

Tesis Doctoral

Interacción entre geometría y dinámica en la modulación de señales intracelulares de calcio

Piegari, Estefanía

2016-03-30

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

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

Cita tipo APA:

Piegari, Estefanía. (2016-03-30). Interacción entre geometría y dinámica en la modulación de señales intracelulares de calcio. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Piegari, Estefanía. "Interacción entre geometría y dinámica en la modulación de señales intracelulares de calcio". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-30.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



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

Interacción entre geometría y dinámica en la modulación de señales intracelulares de calcio

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

por **Lic. Estefanía Piegari**

Director de tesis: Dra. Silvina Ponce Dawson

Consejero de estudios: Dra. Lía Pietrasanta

Lugar de trabajo: IFIBA

26 de febrero de 2016

Fecha de defensa: 30/03/16

Agradecimientos

Quiero agradecerle muy especialmente a Silvina, quien me guió en el proceso de aprendizaje durante todos estos años con mucha alegría.

A mis compañeros del grupo Lucía, Cecilia, Emiliano y María Laura por el empuje constante y la buena onda.

A Lía por aconsejarme con mucho cariño.

A los chicos de laboratorios vecinos por la buena predisposición para ayudar en lo que surgiera.

A mi familia y amigos que me acompañan todos los días con mucha paciencia.

A Cosensores y Colectivo desde el Pie, que me demuestran que es posible preguntarnos qué ciencia queremos hacer y aportar a problemáticas sociales construyendo en conjunto con la comunidad y sus conocimientos.

Resumen

Las señales de Ca^{2+} son ubicuas y juegan un rol importante en numerosos procesos fisiológicos como la fertilización o la muerte celular. Su versatilidad se basa en la variedad de comportamientos espacio-temporales que puede mostrar la concentración de calcio intracelular y en que distintos comportamientos pueden inducir respuestas diferentes. La liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático (RE) hacia el citosol a través de receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (RIP_3s) es una componente clave dentro de los mecanismos de señalización por Ca^{2+} . Los RIP_3s necesitan unir IP_3 y Ca^{2+} para abrirse por lo que la liberación de Ca^{2+} a través de un único RIP_3 puede inducir la apertura de otros canales vecinos, mecanismo que se conoce como liberación de calcio inducida por calcio o CICR por las siglas en inglés. Los RIP_3s aparentemente se organizan en cúmulos sobre la membrana del RE (*clusters*). Si el CICR se encuentra limitado a un *cluster*, las señales pueden permanecer localizadas (*puffs*). En caso contrario, pueden convertirse en ondas que se propagan entre *clusters*. Los *puffs* son los ladrillos de construcción de esas señales más globales que se propagan por toda la célula. Por este motivo, existe un gran interés en la determinación de las propiedades de los *puffs*, especialmente en vista de la actual controversia sobre la distribución espacial de los RIP_3s activables. Las señales de calcio, por otro lado, pueden remodelarse a través de varios mecanismos, entre ellos, el atrapado del Ca^{2+} por parte de *buffers*. Éstos no sólo disminuyen la concentración de Ca^{2+} libre sino que modifican su distribución espacio-temporal de distintos modos dependiendo de su cinética.

Los *puffs* de Ca^{2+} se han observado en células intactas con técnicas ópticas mostrando que son intrínsecamente estocásticos. La obtención de una imagen correcta de la dinámica de los eventos entonces implica ser capaz de detectar todo el rango de tamaños de *puffs*. Éstos se observan usando indicadores de Ca^{2+} de una longitud de onda visible y *buffers* exógenos lentos (por ej; EGTA) para disrumpir el CICR entre *clusters*. Los indicadores de única longitud de onda aumentan su fluorescencia al ligar calcio. De esta manera, generan imágenes que dependen fuertemente de su cinética, transporte y propiedades fotofísicas. Por este motivo, es de particular importancia determinar los artefactos que generan las condiciones del experimento.

La propia existencia de los *puffs* depende de que los RIP_3s están organizados en cúmulos. Una distribución uniforme de receptores debería dar lugar típicamente a señales propagantes tipo ondas. Los ovocitos de *Xenopus laevis* son un sistema experimental ventajoso para estudiar estas señales. Durante la fertilización se evoca una onda de Ca^{2+} que se propaga por toda la célula. La fertilización ocurre en el huevo maduro.

Se ha observado que, al madurar el ovocito, su RE se configura y la distribución de los RIP₃s parece ser más uniforme. Esto tiene un correlato en las características de las señales evocadas en los ovocitos maduros.

En esta Tesis se combinaron experimentos, un análisis teórico y simulaciones numéricas para evaluar de qué modo la geometría de la distribución de canales se combina con alguno de los otros aspectos que influyen sobre la distribución de calcio libre para determinar las características de las señales. El primer aporte fue introducir un método que permite establecer clases equivalentes de experimentos de obtención de imágenes realizados en condiciones diferentes, donde la clase está determinada por la relación señal-ruido que predice el método. Éste también puede utilizarse para estimar el tamaño de las señales más pequeñas que pueden observarse de manera confiable con cada arreglo y para generar imágenes de fluorescencia numéricamente con ruido realista. Esta Tesis también contribuyó a estudiar si la presencia del indicador o del EGTA en distintas condiciones experimentales altera la dinámica intracelular de Ca²⁺, en particular, analizar si son capaces de detectar *puffs* de Ca²⁺ con similar precisión y de qué modo las distintas configuraciones experimentales afectan las propiedades de los *puffs* observados y la dinámica del Ca²⁺ subyacente. Se pudo determinar que aunque el indicador o el EGTA no alteran la dinámica *intracluster* del Ca²⁺, el conjunto de eventos observables del experimento es diferente dependiendo del grado de acoplamiento entre *clusters*. El estudio, por otro lado, permitió inferir que los *puffs* con mayor liberación de Ca²⁺ provienen de cúmulos donde los RIP₃s están muy cerca unos de otros. Para estudiar en más detalle la disrupción del CICR entre *clusters* vecinos que inducen los *buffers* lentos, se realizaron experimentos utilizando simultáneamente dos indicadores de calcio de distinta cinética. Utilizando el método introducido pudimos confirmar nuestra conclusión previa sobre cómo se modifica el conjunto de eventos que se evoca en presencia de *buffers* lentos. Por otro lado, determinamos que la presencia de *buffers* rápidos da lugar a liberaciones de Ca²⁺ más prolongadas tal vez debido a que reducen el efecto inhibitor del Ca²⁺ sobre los RIP₃s. En relación a la razón por la que los *buffers* lentos disrumpen el acoplamiento entre *clusters* pudimos concluir que su presencia disminuye el Ca²⁺ basal, aunque no tanto como para explicar la disrupción. El análisis de la diferente distribución espacio-temporal de los *buffers* lentos y rápidos parecería indicar la presencia de RIP₃s en el espacio entre *clusters* que podrían ser “silenciados” por los *buffers* lentos evitando así la propagación de las señales entre cúmulos. Finalmente, en la Tesis se han mostrado también resultados preliminares de señales de calcio que se observan en células maduras, cuyos cambios pueden explicarse en términos de una distribución espacial distinta de RIP₃s.

Palabras claves: señales intracelulares de calcio, receptores de IP₃, dinámica espacio-temporal, microscopía confocal, fluctuaciones de la fluorescencia.

Interaction of geometry and dynamics on the modulation of intracellular calcium signals.

Abstract

Ca^{2+} signals are ubiquitous and play a relevant role in numerous physiological processes as fertilization or cell death. Their versatility relies on the variety of spatio-temporal behaviors that the intracellular calcium concentration can display and that different behaviors can induce different end responses. Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum (ER) into the cytosol through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP_3Rs) is a key component of the Ca^{2+} signaling toolkit. IP_3Rs need to bind IP_3 and Ca^{2+} to become open and therefore. Therefore, Ca^{2+} released through one open IP_3R can induce the opening of neighboring ones, a mechanism that is known as Calcium Induced Calcium Release (CICR). IP_3Rs are apparently organized in *clusters*. The signals can remain localized (i.e., Ca^{2+} *puffs*) if CICR is limited to one *cluster* or become waves that propagate between *clusters*. *Puffs* are the building blocks of global signals that propagate throughout the cell. Thus, there is great interest in determining *puff* properties, especially in view of the current controversy on the spatial distribution of activatable IP_3Rs . Moreover, calcium signals can be remodeled through various mechanisms, such as Ca^{2+} *buffers*. *Buffers* not only decrease the concentration of free Ca^{2+} but also modify its spatial and temporal distribution in different ways depending on their kinetics.

Ca^{2+} *puffs* have been observed in intact cells using optical techniques showing that they are intrinsically stochastic. Obtaining a correct picture of their dynamics then entails being able to detect the whole range of *puff* sizes. *Puffs* are usually observed using visible single-wavelength dyes and slow exogenous *buffers* (e.g., EGTA) to disrupt *inter-cluster* CICR. Single-wavelength dyes increase their fluorescence upon calcium binding producing images that are strongly dependent on their kinetic, transport and photophysical properties. Thus, determining the artifacts that the imaging setting introduces is particularly relevant.

The very existence of *puffs* depends on the fact that IP_3Rs are organized in *clusters*. A uniform distribution of receptors should typically lead to waves-like (propagating) signals. *Xenopus laevis* oocytes are an advantageous biological system to study these signals since Ca^{2+} release from the ER only occurs through IP_3Rs . During fertilization a Ca^{2+} wave that propagates throughout the cell is evoked. Fertilization occurs in the mature egg. It has been observed that maturation of the oocyte induces a reorganization of the ER whereas IP_3Rs seem to be distributed more uniformly on its membrane. This has its counterpart on the properties of the Ca^{2+} signals that are evoked in mature oocytes.

In this Thesis we have combined experiments, theoretical analyses and numerical simulations to evaluate in which ways the geometry of the channel distributions interacts with the other aspects that affect the intracellular Ca^{2+} dynamics to determine the characteristics of the signals. The first contribution of this Thesis was to introduce a method that establishes equivalence classes of Ca^{2+} imaging experimental conditions, where the class is determined by the signal-to-noise ratio that is predicted by the method. The method can also be used to estimate the smallest signals that can reliably be observed with each experimental setting and to produce numerically generated Ca^{2+} images with realistic noise. The Thesis also contributed to study to what extent experiments performed with different dyes and/or [EGTA] alter the intracellular Ca^{2+} dynamics, in particular, if they are able to detect Ca^{2+} *puffs* with similar accuracy and in which ways the different experimental conditions affect the observed *puff* properties or the underlying dynamics of Ca^{2+} itself. We could determine that, although the dye or EGTA does not alter the *intra-cluster* dynamics, the set of observable events is different depending on the degree of *inter-cluster* coupling/uncoupling that is induced by the experimental conditions. An analysis of the observations allowed us to show that the events with the largest amounts of released Ca^{2+} came from *clusters* with densely packed active IP_3Rs . To study in more detail the way in which slow *buffers* disrupt the *inter-cluster* CICR experiments were performed using two calcium dyes of different kinetics simultaneously. Applying the method introduced previously in the Thesis we could confirm our previous conclusion on how the set of events that is evoked is modified in the presence of slow *buffers*. We determined that the presence of fast buffers, on the other hand, results in longer periods of Ca^{2+} release perhaps because they reduce the inhibitory effect of Ca^{2+} on IP_3Rs . With respect to the way in which the slow *buffers* disrupt the *inter-cluster* coupling we could conclude that their presence decreases basal Ca^{2+} , although not enough to explain the disruption. The analysis of the different spatial and temporal distribution of Ca^{2+} bound to slow and fast *buffers* that is observed in the experiments seems to indicate that there are IP_3Rs in the space between *clusters* that could be silenced by the slow *buffers* thus preventing the propagation of signals between *clusters*. Finally, in the Thesis we have also shown preliminary results on calcium signals observed in mature cells, whose changes can be explained in terms of a different spatial distribution of IP_3Rs with respect to the case of immature oocytes.

Keywords: intracellular calcium signals, IP_3 receptors, spatio-temporal dynamics, confocal microscopy, fluorescence fluctuations.

Índice general

Agradecimientos	I
Resumen	II
Abstract	IV
1. Introducción	1
1.1. Motivación biológica	1
1.1.1. Iones de calcio como mecanismo de señalización celular	1
1.1.2. Mecanismos para controlar la concentración intracelular de Ca^{2+}	3
1.1.3. Señales de Ca^{2+} mediadas por canales receptores de IP_3	4
1.2. Observación de señales de Ca^{2+}	7
1.2.1. Indicadores fluorescentes	7
1.2.2. Compuestos enjaulados	9
1.2.3. Microscopía confocal	10
1.3. Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	12
1.3.1. Clasificación de señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s	13
1.3.2. Características durante distintos estadios de maduración.	15
1.3.3. Efecto de los <i>buffers</i> sobre la dinámica espacio-temporal del Ca^{2+}	17
1.4. Esquema de la Tesis	18
2. Método de clasificación de experimentos de observación de señales de Ca^{2+}	20
2.1. Resumen	20
2.2. Marco general y motivación	21
2.3. Tres tipos de experimentos en condiciones estacionarias	24
2.3.1. Procesamiento de imágenes y presentación de resultados	24
2.4. Modelo de fluctuaciones de la fluorescencia	25
2.5. Imágenes numéricas simuladas y estimación de la relación señal-ruido esperada durante eventos de liberación de Ca^{2+}	28
2.5.1. Distribución determinista de <i>dye</i> ligado a Ca^{2+} en presencia de una fuente localizada.	29
2.5.2. Distribución de la fluorescencia simulada con ruido realista y estimación de la relación señal-ruido.	29
2.6. Descripción general del método de clasificación	31

2.7.	Aplicación del método a tres configuraciones experimentales	32
2.7.1.	Análisis de las fluctuaciones en experimentos con $[F4]_T = 36\mu M$ y $[E]_T = 90\mu M$	32
2.7.2.	Análisis de las fluctuaciones en experimentos realizados con Rhod-2	35
2.7.3.	Simulaciones numéricas para estimar la relación señal-ruido esperada y establecer clases de equivalencia	39
2.8.	El modelo como herramienta para elegir parámetros experimentales adecuadamente	41
2.9.	Discusión y conclusiones	43
2.9.1.	Tests de autoconsistencia del método	45
2.9.2.	Relación señal-ruido estimada con el método	47
2.9.3.	Información adicional que puede inferirse con el método	47
3.	Efecto de las condiciones experimentales sobre las señales de Ca^{2+} evocadas y su observación	50
3.1.	Resumen	50
3.2.	Métodos	51
3.3.	Resultados	52
3.3.1.	El efecto de EGTA sobre las propiedades de los <i>puffs</i>	52
3.3.1.1.	Experimentos: se observan <i>puffs</i> con un crecimiento de la fluorescencia más rápido para cantidades más grandes de $[E]_T$	52
3.3.1.2.	Simulaciones numéricas: el efecto al variar $[E]_T$ en <i>CaE</i> o <i>CaD</i> sobre la liberación de Ca^{2+} y en el acoplamiento de RIP_3s dentro del <i>cluster</i>	55
3.3.2.	Comparación de las propiedades de los <i>puffs</i> con dos fluoróforos de distinta cinética	56
3.3.2.1.	Distribución de amplitudes, cinética y ancho de los <i>puffs</i>	57
3.3.2.2.	Imágenes de Ca^{2+} realistas generadas numéricamente . .	59
3.3.2.3.	En los experimentos realizados con un <i>dye</i> lento y rela- tivamente baja $[E]_T$ no se observan <i>puffs</i> con alta tasa de crecimiento de la amplitud	61
3.4.	Discusión	63
3.4.1.	Comparación de las propiedades de los <i>puffs</i> obtenidos en los tres tipos de experimentos explorados	65
3.4.2.	Las distribuciones de tasa de crecimiento de la amplitud de los <i>puffs</i> coincide luego de recortar los eventos de tasa de crecimiento más grande	66
3.4.3.	Los tres tipos de experimentos difieren en su capacidad de alterar el CICR entre <i>clusters</i> de RIP_3s	67
3.4.4.	Distintos tipos de experimentos evocan distintos tipos de señales debido a su diferente capacidad para atrapar Ca^{2+}	68
3.4.5.	Los distintos tipos de señales observados en los distintos tipos de experimentos permiten inferir información sobre la arquitectura de los <i>clusters</i> de RIP_3 en los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	69
4.	La competencia entre dos indicadores de calcio permite estudiar cómo las moléculas que atrapan calcio remodelan las señales	70

4.1.	Resumen	70
4.2.	Métodos	72
4.2.1.	Simulaciones numéricas	72
4.2.1.1.	Determinación de una función creciente con la corriente de Ca^{2+} que subyace a un evento independientemente de la concentración de <i>dye</i> utilizada.	72
4.2.2.	Experimentos y procesamiento de datos.	74
4.2.2.1.	Estimación del Ca^{2+} basal	74
4.2.2.2.	Derivación de funciones de la corriente de Ca^{2+} a partir de la fluorescencia observada.	75
4.3.	Resultados	76
4.3.1.	Rhod-2 como un <i>buffer</i> lento	76
4.3.2.	Fluo-4 como un <i>buffer</i> rápido	79
4.3.3.	Comparación de la liberación de Ca^{2+} para diferentes tipos de experimentos	81
4.3.4.	Posibles causas del aumento de la liberación de Ca^{2+} al aumentar $[R2]_T$	85
4.3.5.	Cambios en la concentración de calcio basal, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}$	90
4.3.6.	Competencia entre Fluo-4 y Rhod-2	92
4.4.	Discusión	94
5.	Del ovocito al huevo maduro: ¿cómo dependen las señales de Ca^{2+} de la distribución espacial de los $\text{RIP}_{3\text{s}}$?	101
5.1.	Resumen	101
5.2.	Métodos	103
5.2.1.	Experimentos	103
5.2.2.	Análisis de las imágenes	103
5.2.3.	Simulaciones numéricas	103
5.3.	Resultados	104
5.3.1.	Experimentos	104
5.3.2.	Simulaciones	111
5.4.	Discusión	115
6.	Conclusiones	122
A.	Métodos	130
A.1.	Métodos experimentales	130
A.1.1.	Preparación de los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	130
A.1.2.	Técnica de microscopía	131
A.1.2.1.	Modos de adquisición	131
A.1.2.2.	Separación de líneas espectrales de emisión	132
A.1.3.	Procesamiento de imágenes de señales de Ca^{2+}	132
A.1.3.1.	Caracterización de los <i>puffs</i>	133
A.1.3.2.	Caracterización de las ondas.	134
A.1.4.	Análisis estadístico	134

A.1.5. Pre-procesamiento de imágenes en ovocitos de <i>Xenopus</i>	135
A.2. Simulaciones numéricas deterministas	136
A.3. Simulaciones numéricas estocásticas	139
A.3.1. Dinámica del CICR dentro del <i>cluster</i>	139
A.3.2. Dinámica del CICR entre <i>clusters</i>	140
B. Modificación del microscopio para la fotólisis de compuestos enjaulados	143
C. Protocolos utilizados en los ovocitos de rana de <i>Xenopus laevis</i>	145
C.1. Colagenización	145
C.2. Microinyección	146
C.3. Soluciones utilizadas	147
D. Intervalos de confianza de los ajustes	149
D.1. Capítulo 3	149
D.2. Capítulo 6	151
E. Abreviaturas utilizadas	153
Bibliografía	154

Capítulo 1

Introducción

1.1. Motivación biológica

1.1.1. Iones de calcio como mecanismo de señalización celular

Las células están rodeadas por una membrana plasmática (MP), la cual actúa como una barrera selectiva. Sin la presencia de una membrana, la célula no podría mantener su integridad como un sistema químico coordinado. La estructura de la membrana es en forma de bicapa lipídica. Está formada por moléculas fosfolipídicas anfipáticas, esto es, tienen una parte que es hidrofóbica (insoluble en agua) y otra hidrofílica (soluble en agua). Le permite a la célula concentrar los nutrientes y, a su vez, retener los productos que sintetiza para su uso propio. Por esto, la célula necesita energía que le llega desde el medio extracelular, en el caso de células animales, contenida en nutrientes que atraviesan el contorno celular [Alberts et al. (2008)]. Una de las características fundamentales de las células vivas es su habilidad para mantener, en estado estable, una concentración iónica desigual entre los medios extra e intracelular. Tanto el medio extra como intracelular consisten, entre otras cosas, en un soluto acuoso con sales disueltas (como NaCl, KCl que se disocian en iones Na^+ , K^+ , Cl^-) [Ramón Latorre, José López-Barneo, Francisco Bezanilla (1996)]. Insertos dentro de la membrana se encuentran lípidos y proteínas. Estas últimas son las encargadas de transportar específicamente moléculas desde un lado a otro de la membrana. Existen dos tipos principales de proteínas de membrana. En algunos casos, las sustancias se transportan uniéndose a proteínas transportadoras o *carriers* que cambian su conformación para permitir la transferencia a través de la membrana. En el caso del transporte de iones, éstos también pueden pasar a través de poros hidrofílicos denominados canales iónicos que atraviesan la bicapa. Un canal iónico es una proteína que cambia su conformación pasando de cerrado a abierto para permitir el paso selectivo de iones. Este último tipo de transporte ocurre a favor del gradiente

electroquímico del ión y, por tanto, no consume energía. Existen otras proteínas en las que el transporte iónico se realiza contra su gradiente electroquímico. Esto se realiza mediante intercambiadores que transportan más de una sustancia a la vez (una a favor de su gradiente y otra en contra) o de bombas. Esta última forma de transporte es activa y requiere el consumo de energía procedente del metabolismo energético celular. El transporte a través de canales es mucho más rápido y es siempre pasivo [Keener, Sneyd (1998)].

El ión calcio (Ca^{2+}) es un mensajero intracelular de suma importancia para muchas funciones celulares. Juega un rol importante en la contracción muscular, en la fisiología cardíaca, en la adaptación de foto receptores, en la sinapsis neuronal, en la fecundación y, en la formación de huesos entre otros. Una característica importante del Ca^{2+} es que la célula no puede producirlo ni destruirlo, sino únicamente controlar sus concentraciones intracelulares usando como fuente principal de Ca^{2+} el medio extracelular. Las células disponen de diversos mecanismos para controlar con mucha precisión los niveles de Ca^{2+} intracelular. Hay que tener en cuenta que una permanencia prolongada de altas concentraciones de calcio citosólico lleva a la muerte celular o apoptosis [Berridge et al. (1998)]. En condiciones fisiológicas se estima que la concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) en el citosol es del orden de 50 nM. La $[\text{Ca}^{2+}]$ es mucho más elevada en el medio extracelular (~ 1 mM) y dentro de los reservorios internos (~ 1 μM). Entonces los mecanismos por los cuales controlan la concentración de Ca^{2+} son centrales en la fisiología celular.

Frente a distintos estímulos, canales de Ca^{2+} ubicados en la membrana plasmática o en la del retículo endoplasmático (RE) pueden abrirse permitiendo el ingreso de Ca^{2+} al citosol elevando así la concentración citosólica. Esta elevación induce otros cambios en la célula y constituye lo que llamamos una señal de Ca^{2+} . Las respuestas generadas por estas señales dependen de la distribución espacio-temporal del Ca^{2+} citosólico. La contracción muscular es un ejemplo de esto. Las elevaciones espacialmente restringidas cerca de la membrana plasmática activan canales de potasio que causa la relajación del músculo. Cuando el Ca^{2+} aumenta globalmente, el músculo se contrae [Berridge et al. (1998)]. En este ejemplo hay liberación de Ca^{2+} a través de un canal ubicado en la membrana del retículo sarcoplasmático (RS), el receptor de rianodina (RyR). En esta Tesis estamos interesados en la liberación a través de canales receptores de inositol (1,4,5)-trifosfato (RIP_3 por las siglas en inglés) que se encuentran predominantemente en células no musculares ubicados en la membrana del RE con algunas propiedades similares a los RyR [Busa et al. (1985); Choe, Ehrlich (2006); Foskett et al. (2007); Lechleiter, Clapham (1992)].

Cuando un canal de Ca^{2+} se abre, aumenta la concentración de Ca^{2+} se agrupa cerca de la entrada y luego, cuando el canal se cierra, se disipa rápidamente por difusión. Este

tipo de señales localizadas representa los eventos de liberación elementales [Berridge et al. (1998)]. Las señales de Ca^{2+} están construidas a partir de estas elevaciones locales y breves. Las señales elementales tienen dos funciones. Por un lado, pueden activar procesos celulares altamente localizados en la vecindad de los canales. Por otro lado, pueden dar lugar a señales espacialmente más extendidas induciendo la apertura de otros canales de Ca^{2+} a través del fenómeno conocido como liberación de calcio inducida por calcio (*calcium induced calcium release* o CICR) [Callamaras et al. (1998)]. En particular, los RIP_3s pueden ser reclutados de este modo debido a que la probabilidad de apertura depende de Ca^{2+} como explicaremos más adelante. A su vez, si las células están conectadas, las ondas intracelulares generadas por CICR pueden propagarse a células vecinas y convertirse en una onda intercelular en los tejidos [Berridge et al. (1998)].

1.1.2. Mecanismos para controlar la concentración intracelular de Ca^{2+}

El influjo de iones de Ca^{2+} al citoplasma se produce básicamente por dos vías: a través de la apertura de canales situados en la membrana plasmática que separa el medio extracelular del intracelular o mediante la liberación desde los reservorios internos. Existen varios tipos de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática: en algunos la apertura es controlada por la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana (importantes en la generación de oscilaciones rápidas en células cardíacas y en los mecanismos de comunicación neuronal en la célula pre-sináptica), o los canales que se activan cuando el nivel de Ca^{2+} almacenado en los depósitos intracelulares disminuye [Grafton, Thwaite (2001)], en otros por la unión de un ligando externo (como los receptores de NMDA presentes en la sinapsis de algunas neuronas), y en otros es incluso controlada por estímulos mecánicos. Con respecto a la liberación desde reservorios internos, ésta se produce principalmente a través de los RyR y los RIP_3s ya mencionados.

Para remover el Ca^{2+} citosólico existen proteínas especializadas que bombean Ca^{2+} hacia el exterior de la célula o reinsertándolo en los reservorios internos. Ambos métodos requieren un gasto de energía ya que implican el transporte de una sustancia contra su gradiente de concentración. Ejemplos del primer tipo son el intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, que usa la energía electroquímica almacenada en el gradiente de sodio a expensas de la entrada de iones Ca^{2+} o la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), que consume energía entregada por la hidrólisis de las moléculas de ATP. En ovocitos el mecanismo más importante lo constituye la Ca^{2+} -ATPasa del RE (bomba SERCA por sus siglas en inglés), que recaptura iones de Ca^{2+} presentes en el citosol hacia el retículo endoplasmático [Berridge et al. (1998); Keener, Sneyd (1998)].

La forma más rápida de reducir la concentración citosólica de Ca^{2+} es proporcionada por sustancias llamadas *buffers*, que son grandes proteínas que ligan Ca^{2+} y están presentes en la mayoría de los tipos de células. Estos *buffers* de Ca^{2+} lo atrapan con diferentes afinidades y cinéticas, se estima que el 99% del calcio citoplasmático total se encuentra ligado a *buffers*. Estas sustancias controlan tanto la concentración de Ca^{2+} como su escala espacial de difusión. Proteínas de este tipo también están presentes dentro de los reservorios internos. En la Figura 1.1 se esquematizan algunos de los mecanismos para controlar la concentración intracelular de Ca^{2+} . Por ende, la concentración de este ión libre resulta de la combinación de todos estos aportes.

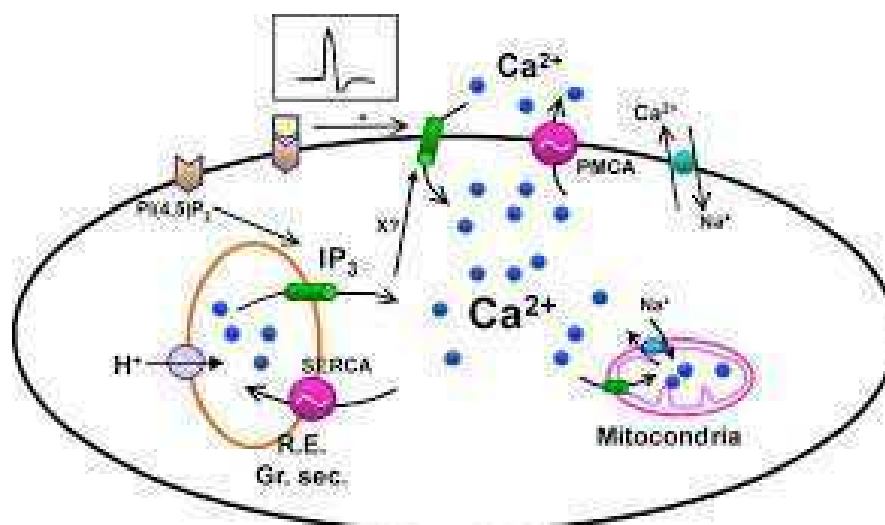


Figura 1.1: Diagrama de algunos de los mecanismos involucrados en el control de la concentración de calcio citosólico. Entrada de calcio al citosol: desde los depósitos intracelulares (RE) mediante IP_3 o abriendo canales de calcio de la membrana plasmática, bien por variaciones del potencial de membrana, por la unión de un ligando externo o por estímulos mecánicos. Remoción de calcio del citosol: mediante bombas o intercambiadores de la membrana plasmática (PMCA, Na^+ - Ca^{2+}) o mediante bombas de los depósitos (SERCA). El llenado de los depósitos requiere la presencia de protones (H^+) en su interior. Otras organelas, como las mitocondrias, también pueden captar Ca^{2+} .

1.1.3. Señales de Ca^{2+} mediadas por canales receptores de IP_3

El receptor de IP_3 es un canal intracelular de liberación de Ca^{2+} activado por ligando que juega un papel central en la modulación de la concentración citoplásmica de Ca^{2+} . Los receptores están distribuidos irregularmente en la superficie del RE (paralela al plano de la membrana) en una gran cantidad de tipos celulares con un espaciado promedio de unos pocos micrómetros [Callamaras, Parker (1999); Callamaras et al. (1998); Parker et al. (1996b)]. En particular, en muchos casos están organizados en cúmulos o *clusters*.

La existencia de *clusters* fue puesta en evidencia en experimentos de microscopía que revelaron que las liberaciones de Ca^{2+} sensibles a IP_3 ocurren en sitios intracelulares discretos. Se estima que estos sitios están formados por *clusters* de receptores de IP_3 activos, cuyo tamaño es de alrededor de 500 nm de lado [Parker et al. (1996a); Parker, Yao (1991); Smith et al. (2010); Swillens et al. (1999)].

En presencia de IP_3 , los RIP_3s poseen características moleculares que les permiten ser modulables por Ca^{2+} , de modo que el receptor activado en presencia de bajos niveles de Ca^{2+} incrementa la probabilidad de apertura del canal, mientras que altos niveles de Ca^{2+} disminuyen su probabilidad de apertura. Este comportamiento pone en evidencia que hay al menos dos sitios de ligadura para Ca^{2+} en los RIP_3 , uno, de mayor afinidad, que induce la apertura del canal y otro, de menor, que induce su cierre. Entonces, el Ca^{2+} liberado a través de un canal único de IP_3 en un *cluster* difunde hacia los canales vecinos induciendo su apertura. Esta modulación por Ca^{2+} da lugar al fenómeno CICR ya mencionado [Mak et al. (1998); Yao et al. (1995)].

Los efectos estimulatorios e inhibitorios del Ca^{2+} citosólico en la actividad de los RIP_3s , junto con la organización en *clusters* de los RIP_3s , son cruciales para establecer los patrones de liberación de Ca^{2+} que se observan [Marchant, Callamaras (1999)]. A bajas concentraciones de IP_3 ($[\text{IP}_3]$), las unidades de liberación individuales funcionan autónomamente, generando eventos de liberación locales [Parker, Yao (1991); Sun et al. (1998); Yao et al. (1995)]. Altas $[\text{IP}_3]$ sensibilizan los sitios de liberación vecinos, de forma que el citoplasma actúa como un medio excitable en el cual las ondas de Ca^{2+} se propagan con sucesivas “olas” de CICR [Callamaras et al. (1998); Parker et al. (1996a)]. Como ejemplo de este comportamiento, en la Figura 1.2¹ se muestra un resultado de [Mak et al. (1998)], en donde grafican las curvas de probabilidad de apertura de los canales en función de la $[\text{Ca}^{2+}]$, para distintas $[\text{IP}_3]$.

¹Imagen extraída de Mak et al. (1998)

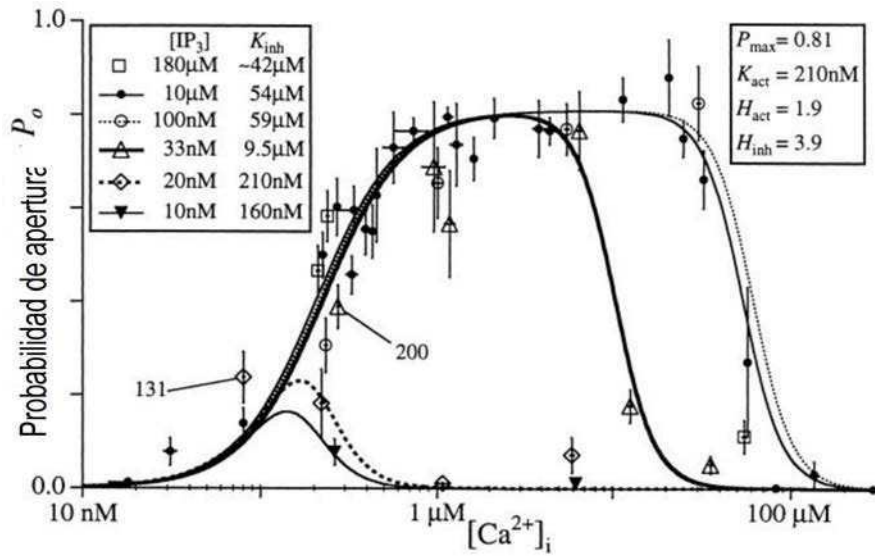


Figura 1.2: Probabilidad de apertura de los RIP₃s en función de la concentración de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) para distintas concentraciones de IP₃ ([IP₃]).

En células intactas, el IP₃ se genera como respuesta a un cierto estímulo, mediante la hidrólisis de fosfolípidos que se encuentran localizados en la membrana plasmática. Posteriormente, difunde en la célula actuando junto con el Ca²⁺ libre para inducir la apertura de los RIP₃s (Figura 1.3).

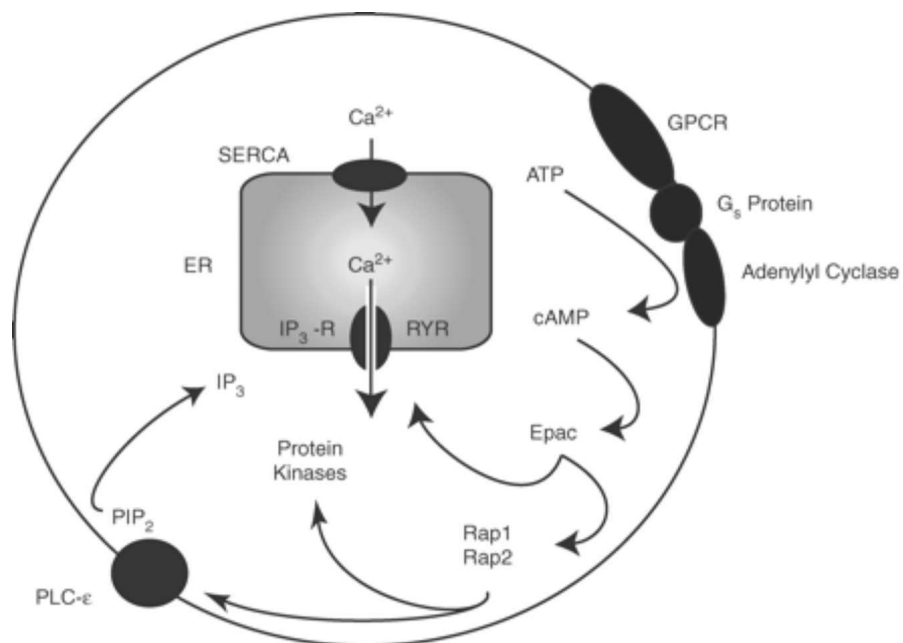


Figura 1.3: Esquema de la producción de IP₃ en la célula, apertura de un RIP₃, y la posterior liberación de Ca²⁺.

1.2. Observación de señales de Ca^{2+}

1.2.1. Indicadores fluorescentes

El método más utilizado para estudiar el rol del Ca^{2+} en los procesos celulares específicos es el uso de indicadores de calcio (o *dyes*) para obtener imágenes de fluorescencia con métodos ópticos. La habilidad para detectar y caracterizar señales intracelulares de Ca^{2+} tiene una estrecha relación con la disponibilidad de los indicadores fluorescentes y de las sucesivas mejoras en las técnicas ópticas, permitiendo la mejora de la resolución espacial y temporal [Paredes et al. (2008)].

Existen indicadores que emiten luz cuando ligan Ca^{2+} y que interactúan únicamente con los iones libres. Se clasifican en dos tipos de indicadores: proteínas fluorescentes genéticamente codificadas y fluoróforos químicos. Los indicadores químicos son los más utilizados porque están optimizados para la investigación del Ca^{2+} en el citosol y en las organelas celulares [Nuccitelli, Biology. (1994)].

Se encuentra disponible comercialmente un amplio rango de indicadores con diversas afinidades. Los más comunes se separan en dos categorías: con intensidad modulable por longitud de onda única (SW de single-wavelength) o doble (llamados radiométricos). Para los indicadores SW, cambios en la concentración de Ca^{2+} generan cambios en la intensidad de la fluorescencia de los espectros de excitación y emisión. Como el único monitoreo experimental relacionado con la $[\text{Ca}^{2+}]$ está dado por la intensidad con una única longitud de onda, estos *dyes* no permiten la medición directa de la concentración de Ca^{2+} [Paredes et al. (2008); Takahashi et al. (1999)]. Los cambios en la intensidad que no provienen de cambios en $[\text{Ca}^{2+}]$ pueden confundir la interpretación de los datos. Los indicadores radiométricos cambian los máximos de longitud de onda, tanto para las curvas de emisión como de excitación al ligar Ca^{2+} .

Los indicadores SW generalmente son sustancias que ligan Ca^{2+} de forma análoga a como lo hacen los *buffers*, pero poseen la propiedad de modificar su espectro de emisión de luz dependiendo de si tienen o no iones de Ca^{2+} ligados y están optimizados para la excitación en longitudes de onda producidas en la iluminación por láser. Una de las mayores ventajas es que no se ven afectados por la luz UV por lo que pueden utilizarse con compuestos enjaulados que se fotolizan con este tipo de luz como explicaremos más adelante. Un ejemplo de estos indicadores son Fluo-3 y Calcium Green. Han sido utilizados para observar señales de Ca^{2+} y su posterior caracterización en una gran variedad de publicaciones [Parker et al. (1996b); Yao et al. (1995)]. Presentan un cambio importante en la intensidad de emisión al ligar Ca^{2+} (de 40 a 100 veces). Fluo-4 es un derivado del fluo-3 más fotoestable y con mayor intensidad de fluorescencia. El hecho de que sea más

luminoso para una menor concentración de indicador tiene como consecuencia una menor toxicidad y tiempos de incubación más cortos. Rhod-2 es un indicador que incorpora cromóforos del tipo rodamina y por esto se excita a una longitud de onda mayor que el Fluo-4.

Como ejemplo se presenta en la Figura 1.4 el espectro de absorción y emisión del indicador Fluo-4 cuando presenta Ca^{2+} ligado. El Fluo-4 pertenece a la clase de indicador estudiado en este trabajo. El espectro de emisión del *dye* sin Ca^{2+} ligado es mucho menos intenso. Al ligar Ca^{2+} y ser excitado con fotones de longitudes de onda dentro de su espectro de absorción, el indicador fluoresce emitiendo fotones con un espectro de emisión como el que se muestra en la Figura.

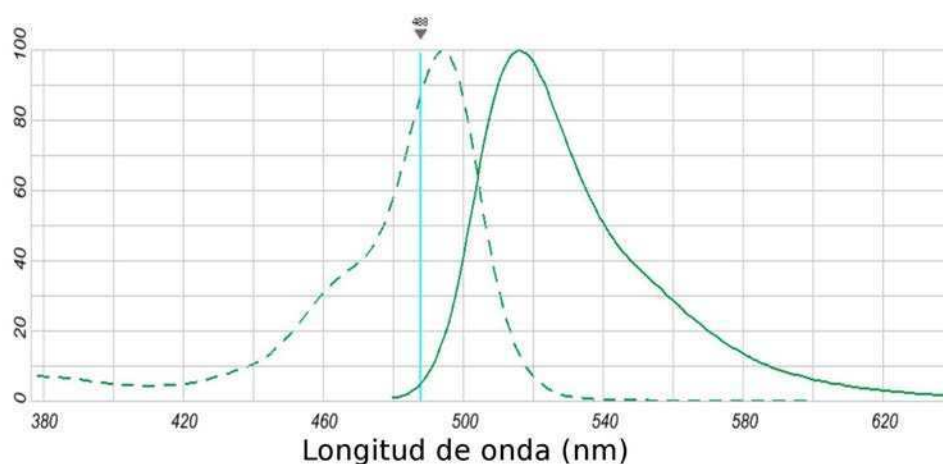


Figura 1.4: Espectro de excitación y emisión del indicador de Ca^{2+} Fluo-4 (Invitrogen Molecular Probes) con Ca^{2+} ligado. Indicado con una línea vertical se especifica la línea láser utilizada. El sombreado indica el rango de longitudes de onda sugerido para su detección.

La mayor desventaja de los indicadores químicos es que la localización en las organelas no puede controlarse fácilmente. Aún más, tienden a estar compartimentados y hasta pueden ser desechados de la célula en experimentos largos. Para resolver este problema se generaron indicadores dextranos que permiten medir durante tiempos prolongados. Son biopolímeros con moléculas fluorescentes. La principal desventaja viene dada por el hecho de que son aniones policarboxilatos que no pueden cruzar la bicapa lipídica de la membrana. Entonces, no son permeables a la membrana y necesitan ser cargados en la célula mediante técnicas invasivas como la microinyección [Nuccitelli, Biology. (1994)].

A su vez, los indicadores químicos de Ca^{2+} actúan como *buffers* y como consecuencia modifican tanto los niveles de Ca^{2+} libre, como la cinética espacio-temporal de las señales de Ca^{2+} . Es por este motivo que se debe tener cuidado tanto en las características espectrales como en las propiedades de unión del indicador. Los indicadores de baja

afinidad son buenos para obtener señales de amplitud grande. Son capaces de evadir la saturación reduciendo el efecto de capturar Ca^{2+} libre, pero es a costa de la intensidad de la señal. En cambio, los eventos pequeños de liberación de Ca^{2+} son monitoreados de forma más eficiente mediante el uso de indicadores de alta afinidad [Dargan et al. (2006); Paredes et al. (2008)].

Los experimentos y las simulaciones numéricas muestran que la amplitud de la fluorescencia está relacionada de forma no lineal con el incremento en el Ca^{2+} libre incluso si el *dye* no está saturado como se ha observado previamente en [Cao et al. (2013); Solovey et al. (2011)]. Para estos *dyes* de longitud de onda única las variaciones de fluorescencia durante las señales de Ca^{2+} son presentadas como un cociente respecto de la fluorescencia basal (antes de que se produzca la señal). Esto es, las variaciones de fluorescencia se muestran como la relación de la ecuación 1.1.

$$\Delta F_R(x_i, t_j) = \frac{F(x_i, t_j) - F_0(x_i)}{F_0(x_i)} \quad (1.1)$$

donde $F(x_i, t_j)$ es la fluorescencia en el punto de la imagen identificado por la posición x_i y el tiempo t_j , y $F_0(x_i)$ es la fluorescencia en el punto espacial, x_i , promediada en el tiempo antes de que ocurra la evocación de la señal. Esto minimiza los artefactos que pueden introducir la heterogeneidad espacial debido a distribución desigual de *dye*, el espesor de la muestra o la intensidad de la iluminación y permite una comparación directa de toda la imagen.

1.2.2. Compuestos enjaulados

La técnica experimental de fotolización de compuestos enjaulados es muy importante para generar cambios rápidos en la concentración de moléculas señalizadoras [Adams et al. (1993)]. Esta técnica utiliza moléculas biológicamente activas que son sintetizadas mediante una unión covalente a un grupo fotosensitivo que las inactiva. Esta es la causa de que en condiciones normales estos compuestos se encuentren inactivos y luego, cuando se iluminan con luz ultravioleta, se activen. Por otro lado, los “flashes” de fotólisis generan estímulos controlados y reproducibles con los cuales analizar los fenómenos fisiológicos que dependen de rápidos cambios de concentración. Este mecanismo es utilizado en conjunto con indicadores que se excitan por fotones de larga longitud de onda para observar las consecuencias de los estímulos.

Entre los compuestos bioquímicos que están comercialmente disponibles en forma enjaulada se encuentra el IP_3 , que ha resultado muy usado en una gran variedad de experimentos [Callamaras et al. (1998); Marchant, Callamaras (1999); Parker et al. (1996b); Sun et al. (1998); Yao et al. (1995)]. Tiene la ventaja de permitir elevaciones rápidas

de [IP₃] evitando el tiempo de retraso y modulación asociada a la producción de IP₃ activo. Su utilización permite observar mayor cantidad de eventos en menor tiempo. De esta forma, no sólo se puede aumentar el número de eventos para hacer una estadística, también permite tener ciertos parámetros controlados en la medición para una posterior caracterización.

1.2.3. Microscopía confocal

Para la observación de las señales de Ca²⁺ en ovocitos, se ha empleado hasta ahora principalmente la microscopía láser confocal. En épocas previas al uso de esta microscopía la observación de especímenes ha estado limitada debido a los grosores variables y a la transmisión y reflexión de la luz de manera no uniforme. Las áreas fuera del plano focal degradaban la imagen haciéndola borrosa, disminuyendo el contraste y la resolución, dificultando así la observación de las estructuras que componen un espécimen. Las ventajas que ofrece la microscopía confocal frente a la microscopía tradicional son imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución lateral y axial. Esta técnica posibilita la obtención de “secciones ópticas” de la muestra, lo que permite su estudio tridimensional.

El principio de la microscopía confocal fue patentado en 1957 por Minsky. Los primeros microscopios basados en esta técnica que demostraron su validez fueron descritos en [Petráñ et al. (1968)] y su aceptación y gran desarrollo tuvo lugar recién con el desarrollo del láser [Pawley (2006); Wilson et al. (1984)].

La microscopía confocal se basa en eliminar el velo que, en una imagen de microscopía óptica normal, producen las regiones que se encuentran fuera del plano de foco. Para esto, se hace pasar la luz que incide sobre la muestra por un pequeño agujero o ranura y se enfoca en el plano de la imagen de un objetivo de gran apertura numérica. De esta manera, la luz que es reflejada por el punto que se encuentra en el plano focal del objetivo, regresa al mismo, es reenfocada y transmitida a su vez por un pequeño agujero o ranura sin ninguna pérdida. En cambio, la luz dispersada o emitida por los puntos que se encuentran fuera del plano de la imagen es atenuada o bloqueada completamente. De esta manera, se obtiene una imagen de alto contraste y definición de un punto en el plano focal, sin que haya una contribución significativa de las regiones que se encuentran fuera de foco (Figura 1.5) ². Debido a que las aperturas tanto de la iluminación como del retorno de la imagen tienen un foco común, se ha denominado este tipo de microscopios como microscopio confocal. Puede resumirse su función diciendo que la microscopía confocal se basa en mejorar la relación entre la señal y el ruido de la imagen. También

²Imagen extraída de <http://www.uninet.edu/conganat/autores/trabajos/T077/>

permite estudiar los especímenes usando luz transmitida o reflejada, ello implica que se puedan estudiar muestras que, por su grosor o por sus características, no son transparentes. Esto ha permitido que se desarrollen nuevas técnicas de preparación de los especímenes a observar, las cuales no implican el corte en rebanadas delgadas como se hacía anteriormente, ampliando así significativamente las posibilidades de estudiar las relaciones estructura-función, ya sea a nivel uni o multicelular.

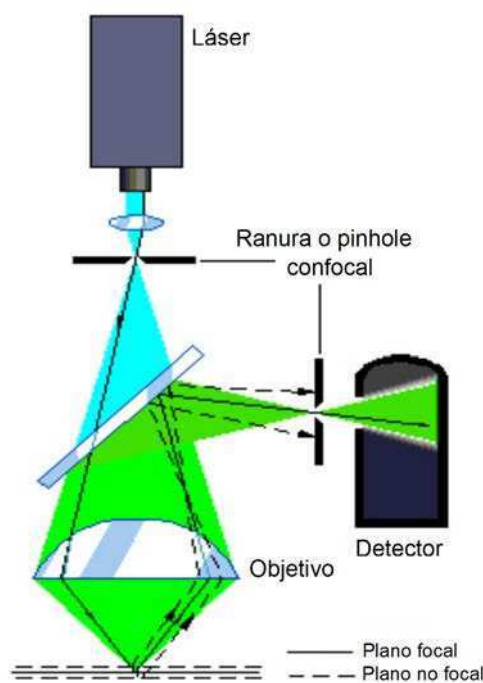
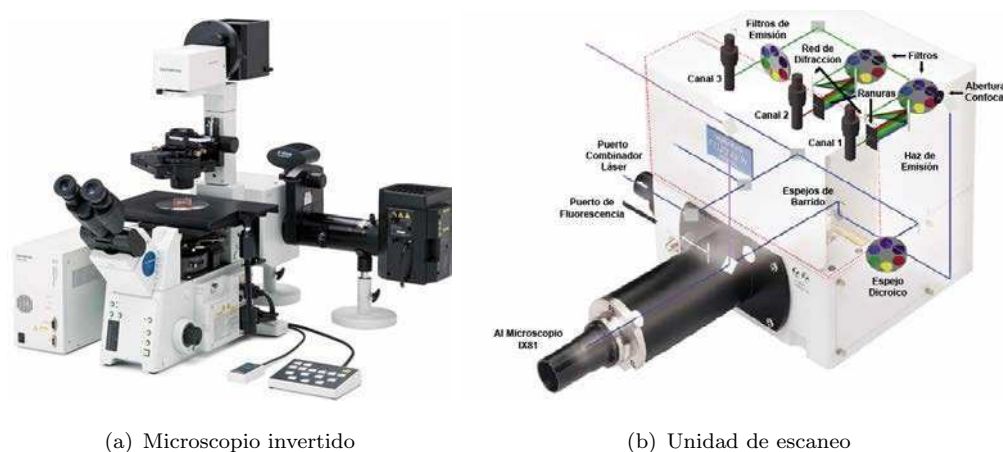


Figura 1.5: Esquema ilustrando los principios de la microscopía confocal.

Los posibles modos de adquisición son, entre otros, los de pantalla completa (frame) y el escaneo constante sobre una línea (linescan). La mayoría de los microscopios confocales pueden adquirir hasta 1 o 2 frames por segundo. Sin embargo, esto resulta muy lento para resolver los cambios dinámicos en la concentración de Ca^{2+} intracelular, que típicamente ocurren en una escala temporal de 10 ms. En cambio, el modo linescan permite obtener imágenes más rápidas (sólo debe escanear una línea de toda la imagen) y con una mejor resolución temporal. Otra de las ventajas de este modo de adquisición radica en que los archivos de datos que se obtienen como resultado son bastante compactos y toda la información espacio-temporal se desprende fácilmente de los perfiles de las señales. La principal desventaja viene de la mano de la limitada información espacial como consecuencia del escaneo en una pequeña región respecto de la muestra total, así como de la incerteza con respecto a si la señal localizada que se observa realmente es originada en la región en la que se hace linescan [Dargan et al. (2006)].

En el Laboratorio de Microscopía y Microespectroscopía se dispone de un microscopio confocal Olympus FluoView 1000. El microscopio tiene una unidad de escaneo espectral (denominada Spectral Scan Unit) conectada a un microscopio invertido IX81 (Figura 1.6)³. Otro módulo tiene los láseres que se usan para excitar las células con microscopía confocal. Una lámpara de mercurio externa Olympus (100W) es utilizada para la adquisición convencional. El microscopio tiene introducida una modificación para fotolizar compuestos enjaulados con la misma lámpara de mercurio (Apéndice B), y fue realizada por integrantes del grupo [Sigaut et al. (2011)]. Permite realizar la fotolización de los compuestos enjaulados en áreas grandes y simultáneamente, obtener imágenes de fluorescencia. El sistema permite modificar durante el experimento parámetros como el tiempo de exposición o la intensidad de los pulsos de UV y, a su vez, estos pulsos pueden ser sincronizados con la adquisición linescan. En [Sigaut et al. (2011)] mostraron que cuanto más largo es un pulso de UV, mayor es la cantidad de Ca^{2+} liberado, existiendo una relación lineal entre ambos.



(a) Microscopio invertido

(b) Unidad de escaneo

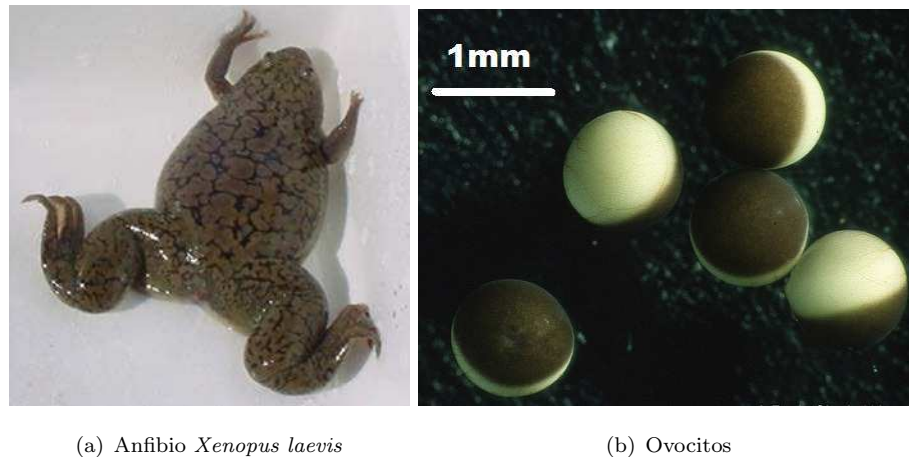
Figura 1.6: Elementos que componen el microscopio confocal.

1.3. Ovocitos de *Xenopus laevis*

Xenopus laevis es una especie de anfibio originario de África (Figura 1.7(a)) y es usada por diversos motivos como un sistema ventajoso en varias investigaciones experimentales biológicas. Entre las ventajas que presentan sus ovocitos (Figura 1.7(b)) están su tamaño relativamente grande, que permite inyectar los compuestos sin necesidad de usar variantes permeables, y la facilidad en el control de la concentración de IP_3 para disparar las señales de Ca^{2+} [Dargan et al. (2006)]. Tienen un diámetro medio del orden del milímetro, lo cual permite observar un repertorio de señales macroscópicas.

³Imagen extraída del manual del confocal

Los RIP_3 s son los responsables de la liberación desde el RE [Busa et al. (1985); Choe, Ehrlich (2006); Foskett et al. (2007); Lechleiter, Clapham (1992)]. Además, en los ovocitos no se encuentran presentes los canales de Ca^{2+} RyR que suelen interferir con los estudios de los canales receptores de IP_3 . Los canales RIP_3 se encuentran localizados aproximadamente a $6\ \mu\text{m}$ de profundidad respecto de la superficie.

(a) Anfibio *Xenopus laevis*

(b) Ovocitos

Figura 1.7: *Xenopus laevis* y sus ovocitos.

1.3.1. Clasificación de señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 s

La primera vez que se detectaron señales localizadas de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 fue en ovocitos de *Xenopus laevis*, en donde una estimulación con baja $[\text{IP}_3]$ evocaba elevaciones locales de Ca^{2+} , mientras que altas $[\text{IP}_3]$ evocaban la propagación de ondas [Parker, Yao (1991); Yao et al. (1995)]. Hasta la fecha, se han obtenido y estudiado un amplio rango de eventos de liberación de Ca^{2+} en estos ovocitos mediante el uso de la microscopía confocal, en particular, en el modo de linescan.

Los eventos están clasificados según la cantidad de canales involucrados: canales únicos (*blip*), *cluster* de canales (*puff*) u ondas globales (Figura 1.8) ⁴. El término *puff* se refiere al aumento localizado de la fluorescencia, que surge como consecuencia de la liberación desde el RE de iones de Ca^{2+} hacia el citosol a través de los canales receptores de IP_3 [Callamaras et al. (1998); Parker et al. (1996b); Sun et al. (1998)]. Existen eventos similares donde el Ca^{2+} es liberado a través de RyR llamados *sparks* [Cheng et al. (1993)].

⁴<http://www.cellbiol.net/stp/alpobesity4.php>

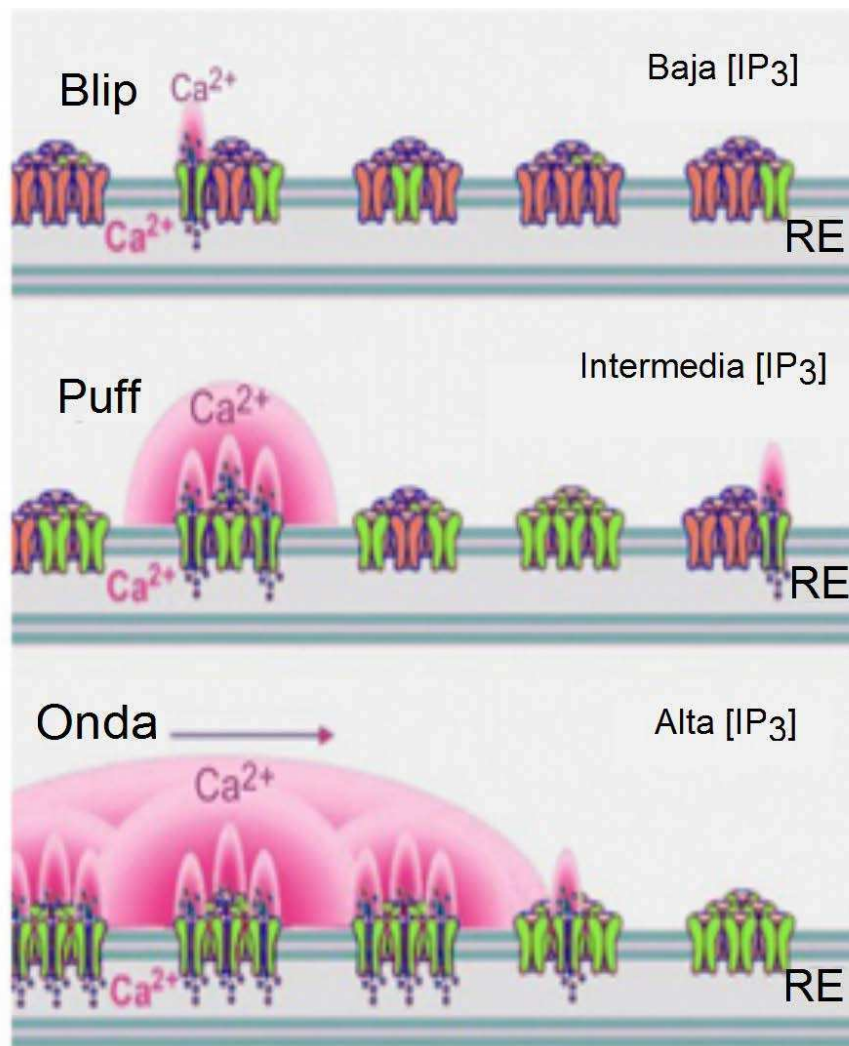


Figura 1.8: Esquema que muestra la actividad de canales y *clusters* de canales modulados por IP₃, en presencia de concentraciones crecientes de dicha sustancia. (Arriba) Para bajas concentraciones, pocos receptores ligan IP₃, entonces la retroalimentación debida al Ca²⁺ liberado por un solo canal está restringida a ese canal, produciendo una señal de Ca²⁺ pequeña y localizada (*blip*). (Medio) Para concentraciones intermedias de IP₃, el Ca²⁺ 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. (Abajo) Altas concentraciones de IP₃ provocan ondas de propagación de calcio mediante el mecanismo de liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (CICR).

En [Sun et al. (1998)] concluyeron que las señales evocadas a una [IP₃] constante forman un continuo de eventos de distintos tamaños y duración variable. De esta forma, la variabilidad de *blip* y *puff* proviene de la variación estocástica, tanto del número de canales reclutados como de la duración de la apertura de los canales [Diambra, Marchant (2011); Smith, Parker (2009)]. Por otro lado, un mismo *cluster* puede dar lugar a *puffs* de distintos tamaños dependiendo del número y de la distribución espacial de los RIP₃s activos que hay en el inicio de la señal [Solovey, Dawson (2010)], dos propiedades que

cambian con el tiempo dado que el IP_3 se pega y despega de los RIP_3 s, por lo que estos receptores entran y salen del estado inhibido [Fraiman et al. (2006)].

Los *puffs* permanecen localizados si los receptores de los *clusters* vecinos no son lo suficientemente sensibles como para responder al Ca^{2+} que difunde en las distancias entre *clusters* [Callamaras, Parker (1999)]. Las propiedades espacio-temporales de los eventos localizados varían dependiendo de las propiedades cinéticas y localización de los canales. Estudiando los distintos tipos de eventos es de esperar que se pueda obtener información sobre las propiedades y de la localización de los canales involucrados. Las respuestas que evocan las señales de Ca^{2+} dependen, a su vez, de la distribución espacio-temporal del ión.

1.3.2. Características durante distintos estadios de maduración.

En los cinco estadios que componen la ovogénesis (Figura 1.9), los ovocitos adquieren características como el diámetro, color de la pigmentación y cantidad de vitelo en el citoplasma. Inmersos en el citoplasma, se encuentran pequeños gránulos de pigmento y gránulos corticales. Tienen la mayor cantidad de vitelo depositado y el pigmento se concentra en un hemisferio. Esto permite diferenciar entre el hemisferio animal (lado oscuro) y hemisferio vegetal (lado claro) [Eppig, Dumont (1974)]. En el hemisferio animal se producen mayor cantidad de eventos de liberación de Ca^{2+} (mediante los RIP_3 localizados en el retículo endoplasmático) que en el hemisferio vegetal [Dargan et al. (2006); Marchant, Parker (2001a)].

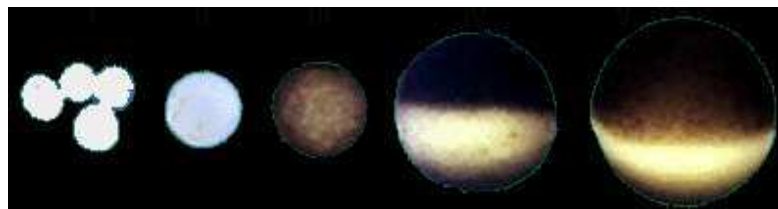


Figura 1.9: Estadios de la ovogénesis.

