Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Cuantificación del transporte que subyace a las señales intracelulares de calcio

Villaruel, Cecilia Liliana

2018-03-27

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:
Villaruel, Cecilia Liliana. (2018-03-27). Cuantificación del transporte que subyace a las señales intracelulares de calcio. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Villaruel, Cecilia Liliana. "Cuantificación del transporte que subyace a las señales intracelulares de calcio". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018-03-27.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Cuantificación del transporte que subyace a las señales intracelulares de calcio

por

Cecilia L. Villarruel

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en
el área de Cs. Biológicas

Director de Tesis: Silvina Ponce Dawson

Consejero de Estudios: Dr. Marcelo Rubinstein

Lugar de Trabajo: IFIBA UBA-CONICET

Buenos Aires, 2018

Fecha de Defensa: 27 de marzo de 2018

Resumen

El Ca^{2+} es un mensajero intracelular ubicuo. Está involucrado en la regulación de diferentes procesos, desde la fecundación hasta la muerte celular, pasando por la diferenciación celular, contracción muscular y muchos otros. La versatilidad y universalidad del Ca^{2+} como agente señalizador se basa en la diversidad de distribuciones espacio-temporales que su concentración puede desplegar dentro de las células. Para generar e interpretar la enorme variedad de señales de Ca^{2+} observadas las células cuentan con mecanismos que sensan la concentración de este ión e intervienen en su homeostasis. Se supone entonces que la información está codificada en la dinámica de la distribución de Ca^{2+}. Una comprensión profunda de las señales requiere por lo tanto identificar las distribuciones que pueden ocurrir, cómo las mismas son moduladas por distintos factores y la respuesta final que pueden inducir en cada tipo celular específico.

Una descripción abarcadora de las señales de calcio, que involucran un amplio rango de escalas espaciales y temporales, requiere necesariamente de una combinación de observación y modelado matemático. Para que esta combinación sea útil es necesario contar con valores confiables (idealmente, medidos *in situ*) de los parámetros biofísicos que caracterizan a los procesos que determinan la dinámica espacio-temporal del calcio intracelular. En particular, es de vital interés conocer el coeficiente de difusión del Ca^{2+} dentro de las células y cómo dicho transporte es afectado por la presencia de *buffers* (típicamente proteínas) que reaccionan con él alterando su concentración y su dinámica. La tasa de transporte intracelular del ión y la "capacidad buffering" del medio son fundamentales para determinar el alcance de las señales.

Los experimentos ópticos proveen una herramienta poco invasiva para observar las señales en células intactas. Una de las técnicas ópticas ampliamente utilizada para

estudiar coeficientes de difusión es la Espectroscopía por Correlación de Fluorescencia (FCS, *Fluorescence Correlation Spectroscopy*), junto con microscopía confocal. FCS utiliza el análisis estadístico de las fluctuaciones en la fluorescencia de un sistema a fin de obtener información de los procesos que generan dichas fluctuaciones. Para esto se calcula la función de autocorrelación (ACF) de las fluctuaciones en la fluorescencia, la información de las escalas temporales características de los procesos subyacentes se encuentra en el decaimiento de la correlación. Sin embargo, la aplicación de esta técnica para estudiar la difusión intracelular del Ca^{2+} no es directa por dos motivos. En primer lugar, para estudiar al Ca^{2+} mediante microscopía de fluorescencia se utilizan sustancias que reaccionan con el Ca^{2+} y, al hacerlo, modifican sus propiedades espectrales, ya sea modificando el rango de longitudes de onda de excitación y emisión o aumentando significativamente su emisión. En segundo lugar, dentro de la célula existen sustancias, típicamente proteicas, llamadas *buffers* que reaccionan con el Ca^{2+} y modifican su tasa de transporte. Entonces el transporte de Ca^{2+} dentro de la célula está determinado por procesos difusivos y de reacción. Este tipo de transporte puede describirse mediante coeficientes de difusión efectivos que tienen información sobre ambos procesos. Por otro lado, para extraer información confiable de este tipo de experimentos es sumamente importante contar con un modelo adecuado para la interpretación de los datos. Usualmente, bajo ciertas aproximaciones es posible obtener expresiones analíticas para la función de autocorrelación. Dichas aproximaciones se basan en ciertos supuestos sobre los que hay que ser muy cuidadosos.

En este trabajo de tesis doctoral nos centramos en la estimación de ciertos parámetros biofísicos subyacentes al transporte intracelular de Ca^{2+}, utilizando como sistema modelo ovocitos de *Xenopus laevis*. En primer lugar analizamos la teoría detrás de las aproximaciones empleadas para el análisis de mediciones de FCS en sistemas similares al aquí empleado. Determinamos los límites de estas aproximaciones y qué parámetros sería posible estimar. En segundo lugar, estudiamos el coeficiente de difusión del Ca^{2+} y de un *buffer* "colectivo" en el citosol y en el lumen del retículo endoplasmático de ovocitos de *X. laevis*, teniendo en cuenta las

consideraciones discutidas en la primer parte respecto de los modelos empleados para la interpretación de los datos.

Palabras claves: dinámica de calcio, procesos de difusión y reacción, espectroscopía por correlación de fluorescencia.

Quantification of the transport underlying intracellular calcium signals

Abstract

Calcium (Ca^{2+}) is an ubiquitous intracellular messenger. It is involved in the regulation of diverse biological processes, such as fertilization, cell diferentiation, muscle contraction, cell death, and many others. The versatility and universality of Ca^{2+} as a signalling agent is based on the great diversity of spatio-temporal distribution that its concentration can display inside cells. To generate and interpret the enormous variety of observed Ca^{2+} signals, cells employ mechanisms that sens and control Ca^{2+} homeostasis. It is supposed that the information is encoded in the Ca^{2+} distribution dynamics. A deep comprehension of calcium signals needs to identify what kind of distributions can be achieved, how they are modulated and the final answer that can be induced in each specific cell types.

Calcium signals involve a wide range of spatial and temporal scales, a comprehensive description necessarily requires a combination of experiments and mathematical modeling. For this combination to be usefull, it is necessary to have reliable estimates, ideally obtained *in situ*, of the biophysical parameters that characterize the processes that determine the spatio-temporal dynamic of intracellular calcium. In particular, it is key to know the Ca^{2+} coefficient diffusion inside cells and how its transport is affected by the presence of buffers, tipically protein, that react with Ca^{2+} modifying its transport and concentration. The intracellular transport rate of Ca^{2+} and the buffering capacity of the media are fundamental to determine the extent of the signals.

Optical techniques have provided a non-invasive means to study intracellular calcium signals in intact cells. Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) in combination with confocal microscopy is an optical technique that have been widely used to estimate diffusion coefficients. FCS uses statistical analysis of the fluctuations of fluorescence in a system in order to derive information of the processes underlying such fluctuations. To this end, the autocorrelation function (ACF) of fluctuation

in fluorescence is computed, the decay of the correlation carries information on the characteristic time scales of the underlying biophysical processes.

However, the direct application of this technique to the case of Ca^{2+} transport in intact cells is not completely straightforward for two reason. In one hand, the observation of Ca^{2+} is by means of fluorophores that react with Ca^{2+} and changes their spectral properties upon binding, by an increase in fluorescence intensity of fluorescence or emission/excitation wavelength shift. On the other hand, inside cells there are Ca^{2+} buffers, tipically protein, that react with Ca^{2+} modifying its transport rate. Hence, Ca^{2+} transport inside cell is determined by diffusion-reaction processes. This situation can be described by effective diffusion coefficients that have information about the two processes. To extract reliable information from these optical experiments it is extremely important to have an appropriate model for the interpretation of the data. Normally, analytic expressions for the autocorrelation function can be obtained under certain approximations. These approximations are based on certain assumptions with which it is necessary to be very careful.

The aim of this Thesis has been to study and estimate certain biophysical paramters underlying intracellular Ca^{2+} transport, with *Xenopus laevis* oocytes as a model system. First of all, we analized the theory under the approximations normally used for the analysis of FCS experiments in systems similar to ours. We determined the limits of such approximations and what parameters could be estimated. In second place, we studied the difffusion coefficient of Ca^{2+} and a collective buffer in *X. laevis* oocytes citosol and lumen of the endoplasmic reticulum, considering the discussion of the first section about the models for data interpretation.

Keywords: calcium dynamics, diffusion and reaction processes, fluorescence corralation spectrosocopy

Índice general

1. Introducción **1**

1.1. El ión calcio como segundo mensajero 2

1.1.1. Mecanismos de control de la concentración intracelular de Ca^{2+} 2

1.1.2. Señales de calcio mediadas por RIP_3s 4

1.1.3. Difusión en presencia de trampas 5

1.2. Ovocitos de *Xenopus laevis* como sistema modelo en el estudio de señales de calcio. 8

1.2.1. Estimación del coeficiente de difusión de Ca^{2+} en extracto citosólicos de ovocitos de *Xenopus laevis*. 8

1.3. Observación de Ca^{2+} intracelular 10

1.3.1. Indicadores fluorescentes 10

1.3.2. Compuestos enjaulados 13

1.3.3. Microscopía confocal 14

1.4. Espectroscopía por Correlación de Fluorescencia 16

1.4.1. Función de autocorrelación 18

1.4.2. FCS en difusión libre 18

1.4.3. FCS en reacción-difusión 20

1.5. Esquema de la Tesis 22

2. Aproximaciones de la función de autocorrelación: estudio teórico **25**

2.1. Sistema con calcio y un indicador 25

2.1.1. FCS en el límite de la Aproximación por reacciones rápidas . 27

2.1.2. Límites en la aplicación de la aproximación por reacciones rápidas 29

2.2. Sistema con calcio, un indicador y un *buffer* 31

2.2.1. Aproximación por reacciones rápidas 33

2.2.2. Aproximación del modelo a un caso más simple 34

2.3. Conclusiones 37

3. Fluctuaciones en experimentos de FCS en sistemas de reacción-difusión **45**

3.1. Teoría de FCS 46

3.2. El rol de las correlaciones iniciales en la ACF 47

3.2.1. Simplificación de la ACF en el límite de reacciones rápidas . 49

3.3. ACF más allá del límite de las reacciones rápidas 50
3.3.1. Autovalores exactos y aproximados 51
3.3.2. Densidades 54
3.4. ¿Qué fluctuaciones se miden en experimentos de FCS que usan indicadores de Ca^{2+} de onda única (SW)? 57
3.5. Conclusiones 60

4. Calibración y estimación de condiciones experimentales óptimas para estudiar la difusión del ión calcio en ovocitos de *Xenopus laevis* 63
4.1. Estimación de las condiciones óptimas para realizar experimentos de point-FCS en ovocitos de *Xenopus laevis* 64
4.1.1. Potencia del láser 64
4.1.2. Región de adquisición 65
4.2. Caracterización del indicador de Ca^{2+}, Fluo8, en mediciones FCS . 71
4.2.1. Resultados 72
4.3. Conclusiones 78

5. Estimación del coeficiente de difusión del Ca^{2+} en ovocitos de *Xenopus laevis* mediante experimentos de FCS 83
5.1. Estimación del coeficiente de difusión de Ca^{2+} en citosol de ovocitos de *X. laevis* 84
5.1.1. Resultados 84
5.2. Estimación del coeficiente de difusión de Ca^{2+} en el lumen del retículo endoplasmático de ovocitos de *X. laevis* 88
5.2.1. Resultados 90
5.3. Conclusiones 91

6. Modificación de las condiciones basales en ovocitos *Xenopus laevis* 97
6.1. Modificación de la concentración de EGTA 97
6.1.1. Aproximación mediante FCS en solución de Fluo8, EGTA y Ca^{2+} 98
6.1.1.1. Resultados 100
6.1.2. Mediciones FCS en ovocitos con Fluo8 y EGTA 103
6.1.2.1. Resultados 104
6.2. Modificación de la concentración de Ca^{2+} basal 106
6.2.1. Aproximación mediante FCS en solución 107
6.2.1.1. Resultados 108
6.2.2. FCS en Ovocitos con Fluo8 y Ca^{2+}exógeno 109
6.2.2.1. Resultados 111
6.3. Conclusiones 114

7. Conclusiones 121

A. Teoría de FCS **129**
A.1. Caso de caso de calcio y un indicador 129
A.2. Caso de calcio, un indicador y un *buffer* 131

B. Metodología **133**
B.1. Ovocitos de *X. laevis* 133
B.1.1. Disección ovárica 133
B.1.2. Colagenización y selección de ovocitos 134
B.1.3. Microinyección 134
B.2. Soluciones 135
B.2.1. Para medición en gota 135
B.2.2. Para la manipulación de ovocitos 136
B.2.3. Para tratamiento de ovocitos 136
B.3. Adquisición 138
B.3.1. FCS 138
B.3.2. Escaneo de imágenes 139
B.3.3. Escaneo por líneas 139
B.4. Evocación de señales por liberación de IP_3 enjaulado 140
B.5. Calibración del volumen confocal 140
B.6. Análisis de datos experimentales 141
B.6.1. Cálculo de ACFs 141
B.6.2. Ajuste de ACFs 141
B.6.3. Ajuste de parámetros biofísicos 143
B.6.4. Análisis de la bimodalidad 143

Agradecimientos **147**

Bibliografía **147**

Capítulo 1

Introducción

La versatilidad y universalidad del ión calcio (Ca^{2+}) como agente señalizador se basa en la diversidad de distribuciones espacio-temporales que su concentración puede desplegar dentro de las células. Se supone entonces que hay información codificada en esa dinámica. Una comprensión profunda de las señales requiere, por lo tanto, identificar las posibles distribuciones intracelulares del Ca^{2+}, cómo son moduladas por distintos factores y la respuesta final que pueden inducir en cada tipo celular específico. Una descripción abarcadora de las señales de calcio requiere necesariamente de una combinación de observación y modelado matemático. Para que esta combinación sea útil es necesario contar con valores confiables (idealmente, medidos *in situ*) de los parámetros biofísicos que caracterizan a los procesos que determinan la dinámica espacio-temporal del calcio intracelular. En particular, es de vital interés conocer el coeficiente de difusión del Ca^{2+} dentro de las células y cómo dicho transporte es afectado por la presencia de *buffers* (típicamente proteínas) que reaccionan con él alterando su concentración y su dinámica. La tasa de transporte intracelular del ión y la capacidad *buffering* del medio son fundamentales para determinar el alcance de las señales.

1.1. El ión calcio como segundo mensajero

El Ca^{2+} es un mensajero intracelular presente en muchísimas vías de transducción (Fig. 1.1). Juega un rol importante en la expresión génica, secreción, proliferación celular, contracción muscular, fecundación y muerte celular programada [1, 2]. En condiciones fisiológicas la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol es del orden de 100 nM. Mientras que en el medio extracelular y en los reservorios internos tiene un valor mayor ($\sim$1 mM y $\sim$500 μM, respectivamente). Este gradiente permite que el nivel citoplásmático de Ca^{2+} pueda ser rápidamente aumentado al abrir de forma transitoria los canales de Ca^{2+} [3]. Justamente, una señal intracelular de calcio consiste en un aumento, localizado o no, de la concentración citosólica de Ca^{2+} respecto de la concentración basal. Por otro lado, concentraciones elevadas de Ca^{2+} citosólico llevan a la muerte celular por necrosis o apoptosis [1]. Por lo tanto, los mecanismos que controlan la concentración de Ca^{2+} son centrales en la fisiología celular.

1.1.1. Mecanismos de control de la concentración intracelular de Ca^{2+}

Como ya fue mencionado, la versatilidad del Ca^{2+} como segundo mensajero reside principalmente en el amplio rango de la escala espacio-temporal que su distribución puede alcanzar y esto se basa, a su vez, en la gran cantidad y diversidad de mecanismos que tienen las células para modificar la concentración citosólica de este ión [2].

Por un lado, el ingreso de Ca^{2+} al citosol puede ocurrir desde el exterior celular a través de proteínas presenten en la membrana plasmática, o desde reservorios internos (mitocondrias, retículo sarco y endoplásmico, y gránulos secretorios). Existen diferentes tipos de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática, cuya apertura puede ser modulada de distintos modos: por 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),

por una disminución del nivel de Ca^{2+} en los depósitos intracelulares [4, 5], por la unión de un ligando externo (como los receptores de NMDA presentes en la sinapsis de algunas neuronas), e incluso por estímulos mecánicos. La liberación desde reservorios internos se produce principalmente a través de canales ubicados en la membrana de los retículos sarco y/o endoplasmático: los receptores de rianodina (RyR), y los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (RIP_3s). Los receptores de rianodina juegan un papel importante en la contracción del músculo cardíaco. Mientras que los RIP_3s están presente en distintos tipos celulares y participan en variados procesos [6–8], su probabilidad de apertura está regulada por IP_3, Ca^{2+}, y distintas proteínas regulatorias [8–11].

La remoción del Ca^{2+} citosólico ocurre mediante la acción de proteínas especializadas que bombean Ca^{2+} hacia el exterior de la célula o reinsertándolo en los reservorios internos. Ambos procesos requieren un gasto de energía ya que implican el transporte de una sustancia contra su gradiente de concentración. Un ejemplo del primer tipo es el intercambiador Na^+-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. La Ca^{2+}-ATPasa del retículo endoplasmático (bomba SERCA por sus siglas en inglés) es un ejemplo del segundo tipo, esta proteína recaptura iones de Ca^{2+} presentes en el citosol hacia el retículo endoplasmático (RE) [1, 12].

Sin embargo, la forma más rápida de reducir la concentración citosólica de Ca^{2+} es llevada a cabo por sustancias llamadas *buffers*, típicamente proteínas que ligan Ca^{2+} y están presentes en la mayoría de los tipos de células. Los *buffers* atrapan Ca^{2+} con diferentes afinidades y cinéticas. En condiciones fisiológicas, la concentración citosólica de Ca^{2+} se estima del orden de 20-100 nM, mientras que la constante de disociación de la mayoría de los *buffers* citosólicos es casi un orden de magnitud mayor $\sim$ 200 nM- 1.5 μM [13]. 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. La concentración de

Ca^{2+} libre resulta, entonces, de la combinación del aporte de todos los mecanismos con los que cuenta la célula. En la Fig. 1.1 se esquematizan algunos de los mecanismos para controlar la concentración intracelular de Ca^{2+}.

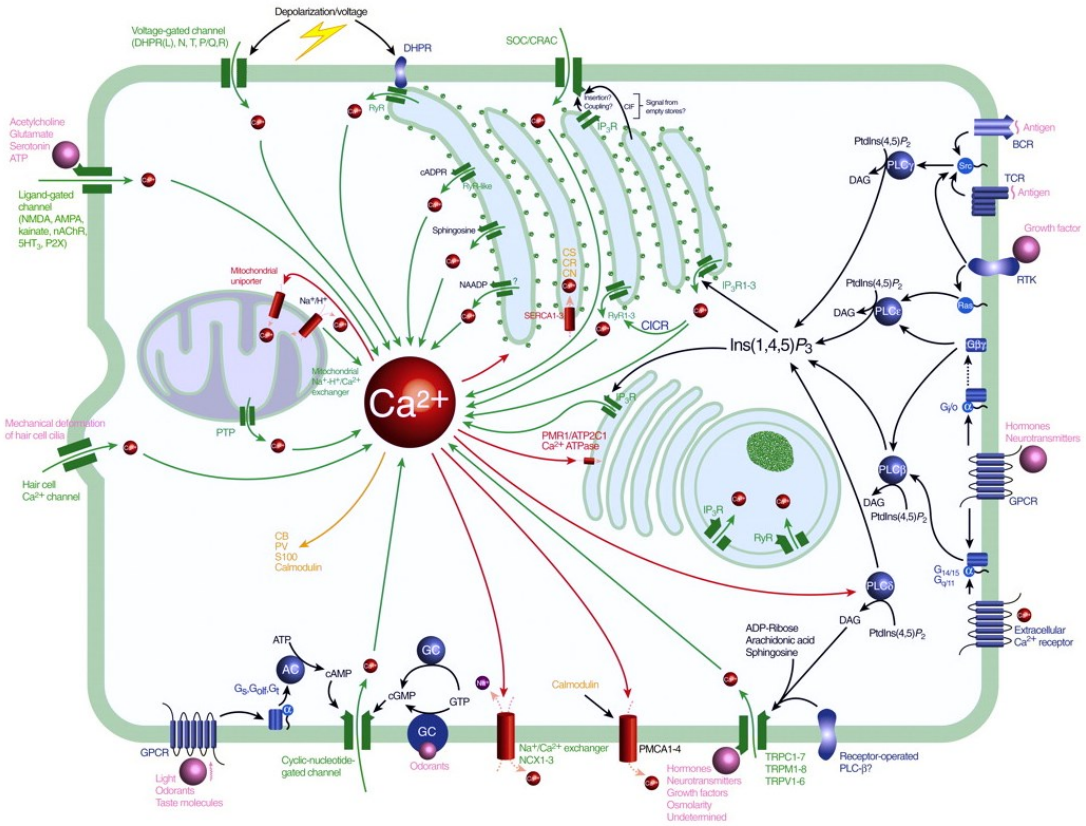

FIGURA 1.1: Resumen de las vías involucradas en la señalización por Ca^{2+} y sus mecanismos de control. Imagen extraída de [14].

1.1.2. Señales de calcio mediadas por RIP_3s

Los RIP_3s son proteínas transmembrana del RE, que funcionan como canales de Ca^{2+} activados por ligando. Si bien hay cierta controversia al respecto, se cree que estos canales, al menos los activos, se ubican formando *clusters* o cúmulos [15, 16]. La existencia de *clusters* se hace evidente en experimentos de microscopía que revelan 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 [15, 17–19].

En presencia de IP_3, los RIP_3s son modulables por Ca^{2+}. El receptor activado, es decir unido a IP_3, 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 afinidad, que induce su cierre. Entonces, el Ca^{2+} liberado a través de un único canal de IP_3 en un *cluster* difunde hacia los canales vecinos induciendo su apertura. Esta modulación por Ca^{2+} da lugar al fenómeno de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR por su sigla en inglés, *Calcium Induced Calcium Release*) [20–22].

Las señales de Ca^{2+} se clasifican según cuántos canales participen de la misma, Fig. 1.2. La liberación de Ca^{2+} a partir de un solo canal se conoce con el nombre de *blip*, mientras que a las liberaciones de Ca^{2+} a partir varios canales dentro de un *cluster* se las llama *puff*, y, por último, se denomina *onda* a liberación de Ca^{2+} desde canales de distintos *clusters*. A su vez, el número de canales que participan en una señal está relacionado con la concentración de IP_3. Cuando la concentración de IP_3 es baja, los canales funcionan de manera autónoma, generando eventos de liberación locales de tipo *blip*. Concentraciones de IP_3 intermedias o altas aumentan la probabilidad de que haya más de un canal activo dentro de un mismo *cluster*, de forma que el Ca^{2+} liberado por un único canal difunde hacia canales vecinos propagando la señal [17, 19, 21, 23, 24].

De modo que la organización en *clusters* de los RIP_3s, la concentración de IP_3, y la tasa de transporte citosólico del Ca^{2+} son cruciales para la propagación de la señal.

1.1.3. Difusión en presencia de trampas

La difusión en presencia de trampas, entendidas como sitios o partículas que atrapan a la molécula que esté difundiendo, afecta la tasa de transporte neto de dicha molécula [25]. La combinación de procesos de difusión y reacción con trampas se

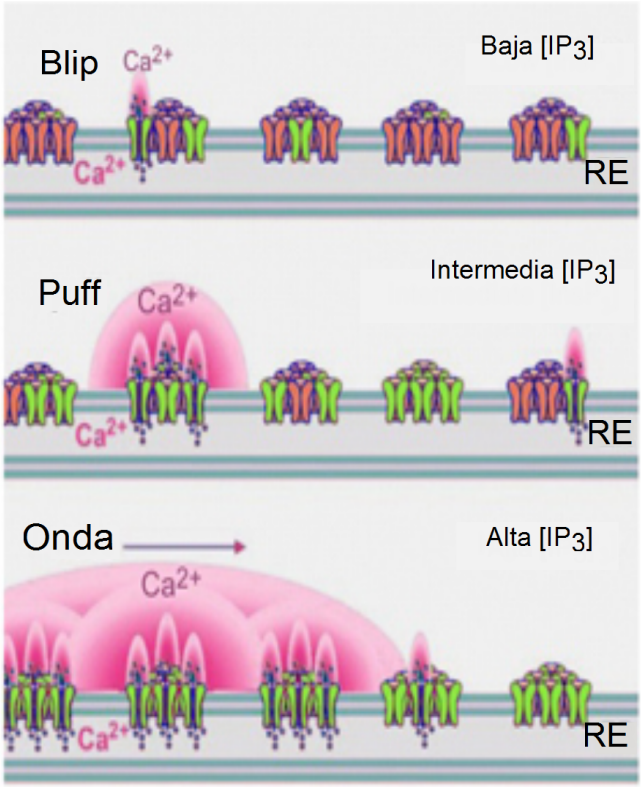

FIGURA 1.2: Tipos de señales de calcio según cuántos canales estén involucrados y su relación con la concentración de IP_3. Imagen extraída y modificada de [8].

describe a través de coeficientes de difusión efectivos que son promedios pesados por la concentración de cada una de las especies involucradas.

Los mensajeros celulares se ven afectados por este tipo de procesos, y como se describió previamente para el Ca^{2+}, la reacción con trampas (también llamadas *buffers*) suele ser parte de los mecanismos de regulación con los que cuentan las células [2, 13, 26]. Sin embargo, las reacciones de pegado y despegado con trampas no sólo funcionan como mecanismos de regulación de concentración, sino que también limitan el rango de acción, tanto espacial como temporal, de los mensajeros, modificando de esta manera la propagación de la señal.

Cuando una especie difunde sin reaccionar con trampas, el coeficiente de difusión libre describe la tasa a la que aumenta el desplazamiento medio cuadrático de una única molécula, como también la tasa a la que se desplega la información, entendida como inhomegeneidades en la concentración de partículas. Sin embargo,

en presencia de trampas, la información difunde más rápido que las partículas únicas y por lo tanto el mensaje difunde más rápido que el mensajero [27].

Cuando una especie, P_f , con coeficiente de difusión D_f, reacciona con trampas más masivas, S, que difunden más lentamente con coeficiente de difusión D_s (o que están inmóviles), formando el complejo P_b según el siguiente esquema de reacción:

$$P_f + S \underset{k_{on}}{\overset{k_{off}}{\rightleftarrows}} P_b \tag{1.1}$$

y P_b difunde a D_s, hay dos coeficientes de difusión efectivos. Uno de ellos, el D_{sm} describe la difusión de partículas únicas y D_{coll} describe la difusión de las inhomegeneidades en la concentración de las partículas:

$$D_{sm} = \frac{D_f + ([S]_{eq}/K_d)D_s}{1 + [S]_{eq}/K_d} \tag{1.2}$$

$$D_{coll} = \frac{D_f + (([S]_{eq}^2/(K_d[S]_{tot}))D_s}{1 + [S]_{eq}^2/(K_d[S]_{tot})} \tag{1.3}$$

donde $[S]_{eq}$ es la concentración de la trampa libre en el equilibrio, $[S]_{tot}$ es la concentración de trampa total, y K_d es la constante de disociación entre las partículas y las trampas [27]. Si bien en el límite en que las trampas están saturadas o cuando están casi todas desocupadas ambos coeficientes prácticamente coinciden, en otras condiciones pueden ser muy distintos entre sí. Comprender esta distinción es sumamente importante para la interpretación de resultados en experimentos donde se estudia la difusión de partículas marcadas. Volviendo sobre el ejemplo anterior, si se estudia un sistema de partículas P_f y trampas S, que reaccionan según la Ec.(1.1) algunos métodos ópticos comúnmente utilizados para estimar coeficientes de difusión proveen información sobre D_{sm} y otros sobre D_{coll}.

1.2. Ovocitos de *Xenopus laevis* como sistema modelo en el estudio de señales de calcio.

Los ovocitos de *Xenopus laevis* son un sistema modelo donde se ha podido observar una enorme variedad de señales intracelulares, desde aquéllas muy localizadas hasta ondas que se propagan por toda la célula. *X. laevis* es una especie de anfibio originario de África (Figura 1.3(a)) y es un sistema modelo ampliamente utilizado en biología. Sus ovocitos tienen un diámetro medio del orden del milímetro (Figura 1.3(b)). Esto permite, por un lado, observar un amplio repertorio de señales de calcio, desde localizadas hasta macroscópicas y, por lo tanto, se han usado desde hace mucho tiempo en el estudio de la señalización por calcio. Por otro lado, su tamaño permite inyectar los compuestos sin necesidad de usar variantes permeables. En ovocitos de *X. laevis*, las señales intracelulares de calcio están mediadas por canales receptores de IP_3, ubicados en la membrana del RE aproximadamente a 6 μm de profundidad respecto de la superficie [8, 10, 11, 28]. Además, en estas células no se encuentran presentes los canales de Ca^{2+} RyR que suelen interferir con los estudios de los canales receptores de IP_3. En los experimentos de evocación de señales de Ca^{2+}, se suele usar IP_3 fotoactivable, que es previamente inyectado en forma enjaulada en la célula y se libera con un pulso de luz ultravioleta (UV). De este modo se tiene control directo sobre el estímulo que da lugar a la aparición de las señales.

1.2.1. Estimación del coeficiente de difusión de Ca^{2+} en extracto citosólicos de ovocitos de *Xenopus laevis*.

El coeficiente de difusión del Ca^{2+} fue previamente estudiado por Allbritton y colaboradores [29]. En este trabajo los autores utilizaron calcio radioactivo y estimaron un coeficiente de difusión efectivo de Ca^{2+} en extractos citosólicos de ovocitos de *X. laevis*. Brevemente, el estudio consistió en colocar extracto citosólico de ovocitos de *X. laevis* en tubos delgados. En uno de los extremos se colocó el Ca^{2+}

FIGURA 1.3: (a) Especímen de *X. laevis*. (b) Ovocitos de *X. laevis* extraídos por disección ovárica y tratados, posteriormente, con colagenasa.

radioactivo, luego los tubos fueron congelados a distintos tiempos de manera de frenar la difusión de las moléculas marcadas. Una vez congelados fueron cortados en secciones y se determinó la concentración de Ca^{2+} en cada sección. Este procedimiento se repitió para distintas cantidades de Ca^{2+} agregado. Los autores encontraron que el coeficiente de difusión de Ca^{2+} depende de su concentración, reportando valores que van desde 13 a 65 $\mu m^2/s$ para concentraciones de Ca^{2+} libre de 90 nM a 1 μM, y asociaron este cambio a la unión del Ca^{2+} con *buffers* presentes en el extracto. Finalmente, los autores proponen que el coeficiente de difusión de Ca^{2+} libre es $D_{Ca} \sim 223\ \mu m^2/s$, valor encontrado para las mediciones realizadas con mayor cantidad de Ca^{2+} agregado. Sin embargo, dado que estas mediciones se realizaron en extractos citosólicos es posible que las condiciones de los extractos no sean totalmente equiparable a las encontradas en el citosol de células intactas. Por otro lado, como se explicó anteriormente, al estudiar la difusión de partículas que interactúan con trampas mediante la marcación de un porcentaje de

ellas, el coeficiente de difusión efectivo estimado corresponde al de partícula única [27, 30]. Es de esperar, por lo tanto, que el coeficiente de difusión efectivo colectivo sea mayor que el determinado para cada concentración de Ca^{2+} analizada lo que llevaría a la conclusión de que el coeficiente de difusión libre de los iones en el citosol fuera mayor que $\sim 220\ \mu m^2/s$. Esto es particularmente relevante teniendo en cuenta que en la mayoría de las señales de Ca^{2+} intracelulares hay liberación de Ca^{2+} a través de RIP_3s y que el coeficiente de difusión libre del IP_3 fue estimado en $\sim 270\ \mu m^2/s$ en [29]. Las estimaciones de [29] llevaron a los autores de este trabajo a la conclusión de que era el Ca^{2+} quien imponía un límite al rango de las señales. Esta conclusión debería re-verse en caso de que el coeficiente de difusión de Ca^{2+} libre fuera mayor que el estimado en [29]. Es por esto que uno de los objetivos principales de esta Tesis es la cuantificación del coeficiente de difusión del Ca^{2+} en células intactas.

1.3. Observación de Ca^{2+} intracelular

Los experimentos ópticos proveen una herramienta poco invasiva para estudiar las señales y la dinámica del Ca^{2+} intracelular en células intactas. Para tal fin se utiliza microscopía, en muchos casos confocal, y fluoróforos que varían sus propiedades espectrales al ligar calcio. La amplia disponibilidad de los indicadores fluorescentes y las sucesivas mejoras en las técnicas ópticas han permitido lograr una aumento en la resolución espacial y temporal en la detección del Ca^{2+} intracelular [31].

1.3.1. Indicadores fluorescentes

Se conocen con el nombre de indicadores o *dyes* de Ca^{2+} a los fluoróforos que varían sus propiedades de emisión al ligar Ca^{2+}. Se clasifican en dos tipos: 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 [32].

Comercialmente, se encuentra disponible un amplio rango de indicadores con diversas afinidades hacia el Ca^{2+}. Los más comunes se separan en dos categorías: con intensidad modulable por longitud de onda única (SW de single-wavelength) o doble (llamados radiométricos). En los indicadores SW, cambios en la concentración de Ca^{2+} generan cambios en la intensidad de la fluorescencia emitida (Fig. 1.4). Los indicadores radiométricos cambian los máximos de longitud de onda, tanto para las curvas de excitación como de emisión al ligar Ca^{2+}.

Los indicadores SW 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 fotoliberan con este tipo de luz como se explicará más adelante. Un ejemplo clásico de estos indicadores son Fluo3 y Calcium Green. Ambos han sido utilizados para observar señales de Ca^{2+} y su posterior caracterización en una gran variedad de publicaciones [33, 34]. Presentan un cambio importante en la intensidad de emisión al ligar Ca^{2+} (de 40 a 100 veces, Fig. 1.4). A su vez, los indicadores químicos de Ca^{2+} actúan como *buffers* y como consecuencia modifican tanto los niveles de Ca^{2+}, 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 [31, 35].

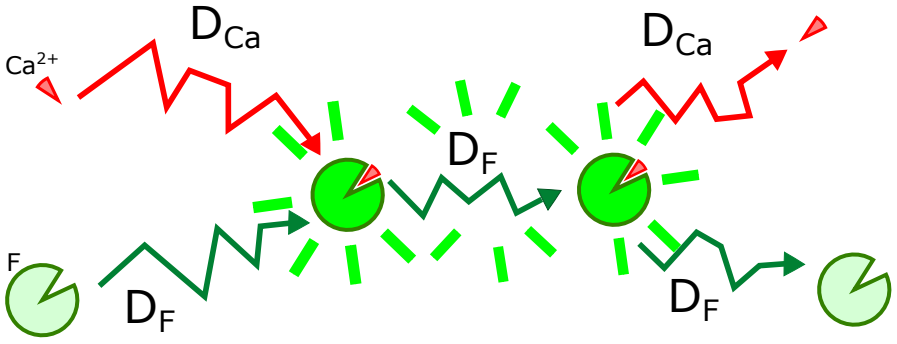

FIGURA 1.4
Esquema de reacción y emisión de fluorescencia para el caso de Ca^{2+} y un indicador SW, F, iluminado con la longitud de onda correspondiente.

Los indicadores Fluo4 y Fluo8 son derivados del Fluo3. Ambos tienen mayor intensidad de fluorescencia que el Fluo3. Esto significa que son más luminosos a una

menor concentración, y consecuentemente tienen una menor toxicidad y necesitan tiempos de incubación más cortos. Tanto el Fluo3, como el Fluo4 y el Fluo8 son derivados del *buffer* de Ca^{2+} BAPTA, con distintas sustituciones (ver Figs. 1.5, 1.6, y Tabla 1.1).

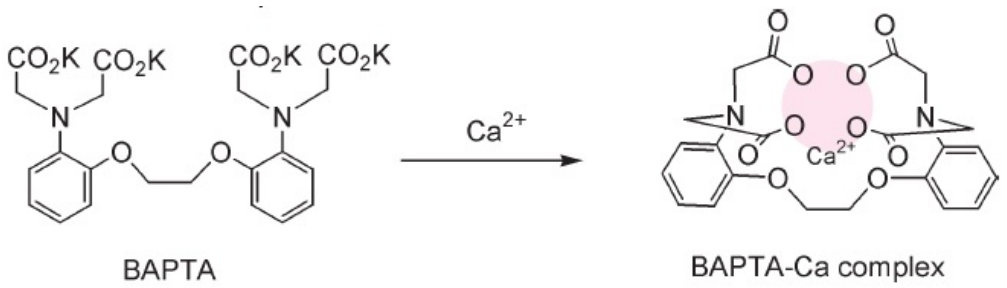

FIGURA 1.5
Estructura de BAPTA y cambio conformacional ante la unión del ión calcio [36].

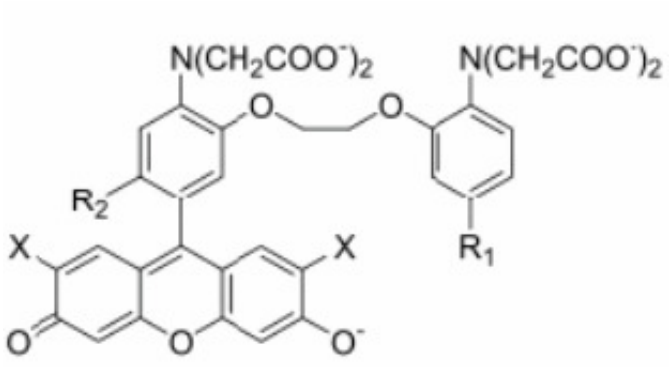

FIGURA 1.6
Estructura molecular de los indicadores de calcio tipo Fluo. X, R_1 y R_2 son los residuos que presentan distintas sustituciones según la versión del indicador [37].

TABLA 1.1: Sustituciones de la familia de indicadores tipo Fluo [37].

	X	R_1	R_2
Fluo1	H	Me	OH
Fluo2-MA (Afinidad media)	H	H	H
Fluo2-HA (Afinidad alta)	H	Me	H
Fluo3	Cl	Me	H
Fluo4	F	Me	H
Fluo8	H	H	H

El Fluo4 en su versión ligado a dextrano tiene un peso molecular de 10 kDa, una $K_d = 772\ nM$, $k_{off} = 80\ 1/s$ [38], su coeficiente de difusión en solución es de

$D_{Fluo4} \sim 85\ \mu m^2/s$ [38, 39]. El Fluo8 tiene un peso molecular de 877 g/mol, y una constante de disociación, reportada por el fabricante, de K_d= 432 y 600 nM en solución e *in vivo*, respectivamente. En los indicadores de Ca^{2+} derivados del BAPTA, los cambios en la afinidad se deben mayormente a cambios en las tasas de disociación, k_{off}, mientras que las tasas de asociación, k_{on}, se mantienen iguales o con variaciones despreciables [40]. Por lo tanto, se espera que la tasa de disociación entre el Fluo8 y el Ca^{2+} sea aproximadamente $k_{off} = 45\ 1/s$ en solución y $k_{off} = 70\ 1/s$ *in vivo*. El Fluo5-N AM es otro indicador de Ca^{2+} derivado de Fluo3, con ciertas peculiaridades. Por un lado es capaz de permear membranas celulares, dado que tiene un grupo éster, y por otro, presenta una muy baja afinidad por el Ca^{2+}. Estas características lo hacen ideal para estudiar el Ca^{2+} presente en el lumen del retículo endoplasmático, ya que dentro de esta organela la concentración del ión calcio es mucho mayor que en el citosol. Tiene un peso molecular de 1128 g/mol, y una K_d= 90 μM. En la Fig. 1.7 se muestra el espectro de emisión y excitación del Fluo4, los otros indicadores de Ca^{2+} usados en esta Tesis, Fluo8 y Fluo5-N, tienen espectros muy similares.

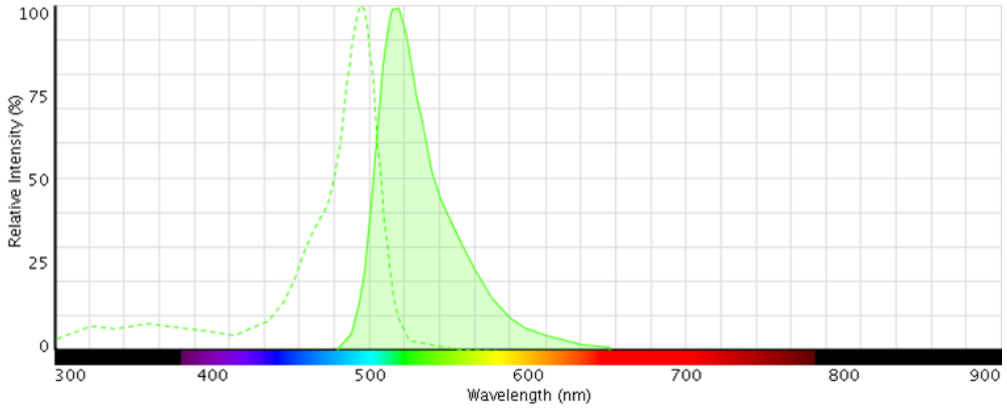

FIGURA 1.7: Espectro de excitación, línea de puntos, y emisión, línea llena, del indicador de Ca^{2+} Fluo4 [41].

1.3.2. Compuestos enjaulados

La fotoliberación de compuestos enjaulados es importante para generar cambios rápidos en la concentración de moléculas señalizadoras [42]. 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 UV, se activen. Por otro lado, es posible generar estímulos controlados y reproducibles con los cuales analizar los fenómenos fisiológicos que dependen de rápidos cambios de concentración.

Entre los compuestos bioquímicos que están comercialmente disponibles en forma enjaulada se encuentran el IP_3 y el nitrophenyl-EGTA (NP-EGTA). El IP_3 enjaulado ha sido ampliamente utilizado en una gran variedad de experimentos [21, 23, 24, 43, 44]. Permite obtener elevaciones rápidas de $[IP_3]$ evitando el tiempo de retraso y modulación asociada a la producción de IP_3 activo. Su utilización permite observar mayor cantidad de señales o eventos en menor tiempo. De esta forma, no sólo se aumenta el número de eventos, sino que también permite tener ciertos parámetros controlados durante la medición para una posterior caracterización. El NP-EGTA es un quelante de Ca^{2+} fotosensible. Presenta una alta selectividad por Ca^{2+}, pero al ser iluminado con luz UV su K_d cambia drásticamente de 80 nM a más de 1 mM. Unido previamente a Ca^{2+}, permite obtener un complejo de Ca^{2+} enjaulado, que será liberado rápidamente ante un pulso de luz UV [45].

1.3.3. Microscopía confocal

La microscopía confocal se basa en eliminar las emisiones provenientes de las regiones que se encuentran fuera del plano focal. 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 re-enfocada 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

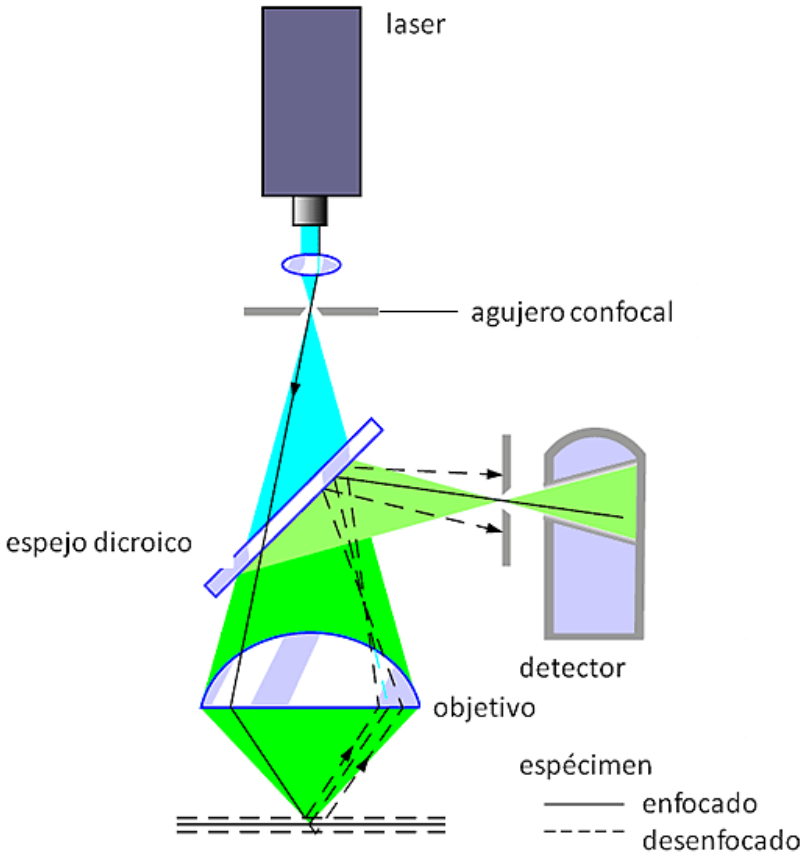

FIGURA 1.8: Esquema ilustrando los principios de la microscopía confocal, modificado de [46].

en el plano focal, sin que haya una contribución significativa de las regiones que se encuentran fuera de foco (Figura 1.8). Debido a que las aperturas tanto de la iluminación como del retorno de la imagen tienen un foco común, se ha denominado a este tipo de microscopios como microscopio confocal. También 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.

1.4. Espectroscopía por Correlación de Fluorescencia

La espectroscopía por correlación de fluorescencia (*Fluorescence Correlation Spectroscopy* o FCS) es una técnica óptica que estudia las fluctuaciones espontáneas, alrededor del equilibrio, de la intensidad de fluorescencia de un sistema. El análisis estadístico de estas fluctuaciones permite obtener, de manera no invasiva, información acerca de los procesos que las originan [47–49], como concentraciones locales, coeficientes de difusión, tasas de reacciones y cambios conformacionales.

