulaciones se mantuvieron como en la Tabla 5.1 (excepto por  $k_1 = 50 \mu M s^{-1}$ ), eligiendo  $I_{Ca} = 0,1 pA$  y  $t_d = 10 ms$ . Las Figs. 6.5 (a), (b) y (c) muestran las líneas de contorno del error para  $\epsilon(t_1)$ ,  $\epsilon(t_2)$  y  $\epsilon(t_3)$ , respectivamente, donde  $t_1 = 4 ms$ ,  $t_2 = 12 ms$  y  $t_3 = 13,5 ms$ . Dado que la fuente está encendida desde  $t = 3$  hasta  $t = 13 ms$ ,  $\epsilon(t_1)$  representa el error poco después de haber comenzado la liberación;  $\epsilon(t_2)$ , justo antes de que se apague la fuente y  $\epsilon(t_3)$ , cuando la fuente de iones de calcio se ha apagado. Para un dado valor de  $k_{on}^B$ , el error aumenta al aumentar  $k_{off}^B$ , mientras que sigue la tendencia opuesta si se deja fijo  $k_{off}^B$  y se aumenta  $k_{on}^B$ . En términos de  $K_d^B = k_{off}^B/k_{on}^B$ ,  $K_d^B$  es igual a  $1 \mu M$  sobre la diagonal que va desde  $k_{on}^B = 100 \mu M^{-1} s^{-1}$ ,  $k_{off}^B = 100 s^{-1}$  hasta  $k_{on}^B = 1000 \mu M^{-1} s^{-1}$ ,  $k_{off}^B = 1000 s^{-1}$ ; es mayor sobre la diagonal y menor debajo de ella (toma el valor  $10 \mu M$  -o  $0,1 \mu M$ - en el límite superior izquierdo -o en el límite inferior derecho- de este espacio de parámetros  $k_{off}^B - k_{on}^B$ ). Se puede decir que, principalmente, el error aumenta cuando aumenta  $K_d^B$ . En los paneles (a) y (b) el error no es mayor que 0,1 (lo cual puede interpretarse como un 10% de error), mientras que en el panel (c) llega hasta 0,4.

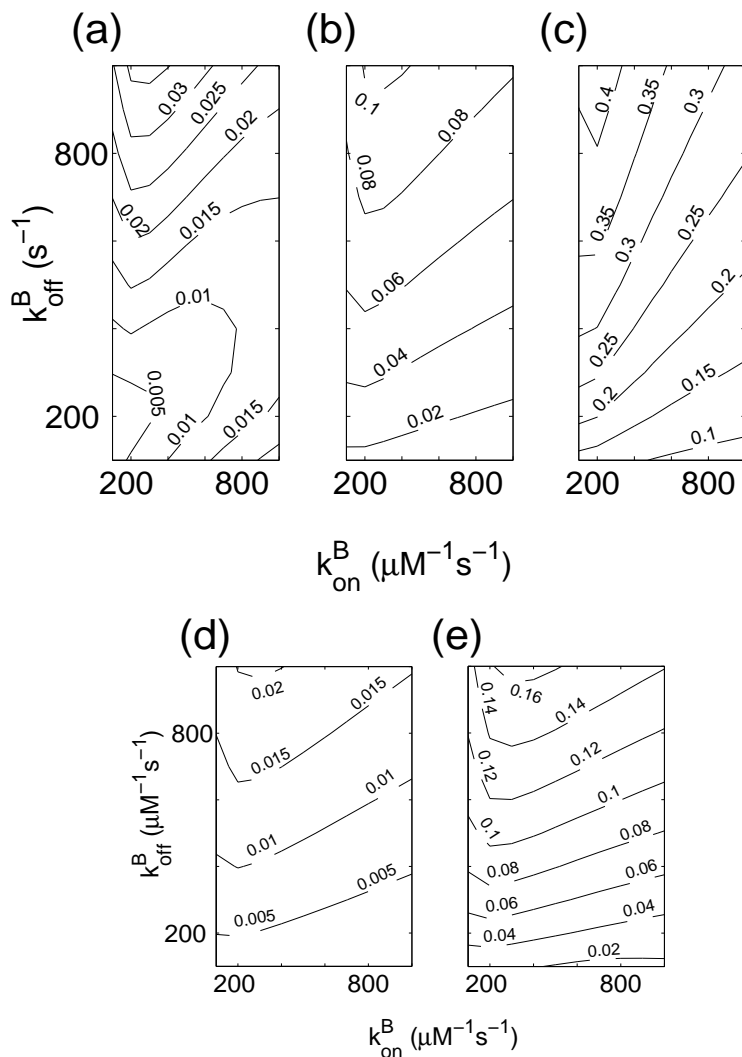


Figura 6.5: Dependencia del error con las constantes de reacción del indicador fluorescente,  $k_{on}^B$  y  $k_{off}^B$ . Modelo de la Tabla 5.1 con  $I_{Ca} = 0,1pA$  y  $t_d = 10ms$ , donde se varían  $k_{on}^B$  y  $k_{off}^B$ . (a), (b), (c): líneas de contorno del error para  $\epsilon(t_1 = 4ms)$ ,  $\epsilon(t_2 = 12ms)$  y  $\epsilon(t_3 = 13,5ms)$ , respectivamente. La fuente está encendida desde  $t = 3$  hasta  $t = 13ms$ . (d), (e): líneas de contorno del error para  $t_2 = 12ms$  pero integrando: sólo dentro de la fuente (d) y sólo fuera de la fuente (e).

Las Figs. 6.5 (d) y (e) muestran las líneas de contorno del error para  $t_2 = 12$  ms pero en este caso integrando: sólo dentro de la fuente (d) y sólo fuera de la fuente (e). La tendencia de los errores es la misma que en (a) y (b). Obtenemos errores que no son mayores al 2 % integrando sólo dentro de la fuente, mientras que llegan hasta el 16 % integrando sólo fuera de ella. El objetivo de estas figuras es distinguir dónde la aproximación funciona mejor: parece ser mucho más eficiente cuando la fuente está encendida, y especialmente eficiente dentro de la fuente. Esta última observación no tiene demasiada relevancia desde el punto de vista del análisis y procesamiento de señales experimentales, debido a que la extensión espacial de la fuente no llega a resolverse en los experimentos dada la resolución espacial de los mismos [Demuro and Parker, 2003, Ventura et al., 2005a]. La principal conclusión de esta figura es que la aproximación lineal brinda una descripción confiable de la evolución de  $[Ca^{2+}]$  en presencia de una fuente localizada, cuando esta fuente está encendida, generando errores que no superan el 10 o el 16 % (dependiendo de cómo se computa el error) para este modelo particular y una dada elección de parámetros.

En la Fig. 6.6 (a) analizamos la dependencia del error con los coeficientes de difusión del calcio libre y del indicador fluorescente,  $D_{Ca}$  y  $D_{dye}$ , respectivamente. Estos dos parámetros fueron variados desde 50 hasta  $320 \mu m^2/s$ . Los otros parámetros de la simulación se mantuvieron como en la Tabla 5.1. Se muestran las líneas de contorno del error para  $t = 12$  ms (la fuente está encendida desde  $t = 3$  hasta  $t = 13$  ms). El error no se ve afectado sensiblemente al variar  $D_{Ca}$ , mientras que decrece al aumentar  $D_{dye}$ . Éste es un resultado positivo dado que en un experimento real no se tiene control sobre el coeficiente de difusión del calcio libre pero, contrariamente, sí es posible elegir entre diferentes indicadores fluorescente. Aún en el peor de los casos, el error no supera el 5 %.

En la Fig. 6.6 (b) analizamos la dependencia del error con la magnitud,  $I_{Ca}$ , y la duración,  $t_d$ , de la fuente. La corriente está en el rango 0,1-1,9 pA y la duración, en el rango 1-10 ms. Nuevamente, los demás parámetros de la simulación se mantienen como en la Tabla 5.1. Las líneas de contorno del error se muestran, en este caso, para  $t = 4$  ms, un tiempo para el cual la fuente está encendida para todos los valores de  $t_d$  considerados. En este caso el error no se ve afectado sensiblemente por cambios en  $t_d$  pero aumenta al aumentar  $I_{Ca}$ . Como antes, aún en el peor de los casos, el error no es superior al 5 %. También hemos estudiado cómo cambian los errores en este espacio de parámetros  $t_d - I_{Ca}$  al cambiar los valores de los parámetros  $R_f$  o  $[B]_T$ , que son el radio de la fuente esférica de iones de calcio y la concentración to-