Los ovocitos completamente crecidos quedan arrestados en la transición G_2/M del ciclo celular. En respuesta a un activador (progesterona en el caso de la rana) entra en la meiosis y se detiene en la metafase II hasta la fecundación [Yamashita et al. (2000)]. Durante la maduración los ovocitos empiezan a cambiar sus características, con manchas blancas en el lado animal o manchas negras en el lado vegetal (Figura 1.10). Aproximadamente entre 3-4 hs después de que ocurre la ruptura de la vesícula germinal (GVBD) se supone que el huevo queda arrestado en la metafase II de la meiosis y la

maduración está completa [Gallo et al. (1995); Sun, Machaca (2004)]. Se habla de ovocito cuando se refiere al ovocito inmaduro y de huevo cuando se refiere al ovocito maduro.



Figura 1.10: Ovocitos maduros.

En el ovocito inmaduro la distancia típica entre canales se cree que es de unos pocos nanómetros, mientras que la distancia entre *clusters* es de unos micrómetros [Callamaras, Parker (1999)]. Sin embargo, la distribución de los RIP_3 y por ende, su proximidad a la membrana plasmática depende del estadio del ovocito, por lo que en un mismo modelo biológico se pueden estudiar las señales de Ca^{2+} generadas por distintas distribuciones geométricas de los receptores de IP_3 . Distintos estudios parecen indicar que los RIP_3 s están distribuidos más uniformemente en el huevo maduro y esto tiene una correlación directa con las señales observadas, que tienden a ser más extendidas espacialmente que en ovocitos inmaduros. Por otro lado, observaciones realizadas a distintas profundidades en ovocitos inmaduros de *Xenopus laevis* mostraron una prevalencia de *puffs* en las cercanías de la membrana plasmática y la evocación directa de ondas en presencia de IP_3 a mayor profundidad.

Durante la maduración se activa la kinasa MPF (factor de promoción de la maduración) que inhibe a la bomba SOCE (que se ubican en la membrana plasmática y entran Ca^{2+} del medio extracelular) [Machaca, Haun (2002)]. La PMCA está localizada en la membrana plasmática pero en los huevos está completamente internalizada y por ende no se puede remover el Ca^{2+} del citosol a través de ella. Para mantener la $[\text{Ca}^{2+}]$ elevada en los huevos se libera Ca^{2+} mediado por RIP_3 s y vuelve a ingresar al RE. Este ciclo le permite a los huevos mantener concentraciones citosólicas de Ca^{2+} elevadas a pesar de que el Ca^{2+} disponible en los reservorios sea limitado [El-Jouni et al. (2005)].

La señal de Ca^{2+} inducida por la fecundación tiene una dinámica espacio-temporal específica y es esencial para activar al huevo e iniciar el desarrollo embrionario [Homa et al. (1993)]. En *Xenopus laevis* se observa una sola liberación de Ca^{2+} que media los pasos tempranos de la activación, incluyendo el bloqueo del espermatozoide [Machaca et al.

(2001)]. El modo de propagación de la onda en los ovocitos es saltatoria pero continua en los huevos [Dawson et al. (1999); Machaca (2004)]. La velocidad de propagación de la onda en los huevos es más lenta que en los ovocitos [El-Jouni et al. (2005)].

1.3.3. Efecto de los *buffers* sobre la dinámica espacio-temporal del Ca^{2+}

Así como las células cuentan con *buffers* que disminuyen la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol, los experimentadores también usan *buffers* exógenos para modificar las señales y observar distintos comportamientos. Para elegir el más apropiado para cada experimento debe tenerse en cuenta la constante de disociación, K_d . Esta constante es igual al valor de la concentración de Ca^{2+} a la cual, en equilibrio, hay una equipartición entre Ca^{2+} libre y Ca^{2+} ligado a *buffer* (CaB).

Entre los *buffers* de Ca^{2+} más populares se tienen EGTA (las siglas en inglés de ethylene glycol tetraacetic acid) y BAPTA (de 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid). Esto se debe a que la constante de disociación a pH neutro es semejante a los niveles intracelulares de Ca^{2+} ($\sim 0.150 \mu\text{M}$). Tienen afinidades similares y, sin embargo, las cinéticas en el ligado de Ca^{2+} son muy distintas. El *buffer* EGTA tiene una velocidad de unión ($K_{on} \sim (3 - 10)\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) lo suficientemente rápida como para unirse a los iones de Ca^{2+} que difunden a distancias micrométricas entre los sitios de liberación, pero demasiado lenta como para afectar la difusión entre RIP_3 s de un mismo *cluster*. Típicamente se agrega este *buffer* en muchos experimentos para estudiar la cinética de los *puffs* [Marchant, Parker (2001b)]. Por otro lado, BAPTA tiene una velocidad de unión mucho más rápida ($K_{on} \sim (100 - 1000)\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), interrumpiendo la difusión dentro de los *clusters* de RIP_3 (Figura 1.11) ⁵ [Dargan, Parker (2003); Nuccitelli, Biology. (1994)].

⁵Imagen adaptada de [Dargan, Parker (2003)]

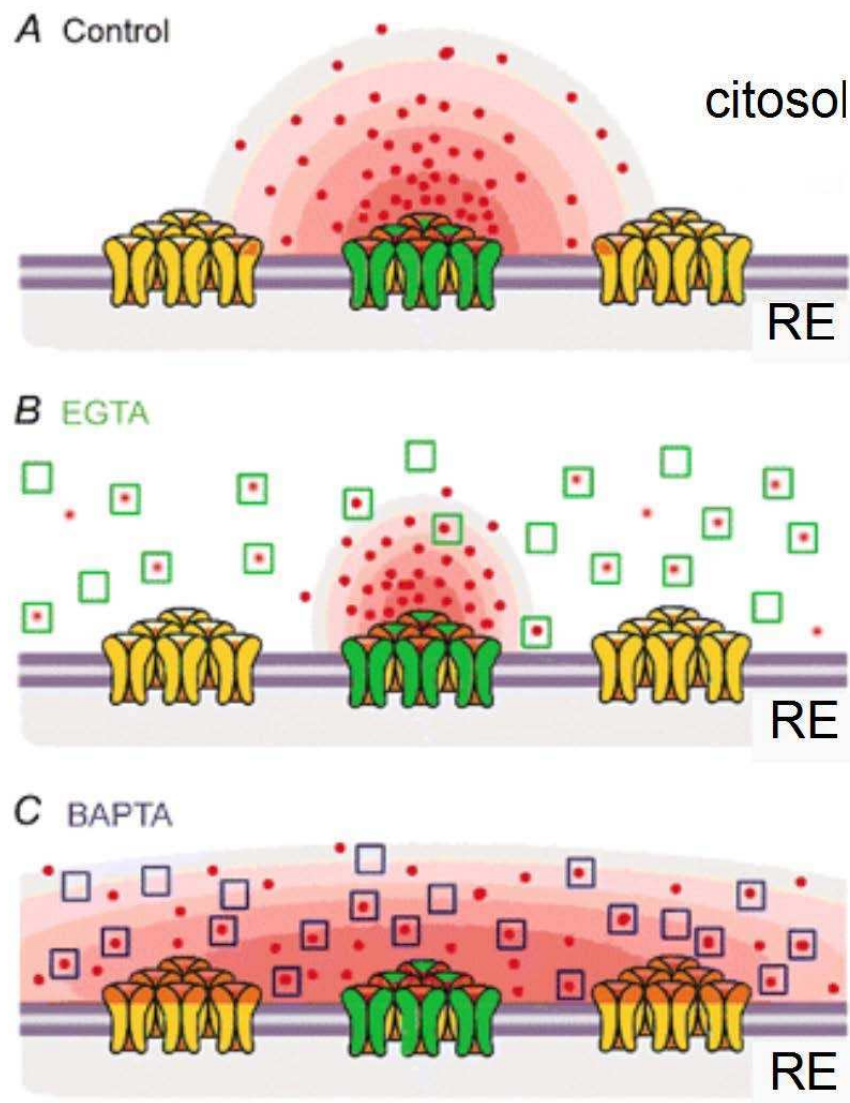


Figura 1.11: Esquema ilustrando la distribución de iones de Ca^{2+} alrededor de los *clusters* de RIP_3 , y como distintos *buffers* afectan la comunicación entre RIP_3 . A: Control. B: con EGTA. C: con BAPTA.

1.4. Esquema de la Tesis

La Tesis se enfoca en estudiar las señales donde el Ca^{2+} es liberado desde el RE a través de RIP_3 s. El objetivo principal de esta Tesis es estudiar de qué modo la geometría de la distribución de los canales se combina con algunos de los otros aspectos que influyen sobre la distribución de Ca^{2+} libre para determinar las características de las señales. Gran parte del esfuerzo de la Tesis está dirigido a comprender y observar de qué modo *buffers* de distinta cinética afectan de modo diferente la distribución de Ca^{2+} libre y cómo la modulación resultante depende de la distribución espacial de los RIP_3 s. Se realizaron distintos abordajes, experimental y teórico/numérico, con el fin de lograr un

mayor entendimiento de las señales de Ca^{2+} . La organización de la Tesis se describe a continuación.

En el Capítulo 2 se presenta un método de análisis de la fluorescencia que permite clasificar experimentos de observación de señales de Ca^{2+} realizados en distintas condiciones y comparar las observaciones experimentales con simulaciones numéricas. El método es necesario para poder conectar la fluorescencia observada con la distribución que puede derivarse de los modelos. Sus resultados están contenidos en [Piegari et al. (2014)].

En el Capítulo 3 se estudian las propiedades de las señales de Ca^{2+} localizadas conocidas como *puffs* cuando se las observa con dos fluoróforos distintos en condiciones tales que, de acuerdo al método introducido en [Piegari et al. (2014)], la relación señal-ruido esperada es similar. El estudio permite inferir información sobre la distribución de RIP_3s participantes de las señales observadas. Estos resultados están contenidos en [Piegari et al. (2015)].

En el Capítulo 4 se profundiza en el estudio del efecto de los *buffers* de distinta cinética sobre la distribución espacio-temporal del Ca^{2+} utilizando simultáneamente dos *dyes*, uno rápido y uno lento. Parte del análisis se hace utilizando el mapeo entre fluorescencia y Ca^{2+} ligado a *dye* establecido en el trabajo [Piegari et al. (2014)]. Parte de los resultados están contenidos en [Piegari et al. (2012)] y están por publicarse.

En el Capítulo 5 se analiza de un modo más directo el efecto de la distribución espacial de los RIP_3s sobre las señales observadas. Dado que se supone que la distribución de los RIP_3s cambia con el estadio de maduración de las células se compararon las señales entre ovocitos y huevos que fueron madurados artificialmente mediante la incubación con progesterona. Se realizaron simulaciones numéricas utilizando el algoritmo introducido en [Lopez et al. (2012)] que permiten estudiar la propagación de las señales como función de la distancia entre canales y la tasa de remoción del Ca^{2+} .

En el Capítulo 6 se sintetizan los resultados de esta Tesis, y se plantean las conclusiones generales.

En el Apéndice A se detallan los métodos experimentales y numéricos que se utilizaron para el desarrollo de esta Tesis. En el Apéndice E se hace un índice de las abreviaturas utilizadas. Los otros Apéndices contienen material suplementario de interés.

Capítulo 2

Método de clasificación de experimentos de observación de señales de Ca^{2+}

2.1. Resumen

Los eventos espacialmente localizados (*puffs*) de Ca^{2+} constituyen los ladrillos elementales de las señales intracelulares de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 s. El uso de distintas microscopías junto con el de indicadores que cambian sus propiedades de emisión de luz al ligar Ca^{2+} brindan un modo relativamente poco intrusivo para estudiar *puffs* de Ca^{2+} . Los experimentos suelen usar también *buffers* lentos de Ca^{2+} (sustancias que atrapan Ca^{2+} con cinética lenta) para desacoplar sitios de liberación discretos y aumentar el número *puffs* evocados. Existe una gran variedad de indicadores de Ca^{2+} y la concentración con la que se los usa, así como también la del *buffer* lento que se agrega para la observación de *puffs*, aumenta los grados de libertad del experimentador. Dado un tipo de *dye* y un *buffer* lento, ¿cuáles son las condiciones experimentales óptimas para la observación de *puffs*? ¿Hasta qué punto experimentos realizados con distintos *dyes* y/o con distintas concentraciones proveen resultados comparables? En este Capítulo introducimos un método para clasificar *a priori* arreglos experimentales para la observación de señales de Ca^{2+} . El mismo involucra la realización, para cada configuración que se quiera clasificar, de tres tipos de experimentos en condiciones estacionarias y el posterior análisis de los mismos en términos de un modelo que describe las fluctuaciones de fluorescencia en estas condiciones. Cuantificando los parámetros del modelo en base a dicho análisis y combinándolo con simulaciones numéricas se obtiene una estimación de

la relación señal-ruido que es esperable al observar señales con cada configuración analizada. El método permite establecer clases de equivalencia en términos de la relación señal-ruido esperada, estimar la menor corriente de Ca^{2+} que puede distinguirse en cada clase, como así también generar imágenes numéricas de señales con ruido realista que pueden usarse para inferir la tasa de liberación de Ca^{2+} que subyace a una imagen.

2.2. Marco general y motivación

Las señales de Ca^{2+} que involucran la liberación de este ión desde el retículo endoplasmático a través de RIP_3s requieren que la concentración citosólica de IP_3 varíe. Si bien en condiciones fisiológicas el IP_3 es producido a partir de precursores en la membrana plasmática cuando la célula recibe un estímulo externo, en los experimentos se suele utilizar IP_3 enjaulado que es foto-liberado (y, por lo tanto, activado) con luz UV. Esto restringe los indicadores de Ca^{2+} con los que pueden observarse las señales así evocadas a aquellos cuya fluorescencia no es excitada con luz UV. Como explicamos en la Introducción, los *dyes* de Ca^{2+} que se excitan en el rango visible del espectro son típicamente de longitud de onda única. El método que introducimos en este Capítulo está desarrollado para experimentos que utilizan este tipo de indicadores. Existe una gran variedad de *dyes* de longitud de onda única que difieren tanto en sus propiedades foto-físicas como en su cinética. En la Fig. 2.1 mostramos tres imágenes tipo linescan obtenidas en experimentos de observación de señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s usando distintas combinaciones de tipo y concentración de *dye* y concentración de EGTA. La Fig. 2.1A fue obtenida con una configuración que usa Fluo-4 y EGTA con concentraciones $[\text{F4}]_T = 36\mu\text{M}$ y $[\text{E}]_T = 90\mu\text{M}$, respectivamente, una combinación que ha probado ser muy adecuada para la observación de señales tipo *puff*. Las Figs. 2.1B y C fueron obtenidas usando el *dye*, Rhod-2, que no había sido utilizado previamente para la observación de *puffs*. La Fig. 2.1B corresponde a concentraciones de *dye* y EGTA, $[\text{R2}]_T = 36\mu\text{M}$ y $[\text{E}]_T = 90\mu\text{M}$, respectivamente, y la 2.1C a $[\text{R2}]_T = 90\mu\text{M}$ y $[\text{E}]_T = 45\mu\text{M}$. En todos los casos se utilizó IP_3 enjaulado que fue fotoliberado con un pulso de intensidad y duración igual en los tres casos en el instante indicado con la línea blanca en las figuras. La luz UV llegó a la muestra a través de la modificación descrita en [Sigaut et al. (2011)] (Apéndice B). En las tres figuras se muestra la fluorescencia cruda, $F(x_i, t_j)$, a lo largo del linescan en cada tiempo t_j , y en cada posición x_i .

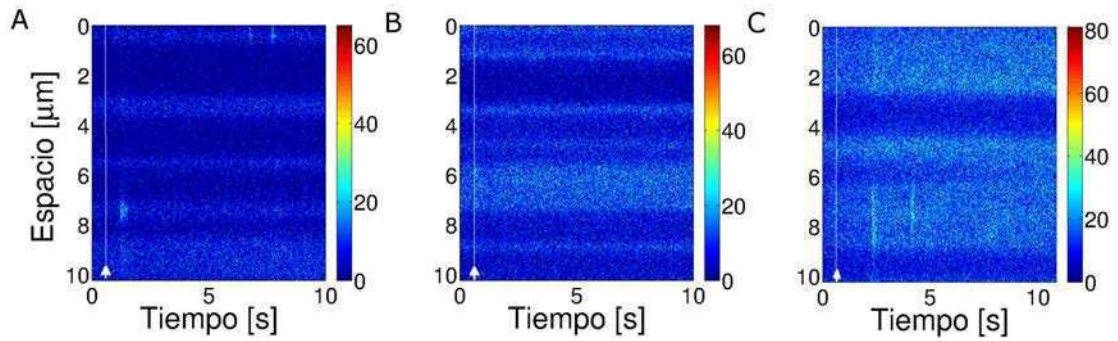


Figura 2.1: Imagen cruda típica obtenida en ovocitos con EGTA y Fluo-4 o Rhod-2 sometidas al mismo pulso de fotolización. (A) Para $[F4]_T = 36\mu M$ y $[E]_T = 90\mu M$, (B) para $[R2]_T = 36\mu M$ y $[E]_T = 90\mu M$ y (C) para $[R2]_T = 90\mu M$ y $[E]_T = 45\mu M$. Las líneas horizontales y verticales corresponden al tiempo y al espacio, respectivamente. Las barras de colores representan la intensidad de la fluorescencia (F), con los colores más cálidos indicando valores mayores. La línea blanca marca el flash UV. En (A) y (C) se observan varios *puff* mientras que en (B) no.

Esta figura muestra que la posibilidad de observar *puffs* depende de la configuración experimental. En particular observamos *puffs* en las Figs. 2.1A y C mientras que en la Fig. 2.1B no aparece ninguno. Esto último no es una particularidad de esta imagen: no observamos ningún *puff* con la configuración de la Fig. 2.1B que corresponde a haber usado las mismas concentraciones de *dye* y EGTA que en la configuración más utilizada de la Fig. 2.1A pero para un *dye* diferente (Rhod-2 en lugar de Fluo-4). La pregunta que surge entonces es, dado un *dye* de longitud de onda única, ¿es posible determinar *a priori* las concentraciones de dicho *dye* y de EGTA que permiten observar *puffs*? Ahora bien, la observabilidad de por sí no es suficiente. Dadas dos configuraciones, ¿podemos compararlas *a priori* y cuantificar en qué medida ambas son capaces de observar o no el mismo número de *puffs*? Surge también la pregunta de hasta qué punto las propiedades de los *puffs* detectados (es decir, de la variación de fluorescencia observada) son similares si se usan distintas configuraciones de *dye* y EGTA. Contestaremos esa pregunta en el Capítulo que sigue.

El método que introducimos en este Capítulo (y que publicamos en [Piegari et al. (2014)] se basa en la técnica de Number & Brightness y requiere la obtención de imágenes de fluorescencia en condiciones estacionarias, que son posteriormente analizadas en términos de un modelo de fluctuaciones. Teniendo en cuenta que los *dyes* de longitud de onda única emiten luz en el mismo rango de longitudes de onda, aunque con distinta eficiencia, tanto cuando están libres como cuando están ligados a Ca^{2+} , es necesario realizar tres tipos de experimentos en condiciones estacionarias para cuantificar los parámetros del modelo de fluctuaciones. Presentamos en lo que sigue una descripción general del método y luego lo discutimos en más detalle al aplicarlo a la combinación de Fluo-4 y EGTA utilizada para obtener la imagen de la Fig. 2.1A ($[F4]_T = 36\mu M$ y $[E]_T = 90\mu M$).

Posteriormente lo aplicamos a las configuraciones con Rhod-2 y EGTA exploradas en las Figs. 2.1B y C. La aplicación del método nos da una estimación *a priori* de la relación señal-ruido (SR) para estas tres configuraciones experimentales a las que denotaremos con las letras minúsculas, (i), (ii), (iii), como se indica en la Tabla 2.1.

Set	Tipo de <i>dye</i> y concentración	$[E]_T$ (μM)
(i)	$[F4]_T = 36\mu M$	90
(ii)	$[R2]_T = 36\mu M$	90
(iii)	$[R2]_T = 90\mu M$	45

Tabla 2.1: Concentraciones de *dye* y EGTA utilizados en los experimentos analizados en este Capítulo.

La comparación de las relaciones señal-ruido obtenidas para cada configuración analizada permite ubicar en la misma clase de equivalencia a los sets (i) y (iii) y en una diferente al set (ii). Esto concuerda con lo ilustrado en la Fig. 2.1 demostrando la habilidad del método para discriminar configuraciones experimentales *a priori* sin necesidad de recurrir a estrategias tipo “prueba y error”. Por otro lado, las imágenes numéricas con ruido realista que generamos usando el modelo de fluctuaciones cuantificado, muestran cuáles son las razones que subyacen a la distinta habilidad de los *dyes*, Fluo-4 y Rhod-2, para detectar *puffs* de Ca^{2+} cuando son usados con la misma concentración. Esta exploración muestra también que la comparación directa de la fracción de Ca^{2+} ligado al *dye* predicha por las simulaciones numéricas en ausencia de ruido, no es suficiente para establecer clases de equivalencia entre estas dos situaciones experimentales.

Caracterizar la capacidad de detección de dos *dyes*, como Fluo-4 y Rhod-2, que tienen propiedades espectrales distintas abre la posibilidad de usarlos simultáneamente para estudiar las señales como discutimos en el Capítulo 4 (ver también [Piegari et al. (2012)]). También puede usarse uno de ellos en combinación con *dyes* que entran diferencialmente en el retículo endoplasmático para monitorear el calcio citosólico y el luminal al mismo tiempo [Lopez et al. (2014)]. En este Capítulo mostramos también cómo puede utilizarse el método para cuantificar la variación de la relación señal-ruido al cambiar la concentración de *dye* y EGTA, el tipo de *dye* o la intensidad de iluminación o para estimar la señal más chica que se puede detectar con una dada configuración. Nuestro método es el primero en utilizar un análisis de las fluctuaciones de la fluorescencia basal con estos fines.

2.3. Tres tipos de experimentos en condiciones estacionarias

El método se basa en la realización de tres tipos de experimentos a los que llamamos Tipo I, II y Tipo III y cuyas características están resumidas en la Tabla 2.2. Todos ellos son hechos en ovocitos donde no se evocan *puffs*, es decir, en condiciones estacionarias. Los ovocitos son tratados como se describe en el Apéndice A.1, se los microinyecta *dye* y EGTA en las concentraciones cuya combinación se quiere analizar. En los ejemplos mostrados en este Capítulo éstas corresponden a las de los sets (i), (ii), (iii) de la Tabla 2.1. En los experimentos Tipo I colectamos la fluorescencia durante 10,86s a lo largo de una línea de 10,25 μ m usando la misma intensidad de luz en distintas regiones del ovocito. En los experimentos Tipo II, seleccionamos una región en un ovocito y obtenemos varias imágenes tipo linescan de 10,86s \times 10,25 μ m, cada una para una intensidad de iluminación diferente (la “iluminación estándar” que se utiliza para observar señales de Ca²⁺ y varias otras). Para este fin, la intensidad del haz de luz se varía en el rango que permite la AOTF del Olympus FV1000. En los experimentos Tipo III tomamos imágenes en condiciones similares a la de los experimentos Tipo I pero en ovocitos donde variamos la concentración basal de Ca²⁺. Para esto último utilizamos una solución de dicloruro de calcio (CaCl₂) que aplicamos en microinyecciones sucesivas hasta una concentración final de 150nM en el ovocito. Obtenemos así varias imágenes de 10,86s \times 10,25 μ m en diferentes regiones del mismo ovocito y para distintas concentraciones finales de Ca²⁺. Por completitud, en la Tabla 2.2 no sólo listamos los tres tipos de experimentos que constituyen el método sino también los de evocación de señales ilustrados en la Fig. 2.1 a los que llamamos Tipo 0.

Experimento	Región del ovocito	Int. de iluminación	[Ca] _{agre}	IP ₃ enj
Tipo 0	-	fija (estándar)	no	sí
Tipo I	variable	fija (estándar)	no	no
Tipo II	fija	variable	no	no
Tipo III	variable	fija (estándar)	si	no

Tabla 2.2: Tipos de experimentos cuyos resultados se muestran este Capítulo.

2.3.1. Procesamiento de imágenes y presentación de resultados

Presentamos los resultados de los experimentos Tipo I-III en términos del valor medio y desvío estándar de la fluorescencia observada en las franjas brillantes (*fb*) de cada imagen analizada. En los ovocitos de *Xenopus laevis* las imágenes linescan típicamente muestran líneas horizontales oscuras que corresponden a los gránulos corticales (ver *e.g.*

Fig. 2.1). Las franjas luminosas corresponden al citosol. En este caso la aplicación de nuestro método requiere el pre-procesamiento de los datos para quedarse únicamente con la información proveniente del citosol como explicamos en A.1.5. Una vez que se identifican las franjas brillantes, sólo trabajamos con los píxeles de la imagen que corresponden a las mismas. Aunque no lo aclaramos, de ahora en más todos los cálculos están hechos sobre los píxeles que identificamos como correspondientes al citosol (es decir, no correspondientes a las franjas oscuras).

Para cada imagen linescan obtenida con los experimentos Tipo I-III, calculamos el valor medio $\langle F \rangle$, y el desvío estándar, σ_F , de la fluorescencia como:

$$\langle F \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i \in fb} \sum_{j=1}^{N_t} F(x_i, t_j) \quad (2.1)$$

$$\sigma_F = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i \in fb} \sum_{j=1}^{N_t} (F(x_i, t_j) - \langle F \rangle)^2} \quad (2.2)$$

donde $N = N_b \cdot N_t$ y la suma sobre i es sobre la ubicación de los píxeles de las franjas brillantes (fb). Para cada tipo de experimento, I-III, realizado con el mismo *dye* y con las mismas concentraciones de *dye* y EGTA (sets (i), (ii) o (iii) en los ejemplos de este Capítulo) obtenemos entre 21 y 88 imágenes linescan dependiendo del tipo de experimento. Luego graficamos los valores σ_F vs $\langle F \rangle$ obtenidos a partir de las imágenes correspondientes a un mismo tipo de experimento (I, II o III) con la misma combinación de *dye* y EGTA ((i), (ii), (iii)). Es decir, para cada configuración a analizar se tienen tres gráficos de σ_F vs $\langle F \rangle$. Las implicancias y las interpretaciones de estos gráficos se discutirán más adelante. Realizamos un ajuste para cada gráfico con polinomios de grado uno o dos dependiendo del tipo de experimento, usando la herramienta *cftool* de Matlab (The MathWorks, Natick, MA). Cuando se ajusta una curva, se obtienen intervalos de confianza para los parámetros de los ajustes. Listamos estos valores en el Apéndice D.1.

2.4. Modelo de fluctuaciones de la fluorescencia

Introducimos ahora el modelo con el que describimos las fluctuaciones de la fluorescencia colectada en cada píxel de la imagen de Ca^{2+} obtenida usando un *dye* de Ca^{2+} SW y EGTA en condiciones estacionarias. El método de clasificación de configuraciones utiliza este modelo para describir la distribución de fluorescencia obtenida con los experimentos Tipo I, II y III (Figs. 2.2–2.4). Determinando algunos parámetros importantes del modelo a partir del ajuste de los datos experimentales, buscamos separar tres fuentes de fluctuaciones de la fluorescencia: (1) variaciones en el número de moléculas de *dye*

cuya fluorescencia se colecta en cada píxel; (2) cambios en la fracción de esas moléculas que están ligadas a Ca^{2+} ; (3) fluctuaciones en el número de fotones detectados.

Para construir el modelo extendemos la teoría de Number & Brightness [Digman et al. (2008)] teniendo en cuenta que, para un *dye* SW, tanto el *dye* ligado a Ca^{2+} como la molécula de *dye* libre emiten en el mismo rango de longitudes de onda (pero con distinta intensidad) y que el detector introduce un factor de amplificación sobre los fotones detectados. Llamemos N a la variable aleatoria que representa el número total de moléculas de *dye* que contribuyen a la fluorescencia en cada píxel. El valor que toma N en cada píxel puede ser considerado como una realización de la variable aleatoria. Como hacen en [Digman et al. (2008)], suponemos que N sigue una estadística Poissoniana. Llamemos N_{CaD} al número de moléculas de *dye* ligadas a Ca^{2+} asociadas a cada píxel. Ésta también es una variable aleatoria. Llamamos p a la probabilidad de que una molécula de *dye* esté ligada a Ca^{2+} . En general p depende del tiempo y del espacio. Para los experimentos desarrollados en condiciones estacionarias consideramos que p es constante y espacialmente uniforme. Esta hipótesis no es válida en el caso de imágenes con señales de Ca^{2+} como discutimos más adelante. En ambos casos suponemos que, dado N , N_{CaD} sigue una distribución Binomial, $N_{CaD} = \text{Binomial}(p, N)$. Teniendo en cuenta que las moléculas de *dye* libre o ligado a Ca^{2+} emiten fotones a distinta tasa suponemos que el número de fotones que llegan al detector durante cada paso temporal está dado por: $N_0 = q_1 N_{CaD} + q_2 (N - N_{CaD})$, donde q_1 y q_2 representan el número de fotones emitidos por molécula que alcanza el detector durante el tiempo de adquisición para las formas de *dye* ligado a Ca^{2+} y libre, respectivamente. q_1 y q_2 son funciones crecientes con la intensidad del láser que excita al *dye* y satisfacen $q_1 > q_2$. Acá seguimos el abordaje del método de Number & Brightness y despreciamos las fluctuaciones en la emisión fotónica. Está implícito en este tratamiento que son las fluctuaciones en el número de moléculas fluorescentes las principales responsables de la variabilidad de la fluorescencia en cada píxel. Resumiendo, suponemos que el número de fotones que alcanza el detector provenientes de la región de la muestra asociada a cada píxel puede escribirse como:

$$N_0 = (q_1 - q_2)\text{Binomial}(p, N) + q_2 N, \quad (2.3)$$

con N una variable aleatoria de distribución Poissoniana. Suponemos que q_2/q_1 está fijo para cada *dye* y que es del orden del cociente de las eficiencias cuánticas de las moléculas de *dye* en las formas libre y ligada a Ca^{2+} . De la ecuación 2.3 se obtiene $\langle N_0 \rangle = ((q_1 - q_2)p + q_2) \langle N \rangle$ y $\sigma_{N_0}^2 = \left[((q_1 - q_2)p + q_2)^2 + p(1 - p)(q_1 - q_2)^2 \right] \sigma_N^2$ para el valor medio y la varianza de N_0 , respectivamente. Dado que N es una variable aleatoria de distribución Poissoniana se cumple que $\sigma_N^2 = \langle N \rangle$. Luego concluimos que

$\sigma_{N_0}^2 = \left[((q_1 - q_2)p + q_2)^2 + p(1-p)(q_1 - q_2)^2 \right] \langle N \rangle$. Ahora bien, el detector amplifica la señal e introduce un ruido adicional. En particular, suponemos que si N_0 fotones llegan al detector, la intensidad de la fluorescencia que es reportada en el píxel de interés es una variable aleatoria, F , que es proporcional a una variable aleatoria de distribución Poissoniana de valor medio N_0 , con una constante de proporcionalidad γ , que representa el factor de amplificación. Es decir, dado N_0 , es $F = \gamma \text{Poisson}(N_0)$. Combinando esta relación con la ecuación 2.3 obtenemos:

$$F = \gamma \text{Poisson}((q_1 - q_2) \text{Binomial}(p, N) + q_2 N), \quad (2.4)$$

con N una variable aleatoria de distribución Poissoniana. Bajo estas hipótesis el valor medio y la varianza (o desvío estándar al cuadrado) de la fluorescencia reportada en cada píxel viene dada por:

$$\langle F \rangle = \gamma((q_1 - q_2)p + q_2) \langle N \rangle, \quad (2.5)$$

$$\sigma_F^2 = \gamma^2 (\langle N_0 \rangle + \sigma_{N_0}^2) = \gamma^2 ((q_1 - q_2)p + q_2 + (q_1^2 - q_2^2)p + q_2^2) \langle N \rangle. \quad (2.6)$$

Las ecuaciones 2.5 y 2.6 pueden combinarse de distintas maneras que resultarían útiles para describir las distintas curvas obtenidas de los experimentos. Obteniendo $\langle N \rangle$ como función de $\langle F \rangle$, q_1 y p de la ecuación 2.5 y reemplazándola en la ecuación 2.6 obtenemos:

$$\sigma_F^2 = \gamma \left(1 + \frac{(q_1^2 - q_2^2)p + q_2^2}{(q_1 - q_2)p + q_2} \right) \langle F \rangle. \quad (2.7)$$

Usando la ecuación 2.5 para escribir q_1 como función de $\langle F \rangle$, $\langle N \rangle$ y p e insertándola en la ecuación 2.6 obtenemos:

$$\sigma_F^2 = \gamma \langle F \rangle + \frac{\langle F \rangle^2}{\langle N \rangle} \frac{p + q_2^2/q_1^2}{(p + q_2/q_1)^2}. \quad (2.8)$$

Por último, usando la ecuación 2.5 para escribir p como una función de $\langle F \rangle$, $\langle N \rangle$ y q_1 e insertándola en la ecuación 2.6 obtenemos:

$$\sigma_F^2 = \gamma(q_1 + q_2 + 1) \langle F \rangle - \gamma^2 q_1 q_2 \langle N \rangle. \quad (2.9)$$

Vamos a usar estas ecuaciones para interpretar y ajustar los gráficos σ_F^2 vs $\langle F \rangle$ obtenidos a partir de los distintos tipos de experimentos, I-III. La expresión que usaremos en cada caso depende de cuáles son las cantidades que se supone toman aproximadamente el mismo valor en todos los puntos de las imágenes que se usan para calcular σ_F^2 y $\langle F \rangle$ en cada tipo de experimento. Estas cantidades están descritas en la Tabla 2.3.

Experimento	$\langle N \rangle$	q_1	p_b
Tipo I	variable	fija	-
Tipo II	fija	variable	fija
Tipo III	variable	fija	variable

Tabla 2.3: Comportamiento de los parámetros del modelo de fluctuaciones en los experimentos desarrollados en condiciones estacionarias.

Como se explicará en la sección resultados de este Capítulo, la combinación de los ajustes de los tres tipos de experimentos permite la cuantificación de γ , q_1 para la iluminación estándar y $\langle N \rangle$. Una vez que tenemos q_1 , usamos el cociente de eficiencias cuánticas del *dye* ligado a Ca^{2+} y libre para estimar q_2/q_1 y determinar q_2 . Para esto suponemos que γ sólo depende de la forma en que es detectada la fluorescencia para generar la imagen, que q_1 y q_2 dependen de la eficiencia cuántica del *dye* y de la potencia del láser y $\langle N \rangle$ de la concentración del *dye*. Suponemos que $\langle N \rangle$ puede variar en distintas regiones de un mismo ovocito. Con el método estimamos entonces un rango posible de valores, $\langle N \rangle$, para una dada concentración de *dye*. Los valores de γ , $\langle N \rangle$, q_1 y q_2 a la intensidad de iluminación estándar deberían permanecer aproximadamente iguales para cualquier experimento (incluido el Tipo 0) que fuera realizado usando la misma configuración, el mismo *dye* y a la misma concentración, y la misma intensidad de láser que los realizados en condiciones estacionarias (Tipo I, II y III). Entonces sólo necesitamos la fracción de moléculas ligadas a Ca^{2+} en cada punto espacial y temporal durante una señal de Ca^{2+} para obtener la relación señal ruido esperada por cada arreglo experimental. Esta fracción puede obtenerse a partir de simulaciones numéricas de la dinámica intracelular de Ca^{2+} como describimos a continuación.

2.5. Imágenes numéricas simuladas y estimación de la relación señal-ruido esperada durante eventos de liberación de Ca^{2+}

Para estimar la relación SR que esperamos obtener en imágenes de señales de Ca^{2+} espacialmente localizadas (*i.e.*, en experimentos Tipo 0) usando una configuración experimental dada (*e.g.*, alguno de los sets (i), (ii), (iii)) combinamos simulaciones numéricas de la dinámica del Ca^{2+} intracelular con el modelo de fluctuaciones de fluorescencia que acabamos de introducir. Para las simulaciones usamos parámetros de *dye* y EGTA que correspondan a los de la configuración cuya relación SR se quiere estimar. Para el modelo de fluctuaciones usamos los parámetros obtenidos a partir del ajuste de los tres

tipos de experimentos (*I*, *II* y *III*) para la configuración experimental de interés. Combinamos las simulaciones y el modelo de fluctuaciones suponiendo que cuando se evocan señales de Ca^{2+} (experimentos Tipo 0), la única cantidad que cambia con respecto a los experimentos realizados en condiciones estacionarias (Tipos *I*, *II* y *III*) es la probabilidad, $p(x, t)$, de que la molécula de *dye* se encuentre ligada a Ca^{2+} en cada tiempo, t , y punto espacial, x , de la imagen. Estimamos esta probabilidad a partir de las simulaciones en presencia de distintas fuentes de Ca^{2+} . En los ejemplos de aplicación del método discutidos en este Capítulo mostramos que también puede obtenerse una estimación aproximada sin necesidad de pasar por las simulaciones. En esta subsección nos concentramos en describir cómo obtenerla usando simulaciones. La estimación de la SR esperada permite una comparación directa de las propiedades de detectabilidad de distintas configuraciones experimentales.

2.5.1. Distribución determinista de *dye* ligado a Ca^{2+} en presencia de una fuente localizada.

Simulamos numéricamente la dinámica de Ca^{2+} en el medio citosólico resolviendo un conjunto de ecuaciones de reacción-difusión para las concentraciones de Ca^{2+} libre, Ca^{2+} ligado a *dye* y a tres tipos de *buffer* (EGTA, endógeno móvil y endógeno inmóvil) en presencia de una fuente puntual de Ca^{2+} ubicada en el origen y de bombas que remueven al Ca^{2+} citosólico uniformemente en el espacio. Usamos los valores de los parámetros que se muestran en la Tabla 2.4. Una vez obtenida la distribución de Ca^{2+} ligado a *dye* como función de la posición y el tiempo, determinamos la distribución “blurreada” a lo largo del linescan, \overline{CaD} , teniendo en cuenta la resolución finita del microscopio. Para más detalles ver Apéndice A.2.

2.5.2. Distribución de la fluorescencia simulada con ruido realista y estimación de la relación señal-ruido.

Generamos imágenes simuladas ruidosas a partir de las simulaciones numéricas del Apéndice A.2 usando el modelo de fluctuaciones de la fluorescencia descripto previamente. Esto es, dada la distribución “blurreada”, $\overline{[Ca^{2+}]}(x, t)$, de la simulación determinamos $p = \frac{\overline{[Ca^{2+}]}(x, t)}{[D]_T}$ como función del tiempo y de la posición a lo largo de la línea escaneada. Elegimos luego un valor, $\langle N \rangle$, dentro del rango determinado a partir de ajustar los resultados experimentales con el modelo de fluctuaciones ya descripto. Elegimos a continuación el valor del número total de moléculas de *dye* para cada posición y tiempo, $N(x, t)$, usando una distribución de Poisson de valor medio $\langle N \rangle$. Luego calculamos la

Parámetro	Valor	Unidades
Ca^{2+} libre		
D_{Ca}	220	$\mu m^2 s^{-1}$
$[Ca^{2+}]_{basal}$	0.1	μM
Indicador de Ca^{2+} dextran Fluo-4		
D_{F4}	15	$\mu m^2 s^{-1}$
k_{on-F4}	240	$\mu M^{-1} s^{-1}$
k_{off-F4}	180	s^{-1}
$[F4]_T$	36	μM
Indicador de Ca^{2+} dextran Rhod-2		
D_{R2}	15	$\mu m^2 s^{-1}$
k_{on-R2}	70, 85	$\mu M^{-1} s^{-1}$
k_{off-R2}	130, 170	s^{-1}
$[R2]_T$	36, 90	μM
Buffer exógeno móvil EGTA		
D_E	80	$\mu m^2 s^{-1}$
k_{on-E}	5	$\mu M^{-1} s^{-1}$
k_{off-E}	0,75	s^{-1}
$[E]_T$	45, 90	μM
Buffer endógeno inmóvil		
k_{on-I}	400	$\mu M^{-1} s^{-1}$
k_{off-I}	800	s^{-1}
$[I]_T$	300	μM
Buffer endógeno móvil lento		
D_M	27	$\mu m^2 s^{-1}$
k_{on-M}	20	$\mu M^{-1} s^{-1}$
k_{off-M}	8.6	s^{-1}
$[M]_T$	250	μM
Buffer endógeno móvil rápido		
D_M	32	$\mu m^2 s^{-1}$
k_{on-M}	500	$\mu M^{-1} s^{-1}$
k_{off-M}	7506	s^{-1}
$[M]_T$	10	μM
Bomba		
k_{off-P}	0.1	s^{-1}
$[P]_T$	0.9	μM
Fuente		
n_C	6	-
t_a	20	ms

Tabla 2.4: Valores de los parámetros utilizados en las simulaciones.

fluorescencia, $F(x, t)$, usando la Ec. 2.4 con $N = N(x, t)$, $p = \frac{[Ca^{2+}](x, t)}{[D]_T}$, y los valores de γ , q_1 y q_2 estimados en los experimentos. Para cada imagen simulada ruidosa computamos la relación señal-ruido como:

$$SR = \frac{\Delta F}{\sqrt{\sigma_{F_{basal}}^2}} = \frac{F_{señal} - F_{basal}}{\sqrt{\sigma_{F_{basal}}^2}} \quad (2.10)$$

con $F_{señal}$ y F_{basal} los valores máximo y mínimo de la fluorescencia de la imagen simulada, respectivamente, y calculamos $\sigma_{F_{basal}}^2$ usando la ecuación 2.6 con $p = p_b \equiv \frac{[CaD]_{basal}}{[D]_T}$. También se puede obtener una estimación de la relación señal-ruido reemplazando $F_{señal}$ y F_{basal} en la ecuación 2.10 por los valores medios dados por la ecuación 2.5 usando p_b y alguna estimación para $p_s \equiv \frac{[CaD]_{señal}}{[D]_T}$. El valor de p_s puede calcularse usando el valor máximo de la concentración de *dye* ligado a Ca^{2+} durante la señal obtenido en las simulaciones. De esta manera, la relación señal-ruido puede escribirse como:

$$SR = \sqrt{q_1 \langle N \rangle} \frac{p_s - p_b}{\sqrt{(1 + q_1)p_b + \xi(1 + \xi q_1)}} \quad (2.11)$$

despreciando términos del orden de $\xi \equiv \frac{q_2}{q_1}$ frente a 1. La ecuación 2.11 puede reescribirse en término de cantidades que están relacionadas con parámetros experimentalmente accesibles. En particular, suponiendo que q_1 es directamente proporcional a la intensidad del láser, I , podemos reescribir $q_1 = q_1(I_{est}) \frac{I}{I_{est}}$, con $q_1(I_{est})$ el valor de q_1 a la intensidad de iluminación estándar, $I = I_{est}$. Reemplazando p_b como función de $[Ca^{2+}]_{basal}$, es decir, haciendo $p_b = \frac{[Ca^{2+}]_{basal}}{[Ca^{2+}]_{basal} + K_d}$, podemos calcular la relación SR como función de $\langle N \rangle$, $\frac{I}{I_{est}}$ y $[Ca^{2+}]_{basal}$ como:

$$SR = \sqrt{q_1(I_{est}) \frac{I}{I_{est}} \langle N \rangle} \frac{p_s - [Ca^{2+}]_{basal} / ([Ca^{2+}]_{basal} + K_d)}{\sqrt{(1 + q_1)[Ca^{2+}]_{basal} / ([Ca^{2+}]_{basal} + K_d) + \xi(1 + \xi q_1)}} \quad (2.12)$$

2.6. Descripción general del método de clasificación

Antes de avanzar con la aplicación particular de nuestro método a las configuraciones definidas por los sets (i)-(iii), hacemos acá una breve descripción de cómo proceder en una situación genérica. Supongamos que queremos obtener imágenes de señales de Ca^{2+} usando un *dye* de longitud de onda única (es decir, queremos desarrollar un experimento Tipo 0) y que queremos evaluar *a priori* el rendimiento del arreglo experimental para una cierta combinación de *dye*, intensidad de iluminación y concentraciones de *dye* y EGTA. Microinyectamos entonces las cantidades deseadas de *dye* y EGTA en distintos ovocitos y realizamos los experimentos Tipo I, II y III como se describe en la Sec. 2.3. Calculamos para cada imagen la fluorescencia media, $\langle F \rangle$, y su varianza σ_F^2 como ya describimos y agrupamos los datos correspondientes a cada tipo experimental obteniendo sus respectivos gráficos de σ_F^2 vs $\langle F \rangle$. Con el objetivo de realizar una clasificación, una posibilidad sencilla es comparar las tres curvas obtenidas para el *dye* de interés con aquellas obtenidas con otro *dye* o a una concentración a la que se sabe que se pueden observar *puffs* de Ca^{2+} . Los experimentos desarrollados con distintos tipos de microscopía también pueden compararse entre sí. Para una comparación más cuantitativa se usan las Ecs. 2.7- 2.9 para ajustar las tres curvas σ_F^2 vs $\langle F \rangle$ obtenidas en los experimentos

Tipo I-III. En la siguiente sección discutiremos qué ecuación se aplica en cada caso. A partir de los ajustes se determinan γ , q_1 y q_2 (a la iluminación estándar) y el rango de valores para el valor medio de moléculas de *dye*, $\langle N \rangle$, para la configuración experimental que se quiere estudiar. Estimando la fracción de moléculas de *dye* ligadas a Ca^{2+} durante una señal localizada se puede calcular la relación señal-ruido que se espera en los experimentos Tipo 0 para la configuración experimental analizada. Esta fracción puede calcularse aproximadamente o por medio de simulaciones numéricas, como se explicó en la Sección 2.5.2.

2.7. Aplicación del método a tres configuraciones experimentales

En esta sección aplicamos nuestro método de clasificación de configuraciones experimentales para la observación de señales de Ca^{2+} a las situaciones definidas por los sets (i), (ii) y (iii) de la Tabla 2.1. El objetivo es analizar si nuestro método permite discriminarlos de un modo consistente a lo observado en la Fig. 2.1 donde los *puffs* de Ca^{2+} pueden observarse en las Figs. 2.1A y 2.1C correspondientes a los sets (i) y (iii) pero no en la Fig. 2.1B, correspondiente al set (ii). Describimos la aplicación con mayor detalle en el caso del set (i). La aplicación del método es similar para las otras dos configuraciones.

2.7.1. Análisis de las fluctuaciones en experimentos con $[F4]_T = 36\mu M$ y $[E]_T = 90\mu M$

En las Figs. 2.2A, B y C mostramos la varianza de la fluorescencia, σ_F^2 como función del valor medio, $\langle F \rangle$, para los datos obtenidos con los experimentos Tipo I, II y III, respectivamente, realizados en ovocitos microinyectados con el set de concentraciones (i) de la Tabla 2.1.

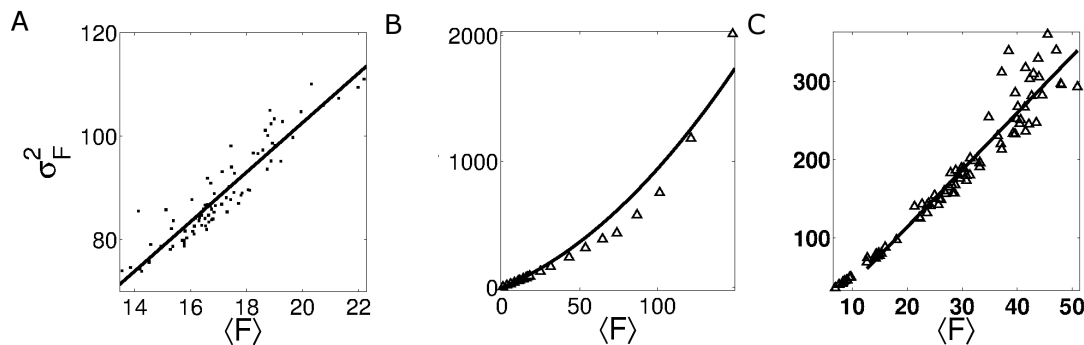


Figura 2.2: Fluctuaciones de la fluorescencia obtenidas a partir de experimentos Tipo I-III realizados en ovocitos con el set de concentraciones (i). Se computan el valor medio de la fluorescencia, $\langle F \rangle$ y la varianza, σ_F^2 , como se describió en la Sec. 2.4. Los datos experimentales y sus correspondientes ajustes (línea negra) se muestran para: (A) 84 imágenes obtenidas en experimentos Tipo I, ajuste: $\sigma_F^2 = 4,8\langle F \rangle + 7,1$; (B) 24 imágenes obtenidas en experimentos Tipo II, ajuste: $\sigma_F^2 = 0,04\langle F \rangle^2 + 5\langle F \rangle$; (C) 88 imágenes obtenidas en experimentos Tipo C, ajuste: $\sigma_F^2 = 7,27\langle F \rangle - 31,4$.

La Fig. 2.2A incluye los datos obtenidos en varias regiones del mismo ovocito con la intensidad de la iluminación estándar y sin microinyectar Ca^{2+} (ver Tipo I en Tablas 2.2 y 2.3). Por lo tanto, q_1 y q_2 toman el mismo valor para todos los datos de la Fig. 2.2A. La fracción de moléculas de *dye* ligadas a Ca^{2+} , p , podría variar entre regiones debido a una distribución no uniforme del Ca^{2+} citosólico basal. Sin embargo, observamos en la Fig. 2.2A que σ_F^2 y $\langle F \rangle$ están linealmente relacionadas y que la curva σ_F^2 vs $\langle F \rangle$ prácticamente pasa por el origen (la ordenada al origen del ajuste es un orden de magnitud menor que los valores de σ_F^2 obtenidos experimentalmente). Dada la Ec. 2.7, esto es esperable si las variaciones entre distintas regiones del mismo ovocito del valor basal de p (p_b) no tienen un efecto notable en la relación $\sigma_F^2/\langle F \rangle$. Usamos la Ec. 2.7 para describir la curva de la Fig. 2.2A e igualar $\gamma(1 + \frac{(q_1^2 - q_2^2)p_b + q_2^2}{(q_1 - q_2)p_b + q_2})$ a la pendiente del ajuste lineal, esto es, 4,8. Esta es la primera parte de la información cuantitativa que derivamos de los experimentos. En la interpretación de los datos está implícito que los puntos a lo largo de la curva σ_F^2 vs $\langle F \rangle$ tienen distintos valores de $\langle N \rangle$ lo que es consistente con suponer que puede haber concentraciones de *dye* levemente distintas en las distintas regiones citosólicas del mismo ovocito (Tabla 2.3).

En la Fig. 2.2B mostramos el gráfico σ_F^2 vs $\langle F \rangle$ que deriva del análisis de las imágenes linescan obtenidas en los experimentos Tipo II. En este caso, dado que no agrupamos datos que vienen de distintas regiones, suponemos que $p = p_b$ y $\langle N \rangle$ toman aproximadamente el mismo valor para todos los puntos (ver Tabla 2.3). Respecto de q_1 y q_2 solo podemos suponer que su cociente es constante pero no que lo sean sus valores individuales dado que estamos variando la intensidad de los láseres. Luego usamos la Ec. 2.8 para interpretar los ajustes de los datos. En particular, ajustando los puntos con un polinomio de orden 2 obtenemos $\gamma \cong 5$. Comparando estas estimaciones con la pendiente

derivada del ajuste de la Fig. 2.2A concluimos que $\gamma(1 + \frac{(q_1^2 - q_2^2)p_b + q_2^2}{(q_1 - q_2)p_b + q_2}) \cong \gamma$ para esos experimentos. Esto implica que la Ec. 2.7 se reduce a:

$$\sigma_F^2 = \gamma \langle F \rangle, \quad (2.13)$$

en condiciones basales para la intensidad de la iluminación estándar usada en la Fig. 2.2A. La estimación del factor de amplificación $\gamma \cong 5$ también coincide con un análisis del comportamiento del detector en el modo de conteo de fotones y en la ausencia de estímulo de fluorescencia (datos no mostrados). En particular, luego de sustraer las cuentas cero, el número de cuentas reportadas por el detector en oscuridad es consistente con el factor de amplificación, esto es, $\langle F_{dark} \rangle |_{F \neq 0} \sim 4,6$. Si también incluimos las cuentas cero encontramos $\langle F_{dark} \rangle \sim 0,61$ que muestra que el detector no introduce un “offset” notable en la fluorescencia reportada.

Mostramos en la Fig. 2.2C el gráfico σ_F^2 vs $\langle F \rangle$ que deriva del análisis de imágenes lineales obtenidas con experimentos realizados usando la misma intensidad de iluminación que en Fig. 2.2A pero en ovocitos microinyectados con *dye*, EGTA, y diferentes cantidades de Ca^{2+} para cambiar la concentración de Ca^{2+} citosólica, $[\text{Ca}^{2+}]_{cit}$ (experimentos Tipo III). También se incluyen en este gráfico los datos de ovocitos sin Ca^{2+} agregado. En la Fig. 2.2C no todos los datos corresponden al mismo valor de $p = \frac{[\text{CaD}]}{[\text{D}]_T}$. Más aún, tampoco se puede suponer que el valor de $\langle N \rangle$ sea el mismo para todos los puntos (ver Tabla 2.3). En este caso, si $\langle F \rangle$ es lo suficientemente grande de forma tal que $\gamma(1 + q_1 + q_2)\langle F \rangle \gg \gamma^2 q_1 q_2 \langle N \rangle$ la Ec. 2.9 se reduce a:

$$\sigma_F^2 \cong \gamma(1 + q_1 + q_2)\langle F \rangle \quad (2.14)$$

Se obtiene una relación similar a partir de la Ec. 2.7 si p es suficientemente grande como para que valga $(q_1 - q_2)p \gg q_2$, o de forma equivalente, $p \gg q_2/q_1$ (para las situaciones analizadas en este trabajo en el que $q_1 \gg q_2$). Entonces, usando la Ec. 2.14 para ajustar los puntos de la Fig. 2.2C con $\langle F \rangle$ suficientemente grande estimamos $\gamma(1 + q_1 + q_2)$. Obtenemos $\gamma(1 + q_1 + q_2) \approx 7,27 - 7,54$ dependiendo de con cuántos puntos nos quedamos para hacer el ajuste ($\langle F \rangle > 12$ como se muestra en la Fig. 2.2C o $\langle F \rangle > 18$, respectivamente). Derivamos q_1 de estos ajustes usando los valores de γ estimados de la Fig. 2.2B y usando que $q_2/q_1 \ll 1$. Obtenemos $q_1 = 0,45 - 0,5$. Estimando q_2/q_1 como el cociente entre las eficiencias cuánticas obtenidas para Fluo-3 en [Akwasaki Minta, Tsien (1989)], $q_2/q_1 = 0,025$, también podemos derivar q_2 . Obtenemos $q_2 = 0,011$ para $q_1 = 0,45$. Estos valores corresponden a la intensidad de la iluminación estándar dado que se derivan de experimentos Tipo III (ver Tabla 2.2).

De la Fig. 2.2A se puede estimar un rango de valores medios posible para $\langle N \rangle$ usando la Ec. 2.5 con el valor $\gamma = 5$ previamente inferido, $q_1 = 0,45$ y $q_2/q_1 = 0,025$. En particular, usando $p_b = 0,125$ (que corresponde a $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,1\mu M$ y $K_D \cong 0,8\mu M$) encontramos que el rango de valores medios de la fluorescencia de la Fig. 2.2A ($14 < \langle F \rangle < 22$) corresponde a $41 < \langle N \rangle < 65$. Si en lugar consideramos $p_b = 0,03$ (que corresponde a $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,02\mu M$) obtenemos $113 < \langle N \rangle < 177$. Resumiendo, de los ajustes analizados hemos estimado $\gamma = 5$, $q_1 = 0,45$, $q_2 = 0,011$ y un rango de valores de $\langle N \rangle$ para el set (i).

Habiendo obtenido γ , q_1 , q_2 y $\langle N \rangle$ estamos en condiciones de estimar la relación señal-ruido como función de la fracción de *dye* ligado a Ca^{2+} , p , durante la señal. Acá sólo damos una estimación aproximada. Una descripción más precisa se puede obtener con simulaciones numéricas como mostraremos más adelante. Para este fin usamos la Ec. 2.11. Dada la estimación previa de los parámetros del modelo obtenemos $\Delta F/\sigma_{basal} \sim 10(p_s - p_b)$ para $p_b = 0,125\mu M$ y $\langle N \rangle = 45$. Entonces, con $(p_s - p_b) \sim 0,2$ se cumple que $\Delta F/\sigma_{basal} \sim 2$ y esperamos que la señal empiece a ser distinguible. Con simulaciones numéricas se puede obtener una estimación de la fuente de Ca^{2+} subyacente que produce la diferencia $(p_s - p_b) \sim 0,2$.

2.7.2. Análisis de las fluctuaciones en experimentos realizados con Rhod-2

Ahora repetimos los experimentos y análisis descritos en la Subsección anterior pero para ovocitos microinyectados con los sets (ii) y (iii). Dado que se usa el mismo láser y la misma condición de intensidad de la iluminación estándar para ambos sets, esperamos que el modelo de fluctuaciones pueda caracterizarse con los mismos valores de γ , q_1 y q_2 a la intensidad de la iluminación estándar. El valor de $\langle N \rangle$, sin embargo, debe ser distinto dado las distintas concentraciones de *dye*, $[R2]_T$.

Mostramos los gráficos de la varianza, σ_F^2 , como función de la fluorescencia media, $\langle F \rangle$, derivado de los experimentos Tipo I y II realizados usando el set (ii) en las Figs. 2.3A y 2.3B y de los experimentos Tipo I-III usando el set (iii) en las Figs. 2.4A, 2.4B y 2.4C.

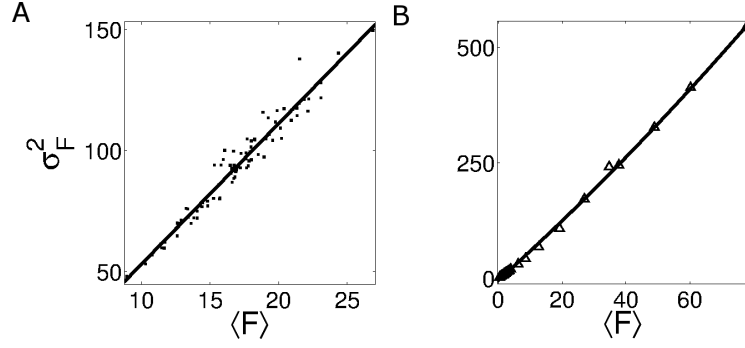


Figura 2.3: Fluctuaciones de la fluorescencia obtenidas en experimentos Tipo I-II realizados en ovocitos con el set de concentraciones (ii). Los datos experimentales y sus correspondientes ajustes (línea negra) se muestran para: (A) 84 imágenes obtenidas en experimentos Tipo I, ajuste: $\sigma_F^2 = 5,8\langle F \rangle - 4,8$; (B) 21 imágenes obtenidas en experimentos Tipo II, ajuste: $\sigma_F^2 = 0,01\langle F \rangle^2 + 6,21\langle F \rangle - 4,34$. En este caso no se muestran los resultados derivados de experimentos Tipo III debido a que no se observa cambio en la fluorescencia para este set de concentraciones con las microinyecciones de Ca^{2+} .

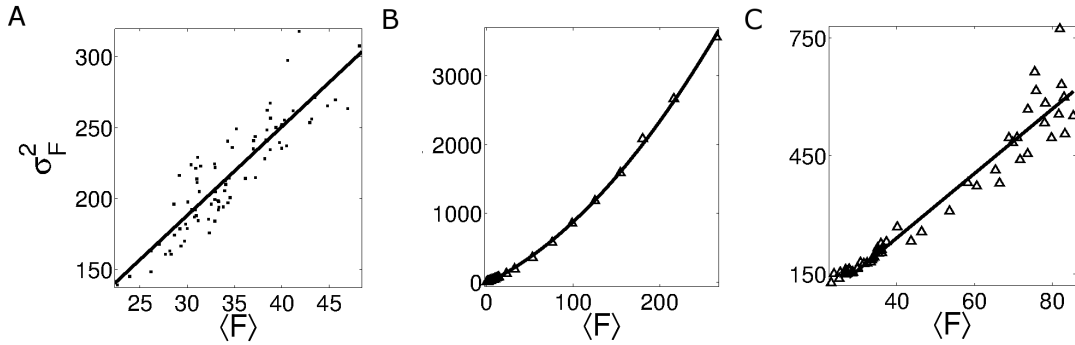


Figura 2.4: Fluctuaciones de la fluorescencia obtenidas de experimentos Tipo I-III realizados en ovocitos con el set de concentraciones (iii). Los datos experimentales y sus correspondientes ajustes (línea negra) se muestran para: (A) 84 imágenes obtenidas en experimentos Tipo I, ajuste: $\sigma_F^2 = 6,2\langle F \rangle + 1,2$; (B) 21 imágenes obtenidas en experimentos Tipo II, ajuste: $\sigma_F^2 = 0,03\langle F \rangle^2 + 6,02\langle F \rangle - 15,07$; (C) 55 imágenes obtenidas de experimentos Tipo III, ajuste: $\sigma_F^2 = 8,18\langle F \rangle - 85,31$.

Las Figs. 2.3A y 2.4A fueron obtenidas a partir de experimentos Tipo I. Observamos que, para ambos sets de concentraciones, σ_F^2 y $\langle F \rangle$ están linealmente relacionados con una pendiente aproximadamente igual (~ 6) en los dos casos. Por lo tanto, es $\gamma(1 + \frac{(q_1^2 - q_2^2)p_b + q_2^2}{(q_1 - q_2)p_b + q_2}) \cong 6$ para ambos tipos de experimentos. Como en el caso del set (i), esto es consecuencia del hecho de que el segundo término dentro del paréntesis es mucho menor que 1.