La técnica de FCS fue desarrollada al principio de los años '70s y se empleó para medir la difusión del bromuro de etidio y su dinámica química con el ADN [47]. A principio de la década del '90, hubo un resurgimiento de esta técnica, con la combinación de FCS y microscopía confocal, y desde entonces ha sido ampliamente utilizada para determinar el coeficiente de difusión intracelular de proteínas marcadas con algún compuesto fluorescente [50–52]. El éxito en la aplicación de la técnica de FCS radica en tener pocas moléculas de manera que cada una de ellas contribuya significativamente a la señal. La microscopía confocal significó, por un lado, reducir el volumen observado, y por otro aumentar la eficiencia de la emisión, lo que se traduce en la posibilidad de trabajar con concentraciones más bajas.

El esquema del *set-up* experimental clásico de FCS confocal es similar al de la microscopía confocal tradicional, Fig.1.9. El haz de luz de excitación proviene de un láser que es dirigido por un espejo dicroico a un objetivo de alta apertura numérica que enfoca la luz dentro de la muestra. Como resultado, sólo unas pocas moléculas son excitadas a la vez. La fluorescencia de emisión pasa por el mismo objetivo, ciertos filtros y luego a través de un *pinhole* que descarta los haces de luz que provienen de la zona por fuera del foco. De esta manera, sólo se colecta la luz proveniente de la cintura del haz del láser. Finalmente, la luz es colectada por un detector, que puede ser un fotomultiplicador o un fotodiodo de avalancha [49].

El volumen de detección confocal está determinado entonces por el conjunto objetivo y *pinhole*, y suele ser del orden del femtolitro. Se denomina w_z y w_r a las

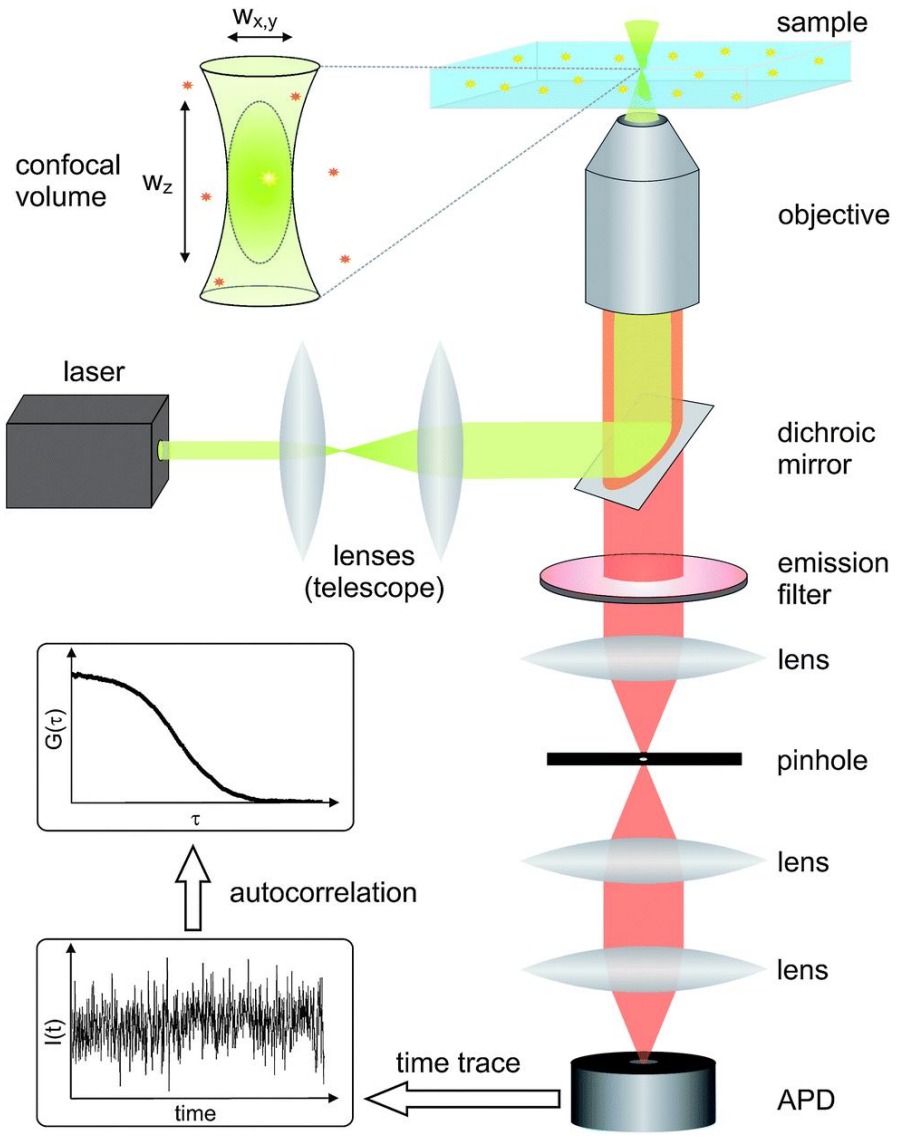

FIGURA 1.9: Esquema ilustrando los principios de la técnica de FCS [53].

medidas de la cintura de este volumen a lo largo del eje z y r, donde z es la coordinada espacial a lo largo de la dirección de propagación del láser y r es la coordinada radial en el plano perpendicular, ver Fig. 1.9. El volumen efectivo queda definido entonces como:

$$V_{ef} = \pi^{3/2} w_r^2 w_z \tag{1.4}$$

Como se verá más adelante, conocer los parámetros geométricos del volumen de detección es crucial para obtener información del sistema mediante la técnica de FCS.

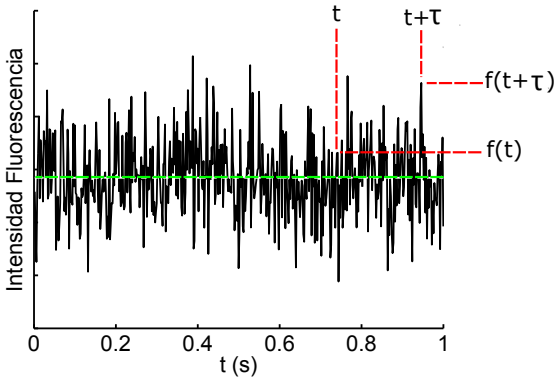

FIGURA 1.10: Registro de intensidad de fluorescencia en el tiempo. En línea a rayas verde se muestra la fluorescencia media, $\langle F \rangle$.

1.4.1. Función de autocorrelación

La función de autocorrelación (ACF, por sus siglas en inglés), Fig.1.10, se calcula a partir de las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia medida experimentalmente como:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta f(t) \delta f(t+\tau) \rangle}{\langle f(t) \rangle^2} \tag{1.5}$$

donde $\langle f(t) \rangle$ es la fluorescencia promedio en el volumen de detección y $\delta f(t)$ es la desviación de la intensidad de fluorescencia respecto del valor medio en cada tiempo, t:

$$\delta f(t) = f(t) - \langle F \rangle \tag{1.6}$$

Al ajustar las ACF experimentales con expresiones analíticas, en los casos en que esto sea posible, se pueden extraer los tiempos de correlación y a partir de ellos inferir los parámetros biofísicos de los mecanismos subyacentes a las fluctuaciones.

1.4.2. FCS en difusión libre

Dejando de lado las fluctuaciones debidas a los procesos de emisión y detección, si la fluorescencia proviene de una única especie, P_f, que difunde libremente con coeficiente D_f, las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia están dadas por

el ingreso y egreso de partículas fluorescentes a y desde el volumen de detección. En este caso la ACF está dada por:

$$G(\tau) = \frac{Go}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_f}\right)\sqrt{1 + \frac{\tau}{w^2 \tau_f}}}, \tag{1.7}$$

donde $w = w_z/w_r$ es la relación de aspecto del volumen de detección, y w_z y w_r son las medidas de la cintura del volumen a lo largo de los ejes z y r, respectivamente, ya descriptas. τ_f es el tiempo característico de difusión de P_f a través del volumen de detección y puede interpretarse como el tiempo medio de residencia de las partículas en dicho volumen, se relaciona con el coeficiente de difusión mediante la siguiente ecuación:

$$\tau_f = \frac{w_r^2}{4D_f} \tag{1.8}$$

Asumir que las fluctuaciones en la fluorescencia se deben sólo a fluctuaciones en el número de moléculas, N_f, en el volumen de observación, V_{ef}, implica que la Ec. (1.5) usada para calcular la ACF es equivalente a:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta N_f(t)\, \delta N_f(t+\tau) \rangle}{\langle N_f(t) \rangle^2}. \tag{1.9}$$

Por lo tanto, el peso total de la ACF en la Ec. (1.7), $Go \equiv G(\tau = 0)$, está dado por:

$$Go = \frac{1}{V_{ef}[P_f]} \tag{1.10}$$

bajo el supuesto de que N_f obedece una estadística de tipo Poisson con valor medio $\langle N_f \rangle = [P_f]V_{ef}$:

$$Go = \frac{\langle \delta N_f(t)\, \delta N_f(t) \rangle}{\langle N_f(t) \rangle^2} = \frac{\mathrm{Var}(N_f)}{\langle N_f \rangle^2} = \frac{1}{\langle N_f \rangle}, \tag{1.11}$$

donde $\mathrm{Var}(N_f)$ es la varianza de la variable estocástica N_f.

Entonces, en el caso de una única especie difundiendo libremente, ajustando la ACF experimental, calculada según la Ec.(1.5), con la expresión analítica de la Ec.(1.7) se determinan dos parámetros: Go y τ_f. En ambos casos, para obtener

información relevante del sistema, como la concentración o el coeficiente de difusión, es necesario conocer el valor de los parámetros geométricos que definen el volumen de detección. Para esto se debe realizar una calibración de dicho volumen, consistente en mediciones FCS sobre una solución de concentración conocida de una partícula fluorescente de coeficiente de difusión conocido.

1.4.3. FCS en reacción-difusión

En un sistema formado por especies que no difunden libremente sino que interactúan químicamente entre sí, las fluctuaciones no se deben sólo al pasaje de las partículas a través del volumen de detección sino también a las reacciones de pegado y despegado. Entonces el decaimiento de la función de autocorrelación va a estar afectado por las escalas temporales de la difusión y también de la reacción. En estos sistemas, no siempre es posible obtener una expresión analítica de la función de autocorrelación. Normalmente se usan aproximaciones válidas en ciertos límites [38, 47, 54–59], que provienen de linealizar las ecuaciones del modelo [49, 60] y escribir la ACF como la suma de integrales, cada una de ellas asociada a una de las ramas de los autovalores que determinan la dinámica de las fluctuaciones de la fluorescencia. Estas integrales son las *componentes* de la ACF (Ver Apéndice A).

Caso de Ca^{2+} y un indicador SW

El sistema de reacción-difusión más simple con el que trabajaremos en esta Tesis está formado por Ca^{2+} y un indicador de Ca^{2+} de tipo SW, F, donde el Ca^{2+} reacciona con el indicador (ver Eq. (2.1)), formando un compuesto, CaF. Todos los cálculos que se presentan en esta Tesis están hechos bajo la hipótesis de que CaF es la única especie fluorescente y de que el indicador con y sin Ca^{2+} ligado difunde con el mismo coeficiente de difusión libre, D_F. Bajo estas hipótesis, y en el límite de reacciones rápidas que supone que los tiempos que caracterizan a la reacción de pegado y despegado entre el Ca^{2+} y el indicador son más rápidos que los de la difusión, la función de autocorrelación puede escribirse mediante la

siguiente expresión analítica [38]:

$$G(\tau) = \frac{Go_F}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_F}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_F}}} + \frac{Go_{ef1}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_{ef1}}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_{ef1}}}} + \\ + \frac{Go_{ef2}\, e^{-\nu_F\,\tau}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_{ef2}}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_{ef2}}}} \tag{1.12}$$

donde $\tau_F = w_r^2/(4D_F)$ y $\tau_{efi} = w_r^2/(4D_{efi})$, $i = 1, 2$. Los D_{efi} son coeficientes de difusión efectivos similares a los de las Ecs. (1.2) y (1.3), es decir, promedios pesados de los coeficientes de difusión libre de las especies del sistema que dependen de las concentraciones y tasas de reacción. La tercera componente de esta expresión está multiplicada por un término exponencial ($e^{-\nu_F\tau}$), donde ν_F, como se explicará en detalle más adelante, está relacionado con la tasa de disociación entre Ca^{2+} y el indicador.

Caso de Ca^{2+}, un *buffer* de Ca^{2+}, y un indicador SW

El otro sistema que consideraremos desde un punto de vista teórico es uno conteniendo Ca^{2+}, un indicador SW y un *buffer* de Ca^{2+} no fluorescente. Este modelo se estudia porque se acerca más a la situación que se puede encontrar al hacer experimentos de FCS en células donde existen numerosos *buffers* de Ca^{2+} endógenos. Bajo las mismas hipótesis del caso anterior y suponiendo que el *buffer* no fluorescente difunde a la misma tasa, D_E, con y sin Ca^{2+} pegado, la función de autocorrelación en el límite de reacciones rápidas, en este caso, tiene la forma [59]:

$$G(\tau) = \frac{Go_F}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_F}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_F}}} + \frac{Go_{ef1}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_{ef1}}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_{ef1}}}} + \\ + \frac{Go_{ef2}\, e^{-\nu_{ef2}\,\tau}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_{ef2}}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_{ef2}}}} + \frac{Go_{ef3}\, e^{-\nu_{ef3}\,\tau}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_{ef3}}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_{ef3}}}} \tag{1.13}$$

donde $\tau_{efi} = \dfrac{w_r^2}{4D_{efi}}$. También acá los varios, D_{efi}, son coeficientes de difusión efectivos aunque ahora son combinación de los coeficientes libres del Ca^{2+}, el fluoróforo

y el *buffer* no fluorescente. Las tasas, ν_{efi}, son funciones de las concentraciones y las tasas de reacción. D_F, D_E y los varios D_{efi} y ν_{efi} son los parámetros que caracterizan las ramas de autovalores del sistema de reacción-difusión linealizado alrededor de la solución de equilibrio (para más detalles ver Apéndice A).

1.5. Esquema de la Tesis

El trabajo presentado en esta Tesis está centrado en la cuantificación de parámetros biofísicos que caracterizan a los procesos que determinan la dinámica espacio-temporal del Ca^{2+} intracelular. En particular nos centramos en el coeficiente de difusión del Ca^{2+} y de los *buffers* de Ca^{2+} endógenos.

En el Capítulo 2, se desarrollará un estudio teórico de ciertas aproximaciones de la función de autocorrelación. En primer lugar se estudiarán los límites de la aproximación por reacciones rápidas en el caso de un sistema de Ca^{2+} y un indicador. En segundo lugar, se analizará si en el caso de un sistema con Ca^{2+} y dos trampas (un *buffer* y un indicador) es posible, para ciertos conjuntos de parámetros, simplificar el modelo al caso de Ca^{2+} y una sola trampa. Por último se incluirá un análisis del comportamiento de los coeficientes de difusión efectivos en el sistema formado por Ca^{2+} y dos trampas (un *buffer* y un indicador) y su relación con los pesos de cada componente.

En el Capítulo 3 se re-analizará el sistema compuesto por Ca^{2+}, un indicador de Ca^{2+} SW y un *buffer* de Ca^{2+} no fluorescente fuera del límite de reacciones rápidas. Se compararán las predicciones de la teoría obtenidas bajo las hipótesis usuales sobre las fluctuaciones iniciales (*i.e.*, que la varianza del número de moléculas fluorescentes es igual a su número medio) con los resultados de experimentos de FCS hechos en solución. En base a esta comparación se propone una revisión de la hipótesis usual sobre las fluctuaciones iniciales para el caso de sistemas de reacción-difusión.

En el Capítulo 4 se plantearán las condiciones óptimas del *set-up* experimental para realizar mediciones de FCS en ovocitos de *X. laevis* microinyectados con un indicador fluorescente de Ca^{2+}, y luego se estudiará al Fluo8 como indicador de Ca^{2+} en mediciones de FCS.

En el Capítulo 5, se estudiará el coeficiente de difusión libre de Ca^{2+} en el citosol de ovocitos de *X. laevis* utilizando la optimización previamente mencionada. Al final de este capítulo se estudiará brevemente el coeficiente de difusión de Ca^{2+} en el lumen del retículo endoplasmático de ovocitos de *X. laevis*.

En el Capítulo 6, se estudiarán los resultados de mediciones FCS en ovocitos de *X. laevis* en los que se modificó, por un lado, la concentración de *buffers* mediante la microinyección del *buffer* exógeno EGTA, y por otro la concentración de Ca^{2+}.

En el Capítulo 7, se sintetizan los resultados de esta Tesis, y se plantean las conclusiones generales.

En el Apéndice A se detalla la teoría de FCS para los sistemas estudiados.

En el Apéndice B se detalla la metodología empleada para la obtención de ovocito, su manipulación y conservación. También se describen los pasos seguidos en los experimentos de FCS y de observación de señales de Ca^{2+}. Finalmente se describe el análisis estadístico de los datos experimentales, principalmente la obtención y ajuste de las funciones de autocorrelación (ACFs).

Capítulo 2

Aproximaciones de la función de autocorrelación: estudio teórico

El análisis de las ACFs, provenientes de mediciones de FCS que registran las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia de un indicador de Ca^{2+} de tipo SW, requiere del uso de aproximaciones a fin de obtener expresiones analíticas que permitan inferir información de los procesos biofísicos subyacentes. En este Capítulo se estudiarán desde un punto de vista teórico ciertas aproximaciones usualmente empleadas en el estudio de sistemas similares al considerado en esta tesis.

2.1. Sistema con calcio y un indicador

La observación del ión calcio mediante microscopía de fluorescencia no es directa, ya que la emisión de fluorescencia proviene de una molécula que está ligada a Ca^{2+}. En particular, los indicadores SW aumentan su intensidad de emisión en más de 100 veces mientras están unidos a Ca^{2+}. Por lo tanto, en un sistema de estas características, formado por Ca^{2+} y un indicador SW, F, las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia no sólo se deben al pasaje del complejo F-Ca^{2+}, CaF,

debido a difusión a través del volumen de detección, sino también a la ocurrencia de reacciones de pegado y despegado (Fig. 2.1).

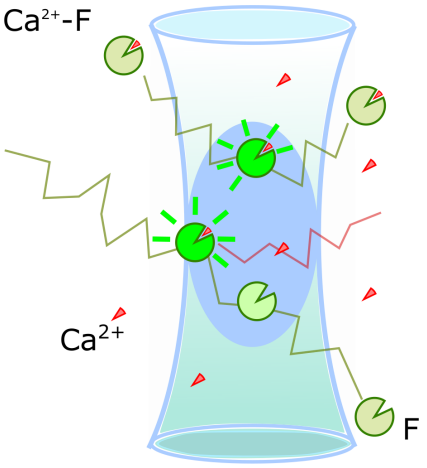

FIGURA 2.1
Esquema de un experimento de FCS para un sistema que contiene Ca^{2+} y un indicador SW, F.

En este caso el esquema de reacción es el siguiente

$$Ca + F \underset{k_{onF}}{\overset{k_{offF}}{\rightleftarrows}} CaF \tag{2.1}$$

con tasas de asociación y disociación, k_{onF} y k_{offF} respectivamente. Las concentraciones en el equilibrio, $[Ca]_{eq}$, $[F]_{eq}$ y $[CaF]_{eq}$ cumplen:

$$[CaF]_{eq} = \frac{[Ca]_{eq}[F]_{tot}}{[Ca]_{eq} + K_{dF}} \tag{2.2}$$

donde $K_{dF} = k_{offF}/k_{onF}$, y $[F]_{tot} = [F]_{eq} + [CaF]_{eq}$ es la concentración total de indicador. Por otro lado, en todos los cálculos teóricos que presentamos en la Tesis suponemos que las moléculas de indicador difunden con el mismo coeficiente libre, D_F, independientemente de si están o no ligadas a Ca^{2+}, mientras que los iones Ca^{2+} difunden con un coeficiente libre, D_{Ca}, mayor que D_F.

2.1.1. FCS en el límite de la Aproximación por reacciones rápidas

En el caso de Ca^{2+} y un indicador SW, F, haciendo los cálculos al estilo de [49], como se describe en el Apéndice A y suponiendo que el indicador es fluorescente sólo cuando está ligado a Ca^{2+}, la función de autocorrelación de las fluctuaciones en la fluorescencia se puede escribir como la suma de tres componentes [38]. En el caso en que las reacciones ocurren en una escala temporal mas rápida que la difusión estas componentes tienen expresiones algebraicas sencillas, Ec. (1.12).

Los coeficientes, D_{ef1} y D_{ef2}, son *coeficientes efectivos*, *i.e.*, promedios pesados entre los coeficientes libres del Ca^{2+}, D_{Ca} y del indicador, D_F, que dependen de las concentraciones y de los parámetros de reacción, y están dados por:

$$D_{ef1} = \frac{D_{Ca} + x_F D_F}{1 + x_F} \tag{2.3}$$

$$D_{ef2} = \frac{x_F D_{Ca} + D_F}{1 + x_F} \tag{2.4}$$

donde $x_F = \frac{[F]_{eq}^2}{[F]_{tot} K_{dF}}$ y:

$$\nu_F = k_{offF} + k_{onF}([F]_{eq} + [Ca]_{eq}) \tag{2.5}$$

Como se mostró en [27], la dinámica en un sistema de reacción-difusión está caracterizada por más de un coeficiente efectivo. Las Ecs. (1.2) y (1.3) así lo demuestran. Usando las aproximaciones usuales sobre las correlaciones instantáneas que se describen más abajo, los pesos de cada una de las componentes en la Ec. (1.12), Go_F, Go_{ef1} y Go_{ef2} están dados por:

$$Go_F = \frac{1}{V_{ef}[F]_{tot}} \tag{2.6}$$

$$Go_{ef1} = \frac{1}{V_{ef}[CaF]_{eq}} \frac{[F]_{eq}^2}{[F]_{tot} K_{dF}} \frac{K_d}{(K_{dF} + [F]_{eq} + [Ca]_{eq})} \tag{2.7}$$

$$Go_{ef2} = \frac{1}{V_{ef}[CaF]_{eq}} \frac{K_{dF}}{(K_{dF} + [F]_{eq} + [Ca]_{eq})} \tag{2.8}$$

La suma de todos los pesos es inversamente proporcional a la concentración de partículas fluorescentes:

$$Go_{tot} = Go_{ef1} + Go_{ef2} + Go_F = \frac{1}{V_{ef}[CaF]_{eq}} \tag{2.9}$$

Como ya lo mencionamos, esta relación se basa en la suposición que se suele hacer en relación a las fluctuaciones en el número de partículas fluorescentes. Más específicamente, se supone que las fluctuaciones en el número de moléculas de especies distintas no están instantáneamente correlacionadas entre sí, que las de una misma especie lo están en un mismo punto del espacio y que siguen una estadística de Poisson [49]. Como discutiremos más adelante, estas hipótesis pueden no ser correctas cuando hay reacciones involucradas. Revisarlas, por otro lado, no sólo modifica el peso total de la ACF sino también los pesos de cada componente individual.

Independientemente de las suposiciones sobre las correlaciones instantáneas, la suma de los dos coeficientes de difusión efectivos satisface:

$$D_{ef1} + D_{ef2} = D_{Ca} + D_F \tag{2.10}$$

La aproximación analítica de la ACF dada por la Ec. (1.12) es siempre válida para tiempos, τ , suficientemente largos tal que el tiempo característico de la reacción ($\tau_{reac} \equiv (k_{off} + k_{on}([Ca]_{eq} + [F]_{eq}))^{-1}$) sea del mismo orden o menor que el tiempo de difusión a través del volumen [56, 58]. Sin embargo, la primer componente, asociada al *dye*, es exacta y no implica ninguna aproximación.

2.1.2. Límites en la aplicación de la aproximación por reacciones rápidas

El propósito de esta sección es estudiar cuándo es posible utilizar la aproximación de la ACF por reacciones rápidas para estimar diferentes parámetros biofísicos a partir de experimentos de FCS realizados en un sistema con Ca^{2+} y un indicador SW. Nos concentramos, en particular, en el caso del Fluo4 dextrano con el que se hicieron experimentos en solución tanto para su versión de alta como de baja afinidad. Para tal fin, se calculó la ACF *full*, $G(\tau)$, numéricamente, mediante las Ecs. (A.5)-(A.8) del apéndice, usando un algoritmo adaptive Lobatto quadrature, con la función *quadl* de la plataforma MatLab (The MathWorks, Natick, MA) y los parámetros listados en la Tabla 2.2. Los resultados fueron comparados con la ACF aproximada, $G_{approx}(\tau)$, dada por la Ec. (1.12) y los mismos parámetros de la Tabla 2.2, Fig. 2.2. La diferencia entre las dos funciones se calculó como:

$$\varepsilon^2 = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\left(G(\tau_i) - G_{approx}(\tau_i)\right)^2 \tag{2.11}$$

con n el número total de puntos.

En la Fig. 2.3 (a) se grafica ε^2 como función de la concentración total de Fluo4, $[F4]_{tot}$, para Fluo4 de alta y baja afinidad (línea sólida y línea punteada, respectivamente). Para ambos indicadores se observa que ε^2 primero aumenta y luego disminuye a medida que aumenta $[F4]_{tot}$. La diferencia es mayor para el indicador de baja afinidad, alcanzando un valor máximo, $\sim 3{,}3\,10^{-10}$, en $[F4]_{tot} \sim 3.7\ \mu M$. Para el indicador de alta afinidad el valor máximo, $\sim 1{,}1\,10^{-10}$ se alcanza a $[F4]_{tot} \sim 6{,}5\ \mu M$. En las concentraciones de indicador más bajas $G(\tau)$ y $G_{approx}(\tau)$ son indistinguibles, mientras que $G_{approx}(\tau)$ decae a tiempos de correlación más bajos que $G(\tau)$ para aquellas concentraciones de indicador, $[F4]_{tot}$, en las que su diferencia es máxima (datos no presentados).

TABLA 2.1: Soluciones.
Todas las soluciones contienen además $[Ca]_{tot} = 4285\ nM$

Fluo4 alta afinidad		Fluo4 baja afinidad	
Solución	$[F4]_{tot}(nM)$	Solución	$[F4]_{tot}(nM)$
1	429	10	214
2	857	11	429
3	1371	12	857
4	1886	13	1114
5	2571	14	1371
6	4286	15	1886
7	9000	16	2571
8	15000	17	4286
9	19286	18	9000

TABLA 2.2: Parámetros usados para calcular numéricamente las ACF's *full* y aproximada. Para las concentraciones de indicador, usamos los valores listados en la Tabla 2.1.

Parámetro	Valor	
w_r	$0.28\ \mu m$	
w	5	
D_{Ca}	$760\ \mu m^2/s$	
D_F	$85\ \mu m^2/s$	
$[Ca]_{tot}$	$4285\ nM$	
	Fluo4 alta Afinidad	Fluo4 baja Afinidad
K_{dF}	$772\ nM$	$2600\ nM$
k_{offF}	$80\ s^{-1}$	$300\ s^{-1}$

Luego se analizó qué tiempos de correlación podrían derivarse del ajuste de la ACF *full* con una expresión de la forma:

$$G(\tau) = \frac{G_0}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_0}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_0}}} + \frac{G_1}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_1}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_1}}} + \frac{G_2 e^{-\nu\tau}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_2}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_2}}} \quad (2.12)$$

donde $w = w_z/w_r$ es un parámetro relacionado con la geometría del volumen confocal. Los distintos tiempos están relacionados con los coeficientes de difusión, $\tau_i = w_r^2/(4D_i)$, $i = 1, 2, 3$, donde w_r es la cintura del haz. Los resultados del ajuste dependen del tiempo de resolución con el que se calcula la ACF. Aquí se muestran los resultados obtenidos usando la misma resolución temporal que la obtenida con el *set-up* experimental con el que se hicieron los experimentos que se describirán más adelante (paso temporal= 20 μs, para mayor detalles ver Apéndice B). Se

probaron dos opciones, primero se fijaron las escalas temporales como en la aproximación por reacciones rápidas y se ajustaron los pesos. En segundo lugar, se ajustaron tanto los pesos como los tiempos.

Del segundo test determinamos que los valores obtenidos del ajuste para τ_0 , ν_F y los pesos, G_0, G_1 y G_2, son similares a aquellos prescriptos por la aproximación por reacciones rápidas. Los otros dos tiempos, τ_1 y τ_2, difieren muy poco de los de la aproximación. Estos resultados están ilustrados en la Fig. 2.3 (b) donde se muestran los cocientes τ_0/τ_F, τ_1/τ_{ef1}, τ_2/τ_{ef2} y ν_F/ν, entre los valores del ajuste y los de la aproximación por reacciones rápidas, para el indicador Fluo4 de alta afinidad. La diferencia, ε^2, entre la ACF full y la del fiteo, usando estos parámetros fue menor a 2,289 10^{-10}. Resultados similares se obtuvieron para Fluo4 de baja afinidad con $\varepsilon^2 \leq$ 2,785 10^{-10}. Al ajustar sólo los pesos y fijar las escalas temporales a los valores de la aproximación por reacciones rápidas se obtuvieron valores similares de ε^2 (2,278 10^{-10} y 2,606 10^{-10} para Fluo4 de alta y baja afinidad, respectivamente). En la Fig. 2.3 (c) se muestran los cocientes entre los pesos obtenidos del ajuste y los de la aproximación para Fluo4 de alta afinidad.

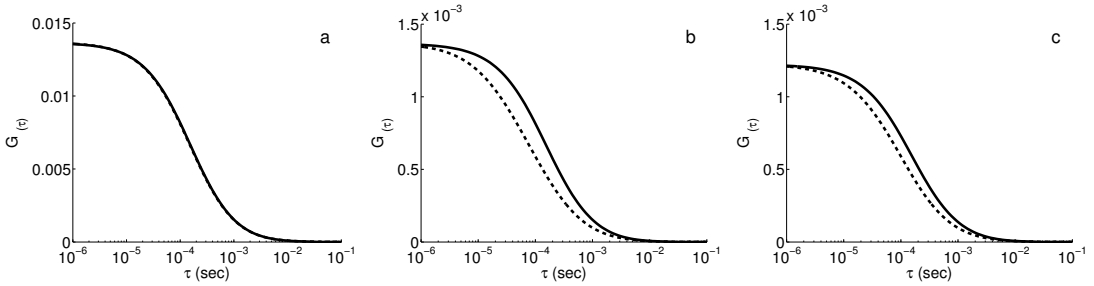

FIGURA 2.2
ACF *full* (línea sólida, Ecs. (A.5)-(A.8)) y aproximada (línea punteada, Ec. (1.12) para Fluo4 de alta afinidad usando los parámetros listados en la Tabla 2.2. $[F4]_{tot}$ = 429 nM (a), 7500 nM (b), 15 μM (c).

2.2. Sistema con calcio, un indicador y un *buffer*

En el caso del Ca^{2+} intracelular, el sistema se vuelve más complejo, ya que en la célula además del indicador agregado exógenamente hay *buffers* endógenos que

atrapan Ca^{2+}. Es decir que sería un sistema con Ca^{2+} y, si se considera un *buffer* endógeno colectivo, dos compuestos que actúan como trampa. En esta Sección estudiamos teóricamente la ACF que puede derivarse para un sistema de reacción-difusión formado por Ca^{2+}, un indicador SW de Ca^{2+}, F, y un *buffer* exógeno, E. Como en la Sec. (2.1), suponemos que la reacción entre el Ca^{2+} y el indicador es

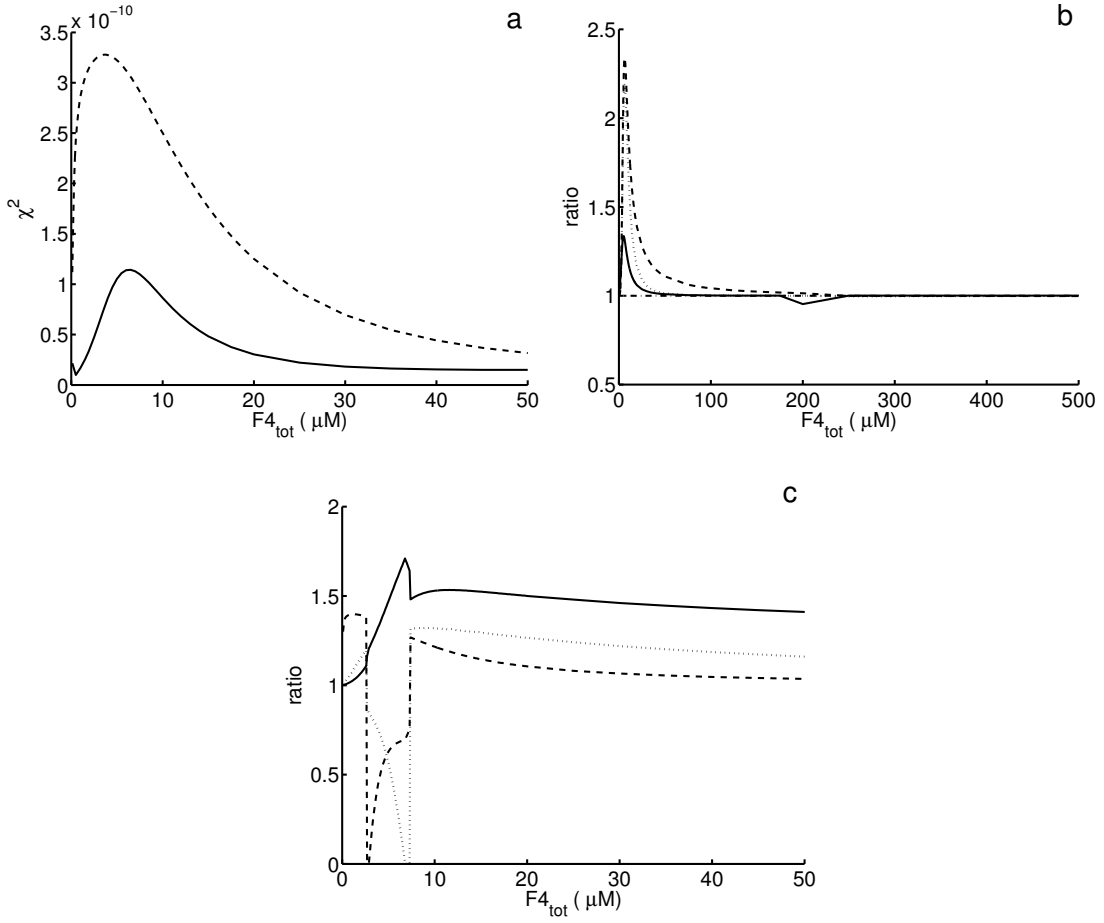

FIGURA 2.3

(a) Diferencia entre las ACFs *full* y aproximada obtenidas usando los parámetros de la Tabla 2.2, para el indicador Fluo4 de alta (línea sólida) y baja (línea a rayas) afinidad. (b) Cocientes τ_0/τ_F (línea sólida), τ_1/τ_{ef1} (línea a rayas), τ_2/τ_{ef2} (línea de puntos) y ν_F/ν (línea de puntos y rayas) entre los tiempos del ajuste y los de la aproximación por reacciones rápidas como función de $[F4]_{tot}$ para Fluo4 de alta afinidad con los parámetros de la Ec. (2.12) libres para ajustar. (c) Similar a (b) pero para los cocientes entre los pesos del ajuste y los de la aproximación por reacciones rápidas, G/G_F (línea sólida), G_1/G_{ef1} (línea a rayas), G_2/G_{ef2} (línea de puntos) como función de $[F4]_{tot}$ para Fluo4 de alta afinidad cuando las escalas temporales de la Ec. (2.12) están fijas en los valores de la aproximación por reacciones rápidas.

de la forma de la Ec. (2.1). Por otro lado suponemos que Ca^{2+} y E reaccionan de acuerdo a:

$$Ca + E \underset{k_{onE}}{\overset{k_{offE}}{\rightleftarrows}} CaE \tag{2.13}$$

donde k_{onE} y k_{offE} son las tasas de reacción que definen la constante de disociación, $K_{dE} \equiv k_{offE}/k_{onE}$. Como en el caso del indicador, suponemos que el *buffer* difunde con el mismo coeficiente de difusión libre, D_E, independientemente de que esté ligado a Ca^{2+} o no. En este caso además de la condición de equilibrio dada por la Ec. (2.2), consideramos el equilibrio entre Ca^{2+} y E:

$$[CaE]_{eq} = \frac{[Ca]_{eq}[E]_{tot}}{[Ca]_{eq} + K_{dE}} \tag{2.14}$$

donde $[E]_{tot}$ es la concentración de *buffer* total.

2.2.1. Aproximación por reacciones rápidas

En este caso, la función de autocorrelación en el límite de reacciones rápidas es la suma de cuatro componentes (Ec. (1.13)), dos de de ellas puramente difusivas y las otras con un factor exponencial. Como en el caso de una sola trampa, la primer componente en Ec. (1.13) corresponde al coeficiente de difusión libre del indicador. Este término, como antes, es exacto y el peso está dado por Ec.(2.6).

Los pesos de las otras componentes no cuentan con expresiones analíticas. Pero como antes, en base a las hipótesis usuales sobre las correlaciones iniciales, la suma de todos los pesos resulta inversamente proporcional a la concentración de partículas fluorescentes:

$$Go_{tot} = Go_{ef1} + Go_{ef2} + Go_{ef3} + Go_F = \frac{1}{V_{ef}[CaF]_{eq}} \tag{2.15}$$

Por otro lado cada una de las otras componentes está caracterizada por un coeficiente de difusión efectivo: D_{ef1}, D_{ef2} y D_{ef3}. En este caso los coeficientes efectivos

son más complicados ya que son combinaciones de los tres coeficientes libres involucrados, D_{Ca}, D_F y D_E. Las dos últimas componentes, además están multiplicadas por un término exponencial con parámetro asociados a las tasas de reacción, ν_{ef2} y ν_{ef3}. D_{ef1} tiene una expresión analítica simple:

$$D_{ef1} = \frac{D_{Ca} + x_F D_F + x_E D_E}{1 + x_F + x_E}, \tag{2.16}$$

Sin embargo, las expresiones analíticas de D_{ef2}, D_{ef3}, ν_{ef2} y ν_{ef3} son muy largas y no serán mencionadas. Sí es importante notar que D_{ef2} y D_{ef3}, a diferencia de D_{ef1}, dependen de la relación de los k_{off}, $k_E = k_{offE}\ /k_{offF}$. Además se satisfacen las siguientes relaciones:

$$D_{ef1} + D_{ef2} + D_{ef3} = D_{Ca} + D_F + D_E, \tag{2.17}$$

$$\nu_{ef2} + \nu_{ef3} = \nu_F + \nu_E, \tag{2.18}$$

donde $\nu_F = k_{offF}([F]_{eq}/K_{dF} + [F]_{tot}/[F]_{eq})$ y $\nu_E = k_{offE}([E]_{eq}/K_{dE} + [E]_{tot}/[E]_{eq})$ están relacionadas con las escalas temporales obtenidas si E o F no están presentes en el sistema, respectivamente.

Dada la gran cantidad de variables, la estimación de parámetros biofísicos con este modelo es sumamente compleja. A continuación analizaremos si dependiendo de la relación de los parámetros es posible aproximar el sistema al de Ca^{2+} y una sola trampa.

2.2.2. Aproximación del modelo a un caso más simple

Teniendo en cuenta que los coeficientes de difusión efectivos dependen de la concentración de Ca^{2+}, indicador o *buffer*, mostramos en la Fig. 2.4 la relación entre los coeficientes de difusión efectivos, D_{ef1}, D_{ef2} y D_{ef3}, y el coeficiente de difusión de Ca^{2+} como función de la concentración total de Ca^{2+}, $[Ca]_{tot}$. Las figuras se realizaron usando parámetros similares a los esperados para el caso de una solución acuosa conteniendo Ca^{2+}, el indicador Fluo4 dextrano de baja afinidad y el *buffer*

de Ca^{2+}, EGTA. Aunque las constantes de disociación son conocidas, usualmente no se tienen valores confiables de las tasas de asociación y disociación, k_{on} y k_{off}. Por este motivo, también exploramos de qué modo varían los coeficientes de difusión efectivos cuando cambia la relación entre las tasas de disociación, k_E. En las figuras también mostramos los coeficientes de difusión efectivos obtenidos en un sistema de Ca^{2+} y una sola trampa (B, donde $B = Fluo4$ o $B = EGTA$), dados por:

$$D_{ef1}^{Ca-B} = \frac{D_{Ca} + x_F D_B}{1 + x_B} \tag{2.19}$$

$$D_{ef2}^{Ca-B} = \frac{x_B D_{Ca} + D_B}{1 + x_B}, \tag{2.20}$$

con $x_B = [B]_{eq}^2/(K_{dB}[B]_{tot})$.

Podemos observar que en todos los casos $D_{ef1}= D_{ef1}^{Ca-E}$ y, además, $D_{ef1} \to D_{Ca}$ a medida que $[Ca]_{tot}$ aumenta. Por otro lado, vemos que si $K_E < K_{dE}/K_{dF}$ ($k_{onE}/k_{onF} > 1$), $D_{ef2} \to D_F$ y $D_{ef3} \to D_E$ a medida que $[Ca]_{tot}$ aumenta. En cambio cuando $K_E > K_{dE}/K_{dF}$ ($k_{onE}/k_{onF} < 1$), y $D_{ef2} \to D_E$ y $D_{ef3} \to D_F$ a medida que $[Ca]_{tot}$ aumenta. En particular, en este último caso lo que vemos es que $D_{ef1}= D_{ef1}^{Ca-E}$, $D_{ef2}= D_{ef2}^{Ca-E}$ y $D_{ef3}= D_F$, es decir que dos de los coeficientes de difusión efectivos se comportan como en el caso de Ca^{2+} y EGTA, y el otro coeficiente es igual a D_F, para todo el rango de concentraciones Ca^{2+} estudiado.

En el caso del Ca^{2+} celular y de un *buffer* endógeno, se espera que la relación entre los coeficientes de difusión libre del *buffer* y del indicador se invierta respecto a lo presentado en la Fig. 2.4. Es decir que $D_F > D_E$. En la Fig.2.4 (d) mostramos la relación entre los coeficientes de difusión efectivos, D_{ef1}, D_{ef2} y D_{ef3}, y el coeficiente de difusión de Ca^{2+} como función de la concentración total de Ca^{2+}, $[Ca]_{tot}$, asumiendo un *buffer* celular casi inmóvil, con $D_E = 0\ \mu m^2/s$.

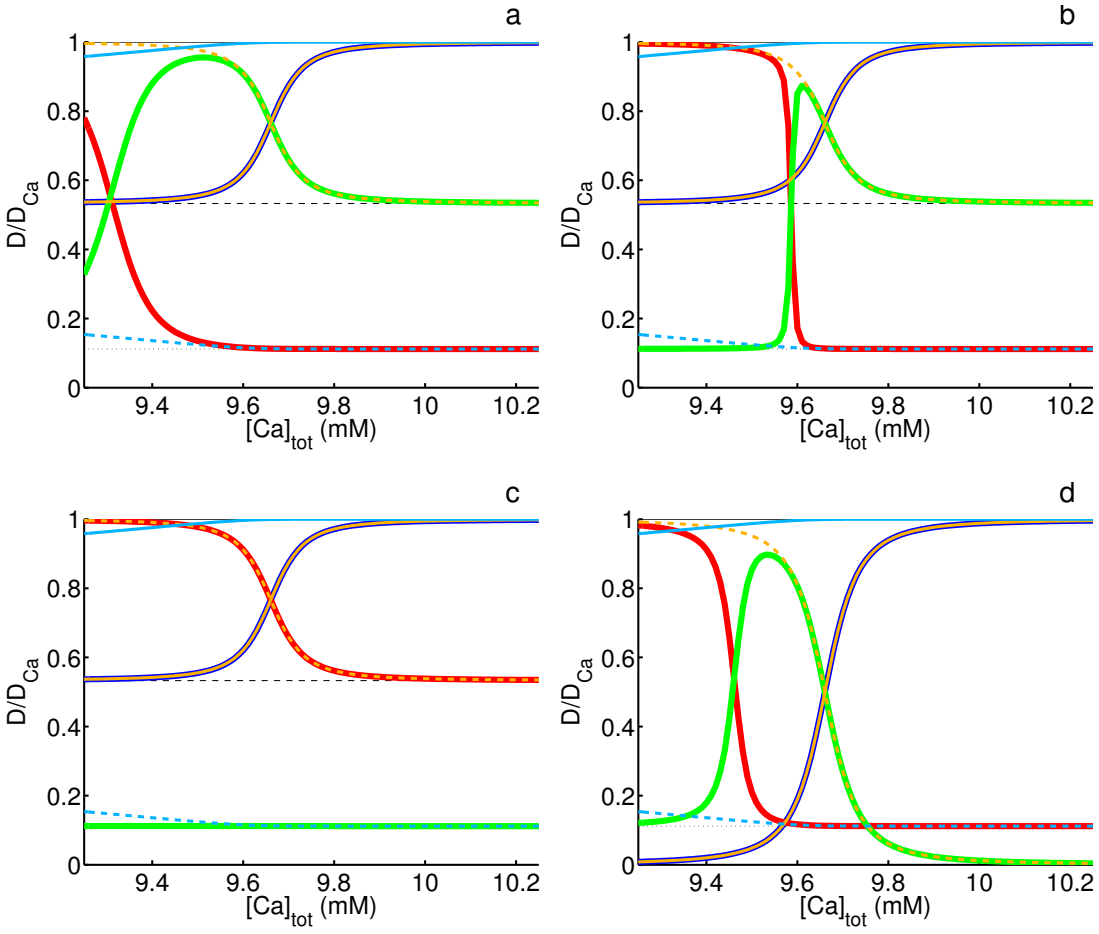

FIGURA 2.4: Cocientes de los tres coeficientes de difusión efectivos, D_{ef1} (línea sólida azul), D_{ef2} (línea sólida roja) y D_{ef3} (línea sólida verde), respecto al coeficiente de difusión libre de Ca^{2+}, en un sistema formado por Ca^{2+}, Fluo4 y EGTA, junto con los dos coeficientes de un sistema con Ca^{2+} y Fluo4, D_{ef1}^{Ca-F} (línea sólida celeste), D_{ef2}^{Ca-F} (línea a rayas celeste) y de un sistema con Ca^{2+} y EGTA, D_{ef1}^{Ca-E} (línea sólida naranja), D_{ef2}^{Ca-E} (línea a rayas naranja), y los coeficientes de difusión libres del Ca^{2+}, D_{Ca} (línea sólida negra), del *dye*, D_F (línea de puntos negra), y del EGTA, D_E (línea a rayas negra), como función de la concentración total de Ca^{2+}. Todos los gráficos fueron hechos con $D_{Ca} = 760\ \mu m^2/s$, $D_F = 85\ \mu m^2/s$, $[F4]_{tot} = 676\ nM$, $[EGTA]_{tot} = 9.66\ mM$, $K_{dF} = 2600\ nM$ y $K_{dE} = 150\ nM$. En (a), (b) y (c): $D_E = 405\ \mu m^2/s$, y $k_{offE} = 1\ s^{-1}$. Luego, en (a) $k_E = 0.001$, $k_{offF} = 1000\ s^{-1}$; en (b) $k_E = 0.01$, $k_{offF} = 100\ s^{-1}$; y en(c) $k_E = 0.1$, $k_{offF} = 10\ s^{-1}$.(d) La figura fue hecha con $D_E = 0\ \mu m^2/s$, $k_{offF} = 300\ s^{-1}$, y $k_{offE} = 0.75\ s^{-1}$. Esperamos que esta situación sea más parecida a la que se podría encontrar en experimentos de FCS en células intactas.

