

Tesis Doctoral

Obtención y análisis de imágenes de alta resolución de señales intracelulares de calcio

López, Lucía Fernanda

2018

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:

López, Lucía Fernanda. (2018). Obtención y análisis de imágenes de alta resolución de señales intracelulares de calcio. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6524_Lopez

Cita tipo Chicago:

López, Lucía Fernanda. "Obtención y análisis de imágenes de alta resolución de señales intracelulares de calcio". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6524_Lopez

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



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

Obtención y análisis de imágenes de alta resolución de señales intracelulares de calcio

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

por **Lic. Lucía Fernanda Lopez**

Director de tesis: Dra. Silvina Ponce Dawson

Consejero de estudios: Dr. Gabriel Mindlin

Lugar de trabajo: IFIBA

Fecha de Defensa: 27 de marzo de 2018

Resumen

El ión calcio (Ca^{2+}) es usado por prácticamente todos los tipos celulares para señalar procesos tan diversos como la fertilización, la comunicación neuronal, la contracción muscular o la muerte celular. La versatilidad de este mensajero se basa en la variedad de patrones espacio-temporales que la concentración intracelular de Ca^{2+} puede desplegar. Dentro de las células el Ca^{2+} citosólico libre es mantenido a muy baja concentración. Las señales entonces involucran el ingreso de Ca^{2+} desde el medio extracelular o su liberación desde reservorios internos. Dentro de este último tipo de procesos, la liberación desde el retículo endoplasmático (RE) a través de receptores (RIP_3s) de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) juega un rol fundamental. En la mayoría de los casos estos receptores están organizados en cúmulos sobre la membrana del RE y pueden abrirse cuando ligan IP_3 y Ca^{2+} . El Ca^{2+} citosólico tiene un rol dual sobre la cinética de los RIP_3s llevándolos a su apertura a concentraciones moderadas y a su inhibición a concentraciones altas. Es por esto que el Ca^{2+} liberado a través de un RIP_3 abierto puede inducir la apertura de canales vecinos. Este fenómeno es conocido como *liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}* (CICR, por su nombre en inglés). En la mayoría de las células los cúmulos de RIP_3s están separados por unos pocos micrones. La organización interna de los cúmulos, por otro lado, no es totalmente conocida aunque se supone que puede variar entre situaciones con RIP_3s muy empaquetados y otras con mayor separación entre canales. Dado que las características de las señales resultantes dependen del CICR, la distribución espacial de RIP_3s intra e inter-cúmulo juega un rol fundamental. Es por esto que la obtención y el análisis de imágenes con resolución suficiente para poder inferir cómo ocurre el acoplamiento entre receptores mediado por calcio es clave. Dependiendo del número de receptores o cúmulos que participan de un mismo evento de liberación, las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s permanecen localizadas o se transforman en ondas que viajan entre cúmulos, abarcando, eventualmente toda la célula. Las señales localizadas (*elementales*) mediadas por RIP_3s son llamadas *blips* o *puffs* según haya uno o varios RIP_3s de un cúmulo simultáneamente abiertos. A través del CICR, los *puffs* de Ca^{2+} constituyen los ladrillos fundamentales de las señales más globales. La variedad de las señales que pueden surgir entonces dependen de la inter-relación entre la cinética y arreglo espacial de los canales, el nivel de Ca^{2+} citosólico, la tasa de liberación de Ca^{2+} y de los mecanismos que lo atrapan o remueven. El objetivo de la Tesis es develar algunas de las propiedades de estos mecanismos y estudiar cómo se afectan unos a otros.

En esta tesis combinamos experimentos, su análisis y el desarrollo de modelos matemáticos para obtener una descripción detallada de los distintos aspectos que moldean el

acoplamiento entre eventos de Ca^{2+} elementales. Esto es particularmente importante dado que el proceso desde señales locales a globales (o *spikes*) es clave para la determinación de los intervalos de tiempo entre *spikes*. Se cree que la información está codificada en la frecuencia de estos *spikes*. Por lo tanto, nuestro objeto de estudio está directamente implicado en la habilidad del Ca^{2+} de transmitir el mensaje que transporta. Para estudiar señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 s experimentalmente, usamos el ovocito de *Xenopus laevis* como sistema modelo. Este es un modelo conveniente, entre otras cosas, porque el Ca^{2+} es liberado desde el RE exclusivamente a través de RIP_3 s. Los experimentos involucraron la observación de señales de Ca^{2+} usando diferentes indicadores de Ca^{2+} fluorescentes (citoplasmáticos y luminal), buffers exógenos e IP_3 enjaulado que fue fotoliberado dentro de las células para inducir la apertura de los RIP_3 s. Para monitorear cambios en la fluorescencia, usamos microscopía confocal multiespectral y microscopía wide-field. Para el modelado usamos descripciones estocásticas y deterministas dependiendo de los aspectos que intentamos describir.

En primer lugar investigamos el tamaño de los eventos de Ca^{2+} observados en ovocitos inmaduros de *Xenopus laevis*. La distribución de amplitudes de *puffs* obtenida no fue gaussiana sino que había una notable fracción de eventos de gran tamaño. La distribución de áreas de *puffs* mostraba una cola larga y podía ser ajustada con una relación tipo ley de potencias. Este comportamiento tipo ley de potencias se encontró también dentro de un modelo simple que incluía acoplamiento entre señales individuales para un amplio rango de valores de los parámetros. Un análisis del modelo mostró que una elevación global de la concentración de Ca^{2+} era muy importante para determinar si la distribución de tamaño de eventos tenía o no cola larga. Esto nos sugirió que la remoción del Ca^{2+} del citosol es clave para determinar el tipo de señales que podían surgir. Determinamos que cuando el Ca^{2+} no es removido del citosol a una tasa lo suficientemente alta, la transición del RIP_3 de un estado inhibido a un estado activo lleva a una liberación inmediata de Ca^{2+} y a la propagación de una señal de baja intensidad. Investigamos luego el rol del Ca^{2+} luminal en las señales. Mientras que el rol del Ca^{2+} citoplasmático ha sido ampliamente estudiado, el rol del Ca^{2+} luminal en las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 no ha sido investigado con tanto detalle. Desarrollamos un protocolo original para usar el indicador Fluo-5N AM en ovocitos de *Xenopus laevis*. Este indicador de Ca^{2+} había sido usado para sensar Ca^{2+} luminal en otros tipos celulares pero nunca había sido usado en ovocitos. Combinando el uso del Fluo-5N AM y el de un indicador de Ca^{2+} citoplasmático cuya emisión ocurre a una longitud de onda diferente (Rhod-2) seguimos la dinámica del Ca^{2+} luminal y del Ca^{2+} citoplasmático en simultáneo durante las señales. A partir del análisis de estas observaciones, cuantificamos las tasas de liberación y de recaptura del Ca^{2+} al lumen. Determinamos que la liberación de Ca^{2+} en el citosol a través de RIP_3 s abiertos no podía explicar por sí misma la dinámica observada en

el lumen. Concluimos entonces que existe una fuente virtualmente inagotable de Ca^{2+} libre luminal que atribuimos a los buffers de Ca^{2+} luminal que muy rápidamente compensan la depleción de Ca^{2+} local que la liberación puede eventualmente producir. Esto es diferente al comportamiento observado durante la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático (RS) en miocitos. Atribuimos esta diferencia a la diferencia entre el cociente entre el área y el volumen en ambos tipos celulares. Por lo tanto, concluimos que la geometría no solamente determina la propagación de señales intracelulares de Ca^{2+} desde el lado citosólico sino también desde su contraparte luminal. Realizamos también experimentos para estudiar y comparar la dinámica espacio-temporal del Ca^{2+} luminal y citosólico. Para este fin, usamos nuevamente Fluo-5N y Rhod-2 para observar el comportamiento del Ca^{2+} en ambos reservorios simultáneamente durante una liberación de IP_3 prolongada en diferentes regiones. Estos experimentos nos permitieron explorar el acoplamiento entre regiones distantes en cada reservorio. Su análisis sugiere que el Ca^{2+} citosólico provee el mecanismo de inhibición necesario para terminar las señales. De esta forma, el Ca^{2+} citosólico parece ser el principal mecanismo de acoplamiento entre RIP_3 s tanto para la propagación inicial de las señales como para el tiempo que tardan los canales en recuperarse y permitir que pueda generarse una nueva onda global. Para estudiar el acoplamiento entre canales entre cúmulos distintos, trabajamos finalmente en un set-up alternativo para observar señales de Ca^{2+} con alta resolución temporal y espacial. A pesar de que el microscopio confocal provee seccionado óptico y alto contraste, el escaneo de la muestra en esta técnica impone una desventaja temporal. Usando un microscopio wide-field, iluminación LED y una cámara EMCCD obtuvimos una resolución axial de aproximadamente 1 micrón. Usamos este set-up para observar señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 s y obtuvimos imágenes 2D con resolución temporal similar a la de las imágenes confocales en modo line-scan (unidimensionales). Este set-up abre la posibilidad de aplicar herramientas de análisis de super-resolución a los *puffs* de Ca^{2+} en ovocitos. Este método puede ser usado para detectar señales de Ca^{2+} en 2D con alta resolución temporal y por lo tanto para estudiar el acoplamiento entre unidades de liberación dentro del cúmulo o entre cúmulos distantes.

Palabras claves: señales de Ca^{2+} intracelulares, receptores de IP_3 Ca^{2+} luminal, dinámica espacio-temporal, microscopía confocal, microscopía wide-field.

High resolution imaging of intracellular calcium signals

The calcium ion (Ca^{2+}) is used by virtually all cell types to signal processes as diverse as fertilization, neuronal communication, muscle contraction and cell death. The versatility of this messenger relies on the variety of spatio-temporal patterns that the intracellular Ca^{2+} concentration can display. Inside cells, free cytosolic Ca^{2+} is kept at very low concentrations. The signals then involve Ca^{2+} entry from the extracellular medium or Ca^{2+} release from internal stores. Among the latter, Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum (ER) through inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) receptors (IP_3Rs) plays a major role. These receptors are organized in clusters on the ER membrane and become open upon the binding of IP_3 and Ca^{2+} . Cytosolic Ca^{2+} plays a dual role on IP_3Rs leading to their opening at moderate concentrations and to their inhibition at very large ones. Therefore, Ca^{2+} released through one open IP_3R can induce the opening of neighboring ones, a mechanism that is known as *Calcium Induced Calcium Release* (CICR). In most cell types IP_3R -clusters are separated by a few microns. The intra-cluster organization is not fully known, although supposedly it could vary between situations in which IP_3Rs are tightly packed and others with larger inter-channel separations. Given that the characteristics of the resulting signals depend on CICR, the IP_3R spatial distribution plays a major role. The acquisition of high enough resolution images to infer how the Ca^{2+} -mediated coupling between IP_3Rs occurs is thus very important. Depending on the number of receptors or clusters that are involved in a release event, IP_3R -mediated Ca^{2+} signals can remain localized or become waves that propagate between clusters and, eventually, throughout the cell. Local (elementary) IP_3R -mediated Ca^{2+} signals are called *blips* or *puffs* based on whether there is only one or several simultaneously open IP_3Rs . Ca^{2+} *puffs* are the building blocks of global signals *via* CICR. The variety of signals that can arise in one cell type then depends on the interplay between the kinetics and spatial arrangement of the channels, the cytosolic Ca^{2+} level, the rate of Ca^{2+} release and the Ca^{2+} -trapping or removing mechanisms at work. The aim of the Thesis is to unveil some of the properties of these mechanisms and of their interplay.

In this Thesis we have combined experiments, their analysis and the development of mathematical models to obtain a detailed description of different aspects that shape the coupling between elementary Ca^{2+} release events. This is particularly important given that the process from local to global signals (or spikes) is key for the determination of the inter-spike time intervals. It is believed that information is encoded in the frequency of these spikes. Thus, our object of study is directly implicated on the ability of Ca^{2+} to

convey the message it transports. To study IP_3R -mediated Ca^{2+} signals experimentally, we used the *Xenopus laevis* oocyte as model system. This is an advantageous model, among other things, because Ca^{2+} is released from the ER exclusively through IP_3Rs . The experiments involved the observation of the Ca^{2+} signals using different fluorescent Ca^{2+} dyes (both cytosolic and luminal), exogenous buffers and caged- IP_3 that was photo-released inside the cells to induce the IP_3R openings. To monitor changes in the fluorescence, we used multispectral confocal microscopy and wide-field microscopy. For the modeling we used both stochastic and deterministic descriptions depending on the aspects that we tried to describe.

We first investigated the size of Ca^{2+} release events observed in immature *Xenopus laevis* oocytes. The *puff* amplitude distribution obtained was not Gaussian with a noticeable fraction of large size events. The *puff* area distribution displayed a long tail and could be fitted with a power law relationship. This power law behavior was also encountered within a simple model that included some coupling among individual signals for a wide range of parameter values. An analysis of the model showed that a global elevation of the Ca^{2+} concentration plays a major role in determining whether the event size distribution is long-tailed or not. This suggested that Ca^{2+} clearing from the cytosol is key to determine the kind of signals that can arise. We determined that when Ca^{2+} is not removed from the cytosol at a sufficiently high rate, the transition from the inhibited to the active state of an IP_3R leads to the immediate release of Ca^{2+} and to the propagation of a low intensity signal. We then studied the role of luminal Ca^{2+} on the signals. While the role of cytosolic Ca^{2+} had been studied at large, the role of luminal Ca^{2+} on IP_3R -mediated Ca^{2+} signals had not been investigated with that much detail. We developed an original protocol to use Fluo-5N AM in *Xenopus laevis* oocytes. This Ca^{2+} dye had been used to monitor luminal Ca^{2+} in other cell types but had never been used in oocytes. Combining the use of Fluo-5N AM and of a cytosolic Ca^{2+} dye which fluorescence peaks at a different wavelength (Rhod-2) we monitored the dynamics of luminal and cytosolic Ca^{2+} simultaneously during signals. From the analysis of these observations we quantified the rates of Ca^{2+} release and re-uptake in the lumen. We determined that the release of Ca^{2+} into the cytosol through open IP_3Rs could not account by itself for the dynamics observed in the lumen. We then concluded that there is an almost inexhaustible source of free luminal Ca^{2+} which we attribute to luminal Ca^{2+} buffers that very fast replenish the local Ca^{2+} depletion that the release can eventually produce. This is dissimilar to the behavior observed during the release of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum (SR) in myocytes. We attributed this difference to the different volume to area ratio in both cell types. Thus, we then concluded that geometry not only shapes the propagation of intracellular Ca^{2+} signals from the cytosolic side but also from its luminal counterpart. We also performed experiments to

study and compare the spatio-temporal dynamics of luminal and cytosolic Ca^{2+} . To this end, we again used Fluo-5N AM and Rhod-2 to observe the behavior of Ca^{2+} in both reservoirs simultaneously during sustained IP_3 photo-release in different regions. These experiments allowed us to explore the coupling between distant regions in each reservoir. Their analysis suggests that cytosolic Ca^{2+} provides the inhibitory mechanism needed to terminate the signals. In this way, cytosolic Ca^{2+} seems to be the main IP_3R -coupling mechanism both for the initial propagation of the signals and for the time it takes for the channels to recover and allow a new global wave to be elicited. In order to study the inter-channel coupling at the inter-cluster level, we finally worked on an alternative set-up to observe Ca^{2+} signals with high temporal and spatial resolution. While the confocal microscope provides optical sectioning and high contrast, the scanning of the sample needed in this technique imposes a temporal disadvantage. Using a wide-field microscope, LED illumination and an EMCCD camera we obtained an axial resolution of approximately 1 micron. We used this set-up to observe IP_3R -mediated Ca^{2+} signals obtaining two-dimensional images of similar temporal resolution as line-scan (e.g., one dimensional) confocal images. The set-up then opens up the possibility of applying super-resolution analyses tools to Ca^{2+} *puffs* in oocytes. This method can be used to detect Ca^{2+} signals in 2D with high temporal resolution and therefore to study coupling between release units within the cluster and between distant clusters.

Keywords: intracellular Ca^{2+} signals, IP_3 receptors, luminal Ca^{2+} , spatio-temporal dynamics, confocal microscopy, wide-field microscopy.

A Gonza y Anita, mis amores.

Agradecimientos

Durante el tiempo que realicé este trabajo aprendí muchísimo y además la pasé muy bien. Quiero agradecerle por esto, en primer lugar, a Silvina por ayudarme siempre, por abrirme puertas, por motivarme y por tenerme paciencia. Cierro esta etapa feliz y convencida de que no pude haber elegido mejor directora de tesis.

Gracias a mis compañeras de trabajo y amigas Ceci y Estefi por su ayuda, por los mates juntas y por el empuje constante. Cada una a su manera hizo grandes aportes a este trabajo y contribuyó a que las largas horas en el laboratorio fueran alegres y productivas.

Quiero agradecerle también a Emi, María Laura, Lía, Lore, Hernán, Pablo y Rocío que siempre me dieron una mano cuando la necesité.

Además de la gente directamente involucrada en el desarrollo de este trabajo, quiero decirle gracias a los que siempre me ayudan y me bancan. A Gonzalo por cuidarme y por nunca perder la calma ni la sonrisa. A Anita porque es todo lo que está bien en este mundo. A Betty, mi ejemplo de mujer, madre y profesional que con su energía y amor nos ilumina a todos los que la rodeamos. A Paula, la mejor compañera de vida que me pudo tocar. A mi querida abuela Estrella por no aflojar nunca. A la familia que elijo todos los días: Luji, Barbi, Luba, Ire y Milio.

Finalmente, quiero agradecerle a dos personas muy importantes y que quiero muchísimo. Ale y Oscar, los mejores suegros del mundo, porque sin ellos este trabajo no existiría.

Índice general

Resumen	I
Abstract	IV
Agradecimientos	VIII
1. Introducción	1
1.1. Un mecanismo universal de señalización	1
1.2. Dinámica del Ca^{2+} intracelular	2
1.2.1. El receptor de IP_3	3
1.2.2. Influencia del Ca^{2+} citosólico	4
1.2.3. Influencia del Ca^{2+} luminal	4
1.3. Distintos tipos de señales	5
1.3.1. Eventos elementales	6
1.3.2. Eventos globales	6
1.3.3. Estocasticidad y acoplamiento	6
1.3.4. Codificación en frecuencia	8
1.4. Observación experimental de señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s	9
1.4.1. El ovocito de <i>Xenopus laevis</i> como célula modelo	9
1.4.2. Indicadores fluorescentes	10
1.4.3. Microscopía de fluorescencia	10
1.4.4. Compuestos enjaulados	13
1.5. Esquema de la Tesis	13
2. Rol del Ca^{2+} citosólico en la propagación de señales	15
2.1. Resumen	15
2.2. Marco general y motivación	16
2.3. Experimentos de adquisición de <i>puffs</i>	17
2.4. Modelos Matemáticos	18
2.4.1. Dinámica intra-cúmulo	19
2.4.2. Dinámica inter-cúmulo sin acumulación de Ca^{2+}	19
2.4.3. Dinámica inter-cúmulo con acumulación de Ca^{2+}	20
2.5. Propagación intra-cúmulo e inter-cúmulo usando un modelo simple	22
2.6. Resultados experimentales	24
2.7. La acumulación de Ca^{2+} y la inhibición de los RIP_3s puede llevar a una distribución tipo ley de potencias	25
2.8. El Ca^{2+} citosólico provee un mecanismo de acoplamiento global que altera la distribución de tamaños de señales.	27

2.9. Discusión	30
3. Observación del Ca^{2+} luminal y caracterización de la geometría intracelular	34
3.1. Resumen	34
3.2. Marco general y motivación	35
3.3. Uso del indicador Fluo-5N AM para sensar Ca^{2+} luminal	36
3.3.1. Carga del Fluo-5N AM en el RE	36
3.3.2. Control con <i>buffers</i> citosólicos	37
3.3.3. Control con IP_3 enjaulado	39
3.4. Imágenes estacionarias de las distintas estructuras del ovocito	41
3.4.1. Citosol y lumen del RE	41
3.4.2. Membrana y lumen del RE	43
3.4.3. Estimación de áreas y volúmenes intracelulares	44
3.5. Estimación de la recarga del Ca^{2+} luminal	45
3.5.1. Experimentos de liberación de Ca^{2+} prolongada	45
3.5.2. Modelo simple para la recarga del Ca^{2+} en el RE	47
3.5.3. Estimación del flujo de recarga	48
3.6. Discusión	49
4. Dinámica del Ca^{2+} luminal y citosólico durante el inicio de la liberación de Ca^{2+} a través de los RIP_3s	52
4.1. Resumen	52
4.2. Marco general y motivación	53
4.3. Observación simultánea de la dinámica del Ca^{2+} luminal y citosólico durante una liberación	54
4.3.1. Experimentos de liberación prolongada	54
4.3.2. Variación de la fluorescencia de los indicadores luminal y citosólico durante una liberación de Ca^{2+}	55
4.4. Modelo para las variaciones de Ca^{2+} y la fluorescencia	57
4.4.1. Dinámica del Ca^{2+} a ambos lados de la membrana del RE durante una liberación mediada por RIP_3s	57
4.4.2. Variaciones de la fluorescencia	59
4.5. Cuantificación de los flujos de Ca^{2+} a ambos lados de la membrana del RE	61
4.5.1. Aplicación del modelo para interpretar los resultados experimentales	62
4.5.2. Chequeo de consistencia del modelo	65
4.6. Discusión	65
5. Dinámica espacio-temporal del Ca^{2+} luminal y citosólico durante señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s	68
5.1. Resumen	68
5.2. Marco general y motivación	69
5.3. Experimentos de fotoliberación prolongada de intensidad variable	70
5.3.1. Descripción de los experimentos	70
5.3.2. Variación de la respuesta frente a distintos estímulos	71
5.4. Estudio de los <i>spikes</i> de Ca^{2+}	73
5.4.1. Análisis del intervalo entre <i>spikes</i>	73
5.4.2. Influencia de la liberación inicial sobre el <i>ISI</i>	75

5.4.3. Tiempo de inicio de los <i>spikes</i>	76
5.5. Homogeneización espacial del Ca^{2+} luminal	77
5.6. Discusión	80
6. Obtención y procesamiento de imágenes wide-field para la observación de señales de Ca^{2+} con alta resolución temporal y seccionado tipo confocal	82
6.1. Resumen	82
6.2. Marco general y motivación	83
6.3. Modificación del microscopio wide-field	84
6.3.1. Cambio en la iluminación	84
6.3.2. Detección de la fluorescencia	85
6.4. Resolución espacial del microscopio wide-field	86
6.4.1. Método para adquirir la PSF experimental	86
6.4.2. Resolución lateral	87
6.4.3. Resolución axial	87
6.5. Imágenes estáticas	88
6.5.1. Métodos de procesamiento de imágenes	89
6.5.1.1. Aplicación de un umbral a partir del análisis de la distribución de intensidades	89
6.5.1.2. Aplicación de un filtro pasabanda	90
6.5.2. Imágenes procesadas de estructuras internas del ovocito	90
6.5.2.1. Observación del Ca^{2+} citosólico	91
6.5.2.2. Observación de la membrana del RE	91
6.6. Detección de señales intracelulares de Ca^{2+}	92
6.6.1. Experimentos de adquisición de señales de Ca^{2+} con el set-up wide-field	92
6.6.2. Procesamiento de imágenes de señales y método de detección automática de eventos breves de liberación de Ca^{2+}	95
6.7. Discusión	97
7. Conclusiones	99
A. Materiales y métodos	103
A.1. Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	103
A.1.1. Obtención de las células	103
A.1.2. Mantenimiento y selección de las células	104
A.1.3. Micro-inyección de los compuestos en las células	106
A.1.4. Uso de las células	106
A.2. Compuestos utilizados	106
A.2.1. Indicadores de Ca^{2+} citosólico	107
A.2.2. Indicador de Ca^{2+} luminal	108
A.2.3. Marcador de membrana del RE	108
A.2.4. IP_3 enjaulado	109
A.2.5. <i>Buffers</i> de Ca^{2+} exógenos	109
A.3. Microscopía confocal	110

A.3.1. El microscopio	110
A.3.2. Iluminación y detección	111
A.3.3. Modos de adquisición	112
B. Análisis de las imágenes	113
B.1. Fluorescencia media, fluorescencia basal y normalización	113
B.1.1. Imágenes 2D	113
B.1.2. Imágenes 2D wide-field	114
B.1.3. Line-scans	114
B.2. Separación de los canales de fluorescencia	115
C. Abreviaturas utilizadas	116
 Bibliografía	 117

Capítulo 1

Introducción

1.1. Un mecanismo universal de señalización

Se dice que el calcio (Ca^{2+}) es una señal de vida y muerte ya que está involucrado en procesos extremadamente diversos como los que se disparan al inicio y al final de la vida de las células [1]. El Ca^{2+} actúa como mensajero a nivel intracelular e intercelular garantizando la comunicación de las células con el medio que las rodea. Las células utilizan los cambios en la concentración de Ca^{2+} como señales. Este mecanismo de señalización es responsable de la regulación de procesos muy distintos: contracción muscular [2], secreción de vesículas de neurotransmisor durante una sinapsis [3] y secreción de insulina [4] entre muchos otros. Para disparar procesos tan diversos, el mecanismo de señalización de Ca^{2+} de una célula debe ser versátil [5, 6]. Esto significa que la célula puede generar e interpretar mensajes codificados en señales de Ca^{2+} que abarcan escalas espacio-temporales variadas dependiendo del proceso.

Las señales intracelulares de Ca^{2+} , en particular, son eventos transitorios durante los cuales la concentración citosólica de Ca^{2+} se eleva. Estos eventos pueden durar desde algunos milisegundos [7] hasta varios minutos en el caso de ondas repetitivas que se propagan a través de la célula [8]. Se sabe que niveles elevados de Ca^{2+} en el citosol pueden ser tóxicos y hasta disparar la muerte celular programada o apoptosis [9]. Es por este motivo que la célula posee distintos mecanismos para controlar el nivel de Ca^{2+} citosólico y mantenerlo a concentraciones relativamente bajas. Esto también explica por qué las elevaciones intracelulares de Ca^{2+} suelen aparecer en forma de pulsos y no como elevaciones prolongadas. Es por lo tanto muy relevante estudiar la dinámica del Ca^{2+} intracelular tanto desde lo experimental como desde el modelado. Para entender cómo se generan estas señales y qué factores las moldean en espacio y tiempo es importante analizar los componentes que actúan a nivel intracelular en la regulación del Ca^{2+} .

1.2. Dinámica del Ca^{2+} intracelular

El Ca^{2+} puede ingresar al citosol desde el medio extracelular a través de canales que se encuentran anclados en la membrana plasmática (MP) o puede ser liberado desde organelas intracelulares que funcionan como reservorios de Ca^{2+} . La liberación de Ca^{2+} desde reservorios internos como el retículo endoplasmático (RE) o el retículo sarcoplasmático (RS) en el caso de células musculares es una característica universal de las señales de Ca^{2+} [10]. Esta liberación está principalmente mediada por dos grandes familias de canales: los receptores de rianodina (o RRis) y los receptores de inositol (1,4,5)-trifosfato (o receptores de IP_3). Cuando estos receptores se abren, el Ca^{2+} fluye desde el RE (o el RS) al citosol a favor de su gradiente puesto que en el RE (y en el RS) las concentraciones de Ca^{2+} pueden ser del orden del micromolar hasta el milimolar mientras que en el citosol las concentraciones de Ca^{2+} son del orden del nanomolar [11].