En las Figs. 2.3B y 2.4B mostramos los datos obtenidos a partir de los experimentos de Tipo II. Como se hizo en el caso del set (i), tomamos $p = p_b$, suponemos que $\langle N \rangle$ toma aproximadamente el mismo valor para todos los puntos de cada figura y que la relación q_2/q_1 es constante pero no los valores individuales, q_1 y q_2 . En este caso observamos

que hay una diferencia fundamental entre los gráficos de las Figs. 2.3B y 2.4B. Mientras que σ_F^2 vs $\langle F \rangle$ tiene forma parabólica en la Fig. 2.4B, la misma permanece como una línea recta en la Fig. 2.3B. Este comportamiento también es diferente al observado con Fluo-4 (Fig. 2.2B). Usando un polinomio de grado 1 o 2 para ajustar los datos de las Fig. 2.3B e interpretando los resultados con la Ec. 2.8 derivamos $\gamma \cong 6$. Obtenemos un valor similar a partir del ajuste de los puntos de la Fig. 2.4B (en este caso usando un polinomio de grado 2). Entonces concluimos que para los experimentos realizados con Rhod-2 (en los que se usa el láser de He-Ne para excitar la fluorescencia) vale $\gamma \cong 6$. El comportamiento diferente observado en las Figs. 2.3B y 2.4B puede atribuirse al hecho de que la parte no lineal de σ_F^2 vs $\langle F \rangle$ no es comparable a la lineal para ninguna de las intensidades de iluminación exploradas en el caso del set (ii). Discutimos más adelante las posibles causas de este comportamiento diferente que puede usarse para rechazar combinaciones de concentraciones de *dye* y EGTA que no son buenas para visualizar señales localizadas de Ca^{2+} .

En la Fig. 2.4C mostramos los datos obtenidos con experimentos Tipo III realizados usando el set (iii). No mostramos la correspondiente figura para el caso (ii) porque no observamos ninguna variación de la fluorescencia luego de las inyecciones de Ca^{2+} lo que, como discutimos después, puede ser debido a la misma razón que subyace a los distintos comportamientos observados en las Figs. 2.3B y 2.4B. A partir de la pendiente del ajuste lineal de los puntos con $\langle F \rangle$ suficientemente grande de la Fig. 2.4C estimamos $\gamma(1+q_1+q_2)$ como antes. Usando $\gamma \cong 6$ y suponiendo que $q_2/q_1 \ll 1$ obtenemos $q_1 = 0,36$ para la intensidad de iluminación estándar del láser de He-Ne.

A continuación estimamos el rango de valores posibles de $\langle N \rangle$ a partir de los datos de las Figs. 2.3A y 2.4A. Para este fin usamos la Ec. 2.5 con $\gamma \cong 6$, $q_1 = 0,36$ y $q_2/q_1 = 0,07$. En particular, para el caso (ii) de la Fig. 2.3A, obtenemos $39 < \langle N \rangle < 98$ usando $p = p_b = 0,05$ (que corresponde a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} = 0,1\mu\text{M}$) y $58 < \langle N \rangle < 145$ usando $p_b = 0,01$ (que corresponde a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} = 0,02\mu\text{M}$). Estos valores son consistentes con los derivados para Fluo-4 a la misma concentración de *dye* y EGTA (Fig. 2.2A). Para el caso (iii) obtenemos, de la Fig. 2.4A, $98 < \langle N \rangle < 177$ usando $p_b = 0,05$ y $145 < \langle N \rangle < 260$ usando $p_b = 0,01$. Los valores de $\langle N \rangle$ son entre 1,8 y 2,5 veces más grande en la Fig. 2.4A que en la Fig. 2.3A, lo que se corresponde con la variación en $[R2]_T$ en ambos casos.

Finalmente estimamos la relación señal-ruido como función de la fracción de *dye* ligado a Ca^{2+} durante una señal, p_s (el valor esperado para los experimentos Tipo 0). De nuevo usamos para este fin la Ec. 2.11. Tomando $\langle N \rangle = 115$ y $p_b \sim 0,05$ para el set (iii), obtenemos $\Delta F/\sigma_{\text{basal}} \sim 17(p_s - p_b)$. Dadas las distintas propiedades cinéticas y constantes de disociación entre Fluo-4 y Rhod-2, no conocemos *a priori* por cuánto

debería diferir la concentración de *dye* ligado a Ca^{2+} en la presencia de la misma fuente para el set (i) y para los sets (ii) o (iii). Esto puede estimarse por medio de simulaciones numéricas. En particular, las simulaciones numéricas de la dinámica de Ca^{2+} intracelular descritas en el Apéndice A.2 muestran que el cociente p_{iii}/p_i (donde estamos usando los subíndices i , ii o iii para identificar el set) es levemente más grande en el pico de la señal que en condiciones basales cuando se comparan las simulaciones para los sets (i) y (iii) (ver siguiente Subsección). Más específicamente, para las simulaciones presentadas en las Figs. 2.5A y 2.5C, resulta $p_{s,iii}/p_{s,i} \sim 0,5$ mientras que $p_{b,iii}/p_{b,i} \sim 0,4$. Usando estas estimaciones concluimos que la fuente que daría una relación señal-ruido del orden de 2 para los experimentos Tipo 0 realizados con el set (i) ($p_{s,i} \sim 0,32$) corresponde a $p_{s,iii} \sim 0,16$ (para experimentos Tipo 0 con el set (iii)). Insertando $p_s = 0,16$ y $p_b = 0,05$ en la expresión $\Delta F/\sigma_{basal} \sim 17(p_s - p_b)$, determinamos que esa fuente daría una relación señal-ruido del orden de 1,9 para los experimentos Tipo 0 realizados con el set (iii).

Esta estimación cae en un factor 1,6 si se reduce $\langle N \rangle$ a un valor dentro del rango que se espera en el set (ii) (en lugar de $\langle N \rangle = 115$). Estas estimaciones de la relación señal-ruido ponen en la misma clase a los experimentos del caso (i) y (iii). Entonces, en principio las señales localizadas de Ca^{2+} deberían ser igualmente detectables con cualquiera de estas dos configuraciones experimentales. La concentración más chica de EGTA utilizada en el último caso podría compensarse por la constante de disociación mayor de Rhod-2 y ser la causa de que ocurra eso. De hecho, mostramos con simulaciones numéricas que este caso nos permite estimar p para una señal muy pequeña. De acuerdo a estas estimaciones aproximadas el set de concentraciones (ii) pertenece a una clase distinta.

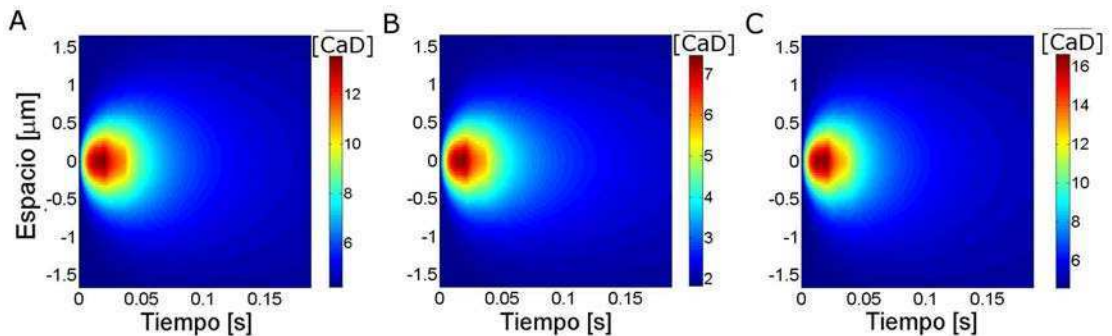


Figura 2.5: Concentración de *dye* ligado a Ca^{2+} obtenida a partir de simulaciones con $n_c = 6$ canales (con una corriente de $0,1\text{pA}$) ubicados en el origen que se abren simultáneamente y que permanecen abiertos durante un tiempo de distribución exponencial con valor medio 20ms . Concentración de *dye* ligado a Ca^{2+} “blurreada” obtenida para: (A) $[F4]_T = 36\mu\text{M}$, $[E]_T = 90\mu\text{M}$ (i); (B) $[R2]_T = 36\mu\text{M}$, $[E]_T = 90\mu\text{M}$ (ii); (C) $[R2]_T = 90\mu\text{M}$, $[E]_T = 45\mu\text{M}$ (iii).

2.7.3. Simulaciones numéricas para estimar la relación señal-ruido esperada y establecer clases de equivalencia

Ahora mostramos los resultados obtenidos usando simulaciones numéricas para computar la relación señal-ruido de las condiciones experimentales exploradas en la Fig. 2.1. Para este ejemplo en particular, simulamos la dinámica de las concentraciones de Ca^{2+} , *dye* y *buffer* como se describió en el Apéndice A.2 usando los parámetros de la Tabla 2.4 pero sin incluir los *buffers* endógenos móviles que están incluidos en esa Tabla. Usamos la misma fuente de Ca^{2+} en los tres casos. En particular, elegimos la situación con $n_c = 6$ RIP₃s que se abren inicialmente cada una de los cuales se va cerrando a un tiempo aleatorio con distribución exponencial de valor medio $t_a = 20\text{ms}$. Elegimos esta fuente porque da una amplitud de la señal del orden de la más chica detectable en el caso del set (i) ($SR \sim 2$). Exploramos otras fuentes obteniendo resultados similares a los ilustrados en esta Sección (datos no mostrados). En la Fig. 2.5 mostramos la distribución de *dye* ligado a Ca^{2+} “blurreada” obtenida en simulaciones que corresponden al set (i) en (A), al set (ii) en (B) y al set (iii) en (C). Una vez que tenemos estos gráficos sin ruido, reemplazamos el valor de la concentración de *dye* ligado a Ca^{2+} en cada píxel por un valor de fluorescencia aleatorio computado como se explicó en la Sección 2.5.2. Mostramos las imágenes ruidosas resultantes en la Fig. 2.6. Para obtener imágenes más realistas también agregamos las franjas oscuras que corresponden a los gránulos en el ovocito. Las Figuras 2.6A y 2.6D corresponden a simulaciones con el set (i), las Figs. 2.6B y 2.6E al set (ii) y las Figs. 2.6C y 2.6F al set (iii). Para pasar de *dye* ligado a Ca^{2+} a distribución de fluorescencia usamos $\gamma = 5$ y $q_1 = 0,45$ para Fluo-4, y $\gamma = 6$ y $q_1 = 0,36$ para Rhod-2, como se deriva del análisis previo. Para el set (iii) (que tiene $[D]_T = 90\mu M$), elegimos $\langle N \rangle$ entre los valores estimados por la Fig. 2.3C, en particular, tomamos $\langle N \rangle = 100$. Con fines comparativos, elegimos $\langle N \rangle = 40 \approx 36/90 \times 100$ para los sets (i) y (ii) (que tienen $[D]_T = 36\mu M$). Las Figs. 2.6A–C fueron obtenidas usando valores de q_2 tal que su cociente respecto de q_1 fuera igual al de las eficiencias cuánticas estimadas en [Akwasaki Minta, Tsien (1989)], esto es, $q_2 = 0,011$ para Fluo-4 (set (i), $q_2/q_1 = 0,025$) y $q_2 = 0,02$ para Rhod-2 (sets (ii) y (iii), $q_2/q_1 = 0,07$). Para analizar el rol de la fluorescencia del *dye* libre en la relación señal-ruido las Figs. 2.6D–F fueron hechas usando $q_2 = 0$ (ver Sección 2.9).

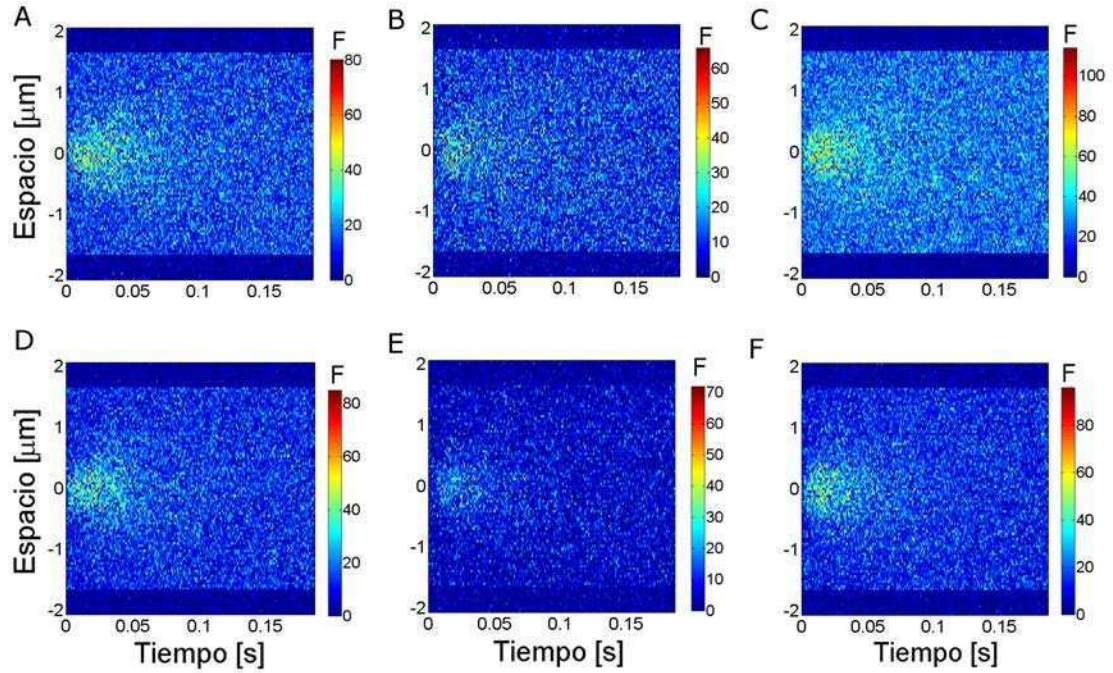


Figura 2.6: Fluorescencia simulada de una imagen linescan durante un experimento Tipo 0. La fluorescencia se computa a partir de las distribuciones de *dye* ligado a Ca^{2+} de la Fig. 2.5 como se explicó en la Sección 2.5.2. (A) y (D) corresponden a los set (i), (B) y (E) corresponden a los set (ii) y (C) y (F) corresponden al set (iii). (A), (B) y (C) se obtuvieron usando q_2/q_1 igual a la relación de las eficiencias cuánticas estimadas en [Youngt, Keizer (1992)]. (D), (E) y (F) se obtienen con $q_2 = 0$, es decir, sin tener en cuenta la fluorescencia debido al *dye* libre. En todos los casos los valores de q_1 son los que se derivan del análisis de fluctuaciones para la intensidad de iluminación estándar.

Comparando las Figs. 2.6A–C observamos que el *puff* es menos distinguible usando Rhod-2 y EGTA en las mismas concentraciones que en las simulaciones con Fluo-4 (Figs. 2.6B). El *puff* se vuelve distinguible cuando la concentración de Rhod-2 aumenta y la de EGTA disminuye (Fig. 2.6C). Estos resultados acuerdan con los de la Fig. 2.1. Esta observación cualitativa es cuantificada en la segunda columna de la Tabla 2.5 donde mostramos la relación señal-ruido computada a partir de la Ec. 2.12 como se explicó en la Sección 2.5.2. Ahí vemos que la relación señal-ruido es más chica para el set de concentraciones (ii) y que el obtenido para el set (iii) es levemente menor que el obtenido para el set (i) de forma tal que se puede esperar un nivel similar de detectabilidad de las señales de Ca^{2+} (es decir en experimentos Tipo 0) para estas dos condiciones experimentales. Las simulaciones numéricas del modelo confirman nuestra comparación previa aproximada entre las configuraciones experimentales exploradas en la Fig. 2.1 poniendo a las condiciones de las Fig. 2.1A y Fig. 2.1C en una clase de equivalencia y a la de Fig. 2.1B en una clase diferente.

Set	$q_2 \neq 0$	$q_2 = 0$
(i)	2.7	2.5
(ii)	2.3	1.5
(iii)	3.1	2.1

Tabla 2.5: Relación SR obtenida en simulaciones ruidosas.

2.8. El modelo como herramienta para elegir parámetros experimentales adecuadamente

Una vez que el modelo es cuantificado para un cierto *dye*, intensidad de iluminación estándar y concentraciones de *dye* y EGTA, puede usarse para determinar cómo los cambios en estos parámetros experimentales afectan la relación señal-ruido. Como esperábamos, se deduce de la Ec. 2.11 que la relación señal-ruido aumenta con $\langle N \rangle$ (es decir, con la concentración de *dye*) y con q_1 (con la intensidad de iluminación o, de forma equivalente, con la intensidad del láser I) mientras que decrece con p_b (es decir, con la concentración basal de Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}$). El modelo de fluctuaciones cuantificado, sin embargo, da más información. Puede usarse para seleccionar las mejores condiciones experimentales en una forma cuantitativa. Como ejemplo, mostramos en la Fig. 2.7 gráficos de la relación señal-ruido, dada por la Ec. 2.12, como función de $\langle N \rangle$ (A), I/I_{est} (B) y $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}$ (C) para dos *dyes*. El propósito de esta figura es doble. Por un lado, permite ilustrar cómo usar el modelo para elegir buenas condiciones experimentales para un cierto *dye* (en el ejemplo, Fluo-4). El segundo beneficio es que muestra cómo elegir buenas condiciones experimentales cuando se busca reemplazar uno de los *dye* por otro que se excita con el mismo láser pero que tiene propiedades fotofísicas distintas (en el ejemplo, Fluo-4 y Fluo-8, respectivamente). Este desarrollo puede aplicarse para mejorar la comparabilidad entre experimentos desarrollados con un *dye* “viejo” y uno “nuevo”. Para estos gráficos primero computamos la relación señal-ruido usando la Ec. 2.12 con los valores $\gamma = 5$, $q_1(I_{\text{est}}) = 0,45$ y $q_2(I_{\text{est}}) = 0,011$, determinado de la aplicación de nuestro método al set (i) con $\langle N \rangle = 40$ en (B) y (C), la intensidad de iluminación estándar, $I = I_{\text{est}}$, en (A) y (C) y $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} = 0,1\mu\text{M}$ en (A) y (B). De estas tres curvas (mostradas en línea llena en la figura) computamos la relación señal-ruido suponiendo que la fracción de moléculas de *dye* que están unidas a Ca^{2+} donde se ubica el máximo de la señal es $p_s = 0,3$ (la mínima amplitud de la señal detectable de acuerdo a lo previamente discutido en la Sección 2.7). Las líneas verticales punteadas indican el rango de valores de $\langle N \rangle$ determinado de la aplicación de nuestro método al set (i) en la Fig. 2.7A, la condición de iluminación estándar, $I/I_{\text{est}} = 1$, en la Fig. 2.7B, y, en la Fig. 2.7C, el valor de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}$ que usamos para el set (i), $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} = 0,1\mu\text{M}$ (que

corresponde a $p_b = 0,1$ y $K_d \cong 0,8\mu M$). De las observaciones de la curva de línea sólida en la Fig. 2.7 concluimos que un aumento moderado de I puede resultar en un cambio notable en la relación señal-ruido de los experimentos Tipo 0 realizados con Fluo-4. Algo similar ocurre con $[Ca^{2+}]_{basal}$, un parámetro cuyo cambio afectaría directamente el tipo de señales que se evocan. Las variaciones naturales en $\langle N \rangle$ que se pueden encontrar cambiando la región del ovocito donde se adquieren las imágenes puede llevar a una mejora del 20% en la relación señal-ruido.

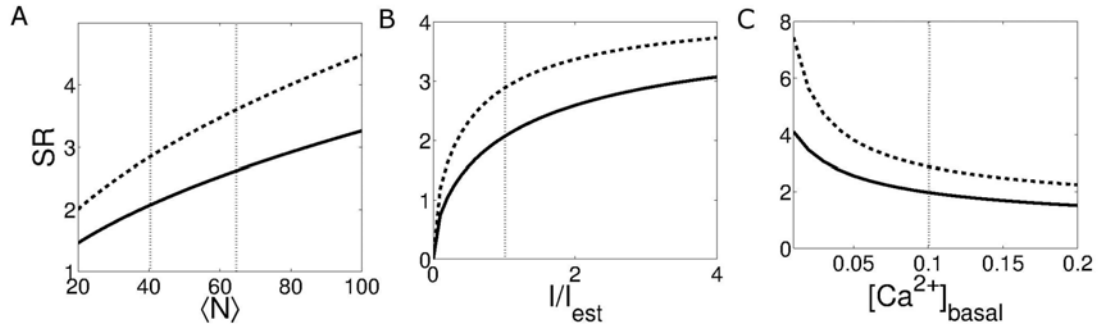


Figura 2.7: Dependencia de la relación señal-ruido con parámetros accesibles experimentalmente. Gráficos de la relación señal-ruido usando la Ec. 2.12 con los valores de los parámetros determinados con Fluo-4 (línea sólida) y con Fluo-8 (línea rayada) como función del valor medio de moléculas $\langle N \rangle$ (A), la intensidad de láser normalizada I/I_{est} (B), y $[Ca^{2+}]_{basal}$ (C). Las líneas verticales punteadas indican el rango de valores de $\langle N \rangle$ y los valores de I/I_{est} y $[Ca^{2+}]_{basal}$ que corresponden al set (i) a la intensidad de iluminación estándar.

Las líneas rayadas en la Fig. 2.7 son equivalentes a las líneas sólidas pero para Fluo-8. Para obtenerlas usamos $K_d = 0,4\mu M$ y supusimos que Fluo-8, cuando está ligado a Ca^{2+} y se excita con el láser de $488nm$, es aproximadamente dos veces más brillante que Fluo-4, mientras que el brillo de la forma libre es aproximadamente el mismo para los dos *dye* (ver ejemplo en la hoja de especificaciones de Fluo-8, Teflabs). Las últimas dos hipótesis implican que para pasar de la Ec. 2.11 a la Ec. 2.12 reemplazamos q_1 por $2q_1(I_{est})I/I_{est} = 0,91I/I_{est}$ y $\xi = 0,00125$. Estimamos el valor de p_s para Fluo-8 simplemente suponiendo que la diferencia con el valor usado para Fluo-4 ($p_s = 0,3$) era el mismo que si el Ca^{2+} y el *dye* estuvieran en equilibrio en el pico de la señal en ambos casos. Esto es, determinamos $[Ca^{2+}]_{señal}$ en el pico relacionándolo con $p_{s,i}$ como $p_{s,i} = 0,3 = [Ca^{2+}]_{señal}/([Ca^{2+}]_{señal} + K_d(Fluo4))$ y luego computamos $p_s(Fluo8)$ usando la misma fórmula pero con $K_d(Fluo8)$. Obtuvimos $p_s(Fluo8) \cong 0,5$. Como en el caso de Fluo-4, usamos $\langle N \rangle = 40$ en (B) y (C), la intensidad de iluminación estándar, $I = I_{est}$, en (A) y (C) y $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,1\mu M$ en (A) y (B). De la comparación de las líneas sólidas y rayadas podemos estimar por cuánto habría que cambiar los valores de los parámetros accesibles experimentalmente para obtener relaciones señal-ruido equivalentes con el *dye* viejo (Fluo-4) y el nuevo (Fluo-8).

2.9. Discusión y conclusiones

Las técnicas ópticas y los *dyes* fluorescentes de Ca^{2+} ofrecen la posibilidad de observar señales intracelulares de Ca^{2+} con mínima disrupción. Los cambios en la fluorescencia que ocurren durante las señales están relacionados a la concentración de *dye* ligado a Ca^{2+} , una cantidad que no sólo depende del Ca^{2+} libre sino también de la habilidad del *dye* para superar otros mecanismos que atrapan Ca^{2+} como los *buffers*. Más aún, cuando se quiere observar señales localizadas de Ca^{2+} evocadas por IP_3 , típicamente se introduce un *buffer* exógeno de Ca^{2+} como EGTA en la célula para disrumpir la comunicación mediada por Ca^{2+} entre *clusters* de canales. Este *buffer* adicional también compite con el *dye* por el Ca^{2+} y puede deteriorar la relación señal-ruido. Hay un gran interés en estudiar las señales locales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 (*puffs*) dado que constituyen los componentes básicos de señales más globales. Los *puffs* son altamente estocásticos. Con el fin de tener una descripción estadística precisa de sus propiedades es necesario tener experimentos que reporten la ocurrencia de los *puffs* con similar nivel de precisión para todo el rango de tamaños de eventos. Ser capaz de estimar la relación señal-ruido que se puede esperar de la configuración experimental puede al menos dar información sobre la confiabilidad de las distribuciones obtenidas en el rango de eventos pequeños. En este trabajo introducimos un método que provee una estimación de la relación señal-ruido de los experimentos que usan *dyes* de Ca^{2+} de longitud de onda única y EGTA. Estos son los *dyes* que se utilizan para observar señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 y que son evocadas por la liberación de IP_3 con iluminación UV.

Nuestro abordaje para explorar el rendimiento de los experimentos de observación de Ca^{2+} está basado en el método de Number & Brightness (N&B) de [Dalal et al. (2008); Digman et al. (2008)]. Éste implica la realización de una serie de experimentos en condiciones estacionarias (Tipo I-III) a partir de los cuales pueden cuantificarse los parámetros del modelo de fluctuaciones de la fluorescencia que también propusimos en este Capítulo. Combinando las cuantificaciones del modelo de fluorescencia con simulaciones de la dinámica de Ca^{2+} intracelular en presencia de una fuente de Ca^{2+} localizada puede estimarse la relación señal-ruido esperada en experimentos con señal evocada (Tipo 0) y pueden generarse imágenes con ruido realista. En nuestro problema hay una fuente adicional de fluctuaciones con respecto al método de N&B, incluso en condiciones estacionarias. Además de las variaciones en el número total de moléculas fluorescentes y del número de fotones detectados, también pueden contribuir a las fluctuaciones de la fluorescencia en un píxel las variaciones en la fracción de moléculas de *dye* ligadas a Ca^{2+} . Más aún, esta fracción depende del número de iones de Ca^{2+} libres en la región de interés que también es una variable dinámica. Nuestro método involucra una simplificación en este sentido: suponemos que la probabilidad, p , de que una

molécula de *dye* esté pegada a Ca^{2+} está fija en condiciones basales (estacionarias) y que su dinámica está gobernada por ecuaciones deterministas (Ecs. A.5- A.8) durante las señales de Ca^{2+} . De este modo, en ausencia de señales, el modelo de fluctuaciones de nuestro método tiene cinco parámetros desconocidos: el factor de amplificación γ , el número de fotones emitidos por molécula de *dye* pegada a Ca^{2+} y de *dye* libre, que llegan al detector durante cada paso de adquisición, q_1 y q_2 , la probabilidad de que una molécula de *dye* esté pegada a Ca^{2+} , p , y el número medio de moléculas de *dye* que contribuyen a la fluorescencia en un píxel, $\langle N \rangle$. Estos parámetros desconocidos se reducen a cuatro si se conoce q_2/q_1 , como se supone en este trabajo. Cuando cuantificamos los parámetros de nuestro modelo, también supusimos que p y $\langle N \rangle$ podían variar entre las regiones de la misma muestra (en nuestro caso, el ovocito) y entre muestras (entre ovocitos). Este aumento del número de parámetros cuantificables con respecto a la técnica de N&B implica que nuestro método precisa la realización de más experimentos que el de N&B. En uno de estos experimentos adicionales se varía el $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}$, lo que varía p . El objetivo de nuestro método es más restringido que el de la técnica de N&B y esto simplifica el análisis. No intentamos construir un mapa píxel a píxel de $[\text{Ca}^{2+}]$, sólo estamos interesados en tener un modelo cuantificado realista de la distribución de las fluctuaciones de la fluorescencia.

Contar con un modelo realista de fluctuaciones de la fluorescencia puede resultar útil para estimar la corriente de Ca^{2+} que subyace a una imagen. Una posibilidad es hacerlo por medio de lo que se llama “forward approach” [Smith et al. (1998)] en el cual la imagen obtenida experimentalmente es directamente comparada con la que se genera mediante simulaciones numéricas como en las Figs. 2.6A–F. Nuestro modelo de fluctuaciones de la fluorescencia puede también ser útil en métodos de tipo “backward” en los cuales la corriente es inferida directamente a partir de la imagen [Soeller, Cannell (2002); Ventura et al. (2005)]. Incluso en este tipo de abordaje, una vez que se infiere la corriente, se genera una imagen simulada numéricamente para comparación directa con los experimentos y esto requiere la adición de ruido que normalmente se realiza de forma *ad hoc* [Izu et al. (2001); Ríos et al. (1999)].

Nuestro método puede usarse para identificar fluctuaciones pequeñas de fluorescencia debidas a liberaciones de Ca^{2+} a través de unos pocos canales abiertos. Esto es relevante cuando se usan técnicas ópticas que infieren la cinética de un único canal (conocidas como “optical patch clamp”) [Demuro, Parker (2005)]. En el caso de los RIP_3s es particularmente importante poder identificar la apertura de un único canal. De acuerdo a una variedad de experimentos, los RIP_3s difunden en la membrana del RE [Pantazaka, Taylor (2011); Smith et al. (2013)] y mientras algunas observaciones parecen indicar que el agrupamiento de RIP_3s ocurre como consecuencia de la estimulación con IP_3 [Diambra, Marchant (2009); Taufiq-Ur-Rahman et al. (2009)], otros experimentos indican que

los *puffs* de Ca^{2+} ocurren en una posición fija de la célula [Wiltgen et al. (2010)]. Para resolver esta paradoja es importante poder separar fluctuaciones espontáneas de cambios pequeños en la fluorescencia debido a liberaciones de Ca^{2+} . Cuando se trata de analizar la dinámica del Ca^{2+} luminal durante la ocurrencia de señales localizadas como se hizo en [Brochet et al. (2005)] también es necesario detectar cambios pequeños en la fluorescencia respecto de un fondo elevado. En [Brochet et al. (2005)] las fluctuaciones debido a la liberación de Ca^{2+} son distinguidas de las fluctuaciones espontáneas de la fluorescencia por medio de un análisis que supone que las fluctuaciones siguen una distribución Poissoniana. Un modelo como el construido con nuestro método, que cuantifica las fluctuaciones de cada configuración experimental específica y que separa el ruido del fondo debido a las fluctuaciones en el número de moléculas fluorescentes de las del número de fotones detectados [Bridge et al. (1999)] puede ser una herramienta útil para identificar si las fluctuaciones pequeñas en el Ca^{2+} luminal se deben a liberaciones de Ca^{2+} hacia el citosol o no.

2.9.1. Tests de autoconsistencia del método

En este trabajo usamos nuestro método para comparar las propiedades de detectabilidad de las señales en experimentos realizados con dos *dyes* diferentes y a concentraciones distintas. Antes de discutir las relaciones señal-ruido que pudimos estimar para los sets (i)-(iii), realicemos ahora algunas pruebas de autoconsistencia. La primera prueba consiste en determinar el rango de valores de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}$ compatibles con los parámetros del modelo de fluctuaciones que estimamos para los sets (i)-(iii). En particular, usando los valores de γ , q_1 y q_2 a la intensidad de la iluminación estándar podemos establecer un rango de valores posibles para la probabilidad de que una molécula de *dye* esté unida a Ca^{2+} en las condiciones exploradas en los distintos tipos de experimentos. En particular, lo hacemos para los experimentos Tipo III comenzando por el set (i). Para este fin usamos la Ec. 2.9 con $\gamma(1 + q_1 + q_2) \approx 7,3 - 7,5$ para ajustar los puntos de la Fig. 2.2C con fluorescencia suficientemente baja como para garantizar que corresponden a condiciones de Ca^{2+} basal. En particular, lo hacemos para los puntos con $\langle F \rangle \leq 12$ y con $\langle F \rangle \leq 18$. Aplicando la Ec. 2.9 a estos puntos obtenemos para cada uno de ellos un valor de la ordenada, $-\gamma^2 q_1 q_2 \langle N \rangle$. Suponiendo que $p = p_b$ para estos puntos usamos la Ec. 2.5 para escribir $\gamma^2 q_1 q_2 \langle N \rangle = \gamma \langle F \rangle q_2 / (p_b + q_2/q_1)$. De esta igualdad determinamos un rango de posibles valores de p_b . En este caso encontramos $p_b \approx (0,1 - 0,7) q_2/q_1$. Esto significa que, para el set (i), la contribución a la fluorescencia del *dye* ligado a Ca^{2+} es comparable a la del *dye* libre en condiciones basales. Usando $p_b = 0,7 q_2/q_1$, $q_2/q_1 = 0,025$ y $K_d \cong 0,8 \mu\text{M}$ la relación $p_b = \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} + K_d} \cong 0,7 q_2/q_1$ implica que $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} \cong 0,014 \mu\text{M}$ que es chico pero resulta un valor razonable. Procedemos ahora de manera similar para el set

(iii). Esto es, usamos la Ec. 2.9 con $\gamma(1 + q_1 + q_2) \approx 8,18$ para los puntos de la Fig. 2.4C con $\langle F \rangle < 22$ y así determinamos el rango de valores posibles de $-\gamma^2 q_1 q_2 \langle N \rangle$. Usando la Ec. 2.5 para escribir $\gamma^2 q_1 q_2 \langle N \rangle = \gamma \langle F \rangle q_2 / (p_b + q_2/q_1)$ encontramos que p_b es despreciable frente a q_2/q_1 . Esto quiere decir que la fluorescencia basal es dominada por la de las moléculas de *dye* libre en este caso. Luego concluimos de nuestras estimaciones que en el caso de Rhod-2, en condiciones basales, casi toda la fluorescencia proviene de moléculas de *dye* libre mientras que la contribución de las moléculas de *dye* ligadas a Ca^{2+} es comparable con la de las moléculas libres para el caso de Fluo-4. Suponiendo que q_2/q_1 es del orden del cociente de eficiencias cuánticas estimadas para Rhod-2 en [Akwasaki Minta, Tsien (1989)], $q_2/q_1 = 0,07$, la relación $p = p_b = \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} + K_d} \cong q_2/q_1$ con $K_d \cong 2\mu\text{M}$ (valor provisto por Invitrogen) implica que $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} \ll 0,15\mu\text{M}$ que es consistente con la estimación obtenida para Fluo-4 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} \cong 0,014\mu\text{M}$). Más aún, para los pocos puntos del set (iii) para los cuales pudimos estimar p_b obtuvimos $p_b \sim 0,18q_2/q_1$ que implica $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} \cong 0,026\mu\text{M}$, un valor dentro del mismo orden de magnitud que el derivado para Fluo-4.

La segunda prueba consiste en comparar el rango de valores de $\langle N \rangle$ que puede inferirse de los experimentos Tipo I para los casos (i) y (iii) (Figs. 2.2A y 2.4A) con aquellos que se derivan de los experimentos Tipo II (Figs. 2.2B y 2.4B). Particularmente, de los experimentos ilustrados en la Fig. 2.2B también podemos estimar $\langle N \rangle$ en la región observada, si suponemos que los valores de $p = p_b$ y q_2/q_1 son conocidos. El ajuste de la curva en la Fig. 2.2B, que no es muy bueno, estima el prefactor del término no lineal, $\langle F \rangle^2$, como 0,04. Entonces, de acuerdo a la Ec. 2.8 resulta $\frac{1}{\langle N \rangle} \frac{p + q_2^2/q_1^2}{(p + q_2/q_1)^2} \cong 0,04$, de la cual obtenemos $\langle N \rangle \approx 140$ si usamos $p_b = 0,125$ y $\langle N \rangle \approx 250$ si usamos $p_b = 0,03$. Estos números son entre 1,4 y 2 veces más grandes que el valor más grande derivado de la Fig. 2.2A. La diferencia puede atribuirse a la baja calidad del ajuste de la Fig. 2.2B. Procediendo de manera similar para el caso (iii), estimamos $\langle N \rangle = 115$ del ajuste de la Fig. 2.4B usando $p = p_b = 0,05$. Este valor está dentro del rango de valores de $\langle N \rangle$ derivado de la Fig. 2.4A para el mismo caso. La estimación es $\langle N \rangle = 78$ para $p_b = 0,01$ (que corresponde a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} = 0,02\mu\text{M}$). Este valor es más chico que la estimación más baja de la Fig. 2.4A y parece indicar que en los experimentos de la Fig. 2.4B se cumple que $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} > 0,02\mu\text{M}$.

La tercera prueba consiste en comparar el rango de valores de $\langle N \rangle$ obtenido para los tres sets de concentraciones entre sí. Del ajuste de la Fig. 2.2A para el set de concentraciones (i), encontramos $41 < \langle N \rangle < 65$ usando $p_b = 0,125$ (que corresponde a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} = 0,1\mu\text{M}$ usando $K_d \cong 0,8\mu\text{M}$) y $113 < \langle N \rangle < 177$ usando $p_b = 0,03$ (que corresponde a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} = 0,02\mu\text{M}$). El ajuste de la Fig. 2.2B no dio una estimación confiable de $\langle N \rangle$. Del ajuste de la Fig. 2.3A para el set de concentraciones (ii) obtuvimos $39 < \langle N \rangle < 98$ usando $p_b = 0,05$ (que corresponde a

$[Ca^{2+}]_{basal} = 0,1\mu M$ usando $K_d \cong 2\mu M$) y $58 < \langle N \rangle < 145$ usando $p_b = 0,01$ (que corresponde a $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,02\mu M$). Estos valores son consistentes con los derivados en el caso (i) que tiene la misma concentración de *dye* y EGTA. Del ajuste de la Fig. 2.4A (para el set (iii)), obtuvimos $98 < \langle N \rangle < 177$ usando $p_b = 0,05$ (que corresponde a $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,1\mu M$) y $145 < \langle N \rangle < 260$ usando $p_b = 0,01$ (que corresponde a $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,02\mu M$). Estos valores de $\langle N \rangle$ son entre 1,8 y 2,5 veces más grandes para los puntos de la Fig. 2.4A que para los de la Fig. 2.3A, lo cual es consistente con el hecho de que la concentración del *dye* en la Fig. 2.4A es 2,5 veces más grande que en la Fig. 2.3A.

Resumiendo, nuestro método pasa exitosamente una serie de pruebas de autoconsistencia y nos permite estimar γ , q_1 y q_2 a la intensidad de iluminación estándar (el último suponiendo valores conocidos de q_2/q_1) y un rango de valores de $\langle N \rangle$ en los tres ejemplos explorados en este trabajo.

2.9.2. Relación señal-ruido estimada con el método

Cuando aplicamos nuestro método para estimar la relación señal-ruido en los experimentos ilustrados en la Fig. 2.1 de nuevo el desempeño fue bueno. Más específicamente, el método determinó que la relación señal-ruido esperada para las condiciones de las Figs. 2.1A y 2.1C eran similares entre sí, mientras que la de la Fig. 2.1B era mucho menor. Esto es consistente con el hecho de que no podíamos observar *puffs* de Ca^{2+} en las condiciones experimentales de la Fig. 2.1B, pero sí en las otras dos combinaciones. Es decir, nuestro método clasifica los experimentos del ejemplo de forma correcta en términos de la detectabilidad de la señal. Más aún, el método puede usarse para determinar hasta qué punto cambios en ciertos parámetros experimentales puede llevar a una mejora apreciable de la relación señal ruido, como se muestra en la Fig. 2.7. Esta figura también muestra cómo el método puede usarse para garantizar la comparabilidad de las señales entre experimentos realizados con dos *dyes* distintos cuando el *dye* usado en una serie de experimentos necesita cambiarse porque se ha discontinuado o para cambiarlo por uno mejorado.

2.9.3. Información adicional que puede inferirse con el método

Tener un modelo de fluctuaciones realista permite ir más allá de una mera clasificación, dando más información sobre las condiciones experimentales de la observación. En particular, podemos investigar en más detalle qué factores son los que más afectan la detectabilidad de las señales como hicimos en este Capítulo. Más específicamente,

exploramos hasta qué punto las distintas cinéticas de los *dyes* y las distintas concentraciones de EGTA son responsables de los distintos tipos de comportamientos observados. Para explorar el efecto de las distintas cinéticas de los *dyes* en las imágenes observadas, analizamos la concentración de *dye* ligado a Ca^{2+} “blurreada” obtenida con las simulaciones. Las concentraciones obtenidas se muestran en la Fig. 2.5. A simple vista esta figura no muestra diferencias significativas entre las tres situaciones simuladas que corresponden a los tres sets de concentraciones (i) (A), (ii) (B) y (iii) (C). Esto coincide con una descripción más cuantitativa de las simulaciones. En particular, el cociente entre la concentración de *dye* ligado a Ca^{2+} en el pico de la señal simulada y su valor basal, es aproximadamente el mismo para todas las figuras. Investigamos hasta qué punto estos resultados dependen del modelo simplificado que usamos para las simulaciones. En particular, agregamos un *buffer* móvil y exploramos un rango amplio de estos parámetros siempre obteniendo el mismo comportamiento. Los resultados de la Fig. 2.5 y estos estudios adicionales implican que las diferencias en la detectabilidad observada entre los casos (i) y (iii) en comparación con el caso (ii) no puede atribuirse a diferencias en la distribución de *dye* ligado a Ca^{2+} subyacente. Podemos en cambio reproducir las propiedades de detectabilidad de las tres condiciones experimentales de la Fig. 2.1 a partir de generar numéricamente imágenes ruidosas usando nuestro modelo de fluctuaciones de la fluorescencia. Esto también muestra que la relación dada por la Ec. 2.3 no siempre brinda una buena estimación del incremento en la concentración de *dye* ligado a Ca^{2+} durante las señales con respecto a las mismas concentraciones en condiciones basales.

Al concluir que las diferencias de detectabilidad entre los experimentos de las Figs. 2.1A y 2.1B no pueden explicarse por las diferencias en la distribución de *dye* ligado a Ca^{2+} subyacente nos llevó a ponderar en las imágenes el rol de la fluorescencia del *dye* libre de Ca^{2+} . Para este fin, generamos imágenes ruidosas combinando el modelo de fluctuaciones con simulaciones numéricas pero sin incluir la contribución de las moléculas de *dye* libre (fijando $q_2 = 0$). Mostramos los resultados en las Figs. 2.6A–C. Lo que puede observarse a simple vista es confirmado por la comparación cuantitativa de la Tabla 2.5. En la primera columna de esta tabla mostramos la relación señal-ruido obtenida usando $q_2 = 0$. Ahí vemos que la relación obtenida para el caso (ii) es solo un poco más chica que la del caso (i). Esto no coincide con lo observado en los experimentos Tipo 0 realizados con estos sets de *dye* y EGTA (Fig. 2.1). Luego concluimos que el ruido no explica por sí solo el hecho de que Rhod-2 no sea capaz de reportar la ocurrencia de los *puffs* cuando se usa a bajas concentraciones. Lo que es relevante para las diferencias en detectabilidad ente Fluo-4 y Rhod-2 es la contribución del *dye* libre a la fluorescencia. Esto resulta evidente también en la estimación de p_b que se deriva combinando los ajustes de las Figs. 2.2A y 2.2C o 2.4A y 2.4C cuando se compara con

q_2/q_1 . De las Figs. 2.2A y 2.2C obtuvimos $p_b \cong (0,1 - 0,7)q_2/q_1$ para el set de concentraciones (i). Esto significa que para esta configuración la contribución del *dye* ligado a Ca^{2+} a la fluorescencia puede ser comparable a la del *dye* libre en condiciones basales. Combinando los resultados de las Figs. 2.4A y 2.4C obtuvimos $p_b \leq q_2/q_1$ (y como mucho $p_b \sim 0,18q_2/q_1$) para el set (iii). Esto significa que la fluorescencia basal se debe principalmente a las moléculas de *dye* libre para esta configuración experimental.

Los diferentes valores de $[E]_T$ usados en los experimentos de las Figs. 2.1B y 2.1C también juegan un rol relevante para mejorar las propiedades de detectabilidad del set (iii) cuando se comparan con las del (ii). Esto se refleja en los distintos comportamientos que tienen las curvas de σ_F^2 vs $\langle F \rangle$ cuando se varía la intensidad de la iluminación en las dos configuraciones experimentales (Figs. 2.3B y 2.4B). Mientras que la curva de la Fig. 2.4B tiene forma parabólica, ésta se mantiene como una línea recta para la Fig. 2.3B. Para interpretar esta diferencia tenemos en cuenta la Ec. 2.8 que se supone es la que describe las Figs. 2.3B y 2.4B. El término no lineal de la ecuación es despreciable para $\langle F \rangle$ muy pequeño y se vuelve comparable o mayor al lineal cuando $a \equiv \gamma \langle F \rangle \leq b \equiv \frac{\langle F \rangle^2}{\langle N \rangle} \frac{p+q_2^2/q_1^2}{(p+q_2/q_1)^2}$. Insertando la Ec. 2.5 en esta desigualdad obtenemos $q_1 \geq c \equiv \frac{p+q_2/q_1}{p+q_2^2/q_1^2}$. Como $q_2/q_1 < 1$, la cantidad $c \geq 1$. Más aún, si $p \gg q_2/q_1$, $c \cong 1$, mientras que para $p \gg q_2/q_1$, es $c \cong q_1/q_2 \gg 1$. Esto implica que cuanto más chico es p respecto de q_2/q_1 , para que se note el término no lineal de la Ec. 2.8, q_1 tiene que ser más grande. Entonces, el distinto comportamiento de las Figs. 2.3B y 2.4B podría atribuirse a que en la 2.3B el valor de $p = p_b$ es más pequeño. Esto, podría deberse a que en la Fig. 2.4B se utiliza una mayor concentración de EGTA respecto de la 2.3B. Este análisis sumado al hecho de que no se observó un aumento en la fluorescencia cuando se realizaron las microinyecciones de Ca^{2+} para el set de concentraciones (ii), es un indicador de que para esta configuración experimental el EGTA está capturando Ca^{2+} de forma más eficiente que el *dye*. Esto explica por qué es necesario usar un valor mayor de $[D]_T$ y menor de $[E]_T$ para reportar la ocurrencia de señales localizadas usando Rhod-2, con el mismo nivel de detectabilidad que con Fluo-4. Este análisis no solo ilustra las posibles aplicaciones de nuestro método. También indica que, en algunos casos, para determinar que ciertas combinaciones de *dye* y EGTA no son adecuadas, no es necesario computar la relación señal-ruido por medio de simulaciones numéricas. En particular, el comportamiento de la Fig. 2.3B ya puede tomarse como una indicación de que el set (ii) no es el más adecuado para la observación de señales de Ca^{2+} .

Capítulo 3

Efecto de las condiciones experimentales sobre las señales de Ca^{2+} evocadas y su observación

3.1. Resumen

Como mencionamos anteriormente, para estudiar la cinética de los *puffs* en muchos experimentos se agrega un *buffer* de Ca^{2+} exógeno lento (típicamente EGTA) [Marchant, Parker (2001b)]. Debido a que la cinética de EGTA es lenta se supone que la adición de este *buffer* no altera el CICR dentro del *cluster* ni compite con el *dye* por el Ca^{2+} durante la señal localizada sino que sólo dificulta la comunicación entre *clusters* vecinos mediada por Ca^{2+} impidiendo así la propagación de ondas. Se supone entonces que ni la dinámica del Ca^{2+} que subyace a los *puffs* ni la distribución de la fluorescencia se ven afectadas por la presencia del EGTA.

En este Capítulo estudiamos hasta qué punto los experimentos realizados con distintos *dyes* y/o $[E]_T$ son capaces de detectar *puffs* de Ca^{2+} con similar precisión y de qué modo las distintas configuraciones experimentales afectan las propiedades de los *puffs* observados. Analizamos también si la dinámica del Ca^{2+} que subyace a los *puffs* es la misma independientemente de la configuración utilizada. Para contestar estas preguntas combinamos simulaciones numéricas con experimentos realizados en ovocitos de *Xenopus laevis* usando EGTA y los mismos dos *dyes* de Ca^{2+} de distinta cinética del Capítulo anterior, Fluo-4 y Rhod-2. Usamos el método de clasificación introducido en

el capítulo anterior [Piegari et al. (2014)] para elegir la combinación de concentraciones de *dye* y EGTA que deberían reportar la ocurrencia de una señal de Ca^{2+} subyacente con similar relación señal-ruido (sets (i) y (iii) del Capítulo anterior). Luego repetimos los experimentos usando Fluo-4 y distintas concentraciones de EGTA. La comparación cuantitativa de las distribuciones de las propiedades de los *puffs* obtenidas para las distintas combinaciones muestra que el conjunto de eventos observados difiere debido a que las combinaciones analizadas tienen distinta capacidad para alterar la comunicación entre *clusters* mediada por Ca^{2+} , incluso cuando ambos *dyes* tienen la misma capacidad de detectar los *puffs* de Ca^{2+} . En particular los *puffs* que presentan el crecimiento de la fluorescencia más rápido entre los observados con el set (i) no aparecen en los experimentos realizados con el set (iii). Estos eventos que se pierden corresponden a señales en las que la eficiencia de CICR dentro del *cluster* es muy alta también se corresponden con los *puffs* de mayor amplitud. Es decir, las mayores amplitudes son obtenidas en donde los RIP_3 s que se abren están muy cerca unos de otros. Los experimentos desarrollados bajo condiciones distintas permiten, por lo tanto, extraer información sobre la organización espacial que subyace a las observaciones. Los experimentos y las simulaciones numéricas también muestran que la amplitud de la fluorescencia está relacionada de forma no lineal con el incremento en el Ca^{2+} libre incluso si el *dye* no está saturado como se ha observado previamente en [Cao et al. (2013); Solovey et al. (2011)].

3.2. Métodos

Los ovocitos fueron tratados como se describe en el Apéndice A.1. Las concentraciones finales de Fluo-4, Rhod-2 e IP_3 fueron $36\mu\text{M}$, $90\mu\text{M}$ y $9\mu\text{M}$, respectivamente. La concentración final de EGTA se varió entre $45\mu\text{M}$ y $300\mu\text{M}$ para los experimentos realizados con Fluo-4, y se dejó fija en $45\mu\text{M}$ para los experimentos con Rhod-2 (ver Tabla 3.1).

Experimento	Tipo de <i>dye</i> y concentración	$[E]_T(\mu\text{M})$
Tipo A	$[F4]_T = 36\mu\text{M}$	90
Tipo B	$[F4]_T = 36\mu\text{M}$	300
Tipo C	$[R2]_T = 90\mu\text{M}$	45

Tabla 3.1: Combinación de concentraciones de *dye* y EGTA que se usan para el trabajo de este Capítulo.

3.3. Resultados

3.3.1. El efecto de EGTA sobre las propiedades de los *puffs*

3.3.1.1. Experimentos: se observan *puffs* con un crecimiento de la fluorescencia más rápido para cantidades más grandes de $[E]_T$

En las Figs. 3.1A y 3.1B mostramos la distribución del rise time, t_R , obtenida para los experimentos Tipo A (A) y Tipo B (B). Los correspondientes valores medios, $\langle t_R \rangle$, y desvío estándar, σ_{t_R} , son $\langle t_R \rangle = 126,1ms$ y $\sigma_{t_R} = 129,9ms$ para el Tipo A y $\langle t_R \rangle = 93,7ms$ y $\sigma_{t_R} = 63,5ms$ para el Tipo B. De forma análoga, en las Figs. 3.1C y 3.1D mostramos la distribución de amplitudes obtenidas para experimentos Tipo A (C) y Tipo B (D). Los correspondientes valores medios, $\langle A \rangle$, y desvíos estándar, σ_A , son $\langle A \rangle = 1,8au$ y $\sigma_A = 0,9au$ para el Tipo A y $\langle A \rangle = 1,5au$ y $\sigma_A = 0,7au$ para el Tipo B. La comparación directa de las distribuciones mediante un test de Kolmogorov sobre las correspondientes CDFs rechaza la hipótesis nula de que las amplitudes vienen de la misma distribución continua con un nivel de significancia del 5% ($p_{value} = 0,002$). Sin embargo, los experimentos previos y las simulaciones numéricas muestran que las amplitudes de los *puffs* no se ven alterados por la presencia de EGTA. Simulamos numéricamente la dinámica de Ca^{2+} en el medio citosólico como se describe en el Apéndice A.2 con los valores de los parámetros que se muestran en la Tabla 2.4, sin considerar los *buffers* móviles rápido y lento, y tomando $n_c = 10$ canales para la fuente. Las simulaciones presentadas en la Fig. 3.2 muestran una disminución pequeña (3%) en la amplitud del *puff* con la presencia de EGTA (Fig. 3.2B). Esta disminución en la amplitud puede ser la causante en parte de las diferencias en las distribuciones de las Figs. 3.1C y 3.1D. Los cambios en el valor absoluto de la amplitud también podrían deberse a cambios en algunas propiedades experimentales. Comparamos las correspondientes CDFs multiplicando todas las amplitudes del experimento Tipo B por el factor 1,3, con el fin de testear si las dos distribuciones se vuelven similares si las amplitudes observadas en un tipo de experimento se multiplican por un factor común. En ese caso el test de Kolmogorov no puede rechazar la hipótesis nula de que las amplitudes (re-escaleadas) provengan de la misma distribución continua con un nivel de significancia del 5% ($p_{value} = 0,082$). Esto se vuelve evidente en la Fig. 3.1E donde mostramos la CDF de A para el experimento Tipo A (línea gris) y de $1,3 \cdot A$ para el Tipo B (línea punteada negra).

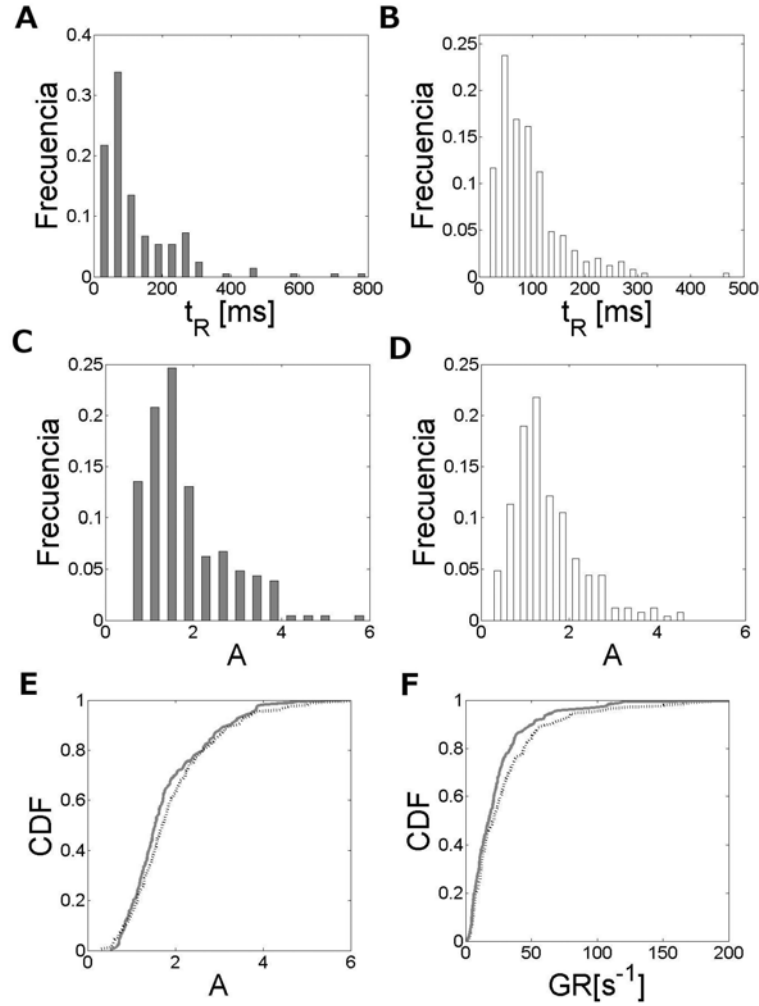


Figura 3.1: Distribuciones de rise time, amplitud y tasa de crecimiento de la amplitud de los *puffs* usando Fluo-4 y dos concentraciones distintas de EGTA. (A-D) Las distribuciones obtenidas de $N = 207$ *puffs* observados en experimentos Tipo A (A, C) y $N = 248$ *puffs* observados en experimentos Tipo B (B, D). El valor medio y el desvío estándar del rise time son, respectivamente, $\langle t_R \rangle = 126,1ms$ y $\sigma_{t_R} = 129,9ms$ para experimentos Tipo A y $\langle t_R \rangle = 93,7ms$ y $\sigma_{t_R} = 63,5ms$ para experimentos Tipo B. Los correspondientes valores medios de la amplitud ($\langle A \rangle$) y desvíos estándar (σ_A) son $\langle A \rangle = 1,8u.a.$ y $\sigma_A = 0,9u.a.$ para experimentos Tipo A (C) y $\langle A \rangle = 1,5u.a.$ y $\sigma_A = 0,7u.a.$ para experimentos Tipo B (D). (E) Función densidad acumulada (CDF por las siglas en inglés) de A para experimentos Tipo A (línea gris) y $1,3 \cdot A$ para experimentos Tipo B (línea negra de puntos). (F) CDF del GR (tasa de crecimiento de la amplitud) para experimentos Tipo A (línea gris) y para experimentos Tipo B (línea negra de puntos). En esta última la tasa de crecimiento se computó incluyendo el factor 1,3 de conversión en la amplitud.

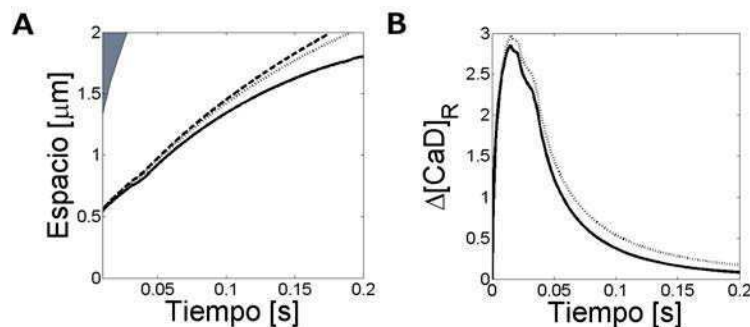


Figura 3.2: Simulaciones deterministas en presencia de una fuente de Ca^{2+} , $[F4]_T = 36\mu\text{M}$ y distintas concentraciones de EGTA. Las simulaciones numéricas se realizaron como se explicó en el Apéndice A.2 usando los valores de la Tabla 2.4 sin *buffers* endógenos móviles, $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,1\mu\text{M}$, $[F4]_T = 36\mu\text{M}$ y $[E]_T = 0, 90, 300\mu\text{M}$. La amplitud de la corriente y la dependencia temporal es la misma en todas las simulaciones. Hay una fuente puntual de 10 RIP_{3s} de $0,1\text{pA}$ que se cierran estocásticamente con un tiempo tomado de una distribución exponencial de valor medio 20ms . De la simulación extraemos los términos de la reacción R_{CaX} , definido en la Ec. A.9 para $X = E$ y $X = F4$, como función de la posición y del tiempo a lo largo del linescan. (A): Curvas para las cuales cambia de signo el término de reacción $RF = R_{CaF4}$ para $[E]_T = 0$ (línea rayada), $[E]_T = 90\mu\text{M}$ (línea punteada) y para $[E]_T = 300\mu\text{M}$ (línea sólida) y para los dos últimos casos la región donde $RE = R_{CaE} < 0$ (región sombreada). $RF < 0$ arriba de cada curva. Se puede observar que CaE o $CaF4$ no son fuentes de Ca^{2+} cerca de la fuente. (B): $\Delta[CaD]_R$ en la ubicación de la fuente para $[E]_T = 90\mu\text{M}$ (línea punteada) y para $[E]_T = 300\mu\text{M}$ (línea sólida). $\Delta[CaD]_R$ es levemente más chica para $[E]_T = 300\mu\text{M}$ que para $[E]_T = 90\mu\text{M}$.

Las Figs. 3.1A y 3.1B muestran que, en promedio, el rise time de los *puffs* observados en los experimentos Tipo B es más chico que en los observados en los Tipo A. Las diferencias en las distribuciones se confirmaron con el test de Kolmogorov que rechaza la hipótesis de que los datos recolectados provengan de la misma distribución continua con un $p_{value} = 0,029$. La Fig. 3.1E muestra que las distribuciones de amplitud coinciden cuando una de ellas se multiplica por un factor de conversión (en este caso, 1,3). Ahora comparamos la tasa a la que crece la amplitud en ambos casos. Basados en los resultados de la Fig. 3.1E trabajamos usando $1,3 \cdot A$ para el experimento Tipo B. Mostramos la correspondiente CDF en la Fig. 3.1F. El test de Kolmogorov rechaza la hipótesis nula de que las tasas de crecimiento de las amplitudes re-escaladas provengan de la misma distribución continua con un nivel de significancia del 6,2% ($p_{value} = 0,061$). Restringiendo la comparación a las tasa, GR , menores a 100s^{-1} el test de Kolmogorov no puede rechazar la hipótesis nula de que dichas tasas provengan de la misma distribución continua con un nivel de significancia del 5% ($p_{value} = 0,528$).

3.3.1.2. Simulaciones numéricas: el efecto al variar $[E]_T$ en CaE o CaD sobre la liberación de Ca^{2+} y en el acoplamiento de RIP_3 s dentro del *cluster*

La comparación de la Fig. 3.1F indica que, aparentemente, hay *puffs* que corresponden a situaciones en las que la amplitud crece muy rápido que pueden observarse en los experimentos Tipo B pero no en los Tipo A. Por medio de simulaciones numéricas analizamos si el crecimiento de la amplitud rápido podría deberse a una liberación de Ca^{2+} adicional proveniente del EGTA ligado a Ca^{2+} o del *dye* ligado a Ca^{2+} (ver Fig. 3.2). Observamos que cerca de la fuente el efecto neto del EGTA y del *dye* es atrapar Ca^{2+} . Entonces, el hecho de que haya *puffs* con una tasa de crecimiento de la amplitud mayor en los experimentos Tipo B que en el Tipo A no puede atribuirse a que CaE o $CaF4$ liberen Ca^{2+} en los primeros. La liberación de Ca^{2+} ocurre lejos de la fuente. Más aún, cuando $[E]_T$ varía de $90\mu M$ a $300\mu M$, observamos una leve disminución (3%) en la amplitud de los *puffs* (en $\Delta[CaD]_R$ definido en la Ec. 1.1, ver Fig. 3.2). Dado que agregar EGTA podría cambiar el $[Ca^{2+}]_{basal}$, repetimos las simulaciones usando $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,3\mu M$ en lugar de $0,1\mu M$ sin encontrar diferencias significativas (no se muestran esos datos). Realizamos una serie de experimentos en ovocitos para comprobar si $[Ca^{2+}]_{basal}$ variaba pero no obtuvimos resultados concluyentes. También realizamos simulaciones numéricas estocásticas como se describe en el Apéndice A.3.1 para estudiar si cambiando la $[E]_T$ de $90\mu M$ a $300\mu M$ se alteraba de distinta forma el acoplamiento de RIP_3 *intra-cluster*. Los resultados obtenidos con $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,07\mu M$, $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,1\mu M$ y $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,3\mu M$ son similares, y cuando se hace un test de Kolmogorov no se puede rechazar la hipótesis nula de que vengan de la misma distribución ($p_{value} = 1$). Ni siquiera un cambio en el $[Ca^{2+}]_{basal}$ de un factor 3 puede alterar el acoplamiento dentro del *cluster*. Dado que además $[Ca^{2+}] - [Ca^{2+}]_{basal}$ es similar en presencia de las 3 combinaciones de *dye* y EGTA nos lleva a concluir que el CICR a nivel *intra-cluster* en los 3 casos es similar (ver Fig. 3.3).