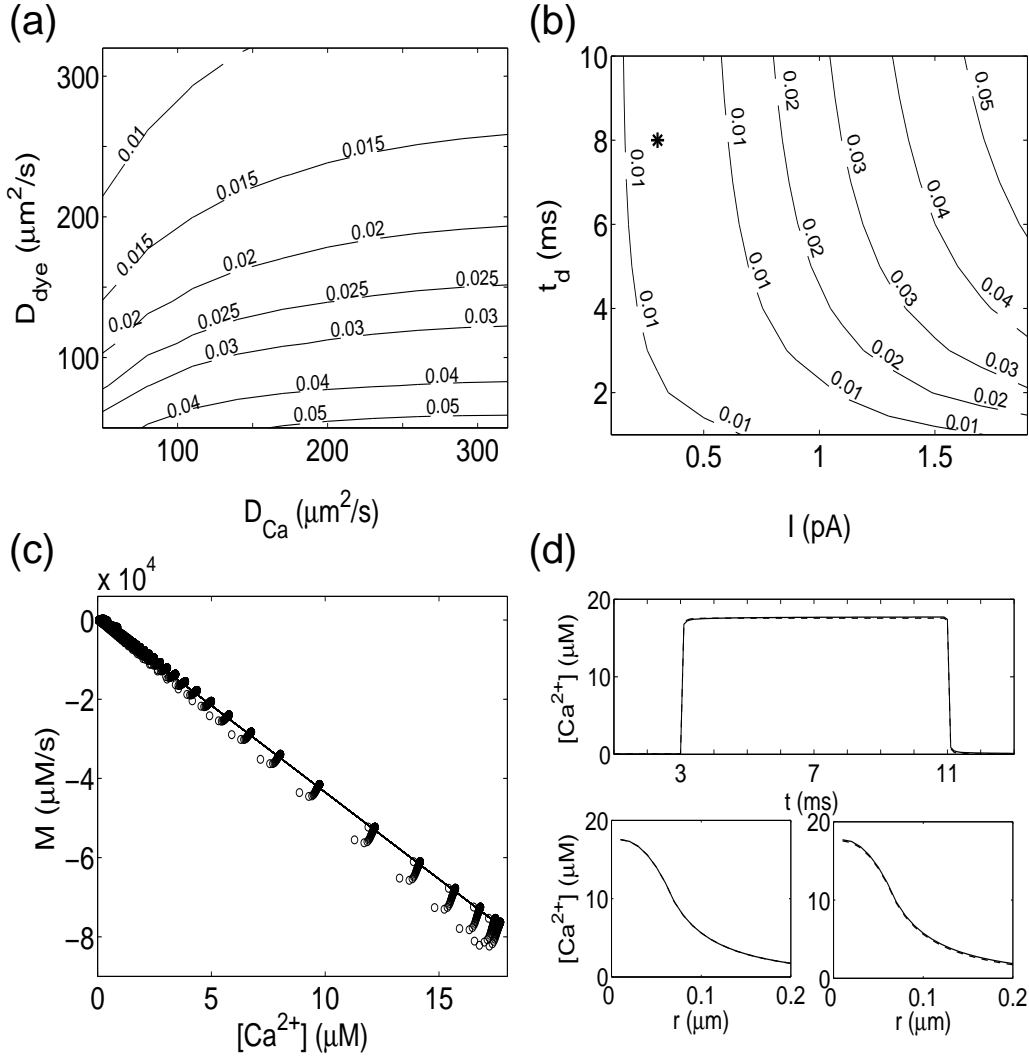


Figura 6.6: (a) Dependencia del error con los coeficientes de difusión del calcio libre y del indicador fluorescente,  $D_{Ca}$  y  $D_{dye}$ , respectivamente, para el modelo con  $\text{Ca}^{2+}$ , un indicador fluorescente y un buffer extra. Los parámetros de la simulación son los de la Tabla 5.1. Líneas de contorno del error para  $\epsilon(t = 12\text{ms})$  (la fuente está encendida desde  $t = 3$  hasta  $t = 13$  ms). (b) Dependencia del error con la magnitud,  $I_{Ca}$ , y la duración,  $t_d$ , de la fuente, para el modelo con  $\text{Ca}^{2+}$ , un indicador fluorescente y un buffer extra. Los parámetros de la simulación son los de la Tabla 5.1. Líneas de contorno del error para  $\epsilon(t = 4\text{ms})$  (la fuente está encendida desde  $t = 3$  hasta  $t = 3\text{ms} + t_d$ ).  $I$  corresponde a  $I_{Ca}$ . (c)  $M$  vs.  $[\text{Ca}^{2+}]$  (círculos) y su mejor ajuste lineal (línea llena) para la simulación indicada con un asterisco en (b). (d) Perfiles de calcio libre para RDE (línea llena) y la aproximación lineal (línea cortada) para la misma simulación. Panel superior, perfil temporal para  $r = 0$ ; panel inferior, perfiles espaciales para  $t_1 = 4\text{ms}$  (izquierda) y  $t_2 = 10\text{ms}$  (derecha).

tal del indicador fluorescente, respectivamente (no se muestran estos datos). Variando  $R_f$  desde su valor en la Fig. 6.6 (b),  $0,05 \mu m$ , hasta  $0,1 \mu m$ , obtenemos errores en el rango  $0,01-0,06$ . Variar  $[B]_T$  desde  $40$  hasta  $100 \mu M$  no produce cambios en el análisis de errores.

Las Figs. 6.6 (c) y (d) corresponden al asterisco en el espacio de parámetros  $t_d - I_{Ca}$  en (b): una simulación numérica con parámetros como los de la Tabla 5.1 pero con  $t_d = 8ms$  e  $I_{Ca} = 0,3pA$  (en este caso la fuente está encendida desde  $t = 3$  hasta  $t = 11 ms$ ). En (c) mostramos  $M$  como función de  $[Ca^{2+}]$  (círculos) y su mejor ajuste lineal (línea llena). La Fig. 6.6 (d) compara perfiles de concentración de calcio libre para  $RDE$  (línea llena) y la aproximación lineal (línea cortada). El panel superior es un perfil temporal para  $r = 0$ ; los paneles inferiores son perfiles espaciales para  $t_1 = 4 ms$  (izquierda) y  $t_2 = 10 ms$  (derecha). Las diferencias entre ambas soluciones son indistinguibles en la escala de la figura.

A continuación, repetimos algunos de los análisis presentados en la Fig. 6.6 pero para el modelo de Baylor modificado introducido en el Capítulo 5 (Tabla 5.2). En la Fig. 6.7 (a) analizamos la dependencia del error con la magnitud,  $I_{Ca}$ , y la duración,  $t_d$ , de la fuente. Como antes, la corriente está en el rango  $0,1-1,9 pA$  y la duración, en el rango  $1-10 ms$ . Los errores son ahora más sensibles a los valores de  $t_d$  que lo observado en la Fig. 6.6 (b). Mientras que en ese caso los errores estaban en el rango  $0,01-0,05$ , ahora están en el rango  $0,08-0,16$ . Las Figs. 6.7 (b) y (c) corresponden al asterisco en el espacio de parámetros  $t_d - I_{Ca}$  de (a):  $8 ms$  y  $0,3 pA$ . En (b) mostramos  $R$  en función de  $[Ca^{2+}]$  (círculos) y su mejor ajuste lineal (línea llena). La Fig. 6.7 (c) compara los perfiles de calcio libre para  $RDE$  (línea llena) y la aproximación lineal (línea cortada). El panel superior es un perfil temporal para  $r = 0$ , los perfiles inferiores son perfiles espaciales para  $t_1 = 4 ms$  (izquierda) y  $t_2 = 10 ms$  (derecha). Las diferencias entre ambas soluciones son ahora más apreciables que en la Fig. 6.6 (d).

## 6.6 Un modelo que separa propiedades intrínsecas de corriente

Las Figs. 6.5–6.7 fueron hechas comparando la solución numérica del modelo completo con la de la Ec. (6.2), donde los parámetros de esta última ( $\mu$  y  $[Ca^{2+}]_0$ ) fueron determinados a partir de ajustar  $M$  como una función lineal



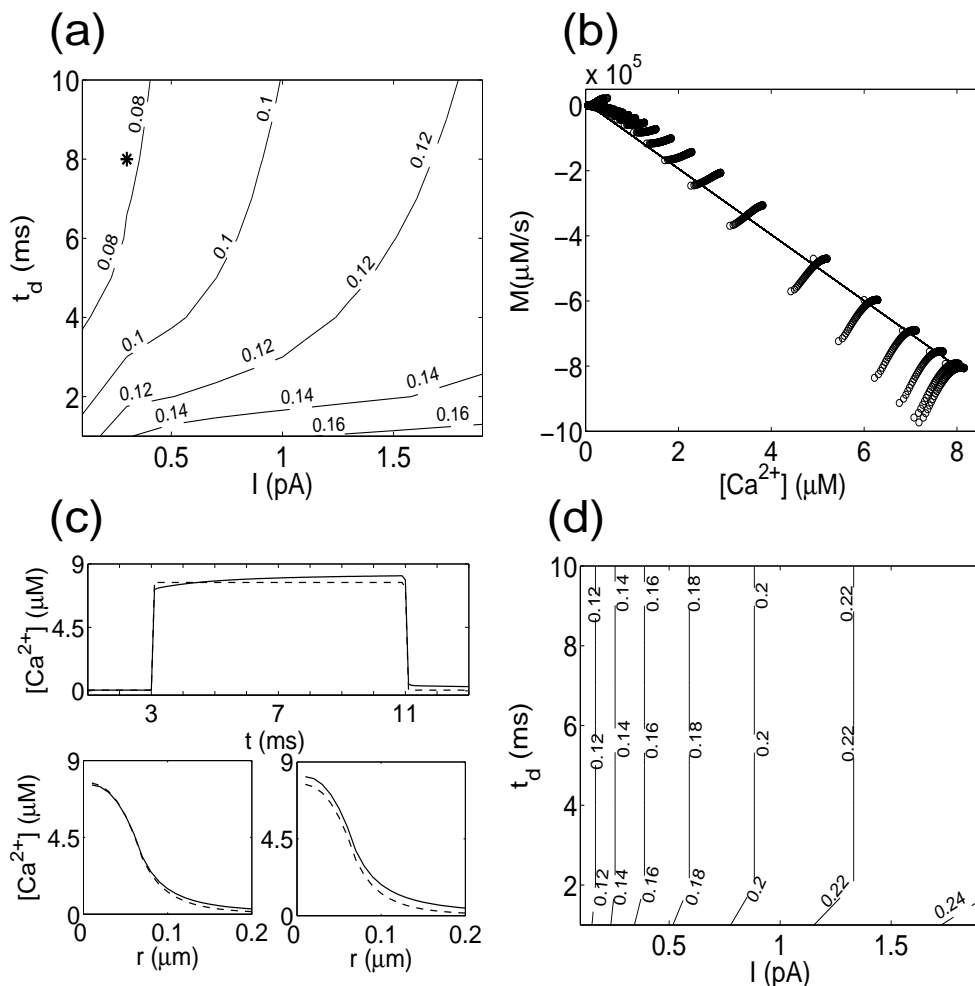


Figura 6.7: (a) Dependencia del error con la magnitud,  $I_{Ca}$ , y la duración,  $t_d$ , de la fuente, para el modelo con varios buffers. Los parámetros de la simulación son los de la Tabla 5.2. Líneas de contorno del error para  $\epsilon(t = 4\text{ms})$ .  $I$  corresponde a  $I_{Ca}$ . (b)  $M$  vs.  $[\text{Ca}^{2+}]$  (círculos) y su mejor ajuste lineal (línea llena) para la simulación indicada con un asterisco en (a). (c) Perfiles de calcio libre para *RDE* (línea llena) y para la aproximación lineal (línea cortada) para la misma simulación. Panel superior, perfil temporal para  $r = 0$ ; paneles inferiores, perfiles espaciales para  $t_1 = 4$  ms (izquierda) y  $t_2 = 10$  ms (derecha). (d) Igual que (a) pero utilizando un único par de valores,  $\mu$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_0$ , para todas las simulaciones.  $\mu$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_0$  se obtuvieron de ajustar linealmente la simulación correspondiente a  $I_{Ca} = 1,9\text{pA}$  y  $t_d = 10\text{ms}$ . Notar que el máximo error en este caso es de 0,24 mientras que en (a) es de 0,16.