Existen también distintos mecanismos de remoción del Ca^{2+} del citosol. Los canales en la MP como las bombas en las membranas de los reservorios intracelulares se encargan de sacar el Ca^{2+} del citosol garantizando así que la concentración de Ca^{2+} citosólica vuelva a su nivel basal. El mecanismo más rápido de disminución de la concentración de Ca^{2+} citosólica es la interacción con *buffers*, típicamente, proteínas, que pegan y despegan los iones modificando su concentración libre. La dinámica del Ca^{2+} intracelular comprende por lo tanto el transporte a través de la MP (desde el medio extracelular), la liberación y el reingreso del Ca^{2+} desde los reservorios internos y la interacción con los distintos *buffers*. Se sintetizan en el esquema de la Fig. 1.1 los principales mecanismos de ingreso y remoción de Ca^{2+} en una célula.

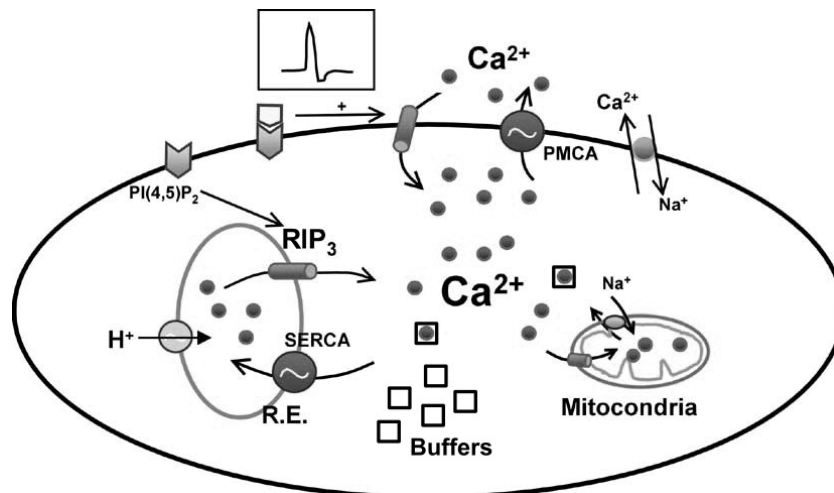


Figura 1.1: Principales elementos involucrados en el mecanismo de señalización de Ca^{2+} . Mecanismos de entrada de Ca^{2+} : desde los reservorios intracelulares como el RE (o SR) o la mitocondria o abriendo canales de Ca^{2+} de la MP. Mecanismos de remoción: bombas o intercambiadores de la membrana plasmática (PMCA, Na^+ - Ca^{2+}) o bombas de los reservorios (SERCA).

En esta tesis se investigaron distintos aspectos de la liberación intracelular de Ca^{2+} mediada por los receptores de IP_3 (RIP_3s). Los RIP_3s constituyen el blanco citosólico primario para el inicio de las señales intracelulares de Ca^{2+} [12]. Su estudio, por lo tanto es de gran interés. Se describen a continuación las características principales de estos receptores. Se presentan luego los distintos factores que afectan la liberación de Ca^{2+} mediada por RIP_3s y cómo esto da lugar a una gran variedad de patrones de liberación.

1.2.1. El receptor de IP_3

El receptor de IP_3 (o RIP_3) es un canal intracelular de liberación de Ca^{2+} . La apertura del canal es un proceso estocástico, por lo que se habla de probabilidad de apertura del RIP_3 [13]. Se sabe que el IP_3 , ligando fisiológico del RIP_3 , tiene un efecto de activación sobre el receptor. Como se puede ver en el gráfico de la Fig. 1.2 A (obtenido por los autores de [14]) la probabilidad de apertura del canal, P_0 , aumenta hasta una saturación al aumentar la concentración de IP_3 .

Se descubrió que el Ca^{2+} citosólico es también un regulador de la cinética del RIP_3 [15]. Se muestra en la Fig. 1.2 B el gráfico experimental obtenido por los autores de [16] para P_0 al aumentar la concentración de Ca^{2+} para distintas concentraciones de IP_3 . En presencia de bajas concentraciones de Ca^{2+} citosólico, aumenta la probabilidad de apertura del canal mientras que para concentraciones altas disminuye.

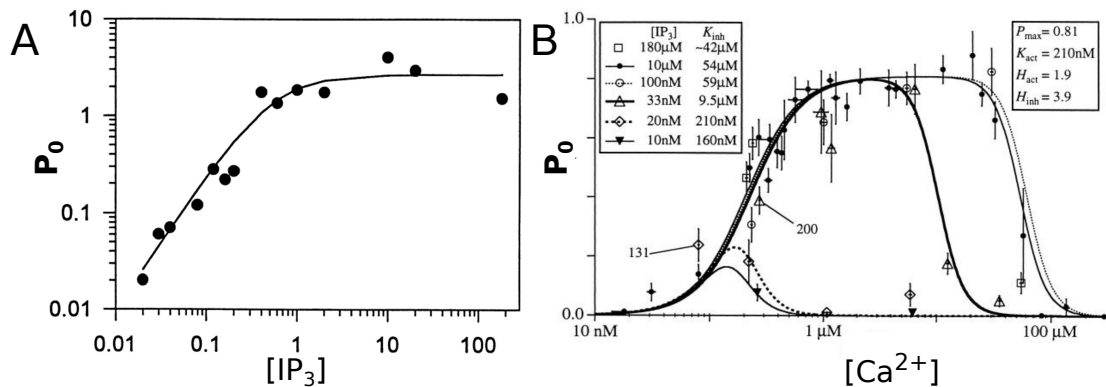


Figura 1.2: Probabilidad de apertura del RIP_3 . **A:** Al variar la concentración de IP_3 . **B:** En función de la concentración de Ca^{2+} citosólico para distintas concentraciones de IP_3 .

Los RIP_3s se encuentran sobre la membrana del RE pero su distribución no es homogénea. Se sabe que los receptores están densamente empaquetados en cúmulos [17]. Estos cúmulos contienen aproximadamente entre 20 y 30 receptores cada uno. Si bien la distribución de cúmulos es aleatoria se ha estimado una distancia media entre cúmulos

de algunos micrones [18]. Se estima que los cúmulos de receptores de IP_3 tienen un tamaño de alrededor de 500 nm de lado [19].

1.2.2. Influencia del Ca^{2+} citosólico

Como ya se mencionó, el propio Ca^{2+} citosólico modula la liberación a través de los RIP_3 s. En presencia de IP_3 , la probabilidad de apertura del RIP_3 es modulada por el Ca^{2+} citosólico. Bajas concentraciones de Ca^{2+} citosólico causan la activación del RIP_3 s mientras que concentraciones altas causan su inhibición. Esta regulación bifásica por parte del Ca^{2+} citosólico sugiere que existen al menos dos sitios de unión para el Ca^{2+} citosólico en el receptor, uno, de mayor afinidad, que induce la apertura del canal y otro, de menor, que induce su cierre como se ha propuesto en [20].

Cuando se abre un RIP_3 , el Ca^{2+} liberado puede difundir hacia los canales vecinos e inducir la apertura de los receptores con IP_3 pegado. Este proceso auto-amplificativo se conoce como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} [21] (CICR del inglés *Calcium Induced Calcium Release*). Para que este acoplamiento entre canales y eventualmente entre cúmulos de canales ocurra, el Ca^{2+} debe poder difundir entre ellos. En el citosol, sin embargo, se sabe que la mayoría del Ca^{2+} no se encuentra libre sino que está ligado a grandes proteínas móviles o inmóviles. Estos compuestos se conocen como *buffers* de Ca^{2+} y representan la forma más rápida de reducir la concentración de Ca^{2+} en el citosol [22]. Distintos *buffers* atrapan Ca^{2+} con diferentes afinidades y cinéticas. La presencia de estos *buffers* afecta por lo tanto las escalas temporales y las distancias a las que puede difundir libremente el Ca^{2+} antes de ser capturado.

1.2.3. Influencia del Ca^{2+} luminal

El RE es el principal reservorio de Ca^{2+} en la mayoría de las células. Se denomina lumen del RE a su espacio interno y por ende, Ca^{2+} luminal al Ca^{2+} contenido en este reservorio. Dentro del RE la concentración de Ca^{2+} es alta, desde las decenas de μM hasta el mM. Esta alta concentración de Ca^{2+} luminal es necesaria para poder tener liberaciones de Ca^{2+} rápidas. Se sabe que gran parte del Ca^{2+} luminal no se encuentra libre dentro del RE sino que está ligado a *buffers* luminales como la calsecuestrina en el caso de células musculares y la calreticulina en células no musculares [11]. En las células musculares, se cree que la rápida disociación del Ca^{2+} de la calsecuestrina (*buffer* luminal de baja afinidad, $K_D = 1\text{mM}$) probablemente previene grandes depleciones del Ca^{2+} luminal que podrían frenar el proceso de liberación de Ca^{2+} . Los *buffers* luminales no sólo almacenan Ca^{2+} sino que también afectan sus propiedades difusivas.

Mientras que la influencia del Ca^{2+} citosólico sobre el receptor de IP_3 fue ampliamente estudiada, la influencia que tiene el Ca^{2+} luminal sobre este receptor sigue siendo incierta. Existen modelos del receptor de IP_3 que proponen la existencia de un sitio de ligadura para el Ca^{2+} luminal [23], es decir, del lado de adentro de la membrana del RE. Estos modelos tienen en cuenta la concentración de Ca^{2+} luminal y citosólica para calcular la probabilidad de apertura del canal. En [24], se formula un modelo que acopla las dinámicas del Ca^{2+} citosólico y luminal con las de la apertura estocástica del canal.

La liberación de Ca^{2+} desde el RE no solo aumenta la concentración de Ca^{2+} citosólico sino que también genera un microdominio luminal en donde la concentración de Ca^{2+} podría verse disminuida (una depleción local) dependiendo de la relación entre las tasas de remoción y de reposición local del Ca^{2+} luminal. Esto podría ocasionar entonces, una disminución en la fuerza electro-química que impulsa al ion desde el lumen del retículo al citosol y una correspondiente disminución en el flujo de Ca^{2+} a través del canal. Otro proceso que puede influenciar la dinámica de liberación de Ca^{2+} es la velocidad a la que se recupera el nivel de Ca^{2+} en el lumen luego de un vaciamiento. Los autores de [24] proponen en base a sus simulaciones que el vaciamiento de Ca^{2+} en regiones espacialmente localizadas del RE asociadas con receptores de IP_3 puede ser uno de los mecanismos de terminación de los puffs. En [25] se habla también de un sitio para Ca^{2+} luminal en el RIP_3 y se apoya la idea de que cambios en la concentración de Ca^{2+} luminal afectan la dinámica del receptor. La dinámica de vaciamiento del Ca^{2+} luminal podría tener entonces influencia significativa en la apertura estocástica de los canales.

1.3. Distintos tipos de señales

El comportamiento dual del RIP_3 respecto del Ca^{2+} citosólico junto con la distribución espacial de los RIP_3 s y las propiedades difusivas del citosol dan origen a una gran variedad posible de señales intracelulares de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 s. Se habla de un continuo de señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 s [26]. Se pueden clasificar las señales por su tamaño es decir, por la cantidad de RIP_3 s involucrados durante una liberación. Si se abre un único RIP_3 o si se abren unos pocos RIP_3 s dentro de un único cúmulo, la liberación de Ca^{2+} será breve y muy localizada, por lo que se considera como un evento elemental de señalización. Si, en cambio, se libera Ca^{2+} desde muchos cúmulos que son reclutados progresivamente se puede tener una señal más global de Ca^{2+} .

1.3.1. Eventos elementales

Cuando un RIP_3 se abre, se forma un microdominio en donde la concentración de Ca^{2+} es muy alta durante un lapso de tiempo ya que luego de que el canal se cierra, este microdominio se disipa rápidamente por difusión. Estos eventos unitarios representan los bloques fundamentales de la señalización de Ca^{2+} . Esta apertura unitaria (denominada *blip* de Ca^{2+}) puede ocasionar a su vez la apertura de otros canales dentro del mismo cúmulo a través del mecanismo de CICR. A este tipo de eventos localizados que pueden involucrar la apertura de más de un RIP_3 dentro de un cúmulo se los conoce como *puffs* de Ca^{2+} [21]. Un *puff* permanece localizado si los cúmulos vecinos son lo suficientemente insensibles como para responder al Ca^{2+} difundiendo entre los cúmulos o si el Ca^{2+} no llega a difundir a estos vecinos. Los *puffs* muestran por lo tanto una gran variabilidad ya que, según la cantidad de RIP_3 s que se activen, pueden tener más amplitud espacial y temporal. Existen eventos análogos a los *puffs* donde el Ca^{2+} es liberado a través de los RR s llamados *sparks* [7].

1.3.2. Eventos globales

Las señales globales de Ca^{2+} surgen de la suma y coordinación de eventos elementales. Para que los sitios de liberación de eventos elementales de Ca^{2+} puedan producir respuestas globales, los canales individuales deben comunicarse entre ellos. Un evento global puede regenerarse dando así origen a ondas repetitivas de Ca^{2+} . El Ca^{2+} liberado en el sitio iniciador puede difundir a los RIP_3 s en clusters vecinos e ir activándolos progresivamente si no están inhibidos. De esta forma los eventos elementales pueden cooperar para generar un onda de Ca^{2+} que puede viajar a través de la célula. Las ondas aparecen como elevaciones de la concentración de Ca^{2+} intracelular que abarcan toda la célula. La relación entre el volumen de la célula y la longitud de onda determinará si se establecen patrones espaciales. Si las ondas ocurren de forma periódica, se generarán oscilaciones globales de la concentración intracelular de Ca^{2+} . Se han observado distintos patrones para estas oscilaciones como por ejemplo ondas planas, ondas espirales y ondas tipo “target” [27].

1.3.3. Estocasticidad y acoplamiento

Un RIP_3 se abre y se cierra de forma aleatoria. Este comportamiento estocástico se manifiesta en la existencia de eventos de liberación espontáneos a través de un único canal o de varios canales dentro de un cúmulo como los *blips* y los *puffs*. Como ya se mencionó, el Ca^{2+} funciona como estímulo de su propia liberación ya que a medida que es

liberado desde los RIP_3 s puede inducir la apertura de RIP_3 s vecinos dentro del mismo cúmulo o en cúmulos distantes. La influencia dual del Ca^{2+} citosólico sobre el RIP_3 junto con la organización espacial en cúmulos de los RIP_3 s son factores cruciales para establecer los patrones de liberación de Ca^{2+} que se pueden generar a partir de un evento elemental [28]. Si la concentración de IP_3 es baja, las unidades de liberación individuales funcionan de forma autónoma ya que los receptores necesitan tener IP_3 ligado para ser activados por Ca^{2+} . En este caso, los eventos de liberación permanecerán localizados [21, 26]. A altas concentraciones de IP_3 , los receptores pueden acoplarse por CICR a partir de una liberación inicial elemental. De esta forma, el citosol se convierte en un medio excitable en el cual pueden propagarse ondas de Ca^{2+} a partir de un evento inicial localizado gracias al CICR [18, 29]. Se ilustra este proceso en el esquema de la Fig. 1.3 en donde se muestra como cambia el tipo de evento que puede ocurrir dependiendo del nivel de IP_3 . A baja concentración de IP_3 , pocos receptores están activados (en color verde en el esquema) y pueden ocurrir *blips*, es muy poco probable el acoplamiento intra-cúmulo como se muestra en el panel superior de la Fig. 1.3. Si varios RIP_3 s en un mismo cúmulo están activados se pueden tener *puffs*. Al aumentar la concentración de IP_3 , se acoplan sitios en distintos cúmulos y la liberación a través de un cúmulo puede propagarse a cúmulos vecinos y generar así una onda de Ca^{2+} como se ve en el panel inferior de la Fig. 1.3.

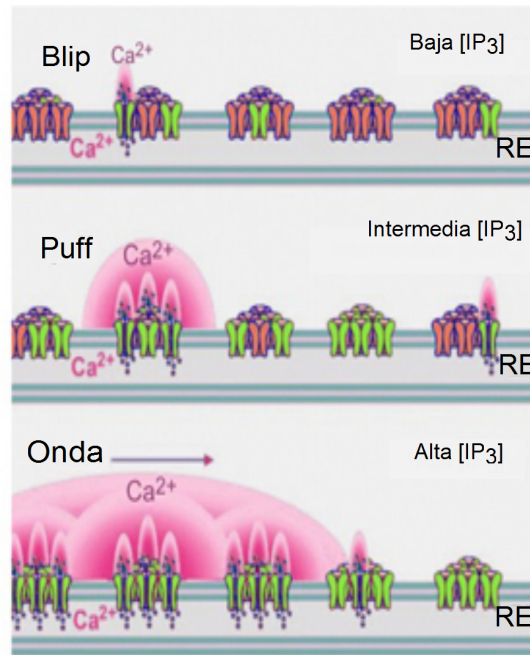


Figura 1.3: Influencia de los niveles de IP_3 en la CICR. A baja $[\text{IP}_3]$ los canales funcionan desacoplados (panel superior), a $[\text{IP}_3]$ media se observa CICR a nivel intra-cúmulo (panel medio) y a $[\text{IP}_3]$ alta existe acoplamiento entre cúmulos (panel inferior). Se indican en verde los RIP_3 s activados que pueden abrirse.

Por otro lado, se sabe que demasiado Ca^{2+} en el citosol puede inhibir a los canales evitando la propagación de una señal. Una vez que la onda se esparció por el citoplasma, la liberación se detiene y el Ca^{2+} debe ser rápidamente removido por dos mecanismos: extrusión de la célula o re-absorción en los reservorios de Ca^{2+} intracelulares.

1.3.4. Codificación en frecuencia

Frente a un estímulo continuo las señales intracelulares globales que involucran la liberación de Ca^{2+} desde el RE a través de RIP_3s pueden repetirse periódicamente. Si sólo se presta atención a la dependencia temporal de la concentración citosólica promediada sobre toda la célula, estas repeticiones se manifiestan como trenes de pulsos. Este tipo de oscilaciones de Ca^{2+} está presente en numerosos tipos celulares y proveen un modo eficiente de transmitir información [1]. Su frecuencia puede variar entre las decenas de Hz en neuronas y las decenas de mHz en células no excitables [30]. En varias ocasiones la frecuencia es proporcional a la intensidad del estímulo [31]. Justamente, se supone que hay información contenida en la frecuencia. La decodificación de esta información es realizada por enzimas que pueden pegar Ca^{2+} en múltiples sitios como la Ca^{2+} -calmodulina quinasa II (CaMKII) [32]. En muchas células, sin embargo, los trenes de pulsos de Ca^{2+} tienen un alto componente estocástico [33]. Esto es así dado que los pulsos surgen a partir de la nucleación de ondas [34]. ¿Cómo hacen las células entonces para decodificar de modo reproducible los estímulos externos codificados en el “período” de los pulsos? Esta pregunta dio lugar a varios trabajos que investigaron la estocasticidad de los trenes de pulsos [34, 35]. En particular en [34] encontraron que el tiempo entre pulsos tiene una componente estocástica que es responsable del 75 % del desvío respecto del valor medio y una componente determinista responsable del otro 25 %. Esto se refleja en que la relación entre el desvío standard y el valor medio es una función lineal de pendiente menor a 1. De acuerdo a los autores esto es lo que permite poder codificar información en frecuencia. La pendiente y, por lo tanto, el contenido de información que puede transmitir la secuencia de pulsos, depende de la tasa de recuperación global: luego de un pulso debe pasar un tiempo mínimo para que la célula se “recupere” y pueda ocurrir una nueva señal global. ¿Cuál es el mecanismo que más influye sobre este tiempo de recuperación? En [35] se proponen el vaciamiento del RE, la degradación del IP_3 y la fosforilación de los RIP_3s como posibles candidatos a regular dicho tiempo. Las investigaciones que se presentan en esta tesis ayudan a contestar esta pregunta.

1.4. Observación experimental de señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s

Si bien se sabe que las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s en las células ocurren en respuesta a estímulos externos, este proceso puede ser lento y no se tiene un control preciso de su inicio. Para estudiar experimentalmente las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s es necesario poder evocar de forma controlada las señales. Una forma de hacer esto es provocar la apertura de los RIP_3s liberando IP_3 enjaulado en el interior de la célula. Por otro lado, para detectar variaciones en la concentración intracelular de Ca^{2+} se pueden utilizar indicadores fluorescentes de Ca^{2+} y microscopía óptica. Se describen a continuación los principios básicos de esta técnica para evocar y detectar señales y las células en las cuales se aplicó: los ovocitos de *Xenopus laevis*.

1.4.1. El ovocito de *Xenopus laevis* como célula modelo

Se han utilizado distintos tipos celulares para estudiar las señales de Ca^{2+} : miocitos [36], células HeLa [37], ovocitos de *Xenopus laevis* [38] entre otras. Los ovocitos de *Xenopus laevis* presentan dos características que los hacen particularmente apropiados para el estudio de las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s : su tamaño y la especificidad de sus canales de Ca^{2+} intracelulares. Al ser células grandes (hasta 1.3 mm de diámetro y 1 μL de volumen), como se puede ver en la fotografía de la Fig. 1.4, su manipulación experimental es sencilla. Los ovocitos tienen además la particularidad de que la liberación intracelular de Ca^{2+} se produce exclusivamente a través de receptores de IP_3 mientras que en otras células, esta liberación se produce también a través de RRis . Los ovocitos son, por lo tanto, un sistema ideal para estudiar señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s [26, 18, 28].

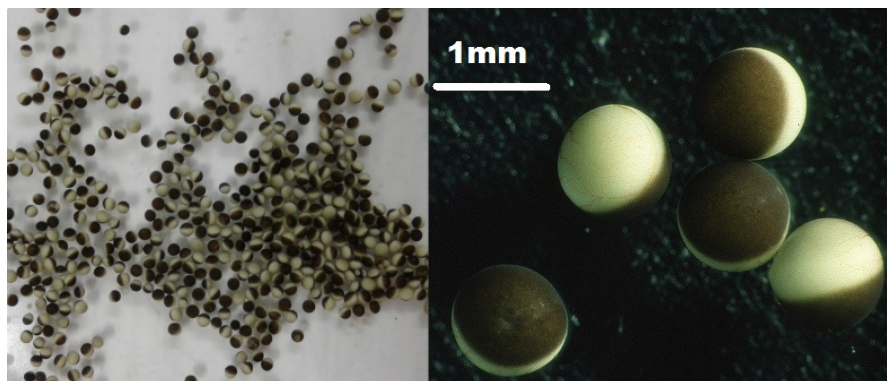
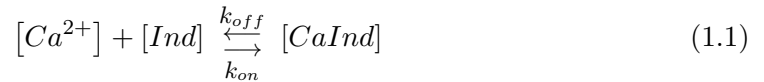


Figura 1.4: Fotografía de ovocitos de *Xenopus laevis* y zoom de algunos ovocitos con escala.

Como se puede ver en las fotografías de la Fig. 1.4, los ovocitos son células polarizadas que presentan un hemisferio animal (más oscuro pues concentra la mayoría de los gránulos de pigmento) y un hemisferio vegetal. La polarización no solo se traduce en el aspecto exterior sino también en la morfología interna de la célula. Se ha mostrado que la mayoría del RE y por lo tanto de los RIP_3 s están concentrados en el hemisferio animal [39].

1.4.2. Indicadores fluorescentes

Los indicadores fluorescentes (o fluoróforos) son moléculas que pueden ser excitadas a estados energéticos superiores absorbiendo energía en forma de luz y que luego decaen a su estado fundamental emitiendo luz de una longitud de onda superior a la luz absorbida. Todos los indicadores están caracterizados por su espectro de excitación y su espectro de emisión. Ambos espectros presentan picos que corresponden a la máxima absorción y la máxima emisión del fluoróforo. Existen indicadores específicos que sirven para marcar Ca^{2+} dentro de las células y seguir su dinámica. Estos fluoróforos de Ca^{2+} se pueden clasificar en dos grandes categorías: las proteínas fluorescentes genéticamente codificadas y los indicadores químicos. En esta tesis se trabajó con indicadores químicos que fueron diseñados para la investigación del Ca^{2+} en el citosol y en las distintas organelas celulares [40]. Los indicadores químicos de Ca^{2+} están contruidos a partir de *buffers* de Ca^{2+} modificados para aumentar considerablemente su fluoreescencia al ligar Ca^{2+} . Como toda reacción química, la reacción entre el indicador y el Ca^{2+} tiene una cinética que puede modelarse con la Eq. 1.1.



$$K_d = k_{off}/k_{on} \quad (1.2)$$

La constante de disociación K_d describe cuán fuertemente se liga un indicador a un ion de Ca^{2+} . La K_d tiene unidades de molar y corresponde a la concentración a la cual la mitad de las moléculas del indicador están ligadas a Ca^{2+} en el equilibrio [40]. Según cual sea el valor de la $[Ca^{2+}]$ que se quiera medir, se deberá elegir el indicador con la K_d adecuada.

1.4.3. Microscopía de fluorescencia

Para excitar al indicador y adquirir su emisión se utiliza un microscopio de fluorescencia. En estos microscopios, la luz procedente de la fuente (en general una lámpara de

mercurio o xenón), atraviesa un primer filtro (filtro de excitación) que selecciona la longitud de onda necesaria para excitar al fluoróforo antes de incidir sobre la muestra. Esta luz se refleja en un espejo dicróico e incide sobre la muestra, excitando al fluoróforo. La luz emitida por el fluoróforo atraviesa el espejo dicróico y llega a un segundo filtro (filtro de emisión) que selecciona la longitud de onda de emisión del fluoróforo. Finalmente, la luz ingresa a un detector (fotomultiplicador) que la convierte en una señal eléctrica. Los filtros de excitación y emisión y el espejo dicróico suelen estar dentro de un cubo armado específicamente para el fluoróforo que se quiere usar. El microscopio se puede adaptar a distintos fluoróforos cambiando por lo tanto el cubo. En la Fig. 1.5 se muestra un esquema de un microscopio de fluorescencia básico.

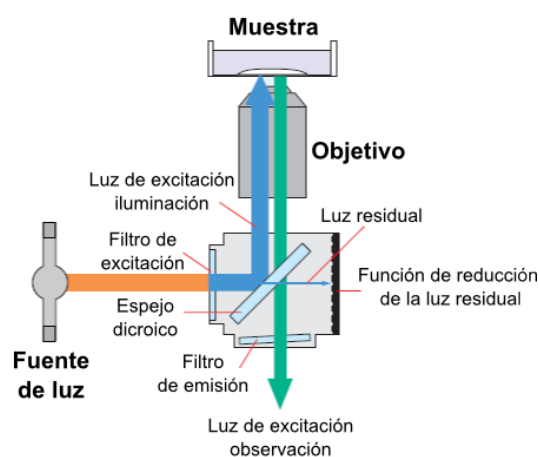


Figura 1.5: Esquema ilustrando los principios de la microscopía de epifluorescencia.