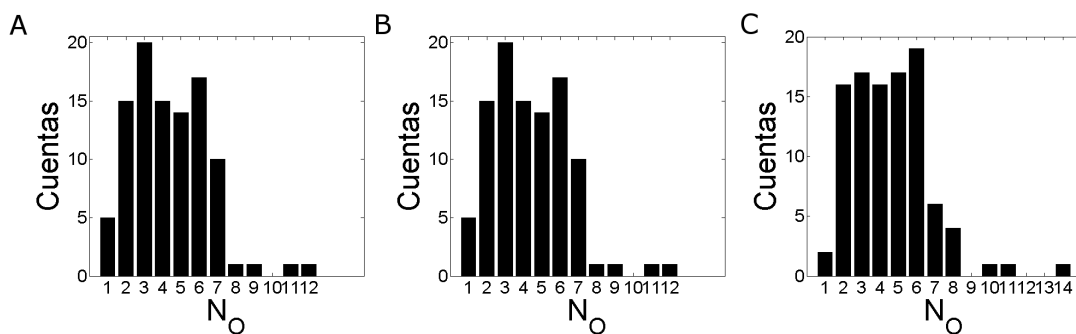


Figura 3.3: Simulación estocástica de *puffs*. Distribución del número de canales abiertos durante un evento de liberación, N_0 , observados para $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,07\mu M$ (A), $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,1\mu M$ (B) y para $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,3\mu M$ (C).

3.3.2. Comparación de las propiedades de los *puffs* con dos fluoróforos de distinta cinética

Los resultados de la Sec. 3.3.1 indican que la diferencia en la tasa de crecimiento de la amplitud observada en los experimentos Tipo A y Tipo B no puede atribuirse exclusivamente a diferencias en la forma en que varía la fluorescencia frente a una misma liberación de Ca^{2+} subyacente. Tampoco puede atribuirse a cambios en el CICR dentro del *cluster* o a la liberación de Ca^{2+} del *dye* o EGTA ligados a Ca^{2+} . Siempre está la posibilidad de que no se pueda detectar un subgrupo de eventos debido a las diferencias en la relación señal-ruido entre dos tipos de experimentos. En el Capítulo anterior introdujimos un método para comparar configuraciones experimentales en términos de la relación señal-ruido que puede esperarse cuando se observan señales de Ca^{2+} [Piegari et al. (2014)]. La aplicación de este método a experimentos desarrollados con Fluo-4 o Rhod-2 nos permitió inferir que la relación señal-ruido de los experimentos Tipo A debería ser similar a la realizada en experimentos con $[R2]_T = 90\mu\text{M}$ y $[E]_T = 45\mu\text{M}$ (ver experimento Tipo C en la Tabla 3.1). El análisis previo de la relación señal-ruido sirve para descartar la posibilidad de que un subgrupo de eventos no pueda detectarse debido al ruido cuando se comparan *puffs* observados en experimentos Tipo A y Tipo C. En lo que sigue comparamos las propiedades de los *puffs* sacados de 94 imágenes de experimentos Tipo A ($[F4]_T = 36\mu\text{M}$ y $[E]_T = 90\mu\text{M}$) y 107 imágenes de experimentos Tipo C ($[R2]_T = 90\mu\text{M}$ y $[E]_T = 45\mu\text{M}$) donde se identificaba al menos un *puff*. Computamos que, en promedio, se observaron 2,18 *puffs/imagen* para los Tipo A y 1,46 *puffs/imagen* para los Tipo C. De acuerdo a este cálculo, parece que para detectar *puffs* los experimentos Tipo A son más eficientes que los Tipo C. Repetimos este cálculo para *puffs* con amplitudes menores que un cierto valor con el fin de analizar si esta distinta capacidad depende del tipo de *puff* que fue observado. Mostramos los resultados obtenidos en la Tabla 3.2. Esta tabla y la discusión de las siguientes subsecciones muestran que el responsable de esta diferencia aparente en la detectabilidad de los *puffs* es la pérdida de los *puffs* de mayor amplitud (y tasa de crecimiento rápida) en los experimentos Tipo C

Rango de amplitudes	Experimentos Tipo A	Experimentos Tipo C
Todas las amplitudes	2,18	1,46
$A < 3$	1,93	1,45
$A < 2,5$	1,72	1,44
$A < 2$	1,54	1,38
$A < 1,5$	1,04	1,17
$A < 1$	0,37	0,51

Tabla 3.2: Número promedio de *puffs* observados por imagen dentro de un cierto rango de amplitudes para experimentos realizados con Fluo-4 (experimentos Tipo A) y con Rhod-2 (experimentos Tipo C).

3.3.2.1. Distribución de amplitudes, cinética y ancho de los *puffs*

En las Figs. 3.4A y 3.4B mostramos las distribuciones de rise time y amplitud para experimentos Tipo C. Si comparamos las distribución de la Fig. 3.4B con el de la Fig. 3.1C observamos que tanto el valor medio de la amplitud como el desvío estándar son más grandes para el experimento Tipo A que para el Tipo C. Esto coincide con las observaciones de que los *puffs* de mayor amplitud se observan en experimentos Tipo A pero no en los Tipo C (ver Tabla 3.2). Comparando las Figs. 3.1A y 3.4A observamos que $\langle t_R \rangle$ es levemente más pequeño en los Tipo C que en los Tipo A. Esta pequeña diferencia va en dirección opuesta para $\langle t_D \rangle$. Respecto al ancho de los *puffs* observamos que el valor medio del ancho es levemente diferente para las dos distribuciones ($\langle Ancho \rangle = 1,1\mu m$ para el Tipo A y $\langle Ancho \rangle = 1,3\mu m$ para el Tipo C) pero las distribuciones en sí no son significativamente distintas (Fig. 3.6).

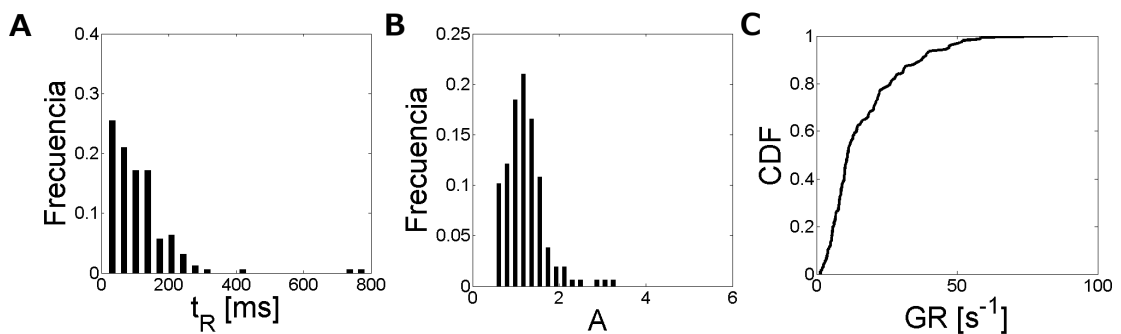


Figura 3.4: Amplitud, rise y tasa de crecimiento de la amplitud de los *puffs* para $[R2]_T = 90\mu M$ y $[E]_T = 45\mu M$. Se obtuvieron el rise time (A), la amplitud (B) y tasa de crecimiento de la amplitud (C) para $N = 157$ *puffs* observados en experimentos Tipo C. El rise time medio ($\langle t_R \rangle$) y el desvío estándar (σ_{t_R}) son $\langle t_R \rangle = 111,6ms$ y $\sigma_{t_R} = 101,1ms$ y la amplitud media ($\langle A \rangle$) y desvío estándar (σ_A) son $\langle A \rangle = 1,2u.a.$ y $\sigma_A = 0,5u.a.$

Comparando las CDFs de los distintos parámetros para los experimentos Tipo A y Tipo C obtenemos que el test de Kolmogorov no puede rechazar la hipótesis nula de que el rise time ($p_{value} = 0,292$) y el decay time ($p_{value} = 0,547$) vengan de la misma distribución continua con un nivel de significancia del 5%. Sin embargo, rechaza la hipótesis de que los anchos (ver Fig. 3.6) y las amplitudes provengan de la misma distribución. En la Figura 3.5 mostramos las CDFs de la amplitud (A) y del rise time (B) de los *puffs* para experimentos Tipo A (línea gris) y Tipo C (línea negra). Al igual que en los experimentos Tipo A y Tipo B, la primera comparación de las distribuciones de las propiedades de los *puffs* obtenidas de experimentos Tipo A y Tipo C muestra diferencias en las amplitudes observadas. Aunque $\langle t_R \rangle$ es más chico para los experimentos Tipo C, la diferencia en la correspondiente CDF no es significativa.

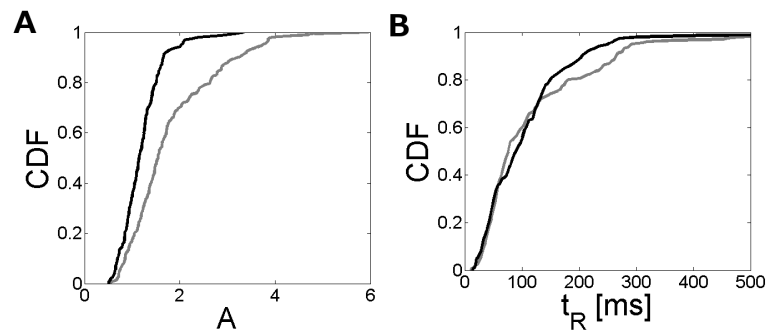


Figura 3.5: Funciones de densidad acumulada. Se grafican las funciones de densidad acumuladas (CDFs) de la amplitud y del rise time (A) y (B), respectivamente, para experimentos Tipo A (línea gris) y para experimentos Tipo C (línea negra). Las CDFs se computaron usando los datos de las Figs. 3.3A, 3.3C, 3.6A y 3.6B como se explicó en el Apéndice A.1.4.

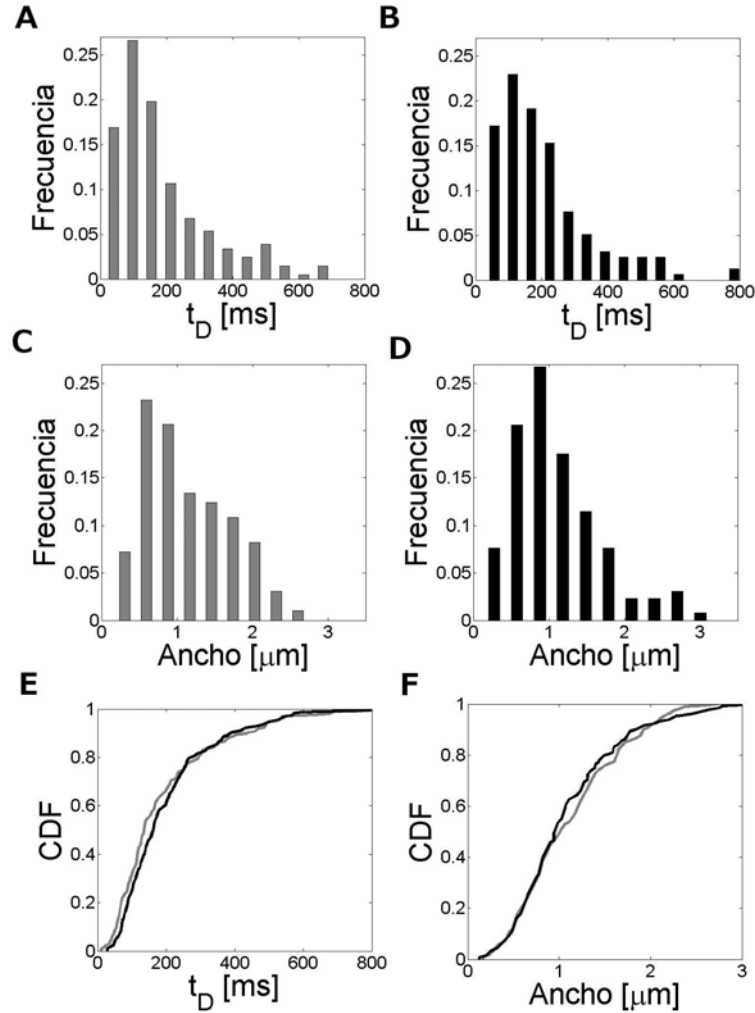


Figura 3.6: Decay time y ancho de los *puffs* para experimentos Tipo A y Tipo C. Distribución del decay time para experimentos Tipo A (A) y Tipo C (B). Distribución de anchos para experimentos Tipo A (C) y Tipo C (D). Se grafican las CDFs del decay time (E) y del ancho (F) para experimentos Tipo A (línea gris) y para experimentos Tipo C (línea negra).

3.3.2.2. Imágenes de Ca^{2+} realistas generadas numéricamente

Para estudiar hasta qué punto las diferencias en las distintas cinéticas de Fluo-4 y Rhod-2 podrían afectar de manera distinta a las imágenes observadas realizamos una serie de simulaciones numéricas. Primero analizamos la distribución de *dye* ligado a Ca^{2+} (citoplasmático) obtenido con simulaciones deterministas como se describió en la Apéndice A.2. Observamos amplitudes levemente mayores para los experimentos Tipo C que en los Tipo A en presencia de la misma fuente (Figura 3.7), lo cual parece contradecir los resultados de la Fig. 3.5A. También exploramos si la diferencia observada en la Fig. 3.5A podía deberse a una distinta eficiencia en el CICR de los dos experimentos. Para este fin realizamos simulaciones de *puff* estocásticas las cuales indican que el acoplamiento

dentro del *cluster* mediado por Ca^{2+} para los experimentos Tipo A y Tipo C no difiere (ver la Figura 3.3).

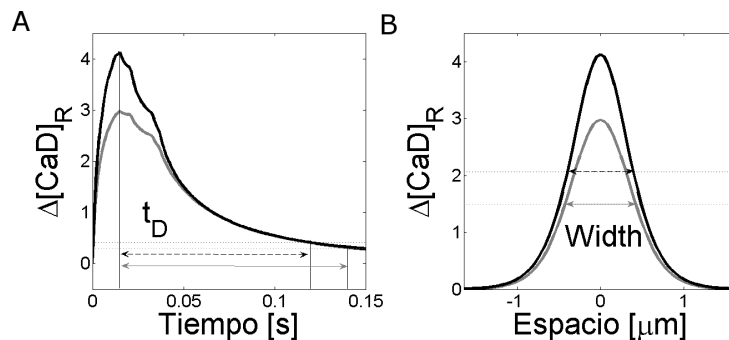


Figura 3.7: Perfiles de simulaciones numéricas sin ruido. Resultados obtenidos para experimentos Tipo A (línea gris) y experimentos Tipo C (línea negra) asumiendo la misma fuente de Ca^{2+} ($n_c = 10$ $\text{RIP}_{3\text{s}}$ ubicados en el origen que se abren en $t = 0$ y se cierran en $t = (0,0005, 0,001, 0,002, 0,0035, 0,004, 0,0045, 0,006, 0,0095, 0,0105)$ s con la misma distribución de calcio libre ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} = 0,1\mu\text{M}$). (A): Perfil temporal en la ubicación de la fuente de Ca^{2+} . (B): Similar a (A) pero en el tiempo en el cual las distribuciones ligadas a Ca^{2+} alcanzan el valor máximo. En ambas figuras mostramos $\Delta[\text{CaD}]_R$ (Ec. A.11). Para experimentos Tipo A obtuvimos el $\text{Ancho} = 0,8\mu\text{m}$, $t_D = 129\text{ms}$ y para los Tipo C $\text{Ancho} = 0,7\mu\text{m}$ y $t_D = 105\text{ms}$

Los resultados contradictorios entre las simulaciones deterministas y estocásticas nos hicieron explorar cómo afectan las distintas propiedades ópticas de Fluo-4 y Rhod-2 a la amplitud de los *puffs* observados. Para esto aplicamos el método descrito en el Capítulo anterior [Piegari et al. (2014)] para obtener imágenes con ruido realista a partir de las generadas numéricamente (Figura 3.7). Recordamos que todas las simulaciones sin ruido se realizaron con la misma fuente de Ca^{2+} . Procesamos estas imágenes simuladas numéricamente como las imágenes experimentales y obtuvimos los perfiles de las Figs. 3.8A y 3.8B para los experimentos Tipo A y Tipo C, respectivamente. Mostramos los perfiles espaciales en la Fig. 3.9. En particular, si calculamos el ancho y el decay time como se describió en la Sec. A.1.3.1 obtenemos $\langle \text{Ancho} \rangle = 0,9\mu\text{m}$ y $\langle t_D \rangle = 54\text{ms}$ para los experimentos Tipo A, y $\langle \text{Ancho} \rangle = 1,1\mu\text{m}$ y $\langle t_D \rangle = 83\text{ms}$ para los Tipo C. Observamos que $\langle t_D \rangle$ es más grande para los experimentos Tipo C que para los Tipo A, probablemente debido a las distintas cinéticas de Fluo-4 y Rhod-2. Ahora, en concordancia con los experimentos, la amplitud A (el valor máximo del perfil temporal) es más chica para Rhod-2 ($A = 1,5$) que para Fluo-4 ($A = 2,3$). Esto muestra que lo más importante para comparar las observaciones experimentales realizadas bajo condiciones distintas es importante tener un método que genera imágenes numéricas con ruido realista.

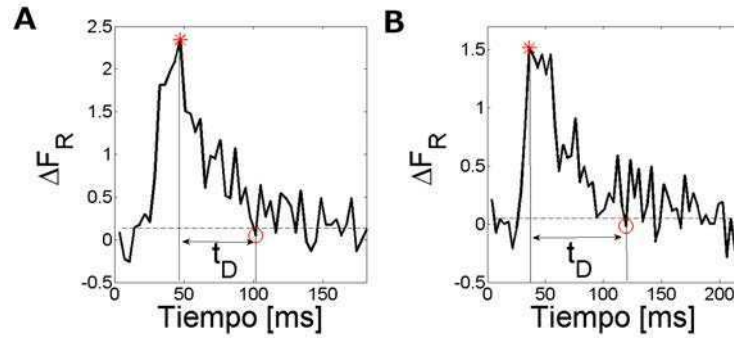


Figura 3.8: Perfiles numéricamente simulados con ruido. Perfiles temporales promedio para experimentos Tipo A (A) y Tipo C (B). La amplitud y el decay time fueron calculados como en los experimentos obteniendo $A = 2,3$ y $t_D = 54ms$ para los Tipo A y $A = 1,5$ y $t_D = 83ms$ para los Tipo C.

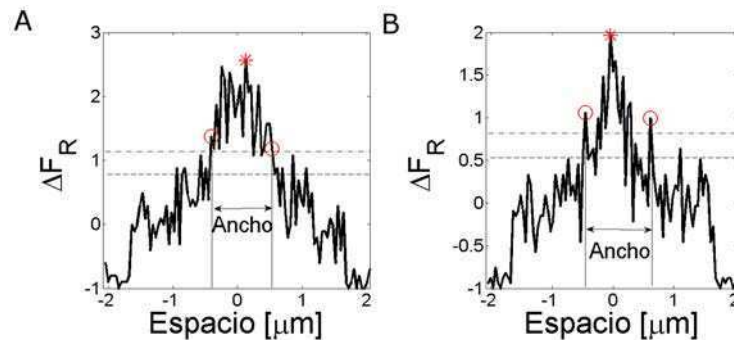


Figura 3.9: Perfiles ruidosos numéricamente simulados. Perfiles espaciales promedio para experimentos Tipo A (A) y Tipo C (B) para el tiempo en el que F alcanza su valor máximo.

3.3.2.3. En los experimentos realizados con un *dye* lento y relativamente baja $[E]_T$ no se observan *puffs* con alta tasa de crecimiento de la amplitud

Las simulaciones de la Figura 3.8 indican que las amplitudes de los *puffs* (fluorescencia) que provienen de una misma corriente de Ca^{2+} subyacente son más chicas cuando se observan con los experimentos Tipo C que con los Tipo A. Sin embargo, las distribuciones de densidad acumulada de las amplitudes de los *puffs* de la Fig. 3.5A no pueden transformarse una en la otra simplemente multiplicando por un factor constante las amplitudes correspondientes a un tipo de experimento. Hay una larga cola en la distribución de amplitudes de los *puffs* de la Fig. 3.1C (experimento Tipo A) que falta en la Fig. 3.4B (experimento Tipo B). Este comportamiento distinto también es claro en la Tabla 3.2 donde listamos el número promedio de *puffs* observados por imagen cuando limitamos las amplitudes de los *puffs* por debajo de un cierto valor. Las diferencias en las distribuciones parecen indicar que los experimentos Tipo A y Tipo C capturan distintos

conjuntos de eventos localizados de liberación de Ca^{2+} . Esta hipótesis se refuerza con el hecho de que, aunque Rhod-2 tiene cinética más lenta que Fluo-4, el tiempo que le lleva a la señal alcanzar su máximo, $\langle t_R \rangle$, es levemente, en promedio, más chico para los experimentos Tipo C que para los Tipo A. Para probar esta hipótesis analizamos las distribuciones de *puffs* observados en términos de la amplitud y el ancho al mismo tiempo. Mostramos las figuras correspondientes a *puffs* observados con experimentos Tipo A y Tipo C en las Figs. 3.10A y B, respectivamente. Se puede observar que los eventos observados en los experimentos Tipo C son más estereotipados que los Tipo A. En particular, los experimentos Tipo A son capaces de detectar *puffs* con amplitudes relativamente grandes con casi cualquier valor de ancho posible, mientras que con Rhod-2 las amplitudes más grandes detectadas corresponden a valores de ancho no muy grandes (comparar las regiones con rectángulos de línea discontinua en las Figs. 3.10A y B). Otra diferencia es que se observan algunos *puffs* anchos con amplitudes relativamente pequeñas con Rhod-2 pero no con Fluo-4 (regiones de línea llena indicadas en Figs. 3.10A y B).

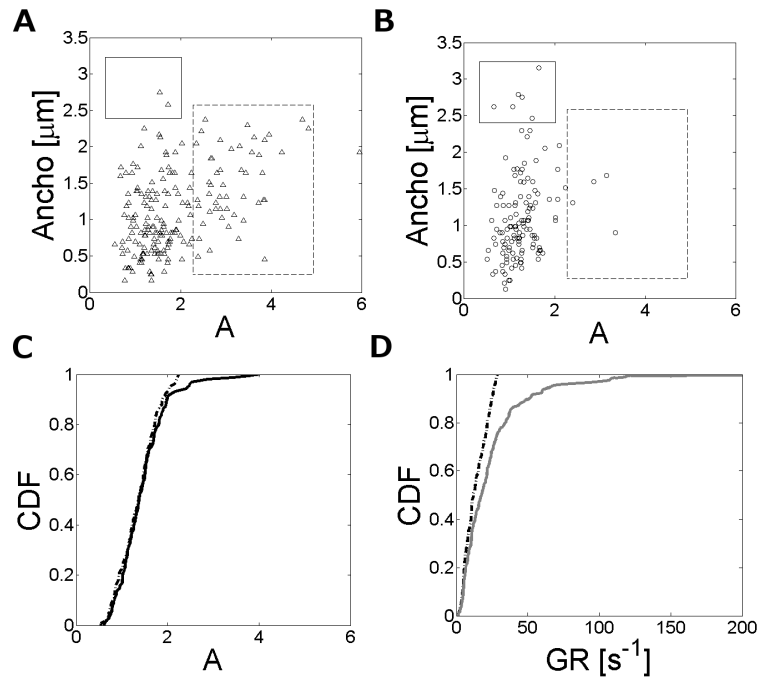


Figura 3.10: Diferencias entre las señales evocadas en experimentos Tipo A y Tipo C. (A) y (B) Gráficos de *Ancho* vs *A* para los *puffs* observados en experimentos Tipo A (A) y experimentos Tipo C (B). Se puede observar que en los dos tipos de experimentos hay un número diferente de *puffs* anchos con amplitudes pequeñas (en la región encerrada con un rectángulo sólido) y de *puffs* angostos con amplitudes grandes (en la región encerrada con un rectángulo de línea punteada). (C) CDFs de la amplitud de los *puffs* para el subgrupo con $A \leq 2,25$ de los experimentos Tipo A (línea discontinua de puntos) y de todos los datos observados en experimentos Tipo C (línea negra), ésta última con el factor de conversión 1,2 en las amplitudes con respecto a las obtenidas directamente de las imágenes, $A_{nuevo} = 1,2 \cdot A_{viejo}$. (D) CDFs de la tasa de crecimiento de la amplitud para experimentos Tipo A cuando tomamos todos los eventos observados (línea gris) o el subgrupo de la Fig. 3.10C (línea discontinua de puntos).

Para analizar si las diferencias en las distribuciones de amplitud de los *puffs* observados con los distintos arreglos experimentales se deben a que se observan distintos conjuntos de eventos localizados calculamos la CDF de las amplitudes de un subgrupo de eventos en el caso Tipo A. Para comparar esta CDF recortada con la correspondiente a los experimentos Tipo C usamos un factor de conversión para esta última teniendo en cuenta que, de acuerdo a la Fig. 3.8, la misma fuente resulta en una señal con A más chica para el Tipo C que para el Tipo A. Si comparamos las Figs. 3.8A y 3.8B, el factor de conversión es cercano a 1,5 (y es 1,3 si comparamos los perfiles espaciales de la Fig. 3.9). En la Fig. 3.10C mostramos la función de densidad acumulada del subgrupo de eventos de experimentos Tipo A con amplitudes $A < 2,25$ (línea discontinua de puntos) y la acumulada de todos los *puffs* observados en los experimentos Tipo C (línea negra), la última con el factor de conversión 1,2 en las amplitudes respecto de las determinadas a partir de las imágenes ($A_{nueva} = 1,2 \cdot A_{vieja}$). Observamos que estas dos distribuciones se parecen mucho. El test de Kolmogorov no rechaza la hipótesis nula de que provengan de la misma distribución continua con un nivel de significancia del 5% ($p_{value} = 0,803$). Si comparamos las distribuciones acumuladas incluyendo todos los eventos para ambos tipo experimentales, el test de Kolmogorov rechaza la hipótesis de que los datos provengan de la misma distribución con un nivel de significancia del 5% ($p_{value} = 3,6 \cdot 10^{-5}$). En la Fig. 3.10D mostramos la CDF de la tasa de crecimiento de la amplitud de los experimentos Tipo A cuando se observan todos los *puffs* (línea gris) o el subgrupo de la Fig. 3.10C (línea discontinua de puntos). Observamos que la primera incluye eventos de tasa de crecimiento más grandes que la segunda. En este caso el test de Kolmogorov rechaza la hipótesis de que los datos vengan de la misma distribución continua con un nivel de significancia del 5% ($p_{value} = 3,2 \cdot 10^{-5}$). Luego concluimos que, como en el caso descrito en la Sec. 3.3.1.1, los eventos capturados en los experimentos Tipo A que se pierden en los Tipo C corresponden a los que tienen tasa de crecimiento de la amplitud más grande.

3.4. Discusión

Las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 son una componente clave dentro de las herramientas de señalización intracelular. Los RIP_3 suelen estar agrupados en *clusters* sobre la membrana del RE y su probabilidad de apertura depende del Ca^{2+} citosólico [Foskett et al. (2007)]. La combinación de estas dos propiedades hace que las señales que median puedan permanecer localizadas o propagarse por toda la célula dependiendo de la eficiencia del CICR [Sun et al. (1998)]. Las señales localizadas en las cuales se libera Ca^{2+} a través de RIP_3 se conocen como *puffs* [Sun et al. (1998)] y son los “ladrillos” de construcción de las señales globales [Marchant, Parker (2001b)]. Por este motivo,

es de gran interés entender la dinámica de estas señales [Bruno et al. (2010); Fraiman, Dawson (2014); Lopez et al. (2012); Shuai et al. (2006); Smith, Parker (2009); Solovey, Dawson (2010)]. Los *puffs* de Ca^{2+} se observan experimentalmente usando *dyes* de Ca^{2+} de longitud de onda única e IP_3 enjaulado. Para maximizar el número de eventos que se observan, usualmente se agrega el *buffer* lento EGTA para interrumpir el acoplamiento mediado por CICR entre *clusters* vecinos [Dargan et al. (2004); Marchant, Parker (2001b)].

En este Capítulo combinamos experimentos y simulaciones para analizar cuán comparables son las propiedades de los *puffs* observados con diferentes *dyes* y $[E]_T$ y hasta qué punto las señales evocadas dependen del *dye* y $[E]_T$ utilizado. Para este fin exploramos tres configuraciones experimentales (ver Tabla 3.1): Tipo A con una combinación de *dye* y $[E]_T$ que se ha probado es adecuada para observar *puffs* de Ca^{2+} en ovocitos de *Xenopus laevis* [Lopez et al. (2012)]; Tipo B con el mismo *dye* y concentración que en el Tipo A pero con $[E]_T$ más grande; y el Tipo C con un *dye* de cinética más lenta que en el Tipo A, pero a una concentración y combinación con un valor de $[E]_T$ en la que se demostró en el Capítulo anterior [Piegari et al. (2014)] que se pueden detectar señales de Ca^{2+} con la misma relación señal-ruido que en el Tipo A. Como discutimos más adelante, concluimos que las diferencias observadas en los tres tipos de experimentos se debe al distinto grado de acoplamiento dentro del *cluster*. Esto es consistente con el hecho de que se observan ondas con mayor frecuencia en los experimentos Tipo C que en los Tipo A, y que las señales que permanecen espacialmente restringidas prácticamente no se observan en experimentos con $[F4]_T = 36\mu\text{M}$ (como los Tipo A) pero con $[E]_T = 45\mu\text{M}$ (datos no mostrados). Entonces, en principio, incluso si distintas combinaciones de *dye* y EGTA permiten que ocurran eventos que involucran el mismo número de RIP_3 s abiertos, distintos niveles de acoplamiento entre *clusters* vecinos recortan de forma distinta las distribuciones de los eventos observados. El análisis de los eventos que “se pierden” en un tipo de experimento en comparación con el otro también da información sobre la organización espacial dentro del *cluster*. Pudimos comparar fácilmente las distribuciones de las propiedades de los *puffs* obtenidos en los experimentos Tipo A y Tipo C a pesar de haber usado dos *dyes* de cinética distinta gracias al método de clasificación de configuraciones experimentales presentado en el Capítulo 2 que nos permite simular imágenes de señales de Ca^{2+} con ruido realista [Piegari et al. (2014)]. De este modo, dada un fuente de Ca^{2+} , pudimos separar el efecto del *dye* sobre la imagen del efecto sobre la fuente misma a través de la modulación del CICR. El hecho de que los eventos que permanecen espacialmente restringidos puedan observarse con similar precisión en los experimentos Tipo A y Tipo C prueba la eficacia de nuestro método. Por otro lado, la posibilidad de aplicar nuestro método a *dyes* que fluorescen en dos longitudes de onda distintas como Fluo-4 y Rhod-2 tiene un valor adicional ya que nos permite analizar

cuantitativamente señales observadas simultáneamente con dos *dyes* como describimos en el Capítulo que sigue.

3.4.1. Comparación de las propiedades de los *puffs* obtenidos en los tres tipos de experimentos explorados

Comparamos las distribuciones de amplitud y rise time de los experimentos Tipo A y Tipo B (Fig. 3.1) y de los experimentos Tipo A y C en las (Figs. 3.1A, 3.1C, 3.4A, 3.4B y 3.5). Para estas últimas comparamos también las distribuciones de anchos y decay time de los *puffs* (Fig. 3.6). El test de Kolmogorov rechaza la hipótesis de que los datos de amplitud y rise time obtenidos en experimentos Tipo A y B y de los datos de amplitud y ancho de los *puffs* para experimentos Tipo A y C, provengan de la misma distribución continua con un nivel de significancia del 5%. El resto de las hipótesis no fueron rechazadas. De acuerdo a las simulaciones presentadas en las Figs. 3.9 y 3.8, podíamos esperar que en cada tipo de experimento se reflejara el mismo evento de liberación de Ca^{2+} subyacente con un cambio relativo en la amplitud de la fluorescencia, ΔF_R , diferente. Por esta razón, exploramos si las distribuciones de las amplitudes de los *puffs* de los experimentos Tipo A y Tipo B coincidían al multiplicar por un factor de conversión la amplitud en uno de los tipos de experimentos. Encontramos que esto ocurría si multiplicábamos las amplitudes de los experimentos Tipo B por el factor 1,3 (ver Fig. 3.1E). Realizamos un análisis similar para comparar las distribuciones de amplitud de los *puffs* obtenidos con los experimentos Tipo A y Tipo C. En este caso usamos el factor de conversión 1,2 para multiplicar las amplitudes obtenidas en los experimentos Tipo C. A pesar del factor de conversión determinamos que las funciones de distribución acumuladas diferían considerablemente. Un análisis más detallado de las propiedades de los eventos que se muestran en las Figs. 3.10A y 3.10B mostró que el conjunto de eventos observados en los experimentos Tipo A y Tipo C era distinto. Esto es, los eventos de mayor amplitud observados en los experimentos Tipo A faltaban en los Tipo C. Esta observación se confirmó con la comparación más cuantitativa de la Fig. 3.10C. Quedándose con el subgrupo de experimentos Tipo A con $A < 2,25$ la distribución acumulada de la amplitud de los *puffs* pasó a prácticamente coincidir con la de los experimentos Tipo C, en este último caso para la amplitud multiplicada por el factor 1,2. Concluimos que el conjunto de eventos observados con experimentos Tipo A incluye a los que se observan en los Tipo C pero también incluye otros de mayor amplitud. Aunque esto es distinto a lo que encontramos en la Fig. 3.1E, los experimentos Tipo A y Tipo B también difieren en el grupo de eventos que pueden detectar. De acuerdo a la Fig. 3.1, el rise time medio es más chico en los *puffs* observados en los experimentos Tipo B que en los Tipo A. Como discutimos en la siguiente subsección, la tasa de crecimiento de la amplitud provee

una descripción unificadora de los eventos que se pierden en un tipo de experimento en comparación con otro en ambos casos.

3.4.2. Las distribuciones de tasa de crecimiento de la amplitud de los *puffs* coincide luego de recortar los eventos de tasa de crecimiento más grande

La comparación de la tasa de crecimiento de la amplitud ($GR = 0,9A/t_R$) que se muestra en la Fig. 3.1F mostró que el cambio en la fluorescencia era más rápido, en promedio, en los experimentos Tipo B que en los Tipo A ($\langle GR \rangle_{II} = 30,2s^{-1}$ y $\langle GR \rangle_I = 24,7s^{-1}$). El test de Kolmogorov aplicado a la distribución acumulada de la Fig. 3.1F rechaza la hipótesis nula de que los dos grupos de datos vengan de la misma distribución continua con un nivel de significancia del %6,1 ($p_{value} = 0,061$). Aunque este nivel de significancia es levemente peor que el valor estándar (5%), es importante notar que este resultado cambia si sólo nos quedamos con el subgrupo de tasas de crecimiento menores a $100s^{-1}$ para hacer la comparación ($\langle GR \rangle_I = 21,1s^{-1}$ y $\langle GR \rangle_{II} = 20,4s^{-1}$). En este caso el test de Kolmogorov no puede rechazar la hipótesis nula y el p_{value} aumenta significativamente (0,528). Esto nos permite concluir que el grupo de eventos observados con los experimentos Tipo B incluye a los observados con los Tipo A pero además incluye eventos con tasa de crecimiento de la amplitud mayor. Al comparar las distribuciones de la tasa de crecimiento de la amplitud en experimentos Tipo A y Tipo C encontramos que si nos quedamos con todos los eventos, el test de Kolmogorov rechaza la hipótesis nula de que los datos vengan de la misma distribución continua con un nivel de significancia del %5 ($p_{value} = 4,0 \cdot 10^{-4}$). Si sólo nos quedamos con el subgrupo de eventos de los experimentos Tipo A con $A < 2,25$, la correspondiente densidad de probabilidad acumulada coincide con la de todos los eventos del Tipo C. En este caso de nuevo los eventos que faltan en los experimentos Tipo C son los que corresponden a los de mayor tasa de crecimiento de la amplitud de los experimentos Tipo A. Como se mostró en la Fig. 3.2, la tasa de crecimiento para $[E]_T$ más grandes no puede atribuirse a la liberación de Ca^{2+} del *dye* o EGTA ligados a Ca^{2+} . Las simulaciones estocásticas discutidas en la Fig. 3.3 también mostraron que cambiar $[E]_T$ no alteraba el acoplamiento entre RIP_{3s} dentro del *cluster*. Discutimos en lo que sigue cómo explicar esta diferencia en el conjunto de eventos capturado por los distintos tipos de experimentos.

3.4.3. Los tres tipos de experimentos difieren en su capacidad de alterar el CICR entre *clusters* de RIP_3 s

La observación de que en los tres tipos de experimentos explorados se obtienen distintos subgrupos de *puffs* puede atribuirse a que los RIP_3 s pertenecientes a *clusters* distintos son efectivamente acoplados de manera distinta. Esta hipótesis es consistente con el hecho de que se pueden obtener ondas con mayor frecuencia en los experimentos Tipo C que en los Tipo A y más en los Tipo A que en los Tipo B. Las diferencias en el acoplamiento entre *clusters* vecinos en los tres tipos de experimentos son ilustradas en la Fig. 3.11. Ahí mostramos la probabilidad, $P_0(d = 1,4\mu\text{m}, \Delta t)$, definida en la Ec. A.13, para simulaciones realizadas bajo condiciones que reproducen las de experimentos Tipo A (línea gris), Tipo B (línea negra punteada) y Tipo C (línea negra) en presencia de la misma fuente de Ca^{2+} ($n_c = 10$ canales). Para las simulaciones usamos $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} = 0,1\mu\text{M}$ para el Tipo A, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} = 0,07\mu\text{M}$ para el Tipo B y $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} = 0,13\mu\text{M}$ para el Tipo C. Repetimos también las simulaciones usando $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} = 0,1\mu\text{M}$ para los experimentos Tipo B y C, otros valores de d y una fuente que involucra la apertura simultánea de más canales (datos no mostrados). En todos los casos encontramos la misma tendencia pero con distintos números. La probabilidad, $P_0(d, \Delta t)$, es más chica para el experimento Tipo B que para el Tipo A para todos los valores d , aunque en el caso de la Fig. 3.11 la mayor diferencia se alcanza para $d \sim 1,4\mu\text{m}$. Cuando comparamos los experimentos Tipo A y C obtenemos que $P_0(d, \Delta t)$ es más chica para los experimentos Tipo C que para los Tipo A si d es suficientemente chica. Para distancias por encima del mínimo depende de la fuente ($d \sim 0,4\mu\text{m}$ para la fuente de la figura) $P_0(d, \Delta t)$ es más grande para los experimentos Tipo C que para los Tipo A.

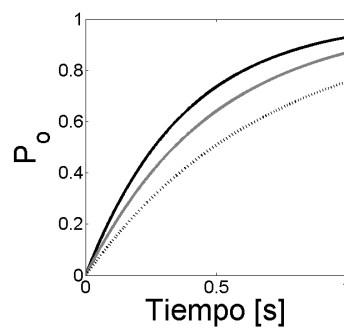


Figura 3.11: Probabilidad, $P(d, \Delta t)$, de que un RIP_3 ligado a IP_3 ubicado a una distancia d del sitio de liberación de Ca^{2+} se abra antes de que pase un tiempo Δt desde el comienzo de la liberación. Mostramos la probabilidad $P(d = 1,4\mu\text{m}, \Delta t)$ definida como en la Ec. A.13, para simulaciones desarrolladas en condiciones basales imitando los experimentos Tipo A (línea gris), Tipo B (línea punteada) y Tipo C (línea negra) en la presencia de la misma fuente de Ca^{2+} ($n_c = 10$ canales) y usando $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} = 0,1\mu\text{M}$ para los experimentos Tipo A, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} = 0,07\mu\text{M}$ para los Tipo B y $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} = 0,13\mu\text{M}$ para los Tipo C.

3.4.4. Distintos tipos de experimentos evocan distintos tipos de señales debido a su diferente capacidad para atrapar Ca^{2+}

La distinta capacidad de atrapar Ca^{2+} a una dada distancia del sitio de liberación que muestran los tres tipos de experimentos estudiados en este Capítulo puede explicar las diferencias en las distribuciones de los *puffs* observados. Es más probable que, dada una cierta tasa de liberación de Ca^{2+} desde un *cluster*, el Ca^{2+} liberado induzca la apertura de RIP_3s en *clusters* vecinos en experimentos con menor capacidad de atrapar Ca^{2+} a una distancia de la fuente del orden de la separación entre *clusters*. Los eventos que involucran la liberación coordinada desde más de un *cluster* no son considerados *puffs* y no están incluidos en las distribuciones analizadas en este Capítulo. Esto puede explicar la ausencia de *puffs* angostos de amplitudes grandes en los experimentos Tipo C en comparación con los de Tipo A como se muestra en las Figs. 3.10A y 3.10B. Los *puffs* anchos de amplitudes chicas que se observan en los experimentos Tipo C pero no en los Tipo A podrían corresponder a *puffs* fuera de foco. Es de esperar que la observación fuera de foco en experimentos con menor capacidad de atrapar Ca^{2+} sea más probable en los de Tipo C. Las diferencias entre los grupos de *puffs* observados en los experimentos Tipo A y B también pueden relacionarse al hecho de que es más probable que los eventos que involucran la apertura de más RIP_3s permanezcan localizados en los experimentos Tipo B que en los Tipo A. En este caso la diferencia es reflejada en la mayor tasa de crecimiento de la amplitud de los *puffs* observados con los experimentos Tipo B cuando se los compara con los Tipo A (ver Fig. 3.1F). Aquí es más difícil observar la diferencia en términos de la amplitud de los *puffs* debido a que aumentar el EGTA tiene dos efectos opuestos: permitir la observación de *puffs* que involucran la apertura simultánea de más RIP_3s y disminuir la concentración de *dye* ligado a Ca^{2+} y el aumento relativo de la fluorescencia. Más aún, como se muestra en [Solovey et al. (2011)], la relación entre el incremento relativo de la fluorescencia y el número máximo de RIP_3s que se abren simultáneamente es no lineal, con una pendiente que disminuye al aumentar el número de RIP_3s . Esta no linealidad que es más pronunciada cuanto más rápido es la cinética subyacente del proceso de liberación de Ca^{2+} [Solovey et al. (2011)], implica un “achataamiento” de los valores que puede tomar la amplitud de los *puffs* más grandes, es decir, achica la cola de su distribución. Esto refuerza la idea de que las diferencias observadas entre los experimentos Tipo A y Tipo B pueden atribuirse a que es más frecuente que haya *puffs* que involucran la apertura de más RIP_3s en los experimentos Tipo B que en los Tipo A.

3.4.5. Los distintos tipos de señales observados en los distintos tipos de experimentos permiten inferir información sobre la arquitectura de los *clusters* de RIP_3 en los ovocitos de *Xenopus laevis*

Las Figs. 3.1F y 3.10D muestran que cuando se comparan los experimentos Tipo A con los Tipo B o Tipo C, los eventos que se pierden en uno u otro tipo experimental son aquellos que tienen tasa de crecimiento de la amplitud más rápida. En las subsecciones previas argumentamos que esos eventos que se pierden corresponde a aquellos con mayor intensidad de liberación de Ca^{2+} . Esto implica que los *puffs* con el mayor número posible de RIP_3 s simultáneamente abiertos también corresponden a los que tienen la tasa de crecimiento de la amplitud más rápida. Es también consistente con el análisis hecho en [Bruno et al. (2010)] que concluye que los *clusters* que subyacen a los *puffs* de Ca^{2+} en ovocitos de *Xenopus laevis* tienen aproximadamente la misma extensión espacial, independientemente del número de RIP_3 s que contengan. Esto implica que cuanto mayor es el número de RIP_3 s abiertos durante un *puff*, más chica es la distancia entre ellos. Una distancia entre canales más chica significa que el CICR dentro del *cluster* es más eficiente [Diambra, Marchant (2011); Solovey, Dawson (2010)] lo que hace que el GR sea mayor [Solovey et al. (2011)]. Esto es diferente a asumir que los RIP_3 s pegados a IP_3 están siempre separados por la misma distancia media, de forma que los *puffs* de mayor amplitud corresponden a los de *clusters* de mayor extensión espacial. La extensión espacial de los *clusters* no debe confundirse con el ancho de los *puffs* que refleja la región por la que difunde el *CaD*. La existencia de una extensión espacial característica para los *clusters* es compatible con el hecho de que el ancho espacial de la fluorescencia sea una función creciente de la amplitud de los *puffs* como se observó en [Dickinson, Parker (2013)]. Esto implica que el atrapado de Ca^{2+} por los *buffers* es menos eficiente en presencia de una liberación de Ca^{2+} rápida resultando en la difusión de Ca^{2+} y *CaD* sobre una región más grande del espacio.

Capítulo 4

La competencia entre dos indicadores de calcio permite estudiar cómo las moléculas que atrapan calcio remodelan las señales

4.1. Resumen

En este Capítulo estudiamos el rol de los *buffers* en las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s observando en simultáneo las señales con Rhod-2 y Fluo-4, dos *dyes* que, como ya se discutió, son de distinta cinética. A pesar de eso, en el Capítulo 2 mostramos que es posible elegir concentraciones de Rhod-2 y EGTA de forma que sea posible observar señales de Ca^{2+} con similar relación señal-ruido a la de los experimentos realizados con otras concentraciones de Fluo-4 y EGTA. Esto significa que aunque las cinéticas de los *dyes* son distintas es posible elegir las concentraciones de forma que las distintas configuraciones sean equivalentes desde el punto de vista de la detectabilidad de las señales. En el Capítulo 3 estudiamos si las propiedades de los *puffs* observados con estas dos configuraciones equivalentes eran similares o no. Encontramos que no solo la distribución espacio-temporal de la fluorescencia que corresponde a un evento de liberación de Ca^{2+} podía ser diferente, sino que el conjunto de eventos obtenidos con ambas configuraciones también era diferente. En ese Capítulo concluimos que las diferencias podían atribuirse a las distintas capacidades que tienen ambas configuraciones experimentales para disrumpir el CICR entre *clusters*. Por otro lado, observamos que los *puffs*

de mayor GR que se observan usando Fluo-4 no se observaban usando Rhod-2. Estos eventos que se pierden corresponden a señales con un CICR *intra-cluster* muy eficiente. En este Capítulo analizamos estos aspectos con mayor detalle ya que el uso de dos *dyes* de cinética distinta nos permite tratar a uno de ellos como si fuera el *buffer* rápido (por ej., BAPTA) o el lento (por ej, EGTA) que se agrega en los experimentos de [Dargan, Parker (2003)], con la diferencia de que es observable cuando se une a Ca^{2+} . Aunque la diferencia en la cinética entre Fluo-4 y Rhod-2 no es tan grande como la diferencia típica entre un *dye* y EGTA, poder observar señales de Ca^{2+} con diferentes concentraciones de Rhod-2 nos permite inferir una tendencia y sacar conclusiones sobre los efectos de los *buffers* lentos de Ca^{2+} en la dinámica de Ca^{2+} intracelular. Análogamente, extraemos conclusiones sobre el papel de los *buffers* rápidos al comparar los eventos observados a distintas concentraciones de Fluo-4. Como en [Piegari et al. (2015)] concluimos que agregar concentraciones de un *buffer* lento (en este caso, Rhod-2) permite que ocurran *puffs* de mayor amplitud, es decir, los eventos más rápidos y con mayor liberación de Ca^{2+} pueden permanecer localizados gracias a la presencia del *buffer* lento. Esta observación se confirma con el análisis de ondas de Ca^{2+} que muestran que su velocidad promedio aumenta cuando se aumenta la concentración de Rhod-2, $[R2]_T$. Interpretamos estas dos observaciones como el resultado de la capacidad de Rhod-2 de reducir el acoplamiento entre *clusters* vecinos. También combinamos las observaciones experimentales con simulaciones para entender el modo en el que un aumento de $[R2]_T$ reduce este acoplamiento. Suponiendo que los *clusters* están separados $\sim 1.4\text{-}2\mu\text{m}$ concluimos que los cambios que se observan en la disrupción al aumentar $[R2]_T$ sólo pueden explicarse si hay RIP_3s “suelos” entre los *clusters* y que ocurre también cierta disminución del Ca^{2+} basal debida a la mayor $[R2]_T$. El análisis del Ca^{2+} basal en los experimentos muestra alguna reducción pero no suficiente para explicar por sí sola los cambios observados en la disrupción. Una comparación entre las distribuciones de Fluo-4 ligado a Ca^{2+} y de Rhod-2 ligado a Ca^{2+} durante eventos que involucran liberación de Ca^{2+} desde muchos sitios de liberación parece apoyar la existencia de RIP_3s sobre regiones mayores a la extensión espacial típica de los *clusters*. Esto nos lleva a pensar que, aunque los RIP_3s se agrupan principalmente en *clusters* que están separados por una distancia media de $\sim 1.4\text{-}2\mu\text{m}$, también hay algunos RIP_3s aislados en el medio que son importantes para la propagación de las señales. El efecto de los *buffers* lentos es mayor a una distancia de las fuentes de liberación de Ca^{2+} que en la región de la fuente en sí. Su efecto, sin embargo, no es tan relevante a distancias del orden de la separación entre *clusters* sino a distancias menores. Es de esperar entonces que la presencia de los *buffers* lentos disminuya el Ca^{2+} libre a esas distancias intermedias de la fuente afectando la probabilidad de apertura de los RIP_3s “suelos” entre *clusters* dificultando así, o impidiendo, la propagación de ondas. El análisis del efecto de Fluo-4 sobre las señales, por otro lado, confirma la hipótesis de [Fraiman, Dawson (2014)] de que la presencia de *buffers* rápidos disminuye

la inhibición de los RIP_3 s permitiendo que existan eventos de liberación de Ca^{2+} más largos que involucran varias re-aperturas de los mismos canales.

4.2. Métodos

4.2.1. Simulaciones numéricas

En este Capítulo realizamos simulaciones numéricas del modelo de reacción-difusión descrito en el Apéndice A.2 con dos fines. Por un lado, para estimar una función que pueda derivarse de la fluorescencia observada y que sea creciente con la corriente de Ca^{2+} subyacente independientemente de las configuraciones de *dye* y EGTA utilizadas. Por otro lado, para estimar la probabilidad de apertura de un canal ubicado a una distancia d de una fuente puntual de Ca^{2+} como se describió en el Capítulo anterior. En ambos casos simulamos el sistema de reacción-difusión que incluye las especies Ca^{2+} , un *buffer* endógeno inmóvil, S , dos indicadores citosólicos, $F4$ y $R2$, y el *buffer* exógeno, $EGTA$. Consideramos una fuente puntual de Ca^{2+} con $n_c = 3, 6, 10, 15, 30$ o 50 o 50 canales que se abren simultáneamente en $t = 0$ y posteriormente se cierran a un tiempo aleatorio elegido de una distribución exponencial de valor medio $20ms$. Para las concentraciones totales de *dye* y EGTA tomamos los valores $[F4]_T = 0, 36\mu M$, $[R2]_T = 0, 36\mu M$ o $90\mu M$ y $[E]_T = 45\mu M$ o $90\mu M$. En relación al Ca^{2+} basal hacemos la mayoría de las simulaciones con $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,1\mu M$ pero para el cálculo de probabilidades exploramos otros valores también. Describimos en lo que sigue con más de detalle.

4.2.1.1. Determinación de una función creciente con la corriente de Ca^{2+} que subyace a un evento independientemente de la concentración de *dye* utilizada.

La amplitud de un *puff* es una medida de cuánto Ca^{2+} se unió al *dye* durante un evento de liberación. Comparar las amplitudes de los *puffs* obtenidas en experimentos realizados en idénticas condiciones es equivalente a comparar cuánto Ca^{2+} se liberó. Si los experimentos son hechos usando diferentes concentraciones de *buffer* o *dye* esta equivalencia se pierde. En esta sección buscamos identificar una cantidad que pueda derivarse de la fluorescencia observada y que sea creciente con la corriente de Ca^{2+} subyacente independientemente de la cantidad de *dye* usada para la observación. Para este fin realizamos simulaciones numéricas del modelo de reacción-difusión ya mencionado con una fuente puntual de Ca^{2+} con $n_c = 3, 6, 10, 15$ o 30 canales y el mismo valor para la concentración de Ca^{2+} basal, $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,1\mu M$, en todos los casos. Una

vez obtenidos los resultados numéricos, calculamos la distribución de *dye* ligado a Ca^{2+} “blurreada”, $\overline{[CaD]}$, y el cociente de la variación durante la señal con respecto al nivel basal, $\Delta[CaD]_R$, como se describe en el Apéndice A.2. En particular, nos interesa el valor del cociente en el pico de la señal (es decir, en el máximo de $\Delta[CaD]_R$). Comparamos los valores (máximos) de $\Delta[CaD]_R$ obtenidos para $D = F4$ en presencia de una dada corriente subyacente para distintas concentraciones de $[R2]_T$, y hacemos lo equivalente para $D = R2$ y distintas concentraciones de $[F4]_T$. Mostramos los resultados obtenidos usando $[E]_T = 90\mu\text{M}$, $[F4]_T = 36\mu\text{M}$ y distintos valores de $[R2]_T$ en la Fig. 4.1A y los obtenidos usando $[E]_T = 45\mu\text{M}$, $[R2]_T = 90\mu\text{M}$ y distintos valores de $[F4]_T$ en la Fig. 4.1B. Allí se ve que tanto $\Delta[CaF4]_R$ para $[R2]_T = 0$ como $\Delta[CaR2]_R$ para $[F4]_T = 0$ son funciones estrictamente crecientes de la corriente de Ca^{2+} subyacente. Definimos entonces $A_{lib-F4} \equiv \Delta[CaF4]_R([R2]_T = 0)$ y $A_{lib-R2} \equiv \Delta[CaR2]_R([F4]_T = 0)$, ya que, por ser funciones crecientes de la corriente de Ca^{2+} , pueden usarse para comparar dos eventos de liberación localizados en términos de la tasa de liberación de Ca^{2+} subyacente a cada uno. La pregunta que surge es cómo determinar A_{lib-F4} y A_{lib-R2} a partir de los datos experimentales. Para ello notamos que, de acuerdo a la Fig. 4.1, para cada valor de corriente, $\Delta[CaF4]_R$ varía linealmente con $[R2]_T$ (Fig. 4.1A) y $\Delta[CaR2]_R$ varía linealmente con $[F4]_T$ (Fig. 4.1B). Las pendientes de estas relaciones lineales cambian al variar la corriente de Ca^{2+} subyacente. Un ajuste de las varias rectas graficadas en cada figura, sin embargo, muestra que dicho cambio no es muy relevante. La pendiente derivada de los ajustes de la Fig. 4.1A, $-\alpha_{F4,R2}$, varía entre $-1,59 \cdot 10^{-3}$ para $n_c = 3$ y $-5,17 \cdot 10^{-3}$ para $n_c = 30$. La pendiente derivada de los ajustes de la Fig. 4.1B, $-\alpha_{R2,F4}$, varía entre $-3,36 \cdot 10^{-3}$ para $n_c = 3$ y $-1,51 \cdot 10^{-2}$ para $n_c = 30$. Por lo tanto, aproximamos A_{lib-F4} y A_{lib-R2} como:

$$\begin{aligned} A_{lib-F4} &\approx \Delta[CaF4]_R + \alpha_{F4,R2}[R2]_T, \\ A_{lib-R2} &\approx \Delta[CaR2]_R + \alpha_{R2,F4}[F4]_T, \end{aligned} \quad (4.1)$$

con $\alpha_{F4,R2} = 4,58 \cdot 10^{-3}$ y $\alpha_{R2,F4} = 1,16 \cdot 10^{-3}$, los valores derivados del ajuste de los datos simulados obtenidos con $n_c = 10$.

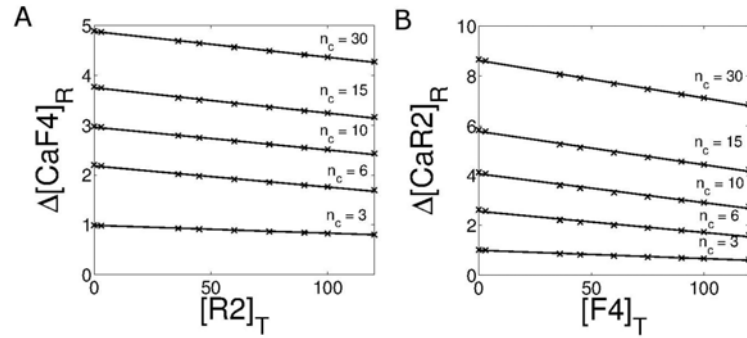


Figura 4.1: $\Delta[CaF4]_R$ cuando se varía $[R2]_T$ (A) y $\Delta[CaR2]_R$ cuando se varía $[F4]_T$ (B) para distintas corrientes ($n_c = 3, 6, 10, 15$ y 30).

4.2.2. Experimentos y procesamiento de datos.

Los resultados que se muestran en este Capítulo corresponden a experimentos realizados en ovocitos de *Xenopus laevis* que fueron tratados como se describe en el Apéndice A.1. En ellos se usan dos *dyes* de Ca^{2+} , Fluo-4 y Rhod-2, para monitorear la $[Ca^{2+}]$ citosólica. Las diferentes concentraciones usadas en cada conjunto de experimentos se detallan en la Tabla 4.1.

Experimento	$[F4]_T$ (μM)	$[R2]_T$ (μM)	$[E]_T$ (μM)
Set I	36	90	90
Set II	36	36	90
Set III	36	0	90
Set IV	36	90	45
Set V	36	36	45
Set VI	0	90	45

Tabla 4.1: Combinaciones de concentración de *dye* y EGTA usadas en los distintos experimentos.

4.2.2.1. Estimación del Ca^{2+} basal

Para obtener una estimación de la concentración media de Ca^{2+} basal, $[Ca^{2+}]_{basal}$, para cada combinación de concentraciones exploradas en este Capítulo seguimos algunos de los pasos del método presentado en el Capítulo 2 [Piegari et al. (2014)]. Para tal fin, trabajamos con los píxeles de las imágenes linescan correspondientes a tiempos anteriores al del inicio del pulso de fotólisis, es decir, analizamos la fluorescencia basal. Una vez descartados los píxeles oscuros correspondientes a los gránulos corticales como

se explicó en el Capítulo 2 calculamos la fluorescencia media basal para cada imagen como:

$$\langle F_{0_{F4,R2}} \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i \in bf} \sum_{j=1}^{j_{UV}} F_{F4,R2}(x_i, t_j), \quad (4.2)$$

donde j_{UV} corresponde al tiempo en el que se inicia la fotólisis y los subíndices, $F4$ o $R2$, denotan si la fluorescencia proviene de moléculas de Fluo-4 o Rhod-2. Para aliviar la notación en lo que sigue no incluimos este último subíndice. Usando los valores, $\langle F_0 \rangle$, derivados de las imágenes obtenidas con un mismo conjunto de concentraciones de *dye* y EGTA (uno de los sets de la Tabla 4.1) calculamos las distribuciones acumuladas con su correspondiente valor medio, $\overline{\langle F_0 \rangle}$ y desvío estándar, σ_{F_0} . Como en el Capítulo 2, pasamos de fluorescencia a Ca^{2+} basal mediante la relación:

$$\overline{\langle F_0 \rangle} = \gamma \left[(q_1 - q_2) \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}} + K_d} + q_2 \right] \overline{\langle N_D \rangle}, \quad (4.3)$$

donde K_d es la constante de disociación de la reacción *dye*- Ca^{2+} , $\overline{\langle N_D \rangle}$ es el número medio de moléculas de *dye* que contribuyen a la fluorescencia colectada en un píxel para cada set ($\overline{\langle N_D \rangle} = \langle N_{R2} \rangle$ para Rhod-2 y $\overline{\langle N_D \rangle} = \langle N_{F4} \rangle$ para Fluo-4).

Como explicamos en la sección de Resultados, utilizamos esta fórmula para comparar los diferentes tipos de experimentos de la Tabla 4.1 y estimar así la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}$ para cada uno de ellos.

4.2.2.2. Derivación de funciones de la corriente de Ca^{2+} a partir de la fluorescencia observada.

Como explicamos en la Sección 4.2.1.1 las simulaciones numéricas predicen que, bajo ciertas hipótesis, las cantidades, A_{lib-F4} y A_{lib-R2} , son funciones crecientes de la corriente de Ca^{2+} que subyace a un *puff* observado en el canal de Fluo-4 o Rhod-2, respectivamente, independientemente de la configuración de *dyes* utilizada para observarlo. Para estimarlas a partir de los datos experimentales necesitamos relacionar la fluorescencia observada con la concentración de *dye* ligada a Ca^{2+} . Para tal fin volvemos a usar la relación introducida en el Capítulo 2 pero despreciando las fluctuaciones en el número de moléculas de *dye* que contribuyen a la fluorescencia de cada píxel. Así obtenemos:

$$[CaD] = \frac{[D]_T}{q_1 - q_2} \left(\frac{F}{\gamma \langle N_D \rangle} - q_2 \right). \quad (4.4)$$

Para estimar $\Delta[CaD]_R \equiv ([CaD] - [CaD]_{\text{basal}})/[CaD]_{\text{basal}}$ primero calculamos ΔF como:

$$\Delta F = \gamma (q_1 - q_2) \frac{\Delta[CaD]}{[D]_T} \overline{\langle N_D \rangle}, \quad (4.5)$$

donde, como antes, $\overline{\langle N_D \rangle}$, es el número medio de moléculas de *dye* que contribuyen a la fluorescencia en cada píxel de una imagen en los experimentos que se simulan. Insertando la Ec. 4.3 en la Ec. 4.5 obtenemos:

$$\Delta F_R = \frac{\left(1 - \frac{q_2}{q_1}\right) \frac{\Delta[CaD]}{[D]_T}}{\left(1 - \frac{q_2}{q_1}\right) \frac{[Ca^{2+}]_{basal}}{[Ca^{2+}]_{basal} + K_d} + \frac{q_2}{q_1}}. \quad (4.6)$$

Por último derivamos:

$$\Delta[CaD]_R = \frac{\Delta[CaD]}{[CaD]_b} = \Delta F_R \left(1 + \frac{q_2/q_1}{\left(1 - \frac{q_2}{q_1}\right) \frac{[Ca^{2+}]_{basal}}{[Ca^{2+}]_{basal} + K_d}}\right) \quad (4.7)$$

usando la estimación $[Ca^{2+}]_{basal} = 100nM$.