2.3. Conclusiones

En este Capítulo presentamos estudios teóricos realizados para determinar cómo interpretar los tiempos de correlación que pueden extraerse en experimentos de FCS realizados en sistemas de reacción-difusión, en particular, aquéllos en donde se observa la fluorescencia emitida por indicadores de Ca^{2+} de tipo SW en presencia de Ca^{2+}. El objetivo, en particular, era analizar hasta qué punto es posible estimar el coeficiente de difusión libre de Ca^{2+} u otros parámetros que afectan su dinámica en estos sistemas a partir de las fluctuaciones de un indicador que fluoresce al ligar Ca^{2+}. Para tal fin estudiamos, por un lado, un sistema en el que las especies relevantes eran Ca^{2+} y un fluoróforo SW de Ca^{2+} y, por el otro, uno en el que había, además, un *buffer* de Ca^{2+} adicional no fluorescente. Con este último sistema buscamos imitar la situación que puede encontrarse en el interior celular donde existen numerosos *buffers* de Ca^{2+} en el citosol.

Para el sistema formado por Ca^{2+} e indicador analizamos hasta qué punto era posible aproximar la función de autocorrelación de las fluctuaciones por las expresiones que pueden obtenerse en el límite de reacciones rápidas, es decir, cuando la escala temporal de las reacciones es más corta que la de difusión. Lo hicimos para el conjunto de concentraciones utilizadas en los experimentos de FCS reportados en [38]. En particular encontramos que la diferencia entre la ACF exacta y la aproximada dada por la Ec. (2.11) era menor a la millonésima parte del valor máximo de la ACF tanto al dejar libres todos los parámetros de ajuste (Figs. 2.2 y 2.3 (a)) como al dejar fijos los tiempos en los valores dados por la aproximación de reacciones rápidas y ajustar sólo los pesos (datos no mostrados). El error siempre fue mayor para el caso del fluoróforo de baja afinidad aumentando, para ambos fluoróforos, para cierto rango de concentraciones de indicador (Fig. 2.3). Los tiempos característicos derivados de los ajustes (τ_i y $1/\nu$) no diferían en más de un factor ~ 2 respecto de los correspondientes a la aproximación de reacciones rápidas (Fig. 2.3 (b)) al dejar todos los parámetros libres durante el fiteo. Los valores inferidos para los pesos de las tres componentes eran los que más diferían en relación a lo predicho por la aproximación de reacciones rápidas (Fig. 2.3 (c)).

Los mayores apartamientos entre los valores derivados de los ajustes y los de la teoría en el límite de reacciones rápidas se daban aproximadamente en el mismo rango de concentraciones de indicador en todos los casos (Fig. 2.3). De este estudio concluimos que los tiempos característicos que pueden derivarse de experimentos de FCS con Ca^{2+} y el indicador SW Fluo4 dextrano pueden ser interpretados usando la teoría en la aproximación de reacciones rápidas para un gran rango de concentraciones de indicador, y que los mismos pueden a lo sumo diferir en un factor $\sim$ 2,4 para los valores de concentración para los que la aproximación de reacciones rápidas funciona peor.

Para el sistema formado por Ca^{2+}, indicador y *buffer* no fluorescente nos concentramos en el estudio de los coeficientes de difusión efectivos como función de la concentración total de Ca^{2+}, ya que este estudio fue asociado a la realización de experimentos en los que se varió dicha concentración [59]. En este caso los coeficientes de difusión efectivos que caracterizan la ACF son combinaciones más o menos complicadas de los tres coeficientes libres del problema que dependen de las concentraciones y parámetros de reacción. Estudiamos entonces en qué rangos dichos coeficientes efectivos podían ser aproximados por expresiones más sencillas: o bien por coeficientes libres o bien por coeficientes efectivos de sistemas con sólo dos especies, Ca^{2+} y *dye* o Ca^{2+} y *buffer* no fluorescente. De este estudio, ilustrado en la Fig. 2.4 (a-c), concluimos que, salvo en regiones muy particulares de la concentración total de Ca^{2+}, los coeficientes efectivos del problema son bien aproximados por estas expresiones más sencillas. Es de esperar entonces que, si el ajuste de los experimentos de FCS realizados en soluciones acuosas conteniendo Ca^{2+}, un indicador SW y un *buffer* no fluorescente permite extraer tiempos de correlación asociados a los coeficientes de difusión efectivos, puedan derivarse, a partir de los mismos, los coeficientes de difusión libre de las especies involucradas. En efecto, esto se pudo hacer en experimentos de FCS, realizados previamente en nuestro grupo, en soluciones conteniendo Ca^{2+}, el indicador Fluo4 dextrano de baja afinidad y el *buffer* de Ca^{2+}, EGTA [59], obteniéndose valores dentro de los esperados para D_{Ca} ($(774 \pm 157)\ \mu m^2/s$), D_E ($(450 \pm 8)\ \mu m^2/s$) y D_{F4} ($(60 \pm 7)\ \mu m^2/s$). Este resultado fue muy promisorio para avanzar en la realización de los

experimentos de FCS en células intactas donde la presencia de *buffers* de Ca^{2+} es inevitable (situación en la que esperamos un comportamiento de los coeficientes efectivos más parecido al de la Fig. 2.4 (d)). El ajuste de los experimentos de [59], sin embargo, se hizo usando una expresión para la ACF con sólo dos componentes puramente difusivas, Ec.(B.1).

Teniendo en cuenta la variación esperada de los coeficientes efectivos (teóricos) con la concentración de Ca^{2+} total fue posible interpretar los dos coeficientes obtenidos a partir del ajuste. En particular, uno de ellos siempre correspondió al coeficiente libre del indicador (D_{F4}= (60 ± 7) $\mu m^2/s$) [59]. El significado del otro, sin embargo, fue diferente dependiendo de $[Ca]_{tot}$ [59]. Analizamos en el Capítulo que sigue la razón que permitió derivar este otro coeficiente en el caso de cada concentración utilizada en [59]. Esta explicación requiere modificar la suposición sobre las correlaciones iniciales que lleva a que el peso total de la ACF sea la inversa del número de moléculas fluorescentes en el volumen (Ecs. (2.9) y (2.15)). Esta modificación, por otro lado, permite explicar la discrepancia observada entre el peso total derivado de los experimentos y el esperado a partir de la construcción de las soluciones, discrepancia que se observa también en los experimentos sin EGTA [38], como se explica a continuación.

Las aproximaciones de la ACF acá analizadas e ilustradas en las Figs. 2.2 y 2.3 fueron utilizadas para interpretar los resultados obtenidos a partir de experimentos de FCS realizados en solución acuosa conteniendo Ca^{2+} y distintas concentraciones del indicador Fluo4 dextrano de baja o alta afinidad [38]. Por otro lado, la ACF aproximada por la Ec. (1.12) fue usada para interpretar los resultados de experimentos de FCS realizados en solución acuosa conteniendo el indicador Fluo4 dextrano de baja afinidad, el *buffer* de Ca^{2+}, EGTA, y distintas concentraciones de Ca^{2+} [59]. Nos referiremos en más detalle a estos experimentos en el Capítulo siguiente. En el caso del primer tipo de experimentos, la ACF pudo ser ajustada por una expresión de la forma de la Ec.(2.12) [38]. A partir de los ajustes pudo identificarse el tiempo de correlación asociado al coeficiente de difusión libre del fluoróforo (el de la primer componente de la Ec. (1.12) de acuerdo a la teoría) como aquél que no variaba con la concentración de indicador. Los valores obtenidos a

partir de este término tanto para el Fluo4 de alta como para el de baja afinidad estuvieron dentro de los esperados ($D_{F4} = (65 \pm 7)\ \mu m^2/s$ y $(89 \pm 8)\ \mu m^2/s$ para el de alta y baja afinidad respectivamente [38], mientras que el valor obtenido para la tetrametilrodamina dextrano de 10 kDa, TMR-D, es $\sim 85\ \mu m^2/s$ [39]. Lo más importante es que, teniendo en cuenta que la suma de los coeficientes de difusión efectivos debe permanecer constante e igual a la suma de los dos coeficientes libres del problema (Ec. (2.10)), también pudo deducirse el coeficiente de difusión libre de Ca^{2+} obteniendo los valores $(801 \pm 70)\ \mu m^2/s$ y $(915 \pm 68)\ \mu m^2/s$ a partir de los experimentos con Fluo4 de alta y baja afinidad, respectivamente [38], los que se comparan muy bien con el valor esperado, 760 $\mu m^2/s$ [61]. Dado que en los experimentos sólo se registra la fluorescencia proveniente del indicador, que está dominada por la emitida cuando el mismo está ligado a Ca^{2+}, la única forma de poder estudiar la difusión del Ca^{2+} es permitiendo que ocurran bastantes reacciones entre ambas especies en el volumen de observación. La aplicación de la teoría a los experimentos también permitió inferir la constante, k_{off}, con buenos resultados. En particular, se obtuvo $k_{off} = (88 \pm 19)\ s^{-1}$ y $k_{off} = (483 \pm 61)\ s^{-1}$ para el Fluo4 de alta y baja afinidad, respectivamente [38]. Usando la K_d provista por el fabricante para calcular $k_{on} = k_{off}/K_d$ se obtuvieron valores similares para ambos indicadores ($k_{on} = (0.114 \pm 0.025)\ nM^{-1}s^{-1}$ para el de alta afinidad y $k_{on} =(0.186 \pm 0.023)\ nM^{-1}s^{-1}$ para el de baja). Esto resultó consistente con el hecho de que en los indicadores de Ca^{2+} basados en BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) como el Fluo4, valores crecientes de K_d son consecuencia, principalmente, de un aumento en la tasa de disociación, k_{off} [40, 62]. Si bien la aproximación dada por la Ec. (1.12) fue utilizada para estudiar otros sistemas [55], nuestra aplicación tiene diferencias importantes respecto de estos trabajos previos. En [55] la molécula más masiva es la biológiamente relevante, por lo tanto su coeficiente de difusión es fácilmente estimable a partir de la primer componente de la Ec. (1.12). En el caso del Ca^{2+} y un indicador SW estamos en la situación opuesta, ya que el coeficiente de difusión libre de la especie de interés sólo aparece en la ACF a través de los coeficientes de difusión efectivos y hubo que deducirlo a partir de ellos.

Si bien los tiempos característicos pudieron ser inferidos correctamente, como era de esperar en base a los estudios numéricos, los pesos no se correspondieron con lo predicho por la aproximación de reacciones rápidas. Ahora bien, también el peso total de la ACF derivado de los ajustes presentó discrepancias respecto de la teoría resultando bastante mayor al predicho por la Ec. (2.9) como si hubiera una concentración menor de Ca^{2+} ligada a indicador que la esperada en base a las concentraciones usadas en los experimentos. De acuerdo a los estudios de [57], el tiempo de convergencia al valor esperado es mucho más largo para el peso que para los tiempos de correlación de la ACF. Sin embargo decidimos explorar otras posibles razones para esta discrepancia, en particular, algún tipo de artefacto experimental. Como discutimos en el Capítulo siguiente creemos que es la hipótesis usual sobre las correlaciones iniciales la que no se cumple en los sistemas de reacción-difusión, especialmente en experimentos donde hace falta una reacción (la de fluoróforo y Ca^{2+}) para que el indicador emita suficientes fotones. De todos modos discutimos acá otras posibles fuentes para esta discrepancia. En particular, los experimentos analizados con la teoría fueron hechos colocando una gota de solución sobre el cubre-objetos. Exploramos entonces la posibilidad de que hubiera adsorción de los reactivos en el cubre. En particular, la adsorción de las proteínas utilizadas fue el argumento utilizado en [54] para explicar las diferencias observadas en las "pseudo"-tasas de reacción de primer orden estimadas usando FCS. Si Ca^{2+} o el indicador son parcialmente adsorbidos por el cubre-objetos entonces sus concentraciones en la gota, $[Ca]_{tot}$ y $[F]_{tot}$, serían distintas a las utilizadas para preparar la solución, $[Ca^{2+}]_{tot}$ y $[F4]_{tot}$. En ese caso el peso total, Go_{tot}, estaría dado por la Ec. (2.9) pero con la concentración, $[CaF]_{eq}$, determinada por la concentraciones verdaderas en la gota, no la que se puede calcular, $[CaF4]$, a partir de las concentraciones usadas para preparar dicha gota. Mostramos en las Figs. 2.5 (a) y (b) gráficos de $V_{ef}[CaF4]$ (línea sólida) y de $V_{ef}[CaF]_{eq}$ (línea a rayas) como función de $[CaF4]$, para el indicador de alta (en (a)) y el de baja (en (b)) afinidad. En ambas figuras calculamos $[CaF]_{eq}$ bajo la suposición de que las fracciones adsorbidas por el cubre-objetos de Ca^{2+} e indicador totales eran, respectivamente, $\zeta_C = 0{,}8$ y $\zeta_F = 0{,}5$. Las curvas a rayas son similares a

las observadas experimentalmente [38] e incluso muestran una disminución de la discrepancia al aumentar la concentración de indicador como en los experimentos. Ahora bien, si la concentración total de fluoróforo en la gota es distinta de la usada para preparar la solución el peso del término asociado al coeficiente libre del indicador (Ec. (2.10)) también debería diferir respecto del esperado en base a las concentraciones usadas para preparar las soluciones. Sin embargo, si bien hubo cierta discrepancia entre los valores obtenidos a partir de los experimentos y los esperados teóricamente, la diferencia fue en promedio del 10 %. Esta diferencia entre el error en el peso total y en el peso de la componente asociada a la coeficiente de difusión libre del indicador refuerza la hipótesis discutida en el Capítulo siguiente. Otra causa posible para la existencia de la discrepancia entre el peso total esperado y el obtenido a partir de los experimentos es la de un error en la calibración del volumen. En particular, el cambio de concentraciones en la gota podría inducir cambios en el índice de refracción que cambiarían el volumen donde se enfoca la luz [63–65]. Es decir, los experimentos hechos con soluciones distintas podrían corresponder a valores de volumen de observación diferentes del valor obtenido durante la calibración hecha en un medio con fluoresceína y sin Ca^{2+} o indicador de Ca^{2+}. Sin embargo la calibración experimental del volumen fue hecha usando 100 nM de fluoresceína y las soluciones usadas para los experimentos con Ca^{2+} e indicador tenían concentraciones muchísimo mayores (ver [38] y tabla 2.1). Dado que el agua tiene un índice de refracción menor al del aceite de inmersión del objetivo y que los índices de refracción aumentan con la concentración de soluto [66] la discrepancia entre los índices del medio de inmersión del objetivo y de la muestra debería decrecer al aumentar la concentración de soluto. El volumen iluminado podría, en principio, ser menor en los experimentos de FCS que en la calibración. El cambio en el índice de refracción para la concentraciones exploradas en [38], sin embargo, sería demasiado pequeño [66] para explicar una diferencia de un factor dos entre el volumen calibrado y el efectivo durante los experimentos. En base a esta discusión podríamos concluir que la adsorción de Ca^{2+} e indicador en el cubre-objetos sería la causa más probable de la discrepancia entre el peso total esperado (Ec. (2.9)) y el determinado a partir de los experimentos de FCS.

Este problema no debería estar presente en los experimentos realizados en células intactas. Sin embargo, como discutimos en el Capítulo siguiente suponemos que es la existencia de correlaciones iniciales más allá de las que se suelen suponer las que explican esta discrepancia. Son también las que permiten entender por qué fue posible extraer a partir de experimentos de FCS en soluciones acuosas conteniendo Ca^{2+}, indicador y *buffer* de Ca^{2+} no fluorescente, tantas escalas temporales [59].

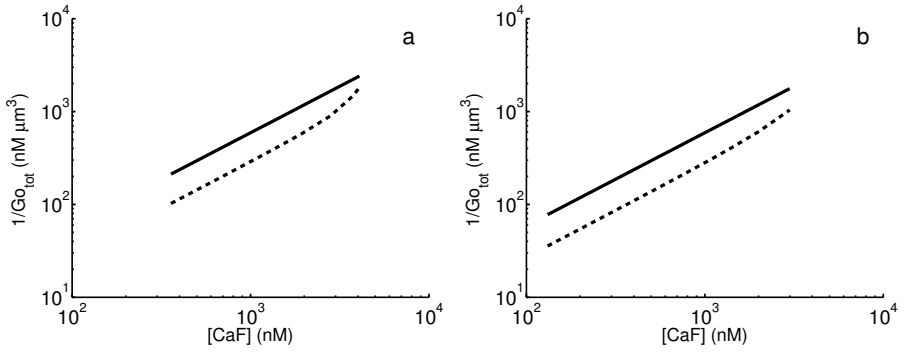

FIGURA 2.5: Inversa del peso total de la ACF calculada teóricamente usando la constante de disociación del Fluo4 provista por el fabricante, el volumen efectivo derivado de la calibración con fluoresceína, $V_{ef} = 0{,}59\ \mu m^3$, y las concentraciones totales de Ca^{2+} y Fluo4 utilizadas para preparar las soluciones experimentales estudiadas en [38] ($V_{ef}[CaF]$, curva sólida) o suponiendo que sólo hay una fracción, $\zeta_C = 0{,}2$ y $\zeta_F = 0{,}5$, respectivamente, de estas últimas en la gota ($V_{ef}[CaF]_{eq}$, línea a rayas). Ambas curvas están graficadas como función de la concentración, $[CaF]$, calculada a partir de las concentraciones totales usadas para armar las soluciones. Se muestran en (a) los resultados para el Fluo4 de alta afinidad y en (b) para el de baja afinidad.

Capítulo 3

Fluctuaciones en experimentos de FCS en sistemas de reacción-difusión

Los estudios del Capítulo anterior y la comparación con los experimentos de FCS en solución reportados en [38] y [59] mostraron que mientras que los tiempos de correlación derivados de las ACFs experimentales podían interpretarse usando la aproximación de reacciones rápidas para una amplia gama de condiciones, los pesos diferían mucho respecto de lo predicho por esta aproximación. Los tiempos aproximados, por otro lado, podían diferir hasta en un factor 2 para el rango de condiciones analizadas. Estas diferencias pueden deberse a limitaciones en la aplicabilidad de la aproximación de reacciones rápidas. Sin embargo, otro factor de discrepancia entre teoría y experimento fue la observada en el peso total de la ACF experimental que resultó entre dos y tres veces mayor que la teórica. Esto es llamativo ya que el peso total teórico considerado se deriva directamente de suponer que el número de partículas fluorescentes sigue una estadística de Poisson. Si bien la discrepancia puede ser debida a un artefacto experimental, en este Capítulo presentaremos otra posible causa, que a su vez explica por qué es posible extraer información de otras escalas temporales, además de las asociadas

con la difusión del *dye*, a partir de experimentos de FCS en sistemas de reacción-difusión compuesto por Ca^{2+}, *buffer* y un indicador de Ca^{2+} de tipo SW.

3.1. Teoría de FCS

El caso de interés, aquí analizado, es un sistema de reacción-difusión compuesto por Ca^{2+}, un indicador de Ca^{2+} SW, F, y un *buffer* de Ca^{2+}, E. Por lo tanto, las especies relevantes son cinco: Ca^{2+} libre (Ca), *dye* libre (F), *buffer* libre (E),Ca^{2+}-ligado a *dye* (CaF) y Ca^{2+}-ligado a *buffer* (CaE), que difunden con coeficientes libres D_{Ca} (Ca), D_F (F y CaF) y D_E (E y CaE) y reaccionan según Ecs.(2.1) y (2.13) [59]. Se asume que las fluctuaciones ocurren alrededor de un valor medio que está definido por las concentraciones en un equilibrio espacialmente uniforme, $[Ca]_{eq}$, $[F]_{eq}$, $[CaF]_{eq}$, $[E]_{eq}$ y $[CaE]_{eq}$, que satisfacen las Ecs. (2.2) y (2.14).

Para estudiar las fluctuaciones se linealizan las ecuaciones del sistema de reacción-difusión de cinco variables alrededor del equilibrio, Ecs.(A.19), [59]. Estas ecuaciones suelen resolverse en el espacio de Fourier [49]. La dependencia temporal de sus soluciones está determinada por cinco ramas de autovalores, $\lambda_i(q)$, $i = 1, ..,5$, inversas de escalas temporales que dependen de la norma, q, del número de onda, $\mathbf{q}$ (la variable conjugada al vector de posición, $\mathbf{r}$, en el espacio real). En el caso de interés de esta sección, dos de las ramas son puramente difusivas, una de ellas está asociada al coeficiente de difusión libre del indicador, D_F, y la otra al coeficiente de difusión libre del *buffer* no fluorescente, D_E:

$$\lambda_4 = -D_F q^2, \tag{3.1}$$

$$\lambda_5 = -D_E q^2. \tag{3.2}$$

Este tipo de autovalores lleva a componentes de la ACF de la forma de la Ec. (1.7). La existencia de dichas componentes en la ACF también depende de si las fluctuaciones en el número de moléculas correspondiente produce fluctuaciones en la fluorescencia o no. Nuevamente, para todos los cálculos asumimos que la única

especie fluorescentes es CaF. Los otros autovalores son más complicados. Los límites para los que existen expresiones analíticas simples para la ACF son tales que estos autovalores no triviales pueden ser aproximados por:

$$\lambda_i \approx \lambda_{efi} \equiv -\nu_{efi} - D_{efi}q^2. \tag{3.3}$$

En este caso, las componentes correspondientes, $G_i(\tau)$, son el producto de un término que decae exponencialmente en el tiempo con tasa ν_{efi}, y otro que decae algebraicamente (como en Ec. (1.7)) con la escala temporal de la difusión, $\tau_i \equiv w_r^2/(4D_{efi})$:

$$G_i(\tau) = \frac{A_i \exp(-\nu_{efi}\tau)}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_i}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_i}}}. \tag{3.4}$$

Como en la Ec. (3.4) usaremos la notación A_i para referirnos al peso de la componente *i-ésima*, es decir, $A_i \equiv G_i(\tau = 0)$.

3.2. El rol de las correlaciones iniciales en la ACF

Como ya dijimos, en el sistema estudiado en este Capítulo, la única especie fluorescente es CaF. Por lo tanto, $f(t)$, está dada por:

$$f(t) = \int QI(r)[CaF](r,t)d^3r, \tag{3.5}$$

donde el parámetro, Q, toma en cuenta la eficiencia de detección, el rendimiento cuántico de la fluorescencia y la sección eficaz de absorción a la longitud de onda de excitación de la especie fluorescente. La integral se calcula sobre el volumen de observación que comúnmente se aproxima por una Gaussiana tridimensional:

$$I(r) = I(0)\, e^{-\frac{2r^2}{w_r^2}}\, e^{-\frac{2z^2}{w_z^2}}. \tag{3.6}$$

A fin de calcular la ACF (Ec. (1.5)) es necesario conocer cómo se relacionan las fluctuaciones, $\delta[CaF]$, en un cierto tiempo, $t+\tau$, y posición dentro del volumen de observación, $\mathbf{r}'$, con las fluctuaciones en un tiempo previo, t, y cualquier otra

posición, $\mathbf{r}$ en el volumen. Asumiendo la invarianza translacional del problema en espacio y tiempo, $\delta[CaF](\mathbf{r}', t+\tau)$ puede expresarse formalmente como:

$$\delta[CaF](\mathbf{r}', t+\tau) = \sum_i \int d^3r O_{1i}(\mathbf{r}' - \mathbf{r}, \tau)\delta C_i(\mathbf{r}, t), \tag{3.7}$$

donde δC_i, $i = 1, ..,5$, son las fluctuaciones en las concentraciones de las cinco especies ($i = 1$ corresponde a $[CaF]$) y $O_{1i}(\mathbf{r}' - \mathbf{r}, \tau)$ es un propagador que determina cómo la fluctuación en la especie, i, en la posición $\mathbf{r}$ y tiempo, t, afecta la fluctuación de $[CaF]$ en posición, $\mathbf{r}'$, y tiempo, $t+\tau$. Combinando las Ecs. (3.7) y (3.5) para calcular la ACF (Ec. (1.5)) queda claro que la ACF resultante depende de las correlaciones entre $\delta[CaF](\mathbf{r}', t)$ y las fluctuaciones en todas las especies, $\delta C_i(\mathbf{r}, t)$, $i = 1, ..., 5$:

$$\langle \delta[CaF](\mathbf{r}, t)\delta C_i(\mathbf{r}', t)\rangle. \tag{3.8}$$

Dadas estas correlaciones "iniciales", el propagador, $O_{1i}(\mathbf{r}' - \mathbf{r}, \tau)$, determina qué escalas temporales caracterizarán la ACF. Como mencionamos en Capítulos anteriores, usualmente se supone que las fluctuaciones en el número de moléculas de diferentes especies están instantáneamente no correlacionadas, que obedecen una estadística Poissoniana (es decir que la varianza y la media del número de moléculas de cada especie, N_i, en el volumen de observación, V_{ef}, satisface: $\mathrm{Var}(N_i) = \langle N_i \rangle$), y que las correlaciones se dan en un rango espacial corto de modo que [49]:

$$\langle \delta C_i(\mathbf{r}, t)\delta C_j(\mathbf{r}', t)\rangle = \delta_{ij}\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')C_{i,eq}, \tag{3.9}$$

donde $C_{i,eq}$ es la concentración de equilibrio de la *i-ésima* especie. Es bajo este supuesto que el peso total de la ACF en el caso de una única especie fluorescente, CaF, está dado por:

$$G_{tot} \equiv G(\tau = 0) = \frac{\mathrm{Var}(N_{CaF})}{\langle N_{CaF}\rangle^2} = \frac{1}{V_{ef}[CaF]_{eq}}, \tag{3.10}$$

es decir que es igual a la inversa del número medio de moléculas fluorescentes en el volumen de observación. Es también bajo este supuesto que la ACF tiene cuatro,

en vez de cinco, componentes siendo la rama dada por la Ec. (3.2) la que falta.

3.2.1. Simplificación de la ACF en el límite de reacciones rápidas

El límite de las reacciones rápidas es válido cuando el tiempo característico de la reacción, Ec. (2.1), es más corto que el tiempo que le lleva a las especies difundir a través del volumen de observación. En este límite los autovalores no triviales pueden ser aproximados por una expresión como en la Ec. (1.7). De esta manera, bajo el supuesto de la Ec. (3.9), la ACF está dada por la Ec. (1.13) [38]. Es decir, en este límite la ACF tiene una componente puramente difusiva asociada al coeficiente de difusión libre del *dye* y tres componentes más (una de ellas puramente difusiva también) que dependen de los coeficientes efectivos de difusión que son función de los coeficientes libres, D_F, D_{Ca} y D_E, de las concentraciones y de las tasas de reacción.

En [59] las ACF derivadas de los experimentos de FCS realizados en solución acuosa conteniendo Ca^{2+}, el indicador de Ca^{2+}, Fluo4 dextrano, y el *buffer* de Ca^{2+}, EGTA, se ajustaron usando dos componentes puramente difusivas:

$$G(\tau) = \frac{A_1}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_1}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_1}}} + \frac{A_2}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_2}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_2}}}. \tag{3.11}$$

Los experimentos de [59] fueron realizados para diferentes concentraciones de Ca^{2+} total, $[Ca]_{tot}$. Analizando la dependencia de los coeficientes de difusión ajustados, D_i, $i = 1, 2$, con la concentración de $[Ca]_{tot}$, fue posible identificar al que era invariante respecto de $[Ca]_{tot}$ con el coeficiente de difusión libre del *dye*, D_F [59]. Comparar la dependencia de $[Ca]_{tot}$ del otro coeficiente de difusión con lo prescrito por el límite de las reacciones rápidas para los coeficientes de difusión efectivos de la ACF, Ec. (1.13), nos permitió realizar una interpretación (que difirió dependiendo del rango de $[Ca]_{tot}$) y eventualmente estimar los coeficientes de difusión libre, D_{Ca} y D_E. En el trabajo de [59] sólo se analizaron el peso total y el de la

TABLA 3.1: Parámetros usados en los cálculos. Los valores de $[Ca]_{tot}$ usados están descriptos en cada figura.

Parámetro	*Valor*
w_r	0.28 μm
w	5
D_{Ca}	760 $\mu m^2/s$
D_F	85 $\mu m^2/s$
D_E	405 $\mu m^2/s$
$[F]_{tot}$	0.676 μM
K_{dF}	2.6 μM
k_{offF}	300 s^{-1}
$[E]_{tot}$	9.66 mM
K_{dE}	0.15 μM
k_{offE}	0.75 s^{-1}

componente correspondiente al coeficiente de difusión libre del *dye* ya que no se contaba con expresiones analíticas para los otros. Como paso previo al análisis del presente Capítulo se los calculó numéricamente y se observó que no había relación entre la componente de mayor peso de acuerdo a la aproximación de reacciones rápidas y el coeficiente de difusión distintos del del *dye* que pudo ser estimado experimentalmente para cada concentración de Ca^{2+} utilizada. Esto nos llevó a avanzar en el análisis de las componentes más allá del límite de reacciones rápidas como se describe a continuación.

3.3. ACF más allá del límite de las reacciones rápidas

En esta Sección se analizarán los autovalores que gobiernan la dinámica linealizada del sistema de interés sin tener en cuenta la aproximación por reacciones rápidas. También se estudiarán los pesos con los que cada uno de ellos contribuye a la ACF. Se considerarán los parámetros listados en la Tabla 3.1 y el de concentración total de Ca^{2+}, $[Ca]_{tot}$, de los experimentos de Sigaut *et al.*, 2017 [59].

3.3.1. Autovalores exactos y aproximados

Como ya se mencionó, hay cinco ramas de autovalores que gobiernan la dinámica del sistema de reacción-difusión linealizado, dos de los cuales están dados por las Ecs. (3.1)–(3.2). Para números de onda pequeños, los otros tres ($\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3$) pueden ser aproximados como en la Ec. (3.3), con D_{efi} los coeficientes de difusión efectivos y ν_{efi} las tasas efectivas de la aproximación de reacciones rápidas derivadas en [59] (con un pequeño cambio en la notación, ya que aquí se intercambiaron los subíndices 2 y 3 respecto a ese trabajo). Por otro lado, para q suficientemente grandes, los tres autovalores no triviales, λ_1, λ_2 y λ_3, pueden ser aproximados por $-D_i q^2$, con D_i uno de los coeficientes de difusión libre del problema, D_F, D_E o D_{Ca}. Si graficamos λ_1, λ_2 y λ_3 en función de q^2 se observan diferentes comportamientos dependiendo de los parámetros. A continuación se analizarán los experimentos presentados en [59]. Para esto recordamos que la ACF tiene cuatro componentes, cada una de las cuales está asociada a una rama de autovalores, λ_i, con $i = 1, 2, 3, 4$. Aunque la ACF no tiene una componente asociada a λ_5 sí depende del coeficiente de difusión del *buffer* inobservable, D_E, a través de los coeficientes efectivos, D_{efi}.

Los experimentos de [59] fueron realizados para varias concentraciones de Ca^{2+} total. Por lo tanto, aquí se analizarán los cambios en las ramas de los autovalores con $[Ca]_{tot}$. En la Fig. 3.1 se muestran los resultados obtenidos para tres casos representativos ($[Ca]_{tot}$=9.3, 9.6 y 10.4 mM) donde se graficaron las ramas de autovalores exactos no triviales λ_i, y los aproximados, λ_{efi}, ($i = 1, 2, 3$), como función de q^2. A fin de relacionar los autovalores con los diferentes parámetros biofísicos en la Fig. 3.2 (a) se muestran los tres coeficientes de difusión efectivos y los libres del sistema y en la Fig. 3.2 (b) las tasas ν_{ef2} y ν_{ef3}, en todos los casos, como función de $[Ca]_{tot}$ dentro del rango de los valores estudiados experimentalmente en [59]. Para $[Ca]_{tot}$ suficientemente bajos se observa en la Fig. 3.2 (a) que $D_{ef1} \approx D_E$, $D_{ef3} \approx D_{Ca}$ y $D_{ef2} \approx D_F$ y, en la Fig. 3.2 (b), que $\nu_{ef3} > \nu_{ef2}$. Esto implica que λ_{ef3} permanece como el autovalor más chico (el más grande en valor absoluto) para todos los números de onda, q. Dado que $D_F < D_E$, λ_{ef1} y λ_{ef2} se cruzan en

un valor finito, q_c. Pero, las ramas reales no se cruzan sino que se evitan como se ve en la Fig. 3.1. En este sentido, mientras que $\lambda_1 \approx -D_E q^2$ para q suficientemente pequeño, para q suficientemente más grande que q_c, $\lambda_1 \approx -D_F q^2 - \nu_{ef2} \approx -D_F q^2$. En la Fig. 3.2 (c) mostramos los pesos de cada componente de la ACF y su suma ($G_{tot} = G(\tau = 0)$), como función de $[Ca]_{tot}$. Los pesos se calcularon para cada componente en términos de los autovectores como se explica en el Apéndice A. En la Fig. 3.2 (c) se observa que el peso, A_4, asociado al coeficiente de difusión libre del *dye* es el más grande en todos los casos. Más aun, se observa que, al menos hasta $[Ca] \sim 9.7\ mM$, los pesos, A_2 y A_3 son despreciables respecto de los otros dos. Esto es consistente con el hecho de que los mejores ajustes de las ACFs experimentales de [59] fueron obtenidas usando dos componentes, y una de ellas corresponde a la escala temporal asociada al coeficiente de difusión libre del *dye*, D_F. Como se puede observar en la Fig. 3.2 (c), hasta $[Ca]_{tot} \sim 9.85\ mM$, el peso, A_1, asociado a λ_1 es el segundo más grande. El hecho de que, para las menores $[Ca]_{tot}$ exploradas experimentalmente en [59], $\lambda_1 \sim -D_E q^2$ para q^2 pequeños mientras que $\lambda_1 \sim -D_F q^2 - \nu_{ef2}$ para q^2 lo suficientemente grandes, podría ser la razón subyacente para haber obtenido una escala temporal asociada al coeficiente de difusión libre del indicador, D_F, y otra al coeficiente de difusión libre del *buffer*, D_E, al ajustar las ACFs experimentales [59]. Este aspecto será estudiado en más detalle más adelante.

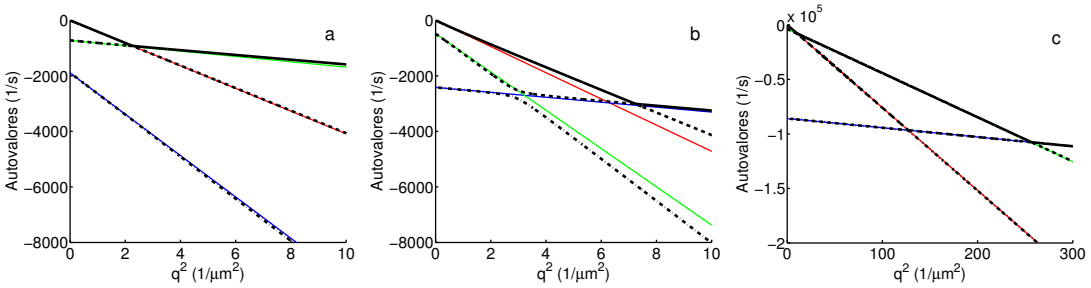

FIGURA 3.1: Tres ramas de autovalores no triviales como función del número de onda al cuadrado, q^2, de las ecuaciones de reacción- difusión linealizada que corresponden a un sistema con Ca^{2+}, *dye* y *buffer* con los parámetros de la Tabla 3.1 y las concentraciones totales de Ca^{2+}: $[Ca]_{tot}$= 9300 μM en (a), $[Ca]_{tot}$= 9600 μM en (b) y $[Ca]_{tot}$= 10400 μM en (c). En las tres subfiguras λ_1 se muestra en línea sólida, λ_2 con línea a rayas y λ_3 con línea de puntos y rayas. Los autovalores efectivos, λ_{ef1}, λ_{ef2} y λ_{ef3} se grafican como líneas sólidas en color rojo, verde y azul, respectivamente.

Para los valores de $[Ca]_{tot}$ intermedios explorados en [59] ($[Ca]_{tot} \sim$ 9.47-9.66 mM) la segunda escala temporal obtenida de los ajustes de [59] parece corresponder al coeficiente de difusión efectivo, D_{ef2}, que es el más grande de los tres (y cercano al mayor coeficiente del sistema, D_{Ca}). Como se muestra en la Fig. 3.2 (a), para este rango de valores de concentración al menos dos de los coeficientes efectivos son notablemente diferentes de los libres. Entonces, como se ve en Fig. 3.1 (b), el gráfico de los autovalores no triviales como función de q^2 es más complicado que en el caso de la Fig. 3.1 (a). Para estas concentraciones, por otro lado, $D_{ef2} > D_{ef1} > D_{ef3} \approx D_F$ y $\nu_{ef2} < \nu_{ef3}$ (ver Figs. 3.1 (b) y 3.2 (a, b)). Por lo tanto, λ_{ef3} cruza a λ_{ef2} en $q = q_{c1}$ y cruza a λ_{ef1} en $q = q_{c2}$. Para los parámetros del problema, $q_{c1} < q_{c2}$. Como se muestra en la Fig. 3.2 (c), el segundo peso más grande en este rango de concentraciones es el asociado a λ_1 que pasa de ser $\sim -D_{ef1}q^2$ para q pequeño a acercarse a $-\nu_{ef3} - D_F q^2$ para q suficientemente grande. Luego nos preguntamos por qué el ajuste de las ACFs experimentales daría un estimación relativamente buena de D_{ef2} en vez de D_{ef1}. En la siguiente sección analizamos esta aparente contradicción.

Finalmente, analizamos los valores más grande de $[Ca]_{tot}$ explorados en [59] ($[Ca]_{tot} \sim$ 10 mM) para los que la segunda escala temporal obtenida del ajuste de las ACFs experimentales parecería corresponder nuevamente a D_{ef2}, que, en este rango, era

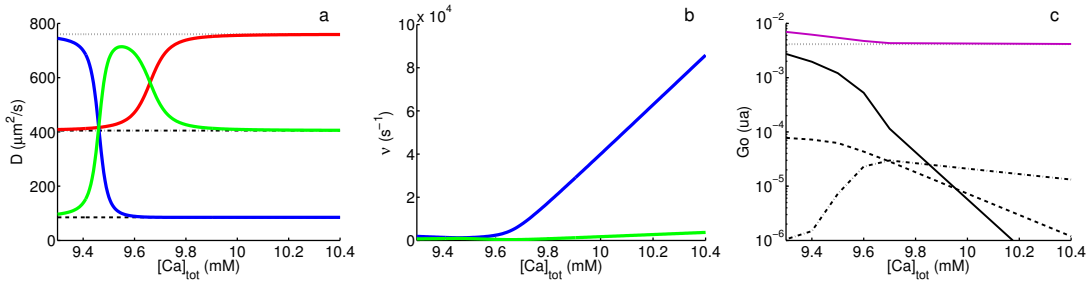

FIGURA 3.2: (a) Coeficientes de difusión efectivos y libres como función de $[Ca]_{tot}$ para un sistema de reacción-difusión con los parámetros de la Tabla3.1, D_{ef1}: línea roja, D_{ef2}: línea verde, D_{ef3}: línea azul, D_{Ca}: línea negra de puntos, D_E: línea negra de rayas y puntos, D_F: línea negra a rayas. (b) Similar a (a) pero para las tasas efectivas, ν_{ef2}: línea verde y ν_{ef3}: línea azul. (c) Pesos de las cuatro componentes de la ACF del problema de interés (A_1: línea sólida negra, A_2: línea a rayas, A_3: línea de puntos y rayas, A_4: línea de puntos) y peso total (Go: línea violeta) como función de la concentración total de Ca^{2+}, $[Ca]_{tot}$.

el coeficiente intermedio, $D_{ef2} \approx D_E$ (Fig. 3.2 (a)). En este caso la componente no trivial con el peso más grande es la correspondiente a λ_3 (ver Fig. 3.2 (c)). Este autovalor, por otro lado, es $\lambda_3 \approx -\nu_{ef3} - D_F q^2$ hasta $q^2 \sim 125/\mu m^2$. Entonces, el decaimiento de tipo difusivo de esta componente está mayormente dominado por D_F y sería imposible separarlo del término asociado a $\lambda_4 = -D_F q^2$, G_4. Además, el hecho de que $\nu_{ef3} \sim 85000\ s^{-1}$ mientras que $\tau_{DF} \sim w_r^2/(4D_F) \sim 2{,}3\,10^{-4} s$ significa que la contribución de esta componente a la suma, $G_4 + G_3$ será pequeña al menos al tiempo de correlación, τ_{DF}. El segundo peso más grande entre las componentes no triviales es el que corresponde a λ_2. Este autovalor se comporta como $\sim -\nu_{ef2} - D_{ef2} q^2 \approx -\nu_{ef2} - D_E q^2$ con $\nu_{ef2} \sim -3700\ s{-}1$ hasta $q^2 \sim 10/\mu m^2$ luego cambia de pendiente dos veces y escala nuevamente como $\sim -\nu_{ef2} - D_E q^2$ para q grandes. Por lo tanto, sería razonable, en principio, que el segundo coeficiente de difusión que se deriva del ajuste sea $D_{ef2} \approx D_E$ en estas condiciones. Ahora, dado que cada rama de autovalores está típicamente caracterizada por más de una escala temporal de difusión dependiendo del número de onda, como se ilustra en la Fig. 3.1, la escala temporal que eventualmente podría derivarse de un ajuste hecho con componentes puramente difusivas dependerá del peso relativo con que los distintos números de onda contribuyen a la componente correspondiente de la ACF. Se estudiará este aspecto en la próxima sección.

3.3.2. Densidades

A fin de comparar los resultados de los ajustes con las ramas de autovalores en más detalle, calculamos la función, $g_i(q, \varphi)$, que da el peso total de cada componente, A_i, cuando se integra sobre q y el ángulo, φ, que forma el vector del número de onda, bfq, con el plano perpendicular del eje óptico, z. Entonces, la cantidades, $g_i(q, \varphi)$, son densidades que satisfacen:

$$A_i = \int_0^\infty dq \int_0^\pi d\varphi g_i(q, \varphi). \tag{3.12}$$

En las Figs. 3.3 (a)–(c) mostramos gráficos de $g_i(q,\varphi)$, $i = 1,2,3$, para $\varphi = \pi/2$ y los mismos valores de $[Ca]_{tot}$ que en Fig. 3.1 (elegimos $\varphi = \pi/2$ porque es el ángulo en el que las funciones, $g_i(q,\varphi)$, alcanzan sus valores máximos). En la Fig. 3.3 (d) mostramos la densidad, g_{oF}, que corresponde al autovalor, λ_4, asociado al coeficiente de difusión libre del *dye* (ver Ec. (3.1)) para el caso con $[Ca]_{tot} = 10.4$ mM. Esta densidad es de la forma $g_i(q,\pi/2) = \alpha q^2 \exp(-q^2 w_r^2/4)$ con α constante para cualquier valor de $[Ca]_{tot}$ como en el caso de cualquier autovalor de la forma Ec. (3.3) con valores fijos, ν_{efi}, D_{efi}, para todo q. Vemos en las Figs. 3.3 (a)–(c) que para ninguno de los autovalores no triviales la densidad correspondiente es de esta forma. Sin embargo, debemos recordar que los mejores ajustes de los datos experimentales en [59] fueron obtenidos con dos componentes puramente difusivas (es decir, $\lambda_i = -D_i q^2$), una de las cuales siempre se correspondió con el coeficiente de difusión libre del *dye*, D_F (la componente con el mayor peso, de acuerdo a los resultados de la Fig. 3.2 (c), pero no en el ajuste experimental). En la Fig. 3.3 (a) vemos que la densidad, g_1, que corresponde al segundo peso más grande en este caso, (ver Fig. 3.2 (c)) es mayor fuera de la región con $q^2 \approx 0$. Vale recordar que para las condiciones de la Fig. 3.3 (a) el ajuste de la ACF experimental predice el valor del coeficiente libre de difusión del EGTA, D_E, que, en este caso es $D_E \approx D_{ef1}$ [59]. Por otro lado, este coeficiente efectivo, satisface $-D_{ef1}q^2 \approx \lambda_1$ en la región de q^2 pequeño (donde g_1 es muy pequeño). Algo parecido ocurre cuando las condiciones son las de la Fig. 3.3 (b), donde la "segunda" escala temporal predicha por el ajuste de los datos experimentales se corresponde con D_{ef2} [59] que satisface $-D_{ef2}q^2 \approx \lambda_2$ en la región de q^2 pequeño. En este caso, si nos restringimos a la región donde $q^2 \leq\sim 7{,}2\mu m^2$, g_2 es quien alcanza el mayor valor. Sin embargo, g_2 disminuye por debajo de g_3 a medida que nos acercamos al límite donde $q^2 \to 0$. En esa región de valores de q^2, el autovalor, λ_3 es $\sim -\nu_{ef3} - D_F q^2$ (ver Fig. 3.1 (b)). El patrón se repite para las condiciones de la Fig. 3.3 (c). En este caso la mayor densidad corresponde al autovalor λ_3, que es $\lambda_3 \approx -\nu_{ef3} - D_F q^2$ para q pequeños (y el máximo de su densidad se encuentra dentro de este rango). La segunda densidad más grande corresponde al autovalor, λ_2, y su valor máximo se encuentra dentro del rango de valores de q para los que $\lambda_2 \approx -\nu_{ef3} - D_F q^2$.