Entre las distintas técnicas de microscopía de fluorescencia disponible, la microscopía láser confocal ha sido la más utilizada para la observación de señales intracelulares de Ca^{2+} en ovocitos [18, 29]. La microscopía confocal permite eliminar la luz procedente de los planos fuera de foco ganando así resolución axial. Para ello, se enfoca el haz del láser en la muestra para excitar la fluorescencia. Se colecta luego la emisión que proviene del plano focal, eliminando los haces de los planos inferiores y superiores con la ayuda de un diafragma como se puede ver en el esquema de la Fig. 1.6. Parte de la luz del láser atraviesa un primer diafragma, es transmitida por un espejo dicróico y se enfoca en un punto de la muestra con un objetivo. La señal fluorescente emitida vuelve por el mismo camino óptico, es reflejada por el espejo dicróico para ser enfocada sobre un detector. Un segundo diafragma es colocado delante del detector para eliminar las contribuciones a la fluorescencia de zonas fuera de foco. Esta técnica presenta la posibilidad de tener seccionado óptico en la dirección perpendicular al plano de observación. Las ventajas que ofrece la microscopía confocal frente a la microscopía tradicional son imágenes de

mayor nitidez y contraste, mayor resolución lateral y axial. En síntesis, la microscopía confocal permite mejorar la relación entre la señal y el ruido al adquirir una imagen.

Si bien la microscopía confocal presenta una gran ventaja sobre la microscopía convencional wide-field (de campo amplio) al ofrecer seccionado óptico, hay que tener en cuenta que al usar como fuente de excitación de la fluorescencia a un haz láser enfocado, no se puede iluminar toda la muestra a la vez. Es decir que para coleccionar una imagen con un microscopio confocal hay que escanear la zona deseada con el láser y reconstruir luego la imagen. Dependiendo de la velocidad de barrido y del tamaño de la región que se quiere observar, este proceso puede ser relativamente lento. Si se quiere coleccionar mucha luz y poder así reconstruir con mayor resolución una imagen, se fijará una velocidad de barrido lenta. Si en cambio se quiere estudiar un proceso dinámico, se deberá barrer más rápido pero sacrificando información y aumentando el ruido. Si se quieren caracterizar estructuras estáticas se optará por la primera opción mientras que se optará por la segunda si se quiere estudiar un proceso dinámico (rápido) como las señales intracelulares de Ca^{2+} .

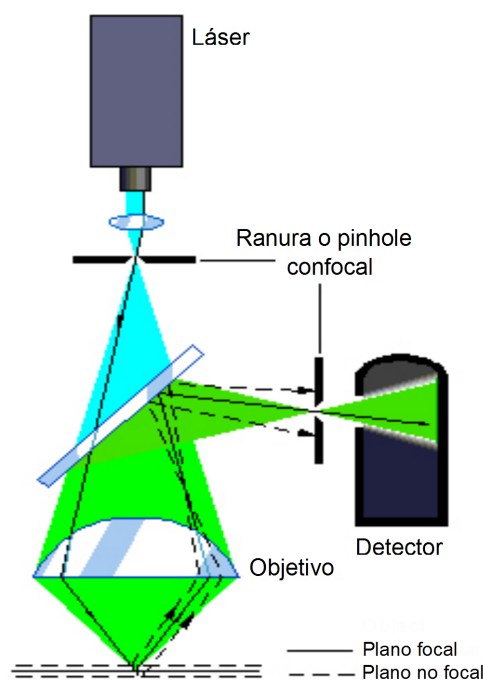


Figura 1.6: Esquema ilustrando los principios de la microscopía confocal.

El microscopio confocal ofrece distintos modos de adquisición según cómo se quiera escanear la muestra. Se puede coleccionar la fluorescencia de una misma línea a lo largo del tiempo (modo line-scan) o se puede escanear todo un cuadro. El modo line-scan permite obtener “imágenes” rápidas pero sacrificando una dimensión espacial.

1.4.4. Compuestos enjaulados

Una forma poco invasiva de generar cambios en las concentraciones de ciertas moléculas dentro de la célula es la fotoliberación de compuestos enjaulados [41]. Esta técnica utiliza moléculas artificiales cuya actividad biológica puede controlarse con un estímulo de luz particular. Esta es la causa de que en condiciones normales estos compuestos se encuentren inactivos y luego, cuando se iluminan con luz UV por ejemplo se activen [42]. Por otro lado, los “flashes” de fotólisis generan estímulos controlados y reproducibles con los cuales analizar los fenómenos fisiológicos que dependen de rápidos cambios de concentración. Entre los compuestos enjaulados comercialmente disponibles se encuentra el IP_3 , que ha sido muy usado en una gran variedad de experimentos de evocación de señales intracelulares de Ca^{2+} en ovocitos [18, 26]. El IP_3 enjaulado permite obtener elevaciones rápidas y transitorias de la $[\text{IP}_3]$ intracelular evitando el tiempo de retraso y modulación asociados a la producción de IP_3 nativo.

1.5. Esquema de la Tesis

En esta tesis se combinaron experimentos, su análisis y el desarrollo de modelos matemáticos para obtener una descripción detallada de distintos aspectos de las señales intracelulares de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 s. Una de las características poco estudiadas de este mecanismo de señalización es su regulación por parte del Ca^{2+} contenido en el lumen del RE. Gran parte del esfuerzo de esta tesis se centra en estudiar la dinámica del Ca^{2+} luminal y citosólico durante las señales mediadas por RIP_3 s. Luego de introducir los conceptos necesarios para enmarcar los resultados de este trabajo, se presenta a continuación una descripción del contenido de cada uno de los 5 capítulos que componen los resultados principales de esta tesis.

En el Capítulo 2 se analizan las distribuciones de tamaño de señales elementales de Ca^{2+} obtenidas experimentalmente y a partir de simulaciones de modelos simples. Se presentan modelos que tienen en cuenta lo que ocurre a nivel de un cúmulo único y entre cúmulos. Se modifica finalmente el modelo de dinámica entre cúmulos para tener en cuenta la acumulación de Ca^{2+} que ocurre luego de cada secuencia de eventos de liberación. Cambiando los parámetros del modelo se estudiaron los distintos factores que alteran la propagación de las señales. Se analizó en particular el rol del Ca^{2+} citosólico como “acoplador” de la liberación desde el RE a nivel global.

Con el objetivo de investigar el rol del Ca^{2+} luminal, se desarrolló primero un protocolo para marcar Ca^{2+} dentro del RE en los ovocitos de *Xenopus laevis*. Se presenta en el Capítulo 3 este protocolo junto con los distintos controles realizados para verificar

la hipótesis de que el indicador Fluo-5N AM sigue las variaciones del Ca^{2+} luminal. Se analiza también en ese capítulo el mecanismo de recaptura del Ca^{2+} al RE luego de una liberación usando el indicador luminal. Se muestra además que el uso conjunto del Fluo-5N AM con otros indicadores sirve para caracterizar la geometría intracelular y obtener estimaciones de volúmenes y áreas dentro del ovocito.

En el Capítulo 4 se vuelve a utilizar el indicador luminal en conjunto con un indicador citosólico para observar simultáneamente Ca^{2+} luminal y citosólico durante eventos de liberación a través de los RIP_3s . Se combinan los resultados experimentales con un modelo simple para cuantificar los flujos de Ca^{2+} durante los primeros instantes de la liberación. A partir de la interpretación de los resultados experimentales gracias al modelo, se estima que los *buffers* luminales constituyen un mecanismo de compensación de la depleción del Ca^{2+} luminal durante las liberaciones transformando al RE en un reservorio prácticamente inagotable de Ca^{2+} .

En el Capítulo 5 se analiza la dinámica espacio-temporal del Ca^{2+} luminal y citosólico durante una liberación prolongada. Se observa el acoplamiento espacial del Ca^{2+} luminal durante un evento de liberación prolongada que tiene como resultado una homogeneización del nivel de Ca^{2+} dentro del RE. Se analizan también los factores que influyen en la aparición de *spikes* de Ca^{2+} y en su frecuencia.

Además de analizar el rol del Ca^{2+} luminal y citosólico sobre la propagación de señales mediadas por RIP_3s , se trabajó en la caracterización de un set-up wide-field que permite adquirir imágenes bidimensionales de señales de Ca^{2+} con alta resolución temporal. En el Capítulo 6 se presenta este set-up y su caracterización. Se muestra que utilizando el set-up en conjunto con procesamientos de imágenes simples se lograron obtener imágenes de las distintas estructuras internas del ovocito. Se lograron también evocar y detectar señales de Ca^{2+} localizadas. Se propone un método para detectar de forma automatizada estas señales en las imágenes que posibilita el estudio de señales muy localizadas y eventualmente podría develar mecanismos de acoplamiento a nivel de un único cúmulo de RIP_3s así como también entre cúmulos.

En el Capítulo 7 se sintetizan los resultados y se plantean las conclusiones generales.

En el Apéndice A se detallan los materiales y métodos experimentales que se utilizaron. En el Apéndice B se describen los procesamientos generales de imágenes aplicados. En el Apéndice C se listan las abreviaturas utilizadas.

Capítulo 2

Rol del Ca^{2+} citosólico en la propagación de señales

2.1. Resumen

Las señales intracelulares de Ca^{2+} pueden ser tanto locales (restringidas espacialmente) como globales (propagar a través de la célula). Diferentes modelos han estudiado la transición entre señales locales y globales y los factores involucrados en esta transición. En este capítulo se discuten estos temas dentro del marco de los modelos simples de propagación de señales de Ca^{2+} . Se analizaron para tal fin las distribuciones de tamaño de señales locales (o *puffs*) observadas en ovocitos inmaduros de *Xenopus laevis*. La distribución de amplitud de los *puffs* obtenida a partir de las señales localizadas observadas no es gaussiana sino que presenta una fracción notable de eventos de gran tamaño. La distribución experimental obtenida para las áreas de los *puffs* en el registro espacio-temporal también presenta una cola larga y puede ajustarse con una función de tipo ley de potencias. Este comportamiento de tipo ley de potencias se reproduce dentro del marco de un modelo simple que incluye cierto acoplamiento entre señales individuales para un amplio rango de valores de parámetros. Un análisis del modelo muestra que una elevación global de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica juega un rol decisivo para determinar si la distribución de tamaño de los *puffs* tendrá cola larga o no. Esto sugiere que la remoción del Ca^{2+} del citosol es un aspecto clave para determinar la estocasticidad de las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s .

2.2. Marco general y motivación

Las señales de Ca^{2+} se caracterizan por tener escalas espaciales muy diversas: el tamaño típico del poro de un canal; las dimensiones de un cúmulo de RIP_3s ($\sim 100 \text{ nm}$); el tamaño de la célula ($10 \text{ } \mu\text{m} - 1 \text{ mm}$). El hecho de que una señal permanezca localizada o se propague a través de la célula depende del propio Ca^{2+} citosólico dado que los RIP_3s se abren al ligar IP_3 y Ca^{2+} . El Ca^{2+} citosólico a su vez actúa de forma dual sobre los receptores ya que a concentraciones moderadas induce su apertura mientras que a concentraciones altas provoca su inhibición. Cuando un RIP_3 se abre, el Ca^{2+} fluye rápidamente y difunde en el citosol. Esta difusión no es libre ya que las células cuentan con diversos mecanismos para reducir la concentración de Ca^{2+} citosólica. La elevación local de $[\text{Ca}^{2+}]$ que ocurre en la vecindad de un canal abierto eventualmente se desparra en el espacio induciendo las aperturas de otros canales vecinos que tengan IP_3 ligado. Esta liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) es fundamental para la propagación de las señales.

El acoplamiento entre las unidades individuales de liberación (RIP_3s) es otro aspecto clave a la hora de determinar el tipo de señal que se puede producir. A pesar de que la distribución espacial de los RIP_3s está actualmente en debate (ver por ejemplo [43]), la evidencia experimental parece indicar que los receptores que pueden ser activados (pueden abrirse) están distribuidos inhomogéneamente, en particular organizados en cúmulos [19]. El hecho de que los RIP_3s no estén distribuidos uniformemente dentro de las células introduce un nuevo factor que también modula la habilidad de una señal de propagar o no: la distancia media entre cúmulos, d . En [44, 45, 46] se introdujo el modelo determinista simple “fire-diffuse-fire” (fdf) para analizar el efecto de esta variable adicional. En particular, se encontraron diferentes regímenes de frente de onda dependiendo del cociente entre el tiempo típico que un cúmulo permanece activo (liberando Ca^{2+}) y el tiempo que le lleva al Ca^{2+} difundir a través de la distancia d . La separación entre cúmulos puede también llevar a fallas en la propagación aún si algunos cúmulos pueden liberar Ca^{2+} . En [45] se analizó la falla en la propagación dentro del marco del modelo determinista fdf. Se encontró que la dinámica de la onda se vuelve irregular y que su patrón temporal sufre una serie de bifurcaciones de doblamiento de período hasta que eventualmente desaparece como solución atractor del modelo. La falla en la propagación se estudió también dentro del marco de los modelos estocásticos fdf [47, 48]. Estos modelos estocásticos reproducen mejor las observaciones experimentales en las cuales, luego de una serie de señales localizadas, hay una explosión de actividad que se propaga a lo largo de una región espacial mucho más grande. La relevancia de la actividad estocástica localizada para provocar una señal global ha sido señalada recientemente. En particular,

se ha argumentado que señales globales aparentemente periódicas no son realmente periódicas sino que son consecuencia de aperturas estocásticas de canales [33, 49, 50]. De hecho, se ha reportado que la ocurrencia de varias señales locales puede eventualmente provocar una onda de Ca^{2+} [51].

La distribución espacial inhomogénea de los RIP_3 s también moldea la cinética de señales locales como los *puffs* [52]. De hecho, se investigó la propagación de las señales de Ca^{2+} dentro de un cúmulo de RIP_3 antes que entre cúmulos en [53]. En ese trabajo se estudió la transición desde una situación en la que la mayoría de las señales involucraban la apertura de todos los RIP_3 s del cúmulo con IP_3 ligado a una situación en la que muy pocos RIP_3 s del cúmulo se abrían. Para tal fin se introdujo un modelo muy simple con el cual se logró reproducir las distribuciones de tamaño de *puffs* experimentales reportadas en [54]. En particular, al ajustar el modelo a las observaciones, se determinó que, para un RIP_3 abierto, el radio dentro del cual la CICR es efectiva es del orden del radio de un cúmulo ($\sim 250 \text{ nm}$). Esto significa un acoplamiento entre canales muy fuerte debido a la CICR dentro del cúmulo, pero no lo suficientemente fuerte como para que todos los RIP_3 s con IP_3 pegado se abran durante cada *puff*. En este capítulo se investiga el acoplamiento mediado por Ca^{2+} citosólico entre RIP_3 s tanto intra como inter-cúmulo. En particular, se estudia el rol de la separación entre RIP_3 s y de la tasa de remoción de Ca^{2+} citosólico sobre las secuencias de señales que pueden ocurrir.

2.3. Experimentos de adquisición de *puffs*

Se realizaron experimentos con el fin de adquirir señales de Ca^{2+} en ovocitos de *Xenopus laevis*. Para ello se inyectaron las células con el fluoróforo de Ca^{2+} Fluo-4 y con IP_3 enjaulado. En todos los casos las concentraciones intracelulares de estos compuestos fueron $36 \mu\text{M}$ y $9 \mu\text{M}$ respectivamente. Se inyectó también el buffer exógeno EGTA y su concentración se varió desde $0 \mu\text{M}$ a $90 \mu\text{M}$.

Se adquirieron imágenes confocales de la fluorescencia del Fluo-4 en modo line-scan enfocando el objetivo $60\times$ a la altura de los gránulos en el hemisferio animal del ovocito. El IP_3 enjaulado se fotoliberó con un flash de luz UV proveniente de la lámpara de Hg. El flash UV se presentó aproximadamente 2 s después de iniciada la adquisición. Se computó la fluorescencia media basal en cada punto del espacio, $\overline{F_b}$ (ver Apéndice B para más detalles) previa al estímulo UV de fotoliberación. Se identificó manualmente la región ocupada por un *puff* en la imagen. La amplitud de un *puff* A , se definió luego como el valor máximo de la fluorescencia normalizada $\Delta F/F_b$ ($F - F_b/F_b$) en la región identificada. Se muestra en la Fig. 2.1 A un ejemplo de una imagen line-scan adquirida en donde el tiempo está en el eje horizontal y el espacio en el eje vertical. Se utilizó un

código de colores que va de colores fríos a cálidos a medida que aumenta el valor de la fluorescencia $\Delta F/F_b$. En este ejemplo, se pueden ver dos *puffs* que ocurren en el mismo sitio en tiempos diferentes. El primer *puff* es más intenso y amplio que el segundo. Para evaluar el área ocupada por un *puff* en el registro espacio-temporal (imagen line-scan), se aplicó un umbral a cada imagen adquirida. Para ello se calcularon la fluorescencia media F_m y su desvío estándar σ para toda la imagen ($\Delta F/F_b$). Luego se igualaron a 0 todos los píxeles con $\Delta F/F_b$ menor que $2F_m + 10\sigma$ y se igualaron a 1 todos los píxeles con $\Delta F/F_b$ mayor a $2F_m + 10\sigma$. De ese modo se obtuvo una imagen binaria en la cual se puede calcular el área ocupada por los píxeles que superan el umbral (o píxeles 1). Se muestra en la Fig. 2.1 B la imagen binaria obtenida al aplicar el umbral a la imagen de la Fig. 2.1 A en donde se representan en color blanco a los píxeles 0 y en negro a los píxeles 1. De esta forma, se determinó el área ocupada por un *puff* en la imagen line-scan. Se analizaron *puffs* de 13 ovocitos distintos en los que se observó una variedad

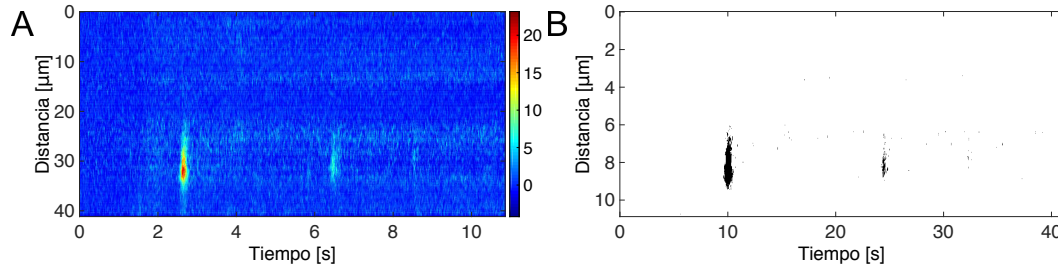


Figura 2.1: Imagen line-scan con dos *puffs* en el mismo sitio. **A:** Imagen de la fluorescencia normalizada $\Delta F/F_b$ con su correspondiente escala de color. **B:** Imagen binaria de la fluorescencia $\Delta F/F_b$ luego de pasarle un umbral.

de eventos desde *puffs* hasta ondas. Se analizaron solamente los eventos localizados en tiempo y espacio. Se caracterizó a los eventos por su amplitud y su área espacio-temporal. Los resultados obtenidos para las distribuciones de estas dos magnitudes analizadas se muestran en la Sección 2.6.

2.4. Modelos Matemáticos

En esta sección se describen las principales características de los modelos utilizados para simular experimentos de eventos de Ca^{2+} . En primer lugar, se utilizó el modelo local presentado en [53] que tiene en cuenta la dinámica de los receptores dentro de un único cúmulo (modelo intra-cúmulo). Luego, se extendió ese modelo para abarcar varios cúmulos dentro de la célula (modelo inter-cúmulo). Finalmente, se adaptó el modelo inter-cúmulo para tener en cuenta el acoplamiento debido a la acumulación de Ca^{2+} (citosólico) que se produce luego de una señal y la inhibición de los canales.

2.4.1. Dinámica intra-cúmulo

Para simular la distribución de tamaños de *puffs* que ocurre en un dado cúmulo, se siguió el modelo introducido en [53] utilizando los valores de parámetros que reproducían las observaciones experimentales de [54]. Se consideró un cúmulo circular de radio fijo, $R = 250 \text{ nm}$, en donde había $N = 18$ RIP_3 s distribuidos con distribución uniforme sobre el disco. Cada RIP_3 tenía una probabilidad $p = 5/18$ de tener IP_3 ligado (es decir, de estar disponible). La fase dinámica empieza al elegir un canal disponible y suponer que está abierto. Luego, se abren todos los otros RIP_3 s disponibles a una distancia $r_{inf} = 0,250 \text{ }\mu\text{m}$ del RIP_3 abierto. Se itera este esquema para cada canal abierto nuevo hasta que no queden RIP_3 s disponibles dentro de una distancia r_{inf} de un canal abierto que estén cerrados. Se caracterizó el tamaño del evento con el número de RIP_3 s que se abrieron. Repitiendo la simulación de este modelo local se produjeron histogramas con la distribución del tamaño de los *puffs* que se muestran en la Sección 2.5. Esta distribución de tamaños modelada se puede comparar con la distribución de amplitudes de *puffs* obtenida en los experimentos si todos los RIP_3 s abiertos contribuyen de la misma forma a la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el cúmulo.

2.4.2. Dinámica inter-cúmulo sin acumulación de Ca^{2+}

Para obtener la distribución de tamaños de eventos que involucran la apertura de RIP_3 s en distintos cúmulos dentro de la célula se utilizó una versión modificada del modelo descrito en la sección anterior. En esta versión modificada se supone que la separación entre dos canales en un cúmulo puede despreciarse cuando se computa su contribución a la concentración de Ca^{2+} libre en la posición de cualquier otro cúmulo y que todos los canales de esos otros cúmulos sensan la misma concentración de Ca^{2+} en cualquier tiempo. Esta suposición se basa en la diferencia que se estima existe entre el tamaño lateral de un cúmulo ($\sim 200 \text{ nm}$) y la distancia entre cúmulos ($\sim 2 \text{ }\mu\text{m}$). Bajo este supuesto, teniendo en cuenta que el acoplamiento entre canales se debe al Ca^{2+} que fluye a través de los RIP_3 s abiertos y que el Ca^{2+} difunde con un coeficiente efectivo entre cúmulos vecinos, se supone que la contribución a la concentración de Ca^{2+} en una posición r_j de un cúmulo con N_{oi} canales abiertos localizado en otra posición r_i es proporcional a la cantidad $N_{oi}/|r_i - r_j|$. Por lo tanto, dado que a nivel intra-cúmulo se supone que todos los RIP_3 s disponibles dentro de una distancia r_{inf} de un canal abierto se abren, a nivel inter-cúmulo se supone que un cúmulo con N_o canales abiertos induce la apertura de todos los otros cúmulos con canales disponibles que se encuentren dentro de un radio $r_{inf}N_o$. Se supone también que, cuando un cúmulo está abierto (o activo), todos sus canales disponibles están abiertos (es decir liberando Ca^{2+}). En este

esquema no se acumula el Ca^{2+} que proviene de distintos cúmulos abiertos para decidir la apertura de un nuevo cúmulo. Esta simplificación es válida mientras la influencia del cúmulo abierto más cercano sea más importante que la de los cúmulos más distantes. Las simulaciones de este modelo fueron realizadas considerando un área total circular de radio $R = 5 \mu m$ y $r_{inf} = 0,250 \mu m$ como anteriormente. Para cada realización se seleccionó el número de cúmulos a partir de una distribución de Poisson con media 25 para garantizar una distancia media entre cúmulos de $\sim 2 \mu m$ y luego se determinó el número de canales disponibles para cada cúmulo a partir de una distribución de Poisson con media 8. De esta forma, la fracción de cúmulos con canales disponibles es similar a la fracción de canales disponibles sobre el total de canales en el caso de las simulaciones intra-cúmulo.

2.4.3. Dinámica inter-cúmulo con acumulación de Ca^{2+}

El modelo de dinámica inter-cúmulo presentado anteriormente trata a cada señal independientemente entre sí. Existe, sin embargo, evidencia de que varias señales locales usualmente preceden una onda de Ca^{2+} global. Se modificó por lo tanto el modelo inter-cúmulo para tener en cuenta este acoplamiento entre señales. Para tal fin, se consideró una región circular más grande (de radio $R = 20 \mu m$) en donde un cierto número de cúmulos se distribuyó aleatoriamente con probabilidad uniforme sobre el área. El número de cúmulos se extrae de una distribución de Poisson con media 400 para garantizar una distancia media entre cúmulos de $\sim 2 \mu m$ y el número de RIP_3 s con IP_3 ligado por cúmulo se extrae de una distribución de Poisson con media 8, como en el modelo presentado en la sección anterior. Estos números no cambian durante la simulación. Para incluir el acoplamiento entre señales, se realizó una simulación dependiente del tiempo en donde se asume que las señales ocurren instantáneamente y los cúmulos que participan de ellas están determinados como en el modelo inter-cúmulo presentado en la sección anterior con algunas modificaciones menores. En el intervalo de tiempo entre señales, el número de RIP_3 s con IP_3 ligado y la concentración de Ca^{2+} cambian con el tiempo. Existe, por lo tanto, una separación entre escalas temporales con una dinámica rápida durante un pico de actividad y una recuperación más lenta entre estos picos. Por otro lado, en este nuevo modelo, se distingue entre RIP_3 s con IP_3 ligado activos e inactivos. En particular, se asume que solamente los RIP_3 s con IP_3 ligado activos pueden abrirse durante una señal y que todos aquellos que participan de un evento se inactivan inmediatamente después de éste. Cada RIP_3 inactivo permanece así por un cierto tiempo (aleatorio). Como se hizo en [23], se extrae el tiempo de inhibición de cada RIP_3 inactivo de una distribución exponencial con media 2.5 s. En $t = 0$ se asume que todos los RIP_3 s con IP_3 ligado están activos y que la $[\text{Ca}^{2+}]$ es igual a $[\text{Ca}_{basal}] =$

0,1 μM . Esta concentración varía luego al agregar una cantidad fija (espacialmente homogénea) para cada RIP_3 que se abrió durante el evento inmediatamente después de la ocurrencia de una señal. La $[Ca^{2+}]$ decae posteriormente a $[Ca_{basal}]$ de forma exponencial con el tiempo a una tasa de 200/s. Se añade para cada canal abierto una cantidad espacialmente uniforme a $[Ca^{2+}]$ bajo el supuesto de que la difusión del Ca^{2+} ocurre lo suficientemente rápido de forma tal que la $[Ca^{2+}]$ llega a ser aproximadamente uniforme en la vecindad del cúmulo en una escala temporal que es mucho más corta que el tiempo medio de separación entre eventos. Para determinar la contribución fija de cada canal abierto a la $[Ca^{2+}]$ total el razonamiento que se siguió fue el siguiente. En primer lugar, se asumió que, mientras que un RIP_3 está abierto, su corriente de Ca^{2+} es $I = 0,1 \text{ pA}$ y que el Ca^{2+} difunde desde el canal con $D = 200 \mu m^2/s$ (aproximadamente el coeficiente de difusión del Ca^{2+} libre [55]). Entonces, cuando el canal está abierto, suma una contribución no uniforme $\Delta[Ca^{2+}]$ a la $[Ca^{2+}]$ de fondo que se aproxima con la solución estacionaria de la ecuación de difusión en presencia de una fuente puntual con $2I$. Es decir, $\Delta[Ca^{2+}] \approx \beta I \mu M \mu m^3 / (4\pi D r)$ donde β es un factor de conversión de unidades y r es la distancia al canal abierto. Teniendo en cuenta los valores de I y D considerados, se tiene $\Delta[Ca^{2+}] \approx 0,414 \mu M \mu m / r$. Se supone por lo tanto que la cantidad total de ΔCa^{2+} contenido en un cilindro de altura h y radio R que encierra el área del RE de la simulación (πR^2) puede aproximarse por $h \int_0^R \Delta[Ca^{2+}] 2\pi r dr = 2\pi h R \times 0,414 \mu M \mu m$ mientras que el RIP_3 está abierto y se distribuye uniformemente sobre el mismo volumen inmediatamente después de que el canal se cierra. De esta forma, se estima la contribución espacialmente uniforme fija a $[Ca^{2+}]$ de cada canal abierto inmediatamente después de que se cierra como $2\pi h R \times 0,414 \mu M \mu m / (h\pi R^2) = 0,828 \mu M \mu m / R = 0,0414 \mu M$. Por lo tanto, luego de una señal con N_o canales abiertos se agrega $N_o \times 0,0414 \mu M$ a la $[Ca^{2+}]$. Como se mencionó anteriormente, esta concentración decae posteriormente hacia su valor basal con una tasa de 200/s que se ha estimado como $D/1\mu m^2$ dado que, para cada canal abierto, $\Delta[Ca^{2+}]$ es cercano a su valor basal a una distancia del orden de 1 μm .