Entonces, dado un evento observado en el canal correspondiente a uno de los dos *dyes*, primero calculamos su amplitud, ΔF_R y luego estimamos el valor (máximo) de $\Delta[CaD]_R$ usando la Ec. 4.7. Finalmente computamos la función, A_{lib} , correspondiente usando la Ec. 4.1 con el valor de α que se deriva de las simulaciones para el *dye* elegido. Dadas las características de las simulaciones suponemos que las funciones, A_{lib-F4} y A_{lib-R2} , proveen estimaciones de funciones crecientes de la corriente subyacente de Ca^{2+} independientemente de las concentraciones de *dye* total siempre que la corriente provenga de una región espacialmente restringida y que el $[Ca^{2+}]_{basal}$ no varíe sensiblemente entre experimentos. Discutimos más adelante cómo modificar estas estimaciones si alguna de las hipótesis implícitas en las simulaciones no se satisfacen.

Además de calcular las distribuciones de A_{lib} para los eventos obtenidos con cada set de experimentos, para algunos sets también calculamos $I_{lib} = A_{lib} \cdot t_R$ lo que nos permite comparar el Ca^{2+} total liberado durante los eventos observados con dichos sets.

Mostramos figuras tipo máscaras realizadas transformado de F a CaD usando la Ec. 4.4 con umbrales $0,6 \cdot CaF4_{max}$ y $0,6 \cdot CaR2_{max}$ para $F4$ y para $R2$, respectivamente.

4.3. Resultados

4.3.1. Rhod-2 como un *buffer* lento

En la Figura 4.2 mostramos las funciones de densidad acumulada (CDFs) de la amplitud, A , (Fig. 4.2A), del rise time, t_R , (Fig. 4.2B) y de la tasa de crecimiento de la amplitud, GR (Fig. 4.2C) de los *puffs* observados con Fluo-4 para experimentos del Set **IV** (línea sólida) y del Set **V** (línea punteada).

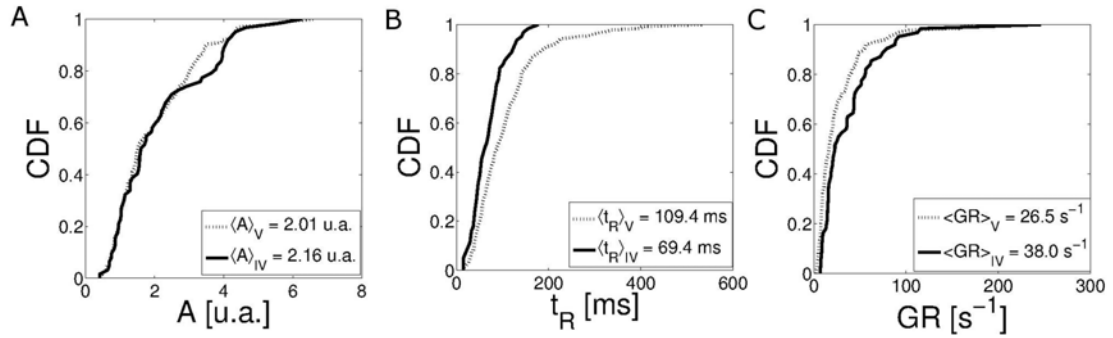


Figura 4.2: Cambios en las propiedades de los *puffs* con $[R2]_T$. CDFs de los parámetros medidos en el canal de Fluo-4 para experimentos realizados con $[E]_T = 45\mu M$: (A) A , (B) t_R y (C) GR . El cuadro dentro de la figura muestra el valor medio de cada parámetro para ambos sets. En todos los casos la línea punteada corresponde al Set **V** y la línea sólida al Set **IV**.

En la Fig. 4.3 mostramos las CDFs de la amplitud, A , (Fig. 4.3A), del rise time, t_R , (Figs. 4.3B) y de la tasa de crecimiento de la amplitud, GR , (Figs. 4.3C) de *puffs* observados con Fluo-4 para experimentos del Set **I** (línea sólida), del Set **II** (línea punteada) y del Set **III** (línea rayada).

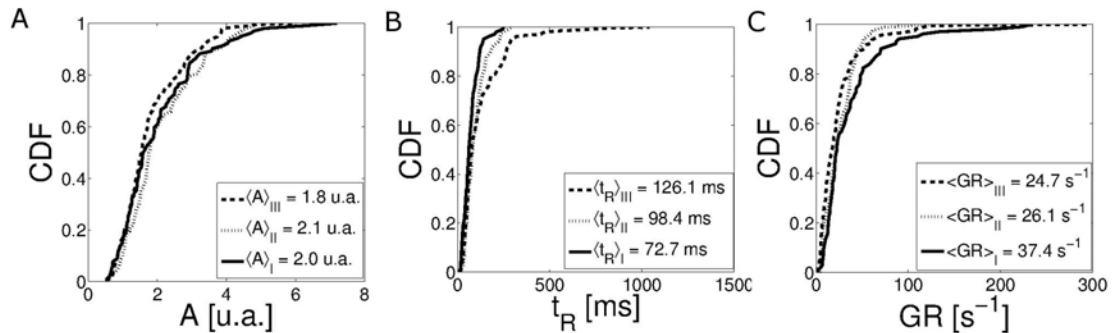


Figura 4.3: Cambios en las propiedades de los *puffs* con $[R2]_T$. Similar a la Fig. 4.2 pero para los experimentos con $[E]_T = 90\mu M$: (A) A , (B) t_R and (C) GR . En todos los casos la línea rayada corresponden al Set **III**, la línea punteada corresponde al Set **II** y la línea sólida corresponde al Set **I**. El cuadro dentro de la figura muestra el valor medio de cada parámetro para cada set.

En la Tabla 4.2 mostramos los valores medios, $\langle A \rangle$, $\langle t_R \rangle$ y $\langle GR \rangle$, de los *puffs* observados con Fluo-4 para los sets de la Tabla 4.1 cuando se varía la $[R2]_T$.

Experimento	$\langle A \rangle$ [u.a.]	$\langle t_R \rangle$ [ms]	$\langle GR \rangle$ [s^{-1}]
Set I	$2,03 \pm 1,23$	$72,7 \pm 45,6$	$37,4 \pm 40,2$
Set II	$2,12 \pm 1,05$	$98,4 \pm 58,6$	$26,1 \pm 18,9$
Set III	$1,81 \pm 0,94$	$126,1 \pm 129,9$	$24,7 \pm 29,3$
Set IV	$2,16 \pm 1,37$	$69,4 \pm 36,7$	$38,0 \pm 38,1$
Set V	$2,01 \pm 1,25$	$109,4 \pm 80,2$	$26,5 \pm 31,0$

Tabla 4.2: Valores medios de $\langle A \rangle$, $\langle t_R \rangle$ y $\langle GR \rangle$, de los *puffs* observados con Fluo-4 para los sets de la Tabla 4.1 donde se varía $[R2]_T$.

Si comparamos las propiedades de los *puffs* observados en Fluo-4 vemos que manteniendo $[F4]_T = 36\mu M$ y aumentando $[E]_T$ de 45 a $90\mu M$ (yendo del Set V al Set II), la amplitud media de los *puffs*, $\langle A \rangle$, aumenta y el valor medio del rise time, $\langle t_R \rangle$, disminuye (Tabla 4.2). El *dye* relativamente lento, Rhod-2, tiene un efecto similar sobre las observaciones con Fluo-4 en los experimentos con $[E]_T = 45\mu M$ cuando su concentración aumenta de 36 a $90\mu M$ (al ir del Set V al Set IV) y en los experimentos con $[E]_T = 90\mu M$ cuando su concentración aumenta de 0 a $36\mu M$ (al ir del Set III al Set II). Al aumentar $[R2]_T$ de 36 a $90\mu M$ mientras que $[E]_T = 90\mu M$ la amplitud media de los *puffs* no aumenta pero $\langle t_R \rangle$ disminuye y $\langle GR \rangle$ aumenta (Tabla 4.2). Esto es consistente con los resultados observados descritos en el Capítulo 3 al aumentar $[E]_T$ [Piegari et al. (2015)]. Como analizaremos más adelante en más detalle, para concentraciones moderadas, Rhod-2 actúa como un *buffer* lento en relación al *dye* Fluo-4.

En la Fig. 4.4 mostramos las CDFs del decay time, t_D , derivadas de las observaciones del canal de Fluo-4 para los experimentos de los sets IV (línea sólida) y V (línea punteada) (4.4A) y para los experimentos de los sets I (línea sólida), II (línea punteada) y III (línea rayada) (4.4B). Observamos que $\langle t_D \rangle$ disminuye a medida que $[R2]_T$ aumenta. Esto es consistente con las observaciones de [Dargan, Parker (2003)] que muestran que el aumento del EGTA acelera el decaimiento del perfil de fluorescencia de Ca^{2+} . Ésta es otra indicación de que Rhod-2 está actuando como un *buffer* lento cuando los *puffs* se monitorean con el *dye* rápido, Fluo-4.

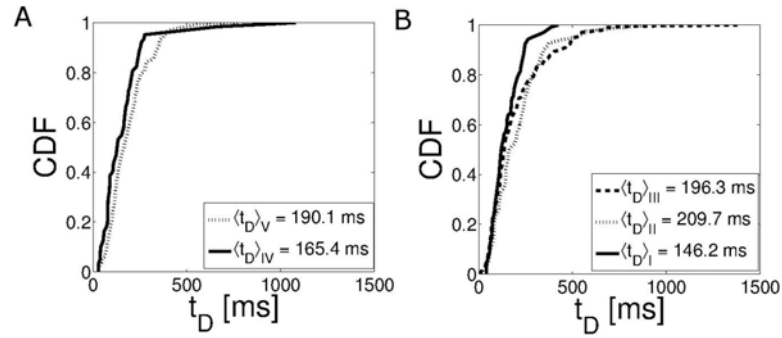


Figura 4.4: CDF del decay time (t_D) en el canal de Fluo-4 para experimentos con $[E]_T = 45\mu M$ (A) y con $[E]_T = 90\mu M$ (B). En (A) la línea punteada corresponde al Set V y la línea sólida al Set IV. En (B) la línea rayada corresponde al Set III, la línea punteada corresponde al Set II y la línea sólida al Set I. El recuadro muestra el t_D medio para cada set.

4.3.2. Fluo-4 como un *buffer* rápido

En las secciones previas presentamos los resultados que muestran que, cuando varía $[R2]_T$, las propiedades de los *puffs* que se observan con Fluo-4 cambian de forma similar a lo que se observó cuando se varió la concentración del *buffer* lento EGTA en el Capítulo 3 y en trabajos anteriores [Dargan, Parker (2003); Piegari et al. (2015)]. Esto nos lleva a la conclusión de que Rhod-2 actúa como un *buffer* lento en comparación con el *dye*, Fluo-4. Ahora analizamos si variando $[F4]_T$ observamos cambios similares en los *puffs* observados con Rhod-2 a los reportados en [Dargan, Parker (2003)] cuando se varía la concentración del *buffer* rápido BAPTA. En la Fig. 4.5 mostramos las CDFs de la amplitud, A , (Fig. 4.5A), del rise time, t_R , (Fig. 4.5B) y de la tasa de crecimiento de la amplitud, GR (Fig. 4.5C) de los *puffs* observados con Rhod-2 para experimentos del Set IV (línea sólida) y del Set VI (línea rayada). En la Tabla 4.3 mostramos los valores medios, $\langle A \rangle$, $\langle t_R \rangle$ y $\langle GR \rangle$, para los *puffs* observados con Rhod-2 cuando se varía $[F4]_T$. Aunque los cambios no son muy notorios, cuando se aumenta la concentración del *dye* rápido, $[F4]_T$, aumenta la fracción de *puffs* observados con Rhod-2 de amplitud chica ($A \leq 1,6u.a.$) o los de rise time grande ($t_R \geq 515ms$). También hay una fracción más grande de eventos con GR relativamente pequeño ($GR \leq 34s^{-1}$). El aumento en el número de *puffs* de amplitud pequeña al aumentar $[F4]_T$ es consistente con que el Fluo-4 esté actuando como un *buffer* rápido frente a Rhod-2 que logra atrapar Ca^{2+} con mayor velocidad lo que se refleja en un decrecimiento del Ca^{2+} ligado a Rhod-2. El aumento del número de eventos con mayor rise time, por otro lado, es consistente con la permanencia más prolongada de la elevación de la fluorescencia observada en [Dargan, Parker (2003)] al aumentar [BAPTA].

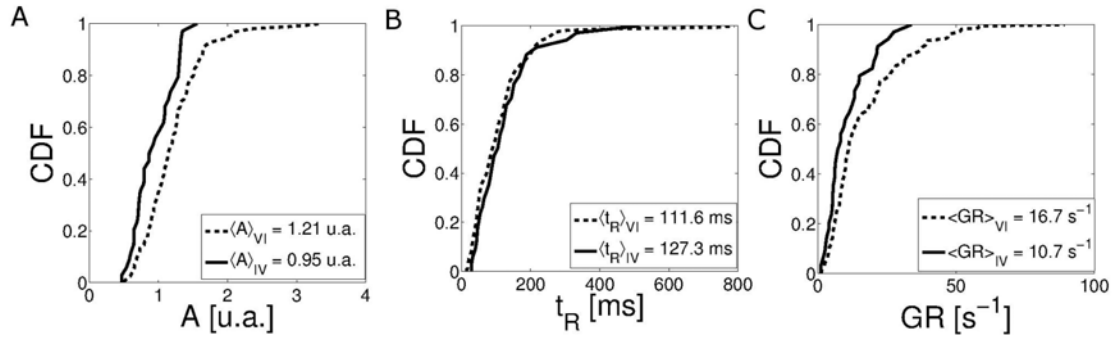


Figura 4.5: Cambios en las propiedades de los *puffs* con $[F4]_T$. CDFs que derivan de los parámetros de imágenes observadas en el canal de Rhod-2 de experimentos desarrollados con $[E]_T = 45\mu M$: (A) A , (B) t_R y (C) GR . En todos los casos la línea rayada corresponde al Set VI y la línea sólida al Set IV.

Experimento	$\langle A \rangle$ [u.a.]	$\langle t_R \rangle$ [ms]	$\langle GR \rangle$ [s ⁻¹]
Set IV	$0,95 \pm 0,30$	$127,3 \pm 98,6$	$10,7 \pm 8,1$
Set VI	$1,21 \pm 0,46$	$101,2 \pm 64,1$	$16,2 \pm 14,2$

Tabla 4.3: Valores medios de $\langle A \rangle$, $\langle t_R \rangle$ y $\langle GR \rangle$, de los *puffs* observados con Rhod-2 para los sets de la Tabla 4.1 donde se varía $[F4]_T$.

En la Fig. 4.6 mostramos las CDFs del decay time (t_D) y la duración (t_{R+D}) para los experimentos de los sets IV (línea sólida) y VI (línea rayada). A partir de estos datos concluimos que $\langle t_D \rangle$ aumenta cuando aumenta $[F4]_T$. Esto es de nuevo consistente con las observaciones de [Dargan, Parker (2003)] en las que se muestra que el decaimiento del perfil de fluorescencia se hace más lento al aumentar el *buffer* rápido, BAPTA.

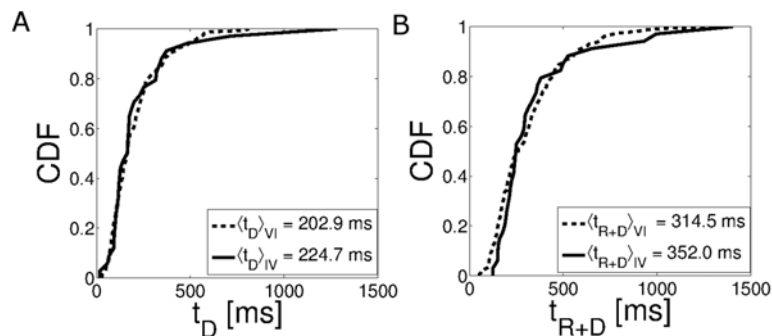


Figura 4.6: Efecto del *buffer* rápido. CDFs de los parámetros medidos en el canal de Rhod-2 para los experimentos con $[E]_T = 45\mu M$: (A) t_D y (B) t_{R+D} . En todos los casos la línea rayada corresponde al Set VI y la línea sólida al Set IV.

4.3.3. Comparación de la liberación de Ca^{2+} para diferentes tipos de experimentos

Hasta el momento comparamos las propiedades de los *puffs* observados en los canales de Fluo-4 o Rhod-2 cuando se cambia la concentración del otro *dye*. El desafío es poder distinguir si los cambios observados corresponden únicamente a cambios en la fluorescencia observada o si la corriente subyacente de Ca^{2+} también se modifica. Para esto calculamos la función A_{lib-R2} para los *puffs* observados en el canal de Rhod-2 y la función A_{lib-F4} para los observados en el canal de Fluo-4 como se describió en la Sec. 4.2.2.2 (ver Ec. 4.1). Como mencionamos en esa sección, dedujimos que estas funciones crecen con la corriente de Ca^{2+} subyacente a partir de simulaciones numéricas realizadas suponiendo que $[\text{Ca}^{2+}]_{basal}$ no cambia cuando cambian las concentraciones de *dye* o EGTA y que la liberación de Ca^{2+} ocurre en una región muy localizada. Discutiremos más adelante las implicancias que tendría en nuestras conclusiones modificar estas hipótesis.

En la Fig. 4.7A presentamos las CDFs de A_{lib-F4} obtenidas para el Set **V** (línea punteada) y el Set **IV** (línea sólida). El test de Kolmogorov-Smirnov no rechaza la hipótesis nula de que A_{lib-F4} de los sets **IV** y **V** vengan de la misma distribución continua con un 95% de nivel de significancia ($p_{value} = 0,19$). Sin embargo, el valor medio de A_{lib-F4} aumenta un poco a medida que aumenta $[R2]_T$ ($\langle A_{lib-F4} \rangle = 2,6u.a.$ para el Set **V** y $\langle A_{lib-F4} \rangle = 3,1u.a.$ para el Set **IV**). Este cambio es acompañado por un cambio en la velocidad media de las ondas evocadas en estas dos configuraciones como se ilustra en la Fig. 4.7B, donde mostramos las CDFs de la velocidad de las ondas observadas en el canal de Fluo-4 en los experimentos del Set **IV** (línea punteada) y del Set **V** (línea sólida). Tampoco en este caso el test de Kolmogorov-Smirnov rechaza la hipótesis nula de que los datos de los dos sets vengan de la misma distribución. Sin embargo, el p_{value} es muy chico ($p_{value} = 0,15$) y la velocidad media se vuelve más grande a medida que aumenta $[R2]_T$ (de $V_{F4} = 22\mu m/s$ a $V_{F4} = 27\mu m/s$ para $[R2]_T = 36$ y $90\mu M$, respectivamente). Como se discute más adelante, estos dos cambios pueden interpretarse dentro del mismo marco suponiendo que al aumentar las concentraciones de Rhod-2 se disrumpe el CICR entre *clusters*.

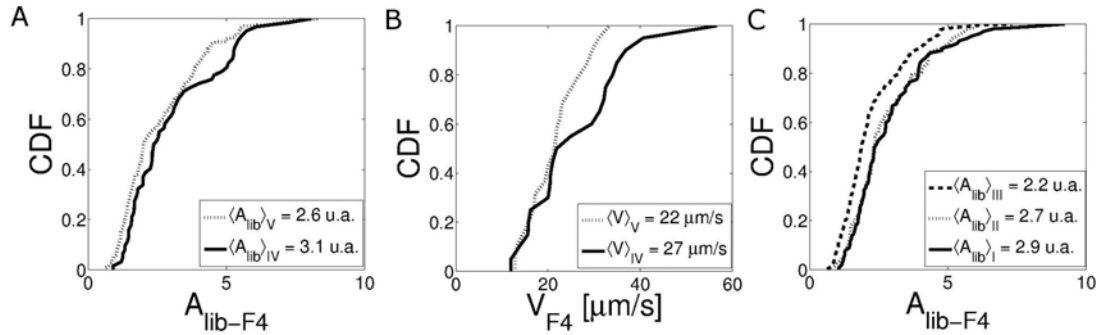


Figura 4.7: Estimación de la liberación de Ca^{2+} observada con el *dye* rápido. (A) Muestra las CDFs de A_{lib-F4} para experimentos desarrollados con $[F4]_T = 36\mu\text{M}$ y $[E]_T = 45\mu\text{M}$ cuando se varía Rhod-2. La línea sólida corresponde al Set **IV** y la línea punteada al Set **V**. Las distribuciones de la velocidad de la onda se representan para ambos tipos de experimentos en (B). (C) es similar a (A) pero para $[E]_T = 90\mu\text{M}$ (la línea sólida corresponde al Set **I**, la línea punteada al Set **II** y la línea rayada al Set **III**).

En la Fig. 4.7C presentamos las CDFs de A_{lib-F4} para experimentos del Set **III** (línea rayada), Set **II** (línea punteada) y Set **I** (línea sólida). El test de Kolmogorov-Smirnov rechaza la hipótesis nula de que A_{lib-F4} de los sets **III** y **II** y de los sets **III** y **I** vengan de la misma distribución continua con un 99% de nivel de significancia ($p_{value} = 2,1 \cdot 10^{-4}$ y $p_{value} = 4,6 \cdot 10^{-5}$, respectivamente), pero no puede rechazar la hipótesis de que los puntos del Set **II** y Set **I** vengan de la misma distribución ($p_{value} = 0,96$). En cualquier caso, hay una cola en la CDF de A_{lib-F4} para el Set **I** que no se puede observar en el Set **II**, lo cual es consistente con un aumento de la liberación de Ca^{2+} en el primero respecto del segundo ($\langle A_{lib-F4} \rangle = 2,2$ para el Set **III**, $\langle A_{lib-F} \rangle = 2,7$ para el Set **II** y $\langle A_{lib-F} \rangle = 2,9$ para el Set **I**). Estas comparaciones indican que la corriente de Ca^{2+} que subyace a los *puffs* observados aumenta a medida que aumenta la concentración del *dye* lento, Rhod-2. Aunque la transformación de la amplitud del *puff* a A_{lib} involucra ciertas incertezas, los cambios observados en el rise time (Fig. 4.3B) apoyan la conclusión de que hay eventos con corrientes de Ca^{2+} más grande para valores mayores de $[R2]_T$.

En la Fig. 4.8A presentamos las CDFs de A_{lib-R2} para los experimentos del Set **VI** (línea punteada) y Set **IV** (línea sólida). El test de Kolmogorov-Smirnov no puede rechazar que los puntos del Set **VI** y Set **IV** vengan de la misma distribución continua ($p_{value} = 0,42$) pero $\langle A_{lib-R2} \rangle$ disminuye cuando se agrega Fluo-4 (de 3.0 para el Set **V** a 2.8 para el Set **IV**) y los eventos con los mayores valores de A_{lib-R2} que se observan para el Set **V** no se observan en el Set **IV**. De esta manera, cuando aumenta la concentración del *dye* rápido, $[F4]_T$, los cambios que se obtienen en A_{lib-R2} y en la duración de los eventos parecen indicar que hay una liberación de Ca^{2+} más persistente aunque de menor corriente. Para analizar qué sucede con el Ca^{2+} total liberado calculamos $I_{lib-R2} = A_{lib-R2} \cdot t_R$. Mostramos las CDFs correspondientes en la Fig. 4.8B. De

estas distribuciones concluimos que el valor medio, $\langle I_{lib} \rangle$, permanece aproximadamente invariante al aumentar $[F4]_T$.

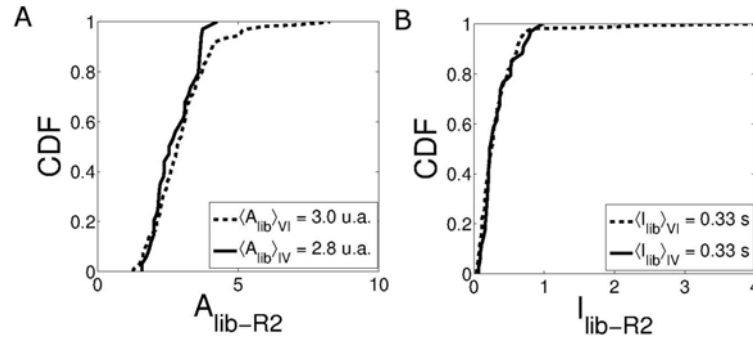


Figura 4.8: Estimación de la liberación de Ca^{2+} observada con el *dye* lento. CDF de A_{lib-R2} (A) y de I_{lib-R2} (B) para experimentos realizados con $[R2]_T = 90\mu\text{M}$ y $[E]_T = 45\mu\text{M}$ y dos concentraciones de Fluo-4. La línea sólida corresponde al Set **IV** y la línea rayada al Set **VI**.

La hipótesis de que A_{lib-F4} o A_{lib-R2} son funciones crecientes de la tasa de liberación de Ca^{2+} deriva de simulaciones con una fuente puntual de Ca^{2+} . De este modo, lo que hace el cálculo de A_{lib-F4} es compensar la disminución de Fluo-4 ligado a Ca^{2+} que ocurre cuando hay más Rhod-2 compitiendo con Fluo-4 para la misma fuente puntual de Ca^{2+} . El cálculo de A_{lib-R2} involucra una compensación similar ante el aumento de $[F4]_T$. En un experimento real, sin embargo, la liberación de Ca^{2+} ocurre sobre un región de un cierto ancho. Si los máximos de Rhod-2 ligado a Ca^{2+} y de Fluo-4 ligado a Ca^{2+} ocurren en posiciones muy cercanas entre sí, entonces la competencia de Fluo-4 y Rhod-2 por el mismo Ca^{2+} ocurre de forma similar al caso de una fuente puntual. Para este tipo de eventos suponemos que A_{lib} es una función creciente de la corriente subyacente de Ca^{2+} . Sin embargo, si los máximos ocurren en dos puntos muy separados entre sí es de esperar que no sea necesaria la corrección que involucra el cálculo de A_{lib} y que las amplitudes en Fluo-4 y en Rhod-2 den información que refleje de un modo fehaciente la cantidad de Ca^{2+} que está siendo liberada en la región donde ocurre cada máximo. Para analizar qué sucede en los *puffs* observados en los distintos sets calculamos, para cada uno de ellos, la distancia δ entre las ubicaciones de los máximos de Fluo-4 ligado a Ca^{2+} y de Rhod-2 ligado a Ca^{2+} . En las Figs. 4.9A, B, C y D mostramos las distribuciones de δ para el Set **V**, Set **IV**, Set **II** y Set **I**, respectivamente. Vemos que tanto para $[E]_T = 45\mu\text{M}$ como para $[E]_T = 90\mu\text{M}$ las distribuciones de δ se concentran alrededor de valores más chicos al aumentar $[R2]_T$. Esto significa que para $[R2]_T = 36\mu\text{M}$, Rhod-2 no es capaz de seguir la dinámica de la señal cerca de la fuente, mientras que para $[R2]_T$ más grande ($90\mu\text{M}$) aparentemente sí lo logra de modo que los máximos de los *puffs* observados con Fluo-4 y Rhod-2 tienden a estar más cerca. Esto también puede observarse en la Fig. 4.10 donde las imágenes de máscaras superpuestas para $[R2]_T = 36\mu\text{M}$ muestran que la

distribución de $CaR2$ está más desparramada en el espacio y rodeando a la de $CaF4$. Para $[R2]_T = 90\mu M$ $CaR2$ se ubica en el centro de la liberación y en los alrededores. Concluimos entonces que la corrección que está implícita en el cálculo de A_{lib-F4} podría no ser necesaria para los experimentos con $[R2]_T = 36\mu M$. En este sentido, si fijamos $\alpha_{F4,R2} = 0$ para $[R2]_T = 36\mu M$ y recalculamos $A_{lib,F4}$, las CDFs correspondientes se corren un poco a la izquierda en relación a las graficadas en las Figs. 4.7 y 4.8 pero la tendencia básica no cambia. Esto nos lleva a la conclusión de que hay eventos con mayor corriente de Ca^{2+} al aumentar $[R2]_T$. Más allá de sus consecuencias en relación a si la amplitud de los *puffs per se* da información suficiente sobre la corriente de Ca^{2+} que los subyace, las diferencias en las distribuciones espaciales reflejadas en la Fig. 4.10 brindan información sobre el modo en que compiten por el Ca^{2+} los *buffers* de distinta cinética como discutiremos más adelante.

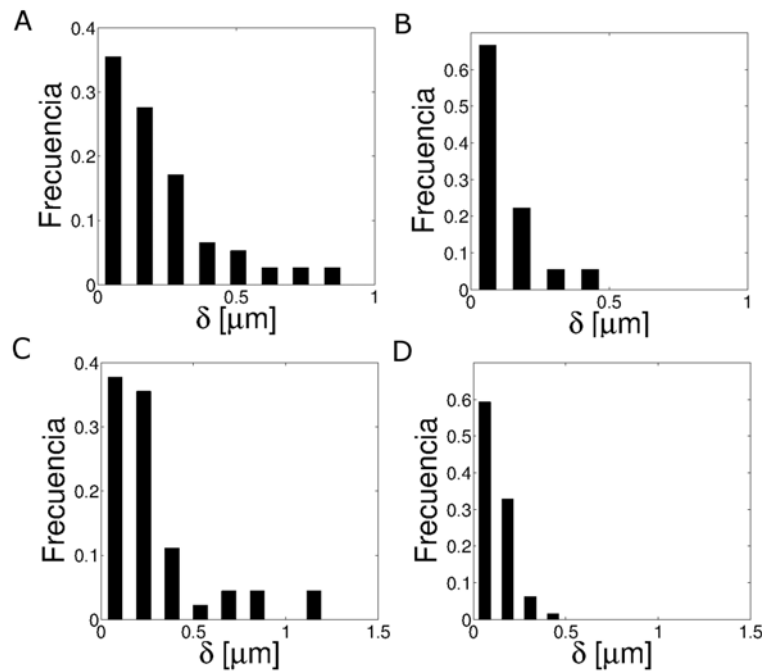


Figura 4.9: Distribuciones de la distancia, δ , entre las ubicaciones de los máximos de Fluo-4 ligado a Ca^{2+} y Rhod-2 ligado a Ca^{2+} durante *puffs* para el Set **V**, Set **IV**, Set **II** y Set **I** en (A), (B), (C) y (D), respectivamente.

En la Figura 4.10 mostramos varios *puffs* observados simultáneamente con Fluo-4 y con Rhod-2 en imágenes de máscaras superpuestas usando como umbral $0,6 \cdot CaD_{max}$ para Fluo-4 (verde) y para Rhod-2 (rojo).

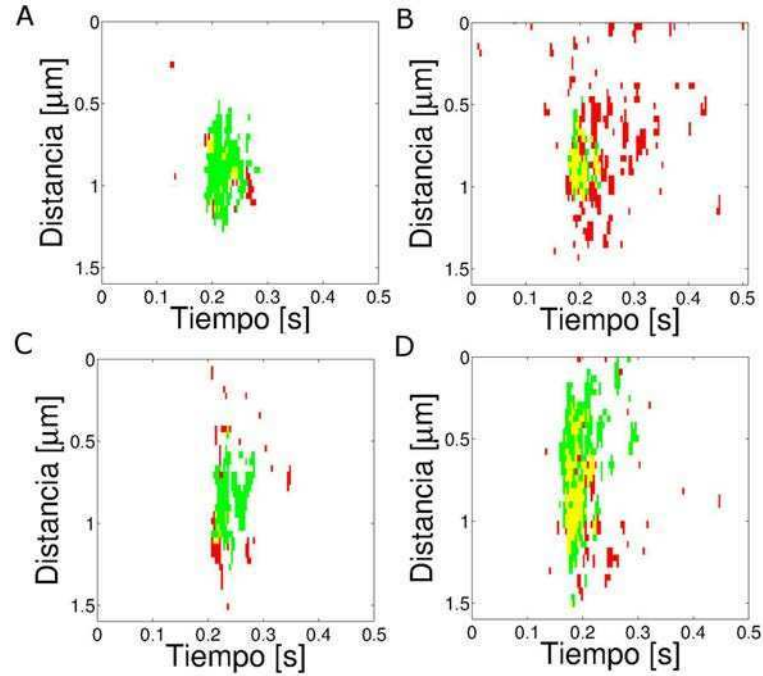


Figura 4.10: Distribución espacio-temporal típica de un *puff*. Máscaras superpuestas usando $0,6 \cdot CaD_{max}$ para Fluo-4 (verde) y para Rhod-2 (rojo). (A) y (C) corresponden a $[R2]_T = 36\mu M$ (Set V y Set II, respectivamente) y (B) y (D) corresponden a $[R2]_T = 90\mu M$ (Set IV y Set I, respectivamente).

4.3.4. Posibles causas del aumento de la liberación de Ca^{2+} al aumentar $[R2]_T$

En esta sección exploramos las posibles causas de que puedan observarse *puffs* con corrientes subyacentes de Ca^{2+} cada vez mayores a medida que aumenta la concentración del *dye* lento. Como analizamos en el Capítulo 3, este incremento en la fracción de eventos con corrientes altas puede deberse a un desacople más eficiente entre los *clusters* al aumentar la concentración de dicho *dye*. La existencia misma de los *puffs* de Ca^{2+} apoya la idea de que los RIP_3 s se organizan en *clusters*. Dado que el CICR subyace a la propagación de las señales, corrientes muy grandes que de otra manera llevarían a ondas podrían permanecer espacialmente localizadas al aumentar la concentración del *buffer* (*dye*) lento. En esta sección analizamos si ésta es la razón que explica los cambios observados en las distribuciones de A_{lib} al variar $[R2]_T$. Analizamos también en qué medida el acoplamiento entre *clusters* puede modificarse con las variaciones en $[R2]_T$. Para esto último utilizamos las simulaciones numéricas deterministas y calculamos, como se explica en el Apéndice A.2, la probabilidad, $P_0(t)$, de que un canal ubicado a una distancia, d , de una fuente puntual se abra antes de que haya transcurrido un tiempo, $t > 0$, desde el momento ($t = 0$) en que se encendió la fuente. Lo hacemos para fuentes

con $n_c = 10$ o $n_c = 50$, RIP_3s simultáneamente abiertos y para distintos valores de $[Ca^{2+}]_{basal}$.

En las Figs. 4.11A–C mostramos la probabilidad calculada a partir de simulaciones hechas con $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,1\mu M$, para las condiciones de los Sets **I**, **II** y **III**. Mostramos los resultados obtenidos a $d = 0,6\mu m$ en la Fig. 4.11A y a $d = 1,4\mu m$ en las Figs. 4.11B y C. El número de canales abiertos simultáneamente es $n_c = 10$ en las Figs. 4.11A y B y $n_c = 50$ en la Fig. 4.11C. El cambio de P_0 al variar $[R2]_T$ no es observable para $n_c = 10$ a $d = 1,4\mu m$ ($\leq 0,004$) mientras que puede ser $\sim 0,085$ a $d = 0,6\mu m$. Más aún, se cumple que $\Delta P_0(t) = P_0(t, d = 0,6\mu m, n_c = 10, [R2]_T = 90\mu M) - P_0(t, d = 0,6\mu m, n_c = 10, [R2]_T = 0\mu M) \approx 0,065$ a $t = d/V$ con $V \sim 10\mu m s^{-1}$, una velocidad de onda de Ca^{2+} típica. La máxima diferencia $\max_t \Delta P_0(t)$ aumenta con n_c . Esto se muestra en la Fig. 4.11C donde $n_c = 50$, $d = 1,4\mu m$ y $\max_t \Delta P_0(t) \sim 0,026$. En la Fig. 4.11D ilustramos qué sucede al variar $[Ca^{2+}]_{basal}$. En este caso comparamos la probabilidad de apertura, P_0 , a la distancia $d = 1,4\mu m$ de la fuente puntual obtenida a partir de simulaciones realizadas con las concentraciones del Set **III** (línea rayada) y Set **I** (línea sólida) pero con un valor distinto de $[Ca^{2+}]_{basal}$ para cada una de ellas ($100nM$ y 50 , respectivamente). En este caso la fuente consta de $n_c = 10$ RIP_3s simultáneamente abiertos.

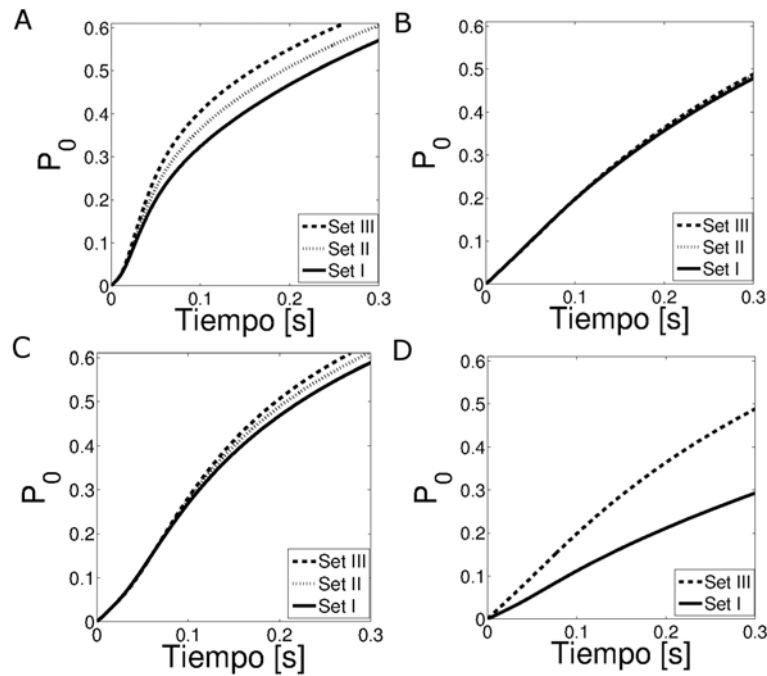


Figura 4.11: Dependencia de P_0 con la distancia d de la fuente y $[Ca^{2+}]_{basal}$. (A) Probabilidad a la distancia, $d = 0,6\mu m$, obtenida de simulaciones con $n_c = 10$. (B) Ídem (A) pero para $d = 1,4\mu m$. (C) Ídem (B) pero a partir de simulaciones con $n_c = 50$. (D) Ídem (B) pero a $d = 1,4\mu m$ con $n_c = 10$ mientras varía $[Ca^{2+}]_{basal}$ de $100nM$ (Set **III**) a $50nM$ (Set **I**). La línea rayada corresponde al Set **III**, la línea punteada corresponde al Set **II**, y la línea sólida corresponde al Set **I**.

Las variaciones de P_0 como función de $[R2]_T$ que pueden observarse en las Figs. 4.11A)–C dan una indicación de en qué medida puede alterarse el acoplamiento entre *clusters* a medida que (sólo) se varía la concentración del *dye* lento. Ahora analizamos si dichas variaciones pueden explicar los cambios en las distribuciones de la tasa de liberación de Ca^{2+} durante los eventos localizados observados en los experimentos que se muestran en la Fig. 4.7. Para ello suponemos que la cantidad A_{lib} que graficamos en esa figura es linealmente proporcional al número de canales simultáneamente abiertos durante el evento, n_c , de forma que su distribución difiere de la de n_c por un factor constante. Si bien se sabe que la amplitud, A , de los *puffs* aumenta no linealmente con n_c para n_c grande [Solovey et al. (2011)], por simplicidad acá trabajaremos como si la dependencia fuera lineal. Supongamos entonces que conocemos la probabilidad, $P(n_c)$, de que n_c canales de un *cluster* estén simultáneamente abiertos. Esta probabilidad depende de las condiciones experimentales, pero en este cálculo sólo nos concentraremos en analizar las variaciones que ocurren como función de $[R2]_T$. Ahora bien, suponiendo que Rhod-2 actúa como un *buffer* lento, es de esperar que no afecte el CICR dentro del *cluster* [Piegari et al. (2015)]. Por esta razón suponemos que $P(n_c)$ no depende de $[R2]_T$. Lo que puede cambiar al variar Rhod-2 es si el evento con n_c canales abiertos en un *cluster* permanece localizado (permanece como un *puff*) o genera la apertura de canales en un *cluster* vecino (se convierte en una onda). Escribimos:

$$P(n_c) = P(n_c \wedge \text{loc} \mid [R2]_T) + P(n_c \wedge \text{w} \mid [R2]_T), \quad (4.8)$$

donde $P(n_c \wedge \text{loc} \mid [R2]_T)$ es la probabilidad de que haya un evento con n_c canales simultáneamente abiertos en un *cluster* y que el evento permanezca espacialmente localizado y $P(n_c \wedge \text{w} \mid [R2]_T)$ es la probabilidad equivalente cuando el evento se convierte en una onda, ambas calculadas para el mismo valor de $[R2]_T$ (el símbolo \wedge indica una probabilidad conjunta y el símbolo \mid una probabilidad condicional). Todas las probabilidades con las que trabajamos acá están definidas sobre el conjunto de eventos, es decir, para $n_c \geq 1$. Para evaluar cómo las dos probabilidades en las que descompusimos a $P(n_c)$ varían con $[R2]_T$ las re-escribimos como:

$$\begin{aligned} P(n_c \wedge \text{loc} \mid [R2]_T) &= P(n_c \mid \text{loc}, [R2]_T)P(\text{loc} \mid [R2]_T) \\ &= P(n_c \mid \text{loc}, [R2]_T) (1 - P(\text{w} \mid [R2]_T)), \end{aligned} \quad (4.9)$$

$$P(n_c \wedge \text{w} \mid [R2]_T) = P(\text{w} \mid n_c, [R2]_T)P(n_c), \quad (4.10)$$

donde $P(\text{w} \mid n_c, [R2]_T)$ es la probabilidad de que, dado que hay n_c canales abiertos en un *cluster* para un dado $[R2]_T$, el evento resultante induzca la liberación de Ca^{2+} desde un *cluster* vecino (es decir, de lugar a una onda); $P(n_c \mid \text{loc}, [R2]_T)$ es la probabilidad de que un evento que permanece localizado para $[R2]_T$ tenga n_c canales simultáneamente

abiertos y $P(\text{loc} | [R2]_T)$ y $P(\text{w} | [R2]_T)$ son las probabilidades de que un evento obtenido para un valor de $[R2]_T$ sea un *puff* o una onda, respectivamente. Estas últimas probabilidades pueden escribirse como:

$$P(\text{loc} | [R2]_T) \equiv \sum_{n_c \geq 1} P(\text{loc} | n_c, [R2]_T) P(n_c) \quad (4.11)$$

$$P(\text{w} | [R2]_T) \equiv \sum_{n_c \geq 1} P(\text{w} | n_c, [R2]_T) P(n_c), \quad (4.12)$$

y satisfacen $P(\text{loc} | [R2]_T) + P(\text{w} | [R2]_T) = 1$, propiedad que usamos en la Ec. 4.9. Combinando las Ecs. 4.8–4.10 llegamos a:

$$P(n_c) = P(n_c | \text{loc}, [R2]_T) (1 - P(\text{w} | [R2]_T)) + P(\text{w} | n_c, [R2]_T) P(n_c) \quad (4.13)$$

Usando las distribuciones derivadas del análisis de los *puffs* obtenidos en experimentos realizados con $[R2]_T$ podemos estimar $P(n_c | \text{loc}, [R2]_T)$. En particular, lo haremos bajo la hipótesis de que A_{lib} , la cantidad que derivamos de las observaciones, es linealmente proporcional a n_c . Por otro lado asociamos a $P(\text{w} | n_c, [R2]_T)$ con la probabilidad, $P_0(t)$, calculada mediante las simulaciones numéricas que ilustramos en la Fig. 4.11. El objetivo es introducir en la Ec. 4.13 la información derivada de estas simulaciones y de los experimentos y así decidir para qué parámetros de las simulaciones se obtienen resultados consistentes. En particular, nos interesa determinar hasta qué punto las variaciones en la densidad de probabilidad de A_{lib} obtenidas al variar $[R2]_T$ se compensan por las variaciones en la probabilidad de evocar ondas de modo que la suma que representa la Ec. 4.13 permanezca constante. Con este fin comparamos $P(n_c \wedge \text{loc} | [R2]_T)$ y $P(\text{w} | n_c, [R2]_T)$ para $[R2]_T = 90\mu M$ y $[R2]_T = 0$. Definiendo $\Delta P_w(n_c) \equiv P(\text{w} | n_c, 0) - P(\text{w} | n_c, 90\mu M)$ y $\Delta P_w = \sum_{n_c \geq 1} \Delta P_w(n_c) P(n_c)$, a partir de las Ecs. 4.13 y 4.12 obtenemos:

$$\begin{aligned} \Delta P_w(n_c) P(n_c) = \\ (P(n_c | \text{loc}, 90) - P(n_c | \text{loc}, 0)) (1 - P(\text{w} | 90)) + P(n_c | \text{loc}, 0) \Delta P_w. \end{aligned} \quad (4.14)$$

Los experimentos muestran que la diferencia entre las distribuciones de tamaño de los *puffs* es más notable en la región de eventos de tamaño más grande (mirar Fig. 4.7), es decir, para los valores de n_c más grandes. Luego calculamos:

$$\begin{aligned} \sum_{n_c \geq n_M} \Delta P_w(n_c) P(n_c) = \\ (F(n_M | \text{loc}, 0) - F(n_M | \text{loc}, 90)) (1 - P(\text{w} | 90)) + \Delta P_w (1 - F(n_M | \text{loc}, 0)), \end{aligned} \quad (4.15)$$

donde F es la densidad de probabilidad acumulada,

$$F(n_M, | \text{loc}, [R2]_T) = \sum_{n_c=1}^{n_M} P(n_c | \text{loc}, [R2]_T), \quad (4.16)$$

que suponemos es igual a la de A_{lib} calculada en los experimentos. Combinamos ahora los resultados de las Figs. 4.11 y 4.7 para estimar los términos de la Ec. 4.15 y verificar si obtenemos términos aproximadamente del mismo orden a ambos lados de la igualdad.

Primero estimamos el término de la derecha de la Ec. 4.15. En particular asociamos n_M a un valor de A_{lib} para el cual $F(n_M | \text{loc}, 0)$ sea suficientemente cercano a 1. Elegimos $A_{lib} \approx 4,8$ para el cual $F(n_M | \text{loc}, 0) \approx 0,98$. Para este valor, $F(n_M | \text{loc}, 90) \approx 0,90$. De este modo resulta: $F(n_M | \text{loc}, 0) - F(n_M | \text{loc}, 90) \approx 0,08$. No tenemos una estimación directa de $P(w | [R2]_T)$. Suponiendo que el número más probable de RIP_{3s} simultáneamente abiertos en un *cluster* es $n_c = 10$ aproximamos $P(w | [R2]_T) \approx P_0(t = d/V, d, n_c = 10, [R2]_T)$, donde P_0 es la probabilidad de apertura calculada como en la Fig. 4.11 a una distancia d de la fuente y a un tiempo, $t = d/V$, desde el inicio de la liberación donde V es una velocidad de onda típica (consideramos el rango entre 10 y $20\mu/s$). De este modo, de las simulaciones con $d = 1,4\mu m$ y $V = 20\mu m/s$ obtenemos $P(w | 90) \approx 0,14$ y $\Delta P_w = P(w | 0) - P(w | 90) \approx 0,004$. Por lo tanto, el término de la derecha es del orden de $0,08 \times (1 - 0,14) + 0,004 \times 0,02 \sim 0,069$ para $d = 1,4\mu m$ y $V = 20\mu m/s$. Este número varía a 0,06 si usamos $V = 10\mu m/s$.

Ahora usamos las simulaciones para poner una cota superior, $\Delta P_{w,max}$, a $\Delta P_w(n_c)$ en el término de la izquierda de la Ec. 4.15. De este modo resulta: $\sum_{n_c \geq n_M} \Delta P_w(n_c) P(n_c) \leq \Delta P_{w,max} \sum_{n_c \geq n_M} P(n_c) = \Delta P_{w,max} (1 - F(n_M))$ donde $F(n_M) = \sum_{n_c \leq n_M} P(n_c)$. Para cuantificar la cota estimamos $P(w | n_c, [R2]_T) \approx P_0(t = d/V)$, con P_0 la probabilidad de apertura de las simulaciones como antes. En particular observamos que $\Delta P_w(n_c) \equiv P(w | n_c, 0) - P(w | n_c, 90\mu M)$ es más grande cuanto más grande es n_c . De esta manera, obtenemos una cota superior usando simulaciones similares a las de la Fig. 4.11 pero para $n_c = 50$ (un número de RIP_{3s} simultáneamente abiertos muy grande). Obtenemos $\Delta P_w(n_c) \leq \Delta P_{w,max} \approx 0,028 - 0,065$ para las condiciones de la Fig. 4.11A (que corresponde a $d = 0,6\mu m$) y $\Delta P_{w,max} \approx 0,0025 - 0,0264$ para las de la Fig. 4.11C (que corresponde a $d = 1,4\mu m$). Para acotar el término de la izquierda necesitamos estimar también $F(n_M)$. Dada nuestra interpretación de los resultados, suponemos que $F(n_M) \leq F(n_M | \text{loc}, 90)$. Si se puede despreciar la fracción de eventos que se convierten en ondas para $[R2]_T = 90\mu M$ podemos aproximar $F(n_M) \approx F(n_M | \text{loc}, 90) \approx 0,90$. En lo que sigue usamos tanto este valor como $F(n_M) = 0,80$. Con estas estimaciones, la cota superior del término de la izquierda es $\sim 0,005$ o menor si usamos los datos derivados de las simulaciones con $d = 1,4\mu m$

Por lo tanto usando ambos términos difieren siempre en un orden de magnitud para $d = 1,4\mu m$. Con los datos derivados para $d = 0,6\mu m$ obtenemos $P(w|90) \approx 0,14$ y $\Delta P_w = 0,028$ usando $V = 20\mu m/s$ y $F(n_M) = 0,90$. Los términos izquierdo y derecho resultantes son 0,02 y 0,07, respectivamente. El de la derecha cambia a 0,06 si consideramos $V = 10\mu m/s$ y el de la izquierda cambia a 0,04 si consideramos $F(n_M) = 0,80$. En este caso ambos términos de la Ec. 4.15 son del mismo orden de magnitud.

4.3.5. Cambios en la concentración de calcio basal, $[Ca^{2+}]_{basal}$

Los cálculos de las subsecciones previas muestran que los cambios en la distribución de la tasa de liberación de Ca^{2+} cuando se varía $[R2]_T$ no son compatibles con las simulaciones que estiman la probabilidad de apertura de RIP_3 s vecinos a un *cluster* activo si suponemos que la distancia entre el canal y el *cluster* es $\sim 1,4\mu m$, y el Ca^{2+} basal permanece invariante al variar $[R2]_T$. Como se ilustra en la Fig. 4.11D, una disminución del $[Ca^{2+}]_{basal}$ al aumentar $[R2]_T$ cambia la probabilidad de apertura a la distancia $d = 1,4\mu m$ en la dirección que se necesita para explicar los cambios observados en las distribuciones de liberación de Ca^{2+} . Acá analizamos si el Ca^{2+} basal está decreciendo al aumentar $[R2]_T$ y en qué medida. Mostramos en la Fig. 4.12 las funciones de densidad acumulada (CDF) de la fluorescencia basal calculada de acuerdo a la Ec. 4.2 a partir de los experimentos realizados con $[E]_T = 45\mu M$. Mostramos la distribución de $\langle F_{0_{F4}} \rangle$ en la Fig. 4.12A y la de $\langle F_{0_{R2}} \rangle$ en la Fig. 4.12B. En (B) multiplicamos los valores, $\langle F_{0_{R2}} \rangle$, por 90/36 en el caso del Set **V** para hacer las distribuciones de los sets **IV** (que tiene $[R2]_T = 90\mu M$) y **V** (que tiene $[R2]_T = 36\mu M$) fácilmente comparables. Observamos que las CDFs se desplazan hacia valores más pequeños a medida que aumenta Rhod-2. Esta observación apoya la idea de que, en promedio, $[Ca^{2+}]_{basal}$ disminuye al aumentar Rhod-2. Sin embargo, este resultado no es conclusivo, dado que no observamos cambios en la misma dirección cuando comparamos experimentos sólo con un *dye* (datos no mostrados).

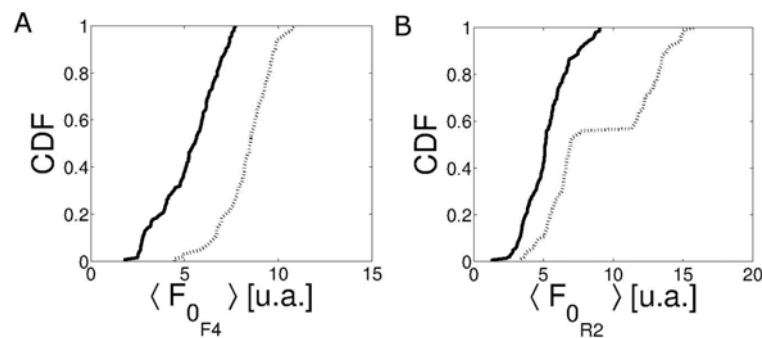


Figura 4.12: CDF de la fluorescencia basal. $\langle F_0 \rangle$ para experimentos con $[E]_T = 45\mu M$ se muestran en el canal de Fluo-4 (A) y del canal de Rhod-2 (B). En ambos casos el Set **V** corresponde a la línea punteada y el Set **IV** a la línea sólida.

Para una comparación más cuantitativa entre los distintos sets estimamos para los distintas combinaciones de *dye* y EGTA probadas el $[Ca^{2+}]_{basal}$ promedio. Para tal fin suponemos que los experimentos del Set **II** están caracterizados por el mismo valor de $\overline{\langle N_{R2} \rangle}$ que los del Set **V** y los del set **I** por el mismo valor que los del set **IV**. También suponemos que el cociente entre los valores de $\overline{\langle N_{R2} \rangle}$ que caracterizan a cada uno de estos pares de sets es igual al cociente de los correspondientes valores de $[R2]_T$. Comparamos en primer lugar el valor, $\overline{\langle F_{0R2} \rangle}$, para los sets **IV** y **V**, suponiendo que vienen dados por la Ec. 4.3. Si además suponemos que $[Ca^{2+}]_{basal}$ es suficientemente chico para el Set **II** de forma que $(q_{1R2} - q_{2R2})[Ca^{2+}]_{basal}/[Ca^{2+}]_{basal} + K_d \ll q_{2R2}$ igualamos:

$$\frac{\overline{\langle F_{0R2} \rangle}_{\mathbf{V}}}{\overline{\langle F_{0R2} \rangle}_{\mathbf{IV}}} = \left(\left(\frac{q_{1R2}}{q_{2R2}} - 1 \right) \frac{[Ca^{2+}]_{basal, \mathbf{V}}}{[Ca^{2+}]_{basal, \mathbf{V}} + K_{dR2}} + 1 \right) \frac{\overline{\langle N_{R2} \rangle}_{\mathbf{V}}}{\overline{\langle N_{R2} \rangle}_{\mathbf{IV}}}. \quad (4.17)$$

Usando los valores, $\overline{\langle F_{0R2} \rangle}_{\mathbf{V}} = 9,1u.a.$ y $\overline{\langle F_{0R2} \rangle}_{\mathbf{IV}} = 13,2u.a.$, determinados a partir de los experimentos y $\overline{\langle N_{R2} \rangle}_{\mathbf{V}}/\overline{\langle N_{R2} \rangle}_{\mathbf{IV}} = [R2]_{T, \mathbf{V}}/[R2]_{T, \mathbf{IV}} = 36/90$ obtenemos $[Ca^{2+}]_{basal} = 115nM$ para el Set **V**. Luego comparamos la fluorescencia basal media medida en el canal de Fluo-4, $\overline{\langle F_{0F4} \rangle}$, para los mismos sets de experimentos. Nuevamente usamos la Ec. 4.3 para relacionar $\overline{\langle F_{0F4} \rangle}$ con $[Ca^{2+}]_{basal}$ pero sin despreciar ningún término. Teniendo en cuenta que $[Ca^{2+}]_{basal} = 115nM$ para el Set **V**, que $\overline{\langle N_{F4} \rangle}_{\mathbf{V}}/\overline{\langle N_{F4} \rangle}_{\mathbf{IV}} = [F4]_{T, \mathbf{V}}/[F4]_{T, \mathbf{IV}} = 1$ y los valores $\overline{\langle F_{0F4} \rangle}_{\mathbf{V}} = 8,4u.a.$ y $\overline{\langle F_{0F4} \rangle}_{\mathbf{IV}} = 5,3u.a.$ derivados de los experimentos determinamos $[Ca^{2+}]_{basal} = 60nM$ para el Set **IV**. Procedemos análogamente comparando la fluorescencia media obtenida en Fluo-4 para los sets **IV** y **I** y para los sets **II** y **I** y así derivamos los valores de $[Ca^{2+}]_{basal}$ para los distintos sets. Ahora bien, la secuencia de comparaciones elegida es arbitraria y se obtienen otros valores si se siguen otras secuencias. Mostramos en la Tabla 4.4 los valores de $[Ca^{2+}]_{basal}$ que pueden obtenerse de este modo. La estimación que varía considerablemente dependiendo de la manera en que hacemos las comparaciones es para el Set **I**. Todos los resultados parecen indicar que hay una pequeña disminución en $[Ca^{2+}]_{basal}$ cuando aumenta $[R2]_T$ o $[E]_T$. Sin embargo, los valores de $[Ca^{2+}]_{basal}$ que podemos derivar a partir de los experimentos con un solo *dye* contradicen esta afirmación. En cualquier caso, la diferencia más grande que obtuvimos para los experimentos realizados con dos *dyes* es de aproximadamente $50nM$ (corresponde a la comparación entre los sets **II** y **I** para los que obtuvimos $\sim 100nM$ y $50nM$, respectivamente). Éste es el rango de valores de $[Ca^{2+}]_{basal}$ que exploramos en la Fig. 4.11D. Si comparamos los términos a izquierda y derecha de la Ec. 4.15 como antes pero usando los números derivados de esta figura concluimos que si bien usando $[Ca^{2+}]_{basal} = 50nM$ para el Set **I** y $100nM$ para el Set **III** se obtienen términos más comparables entre sí aún a la distancia $d = 1,4\mu m$ la corrección no es suficiente. Se explican mejor los cambios en la distribución de liberación de Ca^{2+} mostrada en la Fig. 4.7C si suponemos un d más chico. De las simulaciones

equivalentes a la Fig. 4.11D pero a $d = 0,6\mu\text{m}$ obtenemos $P(w | 90) \approx 0,08$ y $\Delta P_w = 0,12$ para el tiempo correspondiente a la velocidad $V \sim 20\mu\text{m}/\text{s}$ que lleva a que los términos a izquierda y derecha valgan, respectivamente 0,023 y 0,076. El término de la derecha cambia a 0,07 si consideramos $P(w | 90) \approx 0,18$ que es el que se deriva a un tiempo correspondiente a la velocidad de propagación más lenta ($V \sim 10\mu\text{m}/\text{s}$). En $d = 1,4\mu\text{m}$ resulta $P(w | 90) \approx 0,08$ y $\Delta P_w = 0,12$ y la diferencia entre ambos términos es levemente más grande (los términos valen 0.01 y 0.08, respectivamente) que para $d = 0,6\mu\text{m}$. Si consideramos $P(w | 90) \approx 0,16$ que es el valor que se obtiene para el tiempo correspondiente a la velocidad $V \sim 10\mu\text{m}/\text{s}$, el término de la derecha cambia 0,07 y la diferencia sigue siendo mayor que a la distancia $d = 0,6\mu\text{m}$.

Experimento	$\langle F_{0_{F4}} \rangle$ (u.a.)	$\langle F_{0_{R2}} \rangle$ (u.a.)	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}$ (nM)
Set I	$6,1 \pm 1,2$	$13,2 \pm 3,4$	50-74
Set II	$7,2 \pm 1,6$	$6,4 \pm 1,4$	94
Set IV	$5,3 \pm 1,6$	$13,2 \pm 4,0$	60
Set V	$8,4 \pm 1,7$	$9,1 \pm 3,8$	115

Tabla 4.4: Estimación del $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}$.

4.3.6. Competencia entre Fluo-4 y Rhod-2

Las observaciones analizadas hasta el momento nos llevan a dos conclusiones principales. Por un lado, agregar un *buffer* lento disrumpe de forma más eficiente el CICR entre los RIP_{3s} de *clusters* vecinos de forma que los eventos de liberación de Ca^{2+} de mayor amplitud no llegan a ondas y permanecen localizados. Por otro lado, las estimaciones de la Sección 4.3.5 sugieren que es necesario que haya RIP_{3s} a una distancia más chica que la típica distancia entre *clusters* de $\sim 1,4 - 2\mu\text{m}$ para poder explicar la mayor eficiencia en la disrupción del CICR entre *clusters* en presencia de cantidades más grandes del *buffer* lento. En esta sección investigamos estas dos conclusiones a partir de la observación simultánea de las distribuciones de cada *dye* ligado a Ca^{2+} .

La Fig. 4.13 muestra un ejemplo de estas distribuciones para un evento observado en un experimento del Set IV que involucra liberación de Ca^{2+} desde múltiples sitios. Mostramos las distribuciones de Fluo-4 y Rhod-2 ligados a Ca^{2+} en las Figs. 4.13A y B, respectivamente. También mostramos en las Figs. 4.13C y D promedios espaciales de ambas distribuciones para las regiones 1 y 2 de la Fig. 4.13A. Inicialmente $[\text{CaR2}]$ es más grande en el sitio 2 que en el sitio 1. Esto resulta en un aumento mucho más lento de la distribución de $[\text{CaF4}]$ en este sitio que además está retrasado respecto del aumento de $[\text{CaF4}]$ en el sitio 3. Rhod-2 está capturando Ca^{2+} de forma más eficiente en el sitio 2 que en los otros sitios lo que reduce el rise time de $[\text{CaF4}]$ en ese sitio.

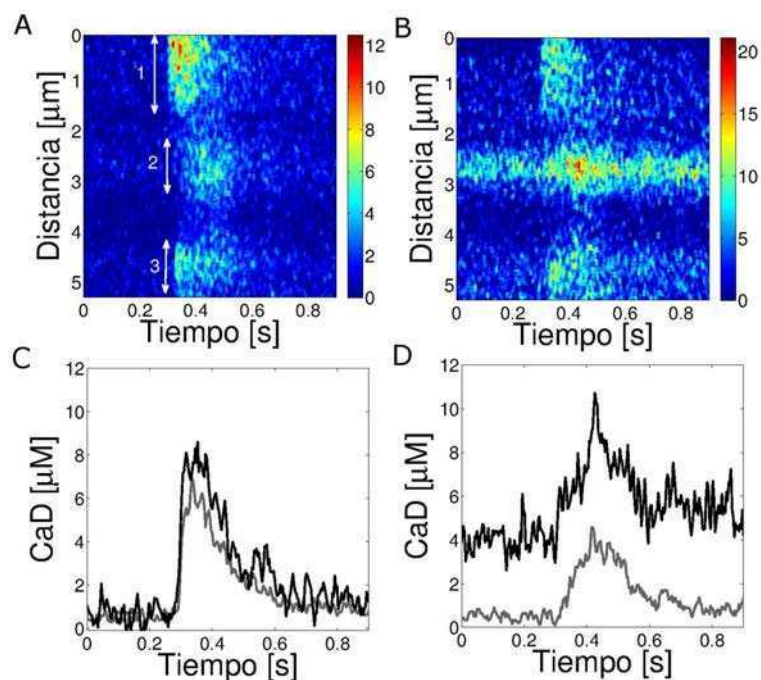


Figura 4.13: Dinámica de Fluo-4 y Rhod-2 ligados a Ca^{2+} durante un evento de liberación múltiple observado con el Set **IV**. (a) $[\text{CaF4}]$. (b) $[\text{CaR2}]$. La barra de colores representa niveles de $[\text{CaF4}]$ y $[\text{CaR2}]$ en μM . (c) Perfiles promedio de $[\text{CaF4}]$ (gris) y $[\text{CaR2}]$ (negro) computados sobre la región 1 definida en (a). (d) Similar a (c) pero con los promedios obtenidos sobre la región 2 definida en (a).