En efecto, todas las densidades, g_i, parecen ser más grandes en el rango de valores de q para los que el autovalor correspondiente, λ_i satisface $d\lambda_i/dq^2 = -D_F$. De hecho, sumando las tres densidades, en todos los casos, obtenemos una función que depende de q^2 como $g_i(q, \pi/2) = \alpha q^2 \exp(-q^2 w_r^2/4)$. Esto es evidente si se comparan las Figs. 3.3 (c) y (d) que fueron obtenidas para los mismos valores de $[Ca]_{tot}$. Entonces, según esta teoría parecería que el autovalor que disminuye con q^2 con pendiente, $-D_F$, es el que debería obtenerse con los ajustes. ¿Por qué es, entonces, que se pueden obtener buenas estimaciones de las otras escalas temporales con los experimentos de [59]?

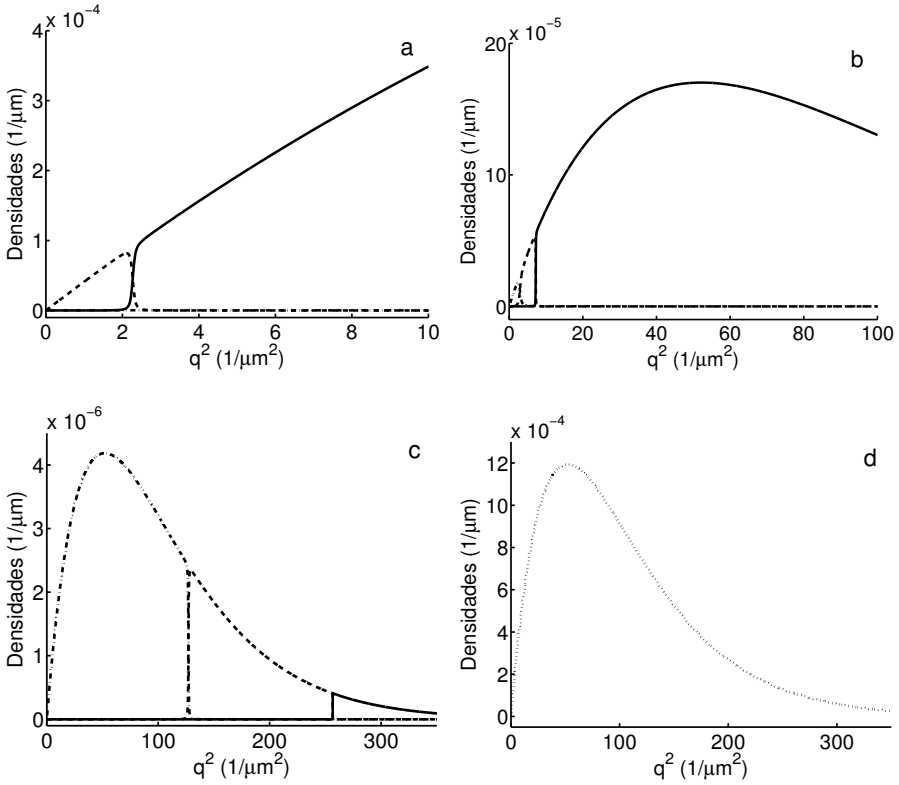

FIGURA 3.3: Densidades, $g_i(q, \varphi = \pi/2)$, como función del número de onda al cuadrado, q^2. Los que corresponden a los tres ramas de autovalores no trivial de la Fig. 3.1 se muestran en (a), (b) y (c) para las mismas concentraciones de Ca^{2+} y con los mismos símbolos de la Fig. 3.1. En (d) se muestra la densidad que corresponde a λ_4, el autovalor asociado a coeficiente de difusión libre del *dye* para el caso con $[Ca]_{tot} = 10{,}4mM$.

Fluctuaciones 57

3.4. ¿Qué fluctuaciones se miden en experimentos de FCS que usan indicadores de Ca^{2+} de onda única (SW)?

El hecho de que sea posible derivar las escalas temporales asociadas a varios de los coeficientes de difusión efectivos del problema mediante el ajuste de las ACFs experimentales en [59] a pesar de que, de acuerdo a lo que acabamos de describir, sólo debería poder ser estimado el coeficiente de difusión libre del *dye* no es la única inconsistencia que encontramos entre teoría y experimentos cuando miramos lo que la teoría descripta hasta ahora predice respecto a los pesos. El peso de la componente asociada al coeficiente de difusión libre del *dye*, D_F, derivado de los ajustes no es el más grande para la mayoría de las concentraciones de Ca^{2+} analizadas (ver Fig. 2(c) en [59]). Esto contradice las predicciones teóricas de la Fig. 3.2 (c). Además, en [59] ya se había detectado una discrepancia entre el peso total de la ACF y su valor esperado ($1/(V_{ef}[CaF])$ de acuerdo a la construcción de las soluciones experimentales y la constante de disociación provista por el fabricante (ver Fig. 3 en [59]). Concretamente, el valor, $[CaF]$, que se derivó de los experimentos fue aproximadamente un tercio del valor teórico [59]. Como en los experimentos realizados en [38], en solución acuosa conteniendo sólo Ca^{2+} y *dye*, esta diferencia fue atribuida a una adsorción parcial de los reactivos al cubreobjetos. Aquí introduciremos una explicación alternativa que también puede servir para los otros resultados aparentemente contradictorios entre la teoría y los ajustes de los datos experimentales.

A fin de introducir la explicación alternativa debemos recordar que suponer que la ACF se debe sólo a fluctuaciones en el número de partículas fluorescentes (N_{CaF}, en nuestro caso de interés) implica que el peso total de la ACF es el cociente entre la varianza y el promedio al cuadrado de N_{CaF} (ver Ec. (1.11)). ¿Qué podemos suponer acerca de la varianza de las distintas variables en nuestro problema de interés? La dinámica de F_T y E_T es puramente difusiva. Entonces es razonable que el número de moléculas de estos reactivos en el volumen de observación tenga

una distribución de tipo Poisson. ¿Y el número de moléculas de *dye* con Ca^{2+} ligado, N_{CaF}? Supongamos que se conoce el número de moléculas totales de *dye* en el volumen, N_{FT}, y que la probabilidad, p_b, de que una molécula de indicador tenga Ca^{2+} ligado es fija. Entonces, N_{CaF} (y $N_F \equiv N_{FT} - N_{CaF}$) sería binomial $(B(p_b), N_{FT})$. Ahora bien, ya que N_{FT} es una variable estocástica con distribución Poissoniana, entonces N_{CaF} y N_F también serán Poisson, siempre que p_b sea constante. Pero p_b no está fija: en verdad fluctúa con el número de iones de Ca^{2+}, N_{Ca}, que están en V_{ef} que es otra variable estocástica. Esto es evidente considerando que $\langle p_b \rangle = [CaF]/[F_T]$ entonces, p_b, como variable estocástica puede ser escrita como:

$$p_b = \frac{N_{Ca}}{N_{Ca} + K_{dF} V_{ef}} \tag{3.13}$$

Nuestra estrategia estará basada en la fórmula general de descomposición de la varianza. Más precisamente consideraremos que:

$$\mathrm{Var}(N_{CaF}) = \langle \mathrm{Var}(N_{CaF} \mid N_{Ca}) \rangle_{NCa} + \mathrm{Var}_{NCa}(\langle N_{CaF} \mid N_{Ca} \rangle_{NCa}), \tag{3.14}$$

donde con $(N_{CaF} \mid N_{Ca})$ nos referimos a la distribución de N_{CaF} condicional al valor de N_{Ca} y con $\langle . \rangle_{NCa}$ a que la media está calculada usando la distribución de N_{Ca}. Este cálculo no es tan sencillo, entonces lo aproximaremos por:

$$\begin{aligned} \mathrm{Var}(N_{CaF}) &= \mathrm{Var}(N_{CaF})|_{\langle p_b \rangle} + \left(\frac{dp_b}{dN_{Ca}}\right)^2 \mathrm{Var}(N_{Ca}) \\ &= \langle p_b \rangle \langle N_{FT} \rangle + \left(\frac{dp_b}{dN_{Ca}}\right)^2 \mathrm{Var}(N_{Ca}) \end{aligned} \tag{3.15}$$

Ahora bien, ¿es posible suponer que N_{Ca} tiene una distribución de Poisson aún cuando el Ca^{2+} se une tanto al *dye* como al *buffer*? Como un primer paso en la corrección de la teoría habitual, vamos a suponer que esto es así. Otro problema que surge es determinar qué volumen debe ser considerado para tener en cuenta este efecto, dado que las fluctuaciones en N_{CaF} alrededor de cierta posición están descorrelacionadas de las fluctuaciones en el número de partículas lejos de esa posición (aun si están dentro del mismo volumen experimental de observación o si son de la misma especie). La suposición de localidad espacial de las correlaciones es

la que introduce el término $\delta(\mathbf{r}-\mathbf{r}')$ en la Ec. (3.9) y no hay motivo para cambiarla. Entonces, supondremos que la varianza es la suma $\langle p_b\rangle\langle N_{FT}\rangle + \alpha\langle N_{Ca}\rangle$ con $\alpha > 0$ un factor no conocido (que se podría derivar de los experimentos). Trasladamos esta correlación inicial que estamos considerando entre las fluctuaciones en N_{CaF} y N_{Ca} a la ACF y la calculamos como:

$$G(\tau) = G_{CaF}(\tau) + \alpha G_{Ca}(\tau) = \frac{1}{([CaF]V_{ef})^2} \times \int d^3r d^3r' Q^2 I(r) I(r')$$
$$(\langle \delta CaF(\mathbf{r},t)\delta CaF(\mathbf{r}',t+\tau)\rangle + \alpha\langle \delta[Ca](\mathbf{r},t)\delta[Ca](\mathbf{r}',t+\tau)\rangle)\,, \qquad (3.16)$$

donde calculamos las fluctuaciones en el tiempo, $t+\tau$, como función de las fluctuaciones a tiempo, t, como en la Ec. (3.7) (ver [49] para más detalles) con las condiciones iniciales dadas por Ec. (3.9). En la Ec. (3.16), G_{CaF} es la ACF que analizamos antes (la obtenida con las suposiciones habituales sobre las correlaciones iniciales) y G_{Ca} es similar a G_{CaF} pero considerando las fluctuaciones de Ca^{2+} libre en el numerador. Como con G_{CaF}, G_{Ca} puede escribirse como la suma de componentes, cada una asociada a una rama de autovalores. Debido a la estructura de los autovectores, G_{Ca} sólo depende de los autovalores no triviales, es decir, es la suma de tres componentes. En la Fig. 3.4 mostramos las densidades correspondientes en el caso de G_{Ca} para las mismas condiciones y con la misma selección de símbolos que en la Fig. 3.1 ($[Ca]_{tot} = 9300\ \mu M$ en (a), $[Ca]_{tot} = 9600\ \mu M$ en (b) y $[Ca]_{tot} = 10400\ \mu M$ en (c)). Allí, observamos que la componente con mayor densidad es la que corresponde a λ_2 en (a), la que corresponde a λ_3 en (b) y la que corresponde a λ_1 en (c). Comparando las Figs. 3.4 y 3.1 vemos que la densidad más grande alcanza su valor máximo para un número de onda, q, tal que $d\lambda_2/dq^2 \sim -D_E$ para las condiciones de las Fig. 3.4 (a), $d\lambda_3/dq^2 \sim -D_{Ca} \sim -D_{ef2}$ para las condiciones de la Fig. 3.4 (b) y $d\lambda_1/dq^2 \sim -D_E$ para las condiciones de la Fig. 3.4 (c). Los coeficientes, D_E, D_{ef2} y D_E, fueron los obtenidos de los ajustes en [59] además del coeficiente de difusión libre del *dye*, D_F, para estas tres condiciones experimentales.

Sumar el efecto que tienen las fluctuaciones en el número de iones de Ca^{2+} libres sobre las de fluorescencia observada como en la Ec. (3.16) también puede explicar

la discrepancia entre la concentración de Ca^{2+} total derivada de los ajustes de la ACF en [59] y las usadas en los experimentos. Concretamente, bajo los supuestos establecidos en el párrafo previo el peso total de la ACF en la Ec. (3.16) ahora está dado por:

$$G(0) = \frac{[CaF]_{eq}V_{ef} + \alpha[Ca]_{eq}V_{ef}}{([CaF]_{eq}V_{ef})^2}. \tag{3.17}$$

Dado que $\alpha > 0$, bajo esta hipótesis $G(0) > 1/([CaF]_{eq}V_{ef})$. Por lo tanto, si el peso derivado de los experimentos satisface Ec. (3.17) y se intenta derivar la concentración de Ca^{2+} ligado a *dye* suponiendo que $[CaF]_{eq}V_{ef} = 1/G(0)$ se obtendrá un valor menor, $[CaF]_{eq}$, que el verdadero, como sucedió en los experimentos de [59].

3.5. Conclusiones

En este Capítulo nos concentramos en un sistema de reacción-difusión formado por Ca^{2+}, un indicador SW de Ca^{2+} y un *buffer* de Ca^{2+} no fluorescente como el explorado experimentalmente en [59] ya que es con el que analizaremos los experimentos de FCS en ovocitos. Dentro de este marco estudiamos, por un lado, la ACF teórica fuera de la aproximación de reacciones rápidas analizando sus tiempos de correlación y los pesos de cada componente individual. Este estudio muestra que cada componente está caracterizada por distintas escalas temporales difusivas dependiendo del rango de longitudes de onda. A pesar de ello, el estudio muestra que, bajo las hipótesis usuales sobre las correlaciones iniciales, los pesos integrados

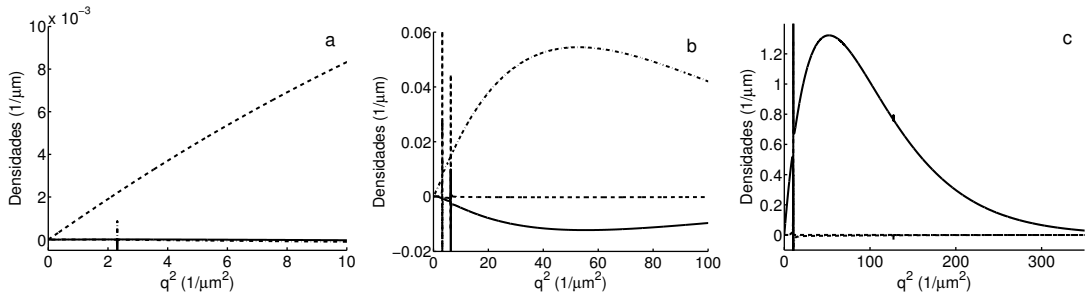

FIGURA 3.4: Densidades de las tres componentes de G_{Ca} calculada como función de q^2 a $\varphi = \pi/2$. Los símbolos y las concentraciones de $[Ca]_{tot}$ en (a), (b) y (c) son las mismas que en la Fig. 3.1.

sobre todas las longitudes son tales que la ACF resulta la suma de dos componentes. Las dos componentes resultantes están caracterizadas por el coeficiente de difusión libre del indicador y una de ellas está, además, multiplicada por un término que decae exponencialmente en el tiempo. Este resultado no permite explicar el hecho de que a partir de los experimentos de FCS de [59] pudieran derivarse tiempos que dependen de los coeficientes de difusión del *buffer* no fluorescente o del Ca^{2+}. Exploramos entonces la posibilidad de que la hipótesis sobre las correlaciones iniciales no sea correcta. En particular, teniendo en cuenta que el número de partículas fluorescentes en el volumen de observación depende de que ocurran reacciones de ligadura entre el fluoróforo y el Ca^{2+} y que el número de iones de este último es a su vez una variable aleatoria trabajamos con una ACF que es la suma de dos funciones de autocorrelación. Estas dos funciones son, por un lado, la de las fluctuaciones en el número de moléculas de fluoróforo ligadas a Ca^{2+} "usual" que se obtiene a partir de una condición inicial donde el número de iones Ca^{2+} es igual a su valor medio y, por el otro, la de las fluctuaciones de los iones de Ca^{2+} *per se*. El tiempo de correlación de esta última que tiene peso máximo para cada condición experimental de [59] corresponde exactamente al tiempo no asociado al coeficiente de difusión libre del fluoróforo que pudo ser determinado experimentalmente en cada caso. Este "agregado" permite también explicar la discrepancia entre el peso total de la ACF predicho por la teoría y el obtenido experimentalmente. Todos estos aspectos nos llevan a la conclusión de que es necesario incluir la dependencia de las fluctuaciones iniciales del número de moléculas de fluoróforo ligadas a Ca^{2+} con las del número de iones Ca^{2+} para explicar los resultados experimentales. En base a este estudio y al antecedente experimental de [59] concluimos que es posible estimar el coeficiente de difusión libre del Ca^{2+} y de algún *buffer* endógeno a partir experimentos de FCS realizados con indicadores de Ca^{2+} SW en células intactas. El hecho de que, fuera de la aproximación de reacciones rápidas, las componentes estén caracterizadas por distintos coeficientes de difusión dependiendo del número de onda, implica que las correlaciones correspondientes decaerán de forma diferente dependiendo de la escala temporal. Esto nos lleva a suponer, entonces, que al ajustar la ACF con componentes difusivas (o con un factor exponencial adicional)

se podrán obtener distintos coeficientes de difusión dependiendo de qué región de la ACF sea la que más "pese" en el momento de hacer el ajuste. Esto, sumado a la complejidad del sistema *in situ* en células intactas, puede explicar la bimodalidad de algunos de los ajustes obtenidos en ovocitos.

Capítulo 4

Calibración y estimación de condiciones experimentales óptimas para estudiar la difusión del ión calcio en ovocitos de *Xenopus laevis*

En este Capítulo estudiamos las condiciones óptimas para la realización de experimentos de FCS usando indicadores de Ca^{2+} SW en ovocitos de *Xenopus laevis*. En particular determinamos la potencia de iluminación adecuada para obtener buenos registros sin dañar la célula y la región óptima de adquisición. Los fluoróforos ideales para la realización de experimentos de FCS son aquéllos con alto rendimiento cuántico. Con ellos se minimizan las fluctuaciones de fluorescencia debidas al proceso de emisión de cada molécula individual y la observación permite cuantificar los otros procesos que afectan dichas fluctuaciones como la difusión o las reacciones. Por esta razón decidimos usar Fluo8 en lugar de Fluo4 en los experimentos de FCS en ovocitos. En este Capítulo presentamos también los resultados de experimentos de FCS realizados en soluciones acuosas conteniendo este indicador y Ca^{2+} con los que determinamos el coeficiente de difusión libre del Fluo8 y algunas de las constantes cinéticas que caracterizan su reacción con Ca^{2+}.

4.1. Estimación de las condiciones óptimas para realizar experimentos de point-FCS en ovocitos de *Xenopus laevis*

Se exploraron distintas condiciones experimentales relacionadas con la potencia del láser de excitación y la región de adquisición para determinar las condiciones experimentales óptimas al realizar experimentos FCS en ovocitos de *Xenopus laevis*.

4.1.1. Potencia del láser

Las mediciones de FCS se basan en el análisis de las fluctuaciones de intensidad de fluorescencia en un volumen pequeño. Para poder obtener información cuantitativa de los procesos asociados a esas fluctuaciones es imprescindible, por un lado, que en el volumen de detección haya pocas partículas fluorescentes, idealmente se trabaja con concentraciones de 100 nM. El bajo número de partículas asegura que las fluctuaciones asociadas a difusión o, también, a reacciones de pegado y despegado sean detectables. Por otro lado, para poder separar las fluctuaciones debidas a los procesos que se quieren estudiar del ruido blanco de la detección, la eficiencia en la emisión debe ser alta. En resumen, la situación ideal sería "pocas" partículas que emitan "mucho". Más allá de las características de emisión del *dye* y de su afinidad por el Ca^{2+}, la potencia del láser de excitación afecta la calidad de los registros y por lo tanto de las ACFs. Potencias demasiado bajas se reflejan en poca una baja probabilidad de excitación y por lo tanto de emisión de las moléculas de indicador. Así mismo, potencias demasiado elevadas pueden dañar la célula o el indicador de manera irreversible (procesos conocidos como *photodamage* y *photobleaching*, respectivamente). A su vez, potencias demasiado elevadas se traducen en problemas con la geometría del volumen de detección [67]. Por lo tanto, determinar la potencia mínima necesaria para obtener mediciones adecuadas es sumamente importante.

Se realizaron mediciones FCS en una solución de Ca^{2+} y el indicador Fluo4 (con concentraciones totales de 369 nM y 286 nM, respectivamente), con distintas potencias de láser (entre 0.1 y 10 %, lo que equivale a un rango entre 1.97 y 6.26 μW). En la Fig. 4.1 se muestran ACFs representativas de los resultados obtenidos al aumentar la potencia del láser.

Estos experimentos, permitieron determinar que para obtener una curva de autocorrelación "limpia", que permita inferir información acerca de los procesos que generan las fluctuaciones, la potencia del láser, en nuestro *set-up*, no debe ser inferior al 3 %, e idealmente debería situarse entre 5-10 % (lo que equivale a aproximadamente en el primer caso 3.22 μW y a 4.09-6.26 μW en el segundo).

4.1.2. Región de adquisición

En esta Tesis se trabajó con ovocitos inmaduros de *X. laevis* (estadío VI de la ovogénesis) como sistema modelo. Estas células tienen una estructura asimétrica, están polarizadas, con un hemisferio llamado *vegetal*, donde principalmente se encuentran las plaquetas de vitelo, y un hemisferio llamado *animal* en el que se encuentran la mayoría de las organelas celulares [68]. Esta asimetría es perfectamente identificable externamente ya que los hemisferios también difieren en su pigmentación, siendo el lado vegetal de color claro y el animal, oscuro (Fig.1.3(b)). El estudio de las señales de calcio se realiza mayormente en el hemisferio animal, ya que en el vegetal, dada la gran cantidad de plaquetas de vitelo son muy difíciles de observar, si bien en la corteza celular vegetal hay RE, y por lo tanto hay liberación de Ca^{2+} [20]. En el hemisferio animal las liberaciones de Ca^{2+} se ven principalmente en el RE de la zona cortical, donde también están los gránulos corticales. Esta región puede reconocerse fácilmente en las imágenes de ovocitos cargados con indicador de Ca^{2+} en el microscopio confocal. Típicamente se observa como una región fluorescente con zonas circulares oscuras (ver Figs. 4.2 y 4.4 (a) panel izquierdo).

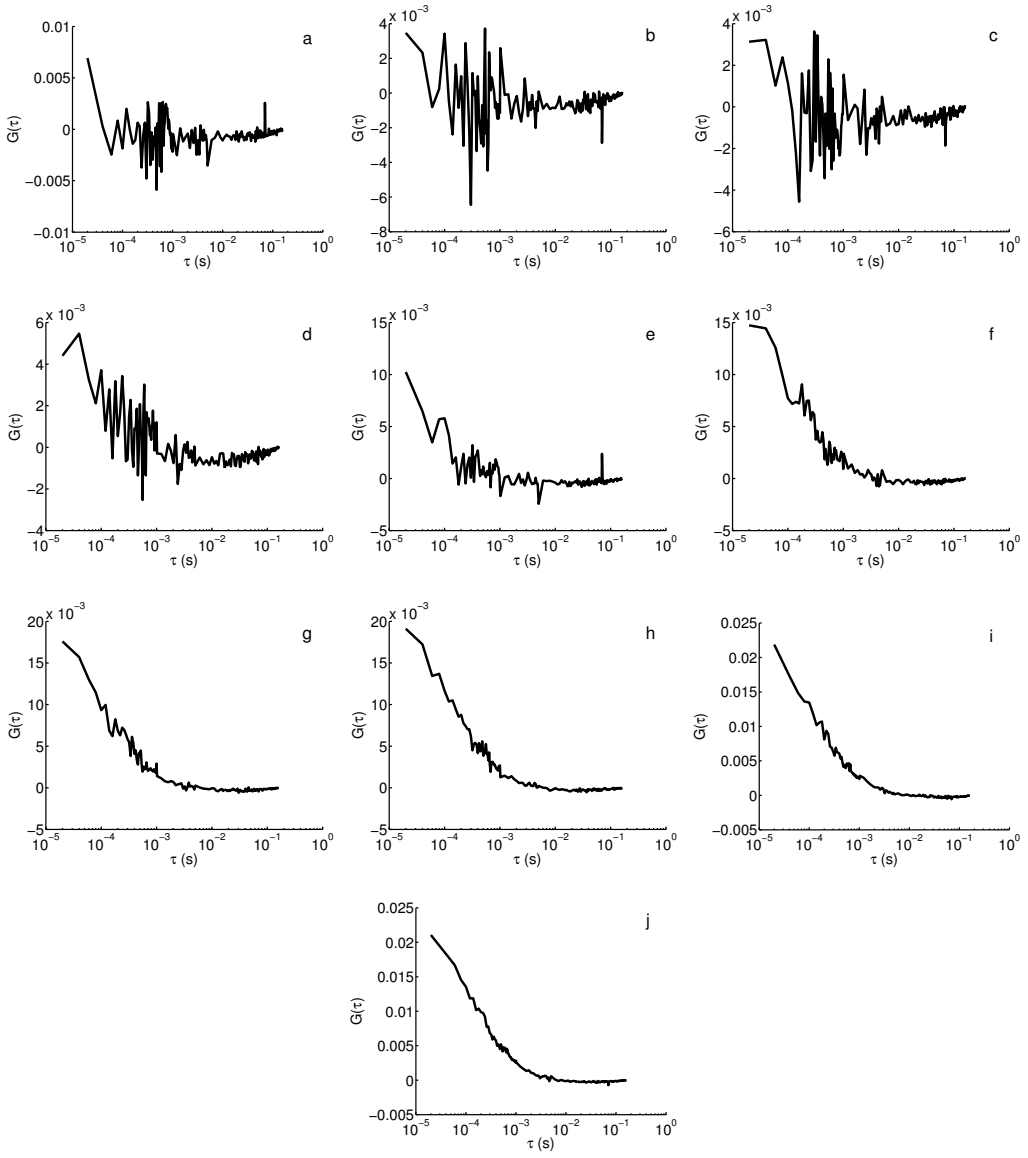

FIGURA 4.1
ACFs obtenidas de mediciones FCS realizadas en solución de Ca^{2+} y Fluo4 ($[Ca^{2+}] = 360nM$ y $[F4]_{tot} = 286\ nM$) con diez potencias diferentes. (a) 0.1 %, (b) 0.2 %, (c) 0.3 %, (d) 0.5 %, (e) 1 %, (f) 2 %, (g) 3 %, (h) 4 %, (i) 5 %, (j) 10 %, porcentajes respecto a la potencia máxima del láser, ver texto para mayor información.

En mediciones previas, se detectó que trabajar con potencias elevadas del láser de excitación, sobre células inyectadas con indicador de Ca^{2+}, produce picos de aumento en la fluorescencia. Para identificar si los cambios bruscos en la intensidad de fluorescencia están relacionados con aumentos en la concentración de Ca^{2+}, se compararon registros de intensidad de fluorescencia, similares a los usados para

FCS, en ovocitos tratados con Fluo4 y TMR. Las mediciones fueron realizadas en la zona de los gránulos corticales en ovocitos de *X. laevis* microinyectados con 37 nl de una solución de Fluo4 y TMR ($[F4]_{mix}$= 500 μM y $[TMR]_{mix}$= 50 μM), (ver Fig. 4.2). La excitación se realizó con la línea de 488 nm para el Fluo4 y 543 nm para la TMR. Los registros de los dos fluoróforos se obtuvieron en simultáneo, detectando la emisión de cada uno por canales distintos. Las potencias usadas fueron de entre 0.3 y 0.5 % para el láser de 488 nm y 1 % para el láser de 543 nm. Esto equivale a un rango de (2.05-2.14) μW, y a 0.2 μW, respectivamente.

En la Fig. 4.3 se muestran dos registros de intensidad de fluorescencia, medida en unidades arbitrarias, ua, en función del tiempo, medido en segundos, s. En la Fig. 4.3 (a) se observa la fluorescencia del Fluo4, y en la Fig. 4.3 (b) se observa el mismo registro, pero de TMR. La fluorescencia media, $\langle F \rangle$, es de 1983 ua para el Fluo4, y 1261 ua para la TMR. En el registro de Fluo4, claramente, se distinguen tres picos a t = 90 s, 112 s y 1434 s, cuyos valores de fluorescencia son 7429 ua, 7586 ua y 11080 ua, lo que representa entre 3.7 y 5.6 veces la $\langle F \rangle$ de este registro. En el registro de TMR también se distinguen tres pequeños picos en los mismos tiempos que los de Fluo4, pero de intensidad mucho menor, 1887 ua, 1955 ua y 2387 ua, entre 1.5 y 1.9 veces la $\langle F \rangle$ correspondiente, pese a que las $\langle F \rangle$ de ambos registros son comparables. Los picos observados en el registro de TMR se deben a lo que comúnmente se denomina *sangrado* de la emisión de un fluoróforo en otro canal. Básicamente lo que sucede es que el canal de detección que sólo debería detectar la emisión de la TMR está colectando algo de la emisión del Fluo4. Estos resultados ponen en evidencia que aun con la potencia del láser de 488 nm por debajo del 1 %, es decir, muy por debajo de la potencia necesaria para obtener ACFs analizables, ocurren aumentos bruscos en la concentración de Ca^{2+} que serían producto de liberaciones de este ión, posiblemente debidas a la ruptura de la membrana del RE.

A continuación se realizaron mediciones en ovocitos microinyectados con 37 nl de una solución de Fluo4 ($[F4]_{mix}$ = 500 μM) a distintas distancias de la zona de los gránulos (0, 1, 2 y 3 μm). Al mover el plano focal lejos de la zona de los gránulos, hacia la membrana plasmática, es decir a zonas donde no habría tanta presencia

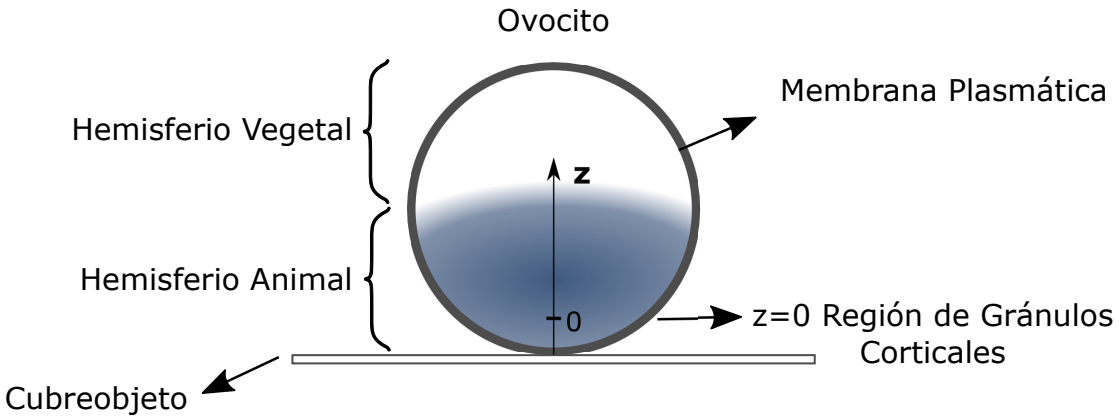

FIGURA 4.2
Esquema del ovocito donde se marca la zona de los gránulos respecto de la membrana plasmática y el eje z, respecto de esta zona.

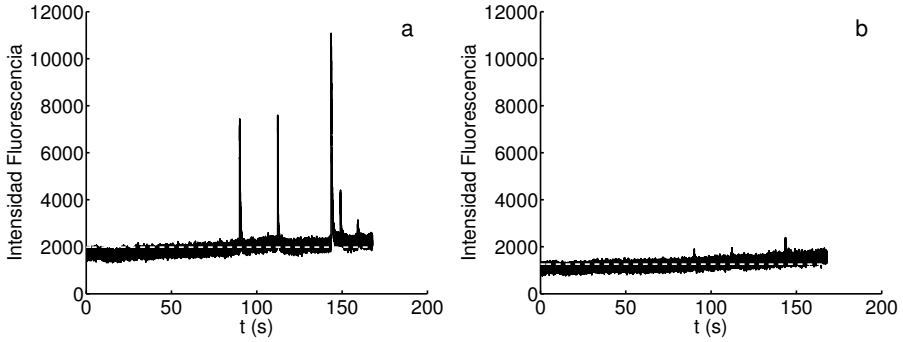

FIGURA 4.3
Registro de intensidad de fluorescencia (ua) en función del tiempo (s) de un ovocito inyectado con Fluo4 y TMR

del RE, fue posible aumentar la potencia del láser sin detectar picos de liberación de Ca^{2+} (Fig. 4.2). De esta manera se consiguió aumentar la eficiencia de emisión de las partículas fluorescente obteniendo una mejora significativa en la curva de autocorrelación sin disrrumpir las condiciones de equilibrio del sistema. (Fig. 4.4).

Sin embargo, alejar el plano focal de la zona donde se encuentran los gránulos corticales tiene como contrapartida la pérdida de la estructura de referencia. Como se puede apreciar en las imágenes (Fig. 4.4), la marca del *dye* se vuelve homogénea y no es posible determinar en qué momento se "sale" de la célula. Para establecer cuántos micrones es posible alejarse de la zona de los gránulos sin salir de la célula se realizó una serie de mediciones FCS en distintos z (z= 0, -1, -2, -3 y -4 μm)

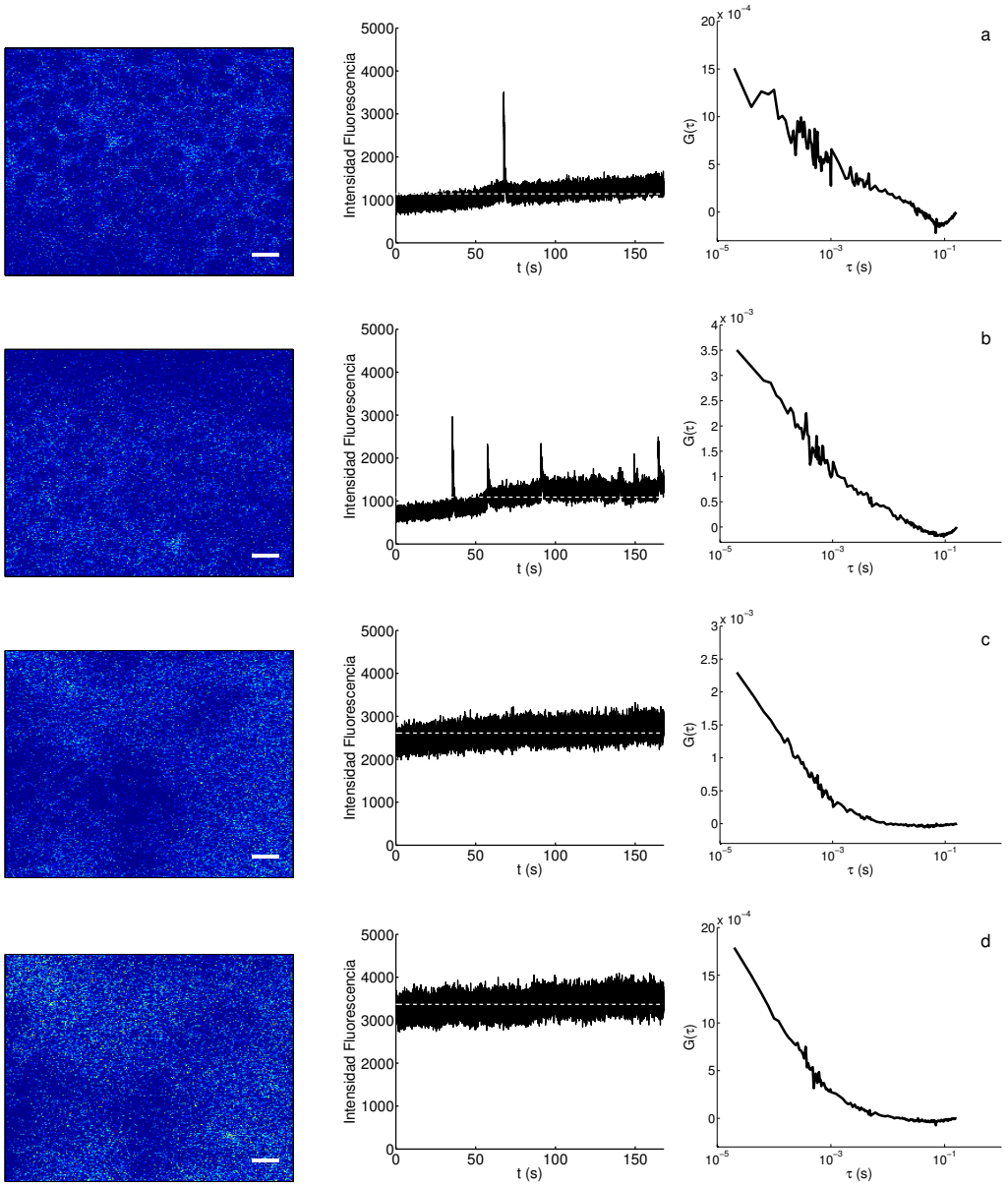

FIGURA 4.4

Izquierda: zona de referencia, imagen de la región en donde se realizó el registro de FCS, los gránulos corticales se observan como círculos más oscuros. Barra= 1 μm. Centro: registros de intensidad de fluorescencia, en unidades arbitrarias (ua) en función del tiempo, medido en segundos (s). Línea blanca a rayas: fluorescencia media, $\langle F \rangle$. Derecha: ACFs obtenidas de mediciones Point-FCS realizadas en ovocitos microinyectados con 37 nl de una solución de $[F4]_{mix} = 500\ \mu M$, a diferentes distancias de la región de los gránulos corticales en el hemisferio animal. (a) z = 0 μm; (b) z =-1 μm; (c) z =-2 μm; (d) z =-3 μm). Las potencias empleadas fueron: 2 % (a) y 5 % (b, c y d) respecto de la potencia máxima, lo que equivale a 2.8 y 4.1 μW, respectivamente.

en ovocitos inyectados con 37 nl de una solución de fluoresceína a 100 y 200 μM. Luego, a partir de los ajustes, de las ACFs obtenidas, con el modelo de la Ec.(1.7) se estimó el coeficiente de difusión de la fluoresceína en cada ubicación (Fig. 4.6). Entre los coeficientes de difusión estimados de las mediciones realizadas en z= 0 μm, -2 μm, y -3 μm no hay diferencias significativas, mientras que el valor encontrado en la ACF correspondiente a z=-4 μm es significativamente diferente del resto. En z=-1 μm sólo se pudo ajustar una de las ACFs, por lo tanto el punto del gráfico de la Fig. 4.6 representa a un único valor y no tiene barra de error, por este motivo se lo excluye de este análisis. De todas maneras es posible observar que las mediciones deberían realizarse a no más de tres micrones de la zona en la que se ven en foco los gránulos corticales.

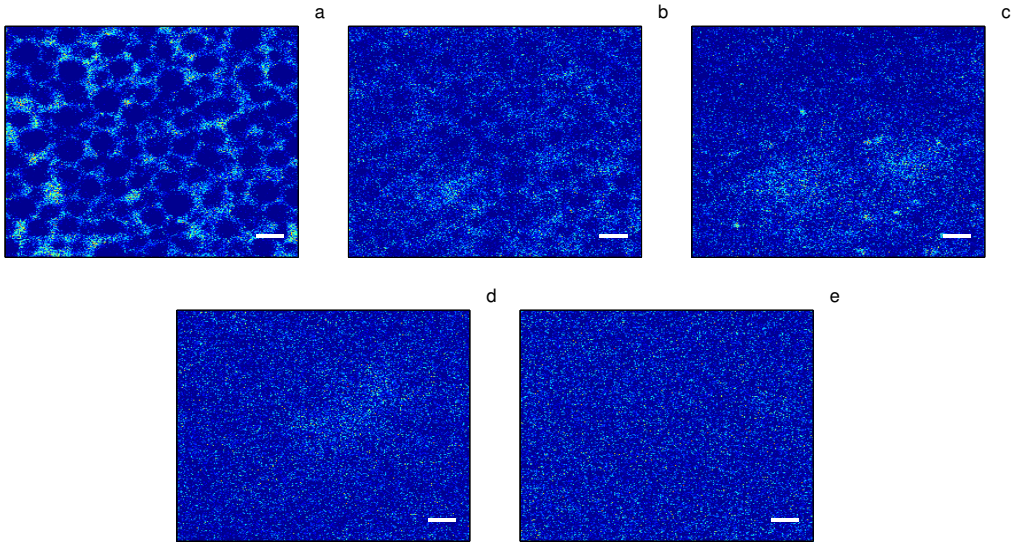

FIGURA 4.5
Imágenes de ovocitos con fluoresceína, a distintos z (distancia desde la zona de los gránulos). (a) z= 0 μm,(b) z= -1 μm ,(c) z= -2 μm,(d) z= -3 μm,(e) z= -5 μm. Barra: 1 μm

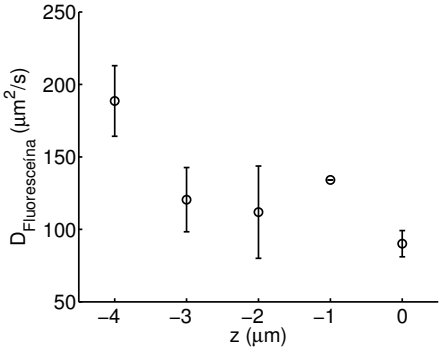

FIGURA 4.6
Coeficientes de difusión estimados de mediciones FCS realizadas a distintas distancias respecto de la zona de los gránulos corticales (z).

4.2. Caracterización del indicador de Ca^{2+}, Fluo8, en mediciones FCS

Las mediciones de FCS en ovocitos de *X. laevis* fueron realizadas en células microinyectadas con el indicador de Ca^{2+}, Fluo8. Como ya se mencionó, el Fluo8 es un indicador de Ca^{2+} análogo a Fluo4, pero dos veces más brillante. A nivel molecular las diferencias con el Fluo4 dextrano, que se usó en varios de los primeros controles, es el reemplazo de los dos átomos de flúor por dos átomos de hidrógeno y la ausencia de grupo dextrano (Fig. 1.6). Esto genera además, que el Fluo8 posea distintas constantes cinéticas en la unión a Ca^{2+} respecto del Fluo4, y, también, que tenga otro coeficiente de difusión.

Mientras que la constante de disociación, tanto en solución acuosa como *in vivo*, fue informada por el proveedor (K_d= 432 nM y 600 nM, respectivamente), al momento de realizar las mediciones no hayamos en la bibliografía el valor de su coeficiente de difusión. Por lo tanto, previamente a las mediciones en ovocitos se realizaron mediciones control en solución de Fluo8 y Ca^{2+}. El objetivo de estas mediciones fue, por un lado determinar el coeficiente de difusión del Fluo8 en solución para tener un parámetro de referencia en las mediciones en la célula. Y por otro lado, testear el uso de este indicador en este tipo de mediciones.

TABLA 4.1: Soluciones.
Todas las soluciones contienen además $[F8]_{tot} = 286\ nM$

Solución	$[Ca]_{tot}(nM)$
1	500
2	1000
3	1250
4	1750
5	2000
6	2250
7	3000
8	5000
9	7500
10	10000
11	100000

TABLA 4.2: Parámetros biofísicos y geométricos de las mediciones en solución de Fluo8 y Ca^{2+}.

Parámetro	*Valor*
w_{xy}	$0.28\ \mu m$
w_{ratio}	5
K_d	$432\ nM$

Se construyeron soluciones con concentración de Fluo8 constante (286 nM) y distintas concentraciones de Ca^{2+} ver Tabla 4.1. Se realizaron mediciones de FCS (ver Apéndice B). Se calculó la ACF promedio para cada medición y se realizó un ajuste teniendo en cuenta el modelo planteado en el Cap. 2 para el caso de Ca^{2+} y un indicador, Ec.(1.12). Se probaron modelos con distintas combinaciones de componentes, ajustes I, II y III (Ecs.(B.1)-(B.3))

4.2.1. Resultados

En casi todos los casos de los ajustes realizados por tres componentes (ajuste III, , Ec.(B.3)), se encontró un coeficiente de difusión alto (alrededor del valor esperado para el ión calcio), mientras que los otros dos mostraban valores similares entre sí o incluso el mismo. Esto se debe a que en las condiciones experimentales, uno de los coeficientes de difusión efectivos tiende al coeficiente de difusión libre del *dye*, D_F, y por este motivo no es posible identificarlos de manera separada, ver

Fig. 4.7. A continuación se analizarán en detalles los resultados obtenidos en los ajustes por dos componentes (ajustes I y II, , Ecs.(B.1) y (B.2)).

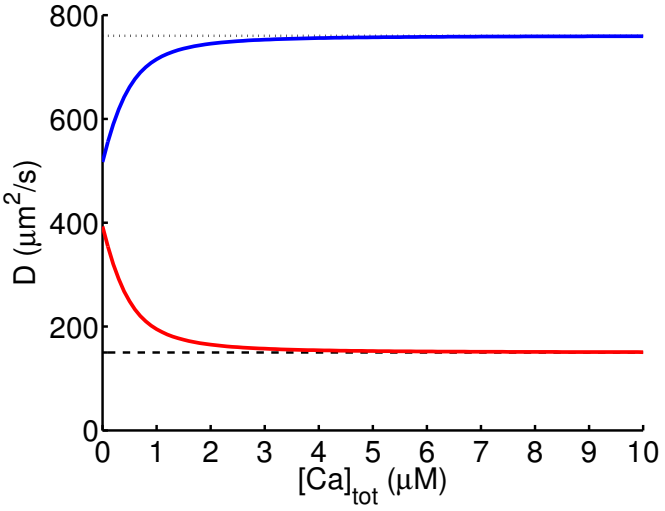

FIGURA 4.7
Coeficientes de difusión libres y efectivos, esperados para un sistema formado por Fluo8 y Ca^{2+}, en función de la concentración de Ca^{2+} total, Ca_{tot}, asumiendo D_{Ca} = 760 $\mu m^2/s$ y D_F = 150 $\mu m^2/s$. D_{ef1} línea sólida azul, D_{ef2} línea sólida roja, D_{Ca} línea de puntos negra, D_F línea a rayas negra.