En este nuevo modelo, el inicio de una señal no solamente depende del número de RIP_3 s activos con IP_3 ligado sino también de la $[Ca^{2+}]$. En particular, se supone que la probabilidad por unidad de tiempo de que un cúmulo con $N_{activos}$ RIP_3 s se abra iniciando una nueva señal es $0,225 s^{-1} * N_{activos} * [Ca^{2+}] / Ca_{basal}$. De esta forma, esta probabilidad toma el valor estimado en [23] para la iniciación de *puffs* en presencia de Ca^{2+} basal. Una vez que el primer cúmulo se abre, la apertura de los otros cúmulos que participan de la señal se decide como antes pero considerando la $[Ca^{2+}]$ de fondo que ya se ha acumulado. En particular, un cúmulo abierto, k , con N_k canales activos induce la apertura de todos los otros cúmulos, i , con $N_i > 0$ canales activos que satisfacen $N_k 0,414 \mu M \mu m / d_{ik} + [Ca^{2+}] \geq 0,414 \mu M \mu m / r_{inf} + [Ca_{basal}]$ donde d_{ik} es la distancia entre

el i -ésimo cúmulo y el k -ésimo cúmulo, $[\text{Ca}^{2+}]$ es la concentración de Ca^{2+} de fondo (acumulada) en el tiempo de la señal y $r_{inf} = 0,250 \mu\text{m}$.

2.5. Propagación intra-cúmulo e inter-cúmulo usando un modelo simple

En esta sección se muestran los resultados obtenidos al usar los modelos intra e inter-cúmulo sin acumulación de Ca^{2+} descritos en las Secciones 2.4.1 y 2.4.2 para generar distribuciones de tamaño de señales de Ca^{2+} . Como se explicó en la Sección 2.4, uno de estos modelos se usó para las señales locales (*puffs*) que involucran la apertura de RIP_3 s dentro de un cúmulo de $\sim 400 \text{ nm}$ de lado. El otro modelo se usó para simular señales que pueden propagar entre cúmulos que están separados entre sí por $\sim 2 \mu\text{m}$. Ambos modelos incluyen una descripción simplificada de los dos procesos dinámicos principales que dan forma a las señales: el pegado del IP_3 y del Ca^{2+} , tratando a cada señal independientemente de las otras. En la Sección 2.7 se describen los resultados obtenidos cuando se incluye el acoplamiento entre señales al modelo inter-cúmulo. Los tipos de señales dependen fuertemente del IP_3 y del Ca^{2+} dado que los RIP_3 s necesitan ligar estas dos especies para abrirse. En los experimentos que se comparan con los modelos, las células se cargan con IP_3 enjaulado que es eventualmente liberado usando un pulso de luz UV. De esta forma, se controla la distribución del IP_3 . Por lo tanto, los modelos asumen que la $[\text{IP}_3]$ está fija. La dinámica del Ca^{2+} , por otro lado, está totalmente controlada por la célula. Su concentración es, por lo tanto, muy baja al principio del experimento y solamente luego de una latencia un ion de Ca^{2+} encuentra un RIP_3 con IP_3 ligado e induce su apertura. Una vez que ocurre eso, el Ca^{2+} liberado difunde lejos del canal abierto y puede inducir la apertura de RIP_3 s cercanos con IP_3 ligado. El cambio en la $[\text{Ca}^{2+}]$ debido a un canal abierto solamente es apreciable en su vecindad. Por lo tanto, el acoplamiento entre canales mediado por Ca^{2+} depende de la distancia. Esta característica se tiene en cuenta en ambos modelos de forma simplificada. En el modelo local, se asume que cada canal abre un RIP_3 cercano con IP_3 ligado si está dentro de una distancia fija, r_{inf} . En el modelo de señales globales, se asume que cada cúmulo que está liberando Ca^{2+} a través de N_o RIP_3 s abiertos puede inducir la liberación de Ca^{2+} de un cúmulo cercano si éste está a una distancia $N_o r_{inf}$.

Se muestra en la Fig. 2.2 A la distribución de tamaños de *puffs* obtenida luego de 1000 realizaciones del modelo local usando los parámetros que permitieron ajustar las observaciones experimentales de [54]. La distribución es relativamente plana para tamaños de eventos pequeños y se aproxima a una distribución de Poisson para eventos más grandes. Este comportamiento está en el medio entre dos casos limitantes. Una

primer situación dominada por IP_3 en la que todos los canales del cúmulo que tienen IP_3 ligado cuando el evento empieza participan de la señal. Esto ocurre cuando los RIP_3 s con IP_3 ligado están densamente empaquetados en el cúmulo, en cuyo caso la distribución es de Poisson. El otro caso limitante corresponde a eventos en los que los RIP_3 s con IP_3 ligado están tan separados entre sí que es muy poco probable que la apertura de uno de ellos induzca la apertura de cualquier otro RIP_3 disponible en el cúmulo. En este caso el factor limitante para la propagación de la señal es la unión a Ca^{2+} .

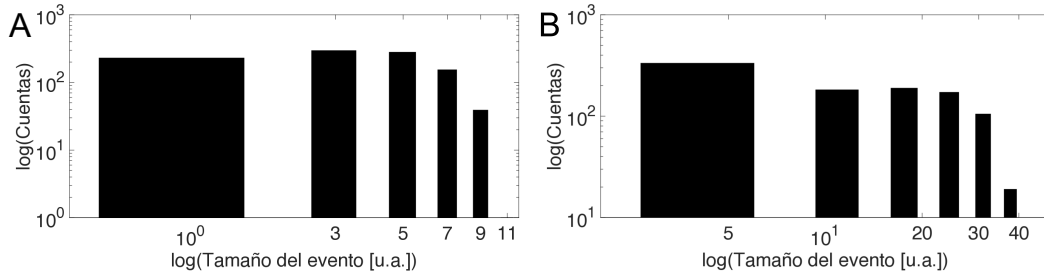


Figura 2.2: Distribuciones de tamaños de eventos obtenidas a partir de las simulaciones. **A:** Modelo intra-cúmulo local. **B:** Modelo inter-cúmulo sin acumulación de Ca^{2+} .

Se muestra en la Fig. 2.2 B la distribución de tamaños de eventos obtenida luego de 1000 realizaciones del modelo de acoplamiento inter-cúmulo sin acumulación de Ca^{2+} . El razonamiento seguido para elegir los parámetros de estas simulaciones es el siguiente. Dado que la simulación cubre un área de $\sim 100 \mu\text{m}^2$, se eligió un número medio de cúmulos igual a 25 para garantizar una separación media entre cúmulos de aproximadamente $2 \mu\text{m}$. Se eligió luego el número medio de RIP_3 s con IP_3 ligado en un cúmulo igual a 8. Este valor es ligeramente superior al valor medio derivado de las observaciones de [54] ($6,02 \pm 0,48$) que corresponde a experimentos que se enfocaban en señales locales. Por lo tanto, al elegir un valor ligeramente superior se espera poder generar señales que involucren la activación de varios cúmulos. Como se asume que todos los canales disponibles (con IP_3 ligado) de un cúmulo se abren cuando se activa el cúmulo, el número medio de RIP_3 s con IP_3 ligado y de canales abiertos en un cúmulo durante un evento de liberación, $\langle N_o \rangle$, coincide. $\langle N_o \rangle = 8$ da $\langle N_o \rangle r_{inf} = 2 \mu\text{m}$ para $r_{inf} = 0,250 \mu\text{m}$ como en el modelo intra-cúmulo. Para cada cúmulo abierto, $N_o r_{inf}$ debe compararse con la distancia a todos los otros cúmulos para decidir su activación. Por lo tanto, los parámetros son tales que $N_o r_{inf}$ es, en promedio, igual a la distancia media entre cúmulos. Esto es similar a la situación encontrada para el modelo de dinámica intra-cúmulo cuando se usaban los parámetros que mejor ajustaban los datos experimentales de [54]. Esto es, la distancia media entre canales disponibles en el caso intra-cúmulo ($\sim 0,12 \text{ nm}$), y la distancia entre cúmulos en el caso inter-cúmulo ($\sim 2 \mu\text{m}$), son del mismo orden que los números que deben ser comparados para decidir la apertura de los canales o la activación de los cúmulos ($r_{inf} = 0,250 \mu\text{m}$ y $N_o r_{inf}$, respectivamente). De hecho, se observa que la distribución de tamaños de eventos de las Figs. 2.2 A y Fig. 2.2 B tienen

formas similares. Como en el caso de la dinámica intra-cúmulo, los parámetros del modelo inter-cúmulo corresponden aproximadamente a una situación intermedia entre una distribución dominada por la unión a Ca^{2+} y una distribución dominada por la unión a IP_3 . Esto se ilustra en la Fig. 2.3 donde se muestra la distribución de tamaños de eventos obtenida con los mismos parámetros que en la Fig. 2.2 B pero con valores diferentes para el número medio de RIP_3 s con IP_3 ligado en un cúmulo. En la Fig. 2.3 A este valor es 4 y el acoplamiento entre cúmulos raramente ocurre. En la Fig. 2.3 B el número medio de RIP_3 s con IP_3 ligado en un cúmulo es 20 y casi todos los cúmulo con RIP_3 s disponibles participan del evento.

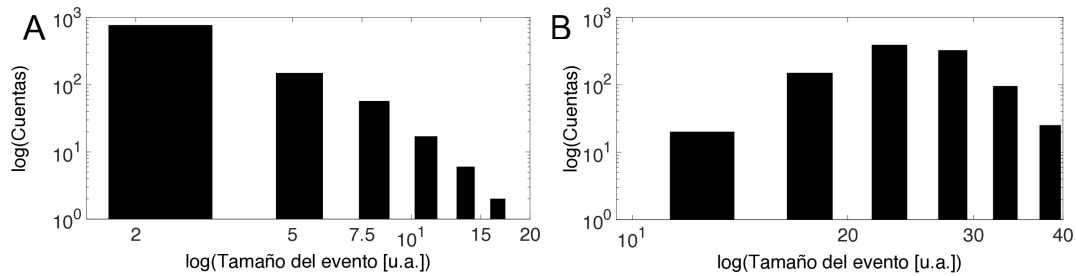


Figura 2.3: . Transición entre los casos en los que el Ca^{2+} ligado es limitante y el IP_3 ligado es limitante para la distribución de tamaños de eventos de las simulaciones del modelo inter-cúmulo sin acumulación de Ca^{2+} . **A:** Similar a la Fig. 2.2 B pero usando un número medio de RIP_3 s con IP_3 ligado igual a 4. **B:** Similar a la Fig. 2.2 B pero usando un número medio de RIP_3 s con IP_3 ligado igual a 20.

2.6. Resultados experimentales

Se presentan en esta sección los resultados obtenidos al analizar los *puffs* adquiridos como se describe en la Sección 2.3. Se caracterizó el tamaño de los *puffs* por su amplitud y su área (espacio-temporal). Se presentan las distribuciones de estas dos cantidades derivadas de los experimentos. Se muestra en la Fig. 2.4 A la distribución de amplitudes de *puff* para 202 *puffs* medidos en 13 ovocitos distintos. Las amplitudes de *puff* varían de 0,54 *u.a.* a 3,95 *u.a.*. La distribución muestra un único máximo en $A = 1,5$ *u.a.*. Se muestra en la Fig. 2.4 B la misma distribución pero en escala logarítmica. Estos datos no se ajustan correctamente con una ley de potencias.

Se muestra en la Fig. 2.5 A la distribución de áreas de *puff* (extensión espacio-temporal). Se obtuvieron valores de áreas de *puff* confiables para 179 *puffs* observados en 12 ovocitos. Las áreas se computaron como se explica en la Sección 2.3. La misma distribución se muestra en escala logarítmica en la Fig. 2.5 B. En este caso, la distribución puede ajustarse con una ley de potencias con exponente entre 1,7 y 2,0 dependiendo del rango de áreas incluido en el ajuste. Se estimó la bondad del ajuste con el coeficiente $\mathcal{R}^2$, que varió entre 0,77 y 0,81 dependiendo del rango de áreas incluido (si se incluyen

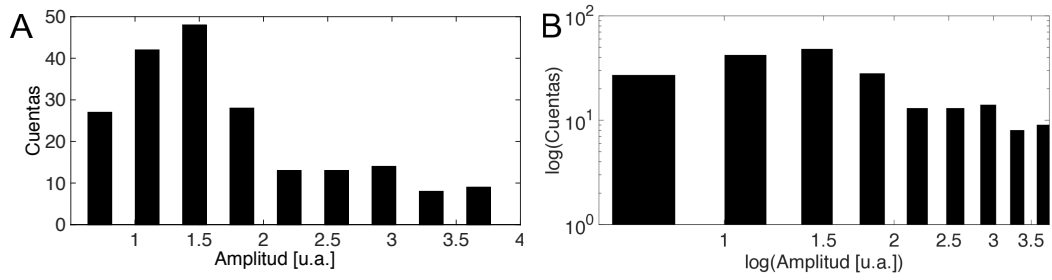


Figura 2.4: Distribución experimental de amplitudes de *puffs*. **A:** Distribución obtenida a partir de 202 *puffs* medidos en 13 células. **B:** Misma distribución que en **A** pero en escala logarítmica.

datos de áreas entre 800 y 4500 px o entre 800 y 4000 px, respectivamente). Se comparó este valor con los valores obtenidos al ajustar los datos con otras distribuciones. La bondad del ajuste fue inferior en todos los casos excepto al ajustar con una distribución log-normal con la que se obtuvo $\mathcal{R}^2 = 0,90$. Siempre resulta difícil distinguir entre distribuciones tipo ley de potencias y log-normal [56] y en este caso es aún más difícil dado el pequeño rango de eventos abarcado por la distribución. En cualquier caso, una característica fundamental de ambos tipos de distribuciones es la existencia de una cola larga. Como se discutirá más adelante, en el caso de las señales de Ca^{2+} , esto es una propiedad relevante por sus implicaciones fisiológicas.

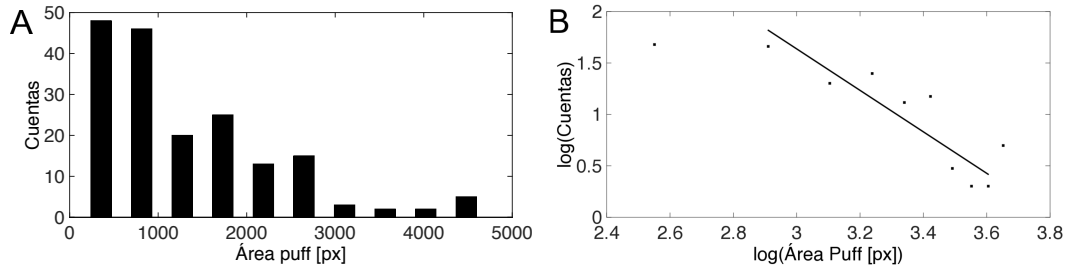


Figura 2.5: Distribución experimental de áreas de *puffs*. **A:** Similar a la Fig. 2.4 pero para el área espacio-temporal abarcada por los *puffs*. Distribución obtenida a partir de 179 *puffs* medidos en 12 células. **B:** Misma distribución que en **A** pero en escala logarítmica (puntos). La recta es el ajuste hecho con una ley de potencias.

2.7. La acumulación de Ca^{2+} y la inhibición de los RIP_3 s puede llevar a una distribución tipo ley de potencias

En la sección anterior se caracterizó a las señales obtenidas experimentalmente con dos cantidades: su amplitud y su dispersión o área espacio-temporal. Estas cantidades no sólo dependen del número de RIP_3 s que se abren durante una señal sino también de los tiempos de esas aperturas y de la distribución espacial de los receptores. Las distribuciones experimentales se pueden comparar con la distribución de canales que participan de los eventos obtenidos a partir de las simulaciones de los distintos modelos.

En particular, ni las simulaciones ni la distribución experimental de amplitudes de *puffs* se describen bien con una ley de potencias. Sin embargo, la distribución experimental de las áreas de *puffs* pudo ser ajustada por una distribución log-normal o ley de potencias sobre un rango relativamente corto de escalas de longitud. Esta limitación se atribuyó al hecho de que se analizaron principalmente señales localizadas (*puffs*). Si se hubieran incluido en el análisis eventos que involucraran RIP_3 s de muchos cúmulos quizás se hubiera obtenido una ley de potencias sobre un rango mayor. Este comportamiento tipo ley de potencias no se observa, sin embargo, en las distribuciones de la Fig. 2.2. El área (espacio-temporal) abarcada por una señal depende fuertemente del acoplamiento mediado por Ca^{2+} entre canales y entre cúmulos. Existe, por otro lado, evidencia experimental de que varias señales locales usualmente preceden una onda de Ca^{2+} (global) cuando se libera IP_3 de forma continua en las células. A pesar de que las células poseen un mecanismo muy eficiente para restituir el Ca^{2+} a su nivel basal una vez que finaliza una señal, esto no ocurre instantáneamente. Por lo tanto, puede haber una acumulación lenta de Ca^{2+} entre señales que ya ha sido observada [51]. Este Ca^{2+} remanente acopla efectivamente las señales locales, un efecto que no se ha tenido en cuenta en los modelos intra e inter-cúmulo utilizados en la Sección 2.5. Más aún, los RIP_3 s se vuelven inactivos luego de su apertura. Se ha estimado que el tiempo típico de inhibición es del orden de 2 s [23]. Esto introduce un acoplamiento adicional entre señales. Con el fin de tener en cuenta estos dos efectos, se modificó el modelo inter-cúmulo descrito en la Sección 2.4. Para tener en cuenta el acoplamiento entre señales, se realizó una simulación dependiente del tiempo en la cual se distinguió entre RIP_3 s con IP_3 ligado activos e inactivos y donde se asumió que las señales ocurren instantáneamente. Entre señales, el número de RIP_3 s con IP_3 ligado activos (los únicos que se abren durante una señal) y la $[\text{Ca}^{2+}]$ cambian con el tiempo. Entonces, el modelo tiene una separación de escalas temporales implícita con una dinámica rápida durante un pico de actividad y una recuperación lenta entre estos picos. Los RIP_3 s se vuelven inactivos luego de abrirse y luego vuelven a estar activos con un escala temporal de 2 s. La $[\text{Ca}^{2+}]$, por otra parte, aumenta luego de una señal dependiendo de cuántos canales se abrieron y luego decae a su valor basal con una tasa del orden de 200 s^{-1} .

Se muestran en la Fig. 2.6 los resultados obtenidos con el modelo inter-cúmulo que tiene en cuenta el acoplamiento entre señales. En este caso, se caracterizó el tamaño de la señal por el número de cúmulos y el número de receptores que participaron en cada evento. Se muestran las distribuciones de estas dos cantidades en escala logarítmica en las Figs. 2.6 A y 2.6 B respectivamente. Se pueden aproximar ambas distribuciones con una ley de potencias sobre un rango relativamente grande de tamaños. El ajuste de algunos de los puntos de la distribución del número de cúmulos involucrados con una ley de potencias dio exponentes entre 1,0 y 1,4 con $\mathcal{R}^2$ entre 0,72 y 0,85 (si se incluyen datos

con entre 30 y 80 cúmulos involucrados, respectivamente). Con respecto al ajuste con una ley de potencias de la distribución del número de RIP_3 s involucrados en cada evento, se obtuvieron exponentes entre 1,0 y 1,7 y $\mathcal{R}^2$ entre 0,76 y 0,92 (si se incluyen datos con entre 20 y 80 RIP_3 s involucrados, respectivamente). Uno de los exponentes obtenido para el ajuste de la distribución del número de receptores está dentro del rango del exponente determinado a partir de la distribución del área de los *puffs* experimentales. La ley de potencias falla para tamaños grandes y esto se debe probablemente a efectos de tamaño finito. Ninguna de las dos distribuciones pudieron ser bien ajustadas con distribuciones tipo log-normal o log-logística.

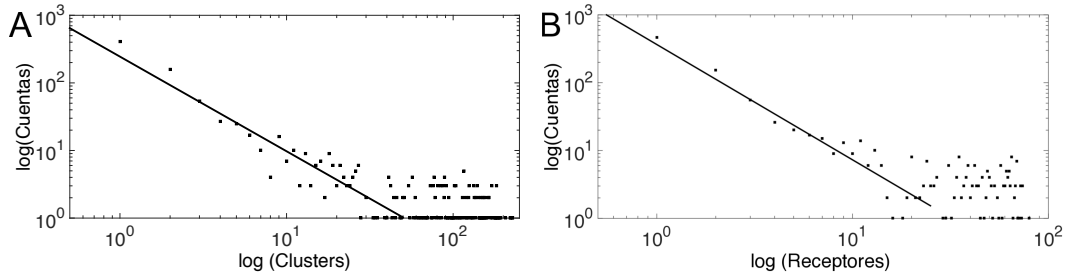


Figura 2.6: Distribución de cúmulos y de receptores involucrados en los eventos obtenidos en las simulaciones del modelo de dinámica inter-cúmulo con acumulación de Ca^{2+} . **A:** Distribución del número de cúmulos involucrados en cada evento (puntos) en escala logarítmica y ajuste con una ley de potencias (recta). **B:** Distribución del número de RIP_3 s involucrados en cada evento (puntos) en escala logarítmica y ajuste con una ley de potencias (recta).

2.8. El Ca^{2+} citosólico provee un mecanismo de acoplamiento global que altera la distribución de tamaños de señales.

Para analizar cuán robusto es el comportamiento de la ley de potencias encontrado en la sección anterior se simuló el modelo inter-cúmulo con acumulación de Ca^{2+} para otros valores de los parámetros. En particular, se estudió cómo las distribuciones del número de cúmulos y de RIP_3 s que participaban de cada evento cambiaban con la distancia media entre cúmulos, dm , el tiempo medio que un RIP_3 permanece inhibido, t_{inh} , la tasa a la cual el Ca^{2+} citosólico decae a su valor basal, δ_{Ca} y con el radio de influencia de un canal abierto, r_{inf} que eran $dm = 2 \mu m$, $t_{inh} = 2,5 s$, $\delta_{Ca} = 200/s$ y $r_{inf} = 0,250 \mu m$ en todas las simulaciones anteriores. En casi todos los casos se pudo ajustar a las distribuciones con una ley de potencias (con exponente entre 1,0 y 1,8) pero sobre un rango de tamaños de evento que podía ser diferente dependiendo del valor de los parámetros. Esto es razonable dado que el tamaño del evento más grande es fuertemente dependiente de algunos de esos parámetros. Por ejemplo, para valores grandes de la

distancia entre cúmulos, dm , o del tiempo de inhibición, t_{inh} y para valores pequeños de del número medio de RIP_3 s con IP_3 pegado por cúmulo, λ , el tamaño del evento más grande decreció significativamente. El variar r_{inf} entre $0,01 \mu\text{m}$ y $0,1 \mu\text{m}$ no produjo cambios notables. Mientras que variar la tasa de remoción del Ca^{2+} citosólico, δ_{Ca} , entre $50/s$ y $100/s$ no cambió el comportamiento tipo ley de potencias de la distribución de tamaños de señales, al usar valores más pequeños (se investigó $20/s \leq \delta_{Ca} \leq 30/s$) se produjo un cambio llamativo. A saber, la distribución de tamaños de eventos dejó de tener una cola larga y se asimiló más a una distribución gaussiana. Se ilustran los resultados obtenidos en las Figs. 2.7 y 2.8.

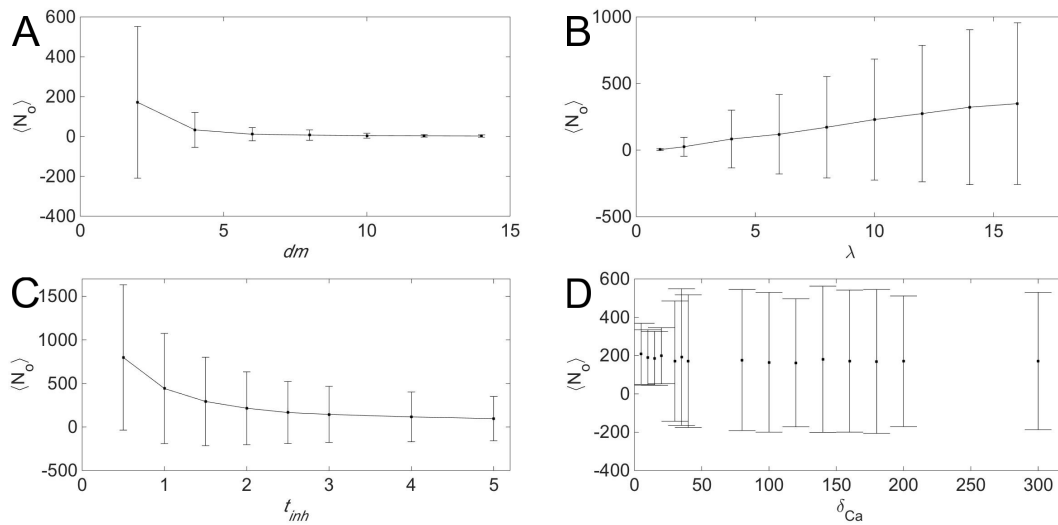


Figura 2.7: Valor medio (símbolos) y desvío estándar (líneas verticales alrededor del valor medio) del número medio de RIP_3 s que participan de un evento, N_o , como función de la distancia inter-cúmulo, dm (A), del número medio de RIP_3 s con IP_3 ligado por cúmulo, λ (B), del tiempo medio de inhibición de un RIP_3 , t_{inh} (C), y de la tasa de remoción del Ca^{2+} citosólico, δ_{Ca} (D). En todos los casos, los parámetros que no se variaron estaban fijos en los valores utilizados en la Sección 2.7.