En las Figs. 4.14A y B mostramos las distribuciones de Fluo-4 ligado a Ca^{2+} y Rhod-2 ligado a Ca^{2+} , respectivamente para una onda obtenida en las condiciones del Set **IV**. En la Fig. 4.14C mostramos los píxeles para los cuales $[\text{CaF4}]$ (verde) y $[\text{CaR2}]$ (rojo) son mayores al 60% de sus valores máximos sobre toda la imagen. La ubicación espacial de estos píxeles se muestra en la barra a la derecha de la figura. Observamos que la región donde se cumple que estas distribuciones superan el umbral del 60% es bastante ancha (más de $2,5\mu\text{m}$). Se obtienen regiones de tamaño parecido si se define el umbral con el 75% de la fluorescencia máxima en cada canal. Estos resultados parecen indicar que la liberación de Ca^{2+} ocurre sobre regiones suficientemente anchas como para que la separación entre las mismas resulte menor a lo que se ha venido suponiendo es la separación entre *clusters*, $\sim 1.4\text{-}2\mu\text{m}$, suposición que se deduce a partir de identificar la ubicación de los sitios de liberación con la de los picos de los *puffs*. El hecho de que la región de liberación sea relativamente ancha también es apoyado por los resultados de la Fig. 4.14F donde mostramos un evento para el cual la fluorescencia observada en el canal de Fluo-4 en un experimento del Set **V** aumenta casi simultáneamente sobre una región espacialmente extendida (Fig. 4.14F izquierda). La barra de la derecha corresponde a la ubicación de los píxeles para los cuales la fluorescencia de Fluo-4 durante el evento es igual o mayor al 75% del valor máximo alcanzado. Vemos que los mismos abarcan una región de al menos $3\mu\text{m}$. La elevación al 75% del máximo en esa región se alcanza

en un tiempo $\sim 50ms$ lo que lleva a suponer que no hay propagación de la señal sino liberación desde fuentes independientes ubicadas a lo largo de los $3\mu m$ de la región.

Comparando las distribuciones de *dye* ligado a Ca^{2+} en las regiones 1 y 4 definidas en la Fig. 4.14A observamos que también en este ejemplo en las regiones donde $[CaR]$ es más grande, Fluo-4 se une a Ca^{2+} más lentamente (mirar las Figs. 4.14D y E).

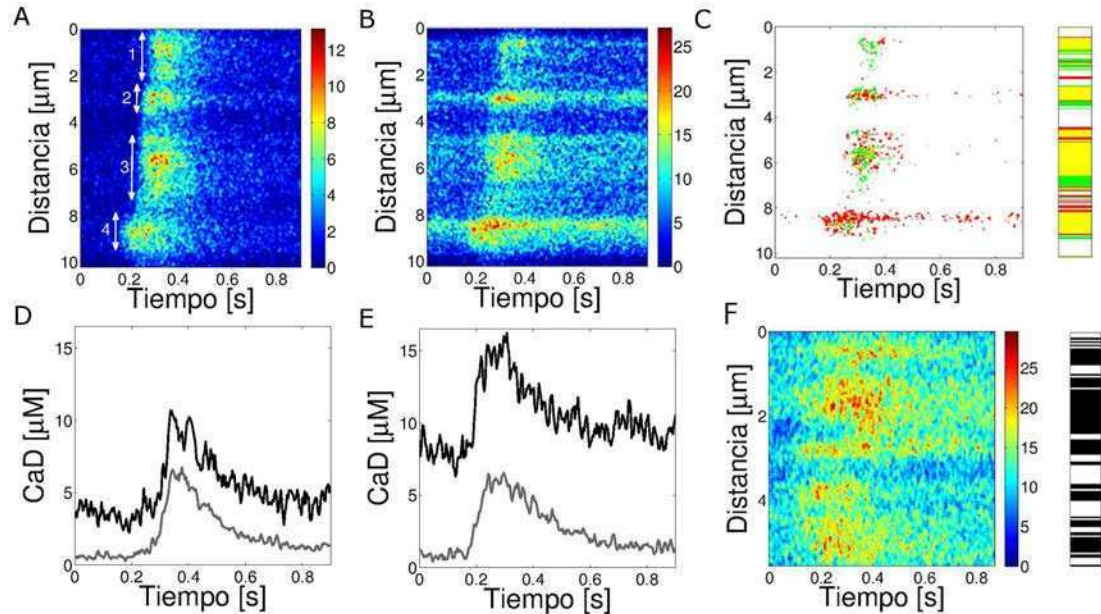


Figura 4.14: Efecto de Rhod-2 sobre las ondas de calcio: propagación. Imagen linescan para Fluo-4 (A) y para Rhod-2 (B). Las doble flechas marcan sitios de liberación. (C) Imágenes de máscaras superpuestas de CaD para Fluo-4 (verde) y para Rhod-2 (rojo) usando como umbral $0,6 \cdot CaD_{max}$ (izquierda) con una barra de las ubicaciones espaciales de estos píxeles (derecha). En (D) y (E) mostramos los perfiles de CaD promediados en función del tiempo para Fluo-4 (gris) y para Rhod-2 (negro) sobre las regiones 1 y 4. (F) Fluorescencia F de la onda de calcio obtenida con el Set **V** para Fluo-4 (izquierda) y la ubicación espacial de los píxeles que pasan el umbral $0,75 \cdot F_{max}$ (derecha).

4.4. Discusión

En este Capítulo estudiamos el rol de los *buffers* sobre las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 observando en simultáneo las señales con dos *dyes* de distinta cinética. En [Dargan, Parker (2003); Dargan et al. (2004)] estudiaron el efecto de agregar *buffers* lentos o rápidos en este tipo de señales mirando la distribución de Ca^{2+} ligado al único *dye* (Oregon Green 488 BAPTA 1) usado en los experimentos. En esos trabajos, los autores observaron que el *buffer* lento aceleraba el decaimiento de la concentración de *dye* ligado a Ca^{2+} y convertía en eventos locales lo que de otra forma habrían sido ondas. Por otro lado, el *buffer* rápido prolongaba la elevación de *dye* ligado a Ca^{2+} y las señales evocadas estaban extendidas espacialmente. Nuestro enfoque consistió en usar dos *dyes*

para observar directamente la distribución espacio-temporal de los *buffers* (de distinta cinética) ligados a Ca^{2+} .

Estudios previos basados en simulaciones numéricas y modelado mostraron que el tiempo medio durante el cual los RIP_3s permanecían abiertos decrecía y que aquél en el que permanecían cerrados aumentaba cuando se agregaba un *buffer* inmóvil en las simulaciones. Agregar un *buffer* móvil no afectaba la cinética de liberación en el caso de RIP_3s aislados pero sí lo hacía en el caso de los RIP_3s organizados en *clusters*. En particular, el tiempo medio durante el cual las simulaciones mostraban liberación de Ca^{2+} desde *clusters* aumentaba si el *buffer* moderaba el efecto inhibitorio que las altas concentraciones de Ca^{2+} generan sobre los canales y que aumentaba si el efecto neto era disminuir el acoplamiento entre RIP_3s debido al CICR. El primer comportamiento se encontraba en los *clusters* con RIP_3s muy empaquetados y el segundo en aquéllos donde la separación media entre RIP_3s del *cluster* era suficientemente grande. Estos resultados concuerdan con otros que señalan la importancia de la organización espacial dentro del *cluster* en la determinación del comportamiento emergente del *cluster* como un todo [Diambra, Marchant (2011); Solovey, Dawson (2010); Solovey et al. (2011)]. El estudio analítico de [Fraiman, Dawson (2014)] analizó el efecto de los *buffers* en secuencias de *puffs* que ocurrían en un mismo sitio de liberación (es decir, en un mismo *cluster*). Este estudio mostró que agregar un *buffer* rápido podía aumentar el número medio de canales que participan de un *puff* y disminuir el intervalo de tiempo medio entre *puffs*.

En este Capítulo primero buscamos indicios de que el *dye* Rhod-2 estaba actuando como se puede esperar de un *buffer* lento y que Fluo-4 lo hacía como un *buffer* rápido. Para este fin analizamos cómo cambiaban las propiedades de los *puffs* observados en Fluo-4 al aumentar Rhod-2 y viceversa. En particular, observamos que el rise time medio disminuía y la tasa de crecimiento de la amplitud aumentaba al aumentar $[R2]_T$ (ver Tabla 4.2 y las Figs. 4.3–4.4) y que, para ciertos tipos de experimentos, esto también se acompañaba por un aumento en la amplitud media del *puff*. Esto es similar a los cambios que se observan cuando aumenta la concentración del *buffer* lento EGTA en el Capítulo 3. El decay time medio, $\langle t_D \rangle$, también disminuía al aumentar $[R2]_T$, una observación que es consistente con las de [Dargan, Parker (2003)] que muestra que el EGTA casi elimina la componente tardía en la liberación de Ca^{2+} acelerando el decaimiento del perfil de fluorescencia observado. Todas estas observaciones apoyaron nuestra hipótesis de que Rhod-2, al menos para concentraciones moderadas, estaba actuando como un *buffer* lento cuando los *puffs* se monitoreaban con el *dye* rápido, Fluo-4. Luego analizamos si al aumentar $[F4]_T$, los *puffs* observados en Rhod-2 mostraban los cambios que inducen los *buffers* rápidos en las señales de Ca^{2+} . En este caso analizamos solo dos situaciones. Aunque los resultados no son conclusivos, la fracción de eventos de amplitudes

pequeñas ($A \leq 1,6$) y rise time grande ($t_R \geq 515ms$) observados con Rhod-2 aumentaba al aumentar Fluo-4. Esto concuerda con las observaciones de [Dargan, Parker (2003); Dargan et al. (2004)] que muestran que hay una liberación de Ca^{2+} más continua aunque de menor amplitud cuando se agrega un *buffer* rápido. Como se discutió en [Fraiman, Dawson (2014)] esto puede atribuirse a que, debido a la presencia del *buffer* rápido, disminuya el rol inhibitorio del Ca^{2+} sobre los RIP_3s permitiendo la re-apertura de los canales y liberaciones más continuas. La reducción en la amplitud de la fluorescencia observada, por otro lado, podría atribuirse al rápido atrapamiento del *buffer* (en nuestro experimento, Fluo-4).

Una vez que establecimos que variando $[R2]_T$ los *puffs* observados con Fluo-4 mostraban cambios similares a los observados previamente al aumentar un *buffer* lento, investigamos si los cambios eran puramente observacionales o si podían atribuirse a una modificación en la liberación de Ca^{2+} subyacente. Para este fin computamos la cantidad A_{lib-F4} (Eq. 4.1), que compensa las distintas cantidades de Ca^{2+} que atrapa Rhod-2 a medida que aumenta su concentración. Las simulaciones numéricas muestran que esta cantidad es una función creciente de la corriente subyacente de Ca^{2+} cuando la fuente es puntual. Las distribuciones de A_{lib-F4} obtenidas en los distintos experimentos mostraron un corrimiento hacia valores mayores al aumentar $[R2]_T$. La aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov a los datos obtenidos con el Set **V** y el Set **IV** (Fig. 4.7) no rechazó la hipótesis nula de que los valores A_{lib-F4} provinieran de la misma distribución continua con un 95% de nivel de significancia ($p_{value} = 0,19$), pero el valor medio $\langle A_{lib-F4} \rangle$ aumentó levemente (de 2.6 a 3.1) al aumentar $[R2]_T$. Comparando las distribuciones derivadas de los experimentos del Set **III**, Set **II** y Set **I**, el test de Kolmogorov-Smirnov rechazó la hipótesis nula de que los datos de los sets **III** y sets **II** o **I** vinieran de la misma distribución continua con un 99% de nivel de significancia ($p_{value} = 2,1 \cdot 10^{-4}$ y $p_{value} = 4,6 \cdot 10^{-5}$, respectivamente), pero no pudo rechazar la hipótesis de que el Set **II** y el Set **I** vinieran de la misma distribución continua ($p_{value} = 0,96$). De todos modos, la CDF de A_{lib-F4} para el Set **I** presenta una cola que no se observa en el caso del Set **II**. Todas estas comparaciones son consistentes con un aumento de la liberación de Ca^{2+} al aumentar $[R2]_T$. Ahora bien, esta conclusión se obtiene suponiendo que los cambios en A_{lib-F4} son una buena indicación de los cambios en la liberación de Ca^{2+} , hecho que está basado en simulaciones que usan una única fuente puntual de Ca^{2+} . Si el máximo de Rhod-2 ligado a Ca^{2+} y Fluo-4 ligado a Ca^{2+} aproximadamente se encuentran en la misma región, la competencia entre Rhod-2 y Fluo-4 por el mismo Ca^{2+} ocurre de forma similar al caso de una fuente puntual y A_{lib-F4} debería proveer una función creciente de la corriente subyacente de Ca^{2+} . Si los dos máximos están más separados, la competencia entre los dos *dyes* no es tan fuerte y por ende quizás no es necesario usar la corrección. Para evaluar si era necesario hacer este cálculo, analizamos la distribución

de la distancia, δ , entre la ubicación de los máximos de Fluo-4 ligado a Ca^{2+} y Rhod-2 ligado a Ca^{2+} durante los *puffs* de Ca^{2+} observados en los distintos tipos de experimentos (Sec. 4.3.3). En particular, encontramos que en todos los casos las distribuciones de δ se concentraban alrededor de un valor chico para los experimentos con $[R2]_T = 90\mu\text{M}$ y que alcanzaban valores más grandes para los experimentos con $[R2]_T = 36\mu\text{M}$. Si fijamos en la Ec. 4.1 $\alpha_{F4,R2} = 0$ para $[R2]_T = 36\mu\text{M}$ y recalculamos A_{lib-F4} las correspondientes curvas en las Figs. 4.7 y 4.8 se corren levemente a la izquierda pero la tendencia básica que lleva a la conclusión de que la liberación de Ca^{2+} aumenta al aumentar $[R2]_T$ no cambia. La variación en la liberación de Ca^{2+} con $[R2]_T$ también es consistente con los cambios mostrados por la velocidad media de las ondas en los sets **IV** y **V**. Como se muestra en las Figs. 4.7(B) la velocidad media aumenta con $[R2]_T$ (de $V_{F4} = 22\mu\text{m/s}$ a $V_{F4} = 27\mu\text{m/s}$ para $[R2]_T = 36\mu\text{M}$ y $90\mu\text{M}$, respectivamente) y aunque el test de Kolmogorov-Smirnov no rechaza la hipótesis de que ambos sets vengan de la misma distribución, el p_{value} obtenido es chico (0,15). Esta observación apoya nuestra interpretación de las diferencias observadas en las distribuciones de tamaños de los *puffs* para experimentos con $[F4]_T = 36\mu\text{M}$, $[E]_T = 90\mu\text{M}$ y con $[R2]_T = 90\mu\text{M}$ y $[EGTA] = 45\mu\text{M}$ del Capítulo 3 [Piegari et al. (2015)]. En ese trabajo hipotetizamos que una concentración alta de *buffer* lento resultaba en una disrupción más eficiente del CICR entre *clusters*. Si el hecho de que ocurran *puffs* con una corriente más grande para $[R2]_T$ más grande se debe a que hay una disrupción más eficiente del CICR entre *clusters*, entonces es razonable que los eventos que se convierten en ondas, en promedio, sean de velocidades más grandes a medida que $[R2]_T$ es más grande. Por lo tanto, los resultados de la Fig. 4.7 tanto para *puffs* como para ondas pueden explicarse consistentemente suponiendo que al aumentar $[R2]_T$, la comunicación entre *clusters* mediada por Ca^{2+} disminuye y los eventos que empiezan con una liberación de Ca^{2+} rápida en un sitio, que de otra manera llevaría a ondas, permanecen localizados.

Dada esta explicación consistente de los cambios observados a medida que se modifica $[R2]_T$ analizamos luego los mecanismos por los cuales un valor alto de $[R2]_T$ podía disrupir el CICR entre *clusters* más eficientemente. Para este fin computamos numéricamente la probabilidad de que un RIP_3 ubicado a una distancia d de una fuente puntual de Ca^{2+} se abriera antes de que hubiera pasado un tiempo t desde el encendido de la fuente y analizamos los resultados obtenidos para $t = V/d$ con $V = 10 - 20\mu\text{m/s}$ una velocidad de onda típica. Repetimos las simulaciones bajo distintas condiciones usando los parámetros de DeYoung-Keizer para las probabilidades de transición del modelo cinético del RIP_3 . Utilizamos la probabilidad así calculada para estimar de qué modo debería variar la distribución de tamaños de los eventos localizados al cambiar $[R2]_T$ y lo comparamos con la distribución de A_{lib-F4} obtenida en los experimentos (Fig. 4.7).

En particular, las simulaciones mostraron que los cambios en P_0 con $[R2]_T$ eran inobservables a una distancia, $d = 1,4\mu m$, de una fuente de Ca^{2+} puntual con un número razonable de RIP_3s simultáneamente abiertos (~ 10) si suponíamos que $[Ca^{2+}]_{basal}$ no se modificaba con $[R2]_T$ (Fig. 4.11B). Las diferencias eran aún más chicas para $d = 2\mu m$ (datos no mostrados). La distancia típica entre *clusters*, estimada a partir de la observación de *puffs*, es de $1,4 - 2\mu m$. Estos resultados indican que los cambios en $[R2]_T$ *per se* no pueden explicar los cambios observados en la distribución de tamaños de liberación de Ca^{2+} (Fig. 4.7) si la distancia sobre la cual ejerce algún efecto el agregado del *buffer* lento es del orden de la separación típica entre *clusters*. Dados estos resultados, repetimos los cálculos para distancias más chicas, $\sim 0,6\mu m$ (Fig. 4.11A), y determinamos que en ese caso el efecto de cambiar $[R2]_T$ podría resultar en un cambio similar a los obtenidos experimentalmente en la distribución de A_{lib-F4} . Suponiendo que $[Ca^{2+}]_{basal}$ decrece al aumentar $[R2]_T$ obtuvimos resultados a $d = 1,4\mu m$ (Fig. 4.11D) que eran más compatibles con las observaciones de la Fig. 4.7 que los obtenidos a $[Ca^{2+}]_{basal}$ fijo (Fig. 4.11B). La condición que mejor explica la Fig. 4.7 se obtuvo con simulaciones que combinan un cambio en $[Ca^{2+}]_{basal}$ con $[R2]_T$ y suponen que hay al menos un RIP_3 a una distancia más corta que la típica entre *clusters* ($d \sim 0,6\mu m$) involucrado en la propagación de ondas. De acuerdo a esta descripción, el *buffer* lento agregado estaría actuando sobre estos RIP_3s sueltos impidiendo o dificultando la propagación de ondas.

Para analizar la factibilidad de la explicación más probable de los cambios observados en la distribución de A_{lib-F4} con $[R2]_T$ investigamos, por un lado, si $[Ca^{2+}]_{basal}$ cambiaba con $[R2]_T$. Por otro lado, buscamos indicios del rol que podría tener Rhod-2 como disruptor del CICR durante distintos tipos de señales y de la existencia de RIP_3s a distancias del centro de los *clusters* menores a $1,4 - 2\mu m$. Para determinar la $[Ca^{2+}]_{basal}$ analizamos los píxeles de las imágenes correspondientes a tiempos anteriores al inicio del pulso de fotólisis usando el modelo introducido en el Capítulo 2 [Piegari et al. (2014)]. Listamos las estimaciones promedio de $[Ca^{2+}]_{basal}$ en la Tabla 4.4. Comparando estos valores para los sets **I** y **II** (experimentos con $[E]_T = 90\mu M$ donde $[R2]_T$ decrece de $90\mu M$ a $36\mu M$) vimos que este valor aumentaba indicando que al aumentar $[R2]_T$ disminuye un poco la concentración de calcio basal. Comparando las estimaciones de $[Ca^{2+}]_{basal}$ para los sets **IV** y **V** (experimentos con $[E]_T = 45\mu M$ donde $[R2]_T$ disminuye de $90\mu M$ a $36\mu M$) también vimos que este valor aumentaba al disminuir $[R2]_T$. Esto coincide con las observaciones de la Fig. 4.12. Analizando los valores de la Tabla 4.4 para los distintos tipos de experimentos concluimos que $[Ca^{2+}]_{basal}$ podía variar a lo sumo entre 100 y $50nM$ cuando se pasa de los experimentos del Set **III** al Set **I**. Aunque estos datos indican la existencia de una tendencia decreciente de $[Ca^{2+}]_{basal}$ en presencia de una concentración creciente de EGTA o de *dyes* (Fig. 4.12), los resultados no son

completamente conclusivos: los valores de $[Ca^{2+}]_{basal}$ obtenidos en ausencia de Rhod-2 resultaron ser más bajos que en cualquier otro tipo de experimento.

Para estudiar el rol de Rhod-2 durante distintos tipos de señales analizamos las distribuciones de Rhod-2 ligado a Ca^{2+} y Fluo-4 ligado a Ca^{2+} en algunos ejemplos paradigmáticos. Mostramos en la Fig. 4.13 un ejemplo en el cual la liberación de Ca^{2+} aparentemente ocurre en al menos 3 sitios. En este ejemplo $[CaR2]$ inicialmente es más grande en el sitio 2 que en el sitio 1, lo que eventualmente lleva a un crecimiento más lento de $[CaF4]$ en el sitio 2. El rise time en $[CaF4]$ también está retrasado en el sitio 2 respecto del sitio 3. Además, la velocidad media se vuelve más grande a medida que aumenta $[R2]_T$. Este ejemplo muestra que donde Rhod-2 está capturando Ca^{2+} más eficientemente (sitio 2) el rise time en $[CaF4]$ se hace más lento. Aunque en este caso particular Rhod-2 no impide la propagación de la señal (observada en Fluo-4) en el sitio 2, el ejemplo ilustra cómo podría hacerlo en casos con menos liberación de Ca^{2+} (desde los sitios 1 o 3). Esto se condice con las observaciones de la Fig. 4.9D donde se puede observar que Rhod-2 se ubica en el sitio de liberación y además lo rodea, es decir, se ubica en una región más extensa. Este mismo comportamiento se observa en la onda ilustrada en la Fig. 4.14. En esta figura también buscamos la región sobre la cual la distribución de *dye* ligado a Ca^{2+} está por encima del 60% de sus valores máximos. Observamos que esto ocurría sobre regiones espacialmente contiguas que se extendían a lo largo de $\sim 2,5\mu m$. Esto parece indicar que hay RIP_3s distribuidos sobre una región bien ancha. Si bien hay picos definidos de fluorescencia que confirman la existencia de *clusters* de RIP_3s , la elevación de la fluorescencia a niveles tan altos en regiones extendidas parece corroborar la existencia de algunos RIP_3s en el medio. Esto concuerda con el análisis de [Diambra, Marchant (2011)] donde los autores discutieron la posibilidad de la co-existencia de distintas micro-arquitecturas de *clusters* lo que se reflejaría en la posibilidad de que ocurrieran eventos de liberación de Ca^{2+} con distintas cinéticas. La idea de que existen tanto RIP_3s en *clusters* como RIP_3s sueltos permitiría compatibilizar también las observaciones aparentemente contradictorias de que los RIP_3s que expresan la proteína fluorescente verde (RIP_3 -GFP) cubren prácticamente toda la membrana del RE con el hecho de que haya eventos de liberación de Ca^{2+} localizados que ocurren sistemáticamente en sitios muy reproducibles [Smith et al. (2010)]. El EGTA que se usa en los experimentos de observación de *puffs* podría estar impidiendo que la liberación de Ca^{2+} desde esos RIP_3s “sueltos” pudiera ser observada con los *dyes* rápidos de modo que a partir de las imágenes obtenidas con estos últimos sólo pudieran localizarse los RIP_3s de los *clusters*.

Como discutimos antes, la variación con $[F4]_T$ de las distribuciones de las distintas propiedades de los *puffs* observadas en Rhod-2 es consistente con los resultados obtenidos en [Dargan, Parker (2003); Dargan et al. (2004)] al variar el buffer rápido, BAPTA.

En particular, los experimentos analizados en este Capítulo mostraron *puffs* de amplitud menor y de rise time mayor al aumentar $[F4]_T$ (Fig. 4.5). El análisis de A_{lib-R2} (la cantidad creciente con la corriente de Ca^{2+} para los *puffs* observados en Rhod-2) mostró una pequeña reducción de $\langle A_{lib-R2} \rangle$ (Fig. 4.8A). Por otro lado, los eventos con los valores más grandes de A_{lib-R2} observados con el Set **IV** aparentemente no estaban presentes en el caso del Set **VI**. Esto nos lleva a la conclusión de que la corriente de Ca^{2+} , no sólo el Ca^{2+} ligado a Rhod-2, decrece al aumentar la concentración del *dye* rápido, Fluo-4. Esto parece contradecir la idea de que la presencia de un *buffer* rápido (en nuestro caso, Fluo-4) disminuye la inhibición del Ca^{2+} sobre los RIP_3 s permitiendo que ocurra una mayor liberación. Debemos recordar, sin embargo, que A_{lib} es un “reportero” de corriente de Ca^{2+} no del Ca^{2+} total liberado. Para estimar esto último calculamos $I_{lib} = A_{lib} \cdot t_R$. Encontramos que I_{lib} permanecía prácticamente invariante al variar $[F4]_T$ (ver Fig. 4.8B). Los resultados sobre cómo varían A_{lib-R2} y I_{lib-R2} junto con la mayor duración del tiempo durante el cual hay liberación, t_R , cuando aumenta $[F4]_T$ es consistente con la hipótesis del rol dual de los *buffers* rápidos sobre las propiedades de las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 s. Por un lado, si su concentración es suficientemente alta, pueden moderar el CICR dentro de un *cluster* dando lugar a señales de menor corriente de Ca^{2+} . Su habilidad para atrapar Ca^{2+} rápidamente, por otro lado, puede impedir la inhibición de los RIP_3 s permitiendo la re-apertura casi inmediata de los canales que participan de las señales prolongando así su duración. La combinación de un tiempo de liberación más prolongado pero a una tasa menor al aumentar la concentración del *buffer* puede dar lugar a una cantidad total de Ca^{2+} liberada que permanece invariante como la observada en nuestros experimentos al variar $[F4]_T$.

Capítulo 5

Del ovocito al huevo maduro: ¿cómo dependen las señales de Ca^{2+} de la distribución espacial de los RIP_3s ?

5.1. Resumen

Las características de las señales intracelulares de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s están determinadas por la cinética de la liberación de los iones desde el retículo, por las propiedades de transporte del Ca^{2+} citosólico en presencia de los varios mecanismos que tienden a disminuir su concentración y por la distribución espacial de los RIP_3s . Esta última propiedad le da características bastante únicas: el hecho de que la probabilidad de apertura de los RIP_3s aumente con $[\text{Ca}^{2+}]$ a bajas concentraciones hacen del citosol un medio excitable y la distribución espacialmente inhomogénea de los RIP_3s hace que esa excitabilidad sea no uniforme. De este modo, dependiendo de la relación entre los tiempos característicos del transporte de Ca^{2+} entre RIP_3s vecinos y de la cinética de la liberación, la propagación de las señales puede permanecer espacialmente restringida o propagarse como una onda saltatoria o continua [Dawson et al. (1999)]. Los ovocitos de *Xenopus laevis* brindan una plataforma única donde estudiar de qué modo la distribución espacial de los RIP_3s impacta sobre las características de las señales ya que el retículo se reconfigura con la maduración. El cambio de geometría se correlaciona con cambios en las propiedades de las señales observadas las que tienden a ser más extendidas espacialmente en el huevo maduro que en los ovocitos inmaduros [Sun et al. (2011)]. En este Capítulo presentamos un estudio preliminar de las características de las señales

de Ca^{2+} en huevos madurados con progesterona comparándolas con las de las observadas en ovocitos inmaduros frente al mismo tipo de estímulo. Presentamos también los resultados de simulaciones numéricas estocásticas donde estudiamos de qué modo varía la propagación cuando un mismo número de RIP_3s se encuentra uniformemente distribuido en el medio u organizado en *clusters* separados por una distancia media mayor. Comparando los comportamientos observados en los experimentos con los de las simulaciones vemos que, si bien las señales en los ovocitos inmaduros muestran liberaciones localizadas tipo *puff* que no están presentes en los huevos y que reflejan el impacto de la distribución inhomogénea de RIP_3s en los primeros, es aparentemente la capacidad diferente de remoción de Ca^{2+} citosólico en los dos tipos celulares la propiedad que más influye sobre las distintas dinámicas observadas. En particular, mientras que en los experimentos realizados en ovocitos inmaduros se observa un pico rápido en la fluorescencia poco después de iniciar la fotoliberación del IP_3 enajaulado seguido de otro que tarda más en decaer, en los maduros la fluorescencia sube lentamente aproximándose a un valor estacionario que no se alcanza mientras dura la fotoliberación. Cuando se detiene la fotólisis del IP_3 , la fluorescencia decae bi-exponencialmente en el caso de los ovocitos inmaduros y en forma casi lineal en los huevos maduros. El primer comportamiento puede asociarse a la dinámica de bombas mientras que el último parece estar mas relacionado a un decaimiento por difusión. La remoción diferente del Ca^{2+} citosólico da lugar a distintas densidades de probabilidad del tamaño de eventos obtenidos en las simulaciones numéricas. Mientras que las bajas tasas de remoción dan lugar a densidades casi Gaussianas alrededor de un valor medio de tamaño bien definido independientemente de la distribución espacial de los RIP_3s [Lopez et al. (2012)], las altas tasas llevan a densidades casi exponenciales en el caso de distribuciones espacialmente uniformes de los RIP_3s las que adquieren una cola larga cuando los RIP_3s pasan a estar distribuidos en *clusters*. Los RIP_3s que participan de los eventos en el caso en que la densidad de tamaños es cuasi-Gaussiana parecen limitarse a regiones espacialmente restringidas como si los canales se abrieran independientemente uno de otros pero con un número medio de RIP_3s simultáneamente abiertos bien definido. Si bien no hay acoplamiento espacial entre los RIP_3s en este caso la dinámica da lugar a un comportamiento espacialmente homogéneo del Ca^{2+} citosólico que explica la subida lenta de la fluorescencia observada en los huevos maduros.

5.2. Métodos

5.2.1. Experimentos

Los ovocitos fueron tratados como se describe en el Apéndice A.1. Para la maduración los ovocitos se incubaron usando progesterona. Se brindan más detalles en el Apéndice A.1.

5.2.2. Análisis de las imágenes

Calculamos la fluorescencia media de un frame como:

$$F_m = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N_x} \sum_{j=1}^{N_x} F(x_i, x_j) \quad (5.1)$$

donde $N = N_x \cdot N_x$ y la suma sobre i y j es sobre los píxeles del frame.

Para caracterizar diferencias en la propagación de la señal en ovocitos y huevos partimos el frame en 25 subframes y calculamos el promedio de F_m en cada subregión. Estudiamos cómo cambian los tiempos característicos en distintas subregiones del ovocito.

5.2.3. Simulaciones numéricas

Para estudiar cómo afecta la distribución de los RIP_{3s} a las señales de Ca²⁺ realizamos simulaciones numéricas estocásticas de la dinámica del CICR entre *clusters* como se describe en la Sección A.3.2. Listamos en la Tabla 5.1 la separación media entre *clusters*, dm , el número medio de *clusters*, λ_N , que satisface $\lambda_N = (2R)^2/dm^2$ con $R = 10\mu m$, el número medio de RIP_{3s} con IP₃ pegado en cada cluster, N_{RIP3} , y la tasa de remoción de Ca²⁺ citosólica, δ_{Ca} , los parámetros que variamos para las distintas simulaciones. Listamos también el número total de RIP_{3s}, $N_{total-RIP3}$, que se obtuvo para cada simulación.

Parámetro	S1	S2	S3	S4	S5	Unidades
dm	4	4	0.4	0.4	0.2	μm
λ_N	25	25	2500	2500	2500	<i>u.a.</i>
N_{RIP3}	75	75	1	1	1	<i>u.a.</i>
$N_{total-RIP3}$	2095	2972	2383	2567	2524	<i>u.a.</i>
δ_{Ca}	200	20	200	20	200	s^{-1}

Tabla 5.1: Valores de los parámetros en las simulaciones estocásticas de la Sec. A.3.2.

Para estudiar las diferencias en la propagación calculamos la distribución de Ca^{2+} durante la señal aproximadamente como:

$$[\text{Ca}^{2+}] = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{previo}} + \sum_i^{N_c} N_{oi} \cdot \mathcal{A} \exp(-((x - x_i)^2 + (y - y_i)^2)/(2\sigma^2)) \quad (5.2)$$

donde $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{previo}}$ es la concentración de Ca^{2+} inmediatamente antes de que ocurra la señal; el índice, i , identifica al *cluster* i -ésimo cuya posición es (x_i, y_i) ; N_{oi} es el número de canales de dicho *cluster* que participan de la señal y la función que multiplica a N_{oi} aproxima la contribución a $[\text{Ca}^{2+}]$ de una fuente puntual de Ca^{2+} por la que circula una corriente de $0.1pA$. Aproximamos esta contribución como una Gaussiana de amplitud $\mathcal{A} = 9,88\mu M\mu m^3/(D \cdot dr)$, en donde $D = 100\mu m^2/s$ corresponde al coeficiente de difusión del Ca^{2+} , dr determina el “coarse-graining” de la aproximación ($dr = 0,16\mu m$) y $\sigma^2 = 2\mu m^2$ corresponde al ancho de la Gaussiana que aproxima a dicha fuente puntual en esta versión “coarse-grained”.

5.3. Resultados

En este capítulo mostramos resultados preliminares cuyo objetivo es establecer cuáles son los factores determinantes de las características diferentes de las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 s en ovocitos y en huevos. Mostramos entonces algunos experimentos realizados en ambos tipos de células y simulaciones numéricas estocásticas.

5.3.1. Experimentos

Las imágenes que mostramos a continuación son representativas del comportamiento observado para los ovocitos inmaduros y las células maduras. En la Fig. 5.1 se observan frames adquiridos en un ovocito y en la Fig. 5.2 frames adquiridos en un huevo en seis tiempos distintos (se indican debajo de la figura). En ambos casos se enciende la luz UV para la fotólisis del IP_3 enjaulado en $t = 11,2s$ y se apaga en $t = 28s$. El tamaño de la imagen es de $207\mu m \times 207\mu m$ y se indica la escala con una línea blanca. La barra de colores representa el valor de la fluorescencia F en cada píxel de la imagen.

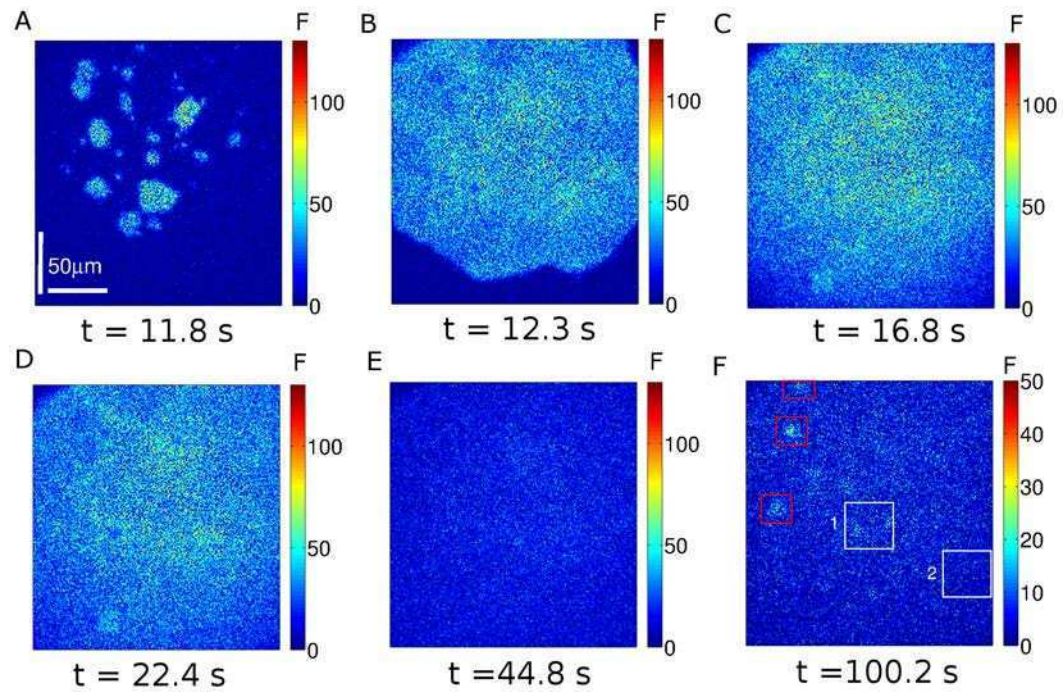


Figura 5.1: Propagación de señales de Ca^{2+} en ovocitos. Frames adquiridos en los tiempos que se indican debajo de cada imagen. En $t = 11,8s$ se encienden varios focos (A), la onda se propaga (B) y alcanza el máximo nivel de fluorescencia en $t = 16,8s$ (C). En (D) se muestra un instante en el que la fluorescencia está decayendo hasta llegar al nivel basal en (E). En (F) se muestra un frame con varios *puffs* dentro de los rectángulos rojos. Se representa el aumento del nivel de la fluorescencia F con el aumento de los colores cálidos.

En el caso de ovocitos observamos que se encienden varios focos simultáneamente en distintas regiones a un tiempo $\sim 0,6s$ posterior al del encendido de la luz UV (Fig. 5.1A). A partir de esos focos se genera una señal que se propaga abarcando toda la región de la imagen (Fig. 5.1B). La fluorescencia continúa elevada en toda la región observada hasta el tiempo, $t = 16,8s$ (Fig. 5.1C). La señal empieza a decaer (Fig. 5.1D) inmediatamente después de apagada la luz UV hasta volver al nivel basal (Fig. 5.1E). A medida que la señal se va recuperando, empiezan a detectarse nuevamente *puffs* que se prenden y se apagan en distintos puntos de la célula. Una captura en $t = 100,2s$ muestra varios *puffs* (rectángulos rojos) en distintos puntos a un menor nivel de fluorescencia (Fig. 5.1F) que en la onda (Fig. 5.1A-D).

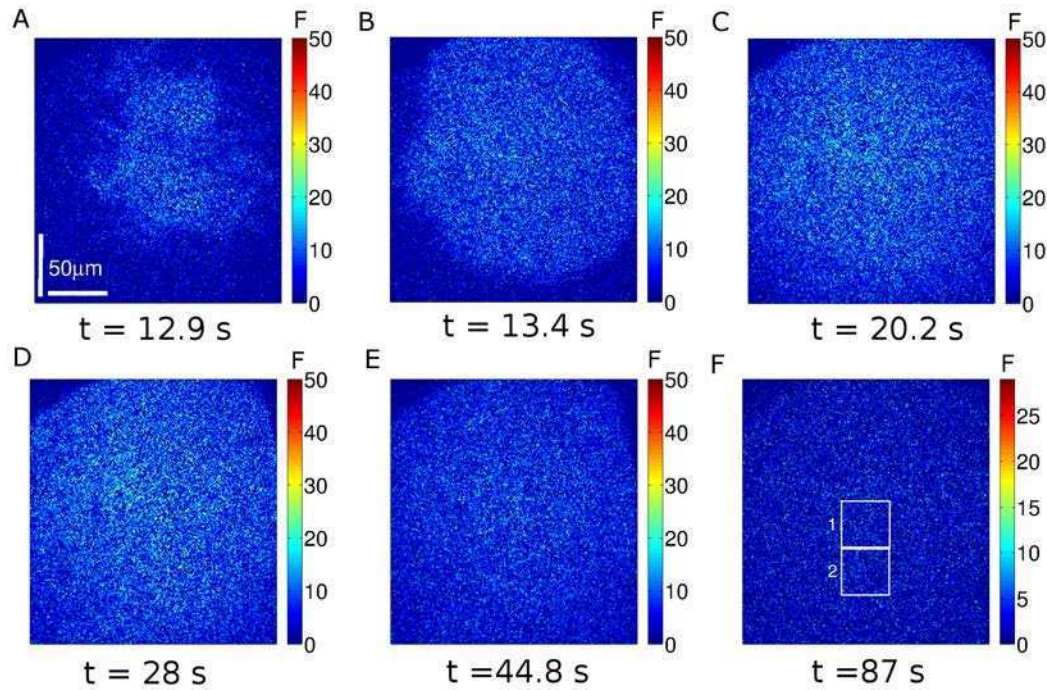


Figura 5.2: Propagación de señales de Ca^{2+} en huevos. Frames adquiridos en los tiempos que se indican debajo de cada imagen. En $t = 12,9s$ comienza la liberación (A), la onda se propaga (B, C) y sigue aumentando la fluorescencia mientras se mantiene prendido el UV (D). En $t = 44,8s$ la fluorescencia no ha alcanzado aún el nivel basal (E). Cuando la señal se recupera tampoco pueden observarse *puffs* (F). Se representa el aumento del nivel de la fluorescencia F con el aumento de los colores cálidos.

En el caso del huevo, la fluorescencia comienza a aumentar en $t = 12,9s$ ($\sim 1,6s$ después del inicio del UV, ver Fig. 5.2A) más uniformemente que el ovocito sobre la región observada. No se identifican en este caso focos de liberación. La señal se propaga (Fig. 5.2B,C) y el nivel de fluorescencia aumenta hasta que se apaga el UV ($t = 28s$). En $t = 44,8s$ el huevo aún no ha alcanzado el nivel basal (Fig. 5.2D). En ningún instante de la propagación pueden observarse señales localizadas tipo *puff* (Fig. 5.2E). Otra diferencia entre las observaciones en ovocitos y huevos es que el nivel de fluorescencia máximo que se alcanza en el primero ($\sim 130u.a.$) es más alto que en el segundo ($\sim 50u.a.$).

Para caracterizar la dinámica de la señal graficamos el valor de la fluorescencia promedio del frame, F_m , en función del tiempo para el ovocito de la Fig. 5.1 (Fig. 5.3A) y para el huevo de la Fig. 5.2 (Fig. 5.3B). Esta Figura permite apreciar la respuesta de las células a dos pulsos de luz UV, uno enviado en $t = 11,2s$ y otro, de igual intensidad y duración, enviado en $t = 173,6s$ en el ovocito y en $t = 112s$ en el huevo como se ilustra con las barras violetas. El comportamiento observado con el segundo pulso es similar. Puede observarse que la dinámica de la señal en el ovocito tiene un comportamiento distinto a la del huevo.

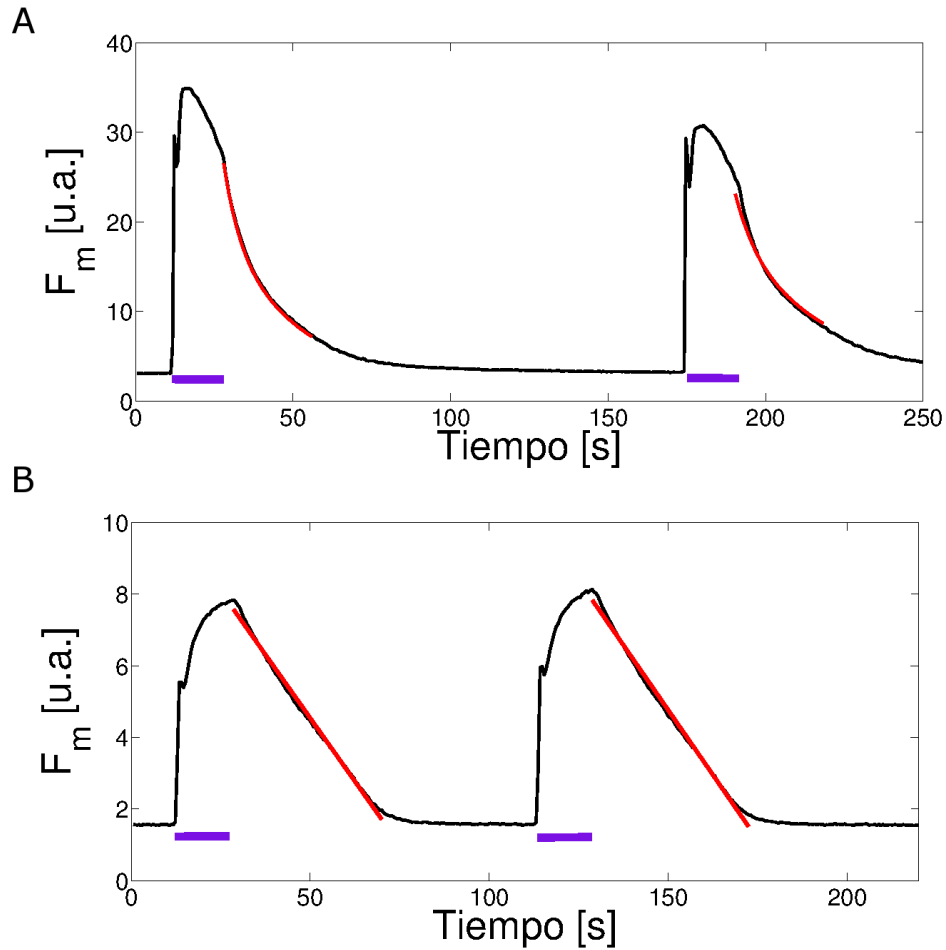


Figura 5.3: Fluorescencia promedio del frame (F_m) en función del tiempo para un ovocito inmaduro (A) y para un huevo (B). Los ajustes del decaimiento de la fluorescencia se muestran en rojo. Con una línea violeta se muestran los pulsos UV.

En los experimentos realizados en ovocitos inmaduros (Fig. 5.3A) con el primer pulso de UV la fluorescencia crece rápidamente hasta un primer pico (en $\sim t = 12,32s$), decae después también rápidamente para volver a crecer y alcanza el máximo en $t = 16,8s$. Luego la señal comienza a decrecer lentamente mientras continúa la iluminación UV. Cuando ésta se apaga (en $t = 28s$) el decaimiento de la fluorescencia se vuelve más rápido y puede ajustarse por una función bi-exponencial de la forma $F = A \cdot e^{-(t-t_0)/t_{decay-r}} + B \cdot e^{-(t-t_0)/t_{decay-l}}$. Se observa un comportamiento similar durante el segundo pulso de luz UV. La dinámica en las células maduras es diferente (Fig. 5.3B). La fluorescencia sube lentamente aproximándose a un valor aparentemente estacionario que no llega a alcanzarse mientras dura la fotólisis. La fluorescencia se hace máxima en el tiempo, $t = 28,6s$, en el que se apaga la luz UV luego de lo cual comienza a decaer. En este caso el decaimiento es casi lineal por lo que lo ajustamos con una función

$F = F_0 \cdot (1 - (t - t_o)/t_{decay})$. En este caso también se observa un comportamiento similar para el segundo pulso del luz UV.

Definimos el tiempo característico de aumento de la fluorescencia como $t_{rise} = \frac{F_M + f_m}{2(F_M - F_m)} \cdot \Delta t$ donde F_M y F_m son el máximo y el mínimo de la fluorescencia y Δt es el tiempo que transcurre desde el inicio de la señal hasta que alcanza el valor máximo. Mostramos los tiempos característicos y amplitudes para el ovocito (Tabla 5.2) y para el huevo (Tabla 5.3). Los valores de los ajustes e intervalos de confianza se muestran en las Tablas D.1 y D.3 del Apéndice D.2 para el ovocito inmaduro y para el huevo, respectivamente.

Parámetro	Pulso 1	Pulso 2
t_{rise} [s]	3,1	3,8
$t_{decay-r}$ [s]	5,5	7,2
A [u.a.]	11,1	6,5
$t_{decay-l}$ [s]	32,3	44,4
B [u.a.]	17,0	15,8

Tabla 5.2: Tiempos característicos y amplitudes en el ovocito. Se muestran el tiempo de subida, t_{rise} y los tiempos de decaimiento rápido, $t_{decay-r}$ de amplitud A y lento, $t_{decay-l}$ de amplitud B de la señal de la Fig. 5.3A cuando se envían dos pulsos de luz UV.

Parámetro	Pulso 1	Pulso 2
t_{rise} [s]	12,4	11,8
t_{decay} [s]	53,3	53,2
F_0 [u.a.]	10,4	7,9

Tabla 5.3: Tiempos característicos y amplitud en el huevo. Se muestran el tiempo de subida, t_{rise} , el de decaimiento, t_{decay} y la amplitud F_0 de la señal de la Fig. 5.3B cuando se envían dos pulsos UV.

Los tiempos característicos de aumento de la señal en el ovocito que se obtienen para el primero y segundo pulso son $t_{rise} = 3,1s$ y $t_{rise} = 3,8s$, respectivamente. Para los huevos estos tiempos dan un orden de magnitud mayor ($t_{rise} = 12,4s$ y $t_{rise} = 11,8s$) (ver Tablas 5.2 y 5.3). Se tienen dos tiempos característicos de decaimiento de la señal en el caso de los ovocitos, uno rápido ($t_{decay-r}$) y otro lento ($t_{decay-l}$). Para el primer pulso estos tiempos de decaimiento son $t_{decay-r} = 5,5s$ y $t_{decay-l} = 32,3s$, mientras que para el segundo pulso los tiempos característicos son levemente más grandes ($t_{decay-r} = 7,2s$ y $t_{decay-l} = 44,4s$, Tabla 5.2). En ambos casos, el tiempo de decaimiento rápido tiene

menor peso. Cuando se envía el segundo pulso tanto $t_{decay-r}$ como $t_{decay-l}$ presentan variaciones (son levemente más grandes) y la diferencia relativa entre los pesos es mayor. Para los huevos la amplitud de la señal cuando se envía el segundo pulso es más baja. El tiempo característico de decaimiento de la señal es similar en ambos pulsos ($t_{decay} = 53,3s$ y $t_{decay} = 53,2s$ para el primero y segundo, respectivamente, ver Tabla 5.3). Estos tiempos son levemente más grandes que los obtenidos para un ovocito.

Para estudiar si existen inhomogeneidades espaciales dentro de la región observada analizamos cómo varía F_m en dos subregiones distintas del ovocito y del huevo (Fig. 5.4).

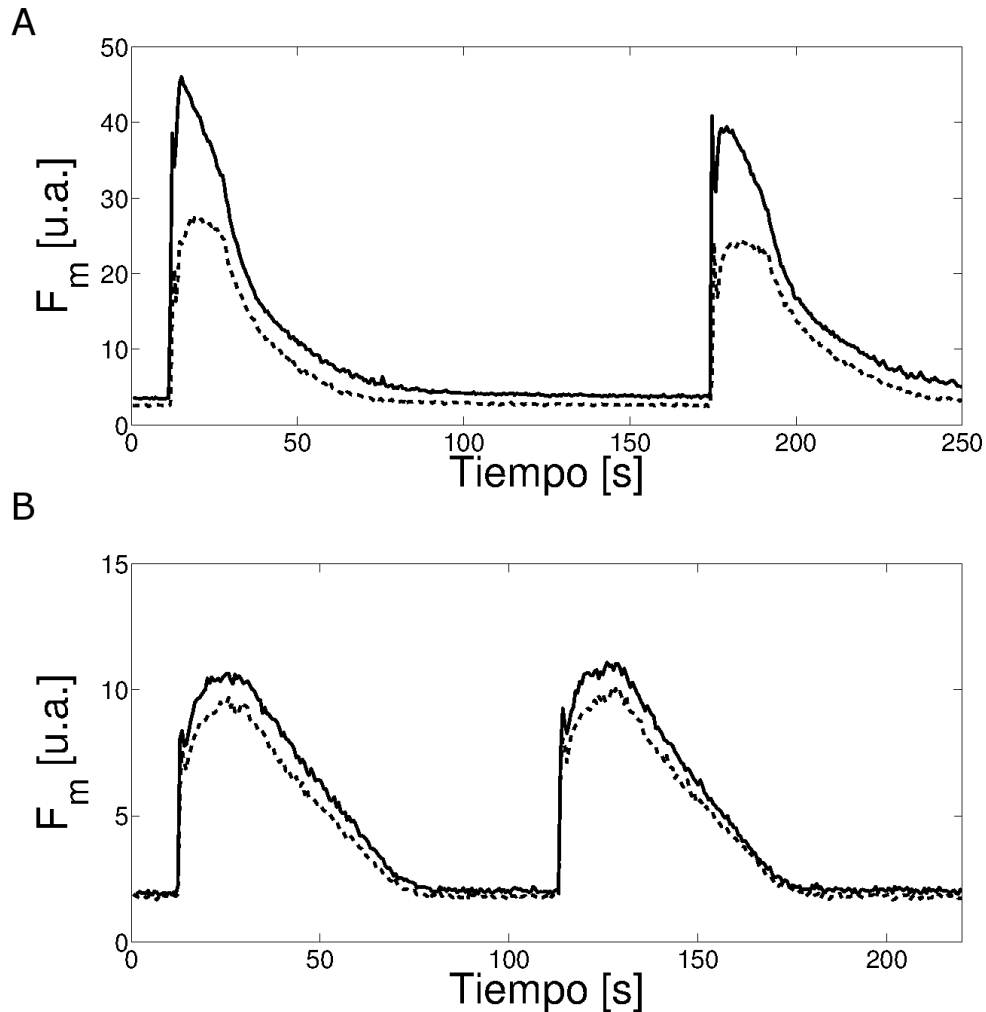


Figura 5.4: Fluorescencia promedio (F_m) en función del tiempo para dos regiones de un ovocito inmaduro (A) y de un huevo (B). En ambos casos, la línea sólida y la línea rayada corresponden a las regiones 1 y 2 de las Figs. 5.1F y 5.2F, respectivamente.

Calculamos los tiempos característicos en ambas regiones de modo análogo que para la fluorescencia promediada sobre todo el frame. Los resultados se muestran en la Tabla 5.4 para el ovocito y en la Tabla 5.5 para el huevo.

Parámetro	Pulso 1	Pulso 2
t_{rise} [s]	1,9	3,6
$t_{decay-r}$ [s]	5,4	7,4
A [u.a.]	11,6	14,7
$t_{decay-l}$ [s]	36,9	64,1
B [u.a.]	19,5	15,4
t_{rise} [s]	5,9	6,4
$t_{decay-r}$ [s]	4,3	–
A [u.a.]	6,0	0
$t_{decay-l}$ [s]	24,9	22,7
B [u.a.]	18,6	19,3

Tabla 5.4: Tiempos característicos y amplitudes en distintas regiones de un ovocito. Se muestran el tiempo de subida, t_{rise} y los tiempos de decaimiento rápido, $t_{decay-r}$ de amplitud A y lento, $t_{decay-l}$ de amplitud B de la fluorescencia en la región 1 (panel superior) y en la región 2 (panel inferior) de la Fig. 5.4A cuando se envían dos pulsos UV.

Parámetro	Pulso 1	Pulso 2
t_{rise} [s]	11,9	10,7
t_{decay} [s]	55,0	52,7
F_0 [u.a.]	10,7	10,8
t_{rise} [s]	11,5	13,2
t_{decay} [s]	53,9	53,5
F_0 [u.a.]	9,3	9,6

Tabla 5.5: Tiempos característicos y amplitudes en distintas regiones de un huevo. t_{rise} , t_{decay} y F_0 en la región 1 (panel superior) y en la región 2 (panel inferior) de la Fig. 5.4B cuando se envían dos pulsos UV.

En el ovocito (Fig. 5.4A) la línea negra sólida que corresponde a la señal en la región 1 de la Fig. 5.1F alcanza un valor máximo ($\sim 45u.a.$) mayor que la línea negra rayada que corresponde a la región 2 ($\sim 27u.a.$) con un tiempo característico t_{rise} menor (ver Tabla 5.4). Además, en la región 2 hay menos variabilidad en la respuesta a los dos pulsos en la región 1, donde parece que luego de haber liberado un valor grande de Ca^{2+} , no puede reproducir la señal en ese tiempo de recuperación. También se observan diferencias en los tiempos de decaimiento entre las regiones. Mientras que en la región 1 el decaimiento de la señal tiene contribución de los dos tiempos ($t_{decay-r}$ y $t_{decay-l}$) para los dos pulsos, no se obtiene un tiempo de decaimiento rápido en respuesta al segundo pulso

en la región 2 (la amplitud $A = 0$). Por el contrario, en el huevo no pueden observarse diferencias significativas en las amplitudes y en los tiempos característicos t_{rise} y t_{decay} entre los dos pulsos (Tabla 5.5). Tampoco se encuentran diferencias significativas entre las dos regiones analizadas.

5.3.2. Simulaciones

El objetivo de esta Sección es determinar hasta qué punto la distribución espacial de los RIP₃s incide sobre el tipo de señales de Ca²⁺ que pueden observarse y si el paso de una distribución en *clusters* a una más uniforme espacialmente puede explicar las diferencias en los comportamientos observados en ovocitos y huevos. Para este fin realizamos simulaciones numéricas estocásticas de la dinámica del CICR entre *clusters* como se describe en la Sec. A.3 variando algunos parámetros relevantes que se muestran en la Tabla 5.1. Más específicamente, estudiamos cómo cambia el número de RIP₃s que participan de un evento, N_o , como función de la distancia media entre *clusters*, dm , y de la tasa de remoción del Ca²⁺ citosólico, δ_{Ca} . Acá entendemos como “evento” una señal que comienza con la apertura de un RIP₃ y que se propaga por CICR induciendo la apertura de otros RIP₃s. Como se explicó en la Sec. A.3, el código supone que el evento ocurre instantáneamente. Por lo tanto, la simulación sólo sirve para determinar cuántos RIP₃s y cuántos *clusters* pueden estar acoplados entre sí debido al CICR en un dado instante. La simulación monitorea la concentración de Ca²⁺ citosólico y el estado de los distintos RIP₃s entre eventos consecutivos. Al finalizar se cuenta con información sobre las secuencias de eventos que pueden ocurrir para las condiciones exploradas. Para estudiar la influencia de la distribución de RIP₃s sobre este acoplamiento simulamos diversas situaciones con el mismo número medio de RIP₃s (que está dado por $\lambda_N \times N_{RIP3}$, ver Sec. 5.2.3), pero distribuidos en *clusters* o más uniformemente. Este caso equivale a tener un número grande de *clusters* con pocos canales separados por una distancia pequeña. Analizamos también las diferencias que se producen, en ambos casos, al variar la tasa de remoción de Ca²⁺ del medio citosólico ($\propto \delta_{Ca}$). Como se muestra en la Tabla 5.1, consideramos tres situaciones, una con una distribución de RIP₃s agrupados en *clusters* separados por una distancia media, $dm = 4\mu m$ entre sí, otra con los RIP₃s distribuidos homogéneamente con una distancia media $dm = 0,4\mu m$, repitiendo las simulaciones para $\delta_{Ca} = 200s^{-1}$ y $\delta_{Ca} = 20s^{-1}$ en ambos casos y otra con los RIP₃s distribuidos homogéneamente con una distancia media $dm = 0,2\mu m$ para $\delta_{Ca} = 200s^{-1}$. Como se desprende de la Tabla el número total de RIP₃s con IP₃ pegado, $N_{total-RIP3}$, es comparable en todos los casos.

En la Fig. 5.5A mostramos la distribución del número de RIP₃s que participan de cada evento, N_o , para el caso **S1** de la Tabla 5.1, es decir, para el caso en que se tienen

2095 RIP₃s en total distribuidos en 27 *clusters* con una tasa de remoción $\delta_{Ca} = 200s^{-1}$. La densidad de probabilidad de N_o parece la superposición de una distribución exponencial y de una Gaussiana centrada en $N_o \sim 150$. El primer bin, $N_o = 0$, corresponde a los pasos temporales en los que no hay eventos (recordemos que los pasos son de tamaño $dt = 0,05s$). En este caso la fracción del tiempo en que no hay eventos es 0.67. La figura no se muestra en escala para poder observar con más detalle la forma de la distribución de eventos con $N_o \neq 0$.

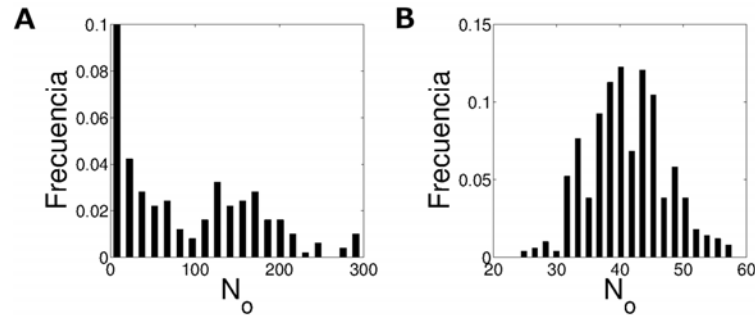


Figura 5.5: Distribución de N_o en simulaciones estocásticas de la dinámica entre *clusters* con acumulación de Ca^{2+} para las condición **S1** (A) y **S2** (B) de la Tabla 5.1.

Cuando se tiene un número total de RIP₃s, $N_{total-RIP3}$, similar pero distribuidos homogéneamente como en el caso **S3**, la distribución de los valores N_o tiene una forma aproximadamente exponencial (Fig. 5.6A) que llega a valores más grandes de N_o que en la Fig. 5.5A (tal vez por la diferencia de $N_{total-RIP3}$ entre ambas simulaciones) pero que no muestra el máximo local que se observa en el caso **S1**. La fracción de tiempo en la que no hay eventos es 0,66.

Si ahora repetimos las simulaciones achicando la tasa de remoción del Ca^{2+} , la distribución de N_o tiene una forma casi Gaussiana tanto para el caso de los RIP₃s organizados en *clusters* como para el de la distribución homogénea como se puede ver en las Figs. 5.5B y 5.6B. El máximo de la distribución está aproximadamente centrado en $N_o \sim 50$ en ambos casos. El cociente entre los valores medios ($\langle N_o \rangle = 45,2$ y $\langle N_o \rangle = 55,5$, respectivamente) es del mismo orden que el de los valores, $N_{total-RIP3}$, para ambos ejemplos ($N_{total-RIP3} = 2099$ para el caso **S2** y $N_{total-RIP3} = 2567$ para el **S4**). Los valores típicos de N_o son menores al valor donde la distribución de la Fig. 5.5A tenía un máximo local (~ 150). En este caso hay eventos en todos los pasos temporales.