Ajuste por dos componentes puramente difusivas (Ajuste I)

Coeficientes de difusión

Del ajuste de cada ACF con la Ec.(B.1) se obtienen dos coeficientes de difusión, D_1 y D_2 (Fig. 4.8). Según las predicciones del modelo teórico es posible identificar a D_2 con D_{ef1}, mientras que, como se mencionó previamente, dado que en el rango de concentraciones de $[Ca]_{tot}$ empleado, D_{ef2} es similar o muy cercano a D_F, resulta imposible identificarlos de manera separada (Figs. 4.7 y 4.8). Por este motivo, D_1 podría seguir un comportamiento como el esperado para D_{ef2} o permanecer constante como D_F.

En primer lugar se consideró a D_1 como el coeficiente de difusión asociado al término del modelo correspondiente al *dye* libre, D_F. Promediando sobre los distintos valores se obtuvo $\bar{D}_1 = (125 \pm 26)\ \mu m^2/s$. En segundo lugar, se consideró $D_1 =$

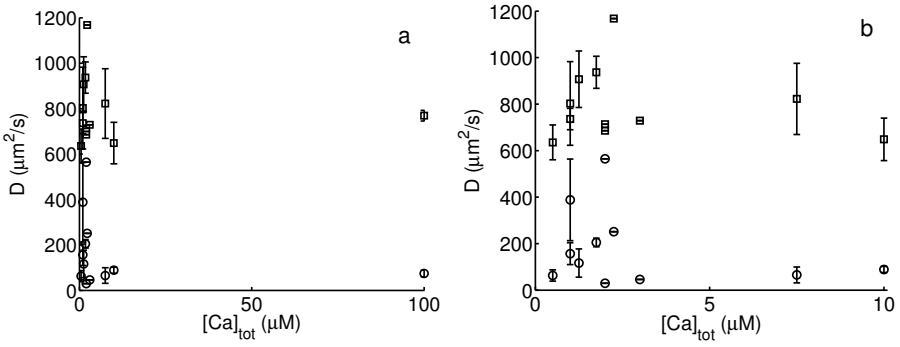

FIGURA 4.8
Coeficientes de difusión en función de la concentración de Ca^{2+} total, $[Ca]_{tot}$. Ajuste por dos componentes puramente difusivas (I). Los datos experimentales se grafican con símbolos para su valor medio y barra de error. Cuadrados, D_1 y círculos D_2. En (a) y (b) se grafican los mismos parámetros para distinto rango de $[Ca]_{tot}$, (a) $[Ca]_{tot}$ = 0 - 100 μM, (b) $[Ca]_{tot}$ = 0 - 10 μM.

D_{ef2} y se usó la Ec. (2.4) para ajustar los valores experimentales en función de x_F. Se consideró D_{Ca}= 760 $\mu m^2/s$ y se obtuvo D_F = (101 ± 34) $\mu m^2/s$. La diferencia entre los datos experimentales, D_1, y el promedio, o los valores del ajuste por la Ec.(2.4), calculada como la suma de las diferencias al cuadrado (Ec. (2.11)), es mayor en el caso del ajuste por la Ec. (2.11) (5328 para la comparación con el promedio contra 9109 para la comparación con el ajuste). Luego se ajustaron los datos obtenidos de D_2, en función de x_F, por la Ec. (2.3), en primer lugar se consideró $D_F = \bar{D}_1$ = 125 $\mu m^2/s$ y en segundo lugar, D_F = 101 $\mu m^2/s$. En el primer caso se obtuvo D_{Ca} = (845 ± 66) $\mu m^2/s$, y en el segundo caso se obtuvo D_{Ca} = (849 ± 65) $\mu m^2/s$. Ver Fig. 4.9.

Ajuste por una componente puramente difusiva y otra multiplicada por el término exponencial (Ajuste II)

Coeficientes de difusión

Del ajuste de cada ACF con la Ec. (B.2) se obtienen dos coeficientes de difusión, D_1, asociado a la componente puramente difusiva y D_2, asociado a la componente con el término exponencial (Fig. 4.10). En la Fig. 4.10 (b) puede observarse que D_1 es cercano al valor esperado para el coeficiente de difusión del *dye*, mientras que D_2

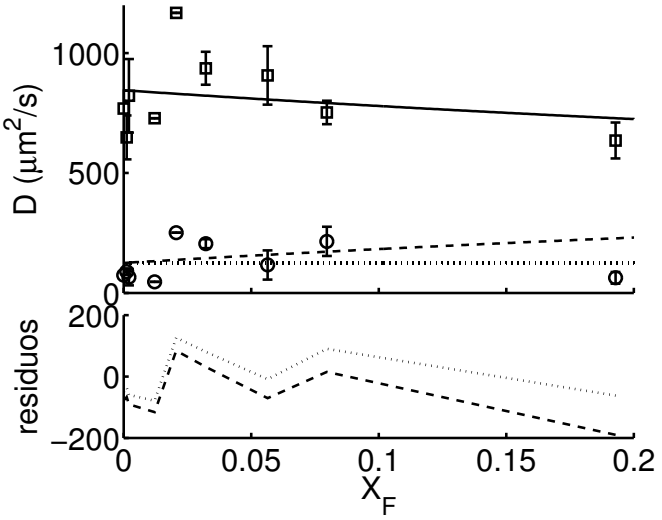

FIGURA 4.9
Coeficientes de difusión en función de x_F. Ajuste por dos componentes puramente difusivas (I). Los datos experimentales se grafican con símbolos para su valor medio y barra de error. Panel superior: símbolos cuadrados: D_2, y símbolos circulares: D_1, línea de puntos: promedio de D_1, línea a rayas: ajuste de D_1 por Ec.(2.4), línea sólida: ajuste de D_2 por Ec.(2.3). Panel inferior: residuos entre D_1 y su promedio, línea de puntos, y residuos entre D_1 y el ajuste por Ec.(2.3), línea a rayas, en función de x_F.

se encuentra alrededor del valor del coeficiente de difusión esperado para el Ca^{2+}. Sin embargo, el modelo teórico predice que el coeficiente de difusión efectivo que tiende al D_{Ca} debería ser el asociado a la componente puramente difusiva, D_{ef1}, y el coeficiente que tiende a D_F debería ser el asociado a la componente con el término exponencial, D_{ef2}. Esta discrepancia, como se discutirá más adelante, puede estar relacionada con el comportamiento de los autovalores de cada componente en función del cuadrado del número de onda, q^2. Si no se tiene en cuenta esta falta de correspondencia sobre qué coeficiente debería estar asociado a la componente con exponencial, lo que se observa es que, como en la sección anterior, D_1 es similar a D_F y a D_{ef2}, y D_2 sigue el comportamiento de D_{ef1}.

Como antes, en primer lugar se consideró a D_2 como el coeficiente de difusión asociado al término del *dye* libre, D_F. Al promediar este valor para las distintas soluciones se obtuvo $\bar{D}_1 = (126 \pm 7)\ \mu m^2/s$. En segundo lugar, se consideró $D_1 = D_{ef2}$ y se ajustaron los datos experimentales con la Ec. (2.4). Considerando

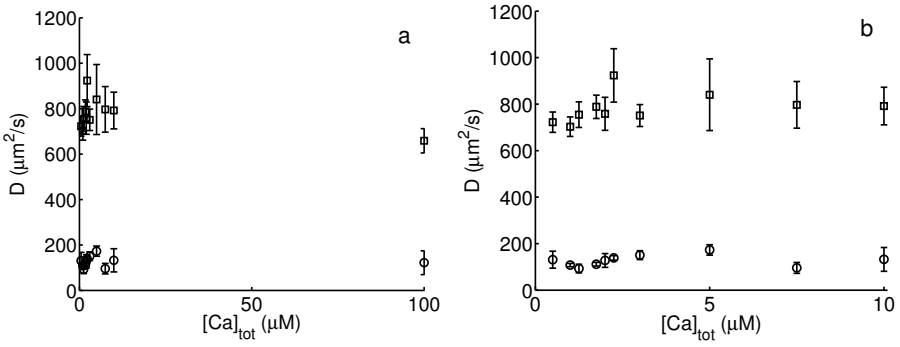

FIGURA 4.10
Coeficientes de difusión en función de la concentración de Ca^{2+} total, Ca_{tot}. Ajuste por dos componentes, una de ellas puramente difusiva y la otra con término exponencial (II). Los datos experimentales se grafican con símbolos para su valor medio y barra de error. D_2: símbolos cuadrados y D_1: símbolos circulares. En (a) y (b) se grafican los mismos parámetros para distinto rango de Ca_{tot}, (a) Ca_{tot} = 0 - 100 μM, (b) Ca_{tot} = 0 - 10 μM.

D_{Ca}= 760 $\mu m^2/s$, se obtuvo D_F = (104 ± 15) $\mu m^2/s$. La diferencia entre los datos experimentales de D_1 y su promedio o la curva del ajuste por la Ec. (2.4), calculada como la suma de las diferencias al cuadrado según la Ec. (2.11), es mayor en el caso del ajuste (508 para la comparación con el promedio contra 2039 para la comparación con la curva del ajuste). Luego, se ajustaron los valores de D_2 en función de x_F por la Ec (2.3). En primer lugar se consideró $D_F = \bar{D}_1 = 125\ \mu m^2/s$ y en segundo lugar, $D_F = 104\ \mu m^2/s$, obteniéndose D_{Ca} = (795 ± 24) $\mu m^2/s$ en ambos casos.

Constantes cinéticas

De la componente asociada al término exponencial en el ajuste de las ACFs por la Ec.(B.2), se obtiene un valor estimado de ν_F. En la Fig. 4.12 se observa que para bajas concentraciones de Ca^{2+} total ($[Ca]_{tot}$ <5 μM), los valores de ν experimentales son similares a los esperados, mientras que para altas concentraciones de Ca^{2+} ($[Ca]_{tot}$ >5 μM), los valores observados son mucho menor a los esperados (hasta 14 veces menor para $[Ca]_{tot}$ = 100 μM). Los datos experimentales de ν pueden ajustarse por la expresión de la Ec. (2.5), con la concentración libre de *dye*, $[F8]_{eq}$, y la concentración de *dye* total, $[F8]_{tot}$ calculadas por construcción de las soluciones, y la K_d provista por el fabricante, Tablas 4.1 y 4.2. Eliminando los

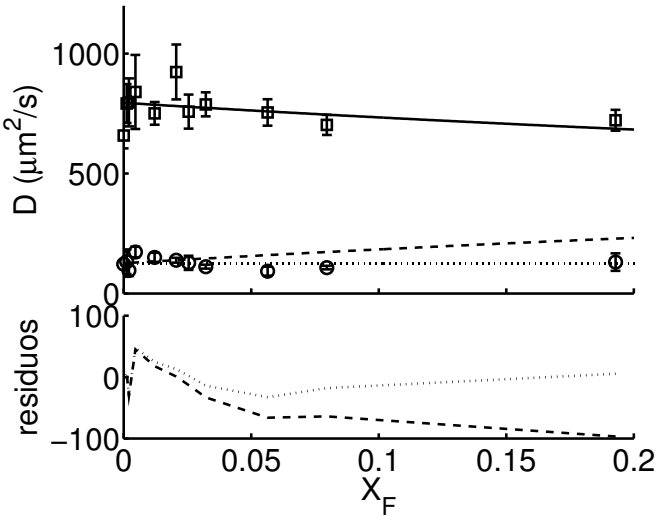

FIGURA 4.11
Coeficientes de difusión en función de x_F. Ajuste por dos componentes, una de ellas puramente difusiva y la otra con término exponencial (II). Los datos experimentales se grafican con símbolos para su valor medio y barra de error. Panel superior: símbolos cuadrados: D_2, símbolos circulares: D_1, línea de puntos: promedio de D_2, línea a rayas: ajuste de D_1 por Ec. (2.4) y línea sólida: ajuste de D_2 por Ec. (2.3). Panel inferior: residuos entre D_1 y su promedio, línea de puntos, y residuos entre D_1 y el ajuste por Ec. (2.3), línea a rayas, en función de x_F.

valores *outliers*, correspondientes a las soluciones 7, 9, 10 y 11 ($[Ca]_{tot}$= 3, 7.5, 10 y 100 μM, respectivamente), y ajustando por la Ec. (2.5), considerando $K_d = 432$ nM y $[F8]_{tot} = 286$ nM, se obtuvo $k_{off} = (55 \pm 14)$ s^{-1}, Fig. 4.13.

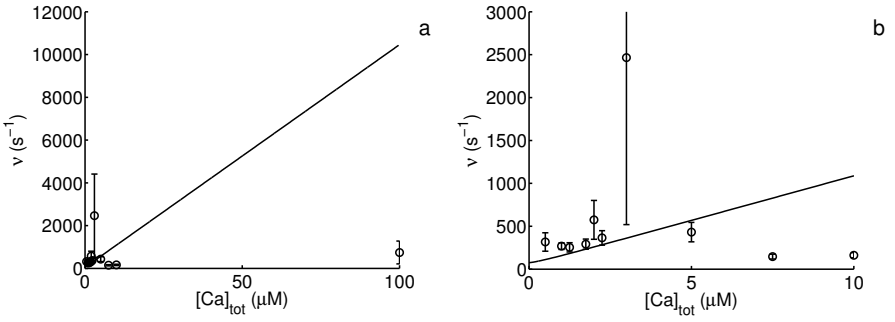

FIGURA 4.12
ν en función de la concentración de Ca^{2+} total, $[Ca]_{tot}$. Ajuste por dos componentes, una de ellas puramente difusiva y la otra con término exponencial (II). Datos experimentales: símbolos circulares con barra de error, línea sólida: ν teórico, esperado por construcción de las soluciones. En (a) y (b) se grafican los mismos parámetros para distinto rango de $[Ca]_{tot}$, (a) $[Ca]_{tot}$ = 0 - 100 μM, (b) $[Ca]_{tot}$ = 0 - 10 μM.

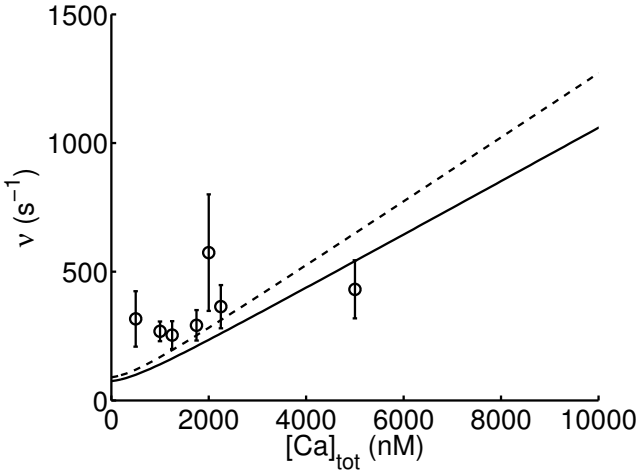

FIGURA 4.13
ν en función de la concentración total de Ca^{2+},Ca_{tot}. Ajuste por dos componentes, una de ellas puramente difusiva y la otra con término exponencial. Círculos: datos experimentales, promedio con barra de error para cada condición. Línea sólida: ν teórico, línea a rayas: ajuste de los datos por Ec. (2.5).

4.3. Conclusiones

En primer lugar se determinó que, a fin de conseguir ACFs "limpias", la potencia del láser no puede ser inferior al 5 % de la potencia máxima (valor que corresponde a $\sim 4\ \mu W$). Sin embargo, realizar mediciones en ovocitos de *X. laevis*, con estas potencias en la zona de los gránulos, genera un aumento en la fluorescencia que perturba la condición de equilibrio necesaria para FCS. Dadas las características del pico de fluorescencia observado, el aumento en la fluorescencia estaría ocasionado por un aumento puntual en la concentración de Ca^{2+} producto de la ruptura de la membrana del retículo endoplasmático por la intensidad del láser. Esto llevó a que se estudie la posibilidad de cambiar de región de adquisición, en particular, mover la zona focal algunos micrones hacia la membrana plasmática. Como resultado se determinó que a una distancia de entre uno y tres micrones de la zona de los gránulos es posible usar el láser en potencias más elevadas (superiores al 5 %) sin riesgo de provocar fotodaño en la membrana del retículo. Es importante mencionar que la ruptura de la membrana del retículo y la consecuente liberación del Ca^{2+} hacia el citosol no sólo provoca una disrrupción de las condiciones de equilibrio necesarias para las mediciones de FCS. Sino que, además, la célula deja

de estar en condiciones fisiológicas normales, debido a que no sólo se libera Ca^{2+} del retículo, que es lo que se puede detectar como un aumento en la intensidad de fluorescencia, también se liberan otras sustancias relacionadas con la homeostasis del Ca^{2+}, como por ejemplo *buffers* de Ca^{2+} exclusivos del retículo o en otras concentraciones. Esto conlleva a que, independientemente de que se pudiera obtener una ACF limpia de estas mediciones, las condiciones del sistema no serían las que se esperan encontrar en una célula en condiciones fisiológicas normales. A su vez, las mediciones con fluoresceína permitieron determinar la distancia máxima respecto de las zonas de los gránulos a la que es razonable ubicarse sin riesgo de estar fuera del citosol. En particular se observó que la distancia óptima está entre 2 y 3 μm desde la zona de los gránulos.

El objetivo de las mediciones de FCS en solución de Fluo8 y Ca^{2+} consistió, en primer lugar, en comprobar la viabilidad de este indicador en mediciones de FCS. En segundo lugar, fue posible estimar ciertos parámetros biofísicos del sistema, como los coeficientes de difusión libre de las especies involucradas, Ca^{2+} y Fluo8, y la tasa de disociación entre entre ellas, ver Tabla 4.3. En particular, las estimaciones del coeficiente de difusión libre del ión calcio en solución acuosa validan los parámetros estimados del ajuste de las ACFs. Ya que los valores obtenidos (795-845 $\mu m^2/s$, ajuste II y I, respectivamente) son consistentes con lo hallado en bibliografía [38, 61]. Estas mediciones también permitieron determinar el coeficiente de difusión libre del indicador de Ca^{2+} Fluo8, desconocido al menos hasta el momento en que fueron realizados estos experimentos. Los valores medios encontrados se encuentran entre $\sim$ 101-126 $\mu m^2/s$ (según se asocie D_1 al coeficiente de difusión de la primer componente, D_F o a D_{ef2}). De acuerdo a los valores obtenidos para las diferencias al cuadrado al comparar D_1, de cualquiera de los dos ajustes, con $\bar{D}_1$ o con D_{ef2} podemos decir que D_1 está siguiendo el comportamiento de el coeficiente de difusión del término del *dye* libre, D_F. Esto es más evidente en el ajuste II (por una componente difusiva y otra con el término exponencial). La estimación del coeficiente de difusión libre del *dye* Fluo8 en solución es sumamente útil para las mediciones en células, ya que permitirá tener una idea del D_F esperado en el citosol. Teniendo en cuenta los resultados presentados en [38], donde se determinó

que la relación entre los coeficientes de difusión de una sustancia en solución y en el citosol de ovocitos de *X. laevis* es $D_{sol}/D_{cit} \sim 3$, se espera que $D_{F_{cit}}$ se encuentre entre 34 y 42 $\mu m^2/s$.

Tabla 4.3: Resumen de los parámetros obtenidos del ajuste de las mediciones de FCS realizadas en solución de Ca^{2+} y el indicador de Ca^{2+}, Fluo8.

Ajuste	$D_1(\mu m^2/s)$		$D_2(\mu m^2/s)$	$k_{off}(1/s)$
	$\bar{D}$	D $\sim D_{ef2}$	D $\sim D_{ef1}$	
I	125 ± 26	101 ± 34	845 ± 66	—
II	126 ± 7	104 ± 15	795 ± 24	55 ± 14

La estimación de k_{off} a partir del ν derivado de los ajustes arrojó valores consistentes con lo esperado, pese a no encontrar la correspondencia esperada entre los coeficientes efectivos y ν, cuestión sobre la que volveremos más adelante. Los indicadores de Ca^{2+} derivados del BAPTA, como el Fluo4 y el Fluo8 entre otros, tienen aproximadamente la misma constante de afinidad, k_{on}, ya que los cambios reportados en la constante de disociación, K_d, se deben principalmente a cambios en la tasa de disociación, k_{off} con nulas o despreciables modificaciones en k_{on} [40]. Como se discute en Sigaut *et al.*, 2017 [38], es posible determinar el valor de k_{on} del Fluo4 cuyos valores de K_d y k_{off} ya han sido reportados. Asumiendo que la constante de disociación del Fluo4 es $K_{d_{F4}} = 772\ nM$ y su tasa de disociación $k_{off_{F4}} = 80\ s^{-1}$ ([38]), entonces dado que $k_{on}= k_{off}/K_d$ la tasa de asociación del Fluo4 es $k_{on_{F4}}$ =0.104 $s^{-1}nM^{-1}$. Por lo tanto el valor teórico de k_{off} del Fluo8 se puede calcular multiplicando la K_d, reportada por el fabricante, por el valor de k_{on} determinado para el Fluo4. Considerando la constante de disociación del Fluo8 en solución, $K_d = 432\ nM$, se calcula un $k_{off_{teórico}}= 45\ s^{-1}$. Mientras que el valor estimado en este trabajo fue $k_{off_{F8}}= (55 \pm 14)\ s^{-1}$. La discrepancia hallada en la correspondencia de los coeficientes efectivos y el término exponencial puede estar dada por el comportamiento de los autovalores, λ_1 y λ_2. Brevemente, la evolución de las concentraciones de los especies que participan en un sistema de reacción-difusión compuesto por Ca^{2+} y un indicador de Ca^{2+}, Fluo8 en este caso, está caracterizada por una matriz con tres ramas de autovalores: λ_F, λ_1 y λ_2, con λ_F el autovalor asociado a la difusión libre del *dye* (Ecs. (A.10)-(A.12)). En la Fig. 4.14 se grafican los autovalores exactos, λ_1 y λ_2, y los aproximados, λ_{ef1} y

λ_{ef2} en función del número de onda al cuadrado, q^2, para distintas concentraciones de Ca^{2+}, Fig. 4.14 (a) y (b). Para bajas concentraciones de Ca^{2+} total, Fig. 4.14 (a), para valores de q^2 pequeños, λ_{ef1} es igual λ_1 ($-D_{ef1}q^2 \approx \lambda_1$) y λ_{ef2} a λ_2 ($-\nu_F - D_{ef2}q^2 \approx \lambda_2$). Mientras que a medida que q^2 aumenta, el comportamiento de los autovalores exactos se modifica, λ_1 toma una pendiente similar a λ_{ef2} y λ_2 a λ_{ef1}. Si se proyectan las curvas de λ_1 y λ_2 en la región q^2 grande hacia q^2=0 μm^{-2}, λ_1 corta al eje y en un valor muy cercano a cero, mientras que λ_2 lo hace en un valor que va a estar más cerca de ν_F. En cambio, para altas concentraciones de Ca^{2+} total, Fig. 4.14 (b), los autovalores exactos, λ_1 y λ_2 son iguales a λ_{ef1} y λ_{ef2} respectivamente para q^2<1.6 μm^{-2} ($-D_{ef1}q^2 \approx \lambda_1$ y $-\nu_F - D_{ef2}q^2 \approx \lambda_2$). Mientras que para q^2>1.6 μm^{-2}, λ_1 y λ_2 son iguales a λ_{ef2} y λ_{ef1} ($-\nu_F - D_{ef2}q^2 \approx \lambda_1$ y $-D_{ef1}q^2 \approx \lambda_2$). Por lo tanto, la proyección de λ_2 corta al eje y en cero. Este comportamiento de los autovalores exactos es compatible con los resultados derivados de los ajustes de las ACFs experimentales obtenidas de mediciones de FCS en solución acuosa de Ca^{2+} y Fluo8. Donde para bajas concentraciones de Ca^{2+} la componente que tiene un coeficiente de difusión similar al del Ca^{2+} está multiplicada por el término exponencial. Al analizar el comportamiento de los autovalores exactos para concentraciones de Ca^{2+} altas vemos que la proyección de λ_2 no permite derivar un valor estimado de ν. Esto es compatible con el hecho de que para altas concentraciones de Ca^{2+}, $[Ca]_{tot}$ >2.25 μM, el ν derivado de los ajustes es muy diferente del esperado, ν_F. Mientras que para todo el rango de concentraciones de Ca^{2+} estudiado, la primer componente estaría dando la componente asociada al *dye* libre en vez de la asociada a D_{ef2} que es la que está multiplicada por el término exponencial.

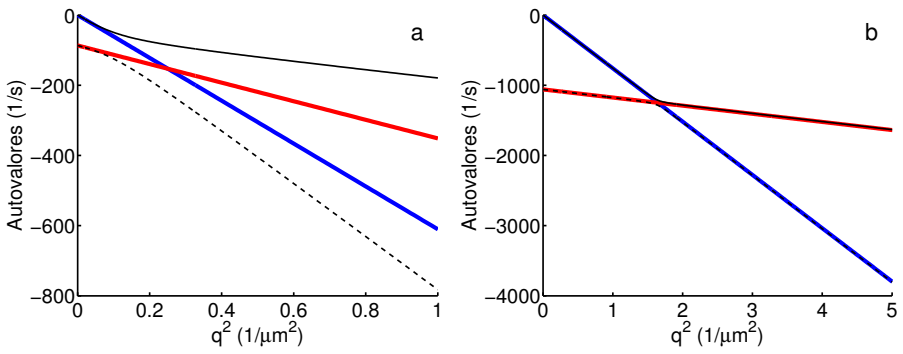

FIGURA 4.14: Dos ramas de autovalores no triviales como función del número de onda al cuadrado, q^2, de las ecuaciones de reacción-difusión linealizadas que corresponden a un sistema con Ca^{2+} y *dye*. Los cálculos se hicieron con los parámetros de la Tabla 4.2, $[F]_{tot}$= 286 nM de Fluo8 y dos concentraciones de Ca^{2+}, en (a) $[Ca]_{tot}$=500 nM y en (b) $[Ca]_{tot}$ = 10 μM. En ambas subfiguras se muestra λ_1 en línea sólida negra, y λ_2 en línea negra a rayas. Los autovalores efectivos λ_{ef1} y λ_{ef2}, se grafican en líneas sólidas azul y roja, respectivamente.

Capítulo 5

Estimación del coeficiente de difusión del Ca^{2+} en ovocitos de *Xenopus laevis* mediante experimentos de FCS

El ión Ca^{2+} es un mensajero intracelular universal, que está involucrado en la regulación de muchos y variados procesos celulares. Esto es posible gracias al amplio espectro de distribuciones espacio-temporales que su concentración puede desplegar dentro de la célula. Los procesos biofísicos subyacentes a su distribución espacio temporal son claves en determinar el tipo de señal generada ante determinado estímulo. A fin de lograr un mayor entendimiento respecto del alcance y de las posibilidades de la señalización por Ca^{2+} es de vital interés conocer el de difusión de este mensajero en células intactas. El principal objetivo de esta Tesis es determinar el coeficiente de difusión del ión Ca^{2+} en ovocitos de *Xenopus laevis* mediante técnicas ópticas, en particular FCS. En el presente Capítulo se estudiarán los resultados de experimentos de FCS realizados en el citosol y en el lumen del retículo endoplasmático de ovocitos de *X. laevis*.

5.1. Estimación del coeficiente de difusión de Ca^{2+} en citosol de ovocitos de *X. laevis*

Se realizaron mediciones de FCS en ovocitos inyectados con 37 nl de una solución de Fluo8, con $[F8]_{mix}$= 100 μM. A partir de cada registro de fluorescencia se calculó una ACF promedio, Fig.5.1 (ver Apéndice B). Para el ajuste de las ACFs se consideró un sistema compuesto por Ca^{2+} y dos trampas: el indicador y un único *buffer* endógeno colectivo. El modelo teórico que representa a este sistema es el de la Ec. (1.13). Sin embargo, realizar un ajuste considerando las cuatro componentes del modelo puede llevar a obtener resultados que no se condicen con el sistema, debido a la gran cantidad de parámetros libres. Teniendo en cuenta, además, el comportamiento de los D_{ef}, que en ciertas situaciones tienden a los D_{ef} de modelos más simple (ej.: Ca^{2+} y *buffer* o Ca^{2+} y *dye*, o incluso a los D libres), se utilizó un modelo más simple para ajustar las ACFs. En particular se usaron distintas combinaciones del modelo completo: dos componentes puramente difusivas (Ajuste I, Ec.(B.1)), una difusiva y una multiplicada por el término exponencial (Ajuste II, Ec.(B.2)), dos difusivas y una multiplicada por el término exponencial (Ajuste III, Ec.(B.3)), y una difusiva y dos multiplicadas por el término exponencial (Ajuste IV, Ec.(B.4)).

5.1.1. Resultados

En muchos casos se observó que para ciertos parámetros estimados a partir de los ajustes de las ACFs, mayormente los coeficientes de difusión, ajustes de distintas ACFs de mediciones realizadas en condiciones similares arrojaban valores que no se ubicaban alrededor de un único valor medio, sino tal vez de dos. Por este motivo, se realizó un análisis de la bimodalidad de la distribución de los parámetros estimados a partir de los ajustes mediante el criterio de Akaike como se detalla en el Apéndice B. En el caso en que este test haya resultado positivo para la bimodalidad se informarán los dos valores medios obtenidos. El ajuste por tres componentes, con dos puramente difusivas y una multiplicada por el término

exponencial (III) mostró inconsistencias sobre cuáles de los tres coeficientes de difusión se encontraba asociado a la componente con el término exponencial. Por este motivo no se desarrollarán los resultados obtenidos con este ajuste. A continuación se detallan los resultados obtenidos para los coeficientes de difusión con el resto de los ajustes (I, II y IV).

Ajuste por dos componentes puramente difusivas (I)

Del ajuste de cada ACF con la Ec.(B.1) se obtienen dos coeficientes de difusión, D_1 y D_2, ambos muestran un comportamiento bimodal, según el criterio de diferencia de Akaike, ver Tabla 5.1 y Fig. 5.2.

Si se estudian los ajustes que presentan un D_1 mayor a 35 $\mu m^2/s$, el valor medio obtenido es D_{1_a}= (60 ± 6) $\mu m^2/s$. El peso, G_{1_a}, asociado a estos coeficientes representa un 10 % del peso total de la ACF, Go_{tot}. Si se asume que esta componente es la del *dye* libre, y se estima la concentración de *dye* total a partir del peso según la Ec. (2.6), se obtiene $[Fluo8]_t$= (1308 ± 154) nM.

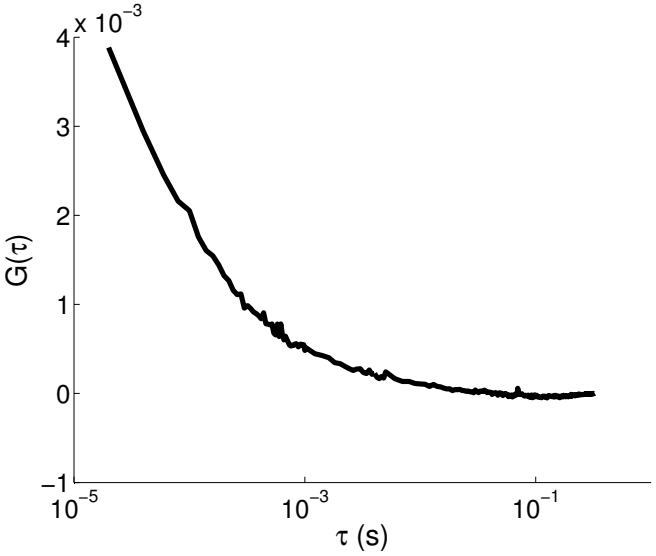

FIGURA 5.1: ACF representativa de una medición de FCS realizada en ovocito cargado con Fluo8.

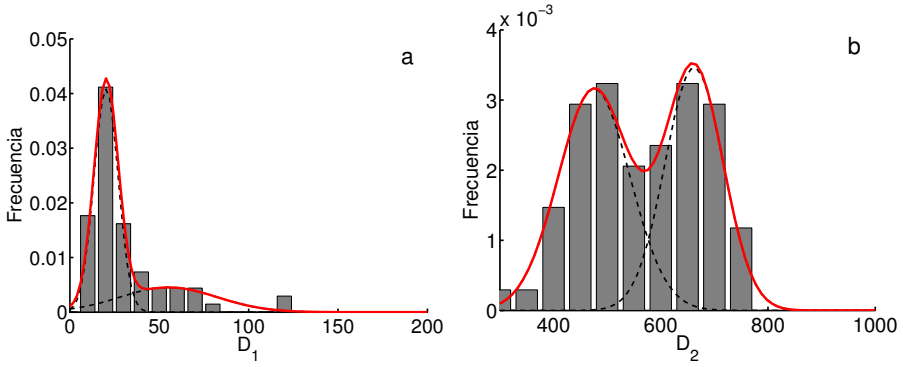

FIGURA 5.2
Frecuencia de distribución de los coeficientes de difusión obtenidos del ajuste I: D_1 (a) y D_2 (b). En línea llena roja se graficó la curva del ajuste de la distribución, en ambos casos se ve una distribución bimodal (cada una de las dos gaussianas se representan en línea de puntos negra).

Ajuste por una componente puramente difusiva, y una multiplicada por el término exponencial (II)

Del ajuste de cada ACF por la Ec.(B.2) se obtienen dos coeficientes de difusión, D_1 y D_2, ambos muestran un comportamiento bimodal, según el criterio de diferencia de Akaike, ver Tabla 5.1, y Fig. 5.3.

Si se estudian los ajustes que presentan un D_1 mayor a 25 $\mu m^2/s$, el valor medio obtenido es D_{1_a}= (42 $\pm$ 3) $\mu m^2/s$. El peso, G_{1_a}, asociado a esta componente representa un 9 % del peso total de la ACF, Go_{tot}. Si se asume que esta componente es la del *dye* libre, y se estima la concentración de *dye* total a partir del peso según la Ec. (2.6), se obtiene $[Fluo8]_t$= (2258 $\pm$ 259) nM.

Ajuste por una componente puramente difusiva, y dos multiplicadas por el término exponencial (IV)

En el ajuste de las ACFs experimentales por la Ec.(B.4), los coeficientes de difusión asociados a la componente puramente difusiva, D_1, y a una de las componentes multiplicadas por el término exponencial, D_2 presentan una distribución bimodal (Fig. 5.4 (a y b)), según el criterio de diferencia de Akaike (Ver Tabla 5.1). El

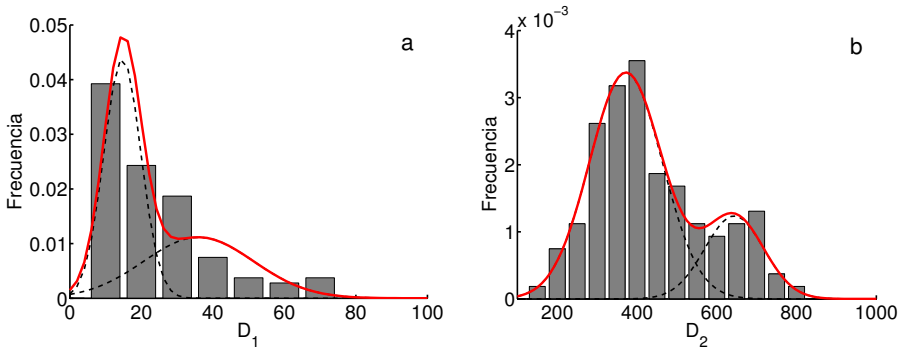

FIGURA 5.3
Frecuencia de distribución de los coeficientes de difusión obtenidos del ajuste II: D_1 (a) y D_2 (b). En línea llena roja se graficó la curva del ajuste de la distribución, en ambos casos se ve una distribución bimodal (las dos gaussianas se representan en línea de puntos negra).

coeficiente de difusión asociado a la otra componente con término exponencial, D_3, presenta una distribución unimodal (Fig. 5.4 (c)). El valor medio obtenido es $D_3 = (332 \pm 13)\ \mu m^2/s$.

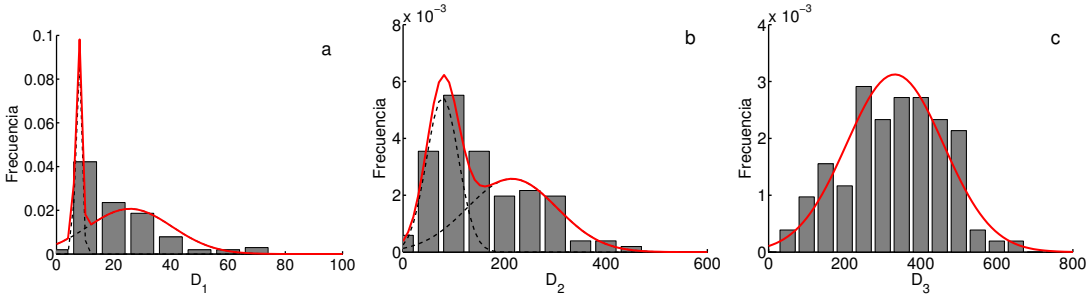

FIGURA 5.4: Frecuencia de distribución de los coeficientes de difusión obtenidos del ajuste IV: D_1 (a), D_2 (b), y D_3 (c) en rojo se graficó la curva del ajuste de la distribución. En (a) y en (b) se ve una distribución bimodal (en línea negra de puntos están representadas las dos gaussianas), mientras que en (c) la distribución es unimodal.

Si se analizan los datos correspondientes a $D_2 < 145\ \mu m^2/s$, que serían los que dan el componente 1 de su distribución, se obtiene un valor medio de D_{2_a}= (81 $\pm$ 4) $\mu m^2/s$. Si se asume que esta componente es la del *dye* libre, y se estima la concentración de *dye* total a partir del peso según la Ec. (2.6), se obtiene $[Fluo8]_t$= (1380 $\pm$ 334) nM. Este peso representa el 32 % del peso total. En cambio, si se asume que la componente del *dye* libre es la que da D_{1_2} y se estudian los $D_1 >$

TABLA 5.1: Coeficientes de difusión estimados de los ajustes de las ACFs obtenidas en mediciones de FCS en el citosol de ovocitos de *X. laevis*. En el caso en que el test de bimodalidad de Akaike haya resultado positivo, se informan los dos valores medios y su proporción, como *Media (%)*, mientras que si la distribución resultó ser unimodal se informa un único valor y se aclara que corresponde al 100 %.

	D_1		D_2		D_3
	D_{1_1}	D_{1_2}	D_{2_1}	D_{2_2}	
Ajuste	Media (%)	Media (%)	Media (%)	Media (%)	Media (%)
I	20 (69)	55 (31)	484(53)	662 (47)	—
II	14 (54)	36 (44)	365(73)	625 (27)	—
IV	8 (24)	26 (76)	78(43)	215 (57)	332(100)

17 $\mu m^2/s$ se obtiene un valor medio de D_{1_b}= (33 ± 2) $\mu m^2/s$, si se calcula como antes la concentración de *dye* total a partir del peso según la Ec. (2.6), se obtiene $[Fluo8]_t$= (7071 ± 2312) nM, este peso, además, representa el 8 % del peso total.

5.2. Estimación del coeficiente de difusión de Ca^{2+} en el lumen del retículo endoplasmático de ovocitos de *X. laevis*

La liberación de Ca^{2+} desde reservorios internos como forma de aumentar su concentración en la construcción de señales intracelulares de Ca^{2+} es un mecanismo ampliamente utilizados por distintos tipos celulares [69]. En células no musculares, esta liberación está mediada principalmente por receptores de IP_3 [28, 70]. En particular, en ovocitos de *X. laevis* los receptores de IP_3 se encuentran distribuidos en la membrana del retículo endoplasmático (RE), el mayor reservorio interno de Ca^{2+}, en estas células, involucrado en las señales intracelulares de dicho ión [8, 10, 11, 28]. Por lo tanto conocer la dinámica del Ca^{2+} en el lumen de RE es clave en el entendimiento de las señales.

Como se mencionó en la introducción, el indicador Fluo5-N tiene una muy baja afinidad por el Ca^{2+} y en su versión AM es capaz de permear membranas. Estas

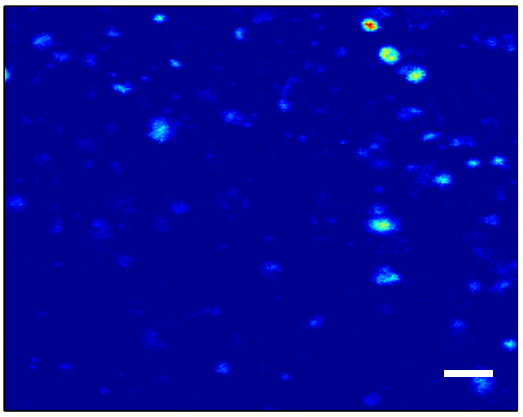

FIGURA 5.5: Ovocito tratado con Fluo5-N AM, zona de referencia donde se realizarán las mediciones FCS, las regiones más claras corresponden a la fluorescencia del indicador. Barra: 1 μm.

características lo convierten en la herramienta elegida para estudiar el Ca^{2+} en los reservorios internos, como es el caso del lumen del RE. El patrón de marcación observado en ovocitos tratados con Fluo5-N es muy diferente del encontrado en ovocitos tratados con Fluo8, que es un marcador de Ca^{2+} citosólico, Fig. 5.5. Típicamente se observan pequeñas regiones marcadas, de aproximadamente 0.3 μm de diámetro, en un fondo oscuro, ocasionalmente es posible percibir los gránulos corticales delimitados por las regiones de fluorescencia. El problema con este tipo de mediciones es que al ser en el lumen del RE, es inevitable que en muchos casos el láser ocasione cierto daño sobre la membrana, lo que se observa como una disminución en la intensidad de fluorescencia.

En esta sección se presentan los resultados obtenidos del ajuste de ACFs obtenidas a partir de mediciones de FCS en el lumen del RE utilizando Fluo5-N AM como indicador de Ca^{2+}. Las mediciones que presentaron problemas en la fluorescencia fueron excluidas del análisis.

Las células fueron incubadas con un baño de solución Barth con concentración de Fluo5-N AM $[F5]$ =10 μM por un lapso de tiempo no inferior a dos horas. Se realizaron mediciones de FCS, tomando registros de 167 s. Cada registro fue dividido en tres segmentos, para cada segmento se calculó la ACF correspondiente, y luego se obtuvo una ACF promedio para cada registro, Fig. 5.6 (Ver Apéndice

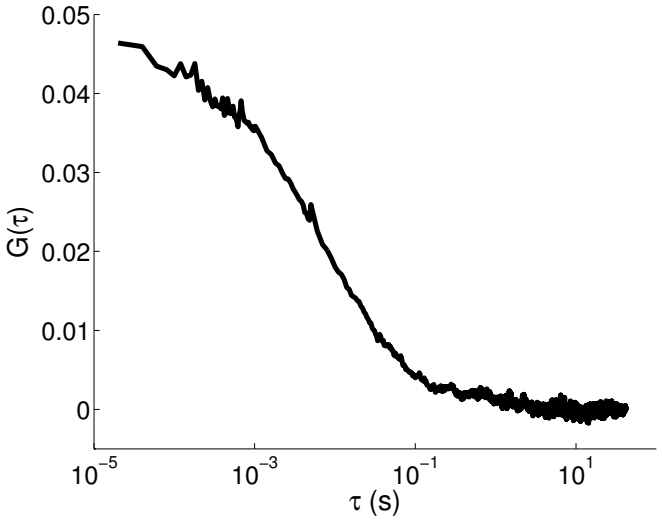

FIGURA 5.6: ACF representativa de una medición de FCS realizada en ovocito tratado con Fluo5-N AM.

B para mayores detalles). La ACF promedio se ajustó con distintas combinaciones de las componentes del modelo teórico de la Ec. (1.13). En particular se probó con: dos componentes puramente difusivas (Ajuste I, Ec.4 (B.1)), una difusiva y una multiplicada por el término exponencial (Ajuste II, Ec. (B.2)), dos difusivas y una multiplicada por el término exponencial (Ajuste III, Ec. (B.3)), y una difusiva y dos multiplicadas por el término exponencial (Ajuste IV, Ec. (B.4)).

5.2.1. Resultados

En todos los ajustes hay ciertos coeficientes que se repiten, ver Tabla 5.2. Por ejemplo, en los cuatro tipos de ajustes realizados se obtienen coeficientes de difusión menores a 1 $\mu m^2/s$ (D_1 para los ajustes I, II, III y IV, y D_{1_1} y D_{3_1} para el ajuste IV). En todos los ajustes vemos un coeficiente de difusión entre 2-5 ($\mu m^2/s$) (D_{2_1} para los ajustes I, II y IV, D_{3_2} para III, y D_{3_3} en IV). Si bien con una mayor variabilidad, también se distingue en todos los ajustes un coeficiente de difusión mayor a 100 (D_{2_2} en los cuatro tipos de ajustes). Los ajustes por tres componentes (III y IV) arrojan un coeficiente de difusión $\sim$30 $\mu m^2/s$ (D_{2_1} en III y D_{1_2} en IV) que no pudo ser determinado en los ajustes por dos componentes (I y II).

Tabla 5.2

Coeficientes de difusión en el RE. Parámetros estimados a partir de distintos tipos de ajustes de las ACFs obtenidas de las mediciones FCS en el retículo endoplasmático. En el caso en que el test de bimodalidad de Akaike haya resultado positivo, se informan los dos valores medios y su proporción, como *Media (%)*, mientras que si la distribución resultó ser unimodal se informa un único valor y se aclara que corresponde al 100 %.