de  $[Ca^{2+}]$  para cada simulación por separado. Es decir, cada uno de los puntos de las figuras donde se grafican las curvas de nivel de  $\epsilon(t)$  corresponde a un conjunto diferente de parámetros  $(\mu, [Ca^{2+}]_0)$ . Tiene sentido que  $\mu$  y  $[Ca^{2+}]_0$  varíen con parámetros intrínsecos de los buffers, como las constantes de reacción. Sin embargo, si  $\mu$  y  $[Ca^{2+}]_0$  (y, por lo tanto,  $M$ ) dependen de las propiedades de la inyección de  $[Ca^{2+}]$  ( $I_{Ca}$  y  $t_d$ ), la Ec. (6.2) pasa a tener un carácter principalmente descriptivo, similar, en cierto modo, al abordaje del Cap. 2, en donde cada experimento requeriría de una descripción con parámetros distintos a determinar a partir del propio experimento. Como apuntábamos en ese capítulo, una de las motivaciones de nuestro abordaje es la de poder separar los efectos sobre el transporte de  $Ca^{2+}$  debidos a procesos intrínsecos al citosol de la intensidad y temporalidad del ingreso de  $Ca^{2+}$ . Llamamos “procesos intrínsecos” a aquéllos cuyas características permanecen inalteradas si se mantienen las concentraciones totales de buffer y bombas y los fenómenos que afectan sus constantes de reacción. Poder separar los procesos intrínsecos de las características de la corriente de  $Ca^{2+}$  es, desde el punto de vista matemático, encontrar un modelo que es independiente de una solución particular y que reproduce un abanico de soluciones reales posibles asociadas a diversas corrientes de  $Ca^{2+}$ . Un modelo reducido con estas propiedades no sólo es descriptivo, sino también, predictivo, y eso incrementa su importancia. Si bien el modelo más “descriptivo” podría, en principio, ser usado para estimar la corriente de  $Ca^{2+}$  en imágenes de fluorescencia, la limitada cantidad de datos que pueden extraerse a partir de un único puff o señal localizada hace que sea preferible poder agrupar datos provenientes de muchos eventos distintos. Un modelo que separa las propiedades intrínsecas permitiría agrupar datos provenientes de distintos eventos para inferir la corriente de  $Ca^{2+}$  en cualquiera de ellos. Este tipo de razonamiento fue el que nos llevo a intentar el abordaje de los Capítulos 4 y 5. La ventaja del nuevo modelo reducido (dado por la Ec. (6.2)) respecto del explorado en estos otros capítulos es el hecho de que posee soluciones analíticas.

Investigamos entonces la habilidad del modelo definido por la Ec. (6.2) para reproducir soluciones correspondientes a distintas corrientes de  $Ca^{2+}$  (tanto en intensidad como en duración) usando un único par de valores,  $\mu$  y  $[Ca^{2+}]_0$ . Con este fin reobtuvimos las líneas de contorno del error de las Figs. 6.6 (b) y 6.7 (a) (espacio de parámetros  $t_d - I_{Ca}$ ) usando para todas las simulaciones del plano los valores de  $\mu$  y  $[Ca^{2+}]_0$  obtenidos al ajustar linealmente una única simulación. Se tomó como simulación de ajuste alguno de los cuatro vértices del plano en estudio, es decir  $v_1 = (I = 0,1 \text{ pA}; t_d = 1 \text{ ms})$ ,  $v_2 = (0,1 \text{ pA}; 10 \text{ ms})$ ,  $v_3 = (1,9 \text{ pA}; 1 \text{ ms})$ , y  $v_4 = (1,9 \text{ pA}; 10 \text{ ms})$ . En el peor de los casos, los errores pasaron de 0,16 a 0,24. Éste caso corresponde al

modelo de Baylor modificado, usando al punto  $v_1$  como simulación de ajuste. Las líneas de contorno se presentan en la Fig. 6.7 (d). Para el modelo con  $\text{Ca}^{2+}$ , un indicador fluorescente y un buffer extra, en el peor de los casos (que corresponde a usar el punto  $v_4$  como simulación de ajuste) el error pasa de 0,05 a 0,1. A partir de estos resultados concluimos que, para el rango de intensidades y duraciones estudiados, el modelo de la Ec. (6.2)) es capaz de separar propiedades intrínsecas de propiedades de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  manteniendo valores tolerables para los errores.

## 6.7 Habilidad de la ecuación de evolución lineal para describir la dinámica observada experimentalmente en puffs y sparklets

Probamos ahora la validez de la Ec. (6.2) para describir la dinámica del  $[\text{Ca}^{2+}]$  determinada a partir de imágenes de fluorescencia verdaderas. Más específicamente, nos concentramos en las situaciones experimentales correspondientes a la Fig. 6.1. Ambos tipos de experimentos fueron realizados en ovocitos de *Xenopus laevis*, en presencia de  $40 \mu\text{M}$  del indicador fluorescente fluo-4 dextran de baja afinidad. En (b) también se utilizaron  $300 \mu\text{M}$  de EGTA. Los experimentos de la Fig. 6.1 (a) corresponden a sparklets debidos al ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo N expresados en la membrana del ovocito mientras que los de la Fig. 6.1 (b) corresponden a puffs evocados por  $\text{IP}_3$ . Las figuras contienen datos provenientes de 8 eventos localizados en (a) y 6 en (b). De acuerdo a las estimaciones del algoritmo del Capítulo 5, los eventos de Fig. 6.1 (a) y (b) corresponden a corrientes,  $I_{Ca}$ , que varían entre 0,11 y 0,14 pA y entre 0.4 y 1.2 pA, respectivamente. Ajustando  $M([\text{Ca}^{2+}])$  mediante las rectas que se muestran en las figuras, estamos usando un único par de valores  $(\mu, [\text{Ca}^{2+}]_0)$  para cada conjunto de eventos. Por lo tanto, estamos suponiendo que, al menos dentro del rango de corrientes que abarcan ambos conjuntos, una misma ecuación de evolución describe la dinámica de  $[\text{Ca}^{2+}]$  para cada uno de estos eventos. Usando esta aproximación de  $M([\text{Ca}^{2+}])$  y determinando el valor de  $Q_{Ca}$  como se detalla en el Capítulo 5, hacemos simulaciones numéricas de la Ec. (6.2) y las comparamos con las observaciones experimentales.

En la Fig. 6.8 mostramos los resultados de este análisis para los datos experimentales de la Fig. 6.1 (a). Utilizando el ajuste indicado en esa figura

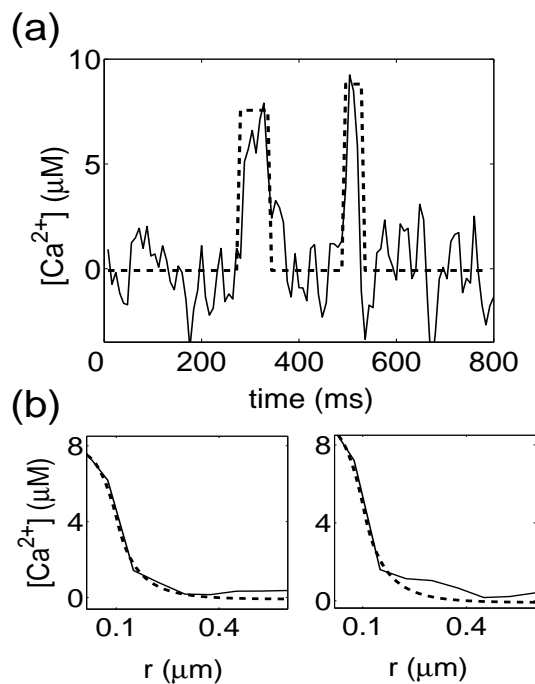


Figura 6.8: Resultados de la integración de la Ec. (6.2) para los datos experimentales de la Fig. 6.1 (a). Perfiles simulados con línea cortada, perfiles experimentales con línea llena. (a) Perfiles temporales para  $r = 0$ . (b) Perfiles espaciales para los dos picos temporales en (a).

y una versión simplificada, constante a trozos (en el espacio y el tiempo), de  $Q_{Ca}$ , elegida de modo de generar con ella corrientes medias similares a las dadas por el algoritmo de reconstrucción (ver Capítulo 5), se obtuvieron los perfiles temporales y espaciales (línea cortada) de la Fig. 6.8, que se comparan con los experimentales (línea llena). Los perfiles temporales en (a) corresponden a  $r = 0$  y los espaciales en (b) corresponden a los dos picos temporales que se observan en (a).

Los resultados en esta sección indican que el nuevo enfoque descrito en este capítulo funciona eficientemente al ser aplicado a datos reales, siempre que estos datos correspondan a fuentes de calcio suficientemente localizadas. Además de constituir una validación experimental del método, estos resultados evidencian la eficiencia del mismo para el procesamiento y caracterización de señales de calcio experimentales.

## 6.8 Usando la nueva descripción dinámica para re-analizar los puffs sintéticos introducidos en el Cap. 2

El uso de la Ec. (6.2) en la sección anterior tiene un carácter descriptivo: nos muestra que la dinámica de  $[Ca^{2+}]$  que se puede derivar de las imágenes de fluorescencia experimentales puede ser descrita, correctamente, por la Ec. (6.2). Ahora bien, una de las propiedades fundamentales de la Ec. (6.2) es su sencillez y el hecho de que posee soluciones analíticas. Esto es una ventaja para poder extraer información cuantitativa a partir de imágenes de fluorescencia, en el espíritu del algoritmo del Capítulo 5, pero usando una ecuación más sencilla. En esta sección presentamos un análisis preliminar de los puffs sintéticos introducidos en el Capítulo 2 usando la Ec. (6.2) para extraer información cuantitativa. A diferencia de lo que hacíamos en el Capítulo 2, en este nuevo análisis no suponemos ni que el transporte de  $Ca^{2+}$  en el citosol es puramente difusivo ni que el  $Ca^{2+}$  libre y el colorante se encuentran localmente en equilibrio en cada instante.