Se muestra en la Fig. 2.7 el valor medio y el desvío estándar del número de RIP_3 s que participan de las señales, N_o , como función de un parámetro variable cuando todos los otros parámetros se mantienen fijos en los valores usados en la sección anterior. Se pueden observar en esta figura las tendencias mencionadas con respecto a cómo varía el número medio de RIP_3 s que participan de un evento, N_o , con dm , λ y t_{inh} . Se observa también que, cuando se varía cualquiera de estos tres parámetros el desvío estándar de N_o disminuye cuando N_o disminuye. El comportamiento hallado para valores pequeños de δ_{Ca} es bastante diferente. El desvío estándar es mucho más pequeño que para los otros tres conjuntos de valores de parámetros explorados. Más aún, el desvío σ_{N_o} decrece al aumentar $\langle N_o \rangle$. Esto surge como consecuencia de que la distribución no presente más una cola larga. Se puede observar esto en la Fig. 2.8 donde se graficó la distribución del número de RIP_3 s que participan de los eventos cuando se mantienen todos los parámetros fijos en los valores utilizados en la sección anterior menos la tasa de

remoción del Ca^{2+} citosólico. Para este parámetro se usaron los valores $\delta_{Ca} = 20/s$ (A), $\delta_{Ca} = 25/s$ (B), $\delta_{Ca} = 30/s$ (C) and $\delta_{Ca} = 200/s$ (D). Se observa que para valores de δ_{Ca} lo suficientemente grandes la distribución se puede aproximar por una ley de potencias. A medida que δ_{Ca} decrece, este comportamiento tipo ley de potencias se mantiene para valores de N_o pequeños pero aparece una nueva componente de tipo gaussiana en la región de N_o grandes. Eventualmente, cuando δ_{Ca} es lo suficientemente pequeño, la región en donde estaba la ley de potencias desaparece y se obtiene una distribución de tipo gaussiana.

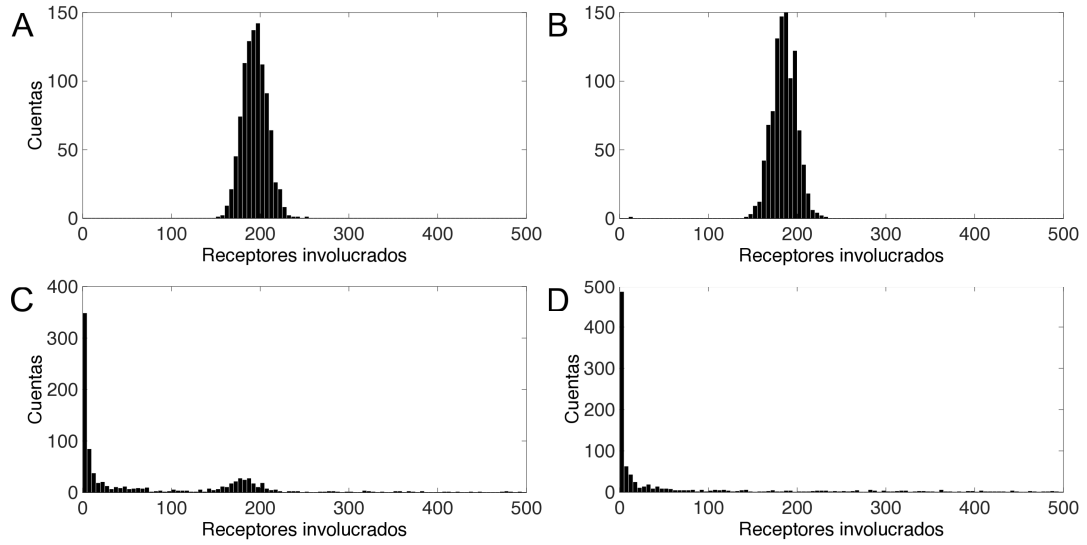


Figura 2.8: Distribución del número de RIP_3 s que participan de los eventos cuando todos los parámetros se mantienen fijos en los valores usados en la Sección 2.7 excepto por la tasa de remoción de Ca^{2+} citosólico que fue: **A** $\delta_{Ca} = 20/s$, **B** $\delta_{Ca} = 25/s$, **C** $\delta_{Ca} = 30/s$, **D** $\delta_{Ca} = 200/s$.

Para interpretar estos resultados, se compararon el número de receptores que participan de cada evento, N_o y el número de RIP_3 s con IP_3 ligado que están activos, N_{act} en cualquier tiempo. Se muestra un gráfico de N_o y N_{act} como función del tiempo para $\delta_{Ca} = 200/s$ en la Fig. 2.9 A y para $\delta_{Ca} = 20/s$ en la Fig. 2.9 B. Se observa que mientras que en el gráfico de la Fig. 2.9 A $N_o < N_{act}$ para la mayoría de los eventos, para $\delta_{Ca} = 20/s$ todos los receptores activos participan de cada evento ($N_o = N_{act}$). De esta forma, la distribución de tamaños de eventos coincide con la de los canales activos que, luego de un pequeño transitorio, tiene un valor medio bien definido con un desvío relativamente pequeño alrededor. La distribución de tamaños de eventos es luego gaussiana.

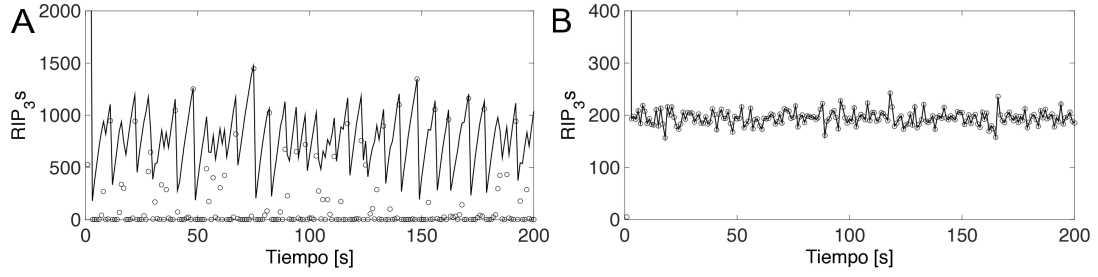


Figura 2.9: Número de RIP_3 s activos y de RIP_3 s que participan de un evento como función del tiempo. Número de RIP_3 s activos, N_{act} (línea sólida) y de RIP_3 s abiertos, N_o (círculos vacíos) como función del tiempo para: **A** $\delta_{Ca} = 200/s$ y **B** $\delta_{Ca} = 20/s$.

2.9. Discusión

La observación de *puffs* de Ca^{2+} y otros estudios indican que, en la mayoría de los tipos celulares, los RIP_3 s activos se encuentran distribuidos en cúmulos sobre la membrana del RE. Estudios recientes llevan a la conclusión de que hay también RIP_3 s activos, sueltos y en menor número, entre los cúmulos [57]. Esta distribución inhomogénea junto con las propiedades cinéticas del receptor dan origen a una variedad de señales que van desde *puffs* (eventos muy localizados) a ondas globales que se propagan a través de la célula. El acoplamiento mediado por Ca^{2+} (o CICR) juega un rol clave para determinar el tamaño del evento. En [53] se estudió la transición entre una situación en la cual la mayoría de las señales involucraban la apertura de todos los RIP_3 s del cúmulo con IP_3 ligado a una situación en la cual muy pocos RIP_3 s del cúmulo se abrían. En este capítulo se estudió esta transición y los mecanismos involucrados en la propagación de las señales a nivel de un cúmulo y entre cúmulos. Para ello se analizó primero la distribución experimental de amplitudes de *puffs* en ovocitos de *Xenopus laevis*. La distribución de áreas (espacio-temporales) de *puffs* en estas células fue diferente y pudo ajustarse por una ley de potencias o por una distribución log-normal mientras que la de amplitudes no. Dado que el área de los *puffs* es un mejor reportero del acoplamiento entre canales (mediado por Ca^{2+}) que la amplitud de los *puffs*, cuando los canales están relativamente separados entre sí se espera encontrar un comportamiento tipo ley de potencias si se incluye también en la estadística a las señales que involucran canales de varios cúmulos.

Para investigar la distribución de tamaños de señales que involucran la apertura de RIP_3 s en varios cúmulos se extendió el modelo de [53] para incluir el acoplamiento entre cúmulos. La primera modificación que se probó trataba a cada señal de forma independiente de las otras. Esto llevó a una distribución similar a la de las señales locales (intra-cúmulo) que no seguía una ley de potencias. Esta primera extensión del modelo, sin embargo, no es adecuada en situaciones en las que las células están constantemente sometidas a un estímulo como en [51]. En ese caso, asumir que las señales actúan independientemente una de otra no es muy realista. Se ha reportado que varias señales

locales usualmente preceden a las ondas de Ca^{2+} , particularmente cuando las células están expuestas a una liberación constante de IP_3 como se hizo en [51]. Esto indica que, en una situación de estímulo continuo, las señales se afectan entre sí, especialmente cuando involucran la apertura de muchos canales en varios cúmulos distintos. Para tener en cuenta este acoplamiento entre señales, se extendió el modelo inter-cúmulo incluyendo tanto la dinámica de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica global como la activación e inactivación de los RIP_3 s con IP_3 ligado en la apertura de los canales. Usando valores de parámetros realistas, se obtuvieron distribuciones para el número de cúmulos y para el número de canales que participaron de las señales. Estas distribuciones se ajustaron por una ley de potencias con exponentes que están dentro de los valores obtenidos para la distribución de tamaños de *puff* obtenida a partir de los experimentos. Se investigó cuán robusto era este comportamiento cambiando los valores de varios parámetros del modelo (la distancia media entre cúmulos, dm , el tiempo medio que un RIP_3 permanece inhibido, t_{inh} , la tasa a la cual el Ca^{2+} citosólico decae a su valor basal, δ_{Ca} y el radio de influencia de un canal abierto, r_{inf}). Se determinó, en particular, que las distribuciones podían seguir siendo ajustadas por una ley de potencias si se cambiaba cualquiera de estos parámetros alrededor de los valores usados en las simulaciones originales. Se puede tener certeza entonces de que la distribución de tamaño de las señales tiene una cola larga y esto podría tener implicaciones fisiológicas.

La distribución de tamaños de eventos no tenía cola larga para todos los valores de parámetros explorados en el modelo. En particular, cuando se disminuyó un orden de magnitud la tasa de remoción del Ca^{2+} citosólico, δ_{Ca} , se obtuvo una distribución de tipo gaussiana alrededor de un valor medio para el número de RIP_3 s (Fig. 2.8) que participaban de cada señal. Se analizó cómo la media y el desvío estándar del número de RIP_3 s participantes variaban con cada uno de los parámetros mencionados anteriormente. Se halló que, en la mayoría de los casos explorados, el desvío aumentaba con la media. La excepción fue la situación hallada para valores de δ_{Ca} pequeños en la que se obtuvo que el desvío, σ_{N_o} , aumentaba poco mientras que la media, $\langle N_o \rangle$, disminuía cuando δ_{Ca} aumentaba hasta un punto en el cual se observaba un gran aumento en σ_{N_o} (Fig. 2.7). Esto indica una transición desde una situación con una distribución tipo gaussiana a una situación en la cual la distribución tenía cola larga y podía ser ajustada por una ley de potencias (por lo menos sobre un rango de tamaños de señales). Para entender por qué se obtuvieron estos diferentes comportamientos, se compararon el número de RIP_3 s activos, N_{act} , y el número de RIP_3 s que participaron de una señal, N_o , en cualquier tiempo dado. Se observó que, mientras que en los casos en que la distribución tiene cola larga, N_o era inferior a N_{act} para la mayoría de los eventos, el número de RIP_3 s participantes era igual al de RIP_3 s activos en casi todos los eventos en el caso de la distribución gaussiana. En particular, se llega a esta situación disminuyendo δ_{Ca} porque,

de esta forma, la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica permanece lo suficientemente alta de forma que no importa cuán pequeña sea la adición de Ca^{2+} liberado por un RIP_3 abierto, todos los RIP_3 s se abren apenas se vuelven activos. Por lo tanto, en esta situación el acoplamiento entre canales casi no actúa. De esta forma, luego de una señal que involucra la apertura de casi todas las unidades disponibles, es muy raro que una unidad recién abierta tenga a otra unidad activa en su vecindad para inducir su apertura y la propagación de la señal fallará. Por lo tanto, lo más probable es que se sucedan pequeñas señales hasta que un número de RIP_3 s lo suficientemente grande se active nuevamente. La distribución aleatoria y en parches espaciales de unidades excitables activas es un ingrediente básico para la existencia de distribuciones de eventos con una cola larga como la que se observa en el modelo y en [58]. Esto también es clave para la gran variabilidad del intervalo de tiempo entre *spikes* como se ha observado en [51, 33]. Cuando todas las unidades están globalmente acopladas (o están continuamente sometidas a un ambiente que las hace disparar apenas se activan) la distribución espacial aleatoria y rala de la excitabilidad desaparece, la distribución de tamaños de eventos deja de tener cola larga como se observa en el modelo. Se observó que la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica provee una forma muy efectiva de pasar de un sistema de cúmulos débilmente conectados entre sí en el cual la distribución de tamaños de las señales tiene cola larga y puede ser aproximada por una ley de potencias a un sistema globalmente acoplado con una distribución de tamaños de eventos de tipo gaussiana. Este último comportamiento se asemeja a lo que puede observarse en los experimentos de [51]: cuando se libera continuamente una concentración alta de IP_3 , el Ca^{2+} basal se acumula y la variabilidad de los intervalos entre *spikes* se vuelve despreciable. Las situaciones con un mecanismo de acoplamiento más eficiente pero que dependían de la propagación de la señal para producir un evento más grande (por ejemplo eligiendo $dm=r_{inf}$ pero dejando $\lambda=1$) no dieron una distribución puramente gaussiana sino que presentaron una mezcla de ley de potencias para eventos pequeños y una gaussiana para eventos más grandes. Los experimentos presentados en este capítulo y los de [51] se realizaron en ovocitos inmaduros. Se sabe que, con la maduración, el RE se reconfigura y la distribución espacial de los RIP_3 s cambia lo que, a su vez, da origen a señales de Ca^{2+} que tienden a distribuirse sobre una región espacial más amplia [59, 60]. Se ha discutido que un aumento de la sensibilidad del RIP_3 podría ser la causa de este comportamiento [61]. Los estudios de [62] mostraron que la disminución de mecanismos de remoción de Ca^{2+} citosólico que ocurre con la maduración es el factor más importante en determinar la dinámica distinta de las señales en el huevo en comparación con las de los ovocitos inmaduros. Lo más probable es que ocurra una combinación de causas cuyo efecto final sea acoplar más eficientemente los RIP_3 s evitando así la aleatoriedad de la excitabilidad observada en ovocitos inmaduros. De esta forma, el huevo maduro está listo para ser fertilizado y una onda de Ca^{2+} puede propagarse exitosamente [63]. El estudio presentado en este capítulo ilustra, por otro lado, cómo la inhibición de los

RIP_3 s causada por la elevación del Ca^{2+} citosólico y la posterior dinámica de este último están involucrados en el tiempo que transcurre entre señales globales sucesivas. Por lo tanto puede ser el Ca^{2+} citosólico a través de sus múltiples efectos sobre los RIP_3 s el que está implicado en que la distribución de tiempos entre señales sucesivas no sea completamente aleatoria como se observó y analizó en [64, 35].

Capítulo 3

Observación del Ca^{2+} luminal y caracterización de la geometría intracelular

3.1. Resumen

El rol del Ca^{2+} citosólico en la cinética de los RIP_3 s y en la dinámica de las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 s ha sido estudiado ampliamente tanto desde lo experimental como desde el modelado. El rol del Ca^{2+} luminal por otro lado no ha sido investigado con tanto detalle a pesar de que se ha hallado que es relevante para la terminación de las señales en el caso de liberación de Ca^{2+} a través de receptores de rianodina. La influencia del Ca^{2+} luminal sobre el RIP_3 , por otro lado, todavía no es clara. Con el fin de avanzar en este aspecto, se presenta en este capítulo un método sencillo para marcar Ca^{2+} luminal en ovocitos de *Xenopus laevis*. Se propone el uso del indicador de baja afinidad Fluo-5N AM para seguir las variaciones del Ca^{2+} luminal. Luego de demostrar que este indicador entra al RE y marca efectivamente el Ca^{2+} en su interior, se lo utilizó en conjunto con un indicador citosólico y con un marcador de membrana para caracterizar la geometría del RE en los ovocitos. Se usó finalmente al Fluo-5N AM para estudiar la recarga del Ca^{2+} luminal al RE luego de una liberación de Ca^{2+} breve pero intensa. Se combinaron experimentos y un modelo simple para cuantificar la tasa de recarga del Ca^{2+} luminal en el RE.

3.2. Marco general y motivación

La liberación de Ca^{2+} desde el RE no sólo aumenta la concentración de Ca^{2+} citosólico sino que también genera un microdominio luminal en donde la concentración de Ca^{2+} se ve disminuida. Esto puede ocasionar una disminución en la fuerza electroquímica que impulsa al Ca^{2+} desde el lumen del RE al citosol y una correspondiente disminución en el flujo de Ca^{2+} a través del canal. Otro proceso que puede influenciar la dinámica de liberación es la velocidad a la que se recupera el nivel de Ca^{2+} en el lumen luego de un vaciamiento. En los estudios realizados en miocitos en donde el Ca^{2+} es liberado desde el RE a través de los receptores de rianodina (RRi) se ha determinado que el Ca^{2+} luminal está directamente implicado en la terminación de las señales de Ca^{2+} , en particular en cardiomiocitos [36, 65]. Más aún, se ha mostrado recientemente que la apertura de algunos subtipos de RRi depende del Ca^{2+} luminal, explicando así el inicio de ondas de Ca^{2+} espontáneas y de arritmias disparadas por Ca^{2+} [66]. A pesar de la analogía entre RRi y RIP_3 s, la caracterización de sensores de Ca^{2+} luminal en RIP_3 s [67, 68] y la evidencia de que las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 dependen del contenido de los reservorios intracelulares [69, 70], el rol del Ca^{2+} luminal en la dinámica de las señales mediadas por RIP_3 es todavía poco claro [71, 72].

Si bien los protocolos y materiales necesarios para marcar Ca^{2+} en el citosol son conocidos y la bibliografía sobre este tema es extensa, no se conocen hasta el momento protocolos ni trabajos experimentales que describan como medir cambios en el Ca^{2+} luminal en ovocitos de *Xenopus laevis*. Como se sabe que dentro del RE las concentraciones de Ca^{2+} son alrededor de 10^4 veces superiores a las del citosol, se han utilizado indicadores análogos a los citosólicos pero de baja afinidad para marcar Ca^{2+} luminal en otras células [40, 73]. Uno de estos indicadores de baja afinidad es el Fluo-5N AM, un indicador análogo al Fluo-4 pero con distinta afinidad. El Fluo-5N AM fue usado anteriormente para sensar Ca^{2+} luminal en diferentes tipos celulares: fibras musculares del sapo de caña [74], miocitos de mamífero [75], miocitos cardíacos [76], astrocitos [77] y en células acinares pancreáticas [78] entre otros.

Con el objetivo de analizar la influencia del Ca^{2+} luminal sobre el RIP_3 y sobre la propagación de las señales mediadas por estos receptores, se presenta en este capítulo un método para observar Ca^{2+} luminal en ovocitos de *Xenopus laevis* con Fluo-5N AM. Hasta donde se tiene conocimiento, esta es la primera vez que este indicador se utilizó en este sistema modelo. Se realizaron distintos controles para verificar la hipótesis de que el Fluo-5N AM marca Ca^{2+} dentro del RE. Luego de probar que el método propuesto fuera útil, se estudiaron la distribución espacial y la dinámica del Ca^{2+} luminal haciendo uso del Fluo-5N AM y de otros indicadores.

3.3. Uso del indicador Fluo-5N AM para sensor Ca^{2+} luminal

Se propone al indicador de Ca^{2+} Fluo-5N AM como posible reportero del Ca^{2+} luminal en los ovocitos de *Xenopus laevis*. Las características de este fluoróforo se describen en el Apéndice A en donde también se detalla cómo se lo micro-inyectó en las células. El indicador Fluo-5N AM no se había usado previamente en ovocitos de *Xenopus laevis*. Es por ello que se debieron realizar varios controles y pruebas de viabilidad. Se presentan a continuación distintos experimentos que prueban la eficiencia del indicador Fluo-5N AM como reportero del Ca^{2+} luminal en ovocitos. En primer lugar se describe la evolución de la fluorescencia del indicador luego de ser inyectado en las células. Se muestra luego un control con dos distintos *buffers* de Ca^{2+} citosólico y finalmente se analiza la evolución de la fluorescencia del Fluo-5N AM al evocar una señal de Ca^{2+} fotoliberando IP_3 enjaulado.

3.3.1. Carga del Fluo-5N AM en el RE

Se realizó el siguiente experimento para cuantificar la evolución de la fluorescencia del indicador Fluo-5N AM dentro del ovocito. Luego de haber realizado la micro-inyección del indicador, se adquirió con el microscopio confocal la fluorescencia de un cuadro de 512×512 píxeles con un objetivo $60\times$ y con zoom $1\times$ lo que equivale a una región escaneada dentro del ovocito de $210 \times 210 \mu\text{m}^2$. En todos los casos la excitación del indicador se realizó con el mismo láser (línea 488 del láser de Ar) y la misma potencia. Los cuadros se adquirieron cada 30, 60 o 120 s. De esta forma, se colectó la fluorescencia de una región dentro del ovocito hasta dos horas después de haberlo micro-inyectado con Fluo-5N AM. Se computó la fluorescencia media de cada cuadro adquirido, $\langle F \rangle$, y se normalizó luego el registro temporal con respecto al máximo de este valor a lo largo del tiempo. Los resultados de este experimento para tres ovocitos distintos pueden verse en el gráfico de la Fig. 3.1.

Cada curva en el gráfico de la Fig. 3.1 representa un ovocito distinto. Las curvas con círculos llenos corresponden a mediciones realizadas en ovocitos en donde la concentración intracelular del Fluo-5N AM era $92 \mu\text{M}$ mientras que la curva con círculos vacíos corresponde a un ovocito en donde esta concentración era de $74 \mu\text{M}$. Se espera que la fluorescencia aumente a medida que el fluoróforo entra al RE y liga Ca^{2+} luminal. La disparidad entre las curvas puede atribuirse al hecho de que las mediciones se realizaron en tres ovocitos distintos y en regiones elegidas arbitrariamente dentro de estos últimos. La región que se adquiere en cada caso no contiene necesariamente la misma cantidad

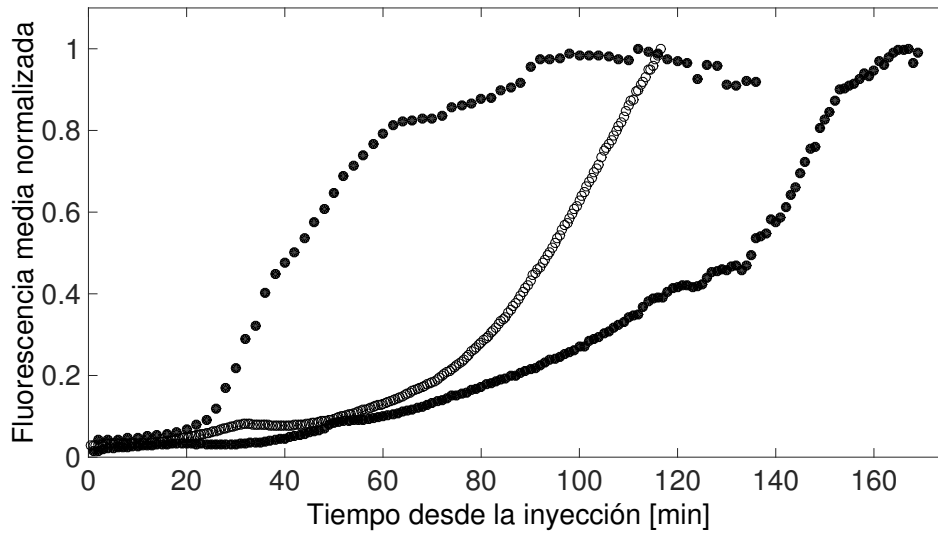


Figura 3.1: Evolución de la fluorescencia del indicador Fluo-5N AM luego de su inyección en tres ovocitos diferentes. Los gráficos representan la fluorescencia media normalizada en el tiempo durante la carga del indicador en el lumen del RE. [Fluo-5N AM]=74 μM (círculos vacíos), [Fluo-5N AM]=92 μM (círculos llenos).

de píxeles luminales (o dicho de otra forma, la misma cantidad de lumen de RE). En los tres casos mostrados en la Fig. 3.1 la fluorescencia tarda en aumentar (aproximadamente 20 min luego de la microinyección del indicador) y además se estabiliza más de una hora después de la inyección. Este retraso puede deberse al tiempo que le lleva al indicador entrar al RE y reportar Ca^{2+} luminal o podría haber un artefacto experimental y el Fluo-5N AM podría estar sensando Ca^{2+} citosólico. Con el fin de descartar esta última posibilidad se realizaron una serie de experimentos control que se describen a continuación.

3.3.2. Control con *buffers* citosólicos

Para descartar que el Fluo-5N AM esté reportando Ca^{2+} citosólico en vez de Ca^{2+} luminal se realizaron experimentos con este indicador en presencia de distintas concentraciones de dos *buffers* citosólicos exógenos. Los *buffers* utilizados fueron EGTA, *buffer* lento de Ca^{2+} , y BAPTA, *buffer* rápido de Ca^{2+} (ver Apéndice A para más detalles sobre estos compuestos). Se sabe que ambos compuestos compiten por el Ca^{2+} citosólico y bajan su concentración libre lo que resulta en una disminución de la fluorescencia ligada a indicadores de Ca^{2+} citosólico. Se inyectaron ovocitos con Fluo-5N AM y dos horas más tarde se colectó la fluorescencia con el microscopio confocal utilizando un objetivo 10 $\times$ para tener un campo de visión más amplio y así observar una región más grande del ovocito. Se adquirió la fluorescencia de una región de 512 $\times$ 512 píxeles con zoom 1 $\times$ lo que equivale a una región escaneada de 1280 $\times$ 1280 μm^2 . Para evaluar si los *buffers* afectan la fluorescencia del Fluo-5N AM en el interior del ovocito, se midió

la fluorescencia media en la región de adquisición, $\langle F \rangle$ y su dispersión, antes de inyectar cualquier *buffer*. Se repitió este procedimiento en el mismo ovocito pero luego de haber inyectado alguno de los *buffers* citosólicos. Una segunda inyección se realizó para aumentar la concentración de *buffer* en el citosol. Se pueden ver en las Figs. 3.2 y 3.3 los resultados obtenidos para EGTA y BAPTA respectivamente.