	D_1		D_2		D_3	
	D_{1_1}	D_{1_2}	D_{2_1}	D_{2_2}	D_{3_1}	D_{3_2}
Ajuste	Media (%)	Media (%)	Media (%)	Media (%)	Media (%)	Media (%)
I	0.36 (48)	0.04 (52)	4 (86)	314 (14)	—	—
II	0.43 (45)	0.06 (55)	3 (89)	191 (11)	—	—
III	0.60 (14)	0.10 (86)	28 (46)	144 (54)	2 (100)	—
IV	0.43 (85)	31 (15)	5 (81)	146 (19)	0.30 (65)	2 (35)

5.3. Conclusiones

En los ajustes de las mediciones con Fluo8 en el citosol de ovocitos de *X. laevis* encontramos en la mayoría de los coeficientes de difusión estimados una distribución bimodal, con dos valores medios. En todos los casos, la correlación entre los coeficientes de difusión (D_1 y D_2 para los ajustes I y II, y D_1 y D_2, D_1 y D_3, y D_2 y D_3 para el ajuste IV) está por debajo de 0.5, ver Tabla 5.3. Esto es un indicio de que el hecho de encontrar una distribución bimodal para los coeficientes de difusión no está relacionado con distintas condiciones del lugar puntual de la medición. Porque de ser así, se vería una mayor correlación entre los coeficientes estimados en cada ajuste.

Tabla 5.3: Correlación entre los coeficientes de difusión estimados de un mismo ajuste de las ACFs obtenidas de las mediciones de FCS en ovocitos de *X. laevis*. i: I, II y IV donde corresponda.

Ajuste		I		II		IV		
		D_1	D_2	D_1	D_2	D_1	D_2	D_3
	D_1	1	0.455	1	0.434	1	0.404	0.38
i	D_2	0.455	1	0.434	1	0.404	1	0.27
	D_3	–	–	–	–	0.38	0.27	1

Dados los resultados teóricos detallados en el Cap. 3 respecto del comportamiento de los autovalores en función del cuadrado del número de onda, q^2, la bimodalidad

encontrada puede deberse a que el ajuste esté convergiendo a distintos mínimos, dando los distintos coeficientes de difusión que sigue cada autovalor.

Si tenemos en cuenta la masa de cada una de las especies moleculares que intervienen en el sistema, m_{Ca} para el Ca^{2+}, m_F para el *dye* y m_B para un *buffer* de Ca^{2+} colectivo, podemos asignar los coeficientes encontrados a cada una de las especies. Dado que $m_B > m_F > m_{Ca}$, entonces $D_B < D_F < D_{Ca}$, donde D_B es el coeficiente de difusión del *buffer*, D_F es el coeficiente de difusión del *dye*, y D_{Ca} es el coeficiente de difusión del Ca^{2+}. En los ajustes por dos componentes, es posible asociar uno de los coeficientes de la primer componente D_{1_1}= 20 $\mu m^2/s$ para el ajuste I, y D_{1_1}= 14 $\mu m^2/s$ para el ajuste II, con el de un *buffer* endógeno (colectivo). Así mismo el otro coeficiente de la primer componente, D_{1_2}= 55 $\mu m^2/s$ para el ajuste I, y D_{1_2}= 36 $\mu m^2/s$ para el ajuste II, con el coeficiente de difusión del *dye*. En estos ajustes (I y II), el coeficiente de difusión asociado a la segunda componente también presentó una distribución bimodal (con valores medios de D_1= 484 $\mu m^2/s$ y 662 $\mu m^2/s$ para el ajuste I, y D_1= 365 $\mu m^2/s$ y 625 $\mu m^2/s$, para el ajuste II). La segunda componente estaría asociada al coeficiente de difusión del Ca^{2+}, ya que es la especie de menor tamaño en el sistema analizado y por este motivo, la de mayor coeficiente de difusión. Aunque en general se observan valores bastantes más altos que lo esperado según la bibliografía, en particular los correspondientes a D_{2_2} en ambos ajustes (I y II).

En el ajuste por tres componentes, el primer término da dos coeficientes de difusión pequeños, que podrían corresponder a un *buffer* endógeno (D_{1_1} = 8 $\mu m^2/s$ y D_{1_2} = 26 $\mu m^2/s$). En particular, si se considera que la distribución de frecuencias de este parámetro es unimodal en vez de bimodal, el valor medio es de D_1= (21 $\pm$ 2) $\mu m^2/s$, muy cercano al valor encontrado en los ajustes por dos componentes. De la segunda componente del ajuste salen dos coeficientes de difusión, el de valor medio D_{2_1}= 78 $\mu m^2/s$ podría ser el coeficiente del *dye*. El otro coeficiente, de valor medio D_{2_2}= 215 $\mu m^2/s$, podría ser un coeficiente efectivo que toma valores entre los coeficientes libres de las especies del sistema. Por último, D_3= (332 $\pm$ 13) $\mu m^2/s$, da el coeficiente de difusión más rápido en este ajuste, por lo tanto lo asociamos al coeficiente de difusión libre del Ca^{2+}. Una interpretación alternativa

de los coeficientes estimados con el ajuste IV es que D_{1_1}= 8 $\mu m^2/s$ corresponda al coeficiente de difusión de un *buffer* endógeno, D_{1_2}= 26 $\mu m^2/s$ al coeficiente del *dye* libre, D_{2_1} = 78 $\mu m^2/s$ y D_{2_2}= 215 $\mu m^2/s$ sean coeficientes efectivos y D_{3_1}= 332 $\mu m^2/s$ corresponda al coeficiente del Ca^{2+}.

En resumen, de estas mediciones se puede estimar aproximadamente el coeficiente de difusión de un *buffer* endógeno colectivo que estaría entre 8 y 21 $\mu m^2/s$. Mientras que el coeficiente de difusión del Fluo8 estaría entre $D_{F_{ovo}}$= (39 ± 9) y (56 ± 12) $\mu m^2/s$, según se considere que en el ajuste IV, el coeficiente de difusión asociado al *dye* está dado por D_{1_2} o D_{2_1}.

Ahora bien, el peso asociado a las componentes que dan el coeficiente de difusión del *dye*, deberían permitir estimar la concentración de indicador total ($[F8]_{tot}$) mediante la Ec. (2.6), que por construcción de las soluciones y considerando que el ovocito tiene un volumen Vol_{ovo} = 1 μm^3 es $[F8]_{tot} \approx 3700\ nM$. Los valores obtenidos en cada tipo de ajuste fueron: ajuste I, $[Fluo8]_t$= (1308 ± 154) nM, ajuste II, $[Fluo8]_t$= (2258 ± 259) nM, y ajuste IV, $[Fluo8]_t$= (1380 ± 334) nM o $[Fluo8]_t$= (7071 ± 2312) nM, según se considere que la componente que da D_F sea D_{2_1} o D_{1_2}. A su vez, el peso de esta componente debería ser inferior al 14 % del peso total de la ACFs, ya que $[CaF]/[F8]_{tot} = [Ca]_{eq}/(K_d + [Ca]_{eq}) = 0.14$ con $[Ca]_{eq}$= 100 nM y K_d = 600 nM. Entonces, de acuerdo a la teoría original descripta en el Cap. 2, el cociente entre el peso del término asociado al *dye*, Go_F, y el peso total Go_{tot} es equivalente al cociente entre las concentraciones de Ca^{2+}-ligado a *dye*, $[CaF]_{eq}$, y *dye* total, $[F]_t$, Go_F/Go_{tot}=$[CaF]_{eq}/[F]_t$. Sin embargo, de acuerdo al Cap. 3, en el caso de interés, el peso total de la ACF es mayor que la inversa del número de partículas de Ca^{2+}-ligado a *dye* debido al efecto que tienen las fluctuaciones en el número de iones de Ca^{2+} libres sobre la fluorescencia observada. Por lo tanto la relación entre el peso de la componente asociada al *dye* debe ser menor al cociente entre $[CaF]_{eq}$ y $[F]_t$. En particular, esto se cumple para los casos analizados en el ajuste por dos componentes (I y II), donde el porcentaje del peso de la componente asociada al *dye* es de 10 y 9 %. Mientras que en el ajuste por tres componentes (IV) esto se cumple si se considera que el coeficiente de difusión asociado a la componente del *dye* libre es D_{1_2}, donde la concentración

total de *dye* estimada es $[Fluo8]_t = (7071 \pm 2312)\ nM$, y el porcentaje respecto del peso total es del 9 %. Cabe recordar también, que en las condiciones en que uno de los coeficientes de difusión efectivos es $\sim D_F$ es imposible determinar cada componente por separado. Por lo tanto, es de esperar que el peso asociado a D_F, Go_F se encuentre sobreestimado ya que se suma el peso de la componente con D_{ef} $\sim D_F$, en esta situación la concentración de *dye* total estimada a partir del peso de las componentes con $D \sim D_F$ sería menor al esperado, algo que se observa en los ajustes I y II, y en el ajuste IV esto lo vemos si consideramos que el coeficiente de difusión del *dye* está dado por D_{2_1}= 26 $\mu m^2/s$.

En los ajustes de las mediciones con Fluo5-N AM en el RE de ovocitos de encontramos coeficientes de difusión llamativamente pequeños (0.04-0.6 $\mu m^2/s$) que corresponden a tiempos de correlación $\tau \sim$ 30-500 ms. La aparición de estos tiempos de correlación más largos en mediciones de FCS cerca de membranas biológicas, como es este caso, suele estar asociada a fluctuaciones térmicas de la membrana [71].

Las especies presentes en el sistema estudiado son tres: Ca^{2+}, un *buffer* endógeno de Ca^{2+}, B, y el indicador Fluo5-N AM, F. La relación de masas es, como antes, $m_{Ca} < m_F < m_B$. Por lo tanto, la relación entre sus coeficientes de difusión es $D_{Ca} > D_F > D_B$. Entonces asociamos D= 2-5 $\mu m^2/s$ con el coeficiente de difusión de un *buffer* endógeno, $D \sim 30\ \mu m^2/s$ con el coeficiente de difusión del Fluo5, y finalmente los coeficientes de difusión mayores, D= 144-314 $\mu m^2/s$, con el del Ca^{2+}.

El indicador de Ca^{2+} Fluo5-N AM tiene un peso molecular (MW) similar al del Fluo8 (MW_{Fluo8}= 887 y $MW_{Fluo5-N}$=1128), por lo que esperamos que el coeficiente de difusión del Fluo5-N sea similar al del Fluo8. Entonces, de acuerdo a los resultados obtenidos, se observa una reducción en los coeficientes de difusión estimado de aproximadamente un factor dos respecto a los valores hallados en el citosol. En particular, si nos centramos en los ajustes por tres componentes (III y IV), que son los que brindan más información, el D_F estimado es $\approx 30\ \mu m^2/s$, mientras que D_{Ca} estimado es $\approx 145\ \mu m^2/s$. Comparando con lo hallado en el

citosol $D_{F_{cit}}/\ D_{F_{RE}} = 39/30 \sim 1.3$ o $D_{F_{cit}}/\ D_{F_{RE}} = 56/30 \sim 1.9$, según qué coeficiente del ajuste IV consideremos que es el correspondiente a D_F (D_{1_2}= 26 $\mu m^2/s$ o D_{2_1}= 78 $\mu m^2/s$), y $D_{Ca_{cit}}/\ D_{Ca_{RE}} = 332/145 \sim 2.3$, los coeficientes de difusión del *dye* y del Ca^{2+}, en el lumen del RE, estarían reducidos aproximadamente en un factor dos respecto a lo encontrado en el citosol. Trabajos realizados con GFP también reportaron una disminución del coeficiente de difusión en el lumen del RE respecto del citosol [72], aunque la disminución reportada en el caso de la GFP fue algo mayor a la encontrada en nuestro caso de estudio. Mientras que para el coeficiente de difusión que asociamos a los *buffers* endógenos se encontró una reducción mayor, con $D_{B_{RE}}$ =3 $\mu m^2/s$, por lo tanto $D_{B_{cit}}/D_{B_{RE}} \sim 5$. Sin embargo, en este caso, la disminución en el coeficiente de difusión puede deberse a la distinta viscosidad del medio o a la geometría del RE sumada a la distinta composición de lo que consideramos como un *buffer* endógeno colectivo.

Como se explicó en el Cap. 2, los coeficientes efectivos varían según las distintas condiciones del sistema, concentraciones, constantes de reacción, etc. Para poder establecer con mayor seguridad si los coeficientes encontrados en este capítulo son efectivos o si son los libres de las especies del sistema en el siguiente Capítulo se realizarán mediciones de FCS en ovocitos con distintas condiciones basales. En particular se buscará modificar la concentración de *buffers* de Ca^{2+} por un lado, y la de Ca^{2+} basal por otro.

Capítulo 6

Modificación de las condiciones basales en ovocitos *Xenopus laevis*

Los coeficientes de difusión efectivos son promedios pesados entre los coeficientes de difusión libre de las especies que participen del sistema. En ciertas condiciones los coeficientes efectivos tienden a los coeficientes libres. En este Capítulo desarrollaremos los resultados obtenidos al intentar modificar las condiciones basales de concentración de *buffer* y Ca^{2+}.

6.1. Modificación de la concentración de EGTA

El EGTA es un *buffer* de Ca^{2+} lento que suele ser usado en el estudio de señales de Ca^{2+} ya que impide la formación de eventos de tipo onda al disrumpir la comunicación entre *clusters* de receptores de IP_3, mientras que permite observar eventos más localizados [73–75]. En la Fig. 6.1 se muestran señales de Ca^{2+} evocadas mediante liberación de IP_3 enjaulado, ante distintas concentraciones de EGTA. La liberación de IP_3 se realizó mediante un pulso de luz UV de aproximadamente 1 s emitido por un sistema LED accionado manualmente. La luz UV fue encendida a aproximadamente 2 s desde el comienzo de la medición a fin de poder estimar

un nivel de fluorescencia basal. La detección se realizó mediante la técnica *Linescan*, utilizando las especificaciones que se suelen usar en el grupo de trabajo para detectar eventos de tipo *puffs* u ondas. Las concentraciones de EGTA analizadas fueron de 1.25, 3.75 y 5 mM en el mix de inyección, con Fluo8 a 1 mM. En la Fig. 6.1 se observa que ante altas concentraciones de EGTA ($[EGTA]_{mix} = 5\ mM$) el IP_3 produce pequeñas liberaciones de Ca^{2+} que se perciben principalmente por un aumento en la curva de la fluorescencia media, $\langle F \rangle$, en función del tiempo, Fig. 6.1 (a). Concentraciones más bajas de EGTA, $[EGTA]_{mix} = 3.75\ mM$, permiten la formación de eventos de tipo *puffs* ante un aumento de IP_3, Fig. 6.1 (b). Mientras que con la concentración de EGTA más baja analizada, $[EGTA]_{mix} = 1.25\ mM$, es posible la generación de eventos de tipo onda, Fig. 6.1 (c). La variedad de eventos, evocados por liberación de IP_3, que pueden observarse ante distintas concentraciones de EGTA, está directamente relacionada con el alcance de los iones calcio liberados por los canales receptores de IP_3. El EGTA modifica la escala espacial de difusión de Ca^{2+} restringiendo la propagación de la señal, esto debería verse reflejado en una modificación en los coeficientes de difusión efectivos. A continuación estudiamos los coeficientes de difusión derivados de mediciones de FCS en ovocitos inyectados con Fluo8 y EGTA en distintas concentraciones.

6.1.1. Aproximación mediante FCS en solución de Fluo8, EGTA y Ca^{2+}

Como primera aproximación se realizaron mediciones de FCS en solución de Ca^{2+}, Fluo8 y EGTA. Se utilizó una concentración total de *dye* constante y un rango de concentraciones de Ca^{2+} y EGTA, para imitar la situación en la célula, donde es esperable que el Ca^{2+} libre se mantenga constante, Tabla 6.2. En particular, para la concentración de Fluo8 y el rango de concentraciones de EGTA (entre 9.43 y 10.34 mM) elegidos la concentración de Ca^{2+} libre se mantiene constante siempre que $[Ca]_{tot} = [EGTA]_{tot}$.

En primer lugar, se analizó de manera teórica el comportamiento esperado para los coeficientes de difusión efectivos en una solución de Fluo8 de concentración

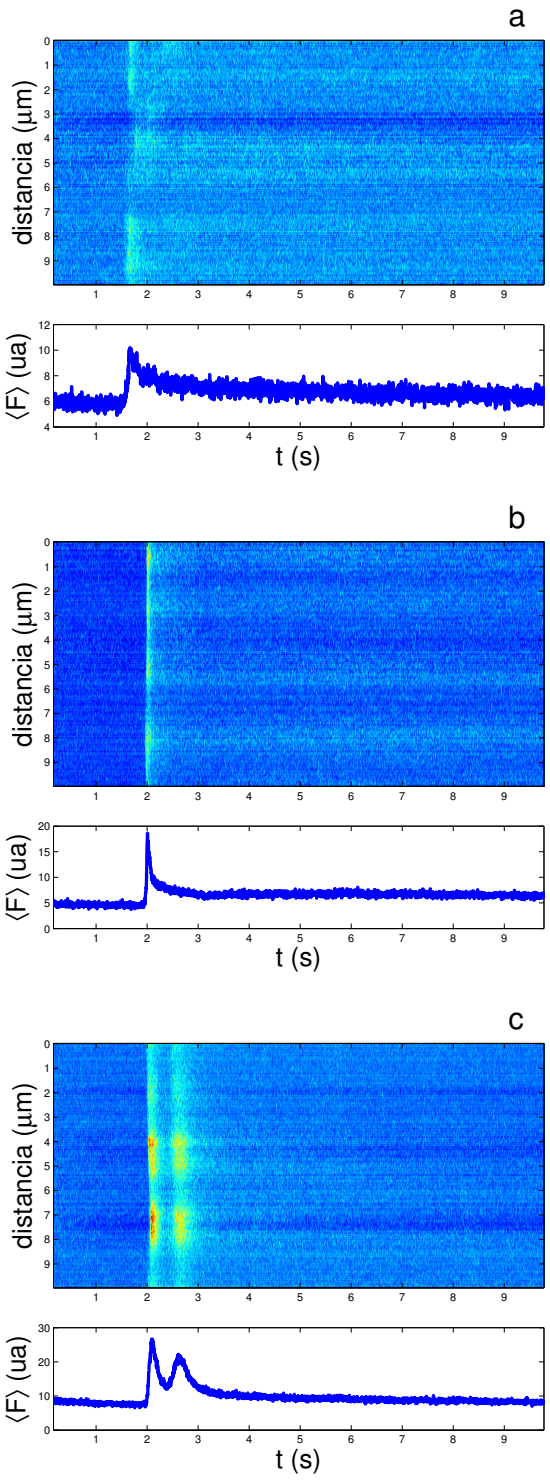

FIGURA 6.1
Señales evocadas por liberación de IP_3 enjaulado con luz UV , en ovocitos tratados con Fluo8 y EGTA ($[EGTA]_{mix} = 5\ mM$ (a), $3.75\ mM$ (b) y $1.25\ mM$ (c)). En cada subfigura también se grafica la curva de la evolución de la fluorescencia media, $\langle F \rangle$, en el tiempo

Tabla 6.1: Parámetros usados en los cálculos

Parámetro	*Valor*
w_r	0.28 μm
w	5
D_{Ca}	760 $\mu m^2/s$
D_F	125 $\mu m^2/s$
D_E	405 $\mu m^2/s$
K_{dF}	432 nM
k_{offF}	45 s^{-1}
K_{dE}	150 nM
k_{offE}	0.75 s^{-1}

constante ($[F8]_{tot}$=676 nM) y un rango de concentraciones de Ca^{2+} y EGTA ($[Ca]_{tot}$=$[EGTA]_{tot}$ entre 9 y 10 mM), Fig. 6.2. También se estudió el comportamiento esperado para los valores de los ν efectivos en el rango de concentraciones mencionado previamente, Fig. 6.3.

Luego, se ajustó las ACFs experimentales con un modelos con dos componentes, una puramente difusiva y una con término exponencial (Ajuste II, Ec. (B.2)).

6.1.1.1. Resultados

El comportamiento de los coeficientes de difusión estimados del ajuste es consistente con lo esperado para un sistema de Ca^{2+}, EGTA y Fluo8, Figs. 6.4 y 6.2. Se obtienen dos coeficientes de difusión, D_1, asociado a la componente puramente difusiva, y D_2, asociado a la componente con el término exponencial. En promedio $\bar{D}_1$= (192 ± 20) $\mu m^2/s$, y $\bar{D}_2$= (624 ± 52) $\mu m^2/s$. Estos valores serían algo

Tabla 6.2: Concentraciones empleadas en las soluciones de Fluo8, EGTA y Ca^{2+}

$[Ca]_{tot}$ (mM)	$[EGTA]_{tot}$ (mM)	$[F8]_{tot}$ (nM)
9.43	9.43	676
9.66	9.66	676
9.76	9.76	676
9.86	9.86	676
10.05	10.05	676
10.34	10.34	676

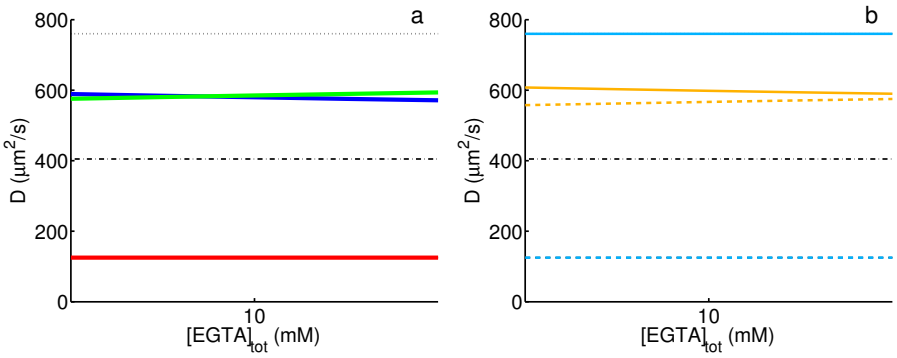

FIGURA 6.2

Valores teóricos esperados para los coeficientes de difusión efectivos de (a) un sistema con las concentraciones de la Tabla 6.2, D_{ef1}: línea azul, D_{ef2}: línea roja, D_{ef3}: línea verde; (b) Coeficientes de difusión efectivos de un sistema formado por Ca^{2+} y EGTA o Ca^{2+} y Fluo8, según las concentraciones de la Tabla 6.2, D_{ef1}^{CaE} línea sólida naranja, D_{ef2}^{CaE} línea a rayas naranja, D_{ef1}^{CaF} línea sólida celeste, D_{ef2}^{CaF} línea a rayas celeste. En ambos gráficos se dibujan en líneas negras los coeficientes de difusión libres del Ca^{2+} (línea de puntos), EGTA (línea de puntos y rayas) y Fluo8 (línea a rayas, no se observa, ya que coincide totalmente con D_{ef2} en (a) y con D_{ef2}^{CaF} en (b)).

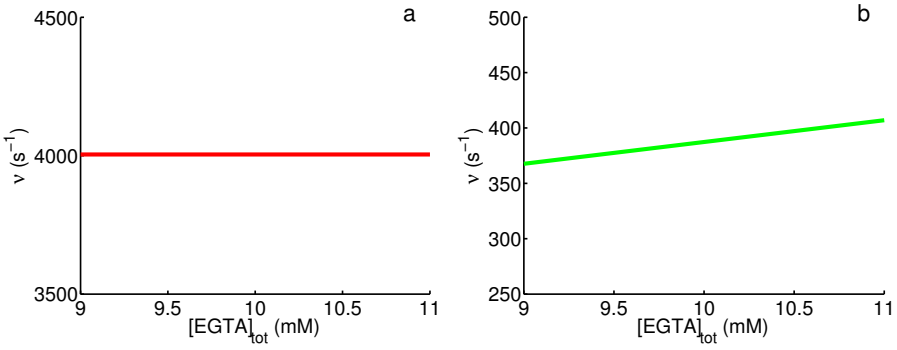

FIGURA 6.3

Valor teóricos esperados para los ν efectivos -(a) ν_{ef2}, (b) ν_{ef3}- de un sistema con las concentraciones de la Tabla 6.2.

superiores a lo que se espera según la teoría, donde D_{ef2}=D_F= 125 $\mu m^2/s$ y D_{ef1} $\sim$ D_{ef3} $\sim$ 600 $\mu m^2/s$.

En cuanto al ν estimado, sacando el valor correspondiente a la solución con $[EGTA]_{tot}$= 10.05 mM, cuyo valor medio es aproximadamente tres órdenes de magnitud mayor que el del resto de las mediciones y además presenta una amplia dispersión, se obtiene un valor medio de $\bar{\nu}$ =(1226 $\pm$ 568) s^{-1}.

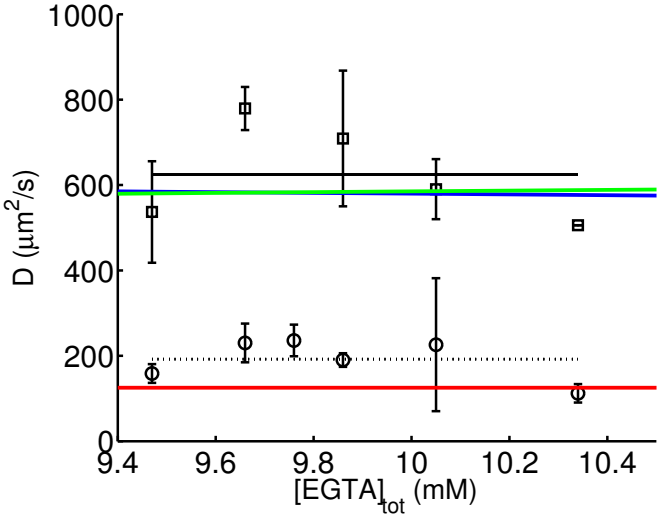

FIGURA 6.4

Coeficientes de difusión efectivos estimados a partir del fiteo por dos componentes, una puramente difusiva y otra multiplicada por el término exponencial, de las ACFs experimentales correspondientes a soluciones con las concentraciones de la Tabla 6.2. Se grafica el promedio y la barra de error (SEM). Símbolos cuadrados: D_1, coeficiente asociado a la componente puramente difusiva; círculos: D_2, coeficiente asociado a la componente con la exponencial. Línea de puntos, promedio de D_1; línea sólida, promedio de D_2

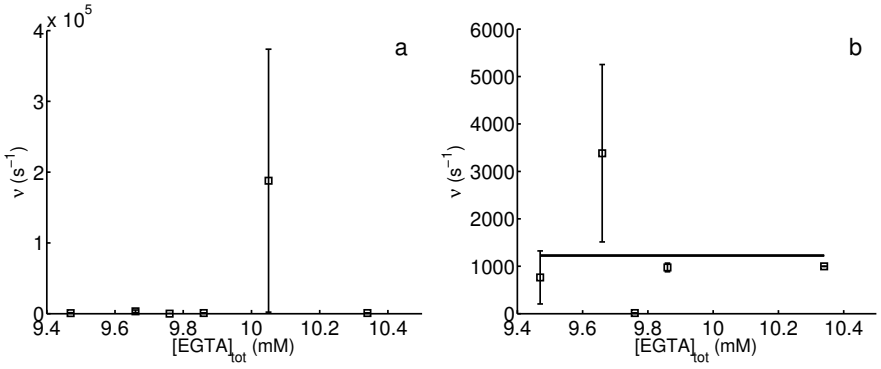

FIGURA 6.5

Valores del ν estimado de los ajustes de las ACFs experimentales, por dos componentes, una puramente difusiva y otra multiplicada por el término exponencial (Ajuste II, Ec.(B.2)), correspondientes a soluciones con las concentraciones de la Tabla 6.2. (a) Todos los datos, (b) se descarta la solución con $[EGTA]_{tot}$= 10.05 mM y se calcula el promedio (línea sólida).

6.1.2. Mediciones FCS en ovocitos con Fluo8 y EGTA

En primer lugar se estudió, de forma teórica, el comportamiento esperado para los coeficientes de difusión efectivos en un sistema de condiciones similares a las experimentales, ver Fig. 6.6.

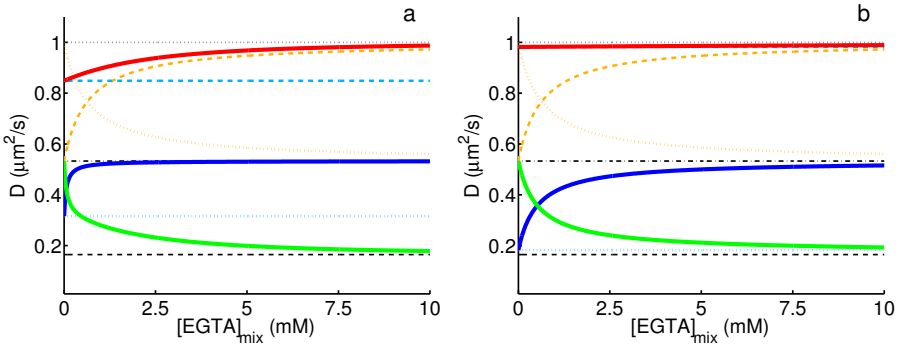

FIGURA 6.6
Coeficientes de difusión efectivos en relación al D_{Ca}, según la concentración total de EGTA, para un sistema donde la concentración de Ca^{2+} libre en el equilibrio es constante (100 nM) y la concentración de Fluo8 es de (a) 3.7 μM y, (b) 37 μM. En líneas sólidas: D_{ef1} en azul, D_{ef2} en rojo, D_{ef3} en verde. En naranja, D_{ef1}^{CaE} en línea de puntos y D_{ef2}^{CaE} en línea a rayas. En celeste, D_{ef1}^{CaF} en línea de puntos y D_{ef2}^{CaF} en línea a rayas. En negro los coeficientes de difusión libres, D_F en línea a rayas, D_E en línea de punto y raya, y D_{Ca} en línea de puntos. Como coeficientes de difusión libres se tomaron valores correspondientes a solución acuosa (D_{Ca} =760 $\mu m^2/s$, D_F =125 $\mu m^2/s$, D_E =405 $\mu m^2/s$) ya que en la célula en principio todos se verían modificados por el mismo factor. Y las constantes de reacción K_{dF}= 600 nM, k_{offF}= 70 $1/s$, K_{dE}= 150 nM y k_{offF}= 0.75 $1/s$.

Luego, se realizaron mediciones de FCS en ovocitos de *X. laevis* microinyectados con 37 nl de una solución con Fluo8 a 100 μM o 1 mM y distintas concentraciones del *buffer* de Ca^{2+} EGTA (1 mM - 10 mM), ver Tabla 6.3. Las ACFs se ajustaron con un modelo de tres componentes, con un término puramente difusivo y dos términos multiplicados por una componente exponencial (Ajuste IV. Ec. B.4). Se analizó la distribución de frecuencia de los coeficientes de difusión estimados y se determinó si se correspondía con una distribución uni o bimodal mediante el criterio de diferencia de Akaike.

TABLA 6.3: Concentraciones empleadas en el *mix* de inyección en ovocitos tratados con EGTA

$[EGTA]_{mix}$	$[F8]_{mix}$	
1.25 (mM)	100 (μM)	1 (mM)
2.5 (mM)	100 (μM)	1 (mM)
3.75 (mM)	100 (μM)	1 (mM)
5 (mM)	100 (μM)	1 (mM)
10 (mM)	100 (μM)	—

6.1.2.1. Resultados

Bajo Fluo8

En todas las mediciones se determinaron cinco coeficientes de difusión. La componente puramente difusiva y una de las multiplicadas por el término exponencial mostraron una distribución bimodal del coeficiente de difusión (D_{1_1}, D_{1_2}, D_{2_1} y D_{2_2}, respectivamente). Mientras que de la última componente se obtuvo un único coeficiente (D_3). Ver Tabla 6.4 y Fig. 6.7.

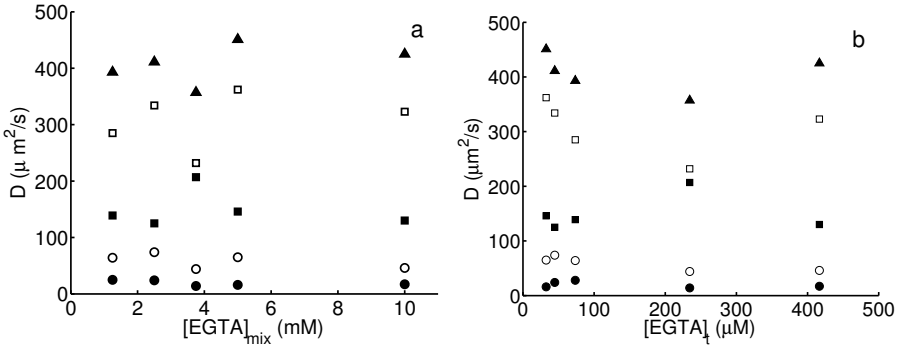

FIGURA 6.7
Coeficientes de difusión estimados a partir del ajuste de las ACFs obtenidas en ovocitos inyectados con una solución de Fluo8 a 100 μM y distintas concentraciones de EGTA. D_{1_1}: círculo lleno , D_{1_2}: círculo vacío, y D_{2_1}: cuadrado lleno, D_{2_2}: cuadrado vacío, y D_3: triángulo lleno. (a) Coeficientes en función de la concentración de EGTA en el mix de inyección, $[EGTA]_{mix}$. (b) Coeficientes en función de la concentración de EGTA en el ovocito.

Tanto D_{1_1} como D_{1_2} se mantienen constantes para las distintas concentraciones de EGTA. Dando un valor medio de $\bar{D_{1_1}}$= (19 ± 3) $\mu m^2/s$, que asociamos al *buffer*

endógeno, y $\bar{D_{1_2}}$= (59 ± 6) $\mu m^2/s$ que asociamos al *dye*. Aplicando la Ec. (2.6) al peso asociado a las componentes de los ajustes que dan D_{1_2} se puede calcular la concentración total de Fluo8, promedio, en el ovocito para cada conjunto de mediciones (agrupando las mediciones por concentración de EGTA en el mix de inyección). Procediendo de esta manera encontramos que las concentraciones de Fluo8 difieren en las distintas mediciones, pese a que la concentración de indicador en la solución de inyección es la misma ($[Fluo8]_t \sim$ 6000 nM, 2000 nM, 6250 nM, 650 nM y 4000 nM, para los ovocitos inyectados con $[EGTA]_{mix}$= 1.25 mM, 2.5 mM, 3.75 mM, 5 mM y 10 mM, respectivamente). Entonces, calculamos un factor de dilución como el cociente entre la concentración de Fluo8 en el mix y la encontrada al aplicar la Ec.(2.6). Ese factor lo usamos para estimar la concentración de EGTA en el ovocito, $[EGTA]_t$. En la Fig. 6.7 (b) se muestran los coeficientes de difusión estimados de los ajustes en función del concentración de EGTA en el ovocito. En esta figura vemos que D_{2_2} y D_3 decaen a medida que aumenta $[EGTA]_t$. Esto indicaría que D_{2_2} y D_3 representan coeficientes de difusión efectivos.

Alto Fluo8

En todas las mediciones se determinaron cinco coeficientes de difusión. La componente puramente difusiva y una de las multiplicadas por el término exponencial mostraron una distribución bimodal del coeficiente de difusión (D_{1_1}, D_{1_2}, D_{2_1} y D_{2_2}, respectivamente). Mientras que de la última componente se obtuvo un único coeficiente (D_3). Ver Tabla 6.5 y Fig. 6.8 (a). Los valores medios de D_{1_1} y D_{1_2} son muy cercanos por lo que podrían representar a un mismo coeficiente de difusión, pese a que el análisis de la bimodalidad fue positivo. En la Fig. 6.8 (b) se presentan nuevamente los coeficientes de difusión obtenidos del ajuste pero con los valores de D_1 interpretados como una única distribución. En promedio se obtiene: $\bar{D_1}$ = (8 ± 1) $\mu m^2/s$, $\bar{D_{2_1}}$ = (44 ± 4) $\mu m^2/2$, $\bar{D_{2_2}}$ = (142 ± 9) $\mu m^2/2$, $\bar{D_3}$ = (366 ± 34) $\mu m^2/2$.

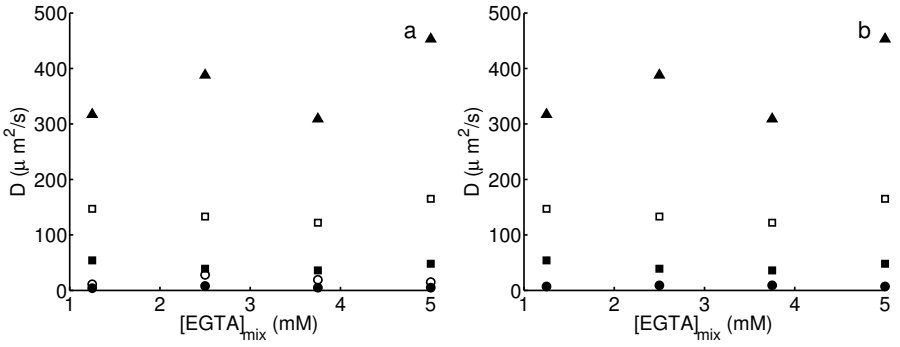

FIGURA 6.8
Coeficientes de difusión estimados a partir del ajuste de las ACFs obtenidas en ovocitos inyectados con una solución de Fluo8 a 1 mM y distintas concentraciones de EGTA. (a) D_{1_1}: círculo lleno, D_{1_2}: círculo vacío, D_{2_1}: cuadrado lleno, D_{2_2}: cuadrado vacío, y D_3: triángulo lleno. (b) D_1: círculo lleno, D_{2_1}, D_{2_2} y D_3 igual que en (a).

TABLA 6.4: Coeficientes de difusión estimados de los ajustes de las ACFs obtenidas en mediciones de FCS en el citosol de ovocitos de *X. laevis* tratados con Fluo8 a 100 μM y distintas concentraciones de EGTA.

	D_1		D_2		D_3
$[EGTA]_{mix}$ (mM)	D_{1_1} Media (%)	D_{1_2} Media (%)	D_{2_1} Media (%)	D_{2_2} Media (%)	Media (%)
1.25	25(87)	64(13)	139(35)	285(65)	393(100)
2.5	24(95)	74 (5)	125(50)	334(50)	411(100)
3.75	14(81)	44(19)	207(73)	232(27)	357(100)
5	16(64)	65(36)	146(40)	362(60)	451(100)
10	17(45)	46(55)	130(45)	323(55)	425(100)

6.2. Modificación de la concentración de Ca^{2+} basal

Como se explicó anteriormente, los coeficientes de difusión efectivos varían con la concentración de cada uno de los actores que intervienen en el proceso involucrado en la generación de fluctuaciones de fluorescencia. Sin embargo, en ciertas condiciones los coeficientes efectivos tienden a los coeficientes de difusión libres. Para determinar si los coeficientes estimados en los ajustes son realmente efectivos o

Tabla 6.5: Coeficientes de difusión estimados de los ajustes de las ACFs obtenidas en mediciones de FCS en el citosol de ovocitos de *X. laevis* tratados con Fluo8 a 1 mM y distintas concentraciones de EGTA.

	D_1		D_2		D_3
$[EGTA]_{mix}$ (mM)	D_{1_1} Media (%)	D_{1_2} Media (%)	D_{2_1} Media (%)	D_{2_2} Media (%)	Media (%)
1.25	4(55)	11(45)	54(27)	147(73)	317(100)
2.5	8(93)	28 (7)	39(23)	133(77)	388(100)
3.75	5(68)	19(32)	36(50)	122(50)	309(100)
5	5(80)	15(20)	48(33)	165(67)	453(100)

si son los libres es necesario modificar las condiciones experimentales. Los experimentos reportados en esta sección se basan en la modificación de la concentración de Ca^{2+} citosólico.

6.2.1. Aproximación mediante FCS en solución

En esta sección se analizarán los resultados de mediciones de FCS en solución acuosa conteniendo el indicador de Ca^{2+}, Fluo8, el *buffer* de Ca^{2+} EGTA y Ca^{2+}, siendo las concentraciones de *dye*, $[F8]_{tot}$ y del *buffer*, $[EGTA]_{tot}$, constantes y un rango de concentraciones de Ca^{2+}, $[Ca]_{tot}$. Ver Tabla 6.6.

Tabla 6.6: Concentraciones empleadas en las soluciones de Ca^{2+} variable

	$[Ca]_{tot}$ (mM)	$[EGTA]_{tot}$ (mM)	$[F8]_{tot}$ (nM)
1	9.27	9.66	676
2	9.37	9.66	676
3	9.42	9.66	676
4	9.47	9.66	676
5	9.52	9.66	676
6	9.57	9.66	676
7	9.61	9.66	676
8	9.66	9.66	676

Previamente a estudiar los resultados de las mediciones de FCS en solución para un rango de concentraciones de Ca^{2+}, se estudió el comportamiento esperado de los coeficientes de difusión efectivos en un sistema formado por las concentraciones

de la Tabla 6.6 y los parámetros de la Tabla 6.1. También se analizó el comportamiento de los coeficientes efectivos en un sistema formado por Fluo8 y Ca^{2+} (sin EGTA), o EGTA y Ca^{2+}(sin Fluo8) con las concentraciones de la Tabla 6.6 y los parámetros de la Tabla (6.1). En las Figs. 6.9 (a) y (b) se observa que las concentraciones más bajas de Ca^{2+} ($[Ca]_{tot}$ <9.4 mM) y para las más altas ($[Ca]_{tot}$ >9.8 mM), los coeficientes de difusión efectivos son similares a los libres. Además, D_{ef1} = D_{ef1}^{CaE} para todo el rango de concentraciones de Ca^{2+} analizado. Mientras que para $[Ca]_{tot}$ >9.6 mM, $D_{ef3} = D_{ef2}^{CaE}$. En la Fig.6.10, se grafica el comportamiento de los ν efectivos para el rango de concentraciones de Ca^{2+}estudiado.

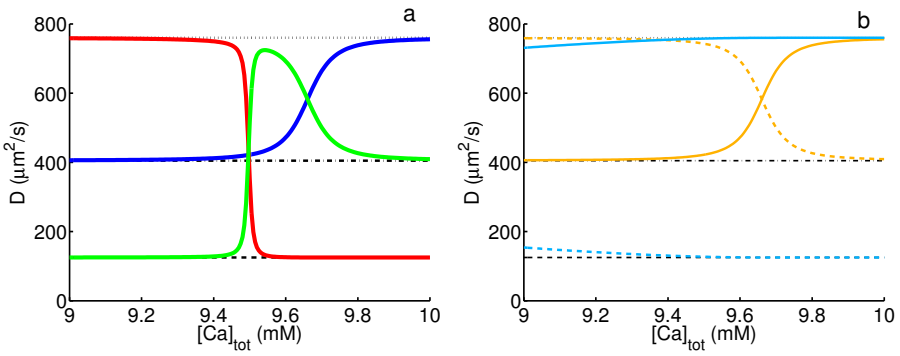

FIGURA 6.9
Coeficientes de difusión efectivos teóricos para soluciones de Fluo8, EGTA y Ca^{2+}. (a) Sistema con las concentraciones de la Tabla 6.6, D_{ef1}: línea azul, D_{ef2}: línea roja, D_{ef3}: línea verde; (b) Sistema formado por Ca^{2+} y EGTA o Ca^{2+} y Fluo8, según las concentraciones de la Tabla 6.6, D_{ef1}^{CaE} línea sólida naranja, D_{ef2}^{CaE} línea a rayas naranja, D_{ef1}^{CaF} línea sólida celeste, D_{ef2}^{CaF} línea a rayas celeste. En ambos gráficos se dibujan en líneas negras los coeficientes de difusión libres del Ca^{2+}(línea de puntos), EGTA (línea de puntos y rayas) y Fluo8 (línea a rayas).

6.2.1.1. Resultados

En este ensayo, el mejor ajuste que describe las ACFs obtenidas es el de dos componentes, con una de ellas puramente difusiva y una multiplicada por el factor exponencial (ajuste II, Ec.(B.2)). El ajuste permite determinar entonces, dos coeficientes de difusión para cada concentración de Ca^{2+} estudiada, D_1 y D_2 y un ν. Los coeficientes de difusión estimados de los experimentos en solución se presentan en la Fig. 6.11. Aquí se observa cómo, para distintas concentraciones de

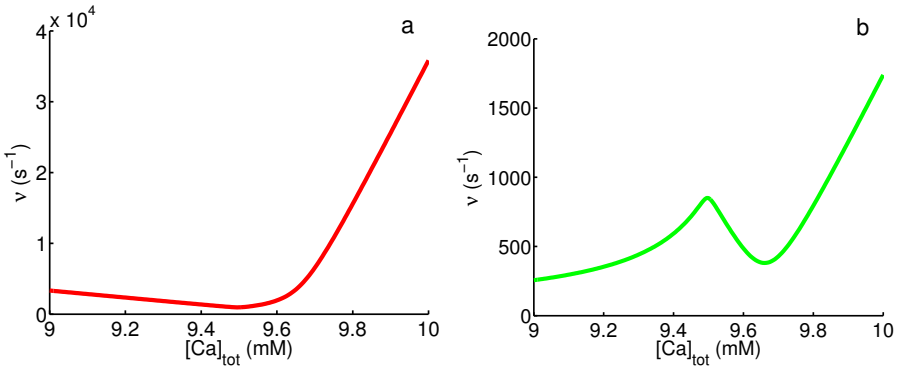

FIGURA 6.10
Valores teóricos esperados para los ν efectivos -(a) ν_{ef2}, (b) ν_{ef3}- de un sistema con las concentraciones de la Tabla 6.6.

Ca^{2+}, el ajuste es capaz de determinar distintos coeficientes efectivos. Para $[Ca]_{tot}$ <9.45 mM, D_1 se comporta como el coeficiente de difusión libre del *dye*, que para estas concentraciones de Ca^{2+} es indistinguible de D_{ef3}, mientras que para concentraciones superiores de Ca^{2+}, su valor medio se asemeja a D_{ef1}. Sin embargo, al analizar los ajustes individuales para las soluciones 5 y 6 (el segundo y tercer punto cuando $[Ca]_{tot}$ >9.45 mM, es decir, los correspondientes a $[Ca]_{tot} = 9.52$ y 9.57 mM) vemos que los valores extremos de las estimaciones de D_1 son similares a los coeficientes de difusión libres esperados para el Ca^{2+} y el *dye*, mientras que en algunos casos D_1 converge al coeficiente de difusión libre del indicador, pero con un peso, G_1, despreciable. D_2 es similar a D_{ef2} cuando la concentración total de Ca^{2+} es inferior a 9.45 mM, en cambio cuando el Ca^{2+} total se encuentra por arriba de este valor, es parecido a D_{ef3}. En cuanto a ν, salvo tres soluciones que ajustaron con valores muy altos de este parámetro, correspondiente a las soluciones 4, 7 y 8 de la Tabla 6.6, los valores estimados son más cercanos a ν_{ef3}, pese a ser levemente inferiores, Fig. 6.12.