Como discutimos en detalle en el Capítulo 5, la fluorescencia no se relaciona directamente con la concentración de  $Ca^{2+}$  libre, sino con la de  $Ca^{2+}$  ligado al indicador. Desde el punto de vista de la dinámica de  $[Ca^{2+}]$ , el indicador actúa como un buffer más que “remueve”  $Ca^{2+}$  libre y cuyo efecto está incluido en el término  $M$  usado en este capítulo. La relación lineal en-

tre  $M$  y  $[Ca^{2+}]$  nos lleva a suponer que cada término correspondiente a la reacción con un buffer particular debe poder aproximarse también por una función lineal de  $[Ca^{2+}]$ . Por lo tanto, esperamos que el término de reacción con el colorante,  $R_F$ , pueda aproximarse como:

$$R_F = -k_{on,F}[Ca^{2+}]( [B]_{T,F} - [CaB_F] ) + k_{off,F}[CaB_F] \cong -\alpha([Ca^{2+}] - [Ca^{2+}]^*), \quad (6.6)$$

donde  $\alpha$  y  $[Ca^{2+}]^*$  son dos constantes. En efecto, hemos verificado esta relación tanto para eventos simulados numéricamente, como para eventos reales. En la Fig. 6.9 mostramos gráficos de  $R_F$  en función de la concentración de calcio para tres de los puffs sintéticos descritos en el Capítulo 2, todos ellos de 50 ms de duración, y con las corrientes totales que se indican en la figura. En la Fig. 6.9,  $[Ca^{2+}]$  es determinada como en el *Paso 2* del algoritmo introducido en el Capítulo 5, usando para el colorante, Oregon Green, los parámetros que caracterizan a fluo-3,  $k_{on,F} = 80 \mu M^{-1} s^{-1}$ ,  $k_{off,F} = 90 s^{-1}$  (ver [Izu et al., 2001]) y  $D_{B,F} = 200 \mu m^2 s^{-1}$ .

A partir de la Ec. (6.6) podemos escribir la concentración de  $Ca^{2+}$  ligada al indicador,  $[CaB_F]$ , como función de  $[Ca^{2+}]$ . Obtenemos:

$$[CaB] = \frac{(-\alpha + k_{on}[B]_T) [Ca^{2+}] + \alpha [Ca^{2+}]^*}{k_{off} + k_{on}[Ca^{2+}]}, \quad (6.7)$$

donde suprimimos el subíndice  $F$  para “alivianar” la notación: de ahora en más en este capítulo,  $[CaB]$  será la concentración de calcio ligado al indicador fluorescente. Por lo tanto, conociendo las constantes de reacción que caracterizan al indicador y determinando  $\alpha$  y  $[Ca^{2+}]^*$  a partir de los experimentos, podemos escribir  $[CaB]$  como una función lineal de  $[Ca^{2+}]$ .

Combinando las Ecs. (6.3)-(6.4) y la Ec. (6.7), tenemos una expresión analítica para  $[CaB]$  como función del tiempo y la posición. Esta concentración es la que debe ser comparada con la fluorescencia medida. Así, podemos computar el ancho completo a amplitud mitad (FWHM) para compararlo con el medido en los experimentos de puffs sintéticos descritos en el Cap. 2. A partir de (6.7) se deduce que  $[CaB]$  alcanza su máximo,  $[CaB]_{max}$ , para el mismo valor de  $r$  para el cual lo hace  $[Ca^{2+}]$ , es decir,  $r = 0$ . Dadas las corrientes que se usan en los experimentos, podemos despreciar  $[Ca^{2+}]_{rest}$  y  $[Ca^{2+}]^*$  (tanto en  $r = 0$  como en el sitio de la amplitud mitad). Obtenemos entonces:

$$[CaB]_{max} = \frac{-\alpha + k_{on}[B]_T}{k_{on}}, \quad (6.8)$$

mientras que el valor de  $[CaB]$  en la posición de la amplitud mitad,  $r^*$ , puede obtenerse insertando las Ecs. (6.3)-(6.4) en la Ec. (6.7) y pidiendo

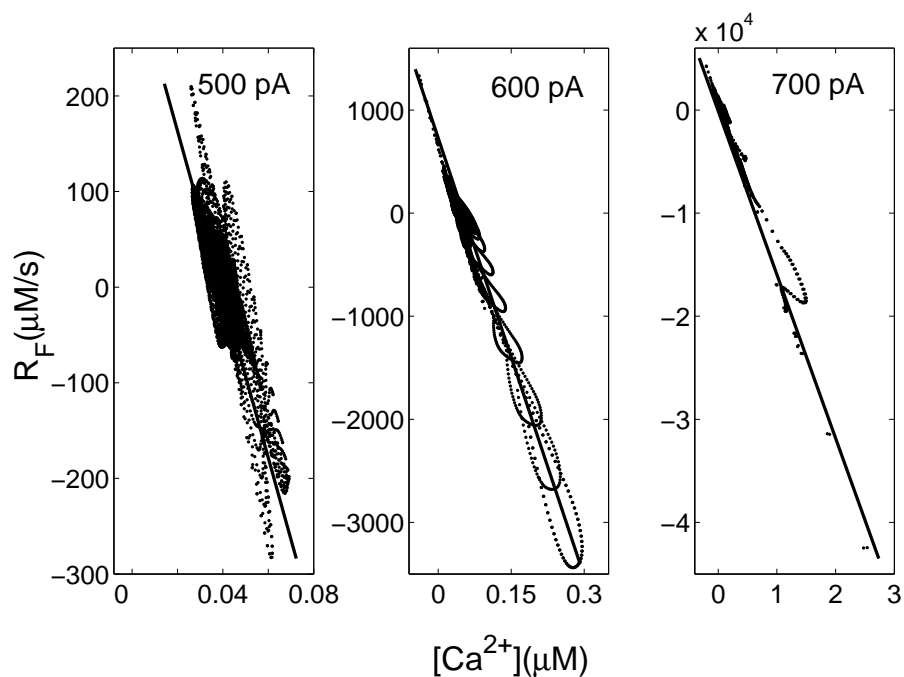


Figura 6.9: Gráficos del término de reacción con el indicador fluorescente,  $R_F$ , en función de la concentración de calcio, para tres eventos sintéticos en los cuales la duración del pulso fue de 50 ms y la corriente total inyectada es de 500, 600 y 700 pA, respectivamente. Con puntos se indican los datos experimentales y las líneas llenas son ajustes lineales de los datos.

$[CaB](r^*) = [CaB]_{max}/2$ . De esta forma resulta:

$$r^* = \frac{\sigma_{Ca}}{4\pi D_{Ca} K_d} \exp(-r^*/\lambda) \mathcal{F}(r^*, t), \quad (6.9)$$

que es una ecuación implícita para  $r^*$ , donde  $\mathcal{F}$  está definida en la Ec. (6.4) y  $\lambda = \sqrt{D_{Ca}/\mu}$ . Cabe notar que en  $r^*$  se ha perdido la dependencia con  $\alpha$ . Por supuesto, todas estas expresiones son válidas mientras la fuente está encendida. Así, si la fuente está encendida por un largo tiempo, como sabemos que  $\mathcal{F}$  tiende a 1 cuando  $t \rightarrow \infty$ ,  $r^*$  irá hacia un valor asintótico al aumentar el tiempo de inyección (valor dado por  $r^* = (\sigma_{Ca}/4\pi D_{Ca} K_d) \exp(-r^*/\lambda)$ ), una característica que se observa en los experimentos.

En resumen, los pasos seguidos para obtener la corriente a partir de imágenes fluorescentes con este nuevo abordaje son:

1. utilizar el *Paso 1* del algoritmo del Capítulo 5 para obtener  $[CaB]$  a partir de los datos de fluorescencia;
2. calcular FWHM para distintos tiempos en la señal de  $[CaB]$ ;
3. obtener los valores de  $\sigma_{Ca}$ ,  $D_{Ca}$  y  $\mu$  en la Ec. (6.9) que mejor ajustan la curva experimental de FWHM en función del tiempo.

En la Fig. 6.10 se muestran los datos experimentales que fueron ajustados con la Ec. (6.9). Se grafica FWHM en función de la duración del pulso para diferentes valores de la corriente inyectada (la corriente total que fluye a través de la pipeta): 400, 900 y 1900 pA. Usando la expresión dada por la Ec. (6.9) para  $r^* = \text{FWHM}/2$ , es posible buscar los valores de la corriente de  $Ca^{2+}$ ,  $I_{Ca}$  (o bien de  $\sigma_{Ca}$ ), del coeficiente de difusión del calcio,  $D_{Ca}$ , y de  $\mu$  que mejor ajustan los datos experimentales. Como discutimos en la Sec. 6.6, una ecuación de la forma (6.2) con un único valor de  $D_{Ca}$ , y de  $\mu$  y  $[Ca^{2+}]_0$  (en este análisis estamos despreciando  $[Ca^{2+}]_0$ ) puede describir la dinámica de  $[Ca^{2+}]$  con un error menor al 24% en presencia de corrientes de  $Ca^{2+}$  dentro del rango 0,1-1,9 pA. Los experimentos analizados en la Fig. 6.10 abarcan un rango mayor de corrientes. En particular, los primeros intentos de ajuste hechos suponiendo  $D_{Ca} = 220 \mu m^2 s^{-1}$  y ajustando  $\mu$  e  $I_{Ca}$ , nos dieron curvas donde FWHM alcanzaba una situación estacionaria mucho más rápidamente que la observada experimentalmente. Por este motivo, decidimos ajustar  $I_{Ca}$ ,  $D_{Ca}$ , y  $\mu$  para cada curva por separado, como primera aproximación al problema. Siguiendo este procedimiento y usando los valores numéricos que caracterizan al colorante, Oregon Green, como en



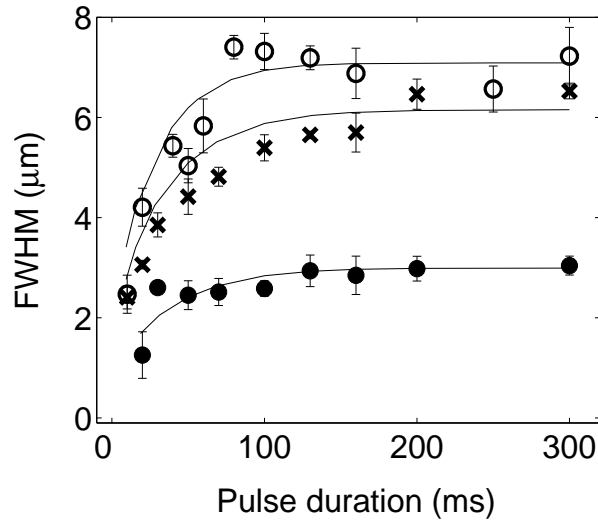


Figura 6.10: Datos experimentales y curvas obtenidas con el modelo (líneas llenas), correspondientes a FWHM en función de la duración del pulso, para diferentes valores de la corriente inyectada. El tiempo está medido en  $ms$  y FWHM en  $\mu m$ . La curva inferior corresponde a 400 pA de corriente total inyectada, la curva siguiente a 900 pA y la superior a 1900 pA.