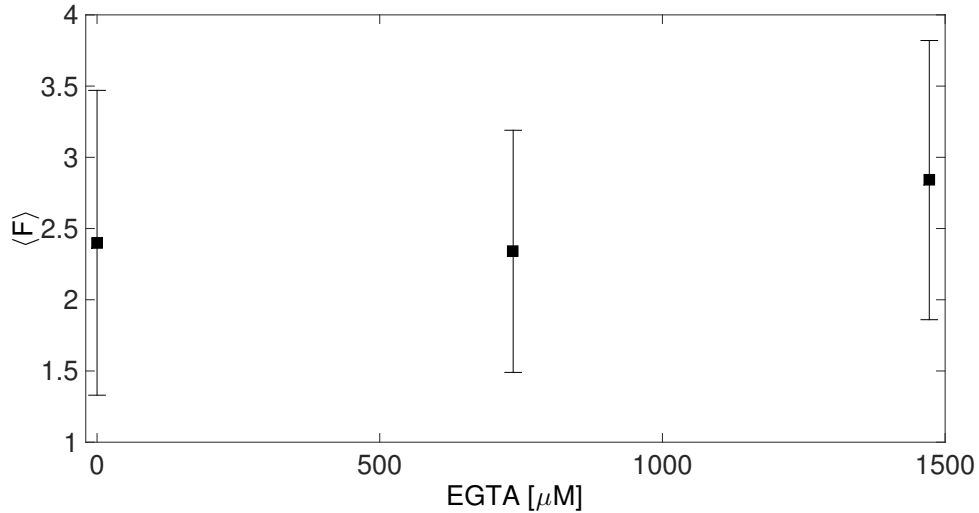


Figura 3.2: Fluorescencia media del indicador Fluo-5N AM al variar la concentración intracelular del *buffer* EGTA.

En la Fig. 3.2 se puede observar que la fluorescencia del indicador Fluo-5N AM no se ve afectada significativamente por las sucesivas inyecciones del *buffer* EGTA. A pesar de llegar a concentraciones intracelulares de EGTA de $\sim 1500 \mu\text{M}$ la fluorescencia no se alteró. Al haber promediado la fluorescencia en una región tan grande se espera que este valor tenga un desvío grande como los que presentan los puntos del gráfico de la Fig. 3.2. Se muestran en la Fig. 3.3 los resultados obtenidos para el *buffer* rápido BAPTA. Al igual que con el EGTA, la adición de BAPTA en el citosol del ovocito no modificó la fluorescencia del indicador Fluo-5N AM.

Si el indicador Fluo-5N AM estuviera sensando Ca^{2+} citosólico entonces la adición de los *buffers* exógenos debería modificar su fluorescencia. El agregado de *buffers* que compiten por el Ca^{2+} resultaría en una disminución en la concentración de Ca^{2+} ligado al indicador que se traduciría en una disminución de la fluorescencia en todo el ovocito. Como esta disminución de la fluorescencia no se observa en los datos presentados en las Figs. 3.2 y 3.3 se descarta que la fluorescencia observada pueda deberse a que el Fluo-5N AM esté ligando Ca^{2+} citosólico. En todo caso, puede afirmarse que la mayor contribución a la fluorescencia del indicador Fluo-5N AM proviene de estar ligado a Ca^{2+} en un reservorio que no es el citosol.

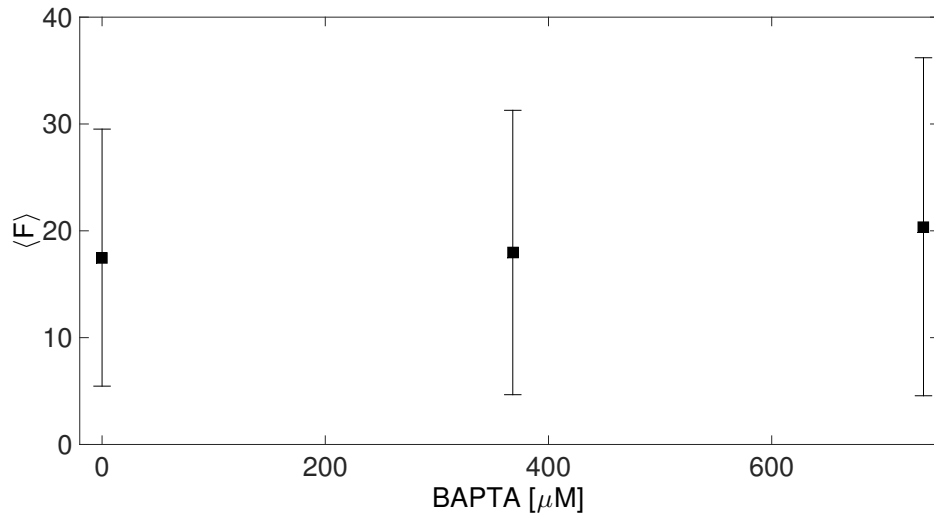


Figura 3.3: Fluorescencia media del indicador Fluo-5N AM al variar la concentración intracelular del *buffer* BAPTA.

3.3.3. Control con IP_3 enjaulado

Otra forma de evaluar que el indicador Fluo-5N AM esté sensando Ca^{2+} en el interior del RE y no en el citosol es seguir su fluorescencia durante una liberación de Ca^{2+} mediada por RIP_3s . Estas liberaciones se traducen en aumentos en la fluorescencia al usar indicadores citosólicos como el Fluo-4 o el Rhod-2 ya que la $[\text{Ca}^{2+}]$ aumenta en el citosol durante una liberación. Se produce por lo tanto una disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]$ dentro del RE que debería traducirse en una disminución de la fluorescencia al usar un indicador luminal. Con el objetivo de observar este comportamiento para el indicador Fluo-5N AM se realizó el siguiente control.

Se realizó un experimento en el cual se comparó el comportamiento de la fluorescencia del indicador Fluo-5N AM en dos casos. En el primer caso se inyectó solamente el indicador mientras que en el segundo caso se inyectó además IP_3 enjaulado. En ambos casos la concentración intracelular del Fluo-5N AM fue de $92 \mu\text{M}$ y en el caso del ovocito inyectado con IP_3 enjaulado la concentración intracelular de éste fue de $9 \mu\text{M}$. Se expuso a ambos ovocitos a un estímulo UV breve (duración $\sim 300 \text{ ms}$) mientras se adquiría la fluorescencia del Fluo-5N AM con el microscopio confocal (con un objetivo $60\times$) en modo line-scan para tener más resolución temporal. En ambos casos se escanearon líneas de 250 píxeles utilizando un tiempo por píxel de $10 \mu\text{s}$ lo que resultó en un tiempo por línea adquirida de 3.26 ms . Los resultados obtenidos para este experimento se muestran en la Fig. 3.4.

Se grafica en la Fig. 3.4 la evolución temporal de la fluorescencia promediada sobre la línea de adquisición (ver Apéndice B para más detalle sobre este promedio) y normalizada respecto del máximo ($\overline{F_N}$) para los dos casos descritos anteriormente. La barra negra

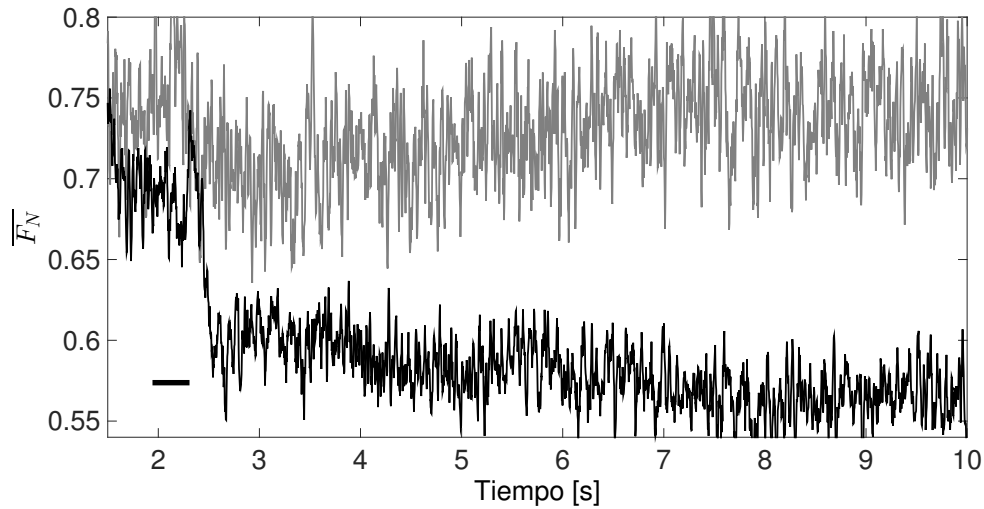


Figura 3.4: Evolución temporal de la fluorescencia promediada (y normalizada) sobre una línea de 250 píxeles para un experimento en el que se presenta un estímulo UV breve que se indica con una línea negra en la parte inferior del gráfico. La traza gris es un ovocito con Fluo-5N AM y la traza negra es un ovocito con Fluo-5N AM e IP_3 enjaulado.

en la parte inferior del gráfico indica el estímulo UV. La línea negra es la evolución de la fluorescencia del ovocito con IP_3 enjaulado mientras que la línea gris es la del ovocito sin IP_3 . A pesar de las fluctuaciones que ambos registros presentan a lo largo del tiempo de la adquisición, se ve una gran diferencia entre el ovocito con IP_3 y el ovocito sin IP_3 luego del estímulo UV. En el primero (línea negra) se observa cómo la fluorescencia decrece abruptamente luego del estímulo mientras que en el último no se observa esta disminución. Esta disminución rápida y abrupta indica que lo que se observa no es fotodaño del fluoróforo (o *bleaching*) a causa del UV pues sólo se observa en el ovocito con IP_3 . Cuando se fotolibera el IP_3 enjaulado, se produce una disminución de Ca^{2+} luminal. Esto provoca una disminución en la concentración de Ca^{2+} ligado a Fluo-5N AM alrededor de la región de liberación que se refleja en una disminución de la fluorescencia del indicador que permanece baja durante varios segundos. Esto se debe a que, como se trata de una liberación no localizada de Ca^{2+} , la zona luminal observada sufre una disminución de Ca^{2+} importante. Los mecanismos de reabsorción del Ca^{2+} luminal no son inmediatos y es por eso que se observa que la señal no recuperó su nivel inicial durante el tiempo del experimento. El ovocito control (sin IP_3 enjaulado) descarta la posibilidad de que la disminución de la fluorescencia del Fluo-5N AM se deba al pulso UV de fotoliberación.

El resultado de este control indica que el Fluo-5N AM se localiza dentro de algún reservorio intracelular en donde hay Ca^{2+} y además hay RIP_3 s que permiten su liberación hacia el citosol. Combinando este resultados con el de los experimentos realizados en presencia de *buffers* citosólicos, se puede afirmar que el Fluo-5N AM está sensando

Ca^{2+} dentro del RE o a lo sumo dentro de algún otro reservorio de Ca^{2+} que tenga RIP_3s en su superficie.

3.4. Imágenes estacionarias de las distintas estructuras del ovocito

En esta sección se combina el uso del Fluo-5N AM con el de otros indicadores para observar y comparar cómo se distribuyen los distintos fluoróforos en el ovocito en condiciones estacionarias. Este estudio tiene dos objetivos. Por un lado, contar con un control adicional para verificar que el Fluo-5N AM se localiza en el lumen del RE al comparar su distribución con la de indicadores cuya localización en el ovocito es conocida. Por otro lado permite cuantificar algunos de los aspectos que caracterizan la geometría del lumen y la del citosol. En particular, se usa para determinar la relación área volumen del primero y el volumen del segundo, parámetros de relevancia para el modelo que se introducirá en el Capítulo 4.

3.4.1. Citosol y lumen del RE

Con el objetivo de comparar la distribución del indicador luminal con la de un indicador citosólico, en el interior del ovocito, se realizaron los siguientes experimentos. En primer lugar se eligió un indicador citosólico cuya emisión fuera complementaria a la del Fluo-5N AM para poder usarlos simultáneamente. El Rhod-2 es un indicador de Ca^{2+} citosólico que satisface esta condición. Se utilizó este indicador primero con Fluo-4 y luego con Fluo-5N AM y se compararon las distribuciones de los dos pares de fluoróforos dentro del ovocito. Las propiedades de los indicadores citosólicos Fluo-4 (cuyas propiedades espectrales son análogas a las del Fluo-5N AM) y Rhod-2 se detallan en el Apéndice A.

Se muestran en la Fig. 3.5 las imágenes obtenidas al inyectar los indicadores citosólicos Fluo-4 y Rhod-2 en un mismo ovocito. Se presentan los canales correspondientes a cada una de las emisiones y una imagen en donde se superponen ambos canales. Las concentraciones intracelulares de los indicadores en este experimento fueron $[\text{Fluo-4}]=37\ \mu\text{M}$ y $[\text{Rhod-2}]=92\ \mu\text{M}$. Se adquirió la fluorescencia proveniente de un cuadro de 512×512 píxeles usando el objetivo $60\times$ y con zoom $10\times$ resultando en una región escaneada dentro del ovocito de $21 \times 21\ \mu\text{m}^2$.

Como se puede ver en las tres imágenes de la Fig. 3.5 ambos indicadores presentan una distribución similar dentro del ovocito. Ambos difunden en el citosol y emiten

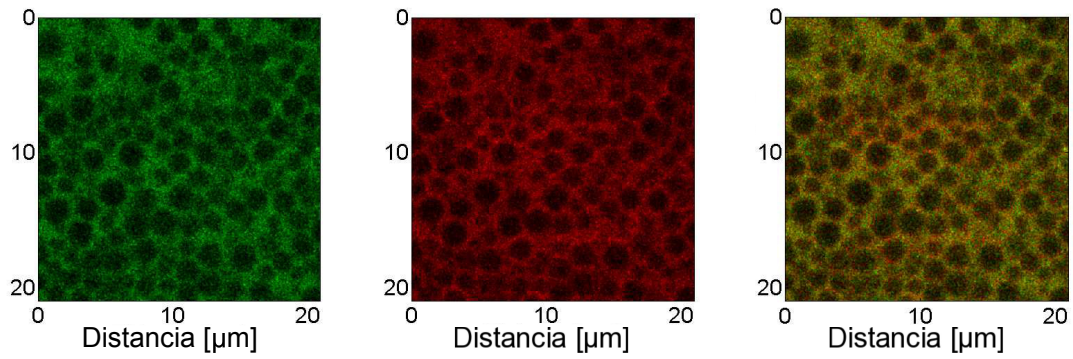


Figura 3.5: Distribución espacial de dos indicadores citosólicos dentro del ovocito: Fluo-5N AM (canal verde) y Rhod-2 (canal rojo). Imagen superpuesta de ambas distribuciones (canal amarillo).

fluorescencia al ligar Ca^{2+} por lo tanto su fluorescencia proviene de la misma región dentro de la célula. Las regiones oscuras que se observan en las 3 imágenes corresponden a regiones en donde los indicadores no entraron, pueden ser gránulos corticales, gránulos de pigmento o el interior de organelas intracelulares. Para cuantificar la colocación entre los dos indicadores, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson y se obtuvo un valor de 0,44. Este valor puede parecer bajo pero debe recordarse que este tipo de cálculos provee una comparación lineal. El Fluo-4 y el Rhod-2 tienen constantes de disociación muy distintas, 770 nM y 2000 nM respectivamente. Mientras que en condiciones basales puede esperarse que el Rhod-2 sea proporcional al Ca^{2+} libre, esta condición no necesariamente se aplica al Fluo-4. Esto último podría introducir una dependencia no lineal entre las distribuciones de la fluorescencia de ambos indicadores que podría resultar por lo tanto en el valor del coeficiente de correlación obtenido a partir de los resultados experimentales presentados.

A continuación se repitió el experimento pero reemplazando el Fluo-4 por Fluo-5N AM. Las imágenes obtenidas se muestran en la Fig. 3.6. En este experimento las concentraciones de los indicadores fueron $[\text{Fluo-5N AM}] = 92 \mu\text{M}$ y $[\text{Rhod-2}] = 92 \mu\text{M}$ y los parámetros de adquisición de la fluorescencia fueron los mismos que para el experimento anterior. La fluorescencia del canal verde (Fluo-5N AM) tiene una distribución espacial diferente de la fluorescencia del canal rojo (Rhod-2) como puede verse en las imágenes de la Fig. 3.6. Como en el experimento presentado en la Fig. 3.5 el indicador Rhod-2 marca Ca^{2+} citosólico mientras que el indicador Fluo-5N AM está marcando Ca^{2+} en algún otro reservorio intracelular. En este caso, se calculó nuevamente el coeficiente de correlación de Pearson para cuantificar la correlación entre los dos canales de fluorescencia observados y se obtuvo un valor de -0,017. Este valor indica que no hay correlación entre las imágenes provenientes de ambos canales. En la tercera imagen de la Fig. 3.6 en la que se muestra la fluorescencia superpuesta de los dos canales se observa que algunas de las estructuras que aparecen como discos oscuros en el canal del Rhod-2 se ven brillantes en el canal del

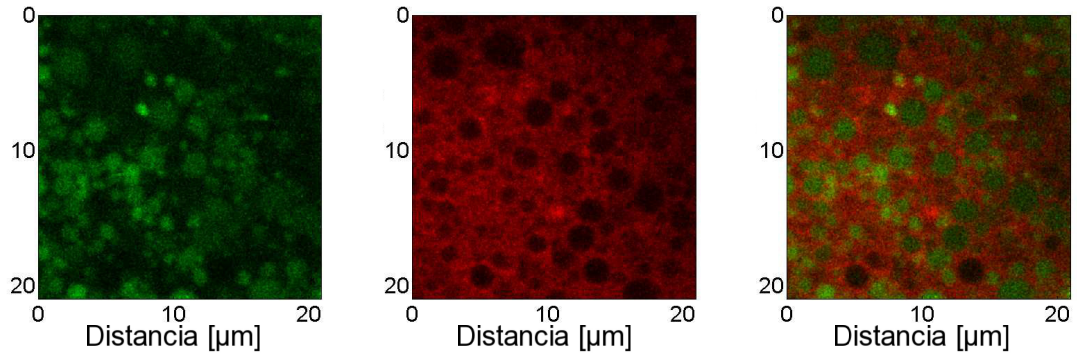


Figura 3.6: Distribución espacial de un indicador luminal (Fluo-5N AM en el canal verde) y un indicador citosólico (Rhod-2 en el canal rojo) en el interior de un ovocito. Imagen superpuesta de ambas distribuciones.

Fluo-5N AM casi como si la distribución espacial de los indicadores fuera complementaria en esas regiones del ovocito.

Al comparar los resultados obtenidos para los dos experimentos presentados en esta sección se observa que la distribución intracelular del indicador Fluo-5N AM es distinta de la distribución de los indicadores citosólicos Fluo-4 y Rhod-2. Las imágenes presentadas en esta sección junto con los resultados de los controles realizados en las secciones 3.3.1, 3.3.2 y 3.3.3 prueban que el indicador Fluo-5N AM no está quedándose en el citosol sino que su fluorescencia proviene de ligar Ca^{2+} en otro reservorio intracelular.

3.4.2. Membrana y lumen del RE

En esta sección se presentan los resultados obtenidos al observar la distribución intracelular de un marcador de membranas y del Fluo-5N AM. Se muestran en la Fig. 3.7 imágenes obtenidas luego de inyectar ovocitos con el indicador Fluo-5N AM y el marcador de membrana del RE Dil. Las características de este indicador se describen en el Apéndice A. Se presentan en las imágenes de la Fig. 3.7 los canales correspondientes a cada una de las emisiones y una imagen en donde se superponen ambos canales. La concentración intracelular del Fluo-5N AM utilizada fue de $92 \mu\text{M}$. Se adquirió la fluorescencia proveniente de un cuadro de 512×512 píxeles usando el objetivo $60\times$ con zoom $10\times$ resultando en una región escaneada dentro del ovocito de $21 \times 21 \mu\text{m}^2$.

El canal del Fluo-5N AM (canal verde) presenta estructuras grandes y rellenas y otras regiones más ruidosas y fuera de foco. Algunas de estas regiones parecen estar conectadas en la imagen y otras aisladas. El canal del Dil (canal rojo) presenta un patrón de marcado irregular con distintas estructuras similares a las descritas en [79] y en [80] en donde el mismo indicador se utilizó para marcar la membrana del RE.

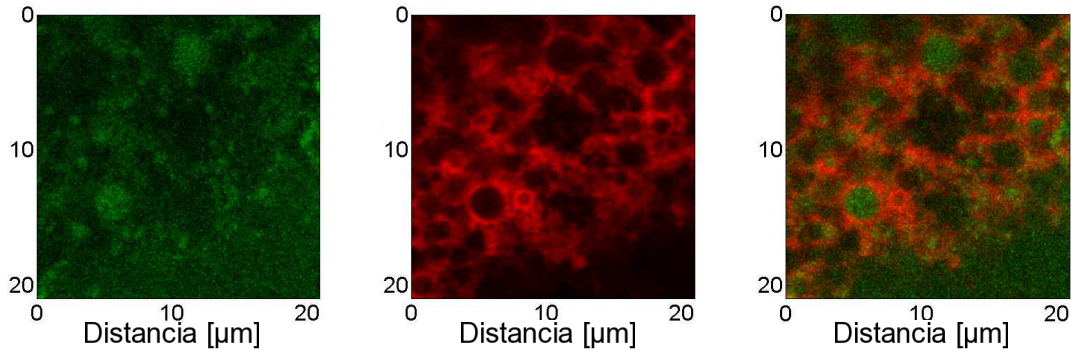


Figura 3.7: Distribución espacial del indicador luminal (Fluo-5N AM en el canal verde) y de un marcador de membrana (Dil en el canal rojo) en el interior de un ovocito. Imagen superpuesta de ambas distribuciones.

Algunas de estas estructuras del canal del Dil parecen encerrar volúmenes cilíndricos o esféricos. La membrana del RE no es una estructura chata sino más bien una red de túbulos y cisternas distribuidos en un gran volumen citosólico [81]. El Dil permite distinguir ciertas estructuras internas pero a causa de la distribución del retículo y de su morfología, no se puede afirmar si los espacios oscuros en la segunda imagen de la Fig. 3.7 son gránulos que están en el citosol, espacios internos del retículo u otras estructuras internas del ovocito. Observando la imagen de los dos canales superpuestos en la Fig. 3.7, se puede ver que algunas de las estructuras que aparecen oscuras en el canal del Dil están brillantes en el canal del Fluo-5N AM. El marcador de RE parece estar marcando el borde de dichas estructuras mientras que el Fluo-5N AM parece estar marcando su interior. Puede observarse también que hay sectores del ovocito que no están marcados por ninguno de los indicadores. La señal del Fluo-5N AM permite discernir cuáles de los espacios oscuros en la señal del Dil corresponden a gránulos y cuáles al interior del retículo.

Para las imágenes de la Fig. 3.7 se realizó nuevamente el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson y se obtuvo el valor 0.057. Este valor indica que no existe correlación entre la fluorescencia del canal verde y la del canal rojo como también puede observarse en las imágenes. Los dos indicadores no colocalizan dentro del ovocito. El Dil está sobre la membrana del RE (una estructura bidimensional) mientras que el Fluo-5N AM está ligado al Ca^{2+} dentro de un reservorio tridimensional que parece estar encerrado y delimitado por esta membrana.

3.4.3. Estimación de áreas y volúmenes intracelulares

Una vez que se determinó que el indicador Fluo-5N AM marcaba efectivamente el Ca^{2+} luminal contenido en el interior del RE, se lo utilizó nuevamente en conjunto con el indicador citosólico Rhod-2 para estimar la relación entre los volúmenes del citosol y

del lumen. Para tal fin se adquirieron imágenes similares a las presentadas en la Fig. 3.6 pero de 100×100 píxeles. El resto de los parámetros de adquisición se mantuvieron para obtener nuevamente la fluorescencia del indicador luminal en un canal de detección y la del indicador citosólico en el otro canal de detección. Para determinar el número de píxeles luminales y citosólicos en cada imagen se eligió primero un umbral T definido respecto de la fluorescencia media de cada imagen $\langle F \rangle$ (ver Apéndice B) y de su desvío estándar σ como $T = \langle F \rangle + 3\sigma$. De esta forma, se contaron los píxeles más brillantes provenientes del canal del Rhod-2 y del canal del Fluo-5N AM a los que se denominó píxeles citosólicos y luminales respectivamente. Se analizaron 37 pares de imágenes (cada imagen se forma con dos canales de fluorescencia) en las cuales se halló que el 36 % de los píxeles eran píxeles citosólicos y el 25 % eran luminales.

Con el fin de de estimar la relación entre el área y el volumen del RE en los ovocitos, se utilizaron las imágenes presentadas en la Fig. 3.7. En estas imágenes se contaron los píxeles más brillantes de cada canal de fluorescencia de la misma forma que se describió anteriormente para obtener una relación entre los píxeles correspondientes a la membrana del RE y a su lumen. En este caso el umbral utilizado para seleccionar los píxeles fue calculado como $T = \langle F \rangle + 5\sigma$. Suponiendo que las intersecciones de la membrana del RE y de su lumen con el plano de la imagen son unidimensional y bidimensional, respectivamente, se consideró que la fracción de píxeles que correspondía a cada una de estas regiones podía ser utilizada para estimar el cociente entre el área y el volumen del RE (en píxeles). Suponiendo además que los píxeles de la membrana del RE estaban sobre estimados en la imagen a causa de que la resolución lateral del microscopio confocal es 4 veces más grande que el tamaño de píxel utilizado se dividió a ese número de píxeles por 4. De esta forma se obtuvo un cociente de $\sim 1/5$ en píxeles que corresponde a un cociente entre área y volumen de $\sim 5 \mu\text{m}^{-1}$.

3.5. Estimación de la recarga del Ca^{2+} luminal

En esta sección se estudia la recarga de Ca^{2+} dentro del lumen del RE luego de una liberación prolongada. Como antes, los objetivos son dos: por un lado, mostrar nuevamente que el Fluo-5N AM marca el Ca^{2+} dentro de un reservorio intracelular y, por el otro, cuantificar la tasa a la que el Ca^{2+} reingresa en dicho reservorio.

3.5.1. Experimentos de liberación de Ca^{2+} prolongada

Se investigó el efecto sobre la dinámica del Ca^{2+} luminal de un estímulo UV más largo que el utilizado en el experimento mostrado en la Fig. 3.4. Las concentraciones

intracelulares de los compuestos utilizados en este tipo de experimento fueron $[\text{Fluo-5N AM}] = 74 \mu\text{M}$ o $92 \mu\text{M}$ y $[\text{IP}_3] = 9 \mu\text{M}$. Se adquirió la fluorescencia proveniente de un cuadro de 256×256 píxeles usando un objetivo $60\times$ con zoom $1\times$ resultando en una región escaneada dentro del ovocito de $105 \times 105 \mu\text{m}^2$. El estímulo UV se presentó 20 segundos después de haber comenzado la adquisición. A diferencia del estímulo breve utilizado en los experimentos control presentados en la Fig. 3.4, en este caso el estímulo UV duró hasta varios minutos.

Se computó la fluorescencia media de cada cuadro que luego se normalizó respecto del máximo para obtener $\langle F_N \rangle$. En la Fig. 3.8 se presentan dos resultados de este tipo de experimentos en donde se grafica $\langle F_N \rangle$ en función del tiempo. Se muestra en la Fig. 3.8 A la fluorescencia media normalizada para cada cuadro como función del tiempo para un experimento en el cual la duración del estímulo UV fue de 9 minutos. La barra en la parte superior del gráfico indica el estímulo UV y el ancho de la barra representa su intensidad. $\langle F_N \rangle$ decrece abruptamente luego de que comienza el estímulo al igual que lo que sucedía en el gráfico de la Fig. 3.4. La fluorescencia permanece casi constante a aproximadamente 70 % de su valor inicial luego de esta caída y mientras se mantiene el estímulo de fotoliberación del IP_3 enjaulado. Apenas se apaga el estímulo UV la fluorescencia del indicador luminal comienza a recuperarse. Con el fin de estudiar esta fase de recuperación, se realizaron más de estos experimentos en donde el estímulo fue una exposición UV más breve pero más intensa. Se muestra en la Fig. 3.8 B el gráfico de la fluorescencia media normalizada como función del tiempo para uno de estos experimentos. En este caso el estímulo se presentó durante aproximadamente 1 minuto.