6.2.2. FCS en Ovocitos con Fluo8 y Ca^{2+}exógeno

Las células fueron microinyectadas con una solución de NP-EGTA unido a Ca^{2+} y Fluo8. La idea original era liberar el Ca^{2+} enjaulado durante el registro de FCS. Mediciones previas realizadas con adquisición de tipo *linescan* habían dado

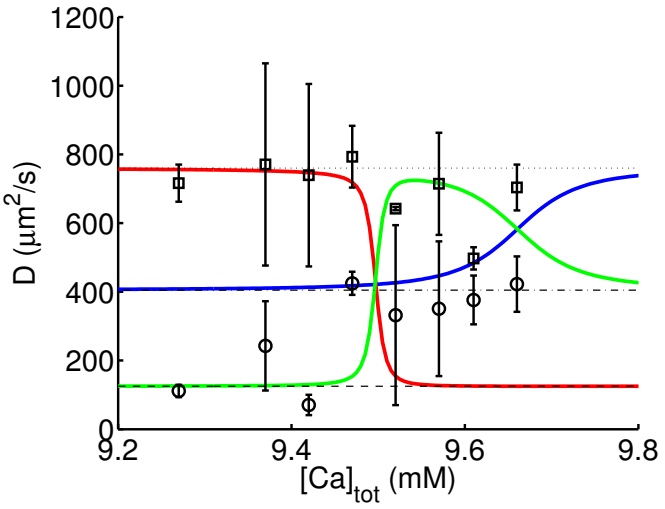

FIGURA 6.11

Coeficientes de difusión efectivos obtenidos del ajuste de las ACFs experimentales en solución de $[F8]_{tot} = 676\ nM$, $[EGTA]_{tot}$= 9.66 mM y un rango de concentraciones de Ca^{2+} total entre 9.27 y 9.66 mM, ver Tabla 6.6. Los datos experimentales se presentan con símbolos (D_2, cuadrado y, D_1, círculo) y barra de error; en líneas sólidas y de color se presentan los valores teóricos para los tres coeficientes de difusión efectivos, D_{ef1}: línea azul, D_{ef2}: línea roja, D_{ef3}: línea verde; en líneas negras los coeficientes de difusión libres del Ca^{2+}(línea de puntos), EGTA (línea de puntos y rayas) y Fluo8 (línea a rayas).

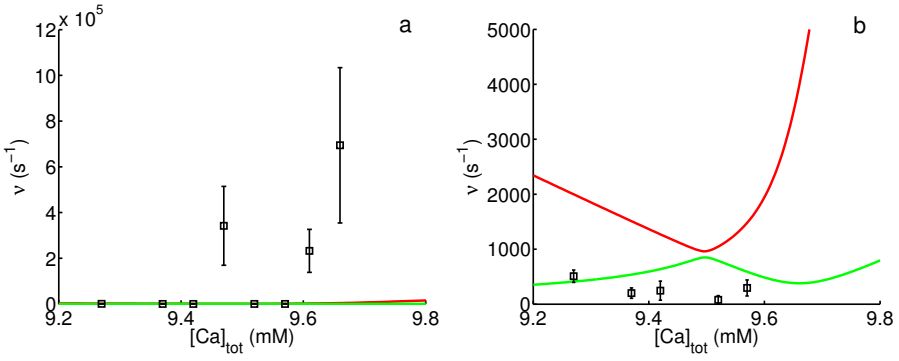

FIGURA 6.12

Estimación de ν a partir del ajuste de las ACFs de un sistema con las concentraciones de la Tabla 6.6. (a) Valores experimentales representados con un símbolo cuadrado y con su barra de error, en línea sólida roja ν_{ef2} teórico, y en línea sólida verde ν_{ef3} teórico. (b) Igual a (a), con un rango menor en el eje y.

indicios de que era posible llegar a un equilibrio entre la liberación de Ca^{2+} por luz UV y la remoción celular del Ca^{2+} en exceso si se hacía una estimulación continua con luz UV (datos no mostrados). Sin embargo al hacer mediciones con

la modalidad de adquisición por punto, necesaria para los registros de FCS, se vio que la estimulación continua con luz UV sumado al láser de excitación, producía una disminución en la intensidad de fluorescencia detectada, posiblemente por *photobleaching* del indicador de Ca^{2+}. No obstante, se vio que aun sin ser sometidas a luz UV, las células inyectadas con Ca^{2+} enjaulado tenían mayor intensidad de fluorescencia, como se explicará más adelante, y esto está relacionado con un mayor nivel de Ca^{2+} basal.

Se realizaron mediciones de FCS en ovocitos inyectados con 1 mM de Fluo8 y dos concentraciones distintas de Ca^{2+}agregado (5 y 50 mM). Dado que en este ensayo se decidió trabajar con ovocitos tratados con una mayor concentración de Fluo8 respecto a las mediciones realizadas en condiciones basales, también se realizaron mediciones de FCS en ovocitos inyectados con Fluo8 a 100 μM y la concentración más baja de Ca^{2+}, a fin de descartar que los efectos observados sobre los coeficientes de difusión estuvieran de algún modo relacionados con la mayor concentración de indicador. Ver Tabla 6.7.

Tabla 6.7: Concentraciones de las soluciones microinyectadas en ovocitos para aumentar la concentración de Ca^{2+}.

Condición	$[CaCl_2]_{mix}$ (mM)	$[NP-EGTA]_{mix}$ (mM)	$[F8]_{mix}$ (μM)
A	5	9	100
B	5	9	1000
C	50	9	1000

Se calcularon las ACFs y se realizaron tres tipos de ajustes: por dos componentes puramente difusivas (ajuste I, Ec.(B.1)), por dos componentes con una difusiva y una multiplicada por el término exponencial (ajuste II, Ec.(B.2)), y por tres componentes, con una difusiva y dos multiplicadas por el término exponencial (ajuste IV, Ec.(B.4)). A continuación se presentan los resultados obtenidos con ajuste IV.

6.2.2.1. Resultados

Condición A

Las mediciones de FCS, realizadas sobre ovocitos inyectados con una solución de 100 μM de Fluo8 y 5 mM de $CaCl_2$ en 9 mM de NP-EGTA, tienen una fluorescencia media $\langle F \rangle$= 1382 ua (unidades arbitrarias). El ajuste de las ACFs calculadas sobre estas mediciones permiten estimar tres coeficientes de difusión. D_1= (77 ± 9) $\mu m^2/s$, D_2= (292 ± 21) $\mu m^2/s$, D_3= (495 ± 20) $\mu m^2/s$. Calculando la concentración de indicador total a partir del peso asociado a la primer componente, G_1, según la Ec. (2.6) se obtiene $[F]_{tot}$ = (6372 ± 1463) nM. Fig. 6.13.

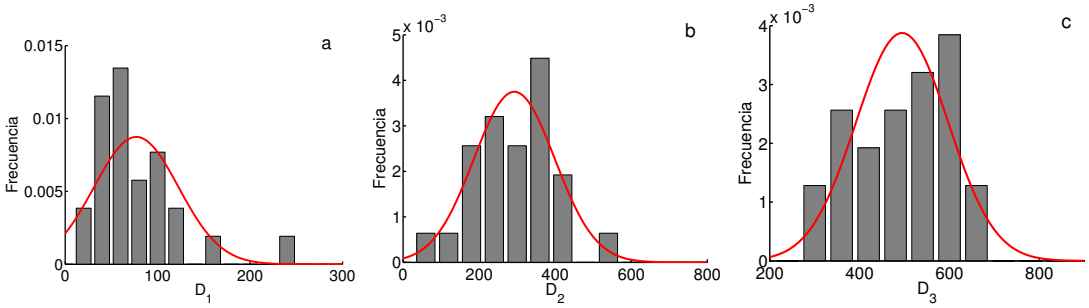

FIGURA 6.13
Distribución de frecuencias de los coeficientes de difusión estimados del ajuste de las ACFs obtenidas de mediciones de FCS en ovocitos de Condición A (inyectados con solución de Fluo8 a 100 μM, y $CaCl_2$ a 5 mM en 9 mM de NP-EGTA). La línea roja representa el ajuste por una distribución gaussiana. (a) D_1, (b) D_2, (c) D_3.

Condición B

Las mediciones de FCS realizadas sobre ovocitos inyectados con una solución de 1 mM de Fluo8 y 5 mM de $CaCl_2$ en 9 mM de NP-EGTA tienen una fluorescencia media $\langle F \rangle$= 2884 ua. Del ajuste de estas las mediciones se desprenden tres coeficientes de difusión: D_1= (48 ± 8) $\mu m^2/s$, D_2= (275 ± 25) $\mu m^2/s$, D_3= (471 ± 24) $\mu m^2/s$. Calculando la concentración de indicador total a partir del peso asociado a la primer componente, G_1, según la Ec.(2.6) se obtiene $[F]_{tot}$ = (16.56 ± 2.59) μM. Fig. 6.14.

Condición C

Las mediciones de FCS realizadas sobre ovocitos inyectados con una solución de 1 mM de Fluo8 y 50 mM de $CaCl_2$ en 9 mM de NP-EGTA tienen una fluorescencia

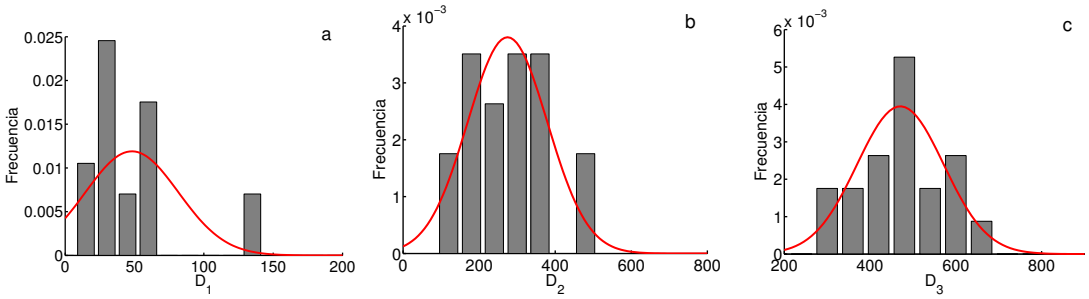

FIGURA 6.14
Distribución de frecuencias de los coeficientes de difusión estimados del ajuste de las ACFs obtenidas de mediciones de FCS en ovocitos de Condición B (inyectados con solución de Fluo8 a 1000 μM, y $CaCl_2$ a 5 mM en 9 mM de NP-EGTA). La línea roja representa el ajuste por una distribución gaussiana. (a) D_1, (b) D_2, (c) D_3.

media $\langle F \rangle$= 7661 ua. La primer componente del ajuste tiene una distribución bimodal, según el criterio de diferencia de Akaike. La media de cada componente de la distribución es de D_{1_1}= 18 $\mu m^2/s$ y D_{1_2}= 56 $\mu m^2/s$. Entonces, se puede intentar separar los datos según D_1 sea mayor o menor a 37 $\mu m^2/s$. Procediendo de esta manera se obtiene D_{1_a}= (17 ± 2) $\mu m^2/s$ y D_{1_b}= (62 ± 9) $\mu m^2/s$. Calculando la concentración de indicador total a partir del peso asociado a la primer componente con D_1 mayor a 37 $\mu m^2/s$ (D_{1_b}), según la Ec. (2.6) se obtiene $[F]_{tot}$ = (38.19 ± 13.93) μM. D_2 muestra una distribución unimodal, con valor medio D_2= (264 ± 27) $\mu m^2/s$. La última componente del modelo ajusta con un coeficiente de difusión, D_3, cuya distribución de frecuencias muestra un comportamiento bimodal, con valores medios D_{3_1}= 354 $\mu m^2/s$ y D_{3_2}= 614 $\mu m^2/s$. Sin embargo dado que en ciertas ocasiones el criterio de diferencia de Akaike da negativo para este parámetro es posible que la bimodalidad reportada previamente sea producto de un falso positivo. Ajustando por una única binomial, el valor medio es de D_3= (461 ± 30) $\mu m^2/s$. Fig. 6.15.

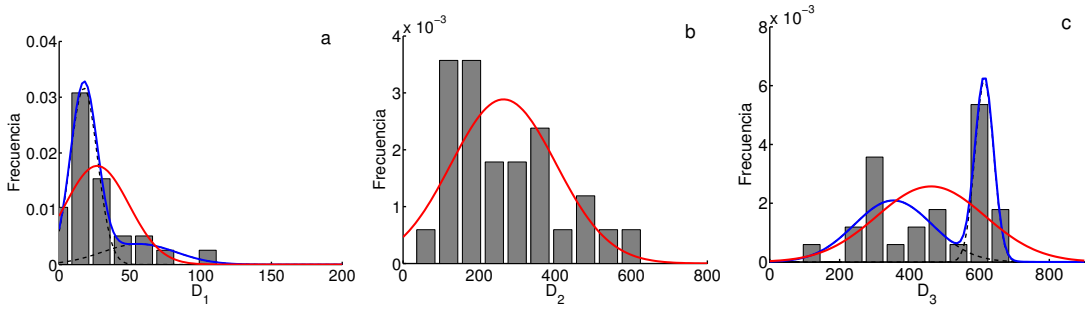

FIGURA 6.15
Distribución de frecuencias de los coeficientes de difusión estimados del ajuste de las ACFs obtenidas de mediciones de FCS en ovocitos de Condición C (inyectados con solución de Fluo8 a 1 mM, y $CaCl_2$ a 50 mM en 9 mM de NP-EGTA). La línea roja representa el ajuste por una distribución gaussiana. El gráfico de distribución de frecuencias de los coeficientes que dieron una distribución bimodal tienen también la curva del ajuste bimodal representado con un línea azul, donde cada una de las gaussianas que dan la curva azul se representa con una línea a rayas negras. (a) D_1, (b) D_2, (c) D_3.

TABLA 6.8: Coeficientes de difusión estimados de los ajustes de las ACFs obtenidas en mediciones de FCS en el citosol de ovocitos de *X. laevis* tratados con Fluo8 y $CaCl_2$.

Condición	D_1		D_2	D_3	
	D_{1_1} Media (%)	D_{1_2} Media (%)	Media (%)	D_{3_1} Media (%)	D_{3_2} Media (%)
A	77(100)	—	292(100)	495(100)	—
B	48(100)	—	275(100)	471(100)	—
C	18(76)	56(24)	264(100)	354(59)	614(41)

6.3. Conclusiones

En este Capítulo intentamos modificar las condiciones basales referidas a la concentración de los *buffers* de Ca^{2+} presentes en el citosol de ovocitos de *X. laevis* mediante la inyección de EGTA en las células, por un lado. Y por otro, se aumentó la concentración de Ca^{2+} mediante la microinyección de una solución de Ca^{2+} y NP-EGTA. El objetivo de estas mediciones fue encontrar una dependencia entre los coeficientes de difusión estimados a partir de los ajustes de las ACFs y

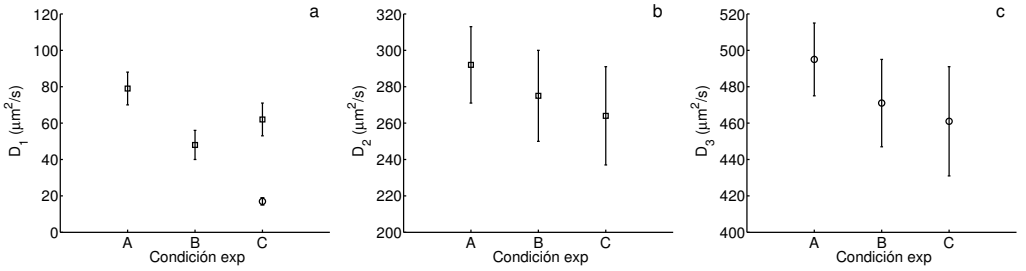

FIGURA 6.16
Comparación de los coeficientes de difusión obtenidos de las ACFs calculadas a partir de mediciones de FCS en ovocitos inyectados con Ca^{2+}, en distintas condiciones (A, B y C, Tabla 6.7).

la concentración de *EGTA* o de Ca^{2+}. En ambos casos, en primer lugar intentamos imitar en solución situaciones similares a las que esperábamos provocar en las células. Para esto realizamos mediciones de FCS en solución acuosa de Fluo8, Ca^{2+} y EGTA, variando la concentración de Ca^{2+} y EGTA (de modo de mantener la concentración de Ca^{2+} libre constante) en un caso, y sólo la de Ca^{2+} en otro. Mediante el ajuste de las ACFs obtenidas en estas mediciones estudiamos que parámetros, en principio, sería posible estimar. En particular notamos que los coeficientes de difusión se comportan según lo esperado, y que, en especial en la mediciones con Ca^{2+} total variable que fueron en las que esperábamos mayor variación de los coeficientes efectivos, distintas condiciones permitían estimar distintos coeficientes de difusión, pese a que para ajustar las ACFs usamos un modelo de sólo dos componentes. Por otro lado, encontramos que, al menos en nuestro *set-up* experimental la determinación de los parámetros relacionados con las reacciones, ν_{efi} no resulta sencilla. De las mediciones en solución sólo pudo determinarse uno de los ν efectivos y con ciertas diferencias respecto de lo esperado.

Aumento de la concentración de buffer

El aumento en la concentración de *buffer* se estudió mediante la microinyección de los ovocitos con distintas concentraciones de EGTA, y dos concentraciones de *dye* (100 μM y 1 mM), condiciones que llamamos de *Bajo* y *Alto Fluo8*, respectivamente. Ajustando las ACFS obtenidas de las mediciones realizadas con *Bajo Fluo8* con la Ec. (B.4) pudimos derivar cinco coeficientes de difusión, D_{1_1}, D_{1_2},

D_{2_1}, D_{2_2}, D_3. D_{1_1} y D_{1_2} no mostraron dependencia con la concentración de EGTA, y su valor promedio es de $\bar{D_{1_1}}$= (19 ± 3) $\mu m^2/s$, que asociamos al *buffer* endógeno, y $\bar{D_{1_2}}$= (59 ± 6) $\mu m^2/s$ que asociamos al *dye*. Aplicando la Ec. (2.6) al peso de las componentes que dan el coeficiente de difusión que asociamos al *dye* obtenemos una concentración de Fluo8 en el ovocito, que si bien difiere en las distintas mediciones, en promedio da un valor de $[Fluo8]_t$= (3.65 ± 1.15) μM, que es consistente con lo esperado si se considera una distribución homogénea de los compuestos inyectados y que el ovocito tiene un volumen de 1 mm^3 (Ver Apéndice B, para una discusión más detallada acerca de la dilución esperada en el ovocito). Sin embargo, el análisis de esta serie de mediciones recae básicamente en los parámetros estimados de los ajustes de las ACFs y su dependencia con la concentración de EGTA. Por lo tanto, si la discrepancia entre la concentración esperada de Fluo8 en el ovocito y la encontrada, obtenida mediante la Ec. (2.6), se traslada a la concentración de EGTA, analizar la dependencia de los parámetros con la concentración de EGTA calculada como la del mix de inyección dividida por un mismo factor de dilución no es correcto. Por lo tanto, estimamos la concentración de EGTA en el ovocito, $[EGTA]_t$, a partir de la dilución observada para el Fluo8 (que calculamos aplicando la Ec. (2.6) al peso de la componente que da el coeficiente de difusión que asociamos al *dye*). Reordenando los datos según $[EGTA]_t$ vemos que D_{2_2} y D_3 decaen conforme aumenta la concentración de EGTA, por lo tanto serían coeficientes efectivos. Si bien, no siguen el comportamiento de los coeficientes efectivos esperados según el análisis teórico presentado en la Fig. 6.7(a). Sin embargo, en el ovocito, además del *buffer* agregado, EGTA, también se encuentran *buffers* endógenos en distintas concentraciones que no fueron tenidos en cuenta en el análisis teórico y no sabemos cómo podrían modificar el comportamiento de los coeficientes efectivos.A su vez, este resultado es consistente con lo observado en la evocación de señales por liberación de IP_3, donde se observa que mayores concentraciones de EGTA reducen el rango de propagación de la señal. Por último, D_{2_1} toma valores similares a los esperados para D_{ef1} del sistema con Ca^{2+}, EGTA y Fluo8, Figs. 6.6 y 6.7(a), en la región donde $D_{ef1} \sim D_E$. Una opción es ajustar D_{2_1} por la expresión de D_{ef1}, Ec. (2.16), y la otra es promediar los datos, ya que en esa

región D_{ef1} permanece constante. Ajustando los datos con la expresión de D_{ef1}, Ec. (2.16), considerando K_{dF}= 600 nM, K_{dE}= 150 nM, con D_{Ca}= 330 $\mu m^2/s$, D_F= 50 $\mu m^2/s$, que son aproximadamente los valores determinados en el Capítulo anterior y con $[Fluo8]_t$ y $[EGTA]_t$ según corresponda, derivamos el coeficiente de difusión libre del EGTA en ovocitos, D_E= (152 ± 21) $\mu m^2/s$. Promediando sobre los valores medios de D_{2_1} obtenemos $\bar{D_{2_1}}$ = (149 ± 15) $\mu m^2/s$, que es indistinto del valor de D_E obtenido del ajuste de los datos de D_{2_1} por la Ec. (2.16).

La situación de las mediciones con Alto Fluo8 correspondería con uno de los casos límites en que los coeficientes de difusión efectivos tienden a los coeficientes de difusión libres de las moléculas que forman el sistema, ya que no muestran dependencia con la concentración de EGTA. Entonces, teniendo en cuenta los coeficientes libres en solución acuosa y el factor por el que se espera que se modifiquen estos parámetros en el citosol [38], y la relación de masas entre las especies del sistema, es posible identificar los coeficientes derivados de los ajustes. Así, es posible asociar a D_1 de Alto Fluo8 con el coeficiente de difusión de un *buffer* endógeno, B. Si se promedian los valores medios encontrados en cada situación se obtiene $D_B \sim$ 14 $\mu m^2/s$. Este valor es consistente con lo reportado por [29], donde estudiando la difusión del Ca^{2+} en homogenato de citosol de ovocitos de *X. laevis* con Ca^{2+} radioactivo, encuentran que el menor coeficiente de difusión es de 13 $\mu m^2/s$. Esto ocurre para una condición de baja concentración de Ca^{2+} donde mayormente se encuentra unido a los *buffers* endógenos, por lo tanto el valor detectado por los investigadores se correspondería con el de los *buffers* endógenos. El segundo coeficiente de difusión de menor valor hallado en nuestras mediciones es el de D_{2_1} que asociamos al coeficiente de difusión del *dye*, Fluo8. El promedio arroja un valor de D_F = (44 ± 4) $\mu m^2/s$. Por un lado el valor encontrado es consistente con el coeficiente de este *dye* en solución, donde, como se menciona en el Cap. 4, se encontró un $D_F \sim$ 125 $\mu m^2/s$, con el valor estimado en ovocitos en condiciones basales del Cap. 5 ($D_F \sim$ 48 $\mu m^2/s$), y con el estimado para mediciones con Bajo Fluo8, (D_F= (59 ± 6) $\mu m^2/s$). Por otro lado el peso de las componentes con valores que se corresponderían al coeficiente de difusión del *dye* en solución, permite obtener, mediante la Ec.(2.6) una concentración de Fluo8 total muy cercana al valor

esperado por construcción de las soluciones y asumiendo que el ovocito tiene un volumen de 1 mm^3. De esta manera se espera que los ovocitos inyectados con 37 nl de Fluo8 a 1 mM deberían tener $[F8]_{tot} = 37\ \mu M$. En promedio los valores obtenidos son de $[Fluo8]_t$= (25.68 ± 2.91) μM, que si bien se encuentra por debajo del esperado, es del mismo orden. A continuación se identifica a D_{2_2} con el coeficiente de difusión en citosol del EGTA, quedando D_E =(142 ± 9) $\mu m^2/2$. Este valor es consistente con lo esperado, ya que en solución se determinó que la difusión del EGTA en solución está regida por un coeficiente de 400 $\mu m^2/s$ [59], y con lo obtenido en las mediciones con Bajo Fluo8 en este mismo Capítulo ($D_E \sim 150$ $\mu m^2/s$). Por último, el mayor coeficiente de difusión encontrado se asocia al Ca^{2+}, que es la especie de menor tamaño en el sistema estudiado. De esta manera D_{Ca} = $\bar{D}_3$ = (367 ± 34) $\mu m^2/2$. Pese a que estas mediciones se hicieron con la misma concentración de Fluo8 que la utilizada en la generación de señales evocadas por liberación de IP_3 enjaulado, no encontramos una dependencia de los coeficientes de difusión con la concentración de EGTA. Sin embargo, la concentración de Ca^{2+} libre en las mediciones de FCS en ovocitos es mucho menor que durante una señal de Ca^{2+}, por lo tanto es posible que esto influya sobre los resultados obtenidos. Por otro lado, considerando que la concentración libre de Ca^{2+} en el ovocito se mantiene alrededor de 100 nM, la concentración de Ca^{2+} ligado a *dye* se ubica alrededor de 5 μM, con un volumen de detección de V_{ef}= 0.59 μm^3 dicha concentración corresponde a $\sim$ 1800 partículas fluorescentes en el volumen de detección, casi el doble del valor máximo recomendado para mediciones de FCS [76]. Esto puede provocar que la técnica sea menos sensible debido a una disminución en las fluctuaciones.

Aumento de la concentración de Ca^{2+}

La inyección de $CaCl_2$-NP-EGTA en ovocitos produce un aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+}. Esto se ve reflejado en un aumento en la fluorescencia media, $\langle F \rangle$, de las células tratadas con igual concentración de Fluo8 y distintas concentraciones de $CaCl_2$-NP-EGTA. En ovocitos inyectados con 100 μM de Fluo8 y en condiciones normales de Ca^{2+} la fluorescencia media es $\langle F \rangle = 597\ ua$. Mientras que en las células inyectadas con igual concentración de Fluo8 y 5 mM

de $CaCl_2$, es decir la condición A, $\langle F \rangle_A = 1382$ ua. Por otro lado las células inyectadas con Fluo8 a 1 mM y 5 mM de $CaCl_2$, condición B, tienen $\langle F \rangle_B = 2884$ ua y las células con igual concentración de Fluo8 y 50 mM de $CaCl_2$, condición C, $\langle F \rangle_C = 7661$ ua. Por último, la diferencia en la $\langle F \rangle$ entre las condiciones A y B estarían asociadas a un aumento en la concentración del *dye*.

Ajustando las ACFS obtenidas de mediciones de FCS en ovocitos con Ca^{2+} agregado, por la expresión de la Ec. (B.4) (ajuste IV), se derivan tres coeficientes de difusión, excepto para la condición C, donde al menos uno de ellos tiene una distribución bimodal. Comparando los coeficientes de difusión estimados se observa que no hay diferencias significativas en D_2 y en D_3 al aumentar la concentración de Ca^{2+} o *dye* inyectado, Figs. 6.16 (b) y (c). El D_1 derivado de los ajustes de las ACFs obtenidas a partir de mediciones en ovocitos microinyectados con una solución con $[F8]_{tot} = 100$ μM y $[CaCl_2] = 5$ mM, condición B, es levemente inferior al de las mediciones en ovocitos inyectados con igual concentración de $CaCl_2$ y $[F8]_{tot} = 1$ mM, condición A (Fig. 6.16 (a)). Sin embargo, los valores medios son similares y consistentes con lo esperado para el coeficiente de difusión del Fluo8 en el citosol. Además en ambos casos, la concentración de Fluo8 total que sale de aplicar la Ec. (2.6) al peso de estas componentes es compatible con la concentración de *dye* esperada según su concentración en el *mix* de microinyección ($[Fluo8]_t$= (6.5 ± 1.5) μM vs. $[F8]_{tot} = 3.7$ μM para la condición A y $[Fluo8]_t$= (16.56± 2.59) μM vs. $[F8]_{tot}$= 37 μM para la condición B). Mientras que en los ajustes de las mediciones realizadas en ovocitos inyectados con mayor concentración de Ca^{2+} (condición C, $[CaCl_2] = 50$ mM en la solución de inyección), los valores estimados de D_1 presentan una distribución bimodal, lo que permite obtener dos coeficientes de difusión de la primer componente del modelo. Uno de ellos, D_{1_b}= (62 ± 9) $\mu m^2/s$, no presenta diferencias estadísticamente significativas respecto al D_1 obtenido en mediciones realizadas en células con menor concentración de Ca^{2+}(condición A y B), Fig. 6.16 (a). A su vez, la concentración de Fluo8 total derivada del peso de asociado a D_{1_b}, calculado mediante la Ec. (2.6), es $[Fluo8]_t$= (38.19 ± 13.93) μM y coincide con lo esperado ($[F8]_{tot}$= 37 μM). El otro coeficiente, (D_{1_a}= (17 ± 2) $\mu m^2/s$), es significativamente menor al D_1 encontrado en

las mediciones realizadas en condiciones A y B, Fig. 6.16 (a) y es similar al valor que en mediciones anteriores (en condiciones basales, Cap. 5, y con distintas concentraciones de EGTA, primer sección del presente Capítulo) asociamos al *buffer* endógeno. Si, como antes, consideramos la relación de los tamaños de los compuestos presentes en el sistema para asociar los coeficientes de difusión derivados, tenemos que el de valor más alto, el correspondiente a D_3, debería ser el del Ca^{2+}. En promedio da un valor de $\bar{D}_3 = (476 \pm 10)\ \mu m^2/s$. Promediando los valores que asociamos al *dye* (D_1 para las condiciones A y B, y D_{1_2} para la condición C), queda D_F= $(60 \pm 9)\ \mu m^2/s$. Mientras que D_2 sería un coeficiente efectivo.

Capítulo 7

Conclusiones

Este trabajo de Tesis se centró principalmente en intentar determinar el coeficiente de difusión intracelular del ión calcio en células intactas utilizando como sistema modelo ovocitos de *X. laevis*, mediante la técnica de FCS.

En primer lugar realizamos un estudio teórico para determinar cómo interpretar los resultados y qué parámetros es posible determinar al aplicar la aproximación por reacciones rápidas en un sistema de reacción-difusión donde la especie de interés, el Ca^{2+}, es la menos masiva y se observa de manera indirecta mediante el pegado a un indicador fluorescente de tipo SW que modifica su intensidad de emisión al estar ligado a Ca^{2+}, en particular consideramos que el *dye* sólo fluoresce si está ligado a Ca^{2+}. Concluimos que los tiempos característicos que pueden derivarse de experimentos de FCS con Ca^{2+} y el indicador SW Fluo4 dextrano pueden ser interpretados usando la teoría en la aproximación de reacciones rápidas para un gran rango de concentraciones de indicador, y que a lo sumo pueden diferir en un factor $\sim$ 2,4 para los valores de concentración para los que la aproximación de reacciones rápidas funciona peor. Sin embargo, la determinación de los pesos correspondientes de cada componente no correspondía con lo predicho por la aproximación por reacciones rápidas. Más aún, el peso total de la ACF tampoco resultó el esperado según la aproximación. A fin de imitar la situación en la célula, donde el Ca^{2+} interactúa con *buffers* endógenos, también estudiamos un sistema en el que además de *dye* y Ca^{2+}, se encuentra presente el *buffer* de Ca^{2+}, EGTA. En

este sistema formado por Ca^{2+}, *dye* y *buffer* también estudiamos si los coeficientes efectivos pueden ser aproximados por las expresiones más sencillas de aquellos correspondientes a un sistema compuesto por Ca^{2+} y *dye*, o Ca^{2+} y *buffer*. Para este análisis revisamos los resultados obtenidos en mediciones de FCS realizadas en solución acuosa de Ca^{2+}, *dye* y EGTA. Salvo para ciertas concentraciones de Ca^{2+} total, los coeficientes efectivos del problema son bien aproximados por las expresiones más sencillas correspondientes a modelos con Ca^{2+} y *dye*, o Ca^{2+} y *buffer*. Sin embargo, nuevamente, los pesos derivados de las ACFs experimentales no son los esperados por la aproximación por reacciones rápidas.

En un primer momento intentamos relacionar las discrepancias entre los pesos con algún artefacto experimental. Lo hicimos, en particular, para el caso de los experimentos en solución con Ca^{2+} y *dye* [38] y concluimos que, de existir, dicho artefacto no debería afectar los experimentos en células intactas. Teniendo en cuenta que los pesos de cada componente individual no habían sido analizados para los experimentos en solución con Ca^{2+}, *dye* y EGTA [59] decidimos estudiar este problema fuera de la aproximación de reacciones rápidas. En [59] la ACF derivada a partir de una serie de experimentos de este tipo, realizados para distintas concentraciones de Ca^{2+} total, había sido ajustada por una expresión con dos componentes puramente difusivas, una de las cuales siempre correspondía al coeficiente de difusión libre del *dye*. El análisis teórico fuera de la aproximación de reacciones rápidas presentado en esta Tesis mostró que dos de las cuatro componentes de la ACF sin aproximar (una de las cuales correspondía a la difusión libre del *dye*) tenían pesos mucho menores que los de las otras dos. Esto permitía, en principio, validar los ajustes experimentales de [59]. Sin embargo, de acuerdo al análisis, la componente de mayor peso debía ser la de la difusión libre del *dye*, situación que sólo se encontró en los experimentos con mayor concentración de Ca^{2+}. Por otro lado, la suma de las otras componentes debía corresponder a un término caracterizado también por el coeficiente de difusión libre del *dye* pero con un factor que caía exponencialmente en el tiempo. Nos preguntamos entonces cómo explicar que los experimentos de [59] permitieran inferir tiempos difusivos

distintos de los de la difusión libre del *dye*. Fue así que exploramos una posibilidad que permitió explicar también la discrepancia entre el peso total obtenido en los experimentos y el esperado teóricamente. Esta nueva explicación se basa en tener en cuenta que el número de moléculas fluorescentes en el volumen de observación depende de dos variables aleatorias: por un lado, del número total de moléculas de *dye* y, por el otro, del número de iones Ca^{2+} libres en el volumen ya que este último determina la probabilidad de que las moléculas de *dye* liguen Ca^{2+}. Debido a esta no linealidad consideramos que la distribución del número de moléculas fluorescentes en el volumen no era Poissoniana y que sus fluctuaciones iniciales dependían de las fluctuaciones en el número de moléculas de *dye* y en el de iones Ca^{2+}. De este modo consideramos una ACF que era suma de dos, una similar a la considerada habitualmente donde la probabilidad de pegar Ca^{2+} está determinada por el número medio de iones en el volumen y otra que tenía en cuenta las fluctuaciones en el número de iones Ca^{2+}. Si bien este término adicional no agrega tiempos característicos, sí modifica los pesos de las componentes individuales y el peso total. Este recálculo de los pesos permitió explicar los resultados de los ajustes de [59]. Este abordaje que es similar al presentado para explicar la reducción en las fluctuaciones observadas entre la transcripción instantánea y el mRNA acumulado resultante de dicha transcripción [60], nos lleva a concluir que los experimentos de FCS que se realizan con un *dye* de Ca^{2+} tipo SW permiten determinar otras escalas temporales además de las asociadas al *dye*, como lo son los coeficientes de difusión de las otras especies involucradas en el sistema, incluso el de los *buffers* no fluorescentes. El análisis fuera de la aproximación de reacciones rápidas muestra, por otro lado, que cada componente de la ACF puede estar caracterizada por un coeficiente de difusión diferente dependiendo de la longitud de onda. Por lo tanto es de esperar que dependiendo de qué parte de la ACF tenga mayor peso en el ajuste se pueda obtener información sobre distintos coeficientes de difusión del problema.

Luego de mostrar los resultados del análisis teórico pasamos a los primeros pasos dados hacia los experimentos en células intactas. En tal sentido, en primer lugar, determinamos las condiciones experimentales óptimas para aplicar la técnica

de FCS en el estudio de la difusión del Ca^{2+} en ovocitos de *X. laevis*. Para ello, analizamos la dependencia entre la calidad de la ACF y la potencia del láser de excitación del fluoróforo de manera de determinar la potencia mínima necesaria para obtener una ACF "limpia". A continuación, dado que en la región donde se suelen hacer las mediciones relacionadas con el estudio de las señales de Ca^{2+} no pueden realizarse mediciones con las potencias determinadas en el punto, anterior ya que provocan picos de intensidad de fluorescencia posiblemente relacionados con liberaciones del RE debido a la ruptura de sus membranas, fue necesario explorar un cambio en la región de medición. Encontramos que corriendo el plano focal entre 1 y 3 μm hacia la superficie de la célula era posible aumentar la potencia del láser sin dañar la célula, al menos las estructuras relacionadas de manera directa con la concentración de Ca^{2+} citosólico. A su vez, la estimación del coeficiente de difusión de fluoresceína en ovocitos permitió establecer una distancia máxima hasta la que era razonable alejarse sin correr riesgo de estar por fuera de la célula o en una región de condiciones diferentes a la de donde se encuentra el RE. Esto fue fundamental para poder obtener ACFs que permitan determinar parámetros confiables relacionados con las tasas de difusión y reacción de las especies involucradas. Por último, determinamos el coeficiente de difusión en solución acuosa del indicador de Ca^{2+} Fluo8 y su tasa de disociación, parámetros desconocidos al menos hasta el momento en que se realizaron los experimentos de esta Tesis. (D_{F8} = (125 ± 17) $\mu m^2/s$ y $koff$ = (55 ± 14) s^{-1}).

Teniendo en cuenta las consideraciones acerca de las condiciones experimentales realizamos luego mediciones de FCS para estudiar el coeficiente de difusión de Ca^{2+} y de los *buffers* endógenos en ovocitos de *X. laevis*. En primer lugar realizamos mediciones de FCS en el citosol y en el lumen del RE de ovocitos de *X. laevis* en condiciones basales. Por último intentamos disrumpir las condiciones basales en el citosol aumentando por un lado la concentración de *buffers* mediante la inyección de EGTA y por otro la concentración de Ca^{2+} mediante la inyección de Ca^{2+}-NP EGTA. En ambos casos, realizamos una primera aproximación al problema realizando mediciones de FCS en condiciones similares a las que esperábamos encontrar en las células y estudiamos qué parámetros era posible estimar.

En particular determinamos que los coeficientes de difusión se comportan según lo esperado, y que, si bien los ajustes se realizaron con una expresión con sólo dos componentes, distintas condiciones permiten estimar distintos coeficientes de difusión. Por otro lado, vimos que, al menos en nuestro *set-up* experimental, los parámetros relacionados con las reacciones, ν_{efi}, son más difíciles de determinar.

Las mediciones realizadas en el citosol en condiciones basales permitieron derivar varios coeficientes de difusión. Considerando la relación de masas de las especies involucradas en los procesos de reacción y difusión que originan las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia interpretamos los valores derivados del ajuste del siguiente modo: D_B, coeficiente de difusión de un "buffer efectivo" endógeno, $\sim$ 20 $\mu m^2/s$; coeficiente de difusión del *dye* libre, $D_F \sim 48$ $\mu m^2/s$; coeficiente de difusión del Ca^{2+}, $D_{Ca} \sim 330$ $\mu m^2/s$. Los coeficientes de difusión del Ca^{2+} y del *dye* Fluo8 hallados en el Cap. 5 son consistentes con sus valores en solución (D_{Ca} ~ 760 $\mu m^2/s$ y $D_F \sim 125$ $\mu m^2/s$) considerando que la viscosidad del citosol es entre dos y tres veces la del agua. A su vez, la concentración de Fluo8 calculada a partir del peso de la componente que tiene el coeficiente de difusión que asociamos con el *dye*, $[Fluo8]_t$, también es consistente con el valor esperado por construcción de la solución de inyección, $[F8]_t$, considerando que el ovocito tiene un volumen de 1 mm^3. En particular, encontramos valores que van entre $[Fluo8]_t$= 1300 nM y 7100 nM, mientras que el valor esperado según las consideraciones mencionadas era de $[F8]_t$= 3700 nM.

Las mediciones realizadas con Fluo5-N tienen la particularidad de que necesitan de tiempos más largos para que la ACF decaiga a cero, como puede apreciarse en las Figs. 5.1 y 5.6, donde presentamos una ACF característica de las mediciones con Fluo8 y con Fluo5-N, respectivamente. Esto junto con la diferencia observada en el patrón de marcación, Figs. 5.5, puede ser interpretado como un indicio de que el Fluo5-N efectivamente ingresó al lumen del RE. El análisis de las mediciones de FCS en el lumen del RE revela por un lado la existencia de tiempos de correlación mucho más largos que los encontrados en las mediciones con Fluo8 en el citosol, τ $\sim$ 30-500 ms, que suelen estar asociados a fluctuaciones de las membranas biológicas [71]. Por otro lado se observa una disminución en los coeficientes de difusión

encontrados, respecto de las mediciones con Fluo8. En particular, y considerando que Fluo5-N y Fluo8 tienen un peso molecular parecido, por lo que su coeficiente de difusión debería ser similar, encontramos que $D_{F_{cit}}/\ D_{F_{RE}} = 39/30 \sim 1.3$ o $D_{F_{cit}}/\ D_{F_{RE}} = 56/30 \sim 1.9$, según qué coeficiente del ajuste IV consideremos que es el correspondiente a D_F (D_{1_2}= 26 $\mu m^2/s$ o D_{2_1}= 78 $\mu m^2/s$). Mientras que para el Ca^{2+}, $D_{Ca_{cit}}/\ D_{Ca_{RE}} = 332/145 \sim 2.3$. Es decir que en el lumen del RE los coeficientes de difusión serían aproximadamente la mitad de su contraparte en el citosol. Estos resultados apuntan en la misma dirección que trabajos previos realizados con GFP [72], donde los autores reportan una disminución de su coeficiente de difusión en el lumen del RE respecto del citosol en células CHO, pese a que la reducción fue mayor a la encontrada en esta Tesis. El coeficiente de difusión asociado a los *buffers* endógenos también mostró una disminución en el lumen del RE respecto del valor hallado en el citosol varias veces mayor que la encontrada para el Ca^{2+} y el *dye*, con $D_{B_{cit}}$= 14-18 $\mu m^2/s$ y $D_{B_{RE}}$ =3 $\mu m^2/s$), por lo tanto $D_{B_{cit}}/D_{B_{RE}} \sim$ 5-6. Sin embargo, en este caso, la disminución encontrada puede ser la suma de la distinta viscosidad del medio más la distinta composición de los *buffers*.

Hasta aquí hemos intentado asignar los coeficientes de difusión derivados de los ajustes de las ACFs a alguna de las especies del sistema analizado. Sin embargo, las condiciones de los experimentos no permiten determinar si los coeficientes obtenidos son coeficientes efectivos o los de las partículas libres. Como se explicó con detalle en el Cap. 2, los coeficientes efectivos varían según las distintas condiciones del sistema, concentraciones, constantes de reacción, etc. En el Cap. 6 intentamos modificar las condiciones del sistema para el caso de las mediciones con Fluo8 en el citosol, a fin de establecer si los coeficientes encontrados se correspondían con valores efectivos o con los coeficientes libres. En particular intentamos modificar la concentración de las sustancias que actúan como trampas de Ca^{2+}por un lado, agregando EGTA, y la de Ca^{2+} basal, agregando Ca^{2+} enjaulado.

Las mediciones con distintas concentraciones de EGTA se realizaron para dos concentraciones de Fluo8 (100 μM y 1 mM en el mix de microinyección, que llamamos de Bajo Fluo8 y Alto Fluo8, respectivamente). Las mediciones con Bajo

Fluo8 permitieron determinar el coeficiente de difusión de los *buffers* endógenos y del Fluo8 que asociamos con los coeficientes D_{1_1} y D_{1_2}, que permanecían constantes para las distintas concentraciones de EGTA, obteniendo $D_B = (19 \pm 3)\ \mu m^2/s$ y $D_F = (59 \pm 6)\ \mu m^2/s$. Por otro lado D_{2_1} es similar al D_{ef1} esperado en un sistema compuesto por Ca^{2+}, Fluo8 y EGTA, donde tiende al coeficiente de difusión libre del EGTA. Así, obtenemos $D_E = (152 \pm 21)\ \mu m^2/s$ o $D_E = (149 \pm 15)\ \mu m^2/s$, según ajustemos los datos por la expresión de la Ec. (2.3) o calculemos su promedio ya que los datos experimentales corresponden a la zona donde $D_{ef1} \sim D_E$. Por último D_{2_2} y D_3 decaen en función de la concentración de EGTA, sin embargo, pese a que no siguen el comportamiento esperado para ninguno de los D_{ef} del caso con Ca^{2+}, Fluo8 y EGTA, permiten fijar una cota mínima para el coeficiente de difusión libre del Ca^{2+} que sería del orden de 400 $\mu m^2/s$. Las coeficientes derivado del ajuste de las mediciones FCS realizadas con Alto Fluo8 no muestran una dependencia con la concentración de EGTA, sin embargo los valores encontrados son similares a lo del caso con Bajo Fluo8. Promediando los valores para todas las concentraciones de EGTA obtenemos $D_B = (8 \pm 1)\ \mu m^2/s$, $D_F = (4 \pm 4)\ \mu m^2/s$, $D_E = (142 \pm 9)\ \mu m^2/s$ y $D_{Ca} = (366 \pm 34)\ \mu m^2/s$. Las mediciones con Ca^{2+} agregado dan cuenta de cómo en distintas condiciones los ajustes de las ACFs pueden converger a distintos coeficientes de difusión. Como es el caso de la condición C, donde a partir de D_1 es posible obtener el coeficiente de difusión asociado al *dye* y a los *buffers* endógenos.