la Fig. 6.9, obtuvimos las curvas que se grafican con línea llena sobre los datos experimentales en la Fig. 6.10. Los valores de  $I_{Ca}$ ,  $D_{Ca}$  y  $\mu$  correspondientes a estos ajustes (que son, necesariamente, valores efectivos) se indican en la Tabla 6.2. Los valores entre paréntesis en la columna de  $I_{Ca}$  representan el porcentaje de la corriente total inyectada que se debe a calcio. Vemos entonces que, a pesar de que estos valores pueden corresponder a corrientes efectivas, los porcentajes son mucho mejores que los obtenidos en el Cap. 2 y están prácticamente dentro del rango esperado por los experimentadores (5-10%). Estos resultados no se modifican significativamente si en lugar de usar la solución (6.3) que diverge en  $r = 0$ , estimamos el valor máximo que alcanza la concentración de calcio en la boca de la pipeta,  $[Ca^{2+}](r = 0)$ , utilizando la solución estacionaria en presencia de una fuente esférica, Ec. (2.5). Con esta consideración, la expresión dada por la Ec. (6.9) pasa a ser:

$$r^* = \left( \frac{\sigma}{4\pi D_{Ca} K_d} + \frac{4R_f}{3} \right) \exp(-r^*/\lambda) \mathcal{F}(r^*, t). \quad (6.10)$$

Considerando que el tamaño de la boca de la pipeta puede estar en el rango  $0,1 - 1,0 \mu m$ , obtenemos resultados similares a los de la Tabla 6.2.

Tabla 6.2: Resultados del procedimiento de ajuste que se muestra en la Fig. 6.10.

Corriente inyectada [pA]	I (pA)	$D_{Ca} [\mu m^2 s^{-1}]$	$\mu [s^{-1}]$
400	8,8 (2,2 %)	9,0	30,2
900	25,03 (2,8 %)	64,0	25,0
1900	88,06 (4,6 %)	81,0	36,0

## 6.9 Discusión y conclusiones

En este capítulo hemos analizado qué es lo que permite reemplazar el ansatz del Capítulo 4 (Ec.(4.4)) por una única función  $k([Ca^{2+}])$ , viendo que la causa está en el ingreso muy localizado de calcio y en la consecuente rapidez con la que el sistema tiende a una solución estacionaria. Más aún, hemos visto que el término  $k([Ca^{2+}])$  puede ser aproximado por una función lineal. De este modo, la descripción de la dinámica del  $Ca^{2+}$  en presencia de una fuente cuasi-puntual y de diversos buffers y mecanismos de remoción, se reduce a una única ecuación dinámica para  $[Ca^{2+}]$  que es lineal en  $[Ca^{2+}]$  y que, por lo tanto, posee solución analítica (mientras la fuente permanece “encendida”). Se investigaron los límites de aplicabilidad de este nuevo enfoque utilizando simulaciones numéricas y datos experimentales, encontrando un buen funcionamiento en ambos casos.

Al probar esta reducción lineal con datos numéricos, pudimos cuantificar el error cometido al reemplazar el conjunto completo de ecuaciones de evolución (Ecs. (1.2)-(1.3)) por la ecuación reducida (Ec. (6.2)), para diferentes modelos de la dinámica del calcio que incluyen distintos mecanismos de captura. Se estudió este error en función de los parámetros involucrados en los modelos numéricos, encontrando, aún en los casos más desfavorables, muy buen acuerdo entre las descripciones completa y reducida. Encontramos que la Ec. (6.2) puede describir la dinámica espacio-temporal de  $Ca^{2+}$  no sólo mientras la fuente localizada está encendida y “cerca” de la solución estacionaria, sino también una vez que se apaga la fuente. Vimos también que en

este nuevo enfoque es posible separar parámetros intrínsecos de los relacionados a las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual lo convierte en un modelo no solamente descriptivo, sino también predictivo.

La aplicación de la reducción lineal a señales de calcio experimentales provenientes de fuentes de calcio suficientemente localizadas, ha puesto en evidencia que  $M$  queda bien descrito por una función lineal de  $[\text{Ca}^{2+}]$  (Fig. 6.1). Más aún, hemos puesto a prueba la descripción lineal mediante la integración de la ecuación dinámica (Ec. (1.2)), utilizando el ajuste lineal para  $M = \sum_i R_i + q_{rem}$ . El resultado positivo de esta integración constituye una validación experimental de la descripción lineal. Por otro lado, también hemos utilizado la descripción reducida presentada en este capítulo para re-analizar los puffs sintéticos del Capítulo 2. Si bien este estudio es aún preliminar, se obtuvieron valores de corriente dentro del rango esperado.

Finalmente, la descripción reducida presentada en este capítulo, que pertenece a la clase de reducciones que se obtienen a partir de datos, en contraposición a las que se obtienen a partir del modelo en diferentes regímenes, resulta entonces de interés porque no requiere conocimiento cuantitativo detallado de todos los procesos involucrados, tiene muy pocos parámetros y éstos se obtienen ajustando datos. La característica que la distingue es la hipótesis de que la suma de todos los mecanismos de captura, lo que hemos denominado  $M$ , puede ser aproximada por una función de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , y que esta función resulta, en muchos casos, aproximadamente lineal. Esto le agrega la enorme ventaja de ser una aproximación con solución analítica, lo cual permite el desarrollo de un algoritmo alternativo y mucho más sencillo de implementar que el presentado en el Capítulo 5 para inferir la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de imágenes fluorescentes.

# Capítulo 7

## Conclusiones

Esta tesis ha sido dedicada al análisis y modelado matemático del transporte de calcio en el citosol celular. El calcio es un ion fundamental en los mecanismos de señalización que usan las células. Debido a que la permanencia prolongada de altas concentraciones de calcio libre llevan a la muerte celular, las células usan una gran variedad de mecanismos para disminuir esa concentración y limitar su elevación a pequeñas regiones dentro del citosol. Estos mecanismos complican el análisis y el modelado de las señales de calcio intracelular. Por otro lado, típicamente, estas señales se inician con el ingreso del mismo a través de canales ubicados en la membrana plasmática o en la membrana del retículo sarco o endoplasmático, y pueden eventualmente, propagarse por toda la célula. Es decir, las señales de calcio involucran escalas espaciales que van desde el tamaño del poro de los canales ( $\sim 1nm$ ) hasta el de la célula toda ( $\sim 1mm$  en el caso de ovocitos). Este rango tan diverso de escalas no puede ser “observado” mediante un único tipo de experimentos. Por lo tanto, el modelado matemático es indispensable para poder combinar el “rompecabezas” de observaciones experimentales parciales en un modelo unificador que permita comprender las señales de calcio en su totalidad. Sin embargo, la elaboración de un modelo unificado es un proceso difícil, al que se puede llegar subdividiendo el modelado matemático, también, en “jerarquías”, cada una de ellas caracterizada por una escala espacial típica. En esta tesis nos concentramos en los aspectos más macroscópicos del transporte de  $Ca^{2+}$  en presencia de buffers, sin entrar en el detalle de los mecanismos que modulan su ingreso a través de los canales antes mencionados. El objetivo último es usar el conocimiento adquirido a partir de este estudio en la construcción de un modelo más abarcador que incorpore otros análisis y

observaciones.

El objetivo principal de la tesis fue la obtención de un conjunto de ecuaciones simplificadas que permitieran describir el transporte de calcio dentro del citosol y que pudieran ser usadas para extraer información cuantitativa a partir de imágenes fluorescentes. El análisis de estas últimas se centró en las tomadas por uno de los grupos del área de biología con el que colaboramos (el grupo de I. Parker en la Universidad de California en Irvine). Estas imágenes fueron obtenidas en ovocitos, en diversas condiciones y frente a distintos tipos de estímulos, usando microscopía confocal e indicadores que emiten luz cuando ligan calcio. Más específicamente, en la tesis se elaboraron distintos modelos matemáticos simplificados y se desarrolló un nuevo método de análisis de las imágenes de fluorescencia para inferir la corriente de calcio que ingresa al citosol a partir de la imagen. Ambos aspectos están íntimamente ligados, ya que sólo contando con un método confiable de análisis de los datos experimentales podremos hacer una comparación cuantitativa con los modelos.

La idea conductora de la tesis fue la “búsqueda de simplicidad”, basada en la pregunta de hasta qué punto es necesario mantener toda la complejidad de los procesos involucrados en los modelos matemáticos para lograr reproducir las observaciones y para extraer información cuantitativa de los datos experimentales. Como primer paso hacia la obtención de una respuesta a esta pregunta, en el Cap. 2 analizamos si era posible describir el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de buffers como un proceso meramente difusivo. Este tipo de análisis fue aplicado a “puffs sintéticos” (imágenes obtenidas inyectando en el citosol, mediante una pipeta, una corriente ionofórica que contiene calcio). Pudimos determinar que, efectivamente, puede aproximarse la forma en que se “ensancha” la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  a lo largo del tiempo por la ley que describe dicho ensanchamiento cuando el transporte es puramente difusivo. Sin embargo, ajustando los datos experimentales obtuvimos coeficientes de difusión que crecían con la intensidad de la corriente inyectada. Esta era una limitación del modelo ya que no permitía separar las propiedades del citosol debida a buffers y otros mecanismos de remoción de  $\text{Ca}^{2+}$ , de las de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo tanto, era prácticamente imposible determinar la intensidad de la corriente que daba lugar a la señal en forma fehaciente a partir del experimento (si suponíamos que la corriente y el coeficiente de difusión así determinados eran valores efectivos que diferían de los valores verdaderos por el mismo factor de escala, usando el valor aceptado del coeficiente de difusión de  $\text{Ca}^{2+}$  obteníamos corrientes que eran un orden de magnitud menores que las esperadas). Este estudio tenía, a su vez, otra lim-

itación: suponía que el calcio y el indicador fluorescente estaban en equilibrio en todo instante. Un estudio más detallado de distintas simulaciones numéricas realizadas *a posteriori* y descritas al final del Cap. 3 mostró que esta hipótesis es difícil de satisfacer en presencia de los altos gradientes de concentración que son típicos de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando éste ingresa a través de unos pocos canales.