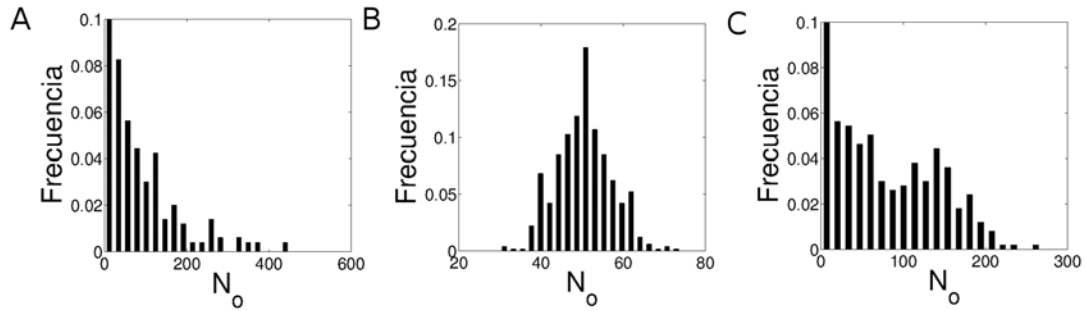


Figura 5.6: Distribución de N_o en simulaciones estocásticas de la dinámica entre *clusters* con acumulación de Ca^{2+} para las condición **S3** (A), **S4** (B) y **S5** (C) de la Tabla 5.1.

Si se reduce aún más la distancia entre *clusters* de modo de aumentar la probabilidad de que la apertura de un RIP_3 en uno de ellos induzca la apertura en *clusters* vecinos (condición **S5** de la Tabla 5.1) la distribución de N_o se parece a la obtenida en el caso **S1**, es decir, se ve como la superposición de una distribución exponencial y de una Gaussiana centrada en $N_o \sim 150$. En este caso la fracción del tiempo durante la cual no hay eventos es 0,49.

Para analizar la distribución espacial de las señales calculamos la distribución de $[\text{Ca}^{2+}]$ en la región simulada usando la Ec. 5.2 y analizamos cómo es el acoplamiento entre los distintos *clusters* que participan de la señal.

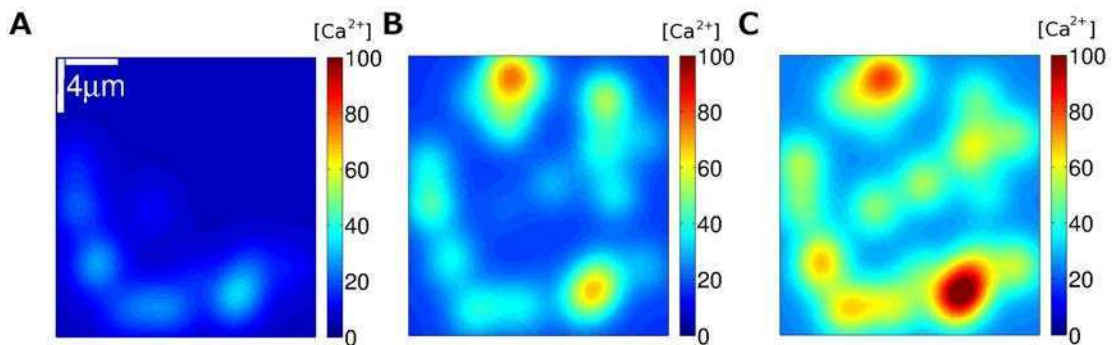


Figura 5.7: Distribución de $[\text{Ca}^{2+}]$ de los eventos en tres instantes de las simulaciones estocásticas con la condición **S1**.

Cuando los RIP_3 s están organizados en *clusters* y el Ca^{2+} es removido rápidamente como en el caso **S1**, la distribución de Ca^{2+} que se observa muestra que cerca de los *clusters* la $[\text{Ca}^{2+}]$ se eleva a niveles muy altos (del orden de $100\mu\text{M}$ para la resolución de la figura de $0,16\mu\text{m}$ y que pueden acoplar *clusters* vecinos sobre un radio $\sim 3,5\mu\text{m}$ (Fig. 5.7B,C). Además de los eventos que involucran canales pertenecientes a numerosos *clusters* distintos, hay otros donde el número de *clusters* es mucho menor (Fig. 5.7A).

Por otro lado, durante una fracción de tiempo del orden de 0,67 no hay eventos. Como discutimos más adelante, esto puede explicarse en términos de la inhibición de los RIP_3s que sucede a un evento que involucra la apertura de numerosos RIP_3s . El número de *clusters* que participan de la señal en la Fig. 5.7A es 15 y en la Fig. 5.7B y C, 27. El número de canales N_o es 68, 203 y 255 en las Figs. 5.7A, B y C, respectivamente. El $[Ca^{2+}]_{previo}$ es $5,7\mu M$ en (A), $16,9\mu M$ en (B) y $24,5\mu M$ en (C). Se puede observar que el número de canales que participan en cada instante aumenta a medida que aumenta el $[Ca^{2+}]_{previo}$.

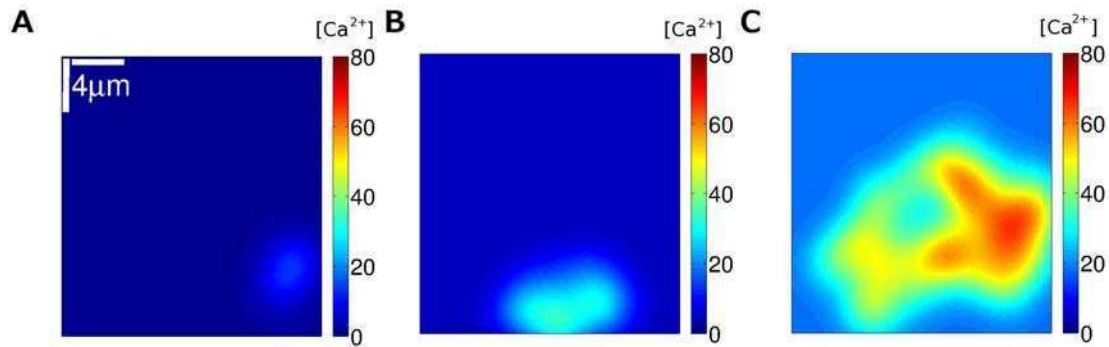


Figura 5.8: Distribución de $[Ca^{2+}]$ de los eventos en tres instantes de las simulaciones estocásticas con la condición **S3**.

En la Fig. 5.8 puede observarse la distribución de Ca^{2+} que se obtiene cuando los RIP_3s están uniformemente distribuidos y la remoción del Ca^{2+} es alta. En este caso hay eventos en los que la $[Ca^{2+}]$ también alcanza valores altos, aunque no tanto como en el caso de la Fig. 5.7. Estas altas elevaciones corresponden a la apertura durante una misma señal de RIP_3s ubicados en sitios cercanos pero pertenecientes a *clusters* distintos (el máximo número de RIP_3s en un cluster en este caso es 4). El número de *clusters* que participan de la señal en la Fig. 5.8A es 9, en la Fig. 5.8B, 43 y en la Fig. 5.8C, 193. El número de canales N_o es 9, 49 y 215 en las Figs. 5.8A, B y C, respectivamente. En este caso la fracción del tiempo sin eventos es levemente más pequeña (0,65) que en el caso **S1**. El $[Ca^{2+}]_{previo}$ es $0,9\mu M$ en (A), $4,3\mu M$ en (B) y $17,9\mu M$ en (C).

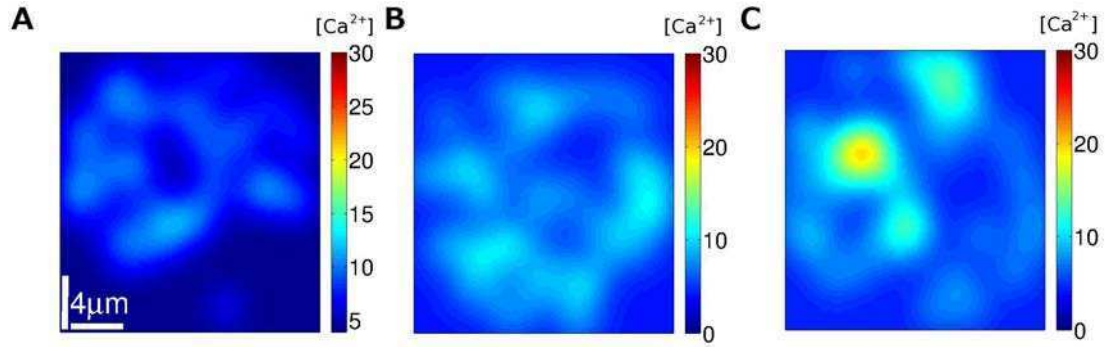


Figura 5.9: Distribución de $[Ca^{2+}]$ de los eventos en tres instantes de las simulaciones estocásticas con la condición **S4**.

En la Fig. 5.9 puede observarse cómo varía la distribución de Ca^{2+} al disminuir su tasa de remoción (condición **S4**) en relación a lo que sucede en el caso **S3**. En la mayoría de los eventos se observa una liberación pequeña de los *clusters* que están homogéneamente distribuidos (A, B y C). El número de *clusters* que participan de la señal en la Fig. 5.8A es 38, en la Fig. 5.8B 43 y en la Fig. 5.8C, 47. El número de canales N_o es 38, 44 y 48 en las Figs. 5.8A, B y C, respectivamente. El $[Ca^{2+}]_{previo}$ es $3,2\mu M$ en (A), $3,7\mu M$ en (B) y $4,1\mu M$ en (C). En los tres casos se ve que el número de canales que participa en la señal aumenta con el $[Ca^{2+}]_{previo}$.

5.4. Discusión

Para estudiar la dependencia de las señales de Ca^{2+} con la distribución de los RIP_3s en este Capítulo estudiamos las diferencias que podían observarse en las señales de $[Ca^{2+}]$ en ovocitos de *Xenopus laevis* en distintos estadios de maduración. A medida que el ovocito madura y se transforma en huevo hay una reconfiguración del RE que debería redistribuir espacialmente a los RIP_3s [Terasaki et al. (2001)]. En particular, las señales en ovocitos y en huevos difieren en algunos rasgos [El-Jouni et al. (2005); Machaca (2004)]. Para estudiar las diferencias observadas y determinar hasta qué punto podían atribuirse a cambios en la distribución espacial de los RIP_3s realizamos experimentos en ovocitos y huevos. Para contar con estos últimos maduramos a los ovocitos con progesterona. Para comparar las señales obtenidas en uno y otro caso microinyectamos ambos tipos celulares con igual concentración de Fluo-4 e IP_3 y los sometimos a dos pulsos de fotólisis de igual intensidad y duración. Observamos que en el caso de los ovocitos podían detectarse focos de liberación que se prendían antes de que se propagara la señal (Fig. 5.1A-C) y que se manifestaban como un pico en el perfil temporal de la fluorescencia promedio, F_m . La liberación en el caso del huevo parecía más continua, lo

que se manifestó en un aumento más gradual de la fluorescencia promediada (Fig. 5.2A-C) que alcanzaba valores máximos menores que en el caso del ovocito.

Caracterizamos los tiempos característicos de la señal y obtuvimos que en el ovocito el tiempo de subida, t_{rise} , es más corto que en el huevo, lo que implica que la variación del Ca^{2+} es más lenta en el huevo. Esto está acompañado por una elevación mucho menor de la fluorescencia en el caso del huevo en comparación con el ovocito. Ambos comportamientos son compatibles con el resultado presentado en [Fontanilla, Nuccitelli (1998)] donde obtienen que la velocidad de propagación de las ondas de Ca^{2+} es mucho más chica en los huevos que en los ovocitos (aproximadamente 9 vs $\sim 20\mu m/s$, respectivamente). La menor amplitud de Ca^{2+} implica un menor acoplamiento entre RIP_3s debido al CICR lo que se traduce en una velocidad de propagación más lenta. El tiempo de recuperación de la fluorescencia también presenta diferencias entre el huevo y el ovocito. El decaimiento de la fluorescencia en el ovocito se ajusta bien por una bi-exponencial, con una componente rápida ($t_{decay-r} \sim (5,5 - 7,2)s$) y un decaimiento lento ($t_{decay-l} \sim (32,3 - 44,4)s$) de amplitudes similares entre sí en el caso del primer pulso y de amplitud $\sim 2 - 3$ veces más grande para la componente lenta que para la rápida en el caso del segundo. Se observa también que los tiempos aumentan en el segundo pulso en comparación con los del primero mientras que el máximo que se alcanza es menor. Esto último sucede a pesar de que la fluorescencia en el segundo pulso parte de un valor promedio mayor que en el primero (3,1u.a. a 3,3u.a.). Esta menor elevación puede deberse a que hay un subconjunto de RIP_3s que han quedado inactivos luego de la señal evocada por el primer pulso lo que se traduce en una menor elevación total de la fluorescencia. Los procesos de remoción del Ca^{2+} de la región observada incluyen la acción de bombas que sacan el Ca^{2+} del citosol y la difusión hacia otras regiones. La velocidad del primero depende de $[Ca^{2+}]$ sólo para concentraciones bajas. Teniendo en cuenta la elevación de la fluorescencia en las señales evocadas por ambos pulsos es de esperar que, apenas se apaga cada pulso de UV, las bombas estén saturadas, extrayendo Ca^{2+} a una tasa constante dada por su velocidad máxima ($\frac{d[Ca^{2+}]}{dt} \sim 0,9\mu M s^{-1}$ de acuerdo al modelo de [Youngt, Keizer (1992)]). Es de esperar entonces que en los primeros instantes luego de que se apaga la luz UV la remoción de Ca^{2+} esté dominada por la difusión. La remoción por difusión depende del gradiente de Ca^{2+} en los bordes de la región observada. El hecho de que la remoción ocurra a una tasa menor en el segundo pulso en comparación con el primero puede deberse a que el gradiente de $[Ca^{2+}]$ sea también menor lo que significaría una distribución espacial de $[Ca^{2+}]$ más uniforme en este segundo caso. Como discutimos en relación a las simulaciones numéricas, es de esperar una distribución más uniforme cuando hay un número relativamente alto de RIP_3s inhibidos pero suficiente Ca^{2+} en el medio como para inducir fácilmente la apertura de los RIP_3s que no están inhibidos. A medida que se disipa el gradiente de Ca^{2+} , el

rol de las bombas es relativamente más importante. Es por lo tanto de esperar que la componente lenta del decaimiento esté dominada por este proceso el que, dada la menor $[Ca^{2+}]$, es razonable que dependa de $[Ca^{2+}]$. Cuando analizamos el decaimiento de la fluorescencia en el caso del huevo vemos que puede ser ajustado por una función lineal con un tiempo característico algo mayor, aunque del mismo orden que el tiempo más lento obtenido para el ovocito, $t_{decay} \sim (53,3 - 53,2)s$. La mayor uniformidad observada en las señales en el caso del huevo que discutimos más adelante pueden explicar que la remoción por difusión sea mucho más lenta en este caso que en el de los ovocitos. Ahora bien, por esta razón las bombas deberían pasar a ser más relevantes. Teniendo en cuenta la baja elevación de la fluorescencia en el caso del huevo en comparación con el del ovocito sería de esperar que las bombas extrajeran el Ca^{2+} a una tasa dependiente de $[Ca^{2+}]$ a menos que hubiera un número suficientemente pequeño de ellas como para que estuvieran saturadas. En tal caso la velocidad de remoción sería constante. El decaimiento cuasi-lineal con el tiempo parecería indicar que es ésta la situación. El que las bombas estén saturadas es compatible con los resultados presentados en [El-Jouni et al. (2005)], donde muestran que en los huevos la PMCA (la bomba de Ca^{2+} presente en la membrana plasmática) está completamente internalizada y por ende no se puede remover el Ca^{2+} hacia el medio extracelular. Esta limitación para remover el Ca^{2+} citosólico junto con una pérdida permanente de Ca^{2+} desde el RE a través de RIP_3s es la razón por la cual pueden mantenerse concentraciones citosólicas de Ca^{2+} elevadas por más tiempo en los huevos [El-Jouni et al. (2005)]. Las diferentes propiedades de las señales en relación a su distribución espacial pueden observarse en la Fig. 5.4 y en las Tablas 5.4 y 5.5. Allí vemos que la amplitud de la elevación de la fluorescencia difiere en 40% entre dos regiones de la imagen en el caso del ovocito mientras que esta diferencia es de 9% en el caso del huevo. En el caso del ovocito se ven además elevaciones locales que podemos asociar a *puffs* que no están presentes en el caso del huevo (Fig. 5.1F). En los ovocitos, por otro lado, se ve que la fluorescencia comienza a decrecer inmediatamente después de alcanzado el pico en la región donde más crece y que esto sucede antes de que se apague la luz UV. En la región del ovocito donde se alcanza un valor menor de fluorescencia máxima este valor permanece relativamente uniforme durante casi todo el tiempo de la iluminación UV. La región con el pico mayor es compatible con la existencia allí de un número mayor de RIP_3s , una fracción significativa de los cuales pasa a estar inactivo luego de la señal debido a la muy alta $[Ca^{2+}]$ alcanzada. Es probable que esta región con mayor densidad de RIP_3s esté involucrada con el inicio de la señal en sí. La región donde la elevación es menor tarda más en alcanzar su máximo (comparar los valores de t_{rise} en la Tabla 5.4). Estas propiedades parecen indicar que allí hay un número menor de RIP_3s que se abren como respuesta a que llega Ca^{2+} desde otras regiones. Al haber una elevación menor de $[Ca^{2+}]$ en esta región, la fracción de RIP_3s que se inhiben es menor

que en la región con un máximo de fluorescencia mayor lo que podría explicar la permanencia más prolongada de la elevación alcanzada mientras dura la iluminación UV. En este sentido su comportamiento es más parecido al del huevo. En el caso del huevo vemos una gran uniformidad tanto en las amplitudes como en los tiempos característicos (ver Tabla 5.5).

Las simulaciones numéricas permiten entender el rol de algunos de los procesos que compiten entre sí para determinar cuántos RIP₃s pueden participar de una misma señal debido al CICR entre *clusters*. En tal sentido vemos que la distribución del tamaño de estas cascadas en términos del número de RIP₃s que participan de las mismas, N_o , muestra tres comportamientos posibles. Por un lado, vemos que, en el caso en que el Ca^{2+} se remueve con una tasa alta, la distribución es aproximadamente exponencial para todos los valores de N_o (caso **S3**) como se ve en la Fig. 5.6A o en la región de valores de N_o bajos (casos **S1** y **S5**) como se ve en las Figs. 5.5A o 5.6C. Los casos **S1** y **S3** difieren en la distribución espacial de los RIP₃s, la que es más uniforme en el caso **S3**. La diferencia entre los casos **S3** y **S5** radica en la distancia media entre *clusters* que es más pequeña en el caso **S5**. En todos estos casos la fracción del tiempo en que no hay eventos es similar ($\sim 0,49 - 0,65$). Para el caso en que la remoción de Ca^{2+} es baja la distribución es aproximadamente simétrica alrededor de un valor medio, $\langle N_o \rangle \sim 0,02N_{total-RIP3}$ donde $N_{total-RIP3}$ es el número total de RIP₃s con IP₃ pegado de la simulación. Esto sucede tanto para el caso con distribución uniforme de RIP₃s (caso **S4**, Fig. 5.6B) como para el caso de la distribución en *clusters* (caso **S2**, Fig. 5.5B). El tercer comportamiento se da para los casos con remoción de Ca^{2+} alta **S1** y **S5** (Figs. 5.5A y 5.6C, respectivamente) y se manifiesta en la aparición de un máximo local en la distribución de N_o alrededor de un valor, $N_o \sim 150$. El análisis de la distribución espacial del Ca^{2+} durante las cascadas permite interpretar los cambios de las distribuciones y brinda, a su vez, información adicional. Como se ve en las Figs. 5.7–5.9 la distribución es bastante inhomogénea en el caso de remoción alta de Ca^{2+} (Figs. 5.7 y 5.8) y es mucho más uniforme en el de remoción baja (Fig. 5.9). El máximo alcanzado es mayor en los primeros dos casos en comparación con el tercero. Los valores que toma la concentración de Ca^{2+} previa al inicio de la cascada son bastante similares entre sí en los tres ejemplos de la Fig. 5.9 mientras que varían entre $\sim 6\mu M$ y $25\mu M$ en la Fig. 5.7 y entre $0,9\mu M$ y $18\mu M$ en la Fig. 5.8. Los ejemplos son representativos de las señales encontradas en los distintos casos. En particular, las señales con mayor $[\text{Ca}^{2+}]$ son las que presentan el mayor número de RIP₃s involucrados y el mayor valor de la $[\text{Ca}^{2+}]$ previa a la señal. Estas señales pueden asociarse a la parte de la distribución de N_o correspondiente que aparece alrededor de $N_o \sim 150$ en las Figs. 5.5A y 5.6C. Estas señales propagan por CICR. El CICR es más o menos efectivo dependiendo de la $[\text{Ca}^{2+}]$ previa a que se abra el primer canal, del número de RIP₃s activos en cada *cluster* y de la distancia que separa

a los *clusters* con canales activos entre sí. Por otro lado la probabilidad de que se abra un primer canal a un tiempo, t , depende de la $[Ca^{2+}]$ y del número de RIP_3 s (con IP_3 pegado) activos en ese instante. Ahora bien, tanto el valor de $[Ca^{2+}]$ como el número de RIP_3 s activos va variando en el tiempo. Si el valor de $[Ca^{2+}]$ es suficientemente bajo la posibilidad de acoplar distintos *clusters* vía CICR está principalmente limitada por la distancia entre *clusters* y la cantidad de Ca^{2+} que puede liberarse en cada uno de ellos en cada instante. Supongamos que una dada realización tiene un cierto “camino” dado por un conjunto de *clusters* en donde, si el número de RIP_3 s activos supera cierto umbral, la apertura de uno de ellos en un *cluster* induce la apertura de los otros. El tamaño del evento resultante estará dado por el número de RIP_3 s activos del camino en el instante de la cascada. Si esto se repite para bajas concentraciones de Ca^{2+} (como puede suceder en el caso en que la remoción es alta y los eventos son típicamente pequeños) es posible esperar una distribución exponencial en el número de RIP_3 s involucrados en las señales. Esto podría explicar la distribución en el caso **S3** en el que la distancia media entre *clusters* es relativamente grande y el número de RIP_3 s por *cluster* es muy bajo, lo que hace que su varianza sea baja también. Es decir, en el caso **S3** todos los *clusters* son muy parecidos entre sí y la distancia relativamente chica entre ellos hace que, en condiciones basales, los “caminos” sean “cortos”. Esto se modifica a medida que se acumula Ca^{2+} , lo que, en el caso de alta tasa de remoción no ocurre muy fácilmente. Hay entonces una distribución de valores de N_o decreciente. Cuando se disminuye la distancia media entre *clusters* es posible que para valores de $[Ca^{2+}]$ algo por encima de las condiciones basales haya caminos más largos, lo que permitiría explicar la aparición del máximo local en la distribución de N_o para el caso **S5**. Esto también sucede en el caso **S1** aunque acá, además, se suma la variabilidad entre *clusters* debida a que los RIP_3 s están distribuidos menos uniformemente que en los casos **S3** o **S5**. De este modo, es más fácil en este caso que coexistan caminos de tamaños muy diversos lo que ayuda a explicar una distribución bimodal. Por otro lado, si en este caso, en un dado instante se abren muchos RIP_3 s esos RIP_3 s pasarán a estar inactivos inmediatamente después. Cuantos más sean los inactivos más probable es que haya alguno que tenga un tiempo de inhibición sensiblemente menor al tiempo de inhibición medio. Por otro lado, si el canal se desinhibe poco después de que suceda la cascada es probable que la $[Ca^{2+}]$ sea relativamente alta y que lleve a este RIP_3 a abrirse inmediatamente después de salir de la inhibición. Ahora bien, es muy probable que la mayoría de los vecinos de ese primer canal abierto estén inhibidos y que la señal permanezca limitada espacialmente e involucre pocos canales. Este comportamiento también contribuiría a la parte exponencial de la distribución de N_o . Al ir repitiéndose estos eventos que involucran algunos canales en distintos lugares el Ca^{2+} se irá acumulando. Esta acumulación permite acoplar via CICR a *clusters* que, sin la presencia de ese Ca^{2+} adicional, no se afectarían mutuamente. Por lo tanto, con ese Ca^{2+} acumulado la apertura de un RIP_3 en un *cluster* podría dar

lugar a un evento “percolante” con muchos RIP_3s de *clusters* diversos involucrados (el Ca^{2+} acumulado modifica el universo de caminos). Estos eventos contribuirían al máximo local en la distribución de N_o . ¿Qué pasa cuando la remoción de Ca^{2+} se hace menor? A medida que se va acumulando el Ca^{2+} puede hacer un camino que una a todos los *clusters*. La dinámica de las señales estará determinada entonces por la salida de la desinhibición de los canales y el subsiguiente pegado de Ca^{2+} . Ahora bien, si la $[\text{Ca}^{2+}]$ se mantiene suficientemente alta lo más probable es que suceda algo que ya describimos: apenas un RIP_3 se desinhibe pasa a pegar Ca^{2+} y a disparar una señal. Lo más probable es que haya sólo una fracción pequeña de RIP_3s desinhibidos, pero es también probable que estén uniformemente distribuidos en el espacio. La señal será entonces de baja intensidad pero espacialmente extendida como se observa en la Fig. 5.9. Esto sucederá independientemente de la cantidad de RIP_3s en los *clusters* ya que la inhibición disminuye el número medio de los que están activos en cada instante en cada uno de ellos. Estas simulaciones nos llevan a la conclusión de que la dinámica de los componentes que subyacen a las señales actúan como “modificadores efectivos” de la distribución espacial de RIP_3s (activos) modificando tanto la distancia media entre *clusters* con RIP_3s activos como el número medio de canales activos en cada uno de ellos en el momento en que se inicia una señal. Por otro lado, la modificación de la distancia sobre la que puede actuar el CICR también morigera el efecto que la distancia entre *clusters* puede tener sobre las propiedades de propagación de las señales. En particular, la $[\text{Ca}^{2+}]$ promedio en el citosol juega un rol fundamental en este aspecto ya que su aumento incrementa la distancia media sobre la que actúa el CICR y ayuda a la apertura temprana de los RIP_3s , cuando aún hay varios inhibidos, lo que contribuye a que la elevación final de Ca^{2+} no sea muy elevada.

Si bien las simulaciones numéricas son muy sencillas, podemos combinar algunas de las conclusiones que obtuvimos de su análisis junto con conclusiones a las que llegamos en Capítulos anteriores para interpretar las observaciones experimentales del presente Capítulo. La diferencia en el aumento inicial de la fluorescencia en ovocitos y huevos puede asociarse a las distintas distribuciones espaciales de los RIP_3s como discutimos en el Capítulo 3. Distribuciones *intra-cluster* con RIP_3s más empaquetados dan lugar a un CICR (*intra-cluster*) más eficiente y a elevaciones más rápidas del Ca^{2+} lo que, a su vez, ayuda a una propagación más rápida de la señal entre *clusters* (ver también Capítulo 4). El hecho de que los ovocitos muestren un primer pico corto y luego uno más extendido nos lleva a suponer que hay una elevación localizada que decae y que después propaga hacia otras zonas induciendo la apertura de nuevos RIP_3s . Como discutimos en relación a las simulaciones numéricas del presente Capítulo, el alto nivel de Ca^{2+} alcanzado en el caso de los ovocitos inhibe una fracción importante de RIP_3s lo que, junto al gradiente de Ca^{2+} que puede generarse en presencia de una distribución inhomogénea de RIP_3s

que hace que de la difusión un mecanismo eficiente de remoción de Ca^{2+} de la zona observada, lleva que el nivel de fluorescencia promedio disminuya incluso mientras continúa la foto-liberación de IP_3 . Como discutimos en el Capítulo 3 (ver también [Solovey et al. (2011)]) una distribución de RIP_3 s más uniforme puede explicar que la elevación de la fluorescencia ocurra más lentamente como se observa en el caso de los huevos. Por otro lado, la distinta tasa de remoción de Ca^{2+} en ovocitos y huevos juega un rol relevante en los comportamientos diferentes observados en ambos tipos celulares. Por un lado, el menor número de bombas en el huevo permite que, cuando se abren los primeros canales, el Ca^{2+} se vaya acumulando lo que ayuda a un acoplamiento más homogéneo en el espacio independientemente de la distribución de RIP_3 s. Por otro lado, esa uniformidad espacial hace que los gradientes de Ca^{2+} sean menores y que la difusión cumpla un rol menos relevante en la remoción. Es decir, el menor número de bombas se suma a un rol menor de la difusión en la remoción para permitir un acoplamiento entre RIP_3 s espacialmente extendido. Estos RIP_3 s uniformemente distribuidos en la región observada se van inhibiendo a medida que participan de la señal y se re-abren poco después de salir de la inhibición debido al alto Ca^{2+} , cuando sigue habiendo muchos RIP_3 s inhibidos. Esto hace que se vaya alcanzando una situación de equilibrio con un número relativamente constante de RIP_3 s abiertos (el que correspondería al $\langle N_o \rangle$ de las distribuciones simuladas obtenidas con δ_{Ca} bajo) y de RIP_3 s inhibidos. Debido al bajo nivel de remoción de Ca^{2+} , la $[\text{Ca}^{2+}]$ va subiendo uniformemente siguiendo aproximadamente una ecuación de la forma:

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]}{dt} = \sigma_{Ca} - \lambda[\text{Ca}^{2+}], \quad (5.3)$$

donde la corriente, $\sigma_{Ca} \propto \langle N_o \rangle$, lo que puede explicar el comportamiento observado en las Figs. 5.3B y 5.4B. Por otro lado, la re-apertura “temprana” de los RIP_3 s debida al Ca^{2+} promedio relativamente alto hace que el valor, $\langle N_o \rangle$, sea menor que en los eventos con señales propagantes en los casos con RIP_3 s distribuidos en *clusters* (los que podrían asociarse a la zona del máximo local en $N_o \sim 150$ en las distribuciones de la Fig. 5.7. La diferencia en la remoción de Ca^{2+} tanto por bombas como por difusión explica el modo distinto en que decae la fluorescencia en el caso de huevos y ovocitos.

Capítulo 6

Conclusiones

Las señales de Ca^{2+} son utilizadas por una enorme variedad de células para regular distintos procesos fisiológicos. En condiciones basales el Ca^{2+} libre en el citosol se encuentra a concentraciones muy bajas. Las señales corresponden a aumentos de esta concentración que se traducen en la acción del Ca^{2+} sobre otros componentes celulares lo que genera distintas respuestas. Estas respuestas dependen de cómo varía la concentración de Ca^{2+} tanto en el tiempo como en el espacio. Es decir, la información que transportan las señales está codificada en la distribución espacio-temporal del ión. El aumento en la concentración del Ca^{2+} citosólico se produce cuando los iones ingresan desde el medio extracelular o son liberados desde el retículo endoplasmático (RE) a través de canales específicos que se abren en respuesta a una señal. En esta Tesis nos centramos en señales mediadas por receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato, IP_3 , que se localizan en la membrana del RE y que constituyen el factor principal para el inicio de las señales intracelulares de Ca^{2+} . La probabilidad de apertura de estos canales aumenta con la concentración de IP_3 y es creciente con Ca^{2+} a concentraciones bajas y decreciente a concentraciones altas. La dependencia con $[\text{Ca}^{2+}]$ hace que, cuando un RIP_3 se abre, el Ca^{2+} liberado induzca la apertura de los RIP_3 s vecinos permitiendo la propagación de las señales mediante el fenómeno conocido como *Calcium-Induced-Calcium-Release* (CICR). La organización espacial de los RIP_3 s en *clusters* de $\sim 100 - 500\text{nm}$ de lado separados por una distancia *intercluster* de $\sim 1,5 - 2\mu\text{m}$ junto con el CICR dan lugar a una jerarquía de señales que van desde la liberación desde un RIP_3 único (*blips*), pasando por los *puffs* donde el CICR sólo induce la apertura de los RIP_3 s de un mismo *cluster* hasta llegar a las ondas que viajan por regiones más extensas gracias a ciclos de CICR entre *clusters*. El objetivo principal de esta Tesis ha sido estudiar la interacción entre la geometría que define la distribución espacial de los RIP_3 s y los otros procesos que determinan la variación espacio-temporal de la concentración de Ca^{2+} citosólico,

en particular, la captura de Ca^{2+} por *buffers*, el mecanismo más rápido de disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica con la que cuentan las células. Para tal fin combinamos experimentos de microscopía y modelado matemático desarrollando, a su vez, métodos novedosos de análisis de imágenes que permitieran una comparación cuantitativa entre ambos abordajes.

La observación de las señales de Ca^{2+} mediante distintas técnicas de microscopía requiere el uso de indicadores que deben ligarse al Ca^{2+} para brindar información sobre su distribución. Esta ligadura es dinámica: las moléculas de *dye* están permanentemente pegando y despegando iones de Ca^{2+} en escalas de tiempo que dependen de la cinética del *dye* y de su concentración. Es decir, los *dyes* actúan como *buffers* de Ca^{2+} . Por lo tanto, las imágenes no sólo brindan información indirecta sobre la distribución de Ca^{2+} en la célula sino que el uso de los indicadores puede afectar a su vez la dinámica de las señales observadas, especialmente en aquéllas que se propagan vía CICR. En los experimentos de observación de *puffs*, por otro lado, se suele utilizar el *buffer* lento de Ca^{2+} , EGTA, suponiendo que su presencia sólo impide el acoplamiento entre *clusters* debido al CICR pero que no altera las propiedades de los *puffs*. Los experimentos de observación de señales presentados en esta Tesis fueron realizados en ovocitos de *Xenopus laevis* microinyectados con IP_3 enjaulado, uno o dos *dyes* de Ca^{2+} de longitud de onda única (*i.e.*, que aumentan su fluorescencia al ligar Ca^{2+} sin variar la longitud de onda de emisión) y el *buffer* lento EGTA, evocando las señales mediante la foto-liberación del IP_3 enjaulado con luz UV y adquiriendo las imágenes con un microscopio confocal. Una primera parte de la Tesis, por lo tanto, se destinó a determinar hasta qué punto lo que se observa con las técnicas de microscopía que utilizan *dyes* de longitud de onda única y EGTA provee un reflejo fiel de la distribución de Ca^{2+} subyacente. Más específicamente, introdujimos un método que permite analizar una configuración experimental y estimar *a priori* la relación señal-ruido que se obtendría al utilizar dicha configuración para observar señales de Ca^{2+} . Este método permite clasificar configuraciones experimentales distintas en términos de la relación señal-ruido esperada e inferir de antemano cuáles son las señales de Ca^{2+} más pequeñas posibles de ser observadas con la configuración analizada. El método, por otro lado, permite conectar la fluorescencia observada con la distribución de Ca^{2+} ligado a *dye* que se deriva de simulaciones numéricas de modelos de la dinámica del Ca^{2+} intracelular. El método, descrito en el Capítulo 2 e introducido en [Piegari et al. (2014)] involucra la realización de tres tipos de experimentos en condiciones basales (*i.e.*, sin evocar señales) y su subsiguiente análisis en términos de un modelo de fluctuaciones de la fluorescencia propuesto por nosotros. A partir de dicho análisis se cuantifican los parámetros del modelo el que, en combinación con simulaciones numéricas de la dinámica del Ca^{2+} intracelular en presencia de una fuente de Ca^{2+} , permite estimar la relación señal-ruido esperada para distintas señales

localizadas. En el Capítulo 2 presentamos una descripción general del método y luego lo discutimos en más detalle al aplicarlo a tres configuraciones experimentales particulares (dos que usaban el *dye* Rhod-2 y una que usaba Fluo-4, ambas en combinación con el *buffer* EGTA). La aplicación a estas tres configuraciones puso en una misma clase a los experimentos realizados con $[F4]_T = 36\mu M$ y $[E]_T = 90\mu M$ y los realizados con $[R2]_T = 90\mu M$ y $[E]_T = 45\mu M$ y en una clase distinta (con peor relación señal-ruido) a los realizados con $[R2]_T = 36\mu M$ y $[E]_T = 90\mu M$. La clasificación resultó consistente con los experimentos de observación de señales realizados con estas configuraciones, ya que pudieron observarse *puffs* con las dos primeras y ninguno con la tercera. El análisis de las imágenes numéricas ruidosas que generamos usando el modelo de fluctuaciones cuantificado a partir de los experimentos mostró la importancia de contar con una descripción realista de las fluctuaciones. En particular mostramos que el cociente entre la variación de la concentración de Ca^{2+} ligado a *dye* durante una señal y la concentración de Ca^{2+} ligado a *dye* basal determinado a partir de las simulaciones numéricas no es suficiente para comparar la observabilidad de las señales obtenidas en distintas condiciones experimentales. La aplicación de nuestro método permitió enfatizar la relevancia de la contribución del *dye* libre a la fluorescencia para determinar el rango de señales observables y la relación señal-ruido.

Contando con dos configuraciones experimentales equivalentes desde el punto de vista de la relación señal-ruido esperada pero obtenidas con *dyes* de cinética distinta, en el Capítulo 3 avanzamos en el análisis de hasta qué punto las propiedades de los *puffs* observados con ambas configuraciones eran similares. No sólo nos limitamos a comparar las propiedades sino que analizamos si el universo de eventos de liberación de Ca^{2+} evocados usando una u otra configuración era el mismo. Esto nos permitió avanzar en nuestro objetivo de comprender y observar de qué modo *buffers* de distinta cinética afectan de modo diferente la distribución de Ca^{2+} libre y cómo, en el caso de *puffs*, la modulación resultante depende de la distribución espacial de los RIP_3 s. Para tal fin estudiamos las propiedades de los *puffs* observados usando $[F4]_T = 36\mu M$ y $[E]_T = 90\mu M$ y $[R2]_T = 90\mu M$ y $[E]_T = 45\mu M$. Analizamos también experimentos realizados con $[F4]_T = 36\mu M$ y $[E]_T = 300\mu M$. De la comparación de las primeras dos configuraciones concluimos que, si bien ambas estaban caracterizadas por la misma relación señal-ruido, el conjunto de *puffs* que podía ser observado en uno u otro caso era distinto. Lo mismo sucedió al comparar las dos configuraciones con Fluo-4. En particular, de ambas comparaciones concluimos que, usando una cantidad mayor del *buffer* lento, EGTA, era posible observar *puffs* de mayor corriente subyacente. Las simulaciones numéricas mostraron que variando la concentración de EGTA entre los valores usados experimentalmente el CICR dentro de los *clusters* no se alteraba. Concluimos entonces que la posibilidad de observar eventos con mayor corriente de Ca^{2+} en presencia de mayores concentraciones del *buffer*

lento era consecuencia de la disrupción más eficiente del CICR *entre clusters* que la adición del EGTA proveía. Es decir, agregando EGTA es posible observar *puffs* con altas corrientes de Ca^{2+} que, en ausencia de EGTA, darían lugar a ondas. Esto indica que la observación no es “inerte” en el caso de las señales de Ca^{2+} donde el Ca^{2+} liberado desde un canal induce la liberación desde canales vecinos, donde se usa un *buffer* lento (EGTA) para disrumpir el acoplamiento mediado por Ca^{2+} entre cúmulos de RIP_3s distintos (adición que se supone que no afecta la medición) y donde el propio fluoróforo actúa también como *buffer* de calcio. Del análisis de las propiedades de los eventos observables sólo con las configuraciones con mayor $[E]_T$ concluimos, por otro lado, que aquéllas con mayor corriente correspondían a situaciones donde los RIP_3s participantes se encontraban a una distancia muy pequeña entre sí. De este modo mostramos que comparando el universo de eventos obtenidos con distintas configuraciones experimentales era posible inferir las propiedades de algunos de los mecanismos que modulan las señales (*e.g.*, la distribución espacial de RIP_3s activos) sin necesidad de observarlos directamente. Los resultados de este Capítulo se encuentran publicados en [Piegari et al. (2015)].

Para profundizar en el estudio del efecto de los *buffers* de distinta cinética sobre la distribución espacio-temporal del Ca^{2+} en el Capítulo 4 estudiamos señales obtenidas en ovocitos de *Xenopus laevis* utilizando simultáneamente los *dyes*, Fluo-4 y Rhod-2, identificando al primero como *buffer* rápido y al segundo como lento. En primer lugar analizamos cómo cambiaban las propiedades de los *puffs* observados en Fluo-4 al aumentar Rhod-2 y viceversa y así probamos que Rhod-2 estaba actuando como se puede esperar de un *buffer* lento y que Fluo-4 lo hacía como un *buffer* rápido. Para investigar si los cambios obtenidos al variar las concentraciones de *dye* y EGTA podían atribuirse a una modificación en la liberación de Ca^{2+} durante las señales determinamos un modo de obtener, a partir de la fluorescencia observada, una función creciente con la corriente de Ca^{2+} subyacente. Utilizando esta función mostramos la existencia de *puffs* con mayor tasa de liberación de Ca^{2+} al aumentar $[R2]_T$, *i.e.*, la concentración del *dye* lento, lo que es consistente con las conclusiones del Capítulo 3. El análisis al variar la concentración del *dye* rápido, $[F4]_T$, no dio resultados muy concluyentes. Se observó, sin embargo, una tendencia de acuerdo a la cual la corriente de Ca^{2+} subyacente a los eventos, en promedio, disminuía al aumentar $[F4]_T$. La duración total de cada evento de liberación, por otro lado, aumentaba con $[F4]_T$ con lo que la cantidad total de Ca^{2+} liberada, en promedio, permanecía relativamente invariante al variar $[F4]_T$. Esto corroboró observaciones previas respecto del rol dual de los *buffers* rápidos, que pueden moderar el CICR dentro de un *cluster* dando lugar a señales de menor corriente de Ca^{2+} y, a su vez, impedir la inhibición de los RIP_3s permitiendo la re-apertura casi inmediata de los canales que participan de las señales prolongando así su duración. Consistentemente con esto, nuestras observaciones mostraron la co-existencia de un tiempo de liberación más

prolongado pero a una tasa menor al aumentar la concentración del *dye* rápido. Dado el marco común dentro del cual pudimos explicar los cambios observados en las propiedades de las señales al aumentar la concentración de un *buffer* lento en los Capítulos 3 y 4, en este último analizamos también los mecanismos por los cuales un valor alto de $[R2]_T$ podía disrumpir el CICR entre *clusters* más eficientemente. Para este fin computamos numéricamente la probabilidad de que un RIP_3 ubicado a una distancia, d , de una fuente puntual de Ca^{2+} se abriera antes de que hubiera pasado un tiempo, t , desde el encendido de la fuente y la usamos para estimar de qué modo debería variar la distribución de tamaños de los eventos localizados al cambiar $[R2]_T$. Comparamos esta estimación con las distribuciones de tamaño obtenidas experimentalmente. Concluimos que la variación de $[R2]_T$ *per se* no podía explicar los cambios observados en la distribución de tamaños de liberación de Ca^{2+} si la distancia sobre la cual el agregado del *buffer* lento ejercía algún efecto era del orden de la separación típica entre *clusters* ($\sim 1,4 - 2\mu m$, de acuerdo a las observaciones de *puffs*). La variación observada experimentalmente podía explicarse mejor si se suponía que había al menos un RIP_3 a una distancia menor ($\sim 0,6\mu m$) de la fuente de Ca^{2+} o si la $[Ca^{2+}]_{basal}$ decrecía al aumentar $[R2]_T$. Estudiamos entonces si la concentración basal cambiaba con $[R2]_T$ en los experimentos. Encontramos algunos indicios de la tendencia decreciente esperada, aunque no concluyentes ya que los experimentos con un solo *dye* no se encuadraban dentro de esta tendencia. De todos modos, a partir de la comparación cuantitativa entre los cambios obtenidos experimentalmente y las variaciones en la probabilidad de propagar una onda calculadas numéricamente concluimos que era posible que fueran dos factores combinados los que determinaban los cambios observados al aumentar $[R2]_T$: una pequeña disminución de $[Ca^{2+}]_{basal}$ y la existencia de algunos RIP_3 s aislados en la regiones entre *clusters*. De acuerdo a esta descripción, el *buffer* lento agregado estaría actuando sobre estos RIP_3 s sueltos impidiendo o dificultando la propagación de las ondas. Para validar esta conclusión analizamos las distribuciones de Rhod-2 y de Fluo-4 ligado a Ca^{2+} derivadas de imágenes de *puffs* y de otras que mostraban eventos de liberación de Ca^{2+} desde múltiples sitios discretos. Las distribuciones observadas durante las señales localizadas mostraron que la concentración de Ca^{2+} ligado a Fluo-4 se elevaba principalmente en la región donde ocurría la mayor liberación (el centro del *puff*) mientras que la del ligado a Rhod-2 cambiaba su distribución en función de la concentración del *dye* y de la de EGTA. Cuando $[R2]_T = 36\mu M$, el Ca^{2+} ligado a Rhod-2 rodeaba al Ca^{2+} ligado a Fluo-4 independientemente de la concentración de EGTA. Cuando $[R2]_T = 90\mu M$, el Ca^{2+} ligado a Rhod-2 se elevaba sensiblemente en la región donde el Ca^{2+} ligado a Fluo-4 alcanzaba su máximo pero aumentaba también a su alrededor cuando la concentración de EGTA no era muy alta ($[E]_T = 45\mu M$). Más aún, la concentración de Rhod-2 ligado a Ca^{2+} alcanzaba un $\sim 60\%$ del máximo de la señal en una región espacialmente extendida (de $\sim 2,5\mu m$). Estas observaciones nos permitieron concluir que cuando el Rhod-2 no puede

competir con el Fluo-4 por el Ca^{2+} en la región de mayor liberación, el *dye* lento termina atrapando Ca^{2+} en los alrededores de esa región. Por otro lado concluimos que cuando sí compite más eficientemente con el *dye* rápido, la concentración de Rhod-2 ligado a Ca^{2+} se distribuye sobre una región espacialmente más extendida que la de Fluo-4 ligado a Ca^{2+} si el EGTA no es suficiente para competir con él. De este modo ilustramos el efecto que el uso simultáneo de *buffers* rápidos y lentos tiene sobre la dinámica del Ca^{2+} , con estos últimos atrapándolo lejos de las zonas de mayor liberación (donde el Ca^{2+} es sólo atrapado por los *buffers* rápidos). El análisis de imágenes con múltiples sitios de liberación mostró que donde Rhod-2 capturaba Ca^{2+} más eficientemente, el aumento de la $[\text{CaF4}]$ se volvía más lento. Aunque en este caso el Rhod-2 sólo dificultaba pero no impedía la captura del Ca^{2+} por parte del Fluo-4, el ejemplo ilustra cómo podría eventualmente impedirlo en otras condiciones. Identificando al Rhod-2 con un *buffer* no fluorescente lento, por otro lado, podemos imaginar de qué modo las señales de Ca^{2+} observadas con un *dye* como Fluo-4 permanecen localizadas en presencia de un *buffer* lento (como Rhod-2). El análisis de las regiones donde la distribución de *dye* ligado a Ca^{2+} estaba por encima del 60 % de su valores máximo mostró que éstas podían extenderse a lo largo de $\sim 2.5\mu\text{m}$ indicando que habría RIP_3s distribuidos sobre una región amplia. Esta elevación espacialmente extendida coexistía con picos definidos de fluorescencia que corroboraban la existencia de *clusters* de RIP_3s . En base a las observaciones y análisis presentados en el Capítulo 4 concluimos que si bien en los ovocitos de *Xenopus laevis* los RIP_3s están en su mayoría organizados en *clusters*, hay también RIP_3s “suelos” entre ellos. Estos RIP_3s suelos son importantes para la propagación de las señales que no permanecen localizadas y es, aparentemente, impidiendo que capturen Ca^{2+} cómo los *buffers* lentos interrumpen el CICR entre *clusters*. Un trabajo conteniendo los resultados de este Capítulo será enviado próximamente a publicar.

Para analizar de un modo más directo el efecto de la distribución espacial de los RIP_3s sobre las señales presentamos en el Capítulo 5 los resultados de experimentos realizados en ovocitos y en huevos que fueron obtenidos madurando artificialmente a los ovocitos con progesterona. Si bien los resultados son aún preliminares, pudimos observar diferencias en la dinámica de la señal en ambos tipos celulares. En el caso de los ovocitos se detectaron sitios de liberación discretos que se “encendían” antes de que se propagara la señal mientras que la liberación en el caso del huevo parecía más “continua” o uniformemente distribuida. Caracterizamos los tiempos característicos de la señal promediada sobre todo el *frame* y obtuvimos, frente a un mismo pulso de luz UV, un aumento del Ca^{2+} más lento y de menor amplitud en el huevo que en el ovocito lo que implica un menor acoplamiento entre RIP_3s debido al CICR en los primeros. La diferencia en los tiempos es consistente con que, en el ovocito, los RIP_3s estén organizados en *clusters* donde la distancia entre canales es menor, el acoplamiento por CICR es más eficiente

y por ello la $[Ca^{2+}]$ aumenta más rápidamente, mientras que, en los huevos, los RIP_{3s} estén distribuidos más uniformemente (y con una mayor separación media entre canales). La diferencia en la amplitud de las señales también puede atribuirse a la diferencia en la eficiencia del CICR de acuerdo a lo concluido en el Capítulo 3. Analizamos luego el tiempo de decaimiento del promedio espacial de la fluorescencia una vez apagado el pulso de fotólisis y también acá encontramos diferencias entre ambos tipos celulares. En el ovocito el decaimiento presentó un comportamiento bi-exponencial como función del tiempo, mientras que en el huevo decayó linealmente con una escala del orden (aunque algo mayor) de la escala más lenta en ovocitos. Atribuimos el decaimiento en la escala rápida en ovocitos a la difusión, proceso que actúa eficazmente en presencia de gradientes altos como los que uno puede esperar si la distribución del Ca^{2+} es espacialmente inhomogénea. En cuanto a la dependencia casi lineal del decaimiento en huevos lo atribuimos a la menor disponibilidad de bombas que remueven Ca^{2+} en éstos en comparación con los ovocitos. Al haber menos bombas, las pocas que quedan se saturan con niveles de Ca^{2+} no demasiado altos lo que resulta en una remoción del Ca^{2+} citosólico a tasa constante. Para verificar las diferencias en relación a la mayor o menor uniformidad espacial de las señales en huevos y ovocitos, argumento que utilizamos para explicar tanto las diferencias en la subida como en el decaimiento de la señal, analizamos el comportamiento de la fluorescencia promediado sobre distintas subregiones de la imagen. Encontramos que mientras que la amplitud variaba en un 40% en distintas regiones del ovocito esta variación era menor del 9% en el caso de huevos. Las diferencias en los tiempos de subida y decaimiento de la fluorescencia mostraban una variabilidad similar a la de la amplitud en ambos tipos celulares. Para estudiar en más detalle cómo la distribución espacial de los RIP_{3s} podía incidir sobre las características espacio-temporales de las señales realizamos simulaciones numéricas de un modelo sencillo [Lopez et al. (2012)] que permite estimar cuántos RIP_{3s} pueden acoplarse vía CICR y participar de una misma señal de Ca^{2+} . Comparamos los resultados de las simulaciones obtenidas utilizando el mismo número medio de RIP_{3s} pero distribuidos en *clusters* en un caso y más uniformemente en otro. Comparamos también los resultados al variar la tasa de remoción del Ca^{2+} liberado. De las simulaciones concluimos que si bien la distribución espacial de los RIP_{3s} cumplía un rol importante el mismo quedaba “desdibujado” cuando el Ca^{2+} liberado no era removido con suficiente velocidad. En ese caso el Ca^{2+} remanente en el medio permitía acoplar sitios de liberación distintos que de otro modo actuarían de forma independiente. Notamos también que la alta concentración de Ca^{2+} remanente permitía que los RIP_{3s} pudieran abrirse inmediatamente después de salir de la inhibición en la que entran después de participar de una señal. Eso hacía que el número medio de RIP_{3s} que participaban de cada señal fuera bastante menor que el número total de RIP_{3s} presentes en el medio ya que cada vez que un canal se desinhibía se encontraba rodeado de varios otros que permanecían inhibidos. Este menor número de RIP_{3s} que se abrían

en una misma “cascada” de CICR junto con la existencia previa de una $[Ca^{2+}]$ más alta que el nivel basal dieron lugar a distribuciones de Ca^{2+} con gradientes más suaves que en el caso en que muchos RIP_3 s se abrían en una región espacialmente restringida sobre un nivel previo de $[Ca^{2+}]$ más bajo. Estos resultados nos llevaron a concluir que es tal vez el menor número de bombas en los huevos en comparación con los ovocitos lo que más incide sobre las distintas distribuciones espacio-temporales del Ca^{2+} observadas en ambos tipos celulares.

En resumen, con el trabajo contenido en esta Tesis hemos contribuido a avanzar en nuestro propósito de entender de qué modo la geometría y la dinámica se combinan para modular las señales intracelulares de Ca^{2+} . El Ca^{2+} provee a las células de un lenguaje. Con esta Tesis hemos ayudado a entender cómo las células pueden pronunciar algunas de las palabras de este lenguaje.

Apéndice A

Métodos

A.1. Métodos experimentales

A.1.1. Preparación de los ovocitos de *Xenopus laevis*

Los experimentos cuyos resultados se presentan en los Capítulos 2-5 fueron realizados usando ovocitos inmaduros de la rana *Xenopus laevis* previamente tratados con colagenasa (Apéndice C.1) y conservados en solución Barth.

Los ovocitos fueron cargados con distintos tipos de reactivos dependiendo del experimento. Las soluciones conteniendo estos reactivos fueron micro-inyectadas en las células usando un microinyector Drummond como se describe en el Apéndice C.2. Para estimar las concentraciones finales de cada compuesto supusimos que el volumen citosólico del ovocito era de $\sim 1\mu l$.

Para observar la distribución de Ca^{2+} dentro de las células se utilizaron los *dyes* Fluo-4 dextran de alta afinidad, $K_d \cong 800nM$, y/o Rhod-2 dextran, $K_d \cong 2000nM$. Se hicieron experimentos usando uno u otro *dye* por separado o ambos simultáneamente. En los experimentos de los Capítulos 2, 3 y 4 se microinyectó también el buffer exógeno de Ca^{2+} , EGTA.

Para evocar señales de Ca^{2+} se microinyectó IP_3 enjaulado a una concentración final de $9\mu M$ que luego era foto-liberado como se explica más adelante en el Apéndice B.

Para variar el Ca^{2+} citosólico como es necesario en algunos de los experimentos del Capítulo 2 se hicieron microinyecciones sucesivas de una solución de dicloruro de calcio ($CaCl_2$) a una concentración final de 150nM en el ovocito.

Algunos de los resultados presentados en el Capítulo 5 corresponden a experimentos realizados en células maduras artificialmente. Para tal fin, se incubó a los ovocitos a 18°C usando progesterona a 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 12-16hs. Se eligieron los huevos con puntos blancos en el hemisferio animal los que indican que ya ocurrió la ruptura de la vesícula germinal (GVBD). Para hacer las mediciones esperamos entre 3-4hs desde la aparición del punto blanco porque se supone que es el tiempo en el que el huevo queda detenido en la metafase II de la meiosis y la maduración está completa [Gallo et al. (1995); Sun, Machaca (2004)].

Fluo-4 Rhod-2 y el IP₃ enjaulado son de Molecular Probes y el EGTA, el dicloruro y la progesterona de Sigma Aldrich.

A.1.2. Técnica de microscopía

Los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente usando un microscopio invertido IX81 conectado a una unidad confocal Olympus FluoView 1000. Todas las mediciones se hicieron a la profundidad de los gránulos corticales en el hemisferio animal de los ovocitos haciendo foco con un objetivo 60X de inmersión en aceite ($AN = 1,35$). Los *dyes* Fluo-4 y Rhod-2 se excitaron con las líneas 488nm del láser de Argón y con la línea 543nm del láser de He-Ne, respectivamente, contenidos en el equipo. La fluorescencia emitida fue detectada entre (500 – 600)nm para Fluo-4 y (555 – 655)nm para Rhod-2 con un detector PMT. Para la adquisición simultánea la emisión de los *dyes* fue detectada en el rango de (500 – 600)nm para Fluo-4 y (600 – 630)nm para Rhod-2. El detector fue usado en el modo de conteo de fotones.

A.1.2.1. Modos de adquisición

Las imágenes en el modo linescan fueron obtenidas escaneando con el zoom digital 10 \times una línea fija ($N_x = 250\text{pixeles}$) ubicada a una profundidad de $\sim (10 - 15)\mu\text{m}$ dentro del ovocito. La velocidad de adquisición por píxel se fijó en 10 $\mu\text{m}/\text{s}$. El tiempo de adquisición por línea fue de 3,62ms, adquiriéndose un total de 3000 líneas. Los experimentos de los Capítulos 2,3 y 4 fueron realizados de este modo.

Las imágenes en el modo frame se realizaron sin zoom digital sobre regiones de 250 \times 250 píxeles (207 $\mu\text{m} \times 207\mu\text{m}$) con un tiempo por píxel de 4 μs y 0,56s por frame. Los experimentos del Capítulo 5 fueron realizados de este modo.

A.1.2.2. Separación de líneas espectrales de emisión

En la Fig. A.1 se muestran los espectros de emisión y absorción de los *dyes* usados en esta Tesis. Allí se puede observar que Fluo-4 tiene una cola de emisión en el rango $(600 - 630)nm$ que se superpone a las longitudes de emisión de Rhod-2. Por esto es importante para la observación de señales usando simultáneamente Fluo-4 y Rhod-2 separar la emisión de ambos *dyes*. Para esto fue necesario realizar una medición control adquiriendo en los dos canales (Ch1 Y Ch2) pero sólo excitando al Fluo-4. A partir del valor medio de la fluorescencia en cada canal, $\overline{Ch1}$ y $\overline{Ch2}$, calculamos el coeficiente $\alpha = \overline{Ch2}/\overline{Ch1}$ que representa la proporción de la fluorescencia de Fluo-4 que entra en el canal de Rhod-2. Luego, cuando se adquirieron imágenes excitando ambos *dyes*, restamos en el canal de Rhod-2 la emisión del Fluo-4, esto es, $Ch2_{limpio} = Ch2 - \alpha \cdot Ch1$ y con esto determinamos la fluorescencia asociada a la emisión del Rhod-2. Se obtuvo $R = 0,1626$.

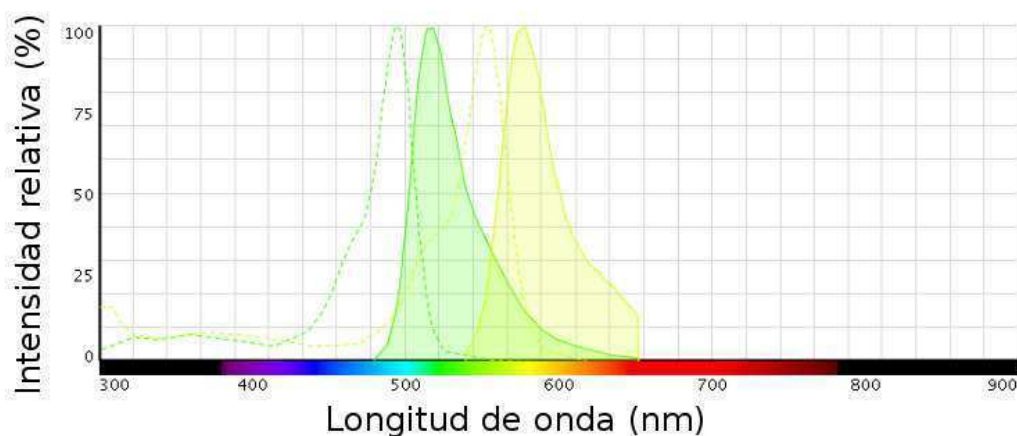


Figura A.1: Espectros de excitación (línea punteada) y emisión (línea sólida) de los *dyes* Fluo-4 y Rhod-2.

A.1.3. Procesamiento de imágenes de señales de Ca^{2+}

Los experimentos brindan valores de la fluorescencia, F , como función de la posición y el tiempo. Cuando la fluorescencia es adquirida en el modo de linescan (como en los experimentos de los Capítulos 2, 3 y 4). En las imágenes tipo linescan que se muestran, el espacio corre verticalmente y el tiempo horizontalmente de izquierda a derecha. En la Figura A.2A se muestra una típica imagen linescan. En esta figura la fluorescencia de un *dye* de calcio (en este caso, Fluo-4) se muestra en cada punto, x_i , y tiempo, t_i , como la relación de la Ec. 1.1. Se representa el aumento del nivel de la fluorescencia con el aumento de los colores cálidos. La flecha marca el pulso UV. Las franjas brillantes

corresponden al citosol mientras que las franjas oscuras corresponden a gránulos corticales. Calculamos la relación ΔF_R (ver Ec. 1.1) a partir de esta fluorescencia suavizada haciendo un promedio a primeros vecinos.

En los frames del Capítulo 5 se muestra la fluorescencia cruda, F .

Todo el procesamiento de imágenes acá descrito fue realizado usando rutinas escritas en MATLAB (2007a, The MathWorks, City, State).

A.1.3.1. Caracterización de los *puffs*

Las propiedades de los *puffs* analizadas en esta Tesis derivan del análisis de imágenes obtenidas en el modo de linescan. Para poder realizar este análisis, las regiones que contienen *puffs* se identifican visualmente como aquéllas donde hay un conjunto de píxeles (al menos 20) cuya fluorescencia, F , es distinguiblemente más alta (a simple vista) que la fluorescencia basal y que la fluorescencia a su alrededor. Una vez identificada la región se selecciona un rectángulo en la imagen que la contenga (Fig. A.2A). Luego se determina el centro del *puff* ubicando el punto espacial, x_c , y el tiempo, t_c , en donde ΔF_R es máximo (Fig. A.2B).