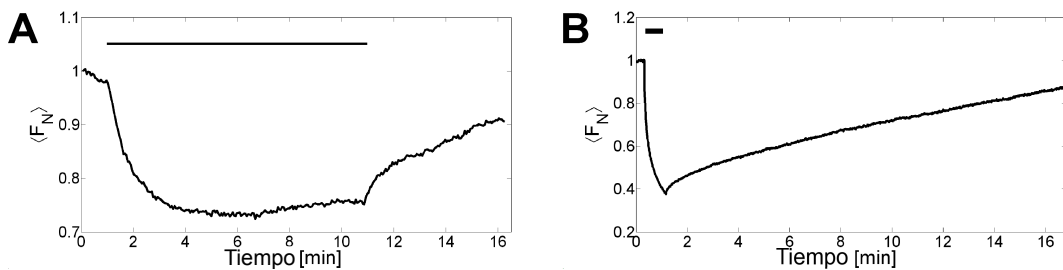


Figura 3.8: Evolución temporal de la fluorescencia media normalizada del Fluo-5N AM sobre un cuadro. **A** Estímulo prolongado (barra en la parte superior) con $[\text{Fluo-5N AM}] = 92 \mu\text{M}$. **B** Recuperación de la fluorescencia luego de un estímulo intenso con $[\text{Fluo-5N AM}] = 74 \mu\text{M}$.

El gráfico de la Fig. 3.8 B muestra que durante el tiempo en el cual se presenta el estímulo UV $\langle F_N \rangle$ decrece aproximadamente al 40 % de su valor inicial. Esto refleja la depleción parcial del Ca^{2+} luminal durante una liberación prolongada y global a través de los RIP_3 s. Luego de que se apaga el UV la fluorescencia comienza a recuperarse. Esta recuperación presenta dos fases, una fase inicial que parece ser rápida y exponencial

y una fase más lenta y lineal. La recuperación ocurre en una escala temporal mucho más lenta que la depleción de Ca^{2+} inducida por el IP_3 observada al inicio del registro temporal.

3.5.2. Modelo simple para la recarga del Ca^{2+} en el RE

Se presenta un modelo muy simple para relacionar la fluorescencia F del indicador Fluo-5N AM con la concentración media de Ca^{2+} luminal en la región de observación $\langle [Ca] \rangle$ durante el proceso de recarga del Ca^{2+} al RE luego de una liberación global. En este modelo Ca es el Ca^{2+} libre, CaD es el Ca^{2+} ligado al indicador (o *dye*) y CaB es el Ca^{2+} ligado a *buffers* luminales. La concentración total de Ca^{2+} en el lumen es entonces $[Ca]_T = [CaB] + [CaD] + [Ca]$. Si se supone que la concentración de Ca^{2+} ligado a indicador $[CaD]$ es proporcional a la concentración de Ca^{2+} libre $[Ca]$ (suponiendo que el Ca^{2+} y el indicador están en equilibrio y lejos de la saturación y que lo mismo ocurre para el Ca^{2+} y los *buffers* luminales) y que a su vez la fluorescencia del indicador F es proporcional a $[CaD]$ se tiene que:

$$[CaD] = \alpha_D [Ca], [CaB] = \alpha_B [Ca], F = \beta [CaD] \quad (3.1)$$

Por lo tanto, se puede vincular la fluorescencia en un píxel con la concentración de Ca^{2+} libre como $F = \beta \alpha_D [Ca]$ y su variación en el tiempo con una variación en la concentración de Ca^{2+} libre luminal como:

$$\frac{\partial F}{\partial t} = \beta \alpha_D \frac{\partial [Ca]}{\partial t}. \quad (3.2)$$

Se considera entonces que la fluorescencia media $\langle F \rangle$ es una medida del Ca^{2+} libre luminal dentro del volumen del RE observado, V , el que está delimitado en algunas direcciones por la membrana del RE (de área A) y que tiene espesor igual a la resolución axial del microscopio ($\sim 1 \mu m$) en la dirección perpendicular a la del plano de la imagen (ver esquema en la Fig. 4.3 del Capítulo 4). Se define la concentración media de Ca^{2+} libre luminal en ese volumen como:

$$\langle [Ca] \rangle = \frac{1}{V} \int_V [Ca] d^3r. \quad (3.3)$$

$\langle [Ca] \rangle$ puede variar a causa de flujos que entran o salen de V a través de A o desde dentro del lumen del RE. Como se quiere analizar el proceso de recaptura del Ca^{2+} , se considera que, pasado un transitorio donde pueden estar operando flujos luminales de carácter difusivo tendientes a uniformizar espacialmente la concentración luminal, el actor principal del proceso subsiguiente durante el que se restablecen los niveles originales

de Ca^{2+} luminal está constituido por las bombas SERCA localizadas en la superficie del RE (A). Se supone que la dinámica de las bombas es lo suficientemente lenta de forma tal que $[Ca]$, $[CaB]$ y $[CaD]$ están en equilibrio en la escala temporal de las bombas. Por lo tanto, se tiene que $[Ca_T] = (\alpha_B + \alpha_D + 1)[Ca]$ y:

$$\left. \frac{\partial \langle [Ca_T] \rangle}{\partial t} \right|_{\text{recarga}} = \frac{1}{V} (\alpha_B + \alpha_D + 1) \int_V \frac{\partial [Ca]}{\partial t} d^3r \Big|_{\text{recarga}} = \frac{1}{V} \int_A \vec{j}_{\text{SERCA}} \cdot d\vec{S} = J_{\text{SERCA}}, \quad (3.4)$$

donde J_{SERCA} es el flujo de Ca^{2+} a través de las bombas SERCA. Este modelo puede explicar la parte de la recuperación mostrada en la Fig. 3.8 B que depende linealmente del tiempo. La recuperación que la precede, de dependencia exponencial, sería la debida a flujos luminales difusivos como se menciona anteriormente.

3.5.3. Estimación del flujo de recarga

La evolución temporal de la fluorescencia del indicador luminal mostrada en la Fig. 3.8 refleja el comportamiento de toda la región escaneada ya que cada punto del gráfico representa el promedio espacial sobre todo el cuadro adquirido para un dado tiempo. Dado que el Ca^{2+} luminal no está homogéneamente distribuido dentro del RE y tampoco lo está el RE dentro de la célula [82], se puede estar perdiendo información espacial al estar promediando la fluorescencia sobre la región de $105 \times 105 \mu\text{m}^2$ escaneada. Para estudiar la recuperación del Ca^{2+} luminal dentro del RE luego de una liberación con más detalle, se dividió a cada cuadro en 16 sub-regiones (de 64×64 píxeles o $26 \times 26 \mu\text{m}^2$) y se analizó su fluorescencia media en el tiempo. A pesar de la heterogeneidad ya mencionada, el comportamiento cualitativo observado fue el mismo en todas las sub-regiones y similar al descrito en la Fig. 3.8 B. Solamente el valor de la intensidad de fluorescencia y el tiempo de recuperación cambiaron entre algunas sub-regiones. Para cuantificar esta heterogeneidad, se analizaron las sub-regiones de 10 experimentos distintos realizados en las mismas condiciones ($[\text{Fluo-5N AM}] = 74 \mu\text{M}$ y $[\text{IP}_3] = 9 \mu\text{M}$).

Con el fin de cuantificar el proceso de re-captura del Ca^{2+} a través de las bombas SERCA, se enfocó el análisis en la recuperación de la fluorescencia luego de que se remueve el estímulo de liberación de IP_3 . En particular, se analizó la fase lineal de la recuperación de la fluorescencia para cada sub-región. Se ajustó una función lineal a la recuperación de la fluorescencia en cada sub-región de cada experimento. De esta forma se obtuvo una estimación de la tasa de recuperación de la fluorescencia en cada sub-región. Se seleccionaron los mejores ajustes ($\mathcal{R}^2 > 0,9$). Se estimó también la fluorescencia basal media de cada sub-región $\langle F_b \rangle$ (ver detalle de este cálculo en el Apéndice B).

Para vincular la tasa de recuperación de la fluorescencia estimada a partir de los datos experimentales con el modelo presentado en la sección anterior para la recarga del Ca^{2+} en el RE se puede usar $\langle F_b \rangle$ y la Ec.3.2 de la siguiente forma:

$$\frac{1}{\langle F_b \rangle} \frac{\partial \langle F \rangle}{\partial t} \Big|_{\text{recup}} = \frac{1}{[Ca]_{\text{basal}}} \frac{\partial \langle [Ca] \rangle}{\partial t} \Big|_{\text{recarga}} = \frac{1}{[Ca]_{\text{basal}}} J_{\text{SERCA}}. \quad (3.5)$$

Si se grafican los valores $\frac{\partial \langle F \rangle}{\partial t} \Big|_{\text{recup}}$ en función de los valores $\langle F_b \rangle$ para cada una de las mediciones de las sub-regiones y se ajusta este gráfico con una función lineal se puede obtener una estimación del cociente entre el flujo J_{SERCA} y la concentración basal de Ca^{2+} luminal $[Ca]_{\text{basal}}$. Considerando estimaciones previas [83] de la concentración basal de Ca^{2+} luminal ($200 \mu\text{M} < [Ca]_{\text{basal}} < 1 \text{ mM}$), se puede por lo tanto estimar J_{SERCA} . La estimación del flujo a través de las bombas durante la recarga a partir de los datos experimentales y del rango para $[Ca]_{\text{basal}}$ es $0,08 \mu\text{Ms}^{-1} < J_{\text{SERCA}} < 0,4 \mu\text{Ms}^{-1}$.

3.6. Discusión

Se realizaron distintos controles para probar la eficiencia del Fluo-5N AM como indicador luminal en ovocitos de *Xenopus laevis*. En primer lugar, se evaluó la carga del indicador dentro de la célula (Fig. 3.1). Luego de determinar que la carga de este indicador presentaba un retraso temporal consistente con la idea de que para fluorescer el Fluo-5N AM debía lograr entrar al RE y ligar Ca^{2+} luminal, se realizaron controles utilizando *buffers* citosólicos. Como se vio que ninguno de los dos *buffers* utilizados (EGTA y BAPTA) modificaron los valores de fluorescencia del Fluo-5N AM registrados en el ovocito, se concluyó que este indicador no está difundiendo en el citosol sino que está sensando Ca^{2+} en otra región de la célula. Aún si alguna fracción del Fluo-5N AM estuviera en el citosol, la contribución de esta fracción a la fluorescencia total colectada no sería significativa a causa de la baja constante de disociación K_d del Fluo-5N AM [76]. Finalmente, se comparó la dinámica de la fluorescencia del Fluo-5N AM luego de presentar un estímulo UV con y sin IP_3 enjaulado. Se observó que el registro correspondiente al ovocito que tenía IP_3 presentaba una marcada disminución en la fluorescencia luego del estímulo de fotoliberación del IP_3 mientras que el UV no modificó la fluorescencia del Fluo-5N AM en el ovocito sin IP_3 . A partir de este control se pudo afirmar por lo tanto que el indicador Fluo-5N AM estaba sensando Ca^{2+} en un reservorio intracelular que posee RIP_3 s en su membrana. Se compararon luego la distribución espacial del Fluo-5N AM con las de indicadores citosólicos (ver Figs. 3.5 y 3.6) y de un marcador de membranas (ver Fig. 3.7). Se mostró que la distribución espacial del indicador Fluo-5N AM dentro del ovocito no colocaliza con la de otro indicador citosólico ni con la del marcador de membrana. Luego de realizar estos controles, se puede afirmar

que la fluorescencia del indicador Fluo-5N AM no proviene del citosol ni de la membrana del RE sino del lumen del RE en donde sensa Ca^{2+} luminal.

Las imágenes obtenidas al marcar el lumen y la membrana del RE confirman resultados previos [81] que indican que en los ovocitos de *Xenopus laevis* este reservorio ocupa un volumen considerable. El patrón de marcado del Dil y el del Fluo-5N AM muestran que la fluorescencia de ambos indicadores no colocaliza. El Dil marca la membrana del RE mientras que el Fluo-5N AM marca su volumen interno. El uso de ambos indicadores simultáneamente permite obtener información acerca de la forma y la morfología del RE en ovocitos. En estas células el RE tiene un volumen significativo y no es solamente una red de membranas conectadas. A partir de las observaciones experimentales realizadas se estimó que algunas de las estructuras del RE tienen forma cilíndrica con un diámetro medio de $2 \mu\text{m}$. Se estimó utilizando estas observaciones el cociente entre el área y el volumen del RE en los ovocitos y se obtuvo el valor $\sim 1/5$ (en píxeles).

Luego de probar que el Fluo-5N AM es un indicador de Ca^{2+} luminal viable en ovocitos de *Xenopus laevis*, se lo utilizó para evaluar la dinámica de recarga del Ca^{2+} luego de una liberación. Se fotoliberó el IP_3 enjaulado con un estímulo largo e intenso de luz UV para tener un evento de liberación de Ca^{2+} global. El gráfico de la Fig. 3.8 A es muy similar a los resultados presentados en [84] para la evolución del Ca^{2+} luminal en células acinares pancreáticas estimuladas con acetilcolina. En ese caso, la acetilcolina evoca un descenso en el Ca^{2+} luminal que dura todo lo que dura la presentación del estímulo de acetilcolina. Luego de que se remueve el estímulo, el Ca^{2+} luminal se recupera de la misma forma que se recupera la fluorescencia del Fluo-5N AM en la Fig. 3.8 A. Esto presenta otra evidencia de que este indicador está efectivamente sensando cambios en el Ca^{2+} luminal. Para analizar la recarga del Ca^{2+} en el RE se utilizó además un modelo simple para vincular la fluorescencia del Fluo-5N AM con la concentración de Ca^{2+} luminal en la región adquirida. Se consideró que luego de una liberación global el Ca^{2+} luminal aumentaba, después de un transitorio breve, únicamente a causa del flujo a través de las bombas SERCA ubicadas en la membrana del RE. Se utilizó la fluorescencia basal y estimaciones previas de la concentración basal de Ca^{2+} luminal para obtener un rango para el flujo de Ca^{2+} a través de las bombas SERCA: $0,08 \mu\text{M}s^{-1} < J_{\text{SERCA}} < 0,4 \mu\text{M}s^{-1}$. Se puede comparar este rango con la estimación teórica presentada en [85, 86]. Los autores proponen que se puede estimar J_{SERCA} como:

$$J_{\text{SERCA}} = \left(\frac{V_{\text{SC}}}{K_S + c} \right) \left(\frac{1}{c_e} \right), \quad (3.6)$$

Donde c es la concentración de Ca^{2+} citosólica, c_e es la concentración de Ca^{2+} luminal, $V_s = 120 \mu\text{M}^2\text{s}^{-1}$ y $K_S = 0,18 \mu\text{M}$. Si se considera que $c = 100 \text{ nM}$ y el rango $200 \mu\text{M}$ - 1 mM para c_e se obtiene por lo tanto a partir de la Ec. 3.6 $0,04 \mu\text{M}s^{-1} < J_{\text{SERCA}} < 0,21$

μMs^{-1} . Tanto el rango estimado experimentalmente como el flujo propuesto por los autores de [85] son consistentes.

Capítulo 4

Dinámica del Ca^{2+} luminal y citosólico durante el inicio de la liberación de Ca^{2+} a través de los $\text{RIP}_{3\text{S}}$

4.1. Resumen

En este capítulo se exploran la dinámica temporal del Ca^{2+} luminal y citosólico simultáneamente en ovocitos de *Xenopus laevis*. Haciendo uso del indicador luminal caracterizado en el Capítulo 3, se realizaron experimentos para observar Ca^{2+} luminal y citosólico en simultáneo. Para interpretar los resultados experimentales se desarrolló un modelo simple que permite analizar los flujos de Ca^{2+} en los primeros instantes de una liberación. Combinando las observaciones experimentales obtenidas y el modelo se concluyó que existe un mecanismo rápido que garantiza la disponibilidad de Ca^{2+} libre en el lumen aun cuando una señal relativamente grande es evocada. Comparando la dinámica de Ca^{2+} citosólico y luminal durante una liberación de Ca^{2+} se estimó que son consistentes con el hecho de que hay un 80 % de Ca^{2+} luminal ligado a *buffers*. La rápida disponibilidad de Ca^{2+} libre se relaciona con la observación experimental presentada en el Capítulo 3 de que el lumen ocupa un volumen considerable en varias regiones de la imagen.

4.2. Marco general y motivación

Como ya se mencionó en el Capítulo 3, el Ca^{2+} luminal moldea la dinámica de las señales intracelulares de Ca^{2+} mediadas por RRs [36, 65, 87, 66]. Para este tipo de señales, el Ca^{2+} luminal está directamente involucrado en la terminación de los eventos elementales de liberación denominados *sparks* de Ca^{2+} . Se ha observado que existe una depleción local y rápida de Ca^{2+} luminal correspondiente (que se denomina *blink* de Ca^{2+}) en la vecindad de un RRi abierto [87]. Estos eventos se han observado en células donde el SR forma microdominios en forma de cisternas. Esta depleción local puede disminuir la probabilidad de apertura de los canales y puede llevar también a una disminución de la corriente a través del canal. El rol del Ca^{2+} luminal en la cinética de las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 s no ha sido estudiado en tanto detalle. Es de esperarse que el Ca^{2+} luminal juegue un rol importante en la dinámica de las señales evocadas por RIP_3 s. En particular, las observaciones de [70] muestran que modulaciones en la recarga del retículo potencian los eventos globales de liberación a través de receptores de RIP_3 s y aumentan la frecuencia de puffs.

Con el fin de avanzar en este aspecto, se quiere investigar la dinámica del Ca^{2+} luminal durante un evento de liberación mediado por RIP_3 s. Luego de probar en el Capítulo 3 que el protocolo de carga del indicador Fluo-5N AM es efectivo y de validar la hipótesis que este indicador marca Ca^{2+} luminal y sigue su dinámica, se lo utilizó para seguir la dinámica del Ca^{2+} durante los eventos de liberación mediados por RIP_3 s. En el Capítulo 3 se mostraron los primeros resultados de estos experimentos en donde se analizó la dinámica temporal del Ca^{2+} luminal durante la recarga del RE a través de las bombas SERCA. Se cuantificó la tasa de recarga a partir de los datos experimentales y de un modelo simple. En este capítulo se utiliza el indicador Fluo-5N AM nuevamente para seguir la dinámica del Ca^{2+} luminal e investigar su rol durante las señales. Con el fin de seguir en simultáneo el Ca^{2+} luminal y el citosólico se utilizó además un indicador citosólico. El indicador citosólico más comúnmente usado para observar señales de Ca^{2+} en ovocitos es el Fluo-4 [51]. Este fluoróforo comparte las propiedades espectrales con el indicador luminal Fluo-5N AM. Por este motivo es imposible utilizar ambos indicadores durante un experimento ya que sería imposible distinguir sus contribuciones a la fluorescencia en cada píxel de la imagen. Se utilizó por lo tanto el indicador Rhod-2 para seguir al Ca^{2+} citosólico durante las señales.

4.3. Observación simultánea de la dinámica del Ca^{2+} luminal y citosólico durante una liberación

En esta sección se presentan los resultados obtenidos al usar simultáneamente el indicador luminal y un indicador citosólico para estudiar la dinámica temporal del Ca^{2+} durante un evento de liberación a través de los RIP_3 s. En la Sección 3.5 del Capítulo 3 se mostraron los resultados de seguir la evolución del Ca^{2+} luminal luego de una liberación intensa y global. La variación de 30 % en la $\langle F_N \rangle$ del Fluo-5N AM después del estímulo que se mostró en la Fig. 3.8 A del Capítulo 3 no parece ser equivalente a los cambios que se observan usualmente durante una señal de Ca^{2+} cuando se la observa desde el lado citosólico. Para explorar este aspecto de la dinámica del Ca^{2+} luminal, se realizaron una serie de experimentos en los que se adquirió simultáneamente la fluorescencia del indicador citosólico Rhod-2 y del indicador luminal Fluo-5N AM durante un evento de liberación de Ca^{2+} para estímulos de fotoliberación de IP_3 prolongados.

4.3.1. Experimentos de liberación prolongada

Se describen a continuación los experimentos en los cuales se observó la dinámica del Ca^{2+} luminal y citosólico simultáneamente durante un evento de liberación evocado fotoliberando de manera continua IP_3 dentro de los ovocitos. Se utilizaron ovocitos inyectados con el indicador luminal Fluo-5N AM y con el indicador citosólico Rhod-2. Estos indicadores de Ca^{2+} pueden ser utilizados en una misma célula ya que sus espectros de emisión están bien separados (ver Apéndice A). De esta forma se pueden seguir simultáneamente las variaciones del Ca^{2+} luminal y citosólico observando la fluorescencia de ambos indicadores. Como en los experimentos presentados en capítulos anteriores, se evocaron las liberaciones de Ca^{2+} a través de RIP_3 s fotoliberando IP_3 enjaulado dentro del ovocito. En los experimentos presentados en esta sección las concentraciones de Fluo-5N AM, Rhod-2 e IP_3 enjaulado fueron de 15 μM , 68 μM y 7 μM respectivamente. La fluorescencia de los indicadores se adquirió con el microscopio confocal (usando un objetivo 60 $\times$) y se utilizaron los láseres de 488 nm y 543 nm para excitar al Fluo-5N AM y al Rhod-2 respectivamente. El compuesto enjaulado se fotoliberó con exposiciones UV de muy baja intensidad y prolongadas. Los canales de emisión de los fluoróforos se procesaron primero para eliminar posibles efectos no deseados de sangrado del canal del Rhod-2 en el canal del Fluo-5N AM (ver Apéndice B para más detalles). Se adquirió la fluorescencia proveniente de un cuadro de 100 $\times$ 100 píxeles con zoom 1 $\times$ resultando en una región escaneada dentro del ovocito de 41 $\times$ 41 μm^2 . Se realizó este tipo de experimento 37 veces en 10 ovocitos distintos. Se presentan a continuación los resultados obtenidos y su análisis.

4.3.2. Variación de la fluorescencia de los indicadores luminal y citosólico durante una liberación de Ca^{2+}

Para cuantificar el comportamiento tanto del Ca^{2+} luminal como citosólico durante los eventos de liberación, se analizó la fluorescencia de los dos indicadores en cada cuadro. Para ello, se trabajó con el valor medio de la fluorescencia sobre todo el cuadro $\langle F \rangle$ (ver detalle de este cálculo en el Apéndice B). De esta forma se obtienen para cada tiempo t los valores $\langle F_{\text{Fluo-5N}} \rangle$ y $\langle F_{\text{Rhod-2}} \rangle$ que representan la fluorescencia media del Fluo-5N AM y del Rhod-2 sobre todo el cuadro adquirido. Se muestran en las Figs. 4.1 y 4.2 los resultados de uno de estos experimentos en donde se observa una liberación de Ca^{2+} con los dos indicadores. En ambos casos se grafica la fluorescencia media sobre todo el cuadro en función del tiempo y se indica con una barra negra en la parte superior del gráfico el estímulo UV de fotoliberación. El ancho de la barra indica que en este caso el estímulo UV de fotoliberación fue de baja intensidad. En la Fig. 4.1

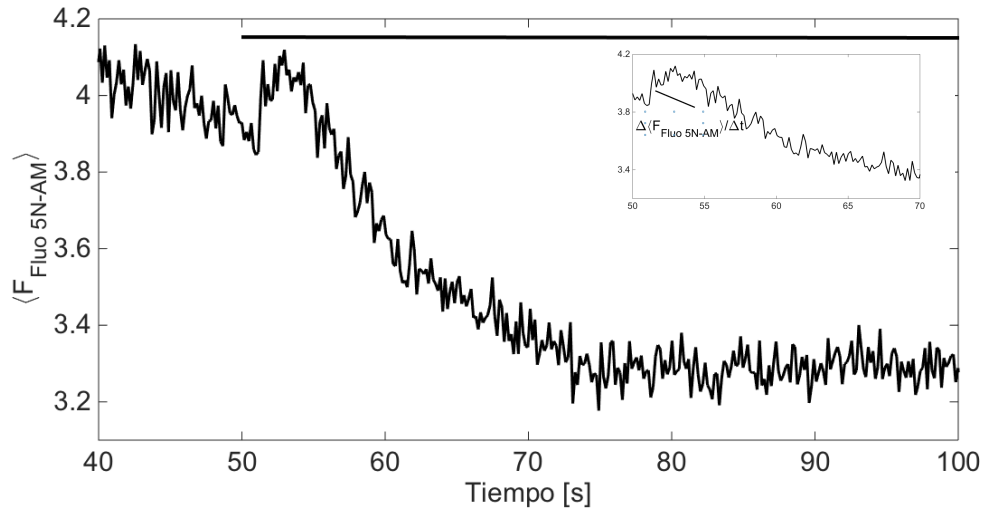


Figura 4.1: Evolución temporal de la fluorescencia media (promedio sobre un cuadro) del Fluo-5N AM durante una liberación prolongada. La barra en la parte superior del gráfico indica el estímulo UV de fotoliberación. El recuadro muestra una ampliación en donde se esquematiza el cálculo de la variación de la fluorescencia.

se muestra la evolución de la fluorescencia media del Fluo-5N AM en presencia de un estímulo UV prolongado que se enciende ~ 50 s después del inicio de la adquisición y se deja durante el resto del experimento. La Fig. 4.2 muestra la evolución de la fluorescencia media del Rhod-2 correspondiente. Luego de que la fotoliberación del IP_3 enjaulado comienza, se genera un evento global que provoca una gran liberación de Ca^{2+} desde el RE hacia el citosol. Se produce por lo tanto una disminución abrupta de la fluorescencia del indicador luminal y un aumento de la fluorescencia del indicador citosólico. Comparando ambas figuras, sin embargo, se puede observar que en el canal del Fluo-5N AM los cambios son mucho más moderados que en el canal del Rhod-2 (notar la diferencia de las escalas verticales entre los gráficos de las Figs. 4.1 y 4.2). Se observa

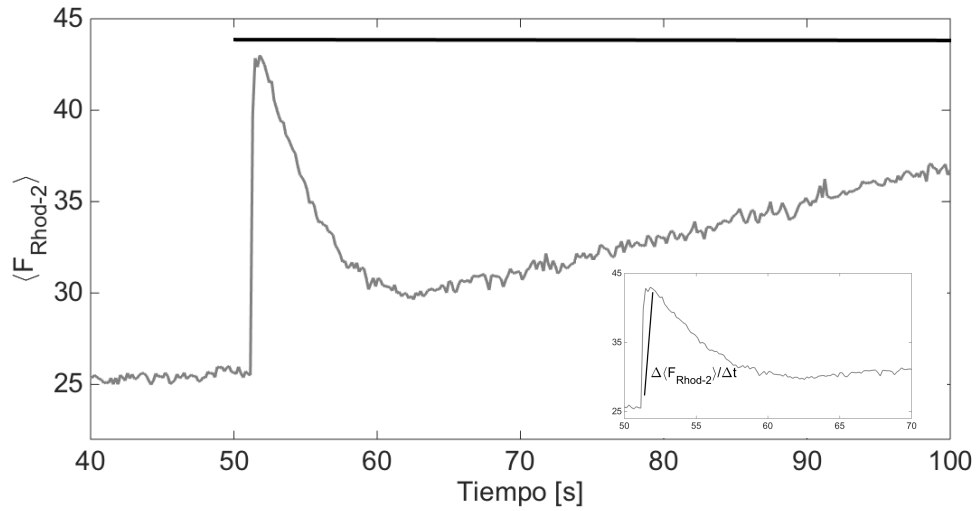


Figura 4.2: Evolución temporal de la fluorescencia media (promedio sobre un cuadro) del Rhod-2 durante una liberación prolongada. La barra en la parte superior del gráfico indica el estímulo UV de fotoliberación. El recuadro muestra una ampliación en donde se esquematiza el calculo de la variación de la fluorescencia.

también que luego de una elevación inicial muy rápida y marcada, la fluorescencia del Rhod-2 eventualmente decrece aún si el estímulo UV sigue encendido. La fluorescencia del Fluo-5N AM también decrece de forma menos abrupta a la bajada inicial que se produce apenas empieza la fotoliberación del UV. Este comportamiento se observó en todos los experimentos realizados en donde los cambios en la fluorescencia del Rhod-2 siempre fueron más importantes que los cambios en la fluorescencia del Fluo-5N AM. Este comportamiento puede deberse a intercambios de Ca^{2+} que ocurren con regiones fuera de la región de adquisición que se está observando. Si bien se puede asumir que existen estos intercambios, es poco probable que este acoplamiento espacial ocurra justo después del inicio de la fotoliberación del IP_3 enjaulado. Por lo tanto, durante los primeros instantes luego del inicio de la fotoliberación se pueden comparar las variaciones de la fluorescencia del Fluo-5N AM y del Rhod-2 despreciando estos intercambios con otras regiones. Con el fin de tener una comparación cuantitativa de las variaciones del Ca^{2+} tanto en el lumen como en el citosol inmediatamente después de que se presenta el estímulo UV de fotoliberación, se computaron las variaciones en la fluorescencia de ambos indicadores en estos primeros instantes como se indica en los recuadros de las Figs. 4.1 y 4.2. Se estimaron las variaciones en la fluorescencia primero en el canal del Rhod-2. Se consideró para esta variación el cambio que ocurre en la curva de $\langle F_{\text{Rhod-2}} \rangle$ desde el nivel basal al pico como se observa en el recuadro de la Fig. 4.2. Se calculó el Δt correspondiente y luego se estimó a partir de ese Δt el $\Delta \langle F_{\text{Fluo-5N}} \rangle$ a partir de los datos del canal del Fluo-5N AM. Se calculó también la fluorescencia media basal $\langle F_b \rangle$ antes del estímulo UV para los dos indicadores (ver detalle en el Apéndice B). Se computaron de esta forma los cocientes $\left. \frac{\Delta \langle F \rangle}{\Delta t} \right|_{R2}$ y $\left. \frac{\Delta \langle F \rangle}{\Delta t} \right|_{R2}$ y los valores medios basales para los 37 experimentos analizados. Luego de juntar todos los datos correspondientes para cada

indicador, se calculó el valor medio de todos los valores obtenidos y se derivaron las estimaciones $\left. \frac{1}{\langle F_b \rangle} \frac{\Delta \langle F \rangle}{\Delta t} \right|_{R2} = 1,5 \text{ s}^{-1}$ y $\left. \frac{1}{\langle F_b \rangle} \frac{\Delta \langle F \rangle}{\Delta t} \right|_{F5} = -0,0023 \text{ s}^{-1}$ para Rhod-2 y Fluo-5N AM respectivamente.