El efecto de los altos gradientes de  $[\text{Ca}^{2+}]$  sobre la validez de la hipótesis de equilibrio fue estudiado en más detalle en el Cap. 3, donde analizamos la pertinencia de la aproximación de buffers rápidos (*RBA*) para describir la propagación de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ . La *RBA* permite obtener una ecuación dinámica cerrada para  $[\text{Ca}^{2+}]$ , analíticamente, a partir de las ecuaciones de los modelos de reacción-difusión que describen la dinámica del calcio en presencia de buffers. Es válida en la medida en que las reacciones entre  $\text{Ca}^{2+}$  y buffers sean suficientemente rápidas como para garantizar que, localmente, las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y buffers estén todo el tiempo en equilibrio entre sí. Como vimos en el Cap. 3, esta separación de escalas temporales es difícil de mantener en presencia de altos gradientes de  $[\text{Ca}^{2+}]$  ya que, en ese caso, la difusión ocurre tanto o más rápidamente que las reacciones. Por esta razón, la *RBA* no es buena para describir ondas “saltatorias” en donde la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde sitios localizados es visible en la señal, pero sí puede serlo para ondas “continuas”, donde la liberación está más extendida en el espacio.

A pesar de sus limitaciones, el análisis de “puffs sintéticos” presentado en el Cap. 2 tenía la virtud de que involucraba un modelo dinámico sencillo cuyos parámetros eran determinados a partir de los experimentos. Eso nos llevó a preguntarnos si no era posible introducir otro modelo matemático sencillo para describir la dinámica del calcio intracelular que pudiera obtenerse a partir de las observaciones y que permitiera separar los términos debidos a la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  de aquéllos “intrínsecos” al citosol (es decir, términos cuyos parámetros constantes dependen de propiedades y cantidad total de buffers, bombas, etc). Inspiradas por esta pregunta, presentamos en el Cap. 4 un modo de obtener este tipo de modelo. Teniendo en cuenta que los procesos que caracterizan el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de buffers son fenómenos disipativos en donde la información “decae” en el espacio y en el tiempo con escalas relativamente cortas desde un punto de vista macroscópico, investigamos si era posible reemplazar los términos de reacción con buffers (que dependen de las concentraciones espacio-temporales de estos últimos) por un “ansatz” en términos de funciones a determinar de  $[\text{Ca}^{2+}]$  y sus primeras derivadas espaciales y temporales. Decidimos quedarnos con los términos de orden más bajo en estas derivadas compatibles con la simetría espacial esféri-

ca característica de señales en las que el calcio ingresa a través de una fuente localizada en un único punto espacial. El análisis mostró que era posible determinar las funciones de  $[Ca^{2+}]$  “incógnita” que definen el ansatz (Ec.(4.4)) a partir de datos y que, usando estas funciones, la única ecuación dinámica resultante era en efecto capaz de reproducir la distribución espacio-temporal del calcio tanto en presencia de buffers rápidos como lentos.

Utilizando el “ansatz” del Cap. 4 elaboramos entonces un algoritmo que nos permitiera inferir la corriente de  $Ca^{2+}$  a partir de imágenes fluorescentes. Describimos este algoritmo en el Cap. 5. Mientras que las aplicaciones del Cap. 4 se habían limitado al análisis de simulaciones, en el Cap. 5 no sólo aplicamos el algoritmo extensamente a “imágenes numéricas” a las que modificamos de forma controlada para imitar el efecto del ruido, del blurring del microscopio y de los muchos errores que pueden introducirse durante la toma de datos, con el objeto de determinar sus límites de aplicabilidad. En este capítulo también usamos el algoritmo para inferir la corriente de  $Ca^{2+}$  a partir de imágenes (“sparklets”) obtenidas en ovocitos cuando el  $Ca^{2+}$  ingresa desde el medio extra-celular a través de un canal único de membrana voltaje-dependiente, obteniendo valores de corriente dentro del rango esperado. Esta última aplicación no sólo permitió demostrar la utilidad del algoritmo para obtener valores de corriente razonables a partir de imágenes reales ruidosas. Sirvió también para validar el abordaje propuesto en el Cap. 4 usando datos reales.

A partir de las muchas pruebas que hicimos del algoritmo, pudimos observar que era posible inferir la corriente con error menor si en el ansatz (4.4) anulábamos la dependencia con las derivadas de  $[Ca^{2+}]$  y lo reemplazábamos por una única función,  $k([Ca^{2+}])$ . En el Cap. 6 analizamos por qué esto era así, llegando a la conclusión de que era debido al ingreso muy localizado del calcio. En efecto, frente a corrientes localizadas permanentes en el tiempo, las soluciones de los sistemas de reacción-difusión tienden, localmente, a una solución estacionaria muy rápidamente (para los parámetros típicos de las señales de  $Ca^{2+}$  estimamos que este tiempo era  $\lesssim 1$  ms). Más aún, estas soluciones estacionarias son tales que  $[Ca^{2+}]$  es una función decreciente de la distancia al sitio por donde ingresa el  $Ca^{2+}$ , mientras este ingreso se mantiene constante. Por lo tanto, una vez alcanzado el estado estacionario es posible invertir la relación entre distancia y  $[Ca^{2+}]$  para escribir cualquier función de la distancia (en particular, las concentraciones de buffers) como una función de  $[Ca^{2+}]$ . Un rasgo interesante de esta aproximación es el hecho de que puede ser simplificada aún más reemplazando la relación no lineal entre la suma de los términos de remoción de  $Ca^{2+}$  y  $[Ca^{2+}]$  por una relación

lineal (que se satisface razonablemente bien para valores típicos de los valores de corriente de los experimentos analizados). Si usamos esta aproximación reducimos, entonces, la descripción de la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de una fuente cuasi-puntual y de diversos buffers y mecanismos de remoción, a una única ecuación dinámica para  $[\text{Ca}^{2+}]$  que es lineal en  $[\text{Ca}^{2+}]$  y que, por lo tanto, posee solución analítica (mientras la fuente permanece “encendida”). En el Cap. 6 estudiamos los límites de aplicabilidad de esta nueva descripción reducida cuyos parámetros también pueden obtenerse a partir de imágenes (numéricas o reales). Determinamos también hasta qué punto en esta nueva “reducción observacional” pueden separarse los parámetros intrínsecos de los que caracterizan la intensidad y temporalidad de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , obteniendo errores menores que  $\sim 24\%$  si se mantienen los parámetros intrínsecos constantes y se varían las corrientes dentro del rango de corrientes típicas de “sparklets” y “puffs”. Usando los valores obtenidos para los diversos parámetros a partir de las señales de “sparklets” analizadas en el Cap. 5, pudimos efectivamente reproducir la distribución espacio-temporal de  $[\text{Ca}^{2+}]$  observada en estas imágenes. Aplicaciones preliminares de este nuevo “ansatz” a los puffs sintéticos introducidos en el Cap. 2 nos permitieron obtener valores de corriente dentro de los rangos esperados. Si bien esta última aplicación es muy preliminar y necesitamos hacer más estudios, creemos que este nuevo algoritmo será mucho más sencillo de implementar por lo que nos abrirá la posibilidad de hacer análisis masivos de imágenes de fluorescencia reales.

Esta tesis es el relato de un camino que decidimos transitar que no siempre es (ni fue) sencillo: el de la investigación interdisciplinaria. ¿Puede la física, con su tendencia a la generalización y a la simplificación aportar algo a la biología, con su tendencia a destacar las particularidades y la diversidad y con un objeto de estudio tan complejo como son los seres vivos? Creemos que los resultados de esta tesis muestran que estas dos visiones pueden complementarse para contestar distintos tipos de preguntas. Nuestra “búsqueda de la simplicidad” nos mostró que era posible encontrarla en los propios datos biológicos. Esperamos que en el futuro este tipo de interacciones pueda crecer ayudando al avance de la ciencia en general.



# Agradecimientos

A Ale, no alcanzan todas las palabras de este mundo y de cualquier otro para vos. Por ser todo y estar siempre, por lo maravilloso que es compartir la vida con vos.

A mis padres, por darme la vida y marcarme el camino, por tanto amor, permanente, sólido, incondicional. A mis hermanos, mis compañeros de ruta, por lo lindo que fue y sigue siendo crecer juntos. Y a mis abuelos, por quererme y hacérmelo sentir, cada uno a su manera.

A mis amigos, los de siempre, los nuevos, los que están lejos.

A los Varela, por interesarse en lo que hago, por la inmensa compañía que fueron estando en Auckland y acá también. A María Elena y al tío Nino (y a Ale también, por supuesto) por ayudarme a rastrear a Galileo.

A Guille y Daniel, por los cafés, por las charlas, por la amistad. A Luciana, Damián, Martín, la gente de Irvine y la de Auckland, porque haber trabajado juntos fue un crecimiento, y también un placer.

A Víctor, por haberme sugerido “¿y si probás con Matlab?”, definitivamente una muy buena idea. A Pablo Mininni por su constante disposición a responder todas mis dudas, y siempre con claridad. A Alberto, por ser mejor aún que los “bomberos voluntarios”.

A la Universidad de Buenos Aires, al CONICET y a la Fundación Antorchas. A este Departamento de Física y toda su gente, un lindo lugar para trabajar.

Y por supuesto, a Silvina, por su guía, su apoyo y emprendimiento. Por enseñarme a hacer ciencia en forma seria, creativa, ordenada. Por confiar en mí, en que todo esto era posible. Por no perder la calma en mis tormentas. Por darme, seguramente sin haberlo buscado, un modelo a seguir.

# Bibliografía

- [Aidley, 1998] Aidley, D. J. 1998. The physiology of excitable cells. Cambridge University Press, Cambridge.
- [Alberts et al, 2002] Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. 2002. Molecular Biology of the Cell, 4th ed. Garland Science, New York.
- [Allbritton et al, 1992] Allbritton, N. L., T. Meyer, and L. Stryer. 1992. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-triphosphate. *Science*. 258:1812-1815.
- [Augustine and Charlton, 1986] Augustine, G. J., and M. P. Charlton. 1986. Calcium dependence of presynaptic calcium current and post-synaptic response at the squid giant synapse. *J Physiol (Lond)*. 381:619-640.
- [Baylor et al., 2002] Baylor, S.M., S. Hollingworth, and W.K. Chandler. 2002. Comparison of Simulated and Measured Calcium Sparks in Intact Skeletal Muscle Fibers of the Frog. *J. Gen. Physiol*. 120:349-368.
- [Berg, 1993] Berg, H. C. 1993. Random walks in biology. Princeton University Press.
- [Berridge, 1993] Berridge, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361:315-325.
- [Berridge, 1997] Berridge, M. J. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. *The Journal of Physiology*. 499:291-306.
- [Berridge et al., 1998] Berridge, M. J., M.D. Bootman, and P. Lipp. 1998. Calcium -a life and death signal. *Nature*. 395:645-648.