En resumen, observando los coeficientes derivados en todos los sets de experimentos podemos establecer un rango para el coeficiente de difusión libre de Ca^{2+}, D_{Ca}, de entre 350 y 450 $\mu m^2/s$, que está entre 1,5 y 2 veces el del valor derivado en el trabajo sobre extractos citosólicos de N. Allbritton y colaboradores [29]. La posibilidad de que el coeficiente de difusión libre del Ca^{2+} estuviera subestimado en estos experimentos estaba implícita en el hecho de que el coeficiente de difusión que se puede estimar con ellos es el así llamado de molécula única (ver Ec. (1.2)) [27] que es siempre menor al colectivo, D_{coll}, y, por lo tanto, se aproxima al libre para valores mayores de la concentración de calcio. Haber obtenido una estimación mayor que en [29] es muy relevante: en ese trabajo se comparaba el coeficiente estimado

($\sim 220\ \mu m^2/s$ para el coeficiente libre de Ca^{2+}) con el del IP_3 ($\sim 270\ \mu m^2/s$). De esa comparación los autores llegaban a la conclusión de que, independientemente de los *buffers* presentes, el Ca^{2+} siempre difundía a menor tasa que el IP_3 y que, por lo tanto, era su tasa de transporte la que limitaba el rango espacial y temporal las señales. Nuestra estimación del coeficiente de difusión libre pone en discusión esta conclusión. Si bien el Ca^{2+} está prácticamente en su totalidad ligado a *buffers* en condiciones basales, lo que disminuye su coeficiente de difusión efectivo, el hecho de que su coeficiente libre pueda ser mayor al del IP_3 determina que localmente, en regiones donde su concentración esté suficientemente elevada, pueda difundir más rápido que el IP_3. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que estudios recientes han demostrado que el IP_3 también es atrapado dentro de las células por lo que su coeficiente de difusión efectivo debe ser considerado más bajo en el interior celular que lo previamente supuesto [77]. Teniendo en cuenta el rol dual (activador e inhibidor) que tiene el Ca^{2+} sobre los RIP_3s, cambios en la velocidad relativa a la que crecen localmente las concentraciones de Ca^{2+} e IP_3 pueden dar lugar a distintos tipos de respuesta [78]. Cómo se relaciona la cota máxima a la que puede difundir el Ca^{2+} en comparación con la del IP_3 es por lo tanto muy relevante para entender los mecanismos de las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s.

Apéndice A

Teoría de FCS

A.1. Caso de caso de calcio y un indicador

La dinámica de un sistema de reacción-difusión compuesto por Ca^{2+}y un indicador *single wavelength* (SW), F, que reacciona según el esquema de la Ec. (2.1), está descripta por las siguientes ecuaciones:

$$\frac{\partial[Ca]}{\partial t}=D_{Ca}\nabla^2[Ca]-k_{on}[Ca][F]+k_{off}[CaF] \tag{A.1}$$

$$\frac{\partial[CaF]}{\partial t}=D_F\nabla^2[CaF]+k_{on}[Ca][F]-k_{off}[CaF] \tag{A.2}$$

$$\frac{\partial[F]}{\partial t}=D_F\nabla^2[F]-k_{on}[Ca][F]+k_{off}[CaF] \tag{A.3}$$

En el caso en que el indicador de calcio, F, es prácticamente no fluorescente cuando no está ligado a Ca^{2+}, la intensidad de fluorescencia está dada por:

$$f(t)=\int QI(r)[CaF](r,t)d^3r, \tag{A.4}$$

donde $[CaF](r,t)$es la concentración de Ca^{2+}ligado al indicador en el tiempo t y en el punto r, el parámetro, Q, tiene en cuenta la eficiencia de detección, la eficiencia cuántica y la sección eficaz de absorción de la partícula fluorescente.

Para calcular la función de autocorrelación, $G(\tau)$, las Ecs. (A.1)-(A.3) se linearizan alrededor del equilibrio se aplica la transformada de Fourier y se obtienen los autovalores. La ACF, $G(\tau)$, se puede escribir como la suma de tres componentes que corresponden a los tres autovalores, en este caso:

$$G(\tau) = G_{\lambda_F}(\tau) + G_{\lambda_1}(\tau) + G_{\lambda_2}(\tau) \tag{A.5}$$

con:

$$G_{\lambda_F}(\tau) = \frac{Go_F}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_F}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_F}}} \tag{A.6}$$

$$G_{\lambda_1}(\tau) = \frac{1}{2(2\pi)^3 hCaF_{eq}} \int d^3q I(q) \left(1 + \frac{(a-h)\nu_F}{(a+h)\Psi(q)} + \frac{(D_{Ca}-D_F)q^2}{\Psi(q)}\right) e^{\lambda_1 t} \tag{A.7}$$

$$G_{\lambda_2}(\tau) = \frac{1}{2(2\pi)^3 hCaF_{eq}} \int d^3q I(q) \left(-1 - \frac{(a-h)\nu_F}{(a+h)\Psi(q)} + \frac{(D_{Ca}-D_F)q^2}{\Psi(q)}\right) e^{\lambda_2 t} \tag{A.8}$$

donde

$$I(q) = \exp(-(w_r^2 q_r^2 + w_z^2 q_z^2)/4) \tag{A.9}$$

con q_r y q_z las coordinadas de Fourier conjugadas a las coordinadas radial y axial, r y z, respectivamente, $a = F_{eq}/K_d$, $h = F_T/F_{eq}$, $\nu_F = k_{off}(a+h)$, $\Psi(q) = \sqrt{(D_F - D_{Ca})^2 q^4 + 2q^2(D_F - D_{Ca})(h-a)k_{off} + (h+a)^2 k_{off}^2}$ y los autovalores:

$$\lambda_F = -D_F q^2 \tag{A.10}$$

$$\lambda_1 = -\frac{1}{2}\left(k_{off}(a+h) + (D_F + D_{Ca})\,q^2\right) + \frac{\Psi}{2} \tag{A.11}$$

$$\lambda_2 = -\frac{1}{2}\left(k_{off}(a+h) + (D_F + D_{Ca})\,q^2\right) - \frac{\Psi}{2} \tag{A.12}$$

El primer autovalor, λ_F, está directamente relacionado con el coeficiente de difusión del *dye*. Los otros dos, λ_1 y λ_2, en el límite de q pequeño, que corresponde a los modos más relevantes en el límite de tiempos largos (de reacciones rápidas), pueden ser aproximados como:

$$\lambda_1 \approx -\frac{hD_{Ca} + aD_F}{a+h} q^2 \tag{A.13}$$

$$\lambda_2 \approx -(a+h)k_{off} - \frac{aD_{Ca} + hD_F}{a+h} q^2 \tag{A.14}$$

Mientras que λ_1 sigue un comportamiento puramente difusivo a q pequeño, λ_2 incluye un decaimiento exponencial, proporcional a k_{off}, superpuesto a la difusión. Los coeficientes de difusión asociados son los de las Ecs. (2.3) y (2.4). En este límite, la Ec. (A.5) puede aproximarse con una expresión de la forma de la Ec. (1.12).

A.2. Caso de calcio, un indicador y un *buffer*

La dinámica de un sistema de reacción-difusión compuesto por Ca^{2+}, un indicador *single wavelength* (SW), F y un *buffer* no fluorescente de Ca^{2+}, que reaccionan según el esquema de las Ecs. (2.1) y (2.13), está descripta por las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned}
\frac{\partial[Ca]}{\partial t} &= D_{Ca}\nabla^2[Ca] - k_{onF}[Ca]\,[F] + k_{offF}[CaF] \\
&\quad -k_{onE}[Ca]\,[E] + k_{offE}[CaE] && \text{(A.15)} \\
\frac{\partial[F]}{\partial t} &= D_F\nabla^2[F] - k_{onF}[Ca]\,[F] + k_{offF}[CaF] && \text{(A.16)} \\
\frac{\partial[CaF]}{\partial t} &= D_F\nabla^2[CaF] + k_{onF}[Ca]\,[F] - k_{offF}[CaF] && \text{(A.17)} \\
\frac{\partial[E]}{\partial t} &= D_E\nabla^2[E] - k_{onE}[Ca]\,[E] + k_{offE}[CaE] && \text{(A.18)} \\
\frac{\partial[CaE]}{\partial t} &= D_E\nabla^2[CaE] + k_{onE}[Ca]\,[E] - k_{offE}[CaE] && \text{(A.19)}
\end{aligned}$$

Aplicando la transformada de Fourier al sistema linealizado alrededor del equilibrio se obtienen los autovalores de la matriz que caracteriza al sistema [49]. En este caso hay cinco autovalores, dos de ellos corresponden a la difusión libre del indicador de Ca^{2+}, F y del *buffer* de Ca^{2+}, E y se escriben como en las Ecs. (3.1) y (3.2). Los restantes autovalores, son más complicados y pueden aproximarse en ciertos límites como en la Ec. (3.3). En el límite de tiempos largos, la ACF puede describirse con la expresión analítica de la Ec.(1.13).

Apéndice B

Metodología

B.1. Ovocitos de *X. laevis*

Se utilizaron ovocitos inmaduros y defoliculados de *X. laevis* obtenidos a partir de la disección ovárica de especímes hembras de *X. laevis* según el protocolo detallado en Cao *et al.*, 1992 [79]. Los individuos se mantuvieron a $18°C$ y con un ciclo luz-oscuridad de 12 horas. Los ejemplares estuvieron ubicados de a pares en recipientes plásticos con agua filtrada y declorada, cubiertos por una red que permite la ventilación.

B.1.1. Disección ovárica

La disección ovárica consiste en realizar un pequeño corte en la región inferior del abdomen, dejando así expuestos los lóbulos del ovario. Con un par de pinzas se extrae una porción de ovario. Los lóbulos extraídos o los segmentos de ellos se colocan en una placa de Petri con solución *ND96*. Cada individuo se opera a intervalos de al menos cuatro semanas alternando ovarios derecho e izquierdo. En todo momento se cumplió con los protocolos y la reglamentación vigente para el uso y descarte de animales no convencionales de laboratorio.

B.1.2. Colagenización y selección de ovocitos

Los lóbulos ováricos obtenidos de la disección ovárica fueron sometidos a un tratamiento mecánico que consiste en separar los ovocitos por medio de pinzas hasta obtener pequeños agregados de cuatro o cinco ovocitos. Luego fueron sometidos a un tratamiento químico con colagenasa a fin de degradar las capas de colágeno de la matriz que los rodea, procedimiento necesario para realizar la microinyección de manera correcta, ya que el colágeno impide la penetración del capilar. Este tratamiento consiste en incubar las células durante 60 minutos, aproximadamente, con agitación suave (200 rpm) en un baño de 20 ml solución *ND96* con 20 mg de colagenasa (SIGMA). Luego se realizaron varios enjuagues con solución *ND96*, eliminando las células muertas. Finalmente se seleccionaron los ovocitos en estadío VI [68], utilizando el tamaño, la forma y la pigmentación como criterios de selección. Se descartaron aquellos ovocitos de tamaño pequeño, de forma irregular y/o aquellos cuya pigmentación no estaba diferenciada en los hemisferios o con manchas de mayor pigmentación o decoloradas. Las células fueron mantenidas en solución *Barth* con gentamicina a 0.2 mg/ml, en placas *multiwell* a $18°C$ por no más de 5 días. Se colocaron aproximadamente no más de 10 ovocitos por pocillo con 800 μl de medio, que fue renovado todos los días, eliminando las células en malas condiciones.

B.1.3. Microinyección

Se empleó un microinyector Drummond Nanoject II con micropipetas obtenidas por estiramiento por calor de capilares Drummond de borosilicato (7" de largo, 0.53 mm de diámetro interno y 1.14 mm de diámetro externo). Para estirar los capilares se utilizó un Puller PC-10, Narishigue, que utiliza un método de calor y estiramiento vertical por fuerza de la gravedad. Luego de romper delicadamente con una pinza la última parte de la punta del capilar estirado, se lo llena con aceite mineral y se lo monta en el microinyector. La microinyección se realizó en el ecuador, línea que separa el hemisferio animal del vegetal. Esto garantiza

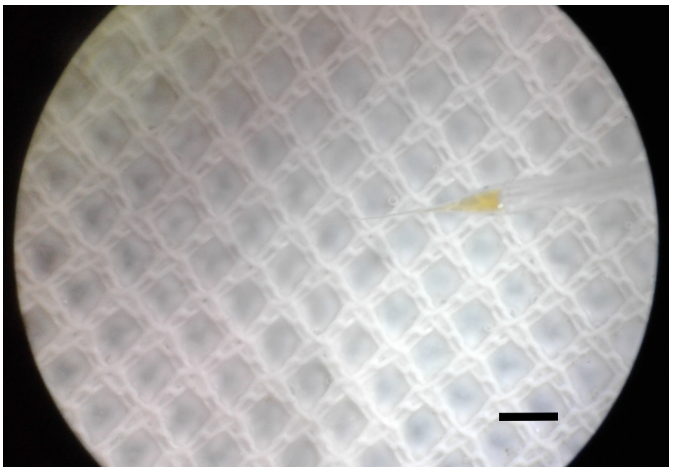

FIGURA B.1: Fotografía de la micropipeta utilizada para la inyección de los ovocitos. Barra= 2mm.

que la inyección se realice en el citosol, evitando el núcleo que se encuentra en el hemisferio animal, cerca del polo. Los ovocitos ya microinyectados se incuban por no menos de 30 minutos a 18°C a fin de que los compuestos se distribuyan homogéneamente en el citosol. En todos los casos el volumen inyectado fue de 37 nl. Asumiendo que el ovocito tiene un volumen de 1 μl, esto implica un factor de dilución de 27 respecto a las concentraciones de las soluciones inyectadas.

B.2. Soluciones

B.2.1. Para medición en gota

Las soluciones empleadas en las mediciones en gota se realizaron con las distintas soluciones del kit de Ca^{2+} (Invitrogen-Molecular Probes) y *dye* (Fluo4-dextrano o Fluo8, Invitrogen-Molecular Probes y Abcam, respectivamente). También se emplearon soluciones diluídas de fluoresceína (Invitrogen-Molecular Probes). Todas las soluciones con concentraciones del rango de nM fueron realizadas en el día de medición a partir de soluciones *stock* de mayor concentración. Cuando fue necesario agregar agua se utilizó agua *miliQ*.

B.2.2. Para la manipulación de ovocitos

Para la manipulación de los ovocitos se emplearon distintas soluciones. A continuación se detallará la composición de cada una de ellas y en qué momentos fueron utilizadas.

Ringer

Esta solución se emplea tanto en la manipulación de los ovocitos durante la microinyección y la adquisición en el microscopio, como también para enjuagar la zona de la herida en el animal durante la disección ovárica. Composición: 120 mM $NaCl$, 2 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 5 mM $HEPES$, pH 7.2.

Barth

Con el agregado de gentamicina, esta solución se emplea para conservar los ovocitos. Composición: 88 mM $NaCl$, 1 mM KCl, 2.4 mM $NaHCO_3$, 0.82 mM $MgSO_4$, 0.33 mM $(Ca(NO_3)_2$, 0.14 mM $CaCl_2$, 5 mM $HEPES$, 0.05 mg/ml gentamicina, pH 7.4.

ND96

La solución *ND96* más gentamicina fue utilizada durante la obtención y colagenización de los ovocitos. Esta solución es similar en su composición, osmolaridad y pH a la solución *Barth* y pueden emplearse indistintamente cualquiera de las dos, por lo que también podría emplearse para conservar los ovocitos. Composición: 96 mM $NaCl$, 2 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1.8 mM $CaCl_2$, 5 mM $HEPES$, 0.05 mg/ml gentamicina, pH 7.4.

B.2.3. Para tratamiento de ovocitos

El tratamiento de ovocitos con fluorófos o reactivos se realizó mediante microinyección de soluciones conteniendo los compuestos de interés, o mediante incubación de las células en baños con dichos compuestos, en los casos en los que se usaran versiones que permean membrana. En el caso del tratamiento por microinyección,

el volumen inyectado fue de 37 nl. Para estimar la concentración en la célula, es necesario dividir la concentración del *mix* de inyección por el factor de dilución correspondiente, que fue estimado en 27, suponiendo que se distribuye homogéneamente en toda la célula, cuyo volumen se asume en 1 μl [80]. Esta estimación no es totalmente correcta, porque la distribución de los compuestos de ninguna manera puede ser homogénea en toda la célula, ya que esto sería asumir que el interior del ovocito es un único compartimiento de iguales características. Además, la célula tiene mecanismos para liberar hacia el medio extracelular o secuestrar en vesículas los compuestos extraños. Sin embargo, se decidió usar la estimación como una aproximación, que da una noción del orden de magnitud de las concentraciones aproximadas que alcanzan los compuestos inyectados en el ovocito. En ciertas ocasiones se combinaron más de un compuesto en la solución de inyección, pero manteniendo las concentraciones finales reportadas a continuación.

Fluoróforos

Los indicadores de Ca^{2+} Fluo4 dextrano (Invitrogen-Molecular Probes) y Fluo8 (Abcam), y los fluoróforos fluoresceína y TMR (Invitrogen-Molecular Probes) se usaron en sus versiones inyectables (es decir q no permean membranas). Fluo4 y Fluo8 se emplearon en concentraciones de 100 μM, 500 μM y 1 mM. En las mediciones control en las que se usó fluoresceína o TMR se usaron soluciones de 100 μM y 200 μM. Estas soluciones se prepararon con agua *miliQ* como solvente.

El Fluo5-N AM (Invitrogen-Molecular Probes), es un acetometil (AM) éster de Fluo5-N. Es un indicador de baja afinidad (K_d= 90 μM), con un peso molecular de 1128 g/mol. Al tener la capacidad de permear membranas se usó en solución para baños de incubación. Para preparar el baño de incubación este indicador se disuelve primero en Pluronic F-127 a una concentración de 4 mM y luego se diluye con solución *Barth* mediante diluciones seriadas hasta una concentración final de 10 μM.

FCS con EGTA

El EGTA empleado en mediciones FCS se usó en concentraciones de (1-10) mM, combinado con Fluo8 a 100 μM y 1 mM. Las concentraciones de EGTA empleadas en los experimentos de evocación de señales se detallan más adelante (IP_3 *enjaulado*).

FCS con Ca^{2+} ***enjaulado***

En los experimentos con liberación de Ca^{2+} enjaulado se realizó una solución con 0.5 μl de $CaCl_2$ a 100 mM y 4.5 μl de $NP-EGTA$ a 10 mM. Para inyectar las células, se preparó una solución 1 μl del mix de $NP-EGTA-Ca^{2+}$ y 1 μl de Fluo8 a 200 μM y 2 mM. Quedando finalmente una solución con 9 mM de $NP-EGTA$, 5 mM de $CaCl_2$ y Fluo8 en la concentración correspondiente en cada caso (100 μM, y 1 mM).

Evocación de señales con IP_3 ***enjaulado***

Se preparó una solución de 1 mM de Fluo8, 0.25 mM de IP_3 enjaulado (Invitrogen-Molecular Probes) y distintas concentraciones de EGTA (1.25, 3.75 y 5 mM).

B.3. Adquisición

Las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente en un microscopio confocal de escaneo espectral Fluoview 1000 (Olympus, Tokyo, Japan), empleando un objetivo de inmersión en aceite 60x, N.A.= 1.35 (UPlanSAPO, Olympus) y pinhole con 115 μm de apertura.

B.3.1. FCS

Se realizaron mediciones de Single point FCS a una tasa de adquisición de 50 kHz (20 μs por punto) con una duración total de 167 s (equivalente a 8365312 puntos). Las mediciones en gota de solución se realizaron a $\sim$ 20 μm del cubreobjeto. Las mediciones realizadas en ovocitos se realizaron tomando como referencia la estructura de los gránulos corticales, que con el ovocito apoyado sobre el vidrio,

no está más allá de los 20 μm del cubreobjeto. En las mediciones en las que se usó Fluo4 dextrano, Fluo8, Fluo5-N AM o fluoresceína se usó la línea de 488 nm de un láser de Argón y se detectó la fluorescencia emitida en un rango de (500-600) nm. Las mediciones realizadas sobre TMR se realizaron con la línea de 543 nm de un láser de Helio-Neón, la fluorescencia se detectó en el rango de (550-650) μm. En los casos en los que se utilizó TMR junto con alguno de los demás fluoróforos que se excitan con la línea de 488 nm, la detección se realizó a través de dos canales y se corrigió el rango de adquisición a fin de reducir al mínimo posible el cruce de la fluorescencia al canal no correspondiente.

B.3.2. Escaneo de imágenes

Las imágenes presentadas en esta tesis corresponden a la imágen de referencia que guarda el programa de control del microscopio al realizar mediciones de FCS. Por la tanto, la excitación y la detección se realizó en las mismas condiciones. Se adquirieron a una tasa de 50 kHz (20 μs por punto), con un tamaño de 256 x 256 puntos.

B.3.3. Escaneo por líneas

La detección de señales de Ca^{2+} se realizó utilizando la técnica del *linescan* que consiste en escanear la misma línea sucesivas veces. En este caso la tasa de adquisición fue de 100 kHz (10 μs por punto) para líneas de 250 puntos, dando un tiempo total por línea de 3.26 s. Nuevamente, la excitación se realizó con la línea de 488 nm del láser de Argón y el rango de detección se ubicó entre (500-600) nm.

B.4. Evocación de señales por liberación de IP_3 enjaulado

La evocación de señales de Ca^{2+} se realizó mediante la foto-liberación de IP_3 enjaulado con un pulso de luz UV de aproximadamente 1 s. Como fuente de luz UV se empleó un sistema LED.

B.5. Calibración del volumen confocal

Como se mencionó brevemente, la estimación de parámetros biofísicos a partir del ajuste de las ACFs obtenidas por los registros de FCS es necesario conocer la geometría del volumen de detección. En particular los parámetros w_r y w donde w es la relación entre w_z y w_r. Con w_z y w_r las medidas de la cintura del haz del láser a lo largo del eje z y r, donde z es la coordinada espacial a lo largo de la dirección de propagación del láser y r es la coordinada radial en el plano perpendicular. Para determinar estos parámetros geométricos es necesario realizar mediciones de FCS en gota de solución acuosa de un fluoróforo de coeficiente de difusión y concentración conocidos. Calculando la ACF y ajustándola por una expresión de la forma Ec. (1.7), es posible estimar w_r y w. El parámetro w que define la relación de aspecto del volumen de detección se supone que es constante, por lo tanto una vez establecido sólo es necesario determinar w_r. Para esto sólo basta con saber el coeficiente de difusión del fluoróforo estudiado. El volumen de detección puede variar dependiendo de la potencia del láser [67], por lo tanto es importante realizar la calibración para todas las potencias empleadas en las mediciones, pero también es importante realizarlo a diario, para descartar posibles desvíos. La calibración fue realizada con fluoresceína 100 nM, asumiendo que el coeficiente de difusión de la fluoresceína es de 425 $\mu m^2/s$, [81], se obtuvo $w \sim 5$ y $w_r \sim 0.28$ μm. Por lo tanto el volumen efectivo resultante es de V_{ef}=0.59 μm^3.

B.6. Análisis de datos experimentales

B.6.1. Cálculo de ACFs

Las ACFs experimentales fueron calculadas usando una rutina casera escrita en la plataforma MATLAB [82]. Para esto, cada una de las mediciones de 167 s fueron divididas en $N = 1021$ segmentos de 163 ms conteniendo 2^{13} segmentos para las mediciones FCS realizadas en solución acuosa; $N = 510$ segmentos de 327 ms conteniendo 2^{14} segmentos para las mediciones FCS realizadas en citosol de ovocitos de *X. laevis*, y $N = 3$ segmentos de 55 s conteniendo 2^{21} segmentos para las mediciones FCS realizadas en el lumen del retículo endoplasmático. La elección del largo de los segmentos se tomó en relación a la longitud mínima necesaria para que no haya correlación, es decir la ACF debe llegar y permanecer en cero.

La ACF se calculó según la Ec. (1.5) para cada uno de los segmentos, a partir de las que se obtiene una ACF promedio para cada medición.

B.6.2. Ajuste de ACFs

El ajuste de las ACFs se realizó con rutinas caseras escritas en la plataforma MATLAB, [82]. Sólo se ajustaron las ACFs de aquellas mediciones en las que la intensidad de fluorescencia se mantuvo fluctuando alrededor de un valor medio constante durante toda la medición. Las mediciones cuyas ACFs eran muy ”ruidosas” también fueron descartadas. Todos los parámetros ajustados fueron determinados para cada ACF promedio mediante un ajuste no lineal de cuadrados mínimos usando la función de MATLAB *nlinfit*.

De los parámetros estimados en los ajustes se derivaron los parámetros biofísicos. Para cada condición se calcularon los valores promedios y el error estándar de la media (SEM) de los parámetros biofísicos obtenidos. Donde correspondiera, también se calcularon los promedios y el SEM sobre todas las condiciones de

medición de aquellos valores experimentales que se espera se mantengan constantes. Las mediciones realizadas con fluoresceína fueron ajustadas con la expresión de la Ec. (1.7). Las mediciones realizadas en solución de Ca^{2+} e indicador, y las mediciones realizadas en solución de Ca^{2+}, EGTA e indicador o en ovocitos, con y sin *buffer* exógeno, se ajustaron teniendo en cuenta distintas variantes de las expresiones de las Ecs. (1.12) y (1.13):

$$G(\tau) = \frac{G_1}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_1}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_1}}} + \frac{G_2}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_2}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_2}}} \tag{B.1}$$

$$G(\tau) = \frac{G_1}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_1}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_1}}} + \frac{G_2\, e^{-\nu\,\tau}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_2}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_2}}} \tag{B.2}$$

$$G(\tau) = \frac{G_1}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_1}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_1}}} + \frac{G_2}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_2}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_2}}} + \frac{G_3\, e^{-\nu\,\tau}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_3}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_3}}} \tag{B.3}$$

$$G(\tau) = \frac{G_1}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_1}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_1}}} + \frac{G_2\, e^{-\nu_2\,\tau}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_2}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_2}}} + \frac{G_3\, e^{-\nu_3\,\tau}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_3}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_3}}} \tag{B.4}$$

Ajuste I: dos componentes puramente difusivas, Ec. (B.1). Ajuste II: una componente difusiva y una multiplicada por el término exponencial, Ec. (B.2). Ajuste III: dos componentes difusivas y una multiplicada por el término exponencial, Ec. (B.3). Ajuste IV: una componente difusiva y dos multiplicadas por un término exponencial, Ec. (B.4). En la Tabla B.1, se detallan los parámetros estimados en cada tipo de ajuste.

Respecto a las mediciones de FCS realizadas sobre un sistema formado por Ca^{2+}, *dye* y *buffer*, si bien la teoría que lo describe propone una expresión analítica para la ACF de cuatro componentes, ajustar una ACF con diez parámetros libres puede llevar a estimaciones que no se condicen con el sistema estudiado.

Tabla B.1: Modelos considerados en el ajuste de las mediciones de FCS y parámetros estimados a partir de los ajustes.

	Componentes	*Parámetros ajustados*		
I	2 dif	G_1 D_1	G_2 D_2	
II	1 dif - 1 exp	G_1 D_1	G_2 D_2 ν	
III	2 dif - 1 exp	G_1 D_1	G_2 D_2	G_3 D_3 ν
IV	1 dif - 2 exp	G_1 D_1	G_2 D_2 ν_2	G_3 D_3 ν_3

B.6.3. Ajuste de parámetros biofísicos

En los casos en los que se ajustó los parámetros estimados según distintas ecuaciones se usó la herramienta de MATLAB *cftool* con una ecuación particular en cada caso.

B.6.4. Análisis de la bimodalidad

El criterio de información de Akaike (Akaike Criterion Information, AIC) es un método muy conocido que mide la bondad de ajuste de un modelo estadístico sobre los datos analizados, donde bajos valores de AIC indican un buen ajuste [83]. Para determinar la bimodalidad de una distribución, es posible ajustar los datos experimentales con un modelo de distribución gaussiana de uno o dos componentes (uni o bimodal) y calcular cuál de los dos ajustes minimiza AIC. Si AIC es mínimo para el modelo de una componente, entonces la distribución de los datos experimentales está mejor descripta por una curva unimodal, mientras que si el AIC es mínimo para el modelo de dos componentes, la mejor descripción de la distribución es con una bimodal. En ese sentido, es posible calcular la diferencia proporcional en los AIC (AIC_d, que llamaremos criterio de diferencia de Akaike) como:

$$AIC_d = \frac{AIC_1 - AIC_2}{max(AIC_1, AIC_2)} \tag{B.5}$$

donde AIC_1 es el AIC para el ajuste con una única gaussiana, AIC_2 es el del ajuste con una mezcla de dos gaussianas, y $max(AIC_1, AIC_2)$ es el valor máximo de los dos valores [84]. AIC_D representa cuánto mejor es el ajuste por un modelo bimodal sobre el unimodal, valores mayores que cero sugieren bimodalidad y menores que cero, unimodalidad. Una manera de mejorar este criterio es eligiendo previamente, un umbral (usualmente entre 10 y 25 %) en la proporción de cada componente para determinar si la distribución es uni o bimodal, además del valor de AIC_d [85].

Agradecimientos

A Silvina, por brindarme la oportunidad de realizar el doctorado bajo su dirección. Por guiarme en este camino de la ciencia interdisciplinaria. Por su infinita paciencia y buena predisposición.

A mis compañeros de grupo Emi, Lucía, Estefi y María Laura, que estuvieron desde el comienzo, y Germán, Rocío y Alan, con quienes compartí el último tramo.

A toda la gente del CMA, en especial a Lía Pietrasanta y Lorena Sigaut.

A Daniel Calvo por brindarnos generosamente los ovocitos durante los primeros años de mi doctorado.

A Gabriela Amodeo y su grupo, en especial a Moira Sutka y Marcelo Ozu. Que nos brindaron su tiempo y compartieron su espacio para que podamos disponer de nuestras células.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, que financiaron este proyecto.

A la Universidad de Buenos Aires y en particular a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales que permitieron mi formación y el desarrollo de esta Tesis. Al Departamento de Física que me adoptó durante estos años.

A familiares y amigos, especialmente a Marta, sin su ayuda esto no hubiera sido posible. Y a Manuel, que contagia sus ganas de lograr imposibles.

A Fabián, Flor y Estefi. Mi único Norte, siempre.

Bibliografía

[1] Michael J. Berridge, Martin D. Bootman, and Peter Lipp. Calcium - a life and death signal. *Nature*, 395:645–648, 1998.

[2] Michael J Berridge, Peter Lipp, and Martin D Bootman. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 1(1): 11–21, 2000.

[3] J.M. Berg, L. Stryer, J.L. Tymoczko, and J.M. Macarulla. *Bioquemistry*. Reverté, 2007. ISBN 9788429176001.

[4] Gillian Grafton and Leanne Thwaite. Calcium channels in lymphocytes. *Immunology*, 104(2):119–126, 2001.

[5] Isabel M Manjarrés, Arancha Rodríguez-García, María Teresa Alonso, and Javier García-Sancho. The sarco/endoplasmic reticulum ca 2+ atpase (serca) is the third element in capacitative calcium entry. *Cell calcium*, 47(5):412–418, 2010.

[6] Hong-Tao Ma, Randen L Patterson, Lutz Birnbaumer, Katsuhiko Mikoshiba, Donald L Gill, et al. Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated ca2+ channels. *Science*, 287(5458):1647–1651, 2000.

[7] Paul F Worley, JM Baraban, SURACHAI Supattapone, Virginia S Wilson, and Solomon H Snyder. Characterization of inositol trisphosphate receptor binding in brain. regulation by ph and calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 262(25):12132–12136, 1987.

[8] J Kevin Foskett, Carl White, King-ho Cheung, and Don-on Daniel Mak. Inositol Trisphosphate Receptor Ca2+ Release Channels. *Physiological Reviews*, 87(2):593–658, 2007. ISSN 0031-9333. doi: 10.1152/physrev.00035.2006.

[9] Chi-un Choe and Barbara E Ehrlich. The inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor (ip3r) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork. *Sci. STKE*, 2006(363):re15–re15, 2006.

[10] W B Busa, J E Ferguson, S K Joseph, J R Williamson, and R Nuccitelli. Activation of frog (xenopus laevis) eggs by inositol trisphosphate. i. characterization of ca2+ release from intracellular stores. *The Journal of Cell Biology*, 101(2):677–682, 1985. doi: 10.1083/jcb.101.2.677.

[11] James D. Lechleiter and David E. Clapham. Molecular mechanisms of intracellular calcium excitability in x. laevis oocytes. *Cell*, 69(2):283 – 294, 1992. ISSN 0092-8674. doi: http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(92)90409-6.

[12] J P Keener and J Sneyd. *Mathematical Physiology*. Interdisciplinary applied mathematics. Springer, 1998. ISBN 9780387983813.

[13] Beat Schwaller. Cytosolic ca2+ buffers. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(11):a004051, 2010.

[14] Martha C Nowycky and Andrew P Thomas. Intracellular calcium signaling. *Journal of cell science*, 115(19):3715–3716, 2002.

[15] Ian F Smith, Steven M Wiltgen, Jianwei Shuai, and Ian Parker. Ca2+ originate from pre-established stabke clusters of inositol trisphosphate receptors. *Sci Signal*, 2(98), 2010. doi: 10.1126/scisignal.2000466.Ca.

[16] Yoko Tateishi, Mitsuharu Hattori, Tomohiro Nakayama, Miwako Iwai, Hiroko Bannai, Takeshi Nakamura, Takayuki Michikawa, Takafumi Inoue, and Katsuhiko Mikoshiba. Cluster formation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor requires its transition to open state. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8):6816–6822, 2005.

[17] Ian Parker and Yong Yao. Regenerative Release of Calcium from Functionally Discrete Subcellular Stores by Inositol Trisphosphate. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 246(1317):269–274, December 1991.

[18] S Swillens, G Dupont, L Combettes, and P Champeil. 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*, 96(24):13750–13755, 1999. ISSN 00278424. doi: 10.1073/pnas.96.24.13750.

[19] I Parker, Y Yao, and V Ilyin. Fast kinetics of calcium liberation induced in Xenopus oocytes by photoreleased inositol trisphosphate. *Biophysical journal*, 70(1):222–237, 1996. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79565-6.

[20] Nick Callamaras, Jonathan S. Marchant, Xiao-Ping Sun, and Ian Parker. Activation and co-ordination of insp_3-mediated elementary ca^{2+} events during global ca^{2+} signals in *xenopus* oocytes. *J. Physiol.*, 509(1):81–91, 1998.

[21] Y Yao, J Choi, and I Parker. Quantal puffs of intracellular Ca2+ evoked by inositol trisphosphate in Xenopus oocytes. *The Journal of physiology*, 482 (Pt 3:533–553, 1995. ISSN 0022-3751.

[22] Don-On Daniel Mak, Sean McBride, and J Kevin Foskett. 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*, 95(26):15821–15825, December 1998.

[23] Xiao Ping Sun, Nick Callamaras, Jonathan S. Marchant, and Ian Parker. A continuum of InsP3-mediated elementary Ca2+ signalling events in Xenopus oocytes. *Journal of Physiology*, 509(1):67–80, 1998. ISSN 00223751. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.067bo.x.

[24] Nick Callamaras, Jonathan S. Marchant, Xiao Ping Sun, and Ian Parker. Activation and co-ordination of InsP3-mediated elementary Ca2+ events during

global Ca2+ signals in Xenopus oocytes. *Journal of Physiology*, 509(1):81–91, 1998. ISSN 00223751. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.081bo.x.

[25] John Crank. *The mathematics of diffusion.* Oxford university press, 1979.

[26] Martin D Bootman, Michael J Berridge, and H Llewelyn Roderick. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Current Biology*, 12(16):R563–R565, 2002.

[27] Bernardo Pando, Silvina Ponce Dawson, Don-On Daniel Mak, and John E. Pearson. Messages diffuse faster than messengers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(14):5338–5342, 2006. doi: 10.1073/pnas.0509576103.

[28] Chi-Un Choe and Barbara E Ehrlich. 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(363):re15, 2006. ISSN 1525-8882. doi: 10.1126/stke.3632006re15.

[29] N.L. Allbritton, T. Meyer, and L. Stryer. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science*, 258:1812–1815, 1992.

[30] Lorena Sigaut, John E. Pearson, Alejandro Colman-Lerner, and Silvina Ponce Dawson. Messages do diffuse faster than messengers: Reconciling disparate estimates of the morphogen bicoid diffusion coefficient. *PLoS Comput Biol*, 10(6):e1003629, 06 2014.

[31] R Madelaine Paredes, Julie C Etzler, Lora Talley Watts, Wei Zheng, and James D Lechleiter. Chemical calcium indicators. *Methods*, 46(3):143–151, 2008.

[32] Richard. Nuccitelli and American Society for Cell Biology. A practical guide to the study of calcium in living cells, 1994.

[33] Y Yao, J Choi, and I Parker. Quantal puffs of intracellular ca^{2+} evoked by inositol trisphosphate in xenopus oocytes. *J Physiol (Lond)*, 482(3):533–553, 1995.

[34] I. Parker, J. Choi, and Y. Yao. Elementary events of insp3-induced ca^{2+} liberation in xenopus oocytes: hot spots, puffs and blips. *Cell Calcium*, 20 (2):105–21, 1996.

[35] Sheila L Dargan, Angelo Demuro, and Ian Parker. Imaging ca^{2+} signals in *xenopus oocytes*. *Xenopus Protocols: Cell Biology and Signal Transduction*, pages 103–119, 2006.

[36] Dojindo Molecular Technologies. Bapta. URL `http://www.dojindo.com/store/p/558-BAPTA.htm`.

[37] Teflabs. Fluo indicators. URL `http://www.teflabs.com/blog/archive/2011/01`.

[38] Lorena Sigaut, Cecilia Villarruel, María Laura Ponce, and Silvina Ponce Dawson. Fluorescence correlation spectroscopy experiments to quantify free diffusion coefficients in reaction-diffusion systems: The case of ca 2+ and its dyes. *Physical Review E*, 95(6):062408, 2017.

[39] Arne Gennerich and Detlev Schild. Anisotropic diffusion in mitral cell dendrites revealed by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 83(1):510 – 522, 2002. ISSN 0006-3495. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75187-4.

[40] Roger Y Tsien. Monitoring cell calcium. *Calcium as a cellular regulator*, pages 28–54, 1999.

[41] Thermo Fischer. Fluorescence spectraviewer. URL `https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html`.

[42] S R Adams, , and R Y Tsien. Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annual Review of Physiology*, 55(1):755–784, 1993. doi: 10.1146/annurev.ph.55.030193.003543. PMID: 8466191.

[43] Ian Parker, John Choi, and Yong Yao. Elementary events of InsP3-induced Ca2+ liberation in Xenopus oocytes: Hot spots, puffs and blips. *Cell Calcium*, 20(2):105–121, 1996. ISSN 01434160. doi: 10.1016/S0143-4160(96)90100-1.

[44] Jonathan Marchant and Nick Callamaras. Initiation of IP3 -mediated Ca2+ waves in. *The EMBO journal*, 18(19):5285–5299, 1999.

[45] GC Ellis-Davies and Jack H Kaplan. Nitrophenyl-egta, a photolabile chelator that selectively binds ca2+ with high affinity and releases it rapidly upon photolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1):187–191, 1994.

[46] F Olschewski. Scientific and technical information.

[47] Douglas Magde, Elliot Elson, and W. W. Webb. Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 29:705–708, Sep 1972. doi: 10.1103/PhysRevLett.29.705.

[48] Nancy L. Thompson, Alena M. Lieto, and Noah W. Allen. Recent advances in fluorescence correlation spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 12(5):634–641, 2002.

[49] Oleg Krichevsky and Grégoire Bonnet. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Reports on Progress in Physics*, 65(2):251, 2002.

[50] E. L. Elson. Fluorescence correlation spectroscopy measures molecular transport in cells. *Traffic*, 2:789, 2001.

[51] Elke Haustein and Petra Schwille. Fluorescence correlation spectroscopy: Novel variations of an established technique. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 36(1):151–169, 2007. doi: 10.1146/annurev.biophys.36.040306.132612.

[52] Gurpreet Kaur, Mauro W Costa, Christian M Nefzger, Juan Silva, Juan Carlos Fierro-González, Jose M Polo, Toby DM Bell, and Nicolas Plachta. Probing transcription factor diffusion dynamics in the living mammalian embryo

with photoactivatable fluorescence correlation spectroscopy. *Nature communications*, 4:1637, 2013.

[53] Northwestern University. Center for advanced microscopy. URL `https://cam.facilities.northwestern.edu/588-/fluorescence-correlation-spectroscopy/`.

[54] D. C. Lamb, A. Schenk, C. Röcker, C. Scalfi-Happ, and G. Ulrich Nienhaus. Fcs - sensitivity enhancement in fluorescence correlation spectroscopy of multiple species using time-gated detection. *Biophys. J.*, 79:1129, 2000.

[55] E. Bismuto, E. Gratton, and D. C. Lamb. Dynamics of ans binding to tuna apomyoglobin measured with fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, 81:3510, 2001.

[56] Emiliano Pérez Ipiña and Silvina Ponce Dawson. From free to effective diffusion coefficients in fluorescence correlation spectroscopy experiments. *Phys. Rev. E*, 87:022706, Feb 2013. doi: 10.1103/PhysRevE.87.022706.

[57] Emiliano Pérez Ipiña and Silvina Ponce Dawson. How long should a system be observed to obtain reliable concentration estimates from the measurement of fluctuations? *Biophys. J.*, 107:2674 – 2683, Dec 2014.

[58] Lorena Sigaut, María Laura Ponce, Alejandro Colman-Lerner, and Silvina Ponce Dawson. Optical techniques provide information on various effective diffusion coefficients in the presence of traps. *Phys. Rev. E*, 82:051912, Nov 2010. doi: 10.1103/PhysRevE.82.051912.

[59] Lorena Sigaut, Cecilia Villarruel, and Silvina Ponce Dawson. Fcs experiments to quantify ca2+ diffusion and its interaction with buffers. *The Journal of Chemical Physics*, 146(10):104203, 2017.

[60] Emiliano Pérez Ipiña and Silvina Ponce Dawson. Fluctuations, correlations and the estimation of concentrations inside cells. *PloS one*, 11(3):e0151132, 2016.

[61] D. Qin, A. Yoshida, and A. Noma. Limitations due to unstirred layers in measuring channel response of excised membrane patch using rapid solution exchange methods. *Japanese Journal of Physiology*, 41:333–339, 1991.

[62] Mohammad Naraghi. T-jump study of calcium binding kinetics of calcium chelators. *Cell Calcium*, 22(4):255 – 268, 1997. ISSN 0143-4160. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0143-4160(97)90064-6.

[63] Alberto Diaspro, Federico Federici, and Mauro Robello. Influence of refractive-index mismatch in high-resolution three-dimensional confocal microscopy. *Applied optics*, 41(4):685–690, 2002.

[64] Jorg Enderlein, Ingo Gregor, Digambara Patra, and Jorg Fitter. Art and artefacts of fluorescence correlation spectroscopy. *Current pharmaceutical biotechnology*, 5(2):155–161, 2004.

[65] Jörg Enderlein, Ingo Gregor, Digambara Patra, Thomas Dertinger, and U Benjamin Kaupp. Performance of fluorescence correlation spectroscopy for measuring diffusion and concentration. *ChemPhysChem*, 6(11):2324–2336, 2005.

[66] Chan-Yuan Tan and Yao-Xiong Huang. Dependence of refractive index on concentration and temperature in electrolyte solution, polar solution, nonpolar solution, and protein solution. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 60(10):2827–2833, 2015.

[67] Volker Buschmann, Benedikt Krämer, and Felix Koberling. Quantitative fcs: determination of the confocal volume by fcs and bead scanning with the microtime 200. 2009.

[68] John J. Eppig and James N. Dumont. Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). *Developmental Biology*, 36(2):330–342, 1974. ISSN 00121606. doi: 10.1016/0012-1606(74)90055-4.

[69] David E Clapham. Calcium signaling. *Cell*, 131(6):1047–1058, 2007.

[70] Ilya Bezprozvanny. The inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors. *Cell calcium*, 38(3-4):261–272, 2005.

[71] Cécile Fradin, Asmahan Abu-Arish, Rony Granek, and Michael Elbaum. Fluorescence correlation spectroscopy close to a fluctuating membrane. *Biophysical journal*, 84(3):2005–2020, 2003.

[72] Mark J Dayel, Erik FY Hom, and AS Verkman. Diffusion of green fluorescent protein in the aqueous-phase lumen of endoplasmic reticulum. *Biophysical journal*, 76(5):2843–2851, 1999.

[73] Guillermo Solovey and Silvina Ponce Dawson. Observable effects of ca2+ buffers on local ca2+ signals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1933): 5597–5603, 2010.

[74] Estefanía Piegari, Lorena Sigaut, and Silvina Ponce Dawson. Ca2+ images obtained in different experimental conditions shed light on the spatial distribution of IP3 receptors that underlie Ca2+ puffs. *Cell Calcium*, 57(2): 109–119, 2015. ISSN 01434160. doi: 10.1016/j.ceca.2015.01.003.

[75] D Fraiman, B Pando, S Dargan, I Parker, and S Ponce Dawson. Analysis of puff dynamics in oocytes: Interdependence of puff amplitude and interpuff interval. *Biophys. J.*, 90:3897–3907, 2006.

[76] Petra Schwille and Elke Haustein. Fluorescence correlation spectroscopy.

[77] George D Dickinson, Kyle L Ellefsen, Silvina Ponce Dawson, John E Pearson, and Ian Parker. Hindered cytoplasmic diffusion of inositol trisphosphate restricts its cellular range of action. *Sci. Signal.*, 9(453):ra108–ra108, 2016.

[78] Ana Calabrese. Dinámica del calcio intracelular en los procesos de plasticidad sináptica. tesis de licenciatura. departamento de física, fcen-uba, 2007.

[79] Yongwei Cao, Miroslava Anderova, Nigel M Crawford, and Julian I Schroeder. Expression of an outward-rectifying potassium channel from maize mrna and complementary rna in xenopus oocytes. *The Plant Cell*, 4(8):961–969, 1992.

[80] Suzanne M Kelly, James P Butler, and Peter T Macklem. Control of cell volume in oocytes and eggs from xenopus laevis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 111(4):681–691, 1995.

[81] Christopher T Culbertson, Stephen C Jacobson, and J Michael Ramsey. Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices. *Talanta*, 56(2):365 – 373, 2002. ISSN 0039-9140. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00602-6.

[82] MATLAB. *version 7.10.0 (R2010a)*. The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, 2010.

[83] Hirotugu Akaike. A new look at the statistical model identification. *IEEE transactions on automatic control*, 19(6):716–723, 1974.

[84] Eric-Jan Wagenmakers and Simon Farrell. Aic model selection using akaike weights. *Psychonomic bulletin & review*, 11(1):192–196, 2004.

[85] Jonathan B Freeman and Rick Dale. Assessing bimodality to detect the presence of a dual cognitive process. *Behavior research methods*, 45(1):83–97, 2013.