Para determinar la amplitud y los parámetros temporales del evento observado computamos $\langle \Delta F_R \rangle_x(t)$ promediando $\Delta F_R(x, t)$ sobre once líneas horizontales (la que corresponde a $x = x_c$ más las correspondientes a las cinco posiciones contiguas a un lado y las cinco posiciones contiguas al otro lado de $x = x_c$). El *rise time*, *decay time* y la amplitud se computan como se muestra en la Fig. A.2C. La amplitud, A , es definida como el máximo de la fluorescencia promediada sobre las 11 líneas, $A \equiv \max_t \langle \Delta F_R \rangle_x(t)$. Denotamos t_{amp} como el tiempo, t , en el que $\langle \Delta F_R \rangle_x(t) = A$, el comienzo del *puff* se identifica con t_{inicio} , el máximo tiempo, t , que satisface $t < t_{amp}$ y $\langle \Delta F_R \rangle_x(t) = 0,1A$. El fin del *puff* se identifica con t_{fin} , el mínimo tiempo, t , que satisface $t > t_{amp}$ y $\langle \Delta F_R \rangle_x(t) = 0,1A$. El *rise time*, *decay time* y la duración del *puff* se definen como $t_R \equiv t_{amp} - t_{inicio}$, $t_D \equiv t_{fin} - t_{amp}$ y $t_{R+D} = t_R + t_D$, respectivamente. También computamos la tasa de crecimiento de la amplitud como $GR = 0,9A/t_R$

Para determinar los parámetros que caracterizan la extensión espacial del evento observado primero computamos el valor medio, m , y el desvío estándar, σ , de ΔF_R en las franjas brillantes de toda la imagen. Luego computamos el *umbral* = $m + \sigma + 0,2 * (A - m - \sigma)$ para cada *puff* de la imagen y $\langle \Delta F_R \rangle_t(x)$ promediando cinco líneas verticales (la que corresponde a $t = t_c$ más las correspondientes a los dos tiempos inmediatamente anteriores y a los dos tiempos inmediatamente posteriores a $t = t_c$). Identificamos los puntos x_i en la región seleccionada que satisfacen $\langle \Delta F_R \rangle_t(x) > \text{umbral}$, y definimos

$x_{min} = \min_i\{x_i\}$ y $x_{max} = \max_i\{x_i\}$ y de ellos, $ancho = x_{max} - x_{min}$. Ilustramos el procedimiento en la Fig. A.2D.

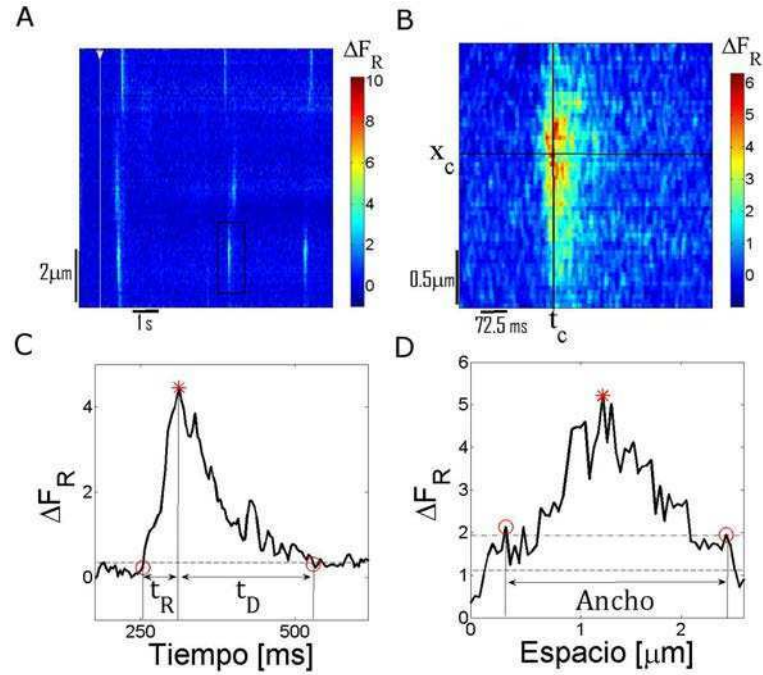


Figura A.2: Imágenes linescan y caracterización de *puffs*. (A) Imagen linescan representativa con Fluo-4, adquirida con un tiempo por píxel de $10\mu s$ y una velocidad de escaneo de $3,62ms$ por línea. Los *puffs* se evocaron con un pulso de fotólisis en el tiempo que se marca con una flecha. (B) Distribución espacio-temporal de ΔF_R del *puff* rodeado por un cuadrado negro en (A). El centro del *puff* es identificado por la coordenada espacial y temporal x_c y t_c , respectivamente. (C) Perfil temporal obtenido de la imagen en (B) promediando 11 líneas horizontales alrededor de x_c . Se indican en la figura los parámetros temporales y la amplitud que se caracterizan. (D) Perfil espacial obtenido de la imagen obtenida en (B) promediando 5 líneas verticales alrededor de t_c . Se indica el ancho del *puff*.

A.1.3.2. Caracterización de las ondas.

Las ondas se identifican visualmente como liberaciones que ocurren seguidas en el tiempo en sitios vecinos. Para determinar la velocidad, V , de las mismas se seleccionaron las coordenadas, (x_i, t_i) ($i = 1, 2$), de dos máximos locales del evento de liberación y luego se calculó $V = \frac{x_1 - x_2}{t_1 - t_2}$.

A.1.4. Análisis estadístico

Para analizar los resultados experimentales calculamos los histogramas de los parámetros obtenidos expresándolos en término de la frecuencia de ocurrencia, $N(X)/N_{total}$, donde $N(X)$ es el número de eventos de un mismo tipo (*puffs* u ondas) con X en un dado *bin* de valores y N_{total} el número total de eventos analizados. Usamos un tamaño de bin

uniforme, h , tal que $N(X)/N_{total} = h f(X)$ con f la función densidad de probabilidad de X . El número de bins es $k = \Delta X/h$, con ΔX el rango de valores obtenidos y el tamaño del bin es $h = 2r/N_{total}^{1/3}$, donde $r \equiv X_{3/4} - X_{1/4}$ es la diferencia entre los valores, $X_{1/4}$ y $X_{3/4}$, que definen el primer y cuarto cuartil, respectivamente, de la función densidad acumulada (CDF por las siglas en inglés), $F(X) = \int_0^X f(X') dX'$.

Para determinar cómo varían las distribuciones de un dado parámetro, X , al variar las condiciones experimentales comparamos las CDFs del mismo parámetro obtenidas en una u otra condición experimental, $F_1(X)$ y $F_2(X)$, a las que calculamos como $F_i(X) = \sum_{X' \leq X} N_i(X')/N_{i,total}$. Luego realizamos un test de Kolmogorov-Smirnov usando el estadístico $\max|F_1(X) - F_2(X)|$.

A.1.5. Pre-procesamiento de imágenes en ovocitos de *Xenopus*

En los ovocitos de *Xenopus laevis* las imágenes linecan típicamente muestran líneas horizontales oscuras que corresponden a los gránulos corticales (ver Fig.A.3 A). Las franjas luminosas corresponden al citosol. Para poder aplicar el método de clasificación de configuraciones experimentales para la observación de señales de Ca^{2+} introducido en el Capítulo 2 necesitamos pre-procesar los datos para quedarnos únicamente con la información proveniente del citosol. Este pre-procesamiento, que no es necesario en otro tipo de células, es ilustrado en la Fig. A.3. Con el fin de separar los píxeles que corresponden a esos dos grupos, primero computamos $\bar{F}(x_i) = \frac{1}{N_t} \sum_{j=1}^{N_t} F(x_i, t_j)$, y luego calculamos el valor medio, $\langle F \rangle_{b,o}$, y el desvío estándar, $\sigma_{F_{b,o}}$, de $\bar{F}(x_i)$ como:

$$\langle F \rangle_{b,o} = \frac{1}{N_x} \sum_{j=1}^{N_x} F(x_j) \quad (\text{A.1})$$

$$\sigma_{F_{b,o}} = \sqrt{\frac{1}{N_x - 1} \sum_{j=1}^{N_x} (\bar{F}(x_j) - \langle F \rangle_{b,o})^2} \quad (\text{A.2})$$

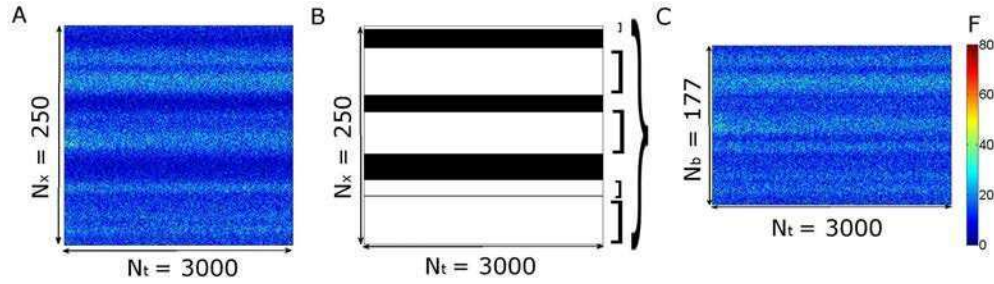
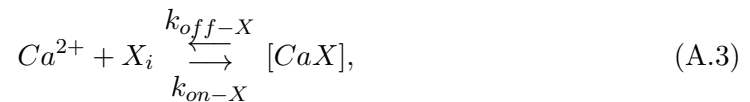


Figura A.3: Pre-procesamiento aplicado a las imágenes de los experimentos Tipo I-III realizados en ovocitos de *Xenopus laevis*. (A) Imagen linescan típica obtenida en experimentos Tipo I donde se distinguen las franjas oscuras (gránulos corticales) y las brillantes (citosol). (B) Franjas brillantes (blanco) y oscuras (negro) de la imagen en (A) identificada como se explicó en la Sec. 2.3.1. (C) Imagen final con las franjas oscuras removidas. Luego trabajamos con todos los píxeles de la imagen sin distinguir sus coordenadas espacial y temporal. Este pre-procesamiento podría no necesitarse en otras células. La barra de colores representa la fluorescencia F tanto en (A) como en (C).

Finalmente identificamos la ubicación de las líneas espaciales brillantes, x_i , como aquellas que satisfacen $\overline{F}(x_i) > \langle F \rangle_{b,o} - 0,5\sigma_{F_{b,o}}$ (indicado en blanco en la Fig. A.3B). Una vez que se identifican las franjas brillantes, sólo trabajamos con los píxeles de la imagen que corresponden a las mismas (Fig. A.3C).

A.2. Simulaciones numéricas deterministas

Para la determinación de la distribución de *dye* ligado a Ca^{2+} en presencia de una fuente localizada de Ca^{2+} simulamos numéricamente la dinámica de Ca^{2+} en el medio citosólico resolviendo un conjunto de ecuaciones de reacción-difusión en un volumen esférico, suponiendo simetría esférica, para las siguientes especies: Ca^{2+} , un *buffer* endógeno inmóvil (S), uno o dos indicadores de Ca^{2+} citosólico (Fluo-4, $D = F4$ o Rhod-2, $D = R2$) y un *buffer* exógeno móvil ($EGTA$). En algunos casos también consideramos un *buffer* adicional móvil (M). Incluimos una fuente de Ca^{2+} localizada en el origen y bombas que remueven Ca^{2+} uniformemente en el espacio (P). La fuente representa un *cluster* de RIP_{3s} . Consideramos que un único ion de Ca^{2+} se une a una molécula de *buffer* o de *dye* de acuerdo a:



donde X representa D , E , S o M , y k_{on-X} y k_{off-X} son las constantes de pegado y despegado de la reacción. Suponemos que las concentraciones de *dye*, de $EGTA$ y los *buffers* son inicialmente uniformes y que los coeficientes de difusión de estas especies

son los mismos en su forma libre o ligada a Ca^{2+} . Esto implica que las concentraciones totales $[D]_T$, $[E]_T$, $[M]_T$, y $[S]_T$ permanecen uniformes y constantes para todo tiempo. Por lo tanto calculamos las concentraciones libres, $[D]$, $[E]$, $[M]$, y $[S]$ sustrayendo la concentración de la forma de *dye* ligada a Ca^{2+} de sus respectivas concentraciones totales. Dados estos supuestos, el conjunto de ecuaciones de reacción-difusión es:

$$\frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} = D_{\text{Ca}} \nabla^2[\text{Ca}^{2+}] + \sum_{X=D,S,M,EGTA} R_{\text{Ca}X} + \text{source} \delta(r) - [P]_T \frac{[\text{Ca}^{2+}]^2}{[\text{Ca}^{2+}]^2 + k_{\text{off}-T}}, \quad (\text{A.4})$$

$$\frac{\partial[\text{Ca}D]}{\partial t} = D_{\text{dye}} \nabla^2[\text{Ca}D] + R_{\text{Ca}D}, \quad (\text{A.5})$$

$$\frac{\partial[\text{Ca}EGTA]}{\partial t} = D_{EGTA} \nabla^2[\text{Ca}EGTA] + R_{\text{Ca}EGTA}, \quad (\text{A.6})$$

$$\frac{\partial[\text{Ca}M]}{\partial t} = D_M \nabla^2[\text{Ca}M] + R_{\text{Ca}M}, \quad (\text{A.7})$$

$$\frac{\partial[\text{Ca}S]}{\partial t} = R_{\text{Ca}S}, \quad (\text{A.8})$$

donde D_{Ca} , D_{dye} , D_M y D_{EGTA} son los coeficientes de difusión de Ca^{2+} , D , M y $EGTA$, respectivamente. Los términos de reacción, $R_{\text{Ca}X}$, se derivan del esquema cinético, ec. A.3:

$$R_{\text{Ca}X} = k_{\text{on}-X}[\text{Ca}^{2+}]([X]_T - [\text{Ca}X]) - k_{\text{off}-X}[\text{Ca}X] \quad (\text{A.9})$$

Resolvemos las ecuaciones suponiendo condiciones de contorno de Neumann en $r = 20,5 \mu\text{m}$ con \mathbf{r} la coordenada espacial. Para la fuente suponemos que consiste de n_c canales que se abren simultáneamente en $t = 0$ cada uno de los cuales se cierra luego de un tiempo que proviene de una distribución exponencial con tiempo medio t_a [Youngt, Keizer (1992)]. Para las condiciones iniciales, suponemos que todas las especies están en equilibrio entre sí ($R_{\text{Ca}X} = 0$ para todas las X a $t = 0$), con Ca^{2+} a su concentración basal, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}$.

Las ecuaciones de reacción-difusión se resuelven usando el método de “backward Euler” en el tiempo y diferencias finitas en el espacio con una expresión a segundo orden para el Laplaciano (primeros vecinos). El tamaño de la grilla espacial es $dr = 0,041 \mu\text{m}$ y el paso temporal es $dt = 10 \mu\text{s}$. Los valores de los parámetros se muestran en una Tabla para cada capítulo.

Para comparar con las señales obtenidas con el microscopio confocal en el modo linescan calculamos el promedio pesado de $[\text{Ca}D]$ a lo largo de la línea $r = (x, 0, 0)$ teniendo en cuenta “la point spread function” (PSF) del microscopio. En este caso, la

señal confocal como función de x resulta [Shuai et al. (2006)]:

$$\overline{[CaD]}(x, t) = \frac{\int [CaD](r', t') \exp(-2((x - x')^2 + y'^2)/w_r^2 - 2z'^2/w_z^2) dx' dy' dz'}{V} \quad (\text{A.10})$$

donde $w_r = 0,23\mu m$, $w_z = 1,15\mu m$ y $V = w_r^2 w_z \frac{\pi^3}{2}$. Ésta es la versión “blurreada” de la concentración de *dye* ligado a Ca^{2+} . Teniendo $\overline{[Ca^{2+}]}(x, t)$ calculamos la probabilidad como función de x y t de que una molécula de *dye* se encuentre ligada a Ca^{2+} durante una señal de Ca^{2+} como $p = \frac{\overline{[Ca^{2+}]}(x, t)}{[D]_T}$.

Para comparar la distribución de *dye* ligado a Ca^{2+} obtenida en simulaciones que imitan las condiciones de los experimentos en presencia de la misma fuente puntual computamos el incremento relativo en \overline{CaD} :

$$\Delta[CaD]_R = \frac{\overline{[CaD]} - \overline{[CaD]}_b}{\overline{[CaD]}_b} \quad (\text{A.11})$$

donde \overline{CaD} se computa como en la Ec. A.10 y \overline{CaD}_b es la concentración de *dye* ligado a Ca^{2+} en condiciones basales. La amplitud de la señal simulada se define entonces como:

$$A = \max_t \left(\frac{\Delta \overline{[CaD]}}{\overline{[CaD]}_b(0, t)} \right) \quad (\text{A.12})$$

El decay time de la señal en la distribución de *dye* ligado a Ca^{2+} es computado del perfil temporal de $\Delta \overline{[CaD]}/\overline{[CaD]}_b$ en el origen (el sitio de liberación de Ca^{2+}) como el tiempo, t_D , tal que $\Delta \overline{[CaD]}/\overline{[CaD]}_b(0, t_D) = 0,1A$. El ancho se computa a partir del perfil espacial, $\Delta \overline{[CaD]}/\overline{[CaD]}_b(x, t_{max})$, obtenido para el tiempo, t_{max} , para el cual $\Delta \overline{[CaD]}/\overline{[CaD]}_b(0, t)$ es máximo como doble de la distancia, x , para la cual $\Delta \overline{[CaD]}/\overline{[CaD]}_b(x, t_{max}) = 0,5A$.

Usamos estas simulaciones también para evaluar el grado de acoplamiento entre *clusters* vecinos debido al CICR. Para tal fin calculamos la probabilidad, $P_0(t)$, de que un canal ubicado a una distancia, d , de la fuente puntual se abra antes de que haya transcurrido un tiempo, $t > 0$, desde el encendido de dicha fuente como:

$$P_0(d, \Delta t) = 1 - \exp\left(-\int_0^{\Delta t} k_{on}[Ca^{2+}](d, t) dt\right) \quad (\text{A.13})$$

donde $[[Ca^{2+}]](\mathbf{r}, t)$ es la concentración obtenida en las simulaciones y $k_{on} = 20\mu M^{-1} s^{-1}$ es la tasa a la que pega Ca^{2+} el sitio activador de un RIP_3 en el modelo de DeYoung-Keizer [Youngt, Keizer (1992)].

A.3. Simulaciones numéricas estocásticas

En esta Tesis realizamos dos tipos de simulaciones estocásticas que describen la dinámica del Ca^{2+} intracelular en dos escalas: por un lado, dentro de un *cluster* de RIP_3s , y, por el otro, entre *clusters*. Ambas involucran numerosas simplificaciones ya que no buscan describir la dinámica a lo largo de todo el tiempo sino sólo extraer información sobre el proceso de CICR entre RIP_3s de un *cluster* y entre *clusters*.

A.3.1. Dinámica del CICR dentro del *cluster*

Para simular la dinámica del CICR dentro de un *cluster* implementamos el método introducido en [Solovey et al. (2008)]. De este modo, consideramos al espacio como un paralelepípedo de lados $L_x = 2,7\mu\text{m}$, $L_y = 2,7\mu\text{m}$ y $L_z = 1,5\mu\text{m}$ con $z = 0$ el plano que representa la superficie de la membrana del RE. Suponemos que en ese plano hay un *cluster* circular de radio $R = 0,23\mu\text{m}$. Al inicio de cada simulación tomamos un número aleatorio, N_s , de una distribución de Poisson de valor medio $\langle N_s \rangle$ que asignamos al número de RIP_3s con IP_3 del *cluster*. Elegimos las ubicaciones de los N_s RIP_3s con IP_3 pegado usando una distribución uniforme sobre el *cluster*. Consideramos un modelo cinético en el cual los RIP_3s con IP_3 pegado pueden estar cerrados (C), abiertos (O) o inhibidos (I), con una probabilidad de transición por unidad de tiempo $K_{CO} = 20\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}[\text{Ca}^{2+}]$, $K_{OI} = 100\text{s}^{-1}$, $K_{OC} = 0$, $K_{IO} = 0$, $K_{IC} = 0$ y $K_{CI} = 0$. Con este modelo sólo podemos estudiar la primera “ola” de un proceso de CICR en el *cluster*. Es adecuado para estudiar las propiedades de eventos en los que no hay re-aperturas de un mismo canal, es decir, típicamente, *puffs*. Para determinar la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el *cluster* suponemos que cada RIP_3 abierto o recientemente cerrado suma a la $[\text{Ca}^{2+}]$ una función dependiente de la posición del RIP_3 que es constante en el primer caso y tiene una dependencia temporal pre-establecida en el segundo. Estas contribuciones fueron determinadas en [Solovey et al. (2008)] a partir de ajustar la distribución de Ca^{2+} obtenida en simulaciones del sistema de reacción-difusión para Ca^{2+} *dye* y EGTA con una fuente puntual de $0,1\text{pA}$, $[F4]_T = 40\mu\text{M}$ y distintos valores de $[E]_T$. Nosotros comprobamos que las mismas funciones ajustan muy bien las simulaciones realizadas con la misma fuente de calcio y las tres combinaciones de *dye* y EGTA exploradas en el Capítulo 3 donde se usan las simulaciones estocásticas que acá describimos. Entonces, para estudiar posibles diferencias en el CICR intra-*cluster* para los tres tipos de experimentos del Capítulo 3 realizamos simulaciones con tres valores distintos de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}$. Las simulaciones arrancan con $[\text{Ca}^{2+}] = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}$ y con todos los RIP_3s cerrados excepto uno que está abierto. La dinámica avanza con un paso temporal, $dt = 1\mu\text{s}$, usando el modelo cinético para decidir estocásticamente los estados de los receptores hasta un tiempo $t_{\text{final}} = 0,15\text{s}$. Para cada

simulación se hacen 100 realizaciones. Se obtiene el número de canales abiertos como función del tiempo, $N(t)$, y se determina su valor máximo $N_0 = \max_t(N(t))$. Mostramos histogramas de los valores N_0 que corresponden a las 100 realizaciones que corresponden a un dado $[Ca^{2+}]_{basal}$. Para permitir la comparabilidad usamos, para todas las combinaciones de parámetros explorados, la misma secuencia estocástica de distribución de RIP₃s con IP₃ pegado en el *cluster* y elegimos el mismo receptor para ser el primero en abrirse. Realizamos simulaciones con $[Ca^{2+}]_{basal} = 0,07, 0,1, 0,3 \mu M$

A.3.2. Dinámica del CICR entre *clusters*

Para estudiar la propagación de señales entre *clusters* utilizamos el código introducido en [Lopez et al. (2012)] pero partiendo de una situación en que todos los RIP₃s están cerrados. En este algoritmo se considera una región cuadrada de $2R$ de lado ($R = 10 \mu m$) y una distancia media, dm , entre *clusters*. Se elige después un número, N , de *clusters* con una distribución de Poisson de valor medio $\lambda_N = R^2/dm^2$. Los N *clusters* se distribuyen aleatoriamente con una probabilidad uniforme sobre el área cuadrada. Se elige a continuación el número de RIP₃s con IP₃ pegado en cada *cluster* usando una distribución de Poisson de valor medio N_{RIP3} y se descartan los *clusters* para los que este número es cero. Los valores, N_{RIP3} , asignados a cada *cluster* permanecen constantes a lo largo de la simulación. El modelo supone que los eventos de liberación son instantáneos lo que implica cierto límite a la resolución temporal de la descripción. El objetivo es determinar el número de *clusters* y de RIP₃s que participan de cada evento de liberación. La “baja” resolución temporal determina también que trabajemos en cada paso temporal con una $[Ca^{2+}]$ espacialmente uniforme. Esta distribución uniforme corresponde a la $[Ca^{2+}]$ entre eventos de propagación. Está implícito en el modelo que esta concentración se vuelve relativamente uniforme en escalas de tiempo menores a la resolución con la que describimos la dinámica del Ca^{2+} entre eventos. Modelamos el CICR como en [Solovey, Dawson (2010)] teniendo en cuenta la distancia entre los *clusters* con RIP₃s abiertos y aquéllos con RIP₃s que están cerrados pero no inactivos. En particular, cuando se abre un RIP₃ activo perteneciente a un *cluster* se abren todos los otros RIP₃s activos del mismo *cluster*. Después, dado que se abrió un cierto número de RIP₃s en un *cluster* se abren todos los RIP₃s activos de los *clusters* vecinos que se encuentran a una distancia que depende del número de RIP₃s abiertos del primer *cluster*. El cálculo supone que la separación media entre dos canales de un *cluster* es despreciable cuando se computa su contribución a la concentración de Ca^{2+} libre en la ubicación del *cluster* vecino y que, para todo tiempo, no hay diferencia en la $[Ca^{2+}]$ que sensa cada uno de los RIP₃s de esos *clusters* vecinos. Esta hipótesis se basa en la diferencia que se supone existe entre la extensión del *cluster* ($\sim 400nm$) y la distancia entre *clusters* ($\sim 1,4 - 2 \mu m$). Más

específicamente, teniendo en cuenta que el acoplamiento entre *clusters* se debe a los iones de Ca^{2+} que fluyen a través de los RIP_3s y que el Ca^{2+} difunde con un coeficiente de difusión efectivo, D , suponemos que si un *cluster* ubicado en la posición r_i pasa de estar cerrado a tener N_{oi} canales abiertos a un dado instante, la concentración de Ca^{2+} que “siente” un *cluster* ubicado en la posición, r_j , se incrementa en forma proporcional a $N_{oi}/(D|r_i - r_j|)$. Suponemos que el *cluster* ubicado en r_j comienza entonces a liberar Ca^{2+} (y, por lo tanto, participa del evento) si el valor de $[\text{Ca}^{2+}]$ que siente supera un cierto umbral y si hay dentro de él RIP_3s activos. La tasa a la que libera Ca^{2+} cada nuevo *cluster* es proporcional al número de RIP_3s activos que posee. La condición sobre el umbral es evaluada para todos los *clusters* hasta que se agotan todas las evaluaciones posibles. Eso define el tamaño del evento (es decir, el número de *clusters* y el de RIP_3s que participan del evento) además de la ubicación de los sitios de liberación. Una vez terminada la evaluación, todos los RIP_3s que participaron del evento pasan a estar inactivos. Se elige entonces el tiempo que cada uno de ellos permanecerá inactivo en forma aleatoria con una distribución exponencial de tiempo medio, $t_{inh} = 2,5S$ [Fraiman et al. (2006)]. De esta descripción se desprende que el algoritmo distingue entre RIP_3s activos e inactivos, que sólo los activos se pueden abrir durante una señal y que todos los que participan de un evento se inactivan inmediatamente después. Durante el tiempo entre señales, el número de RIP_3s inactivos va disminuyendo a medida que cada uno cumple con el tiempo de inactivación determinado con la distribución exponencial y la concentración de Ca^{2+} (que se supone espacialmente uniforme) va cambiando también. En esto se hace evidente la separación de escalas temporales implícita en el algoritmo con una dinámica rápida durante el pico de actividad y una recuperación lenta entre picos. Inmediatamente después de cada evento agregamos a la $[\text{Ca}^{2+}]$ (uniforme) inmediatamente anterior al evento una cantidad fija, espacialmente uniforme, por cada canal que participó del evento. Agregamos cantidades espacialmente uniformes bajo la hipótesis de que la difusión del Ca^{2+} ocurre lo suficientemente rápido como para que la $[\text{Ca}^{2+}]$ se vuelva aproximadamente uniforme en la vecindad de los *clusters* en una escala temporal que es mucho más corta que el tiempo de separación medio entre eventos [Fraiman et al. (2006)]. Para determinar la contribución fija de cada canal abierto a la $[\text{Ca}^{2+}]$ total razonamos del siguiente modo. Primero, suponemos que, mientras un RIP_3 está abierto, la corriente de Ca^{2+} es $I = 0,1pA$ y que el Ca^{2+} difunde en el citosol con $D = 200\mu\text{m}^2/s$ (aproximadamente el coeficiente de difusión libre) [Allbritton et al. (1992)]. De esta forma, cuando el canal está abierto agrega una contribución no uniforme $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ a la $[\text{Ca}^{2+}]$ previa que aproximamos con la solución estacionaria de la ecuación de difusión en presencia de una fuente puntual $2I$. Esto es, $\Delta[\text{Ca}^{2+}] \cong \beta I \mu\text{M} \mu\text{m}^3 / (4\pi D r)$ donde β es un factor de conversión y r es la distancia al canal abierto. Dados los valores considerados de I y D , resulta $\Delta[\text{Ca}^{2+}] \cong 0,414\mu\text{M} \mu\text{m} / (r)$. Luego, suponemos que la cantidad total, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$, contenida en un cilindro de altura h y radio R que encierra el área del RE mientras que

el RIP_3 está abierto puede aproximarse por $h \int_0^R \Delta[\text{Ca}^{2+}] 2\pi r dr = 2\pi h R 0,414 \mu M \mu m$ y que pasa a estar uniformemente distribuida en el mismo volumen cuando el RIP_3 se cierra. De este modo estimamos que la cantidad espacialmente uniforme con la que cada RIP_3 que participó de un evento contribuye a la $[\text{Ca}^{2+}]$ inmediatamente después haberse cerrado es $2\pi h R 0,414 \mu M \mu m / (h\pi R^2) = 0,828 \mu M \mu m / R = 0,0414 \mu M$. Entonces, luego de una señal de la cual participaron N_o RIP_3 s agregamos $N_o \cdot 0,0414 \mu M$ a la $[\text{Ca}^{2+}]$. Inmediatamente después, esta concentración decae exponencialmente en el tiempo hacia el valor basal con una tasa δ_{Ca} . El inicio de una nueva señal depende no solo del número de RIP_3 s con IP_3 pegado sino también de la $[\text{Ca}^{2+}]$. En particular, suponemos que la probabilidad por unidad de tiempo de que se abra un *cluster* con N_{act} RIP_3 s activos es $0,225 s^{-1} \cdot N_{act} \cdot [\text{Ca}^{2+}] / [\text{Ca}^{2+}]_{basal}$. De este modo la probabilidad por unidad de tiempo coincide con la determinada en [Fraiman et al. (2006)] cuando el Ca^{2+} se encuentra en su concentración basal. Una vez que el primer *cluster* se abre, la apertura de los otros *clusters* que participan de la señal es decidida como antes. En particular, un *cluster* abierto, k , con N_k canales activos induce la apertura de todos los otros *clusters* i , con $N_i > 0$ que satisfacen $N_{act} 0,0414 \mu M \mu m / d_{ik} + [\text{Ca}^{2+}] \geq 0,0414 \mu M \mu m / r_{inf} + [\text{Ca}^{2+}]_{basal}$ donde d_{ik} es la distancia entre los *clusters* i y k , $[\text{Ca}^{2+}]$ es la concentración citosólica inmediatamente antes de la señal y $r_{inf} = 0,25 \mu m$. La simulación se inicia en $t = 0$ cuando suponemos que todos los RIP_3 s están activos y que la $[\text{Ca}^{2+}]$ es la $[\text{Ca}^{2+}]_{basal} = 0,1 \mu M$.

Apéndice B

Modificación del microscopio para la fotólisis de compuestos enjaulados

Los sistemas de iluminación se encuentran conectados a la unidad de escaneo mediante fibras ópticas. En la modificación, se utiliza la misma lámpara de mercurio como luz UV para el mecanismo de fotolización. Tiene incorporados algunos elementos ópticos para dirigir la luz a un puerto SIM (SIMultaneous) (Figura B.1). El tamaño del haz de UV depende del diámetro de la fibra óptica y del aumento del objetivo. Está ajustado de forma que la iluminación sea homogénea en el plano que se desea escanear.



Figura B.1: Fotografía de la unidad espectral con las modificaciones.

La unidad de escaneo tiene un riel motorizado con 3 posiciones. En la primer posición hay un espejo dicroico que redirecciona la luz de la lámpara de mercurio para el modo de observar por fluorescencia convencional (la luz proveniente de la caja de láseres no puede pasar) (Figura B.2(a)). En la segunda posición no hay nada, de modo que la luz de la caja pasa pero la proveniente de la lámpara no (Figura B.2(b)). En la tercera posición se realizó la modificación colocando un espejo que refleja las longitudes de onda corta (< 450 nm) y transmite las largas (>450 nm) (Figura B.2(c)). De este modo, el rayo reflejado se puede utilizar para la fotólisis junto con los láseres para la adquisición.¹

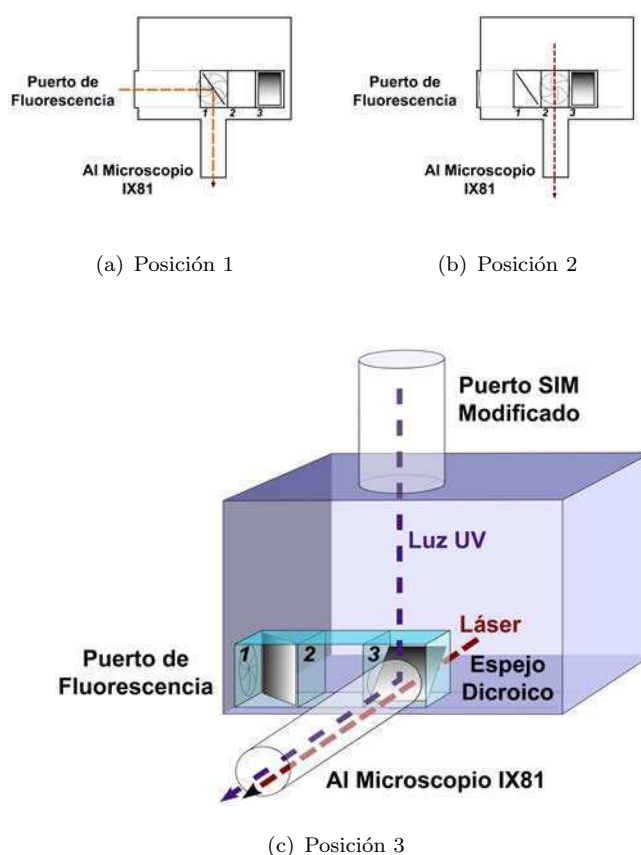


Figura B.2: Esquema de la modificación realizada en la unidad de escaneo.

Inmediatamente después de la lámpara y antes de la salida de la fibra óptica, se encuentran un obturador de velocidad rápida (Uniblitz) y una rueda motorizada con filtros neutros que pueden ser comandados desde el software de Olympus. Con el fin de controlar el tiempo de exposición a los pulsos de UV, tiene conectado al obturador un generador de pulsos que envía pulsos TTL de 5 volts con una duración desde 10ms con pasos de 10ms. Esta señal se conecta a una salida TTL que tiene el microscopio y es comandada con el software Olympus FW10-ASW mediante la ventana “time controller-[Sigaut et al. (2011)].

¹Imágenes extraídas de [Sigaut et al. (2011)]

Apéndice C

Protocolos utilizados en los ovocitos de rana de *Xenopus laevis*

C.1. Colagenización

Los ovocitos utilizados para los experimentos están previamente colagenizados por el grupo a cargo de Daniel Calvo en el INGEBI. Este método permite separarlos del tejido conectivo que los mantiene unidos en cada lóbulo. De esta forma, se consigue que queden aislados. Es importante mencionar que los ovocitos deben estar siempre en un medio acuoso, y para esto se utiliza la solución Ringer del Apéndice C.3 (Tabla C.2). Pueden conservarse en solución Barth (Tabla C.3) en una heladera a 17 ° C hasta 4 días.

El protocolo consiste de los siguientes pasos:

- Los lóbulos de ovocitos extraídos durante la cirugía deben entrar en contacto con solución Barth inmediatamente. Para ello, bajo la lupa, abrir (romper un sector del tejido conectivo) los lóbulos que se encuentren enteros con un juego de forceps minimizando el contacto con los ovocitos.
- Mantener los ovocitos a 18 ° C durante dos horas.
- Preparar en un tubo Falcon de 50 ml aproximadamente 15 ml de solución de colagenasa 400 Uxml de acuerdo a la siguiente fórmula: $masaColagenasa(mg) =$

$\frac{400U*15ml*mg}{actividad(U)*ml}$ donde masaColagenasa representa los mg de colagenasa que se deben disolver en 15 ml de solución de colagenización 1X (solución sin calcio) (Tabla C.1). En caso de colagenizar más de dos lóbulos, preparar 30 ml ajustando la masa adecuadamente.

- Agregar a la solución de colagenasa los ovocitos a colagenizar. Inmediatamente comenzar la agitación en un ambiente refrigerado (17-22) ° C durante 4 horas.
- Realizar al menos 4 lavados de los ovocitos con sc. de colagenización sin calcio. Dejar reposar el tubo en posición vertical durante 30 s para que los ovocitos se sedimenten, y descartar la mayor fracción posible de sobrenadante. Inmediatamente después agregar más solución de lavado (al menos 15 ml).
- Repetir la operación con dos lavados solución Barth.
- Luego del último descarte, volcar los ovocitos en una caja de Petri conteniendo sc. Barth.
- Guardar en incubadora (17-19) ° entre 12 y 30 horas.
- Si es necesario mantener ovocitos sin colagenizar para ser utilizados en días posteriores, los lóbulos deben conservarse en una caja de Petri con Barth en heladera.

Compuesto	C _{stock} [mM]	MW	Masa por litro de stock 10X [g]
NaCl	96,0	58,4	56,1
KCl	2,0	74,6	1,5
MgCl ₂ -6H ₂ O	5,0	203,3	10,2
HEPES	5,0	238,3	11,9

Tabla C.1: Solución de colagenización.

C.2. Microinyección

El primer paso de la microinyección consiste en preparar las micropipetas que se colocan en el microinyector. Se utiliza un puller para manipular los capilares de vidrio. El mecanismo mediante el cual se obtienen es calentando un punto del capilar y estirando desde el extremo inferior mediante unas pesas. De esta forma, el vidrio se va estirando hasta llegar a ser lo suficientemente fino y se rompe con precisión en el punto de calentamiento. Resulta natural tomar como punto de calentamiento la mitad del capilar, de forma que queden dos pipetas de tamaños semejantes.

Una vez obtenidas, se corta la punta de la pipeta bajo un microscopio Olympus SZ51 utilizando una pinza fórceps. De esta forma, se consigue que una solución pueda entrar y salir.

Se llena la pipeta con un aceite mineral (u otro fluido incompresible) y se monta en la aguja del extremo del microinyector, ajustándola con un anillo giratorio. Hay que tener cuidado con que no quede ninguna burbuja de aire porque se puede dañar el aparato. Se vacía un poco la pipeta apretando el botón descarga para que pueda entrar otra sustancia. Se utiliza un microinyector automático que varía el volumen de microinyección desde 2.3 nl hasta un máximo de 69.0 nl, aumentando de a pasos discretos de acuerdo a una configuración de llaves variable. Dispone de dos velocidades de inyección, lenta y rápida.

Luego se arma una gota con la solución previamente preparada y, metiendo la punta de la pipeta dentro, se carga la pipeta con el botón de carga que mueve el motor mecánico. Este procedimiento también se realiza bajo la lupa para asegurarse que la punta de la pipeta esté dentro de la gota durante todo el tiempo que se carga la solución.

El volumen de microinyección está previamente fijado para obtener las concentraciones deseadas en el ovocito. La microinyección se realiza en la línea que separa el lado animal del vegetal, y procurando no penetrar demasiado profundo para no llegar al núcleo (nuevamente para la optimización del procedimiento se utiliza el microscopio). Cuando se saca la pipeta del interior, se hace con cuidado para no dañar al ovocito. Un movimiento brusco puede generar la ruptura de su estructura. Para colocar los ovocitos en solución es conveniente utilizar un recipiente de no más de 1 cm de altura (para que se pueda manipular el microinyector con mayor libertad) y con un cuadrulado que facilite a que el ovocito se mueva lo menos posible. Al finalizar, se colocan en un vial de vidrio con solución Barth en una heladera a 17 ° C y se dejan reposar aproximadamente durante 30 minutos.

C.3. Soluciones utilizadas

Las soluciones utilizadas para manipular los ovocitos se muestran en las Tablas C.2 y C.3

Compuesto	C_{stock} [mM]	MW	Masa por litro de stock 1X [mgr]
NaCl	120	58,4	7013
KCl	2,0	74,6	149
CaCl ₂ -2H ₂ O	1,8	147	265
HEPES	5,0	238	1192

Tabla C.2: Solución Ringer preparada para trabajar con las células.

Compuesto	C_{stock} [mM]	MW	Masa por litro de stock 1X [mgr]
NaCl	88	58,4	5143
KCl	1,0	74,6	74,6
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,4	147	60,3
NaHCO ₃	2,4	247	202
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,8	236	202
Ca(NO ₃) ₂ -4H ₂ O	0.33	238.6.15	77.9
HEPES	5	238.30	1192

Tabla C.3: Solución Barth preparada para conservar las células.

A la solución de la Tabla C.3 se le agregó 0.5 mg/ml de gentamicina en solución 1 X.

Apéndice D

Intervalos de confianza de los ajustes

Ajustes e intervalos de confianza para los parámetros del ajuste.

D.1. Capítulo 3

Experimentos Tipo I: Variabilidad de la fluorescencia dentro de un ovocito.

$$\sigma_F^2 = a\langle F \rangle + b$$

Experimentos Tipo II: Variabilidad de la fluorescencia con la intensidad del láser.

$$\sigma_F^2 = a\langle F \rangle^2 + b\langle F \rangle + c$$

Experimentos Tipo III: Variabilidad de la fluorescencia con la concentración de calcio citosólica.

$$\sigma_F^2 = a\langle F \rangle + b$$

Figura 2.2

(A)

$$a = 4,77 (4,37; 5,18)$$

$$b = 7,05 (0,13; 13,97)$$

(B)

$$a = 0,044 (0,037; 0,051)$$

$$b = 5(\text{fijo})$$

$$c = 0(\text{fijo})$$

(C)

fluorescencias altas

$$a = 7,27 (6,76; 7,78)$$

$$b = -31,04 (-47,65; -14,43)$$

Figura 2.3

(A)

$$a = 5,80 (5,50; 6,10)$$

$$b = -4,77 (-9,93; 0,39)$$

(B)

$$a = 0,011 (0,005; 0,017)$$

$$b = 6,21 (5,81; 6,61)$$

$$c = -4,34 (-8,20; -0,47)$$

Figura 2.4

(A)

$$a = 6,23 (5,55; 6,92)$$

$$b = 1,20 (-22,59; 25,00)$$

(B)

$$a = 0,029 (0,027; 0,031)$$

$$b = 6,02 (5,46; 6,58)$$

$$c = -15,7 (-33,7; 3,53)$$

(C)

fluorescencias altas

$$a = 8,17 (7,44; 8,92)$$

$$b = -85 \text{ } (-128; -42)$$

D.2. Capítulo 6

Ovocito inmaduro.

$$F = a \cdot e^{b \cdot t} + c \cdot e^{d \cdot t}$$

Parámetro	Pulso 1	Pulso 2
a	1800 (1267; 2333)	$2,0 \cdot 10^{12}$ ($1,8 \cdot 10^{12}$; $2,1 \cdot 10^{12}$)
b	-0,1869 (-0,1994; -0,1743)	-0,1384 (-0,1488; -0,1281)
c	40,38 (37,32; 43,43)	1150 (54; 2050)
d	-0,0305 (-0,0319; -0,02907)	-0,0225 (-0,0251; -0,0163)

Tabla D.1: Valores de los parámetros del ajuste bi-exponencial en los decaimientos de la fluorescencia cuando se envían los dos pulsos de la Fig. 5.3A.

Parámetro	Pulso 1	Pulso 2
a	2073 (860; 3287)	$2,18 \cdot 10^{12}$ ($-8,31 \cdot 10^{12}$; $1,27 \cdot 10^{13}$)
b	-0,184 (-0,209; -0,159)	-0,135 (-0,161; -0,109)
c	41,7 (35,01; 48,39)	301,1 (-130,7; 732,8)
d	-0,0271 (-0,0301; -0,0241)	-0,0157 (-0,0222; -0,0092)
a	4020 (-3637; $1,17 \cdot 10^4$)	0
b	-0,2356 (-0,3115; -0,1597)	-0,2326
c	57,27 (46,78; 67,75)	$8,5 \cdot 10^4$ ($1,8 \cdot 10^4$; $1,5 \cdot 10^5$)
d	-0,0402 (-0,0439; -0,0366)	-0,043 (-0,047; -0,040)

Tabla D.2: Valores de los parámetros del ajuste bi-exponencial en los decaimientos de la fluorescencia en dos subregiones del ovocito de la Fig. 5.4A.

Ovocito maduro.

$$F = p \cdot t + q$$

Parámetro	Pulso 1	Pulso 2
p	-0,1416 (-0,1439; -0,1393)	-0,1484 (-0,1509; -0,1460)
q	11,62 (11,51; 11,74)	27,01 (26,65; 27,38)

Tabla D.3: Valores de los parámetros del ajuste lineal en los decaimientos de la fluorescencia cuando se envían los dos pulsos de la Fig. 5.3B.

Parámetro	Pulso 1	Pulso 2
p	-0,1937 (-0,1963; -0,1912)	-0,2047 (-0,2080; -0,2014)
q	16,05 (15,92; 16,18)	37,15 (36,66; 37,64)
p	-0,173 (-0,176; -0,169)	-0,1794 (-0,1834; -0,1754)
q	14,12 (13,94; 14,30)	37,70 (33,11; 33,30)

Tabla D.4: Valores de los parámetros del ajuste lineal en los decaimientos de la fluorescencia en dos subregiones del huevo de la Fig.. 5.4B.

Apéndice E

Abreviaturas utilizadas

IP ₃	Inositol (1,4,5)-trifosfato
RIP ₃	Canal receptor de IP ₃
RE	Retículo endoplasmático
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
BAPTA	1,2-Bis(o-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
CICR	Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺
SW	Indicador Single-Wavelength
GVBD	Ruptura de la vesícula germinal
F4	Fluo-4
R2	Rhod-2
E	EGTA
CaF4	Fluo-4 unido a Ca ²⁺
CaR2	Rhod-2 unido a Ca ²⁺
CaE	EGTA unido a Ca ²⁺
[Ca ²⁺]	Concentración Ca ²⁺
[Ca ²⁺] _{basal}	Concentración basal de Ca ²⁺

Bibliografía

- Adams S R, , Tsien R Y.* Controlling Cell Chemistry with Caged Compounds // Annual Review of Physiology. 1993. 55, 1. 755–784. PMID: 8466191.
- Akwasaki Minta Joseph P. Y. Kao, Tsien Roger Y.* Fluorescent Indicators cytosolic calcium // The Journal of biological chemistry. 1989. 264, 14. 8171–8178.
- Alberts Bruce., Wilson John., Hunt Tim.* Molecular biology of the cell. New York: Garland Science, 2008.
- Allbritton Nancy L, Meyer Tobias, Stryer Lubert.* Range of messenger action of calcium ion and inositol 1, 4, 5-trisphosphate // SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-. 1992. 258. 1812–1812.
- Berridge M J, Bootman M D, Lipp P.* Calcium - a life and death signal. // Nature. 1998. 395, 6703. 645–8.
- Bridge John H. B., Ershler Philip R., Cannell Mark B.* Properties of Ca²⁺ sparks evoked by action potentials in mouse ventricular myocytes // The Journal of Physiology. 1999. 518, 2. 469–478.
- Brochet Didier X P, Yang Dongmei, Di Maio Alessandro, Lederer W Jonathan, Franzini-Armstrong Clara, Cheng Heping.* Ca²⁺ blinks: rapid nanoscopic store calcium signaling. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005. 102, 8. 3099–3104.
- Bruno Luciana, Solovey Guillermo, Ventura Alejandra C., Dargan Sheila, Dawson Silvana Ponce.* Quantifying calcium fluxes underlying calcium puffs in *Xenopus laevis* oocytes // Cell Calcium. 2010. 47, 3. 273–286.
- Busa W B, Ferguson J E, Joseph S K, Williamson J R, Nuccitelli R.* Activation of frog (*Xenopus laevis*) eggs by inositol trisphosphate. I. Characterization of Ca²⁺ release from intracellular stores. // The Journal of Cell Biology. 1985. 101, 2. 677–682.

- Callamaras N, Parker I.* Radial localization of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} release sites in *Xenopus* oocytes resolved by axial confocal linescan imaging. // *The Journal of general physiology.* 1999. 113, 2. 199–213.
- Callamaras Nick, Marchant Jonathan S., Sun Xiao Ping, Parker Ian.* Activation and co-ordination of InsP_3 -mediated elementary Ca^{2+} events during global Ca^{2+} signals in *Xenopus* oocytes // *Journal of Physiology.* 1998. 509, 1. 81–91.
- Cao Pengxing, Donovan Graham, Falcke Martin, Sneyd James.* A stochastic model of calcium puffs based on single-channel data // *Biophysical Journal.* 2013. 105, 5. 1133–1142.
- Cheng Heping, Lederer WJ, Cannell Mark B.* Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle // *Science.* 1993. 262, 5134. 740–744.
- Choe Chi-Un, Ehrlich Barbara E.* The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork. // *Science's STKE : signal transduction knowledge environment.* 2006. 2006, 363. re15.
- Dalal Rooshin B, Digman Michelle A, Horwitz Alan F, Vetri Valeria, Gratton Enrico.* Determination of particle number and brightness using a laser scanning confocal microscope operating in the analog mode // *Microscopy Research and Technique.* I 2008. 71, 1. 69–81.
- Dargan Sheila L, Parker Ian.* Buffer kinetics shape the spatiotemporal patterns of IP3-evoked Ca^{2+} signals. // *The Journal of physiology.* 2003. 553, Pt 3. 775–788.
- Dargan Sheila L, Schwaller Beat, Parker Ian.* Spatiotemporal patterning of IP3-mediated Ca^{2+} signals in *Xenopus* oocytes by Ca^{2+} -binding proteins. // *The Journal of physiology.* 2004. 556, Pt 2. 447–461.
- Dargan SheilaL., Demuro Angelo, Parker Ian.* Imaging Ca^{2+} Signals in *Xenopus* Oocytes // *Xenopus Protocols SE - 8.* 322. 2006. 103–119. (*Methods in Molecular Biology*TM).
- Dawson Silvina Ponce, Keizer Joel, Pearson John E.* Fire–diffuse–fire model of dynamics of intracellular calcium waves // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999. 96, 11. 6060–6063.
- Demuro Angelo, Parker Ian.* “optical patch-clamping”: single-channel recording by imaging Ca^{2+} flux through individual muscle acetylcholine receptor channels. // *The Journal of general physiology.* 2005. 126, 3. 179–192.

- Diambra Luis, Marchant Jonathan S.* Localization and socialization: Experimental insights into the functional architecture of IP3 receptors // *Chaos*. 2009. 19, 3.
- Diambra Luis, Marchant Jonathan S.* Inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor microarchitecture shapes Ca²⁺ puff kinetics // *Biophysical Journal*. 2011. 100, 4. 822–831.
- Dickinson George D, Parker Ian.* Factors determining the recruitment of inositol trisphosphate receptor channels during calcium puffs // *Biophysical journal*. 2013. 105, 11. 2474–2484.
- Digman Michelle a, Dalal Rooshin, Horwitz Alan F, Gratton Enrico.* Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope. // *Biophysical journal*. 2008. 94, 6. 2320–2332.
- El-Jouni Wassim, Jang Byungwoo, Hawn Shirley, Machaca Khaled.* Calcium signaling differentiation during *Xenopus* oocyte maturation // *Developmental biology*. 2005. 288, 2. 514–525.
- Eppig John J., Dumont James N.* Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) // *Developmental Biology*. 1974. 36, 2. 330–342.
- Fontanilla Ray A, Nuccitelli Richard.* Characterization of the sperm-induced calcium wave in *Xenopus* eggs using confocal microscopy // *Biophysical journal*. 1998. 75, 4. 2079–2087.
- Foskett J Kevin, White Carl, Cheung King-ho, Mak Don-on Daniel.* Inositol Trisphosphate Receptor Ca²⁺ Release Channels // *Physiological Reviews*. 2007. 87, 2. 593–658.
- Fraiman Daniel, Dawson Silvina Ponce.* Buffer regulation of calcium puff sequences // *Physical Biology*. 2014. 11, 1. 016007.
- Fraiman Daniel, Pando Bernardo, Dargan Sheila, Parker Ian, Dawson Silvina Ponce.* Analysis of puff dynamics in oocytes: interdependence of puff amplitude and interpuff interval. // *Biophysical journal*. 2006. 90, 11. 3897–3907.
- Gallo Christopher J, Hand Arthur R, Jones TL, Jaffe Laurinda A.* Stimulation of *Xenopus* oocyte maturation by inhibition of the G-protein alpha S subunit, a component of the plasma membrane and yolk platelet membranes. // *The Journal of cell biology*. 1995. 130, 2. 275–284.
- Grafton G., Thwaite L.* Calcium channels in lymphocytes // *Immunology*. 2001. 104, 2. 119–126.

- Homa ST, Carroll J, Swann K.* Fertilization and early embryology: The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation // *Human Reproduction*. 1993. 8, 8. 1274–1281.
- Izu L T, Mauban J R, Balke C W, Wier W G.* Large currents generate cardiac Ca²⁺ sparks. // *Biophysical journal*. 2001. 80, 1. 88–102.
- Keener J P, Sneyd J.* *Mathematical Physiology*. 1998. (Interdisciplinary applied mathematics).
- Lechleiter James D., Clapham David E.* Molecular mechanisms of intracellular calcium excitability in *X. laevis* oocytes // *Cell*. 1992. 69, 2. 283 – 294.
- Lopez Lucía, Piegari Estefanía, Sigaut Lorena, Dawson Silvina Ponce.* Intracellular calcium signals display an avalanche-like behavior over multiple lengthscales // *Frontiers in Physiology*. 2012. 3 SEP, September. 1–13.
- Lopez Lucia, Sigaut Lorena, Dawson Silvina Ponce.* Observing the Dynamics of Luminal and Cytosolic Calcium During IP₃R-Mediated Calcium Signals // *Biophysical Journal*. I 2014. 106, 2. 531a–532a.
- Machaca Khaled.* Increased sensitivity and clustering of elementary Ca²⁺ release events during oocyte maturation // *Developmental biology*. 2004. 275, 1. 170–182.
- Machaca Khaled, Haun Shirley.* Induction of maturation-promoting factor during *Xenopus* oocyte maturation uncouples Ca²⁺ store depletion from store-operated Ca²⁺ entry // *The Journal of cell biology*. 2002. 156, 1. 75–86.
- Machaca Khaled, Qu Zhiqiang, Kuruma Akinori, Hartzell H Criss, McCarty Nael.* The endogenous calcium-activated Cl channel in *Xenopus* oocytes: a physiologically and biophysically rich model system // *Calcium-Activated Chloride Channels*. 2001. 3–39.
- Mak Don-On Daniel, McBride Sean, Foskett J Kevin.* Inositol 1,4,5-tris-phosphate activation of inositol tris-phosphate receptor Ca²⁺ channel by ligand tuning of Ca²⁺ inhibition // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. XII 1998. 95, 26. 15821–15825.
- Marchant J S, Parker I.* *Xenopus tropicalis* oocytes as an advantageous model system for the study of intracellular Ca(2+) signalling. // *British journal of pharmacology*. 2001a. 132, 7. 1396–1410.
- Marchant Jonathan, Callamaras Nick.* Initiation of IP₃ -mediated Ca²⁺ waves in // *The EMBO journal*. 1999. 18, 19. 5285–5299.

- Marchant Jonathan S, Parker Ian.* Role of elementary Ca²⁺ puffs in generating repetitive Ca²⁺ oscillations // *EMBO Journal*. 2001b. 20, 1. 65–76.
- Nuccitelli Richard., Biology. American Society for Cell.* A practical guide to the study of calcium in living cells. San Diego, 1994.
- Pantazaka Evangelia, Taylor Colin W.* Differential distribution, clustering, and lateral diffusion of subtypes of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor // *Journal of Biological Chemistry*. 2011. 286, 26. 23378–23387.
- Paredes R Madelaine, Etzler Julie C, Watts Lora Talley, Zheng Wei, Lechleiter James D.* Chemical calcium indicators. // *Methods (San Diego, Calif.)*. XI 2008. 46, 3. 143–51.
- Parker I, Yao Y, Ilyin V.* Fast kinetics of calcium liberation induced in *Xenopus* oocytes by photoreleased inositol trisphosphate. // *Biophysical journal*. 1996a. 70, 1. 222–237.
- Parker Ian, Choi John, Yao Yong.* Elementary events of InsP₃-induced Ca²⁺ liberation in *Xenopus* oocytes: Hot spots, puffs and blips // *Cell Calcium*. 1996b. 20, 2. 105–121.
- Parker Ian, Yao Yong.* Regenerative Release of Calcium from Functionally Discrete Subcellular Stores by Inositol Trisphosphate // *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. XII 1991. 246, 1317. 269–274.
- Pawley James B.* Fundamental limits in confocal microscopy // *Handbook of biological confocal microscopy*. 2006. 20–42.
- Petráň Mojmír, Hadravský Milan, Egger M David, Galambos ROBERT.* Tandem-scanning reflected-light microscope // *JOSA*. 1968. 58, 5. 661–664.
- Piegari Estefanía, Lopez Lucía, Perez Ipiña Emiliano, Ponce Dawson Silvina.* Fluorescence fluctuations and equivalence classes of Ca²⁺ imaging experiments // *PLoS ONE*. 2014. 9, 4.
- Piegari Estefania, Lopez Lucia, Sigaut Lorena, Ponce Dawson Silvina.* Studying Calcium Signal Reshaping by Buffers Observing the Competition of Two Dyes // *Biophysical Journal*. 2012. 102, 3. 310a.
- Piegari Estefanía, Sigaut Lorena, Ponce Dawson Silvina.* Ca²⁺ images obtained in different experimental conditions shed light on the spatial distribution of IP₃ receptors that underlie Ca²⁺ puffs // *Cell Calcium*. 2015. 57, 2. 109–119.
- Ramón Latorre, José López-Barneo, Francisco Bezanilla Rodolfo Llinás.* BIOFÍSICA Y FISIOLÓGÍA CELULAR. 1996. Universida.

- Ríos E, Stern M D, González A, Pizarro G, Shirokova N.* Calcium release flux underlying Ca²⁺ sparks of frog skeletal muscle. // *The Journal of general physiology.* 1999. 114, 1. 31–48.
- Shuai Jianwei, Rose Heather J, Parker Ian.* The number and spatial distribution of IP₃ receptors underlying calcium puffs in *Xenopus* oocytes. // *Biophysical journal.* 2006. 91, 11. 4033–4044.
- Sigaut Lorena, Barella Mariano, Espada Rocío, Ponce María Laura, Dawson Silvina Ponce.* Custom-made modification of a commercial confocal microscope to photolyze caged compounds using the conventional illumination module and its application to the observation of Inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signals. // *Journal of biomedical optics.* 2011. 16, 6. 066013.
- Smith G D, Keizer J E, Stern M D, Lederer W J, Cheng H.* A simple numerical model of calcium spark formation and detection in cardiac myocytes. // *Biophysical journal.* 1998. 75, 1. 15–32.
- Smith Ian, Swaminathan Divya, Parker Ian.* Imaging the motility of inositol trisphosphate receptors in intact mammalian cells using single particle tracking photoactivated localization microscopy (sptPALM) // *Proceedings of The Physiological Society.* 2013.
- Smith Ian F, Parker Ian.* Imaging the quantal substructure of single IP₃R channel activity during Ca²⁺ puffs in intact mammalian cells. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009. 106, 15. 6404–6409.
- Smith Ian F, Wiltgen Steven M, Shuai Jianwei, Parker Ian.* Ca²⁺ originate from pre-established stable clusters of inositol trisphosphate receptors // *Sci Signal.* 2010. 2, 98.
- Soeller Christian, Cannell Mark B.* Estimation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release flux underlying Ca²⁺ sparks. // *Biophysical journal.* 2002. 82, 5. 2396–2414.
- Solovey G., Fraiman D., Pando B., Ponce Dawson S.* Simplified model of cytosolic Ca²⁺ dynamics in the presence of one or several clusters of Ca²⁺-release channels // *Phys. Rev. E.* Oct 2008. 78. 041915.
- Solovey Guillermo, Dawson Silvina Ponce.* Intra-cluster percolation of calcium signals // *PLoS ONE.* 2010. 5, 2. 1–8.
- Solovey Guillermo, Fraiman Daniel, Dawson Silvina Ponce.* Mean field strategies induce unrealistic non-linearities in calcium puffs // *Frontiers in Physiology.* 2011. 2 AUG, August. 1–11.

- Sun Lu, Machaca Khaled.* Ca²⁺ cyt negatively regulates the initiation of oocyte maturation // *The Journal of cell biology.* 2004. 165, 1. 63–75.
- Sun Lu, Yu Fang, Ullah Aman, Hubrack Satanay, Daalis Arwa, Jung Peter, Machaca Khaled.* Endoplasmic reticulum remodeling tunes IP 3-dependent Ca²⁺ release sensitivity // *PLoS One.* 2011. 6, 11. e27928.
- Sun Xiao Ping, Callamaras Nick, Marchant Jonathan S., Parker Ian.* A continuum of InsP₃-mediated elementary Ca²⁺ signalling events in *Xenopus* oocytes // *Journal of Physiology.* 1998. 509, 1. 67–80.
- Swillens S, Dupont G, Combettes L, Champeil P.* From calcium blips to calcium puffs: theoretical analysis of the requirements for interchannel communication. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999. 96, 24. 13750–13755.
- Takahashi a, Camacho P, Lechleiter J D, Herman B.* Measurement of intracellular calcium. // *Physiological reviews.* 1999. 79, 4. 1089–1125.
- Taufiq-Ur-Rahman , Skupin Alexander, Falcke Martin, Taylor Colin W.* Clustering of InsP₃ receptors by InsP₃ retunes their regulation by InsP₃ and Ca²⁺ // *Nature.* IV 2009. 458, 7238. 655–659.
- Terasaki Mark, Runft Linda L, Hand Arthur R.* Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *xenopus* oocyte maturation and activation // *Molecular Biology of the Cell.* 2001. 12, 4. 1103–1116.
- Ventura Alejandra C, Bruno Luciana, Demuro Angelo, Parker Ian, Dawson Silvina Ponce.* A model-independent algorithm to derive Ca²⁺ fluxes underlying local cytosolic Ca²⁺ transients. // *Biophysical journal.* 2005. 88, 4. 2403–2421.
- Wilson Tony, Sheppard Colin, Jovanovich Harcourt Brace.* Theory and practice of scanning optical microscopy. 180. 1984.
- Wiltgen Steven M., Smith Ian F., Parker Ian.* Superresolution localization of single functional IP₃R channels utilizing Ca²⁺ flux as a readout // *Biophysical Journal.* 2010. 99, 2. 437–446.
- Yamashita Masakane, Mita Koichi, Yoshida Noriyuki, Kondo Tomoko.* Molecular mechanisms of the initiation of oocyte maturation: general and species-specific aspects // *Progress in cell cycle research.* 2000. 115–129.
- Yao Y, Choi J, Parker I.* Quantal puffs of intracellular Ca²⁺ evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes. // *The Journal of physiology.* 1995. 482 (Pt 3. 533–553.
- Youngt Gary W D E, Keizer Joel.* A single pool // *Nature.* 1992. 89, October. 9895–9899.