- [Bezprozvanny et al, 1991] Bezprozvanny, I., J. Watras, and B. E. Ehrlich. 1991. Bell-shaped calcium-response curves for Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*. 351:751-754.
- [Blatter et al., 1997] Blatter, L. A., J. Hüser, and E. Ríos. 1997. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release flux underlying Ca<sup>2+</sup> sparks in cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:4176-4181.
- [Bootman et al., 1997] Bootman, M., E. Niggli, E., M. J. Berridge, and P. Lipp. 1997. Imaging the hierarchical Ca<sup>2+</sup> signalling system in HeLa cells. *The Journal of Physiology*. 499:307-314.
- [Bruno et al., 2005] Bruno, L., A. C. Ventura, S. Dargan, I. Parker, and S. Ponce Dawson. 2005. Determination of Ca<sup>2+</sup> currents underlying Ca<sup>2+</sup> puffs in *Xenopus* oocytes using an heuristic model. In preparation.
- [Callamaras et al., 1998] Callamaras, N., J. S. Marchant, X-P. Sun and I. Parker. 1998. Activation and co-ordination of InsP<sub>3</sub>-mediated elementary Ca<sup>2+</sup> events during global Ca<sup>2+</sup> signals in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 509:81-91.
- [Callamaras and Parker, 1999a] Callamaras, N, and I. Parker. 1999. Construction of a confocal microscope for real-time x-y and x-z imaging. *Cell Calcium*. 26:271-279.
- [Callamaras and Parker, 1999b] Callamaras, N. and I. Parker. 1999. Radial localization of Inositol 1,4,5-Trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> release sites in *Xenopus* oocytes resolved by axial confocal linescan imaging. *J. Gen. Physiol.* 113:199-213.
- [Callamaras and Parker, 2000] Callamaras, N. and I. Parker. 2000. Phasic characteristic of elementary Ca<sup>2+</sup> release sites underlying quantal responses to IP<sub>3</sub>. *EMBO J.* 19:3608-3617.
- [Cong et al, 2004] Cong, W., L. V. Wang, G. Wang. 2004. Formulation of photon diffusion from spherical bioluminescent sources in an infinite homogeneous medium. *BioMedical Engineering OnLine* 3(12):1-16.
- [Crank, 1956] Crank, J. 1956. The mathematics of diffusion. Oxford University Press, London.
- [Cheng et al., 1993] Cheng, H., W. J. Lederer, M. B. Cannell. 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262:740-744.

- [Dargan and Parker, 2003] Dargan, S.L and I. Parker. 2003. Buffer kinetics shape the spatio-temporal patterns of IP<sub>3</sub>-evoked Ca<sup>2+</sup> signals. *J. Physiol.* 553(3):775-788.
- [Dargan and Parker, 2004] Dargan, S.L and I. Parker. 2004. Spatio-temporal patterning of IP<sub>3</sub>-mediated Ca<sup>2+</sup> signals in *Xenopus* oocytes by Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *J. Physiol.* 556(2):447-461.
- [Dawson et al., 1999] Dawson, S.P., J. Keizer, and J. E. Pearson. 1999. Fire-diffuse-fire model of dynamics of intracellular calcium waves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6060-6063.
- [Dawson and Uchitel, 2002] Dawson, S.P., and O. Uchitel. 2002. The effect of buffered calcium diffusion on neurotransmitter release. *Physica D* 168-169:356-364.
- [Demuro and Parker, 2003] Demuro, A., and I. Parker. 2003. Optical single-channel recording: imaging Ca<sup>2+</sup> flux through individual N-type voltage-gated channels expressed in *Xenopus oocytes*. *Cell Calcium*. 34: 499-509.
- [Demuro and Parker, 2004] Demuro, A., and I. Parker. 2004. Imaging the activity and localization of single voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 86:3250-3259.
- [De Knonick and Schulmann, 1998] De Knonick, P., and H. Schulmann. 1998. Sensitivity of CaM Kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science* 279:227-230.
- [De Young and Keizer, 1992] De Young, G. W., and J. Keizer. 1992. A single-pool inositol 1,4,5-triphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca<sup>2+</sup> concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9895-9899.
- [Falcke et al., 1999] Falcke, M., J. L. Hudson, P. Camacho, and J. D. Lechleiter. 1999. Impact of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> cycling on pattern formation and stability. *Biophys. J.* 77(1):37-44.
- [Finch et al., 1991] Finch, E. A., T. J. Turner, and S. M. Goldin. 1991. Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science* 252:443-446.
- [Fontanilla and Nuccitelli, 1998] Fontanilla, R. A., and R. Nuccitelli. 1998. Characterization of the Sperm-Induced Calcium Wave in *Xenopus* Eggs Using Confocal Microscopy. *Biophys. J.* 75:2079-2087.

- [Gershenfeld, 1999] Gershenfeld, N. 1999. The nature of mathematical modeling. Cambridge University Press, Cambridge.
- [Goldbeter, 1996] Goldbeter, A. 1996. Biochemical oscillations and cellular rhythms. Cambridge University Press, Cambridge.
- [Gouesbet, 1992] Gouesbet, G. 1992. Reconstruction of vector fields: The case of the Lorenz system. *Phys. Rev. A* 46:1784-1796.
- [Guckenheimer, 1983] Guckenheimer J., and P. Holmes. 1983. Nonlinear Oscillations, Dynamical Systems and Bifurcations of Vector Fields. Springer-Verlag, New York.
- [Hille, 2001] Hille, B. 2001. Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates, New York.
- [Horne and Meyer, 1997] Horne, J. H. and T. Meyer. 1997. Elementary calcium-release units induced by inositol trisphosphate. *Science*. 276:1690-1693.
- [IDL] IDL programming language. Research Systems, Inc., Boulder, CO, USA.
- [Izu et al., 2001] Izu, L. T., J. R. Mauban, D. W. Balke, and W. G. Wier. 2001. Large currents generate cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  sparks. *Biophys. J.* 80:88-102.
- [Jaffe, 1991] Jaffe, L. F. 1991. The path of calcium in cytosolic calcium oscillations: A unifying hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9883-9887.
- [Jouaville et al, 1995] Jouaville, L. S., F. Ichas, E. L. Holmuhamedov, P. Camacho, and J. D. Lechleiter. 1995. Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* 377:438-441.
- [Jung et al., 1998] Jung, P., A. Cornell-Bell, K. Shaker, and F. Moss. 1998. Noise-induced spiral waves in astrocyte syncytia show evidence of self-organized criticality. *J. Neurophys.* 79:1098-1101.
- [Keener and Sneyd, 1998] Keener, J. P., and J. Sneyd. 1998. Mathematical Physiology. Springer-Verlag, New York.
- [Keizer et al., 1998] Keizer, J., G. Smith, S. Ponce-Dawson, and J. Pearson. 1998. Saltatory propagation of  $\text{Ca}^{2+}$  waves by  $\text{Ca}^{2+}$  sparks. *Biophys. J.* 75:595-600.

- [Kidd et al., 1999] Kidd, J. F., K. E. Fogarty, R. A. Tuft, and P. Thorn. 1999. The role of  $\text{Ca}^{2+}$  feedback in shaping  $\text{InsP}_3$ -evoked  $\text{Ca}^{2+}$  signals in mouse pancreatic acinar cells. *J. Physiol. (Lond.)* 520:187-201.
- [Lechleiter et al., 1991] Lechleiter, J. L., S. Girard, E. G. Peralta, and D. E. Clapham. 1991. Spiral calcium wave propagation and annihilation. *Science*. 252:123-126.
- [Lee, 1999] Lee, H.K., and Elmslie, K.S. 1999. Gating of Single N-type Calcium Channels Recorded from Bullfrog Sympathetic Neurons. *J. Gen. Physiol.* 113:111-124.
- [Lin, 1997] Lin, Z., S. Haus, J. Edgerton, D. Lipscombe, 1997. Identification of functionally distinct isoforms of the N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel in rat sympathetic ganglia. *euron*. 18:153-166.
- [Lipp and Niggli, 1996] Lipp, P., and E. Niggli. 1996. A hierarchical concept of cellular and subcellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 65:265-296.
- [Lukyanenko et al., 1998] Lukyanenko, V., T. F. Wiesner, and S. Gyorke. 1998. Termination of  $\text{Ca}^{2+}$  release during  $\text{Ca}^{2+}$  sparks in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* 507:667-677.
- [Mak et al., 1998] Mak, D-O D., S. McBride, and J.K. Foskett. 1998. Inositol 1,4,5-trisphosphate activation of inositol trisphosphate receptor  $\text{Ca}^{2+}$  channel by ligand tuning of  $\text{Ca}^{2+}$  inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95:15821-15825.
- [Mak et al., 2000] Mak, D-O D., S. McBride, V. Raghuram, Y. Yue, S.K. Joseph, J.K. Foskett. 2000. Single channel properties in endoplasmic reticulum membrane of recombinant type 3 inositol trisphosphate receptor. *J. Gen. Physiol.* 115:241-255.
- [MATLAB] MATLAB. The Mathworks, Natick, MA, USA.
- [Mindlin et al., 1990] Mindlin, G. B., X. Hou, H. G. Solari, R. Gilmore, and N. B. Tufillaro. 1990. Classification of strange attractors by integers. *Phys. Rev. Lett.* 64:2350-2353.
- [Mindlin et al., 1998] Mindlin G. B., N. Merener, and P. T. Boyd. 1998. Low-dimensional dynamics outside the laboratory: The case of roAp stars. *Europhys. Lett.* 42:31-36.

- [Murray, 1989] Murray, J. D. 1989. *Mathematical Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [Naraghi and Neher, 1997] Naraghi, M. and E. Neher, 1997. Linearized buffered  $Ca^{2+}$  diffusion in microdomains and its implications for calculation of  $[Ca^{2+}]$  at the mouth of a calcium channel. *J. Neurosci.* 17:6961-6973.
- [Neher, 1986] Neher, E. 1986. Concentration profiles of intracellular  $[Ca^{2+}]$  in the presence of diffusible chelator, in *Calcium Electrogenesis and Neuronal Functioning*, Exp. Brain Res. 14, U. Heinemann, M. Klee, E. Neher, and W. Singer, eds., Springer-Verlag, Berlin, 1986, pp. 80–96.
- [Neher, 1999] Neher, E. 1998. Usefulness and limitations of lineal approximations to the understanding of  $Ca^{2+}$  signals. *Cell Calcium* 24(5/6):345-357.
- [Neher, 2000] Neher, E. 2000. Calcium buffers in flash-light. *Biophys. J.* 79:2783-2784.
- [Nguyen et al., 2001] Nguyen, Q-T., N. Callamaras, C. Hsieh, I. Parker. 2001. Construction of a two-photon microscope for video-rate  $Ca^{2+}$  imaging. *Cell Calcium.* 20:383-393.
- [Nuccitelli, 1994] Nuccitelli, R. 1994. *Methods in cell biology*. Volume 40. A practical guide to the study of calcium in living cells. Academic Press.
- [Packard et al., 1980] Packard, N. H., J. P. Crutchfield, J. D. Farmer, and R. S. Shaw. 1980. Geometry from a Time Series. *Phys. Rev. Lett.* 45:712-716.
- [Pando, 2003] Pando, B. F. 2003. Efectos geométricos sobre la propagación de señales de calcio. Tesis de Licenciatura.
- [Pape et al, 1995] Pape, P. C, D. S. Jong, W. K. Chandler. 1995. Calcium release and its voltage dependence in frog cut muscle fibers equilibrated with 20 mM EGTA. *J. Gen. Physiol.* 106:259-336.
- [Pape et al, 1998] Pape, P. C, D. S. Jong, W. K. Chandler. 1998. Effects of partial sarcoplasmic reticulum calcium depletion on calcium in frog cut muscle fibers equilibrated with 20 mM EGTA. *J. Gen. Physiol.* 112:263-295.

- [Parker and Yao, 1991] Parker, I. and Y. Yao. 1991. Regenerative release of calcium from functionally discrete subcellular stores by inositol trisphosphate. *Proc. R. Soc. Lond. B* 246:269-274.
- [Parker et al., 1996a] Parker, I., J. Choi, J. and Y. Yao. 1996. Elementary events of  $\text{InsP}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  liberation in *Xenopus* oocytes: hot spots, puffs and blips. *Cell Calcium* 20:105-121.
- [Parker et al., 1996b] Parker, I, Y. Yao, and V. Ilyin. 1996. Fast kinetics of calcium liberation induced in *Xenopus* oocytes by photoreleased inositol trisphosphate. *Biophys. J.* 70:222-237.
- [Parker et al., 1997] Parker, I., N. Callamaras and W.G. Wier. 1997. A high-resolution, confocal laser-scanning microscope and flash photolysis system for physiological studies. *Cell Calcium* 21(6):441-452.
- [Pawley, 1995] Pawley, J.B., 1995. Ed., Handbook of Biological Confocal Microscopy. Plenum Press, New York.
- [Press et al., 1992] Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., and Flannery, B.P., 1992. Numerical Recipes in C, p.671. Cambridge University Press, Cambridge.
- [Pawley, 1995] Pawley, J.B., 1995. Ed., Handbook of Biological Confocal Microscopy. Plenum Press, New York.
- [Ríos et al., 1999] Ríos, E., M. D. Stern, A. González, and G. Pizarro. 1999. Calcium release flux underlying  $\text{Ca}^{2+}$  sparks of frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 114:31-48.
- [Ríos and Brum, 2002] Ríos, E., and G. Brum. 2002.  $\text{Ca}^{2+}$  release flux underlying  $\text{Ca}^{2+}$  transients and  $\text{Ca}^{2+}$  sparks in skeletal muscle. *Frontiers in Bioscience.* 7:d1195-1211.
- [Roberts, 1994] Roberts, W. M. 1994. Localization of calcium signals by a mobile calcium buffer in frog saccular hair cells. *J. Neurosci.* 14:3246-3262.
- [Smith, 1996a] Smith, G. D. 1996. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  influx on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  responses in antigen-stimulated RBL-2H3 cells and Calculations of localized  $\text{Ca}^{2+}$  elevations and domain of  $\text{Ca}^{2+}$  using the rapid buffering approximation. Dissertation.



- [Smith et al., 1996] Smith, G. D., J. Wagner, and J. Keizer. 1996. Validity of the rapid buffering approximation near an open  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Biophys. J.* 70:2527-2539.
- [Smith., 1996b] Smith, G. D. 1996. Analytical steady-state solution to the rapid buffering approximation near an open  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Biophys. J.* 71:3064-3072.
- [Smith et al., 1998] Smith, G. D., J. E. Keizer, M. D. Stern, W. J. Lederer, and H. Cheng. 1998. A simple numerical model of calcium spark formation and detection in cardiac myocytes. *Biophys. J.* 75:15-32.
- [Smith et al., 2001] Smith, G. D., L. Dai, R. M. Miura, and A. Sherman. 2001. Asymptotic Analysis of Buffered Calcium Diffusion near a Point Source *SIAM J. Appl. Math.* 61:1816-1838.
- [Sneyd et al., 1998] Sneyd J., P. Dale, and A. Duffy. 1998. Traveling waves in buffered systems: applications to calcium waves. *SIAM J. Appl. Math.* 58:1178-1192.
- [Soeller and Cannell, 2002] Soeller, C., and M. B. Cannell. 2002. Estimation of the the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release flux underlying  $\text{Ca}^{2+}$  sparks. *Biophys. J.* 82(5):2396-2414.
- [Solari et al., 1996] Solari, H., M. A. Natiello and G. B. Mindlin. 1996. Non-linear Dynamics, A Two Way Trip From Physics To Math. Institute of Physics.
- [Song et al., 1998] Song, L-S, J. S. K. Sham, M. D. Stern, E. G. Lakatta, and H. Cheng. 1998. Direct measurement of SR release flux by tracking “ $\text{Ca}^{2+}$  spikes” in rat cardiac myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 512:677-691.
- [Strier and Dawson, 2000] Strier, D. E., and S. P. Dawson. 2000. Rescaling of diffusion coefficients in two-time scale chemical systems. *J. Chem. Phys.* 112:825-834.
- [Strier, 2002] Strier, D. 2002. Procesos de autoorganización en sistemas biológicos. Tesis de Doctorado.
- [Strier et al., 2002] Strier, D. E., A. Chernomoretz, and S. P. Dawson. 2002. Reduced description of two time-scale chemical systems. A mesoscopic approach. *Phys. Rev. E.* 65.4:046233-47.

- [Strier et al., 2003] Strier, D, A. C. Ventura, and S. Ponce Dawson. 2003. Saltatory and continuous calcium waves and the rapid buffering approximation. *Biophys. J.* 85:3575-3586.
- [Sun et al., 1998] Sun, X-P, N. Callamaras, J.S. Marchant and I. Parker. 1998. A continuum of InsP<sub>3</sub>-mediated elementary Ca<sup>2+</sup> signalling events in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 509:67-80.
- [Swillens et al., 1999] Swillens, S., G. Dupont, L. Combettes, and P. Champeil. 1999. From calcium blips to calcium puffs: Theoretical analysis of the requirements for interchannel communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13750-13755.
- [Takahashi et al., 1999] Takahashi, A., P. Camacho, J. D. Lechleiter, and B. Herman. 1999. Measurement of intracellular calcium. *Physiological Reviews.* 79(4):1089-1125.
- [Timmer et al., 1998] Timmer, J., T. Müller and W. Melzer. 1998. Numerical methods to determine calcium release flux from calcium transients in muscle cells. *Biophys. J.* 74:1694-1707.
- [Veijola, 1996] Veijola, T. Simple model for thermal spreading impedance. 1996. *Proceedings of BEC 96* 73-76.
- [Ventura and Ponce Dawson, 2002] Ventura, A. C. and S. Ponce Dawson. Análisis de eventos elementales en las señales intracelulares de calcio. *Anales AFA.* 13:194-196.
- [Ventura et al., 2004] Ventura, A.C., L. Bruno and S. Ponce Dawson. 2004. Probing a reduced equation for intracellular calcium dynamics. *Physica A.* 342:281-287.
- [Ventura et al., 2005a] Ventura, A. C., L. Bruno, A. Demuro, I. Parker, and S. Ponce Dawson. 2005. A model-independent algorithm to derive Ca<sup>2+</sup> fluxes underlying local cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients. *Biophys. J.* 88:2403-2421.
- [Ventura et al., 2005b] Ventura, A. C., C. E. Cesar, S. Ponce Dawson and I. Parker. IP<sub>3</sub>-evoked and simulated Ca<sup>2+</sup> puffs studied in *Xenopus* oocytes after functional uncoupling by EGTA. In preparation.
- [Ventura et al., 2005c] Ventura, A. C., L. Bruno and S. Ponce Dawson. Reduced descriptions of intracellular calcium dynamics obtained from data. In preparation.

- [Verkhatsky and Toescu, 1998] Verkhatsky, A. and E. C. Toescu. 1998. Integrative aspects of calcium signaling. Plenum Press, New York.
- [Wagner and Keizer, 1994] Wagner, J., and J. Keizer. 1994. Effects of rapid buffers on  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion and  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *Biophys. J.* 67:447-456.
- [Watras et al., 1991] Watras, J., I. Bezprozvanny, and B. E. Erlich. 1991. Inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channels in cerebellum: presence of multiple conductance states. *J. Neurosci.* 11:3239-3245.
- [Wiggins, 1990] Wiggins, S. 1990. Introduction to Applied Nonlinear Dynamical Systems and Chaos. Springer-Verlag, New York.
- [Yao et al., 1995] Yao, Y., J. Choi, and I. Parker. 1995. Quantal puffs of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 482.3:533-553.
- [Zou et al., 2004] Zou, H., L. M. Lifshitz, R. A. Tuft, K. E. Fogarty and J. J. Singer. 2004. Imaging calcium entering the cytosol through a single opening of plasma membrane ion channels: SCCaFTs- fundamental calcium events. *Cell Calcium.* 35: 523-533.