4.4. Modelo para las variaciones de Ca^{2+} y la fluorescencia

Se presenta en esta sección un modelo para interpretar las observaciones experimentales realizadas. El modelo tiene en cuenta la dinámica del Ca^{2+} a ambos lados de la membrana del RE durante una liberación mediada por RIP_3s y vincula sus cambios temporales con variaciones en la fluorescencia de los indicadores.

4.4.1. Dinámica del Ca^{2+} a ambos lados de la membrana del RE durante una liberación mediada por RIP_3s

A continuación se presenta un modelo simple que se desarrolló para describir y explicar las características principales de la dinámica temporal del Ca^{2+} citosólico y luminal obtenida en los experimentos de la sección anterior. En este modelo se considera que tanto en el lumen como en el citosol el Ca^{2+} puede estar libre, ligado al fluoróforo o ligado a *buffers* endógenos. Se denomina Ca al Ca^{2+} libre, CaD al Ca^{2+} ligado al fluoróforo y CaB al Ca^{2+} ligado a *buffers*. La concentración total de Ca^{2+} en el lumen del RE como en el citosol puede por lo tanto expresarse como $[Ca_T^{(L,c)}] = [CaB^{(L,c)}] + [CaD^{(L,c)}] + [Ca^{(L,c)}]$ en donde los superíndices (L, c) indican Ca^{2+} luminal o citosólico respectivamente. Para poder comparar el modelo con las observaciones experimentales, se promedian las concentraciones sobre un volumen luminal (V_L) o citosólico (V_c) que no necesariamente abarca todo el volumen de estos reservorios. Se define la derivada temporal del promedio de la concentración total de Ca^{2+} en cualquiera de estos volúmenes como:

$$\frac{\partial \langle [Ca_T^{(L,c)}] \rangle}{\partial t} \equiv \frac{1}{V_{L,c}} \int_{V_{L,c}} \frac{\partial [Ca_T^{(L,c)}]}{\partial t} d^3r, \quad (4.1)$$

con expresiones equivalentes para las otras concentraciones ($[CaB^{(L,c)}]$, $[CaD^{(L,c)}]$ y $[Ca^{(L,c)}]$). Los volúmenes (parciales), V_L o V_c , están limitados por un área común, A , que corresponde a la membrana del RE. Se dice que los volúmenes V_L o V_c son parciales porque se quiere conectar el modelo con los resultados experimentales y las imágenes experimentales no abarcan toda la célula sino solamente la región de observación. Por lo tanto, los volúmenes observados están parcialmente rodeados por otra área que es un artefacto de la medición y que está determinada por el tamaño finito de la imagen como se puede ver en el esquema de la Fig. 4.3. En este esquema se representa una región de

observación en donde hay volúmenes pertenecientes al lumen del RE (en verde) y áreas perteneciente a la membrana del RE (en rojo). En esas áreas de intercambio se localizan los RIP_3 s y las bombas SERCA. Se considera que las variaciones en el Ca^{2+} luminal y citosólico durante un evento provienen mayoritariamente de la liberación de Ca^{2+} a través de los RIP_3 s y de la difusión como se modela en las Ecs. 4.2 y 4.3.

$$\left. \frac{\partial \langle [\text{Ca}_T^{(L)}] \rangle}{\partial t} \right|_{lib} = -\frac{1}{V_L} \left(\int_A \vec{j}_{\text{RIP}_3} \cdot d\vec{S} - \int_{A_L} \left(D_{\text{Ca}} \nabla [\text{Ca}^{(L)}] + D_B \nabla [\text{Ca}B^{(L)}] + D_D \nabla [\text{Ca}D^{(L)}] \right) \cdot d\vec{S}, \right. \quad (4.2)$$

$$\left. \frac{\partial \langle [\text{Ca}_T^{(c)}] \rangle}{\partial t} \right|_{lib} = \frac{1}{V_c} \left(\int_A \vec{j}_{\text{RIP}_3} \cdot d\vec{S} + \int_{A_c} \left(D_{\text{Ca}} \nabla [\text{Ca}^{(c)}] + D_B \nabla [\text{Ca}B^{(c)}] + D_D \nabla [\text{Ca}D^{(c)}] \right) \cdot d\vec{S}, \right. \quad (4.3)$$

donde $\vec{j}_{\text{RIP}_3}$ es el flujo de Ca^{2+} a través de los RIP_3 s abiertos localizados en el área de intercambio RE-citosol, A . El subíndice “lib” se refiere al hecho de que se está modelando la dinámica durante un evento de liberación de Ca^{2+} . D_{Ca} , D_B y D_D representan los coeficientes de difusión del Ca^{2+} libre, del *buffer* y del fluoróforo respectivamente. $\langle [\text{Ca}_T^{(L,c)}] \rangle$ es la $[\text{Ca}^{2+}]$ media total en un volumen $V_{L,c}$ totalmente contenido en el lumen o en el citosol. Las porciones de los volúmenes $V_{L,c}$ que se observan en los experimentos no necesariamente están conectadas. Como ya se mencionó, estos volúmenes pueden estar rodeados por el área A o por un área que es un artefacto impuesto por la configuración experimental. En el panel de la izquierda del esquema de la Fig. 4.3 se selecciona

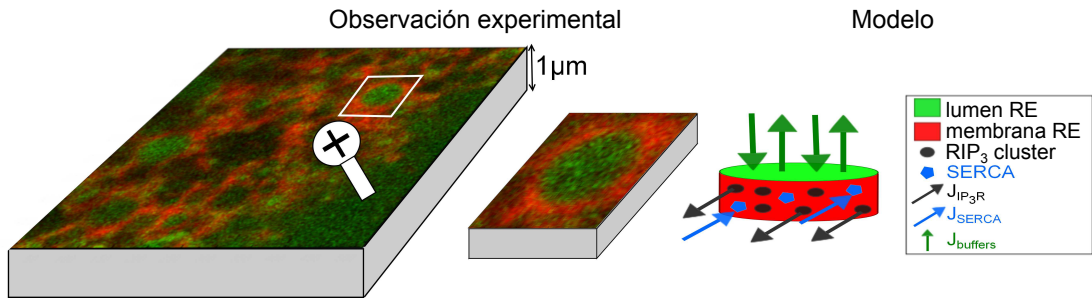


Figura 4.3: Diferentes áreas del modelo. El área de intercambio entre el RE y el citosol en donde están los RIP_3 s que se representa en rojo, A , y el área que delimita la región de observación que se representa con los bordes grises.

una porción conectada entre sí de V_L que se reproduce a mayor escala a la derecha. En el panel de la derecha se presenta un esquema en el que se representa esta porción como un cilindro. El área lateral del cilindro (en rojo) es parte del área de intercambio A a través de la cual fluye el Ca^{2+} mientras que las áreas de las tapas del cilindro forman

parte del área que es un artefacto de la medición, A_L . El volumen de este cilindro forma parte de V_L . Las áreas laterales (en gris) del esquema a la izquierda de la Fig. 4.3 también forman parte del área que es un artefacto y que delimita tanto el lumen (A_L) como el citosol (A_c) dependiendo de la región. Los términos de flujos difusivos en las Ecs. 4.2 y 4.3 corresponden a flujos a través de A_L o A_c , dentro del lumen o del citosol respectivamente. Estos términos difusivos se desprecian en ambas variaciones citosólicas y lumbales cuando se aplica el modelo a las observaciones experimentales. Durante los primeros instantes de una liberación de Ca^{2+} mediada por RIP_3 s la concentración total de Ca^{2+} promedio en V_L o en V_c varía principalmente a causa del intercambio a través de los RIP_3 s localizados en el área común A . En este modelo se desprecia por lo tanto el flujo difusivo de Ca^{2+} a través de otras áreas que delimitan V_L o V_c . Se desprecian también los efectos de las bombas de Ca^{2+} y de las pérdidas de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática durante los primeros instantes de una liberación porque se asume que ocurren en una escala de tiempo mucho más lenta. De esta forma, la dinámica de la $[\text{Ca}^{2+}]$ luminal total al inicio de una liberación puede modelarse como:

$$\left. \frac{\partial \langle [\text{Ca}_T^{(L)}] \rangle}{\partial t} \right|_{lib} \approx -\frac{1}{V_L} \left(\int_A \vec{j}_{\text{RIP}_3} \cdot d\vec{S} \right) \equiv -J_{\text{RIP}_3}. \quad (4.4)$$

El mismo evento pero visto desde el citosol representa un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ total citosólica que se modela como:

$$\left. \frac{\partial \langle [\text{Ca}_T^{(c)}] \rangle}{\partial t} \right|_{lib} \approx \frac{1}{V_c} \left(\int_A \vec{j}_{\text{RIP}_3} \cdot d\vec{S} \right). \quad (4.5)$$

Usando las Ecs. 4.4 y 4.5 se pueden relacionar variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]$ total durante una liberación a ambos lados de la membrana del RE:

$$\begin{aligned} \left. \frac{\partial \langle [\text{Ca}_T^{(L)}] \rangle}{\partial t} \right|_{lib} &= \frac{\partial \langle [\text{CaD}^{(L)}] \rangle}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial t} (\langle [\text{Ca}^L] \rangle + \langle [\text{CaB}^L] \rangle) \\ &\approx -\frac{V_c}{V_L} \left. \frac{\partial \langle [\text{Ca}_T^{(c)}] \rangle}{\partial t} \right|_{lib}. \end{aligned} \quad (4.6)$$

4.4.2. Variaciones de la fluorescencia

Para relacionar el modelo con las observaciones experimentales se usa el método introducido en [88] que permite vincular variaciones en la fluorescencia de un indicador de Ca^{2+} con las concentraciones subyacentes de Ca^{2+} ligado al indicador. Se considera que la fluorescencia F en un píxel está compuesta por dos contribuciones: una de moléculas de Ca^{2+} ligado al indicador, CaD , que contribuyen con q_1 fotones por molécula emisora y otra de moléculas de indicador libre, D , que contribuyen con q_2 . El cociente q_1/q_2 es del orden del cociente entre las eficiencias cuánticas entre las dos formas de la molécula

de fluoróforo (libre o ligada a Ca^{2+}). De esta forma, se puede escribir F en cada píxel como:

$$F = \alpha q_1 \left(\left(1 - \frac{q_2}{q_1} \right) \frac{[CaD]}{[D_T]} + \frac{q_2}{q_1} \right) N_D, \quad (4.7)$$

donde N_D es el número de moléculas de indicador fluorescente que contribuye a F en el píxel de interés, $\frac{[CaD]}{[D_T]}$ es la probabilidad que una molécula de indicador esté ligada a Ca^{2+} en ese píxel y α es un factor introducido por los detectores. Promediando sobre todos los píxeles que corresponden al lumen (para Fluo-5N AM) o al citosol (para Rhod-2) en la imagen se obtiene:

$$\langle F \rangle_{L,c} = \alpha q_1 \left(\left(1 - \frac{q_2}{q_1} \right) \frac{\langle [CaD] \rangle_{L,c}}{[D_T]} + \frac{q_2}{q_1} \right) \langle N_D \rangle_{L,c}, \quad (4.8)$$

Donde se asume que $\langle [CaD]/[D_T] N_D \rangle_{L,c} = \langle [CaD] \rangle_{L,c} / [D_T] \langle N_D \rangle_{L,c}$. Esto implica que la probabilidad de que una molécula de indicador esté ligada a Ca^{2+} en la región que contribuye a un píxel es independiente de cuantas moléculas de indicador haya en esa misma región y se considera que $\langle [CaD]/[D_T] \rangle_{L,c} = \langle [CaD] \rangle_{L,c} / [D_T]$. La Ec. 4.8 es válida tanto antes como después de la liberación cuando se asume que $\langle F \rangle_{L,c}$ y $[CaD]$ corresponden a una situación basal y durante la liberación cuando $\langle F \rangle_{L,c}$ y $[CaD]$ son dependientes del tiempo. Más aún, si se mira a la misma región antes y durante la liberación, $\langle N_D \rangle_{L,c}$ tiene el mismo valor en cualquier tiempo. En los experimentos de la Sección 4.3 no se computa la fluorescencia media sobre los píxeles luminales o citosólicos sino sobre todos los píxeles de la imagen (que se denomina $\langle F \rangle$). Asumiendo que, por lo menos en promedio, dada una región de observación los píxeles luminales o citosólicos permanecen siempre iguales, se puede entonces asumir que:

$$\langle F \rangle = \frac{N_{L,c}}{N_T} \langle F \rangle_{L,c}, \quad (4.9)$$

donde $N_{L,c}$ es el número de píxeles luminales o citosólicos de la imagen, N_T es el número total de píxeles y F es la fluorescencia que proviene de Fluo-5N AM o de Rhod-2 para el lumen y el citosol, respectivamente. Si se compara entonces la fluorescencia que viene del mismo canal de detección antes y durante la liberación se puede asumir que :

$$\frac{\langle F \rangle}{\langle F_b \rangle} = \frac{\langle F \rangle_{L,c}}{\langle F_b \rangle_{L,c}}, \quad (4.10)$$

para el reservorio correspondiente. Combinando las Ecs. 4.8 y 4.10 se llega a:

$$\frac{\Delta \langle F \rangle_{L,c}}{\langle F_b \rangle_{L,c}} = \frac{1 - \frac{q_2}{q_1}}{\left(1 - \frac{q_2}{q_1} \right) [CaD_b] + \frac{q_2}{q_1} [D_T]} \Delta \langle [CaD] \rangle_{L,c}, \quad (4.11)$$

con $\Delta\langle F \rangle \equiv \langle F \rangle - \langle F_b \rangle$, $\Delta[\text{CaD}] \equiv [\text{CaD}] - [\text{CaD}_b]$ y $\langle [\text{CaD}_b] \rangle_{L,c} = [\text{CaD}_b]$ las concentraciones basales de Ca^{2+} ligado al fluoróforo estimadas teóricamente para las condiciones del lumen y del citosol. A partir de la Ec. 4.11 se deriva la Ec. 4.12 simplemente dividiendo por el tiempo transcurrido entre las mediciones de $\langle F \rangle$ y de $\langle F_b \rangle$. Los subíndices L, c se omiten de los promedios para simplificar la notación.

$$\frac{1}{\langle F_b \rangle} \frac{\Delta\langle F \rangle}{\Delta t} = \frac{\left(1 - \frac{q_2}{q_1}\right)}{\left(1 - \frac{q_2}{q_1}\right) [\text{CaD}_b] + \frac{q_2}{q_1} [D_T]} \frac{\Delta\langle [\text{CaD}] \rangle}{\Delta t}, \quad (4.12)$$

donde F_b y F son las fluorescencias que vienen del indicador, D , ΔF es la variación de la fluorescencia definida como $F - F_b$ que ocurre durante el intervalo temporal Δt , q_2/q_1 es el cociente entre el número de fotones por molécula emisora que alcanza el detector durante el tiempo de adquisición para las formas ligada a Ca^{2+} y libre del indicador, $[D_T]$ es la concentración total del indicador y $[\text{CaD}_b]$ es la concentración basal de indicador ligado a Ca^{2+} , ambas concentraciones en la región de interés (V_L o V_c dependiendo del indicador). Como se hizo en [88] se usó $q_2/q_1 = 0,07$ para el Rhod-2 y, para el Fluo-5N AM, se usó el mismo valor que se usó para el Fluo-4, $q_2/q_1 = 0,025$. Se aproximó $\Delta\langle [\text{CaD}^{(L,c)}] \rangle / \Delta t \approx \partial\langle [\text{CaD}^{(L,c)}] \rangle / \partial t$ con este último término dado por el equivalente de la Ec. 4.1 para CaD . Esta equivalencia puede usarse si se cumple que $[\text{CaD}_b] = [\text{CaD}]$ justo antes de aplicar el estímulo UV que evoca la liberación (y por lo tanto el cambio en la fluorescencia de los indicadores). El hecho que la Ec. 4.12 sea una ecuación para el cociente entre los promedios permite relacionar el promedio de la fluorescencia que se realiza sobre toda la imagen con el de $[\text{CaD}]$ que está dado por la integral de esta concentración sobre V_L o V_c . Se estimó $[\text{CaD}_b]$ considerando que el Ca^{2+} y el indicador están en equilibrio:

$$[\text{CaD}_b] = \frac{[D_T][\text{Ca}_b]}{[\text{Ca}_b] + K_D}, \quad (4.13)$$

con $[D_T] = [\text{Rhod-2}]$, $K_D = 2\mu\text{M}$ y $[\text{Ca}_b^c] = 100\text{ nM}$ para el citosol y $[D_T] = [\text{Fluo-5N AM}]$, $K_D = 90\mu\text{M}$ y $[\text{Ca}_b^L] = 200\mu\text{M}$ [89] en el lumen del RE.

4.5. Cuantificación de los flujos de Ca^{2+} a ambos lados de la membrana del RE

Se utilizó el modelo para las variaciones del Ca^{2+} y la fluorescencia para interpretar los resultados experimentales presentados en la Sección 4.3.2. Se muestran a continuación las estimaciones para los flujos de Ca^{2+} obtenidas a partir de este análisis. Se propone finalmente una forma de chequear la consistencia del modelo aplicado.

4.5.1. Aplicación del modelo para interpretar los resultados experimentales

Se utilizó la Ec. 4.12 para obtener las variaciones temporales de $\langle[CaD]\rangle$ de cada uno de los indicadores. Usando los parámetros descritos en la Sección 4.4 se obtuvo, para el Ca^{2+} citosólico (a partir de la fluorescencia del Rhod-2), $\left.\frac{\Delta\langle[CaD^c]\rangle}{\Delta t}\right|_{lib} = 12,6 \mu\text{M s}^{-1}$. Para poder derivar una estimación de la variación del Ca^{2+} total a partir de $\Delta\langle[CaD^c]\rangle$ se consideraron dos casos extremos: un caso poco realista en el cual $\Delta\langle[CaD^c]\rangle = \Delta[Ca_T^{(c)}]$ y un caso más realista que se explica a continuación. Se estimó la fracción de Ca^{2+} que corresponde a cada una de sus variantes en el citosol utilizando valores previamente establecidos de concentraciones de *buffers* citosólicos y sus constantes de disociación. Esta estimación se utilizó para acotar la variación del Ca^{2+} total a partir de lo que se deduce es la variación de la concentración del Ca^{2+} ligado al indicador durante los eventos de liberación observados experimentalmente. Aún si este proceso es dinámico, se computaron las estimaciones suponiendo que las diferentes concentraciones están en equilibrio entre sí. Considerando que la concentración basal de Ca^{2+} citosólico es $[Ca_b] = 100 \text{ nM}$, $[D_T] = [\text{Rhod-2}] = 68 \mu\text{M}$ y $K_D = 2 \mu\text{M}$ (constante de disociación del indicador Rhod-2), se obtuvo:

$$[CaD_b] = \frac{[D_T][Ca_b]}{K_D^D + [Ca_b]} = 3,4 \mu\text{M}, \quad (4.14)$$

Para la concentración de Ca^{2+} ligado al indicador en condiciones basales. Usando la Ec. 4.11 para los experimentos de la Sección 4.3 en los que se analizaron los primeros instantes de una liberación de Ca^{2+} , la concentración de Ca^{2+} ligado al Rhod-2 en el citosol alcanza, en promedio, un valor máximo de $[CaD] \approx 14 \mu\text{M}$. Usando la aproximación del equilibrio para estimar la $[Ca^{2+}]$ se obtuvo $[Ca] = 0,5 \mu\text{M}$ en este pico. Las concentraciones y las propiedades de los *buffers* que pueden atrapar al Ca^{2+} en el citosol han sido caracterizados en diferentes tipos celulares. En particular en [22] se determinó que puede haber $\sim 300 \mu\text{M}$ del *buffer* parvalbumina cuya constante de disociación es $K_D \sim 0,25 \mu\text{M}$. Se usaron estos parámetros para obtener una estimación de cuánto Ca^{2+} podría estar ligado a *buffers* si la concentración de Ca^{2+} libre es $[Ca] = 0,5 \mu\text{M}$:

$$[CaB] = \frac{[B_T][Ca]}{K_D^B + [Ca]} = 200 \mu\text{M}. \quad (4.15)$$

Por lo tanto, considerando solamente a este *buffer* y al indicador se obtuvo $\Delta\langle[Ca_T]\rangle \approx 14 \mu\text{M} + 200 \mu\text{M} + 0,5 \mu\text{M} - (0,1 \mu\text{M} + 3,4 \mu\text{M} + 86 \mu\text{M}) = 12\Delta\langle[CaD]\rangle$. Se obtuvo de esta forma la estimación más realista $\Delta\langle[CaD]\rangle = 0,08\Delta[Ca_T]$ para el Ca^{2+} citosólico.

De esta forma la variación temporal de la $[Ca^{2+}]$ citosólica total está restringida por:

$$12,6 \mu M s^{-1} \leq \frac{\Delta \langle [Ca_T^c] \rangle}{\Delta t} \Big|_{lib} \leq 158 \mu M s^{-1}. \quad (4.16)$$

Aproximando $\Delta/\Delta t \approx \partial/\partial t$ e insertando la Ec. 4.16 en la Ec. 4.6 se obtuvo:

$$\begin{aligned} -\frac{V_c}{V_L} 158 \mu M s^{-1} \leq \frac{\Delta \langle [CaD^{(L)}] \rangle}{\Delta t} \Big|_{lib} + \frac{\Delta}{\Delta t} (\langle [Ca^L] \rangle \\ + \langle [CaB^L] \rangle) \Big|_{lib} \leq -\frac{V_c}{V_L} 12,6 \mu M s^{-1}. \end{aligned} \quad (4.17)$$

Para repetir los cálculos que llevaron a la Ec. 4.16 para el caso del Ca^{2+} luminal y el Fluo-5N AM existe una dificultad adicional: la concentración total de este indicador no se puede estimar con certeza ya que no se puede saber qué fracción del Fluo-5N AM total inyectado entró efectivamente al lumen del RE. Se puede sin embargo estimar una cota superior para la concentración total de indicador luminal, $[D_T^L]$, en términos de la concentración intracelular total, $[Fluo-5NAM] = 15 \mu M$, como:

$$[D_T^L] \leq [Fluo5N - AM] \left(1 + \frac{V_{cT}}{V_{LT}} \right), \quad (4.18)$$

Con V_{LT} and V_{cT} los volúmenes luminal y citosólico, si el Fluo-5N AM no entra en otras organelas intracelulares que no sean el RE. Como se describe en la Sección 3.4.3 del Capítulo 3 se estimó la cantidad de píxeles luminales y citosólicos a partir de las imágenes obtenidas marcando con Rhod-2 y Fluo-5N AM. A partir de esos resultados se pudo estimar el cociente entre el volumen luminal (V_L) y el volumen citosólico (V_c) en la región de observación. De este forma se estimó que ese valor era $\frac{V_c}{V_L} = 1,4$. A pesar de que las imágenes adquiridas en los experimentos fueron obtenidas en una región del ovocito en donde el RE puede estar sobre representado, se usó de todas formas $[Fluo5N - AM](1 + \frac{V_c}{V_L})$ como una cota superior para la concentración total del Fluo-5N AM en el lumen del RE. Se obtuvo de esta forma $[D_T^L] \leq 36 \mu M$. Procediendo de forma análoga a como se hizo para el Rhod-2 se obtuvieron límites para la variación del Ca^{2+} ligado al indicador en el lumen durante los instantes iniciales de la liberación de Ca^{2+} . Como esta variación es negativa, se expresa como:

$$-0,06 \mu M s^{-1} \leq \frac{\Delta \langle [CaD^L] \rangle}{\Delta t} \Big|_{lib} \leq 0. \quad (4.19)$$

Insertando esta estimación y $\frac{V_c}{V_L} = 1,4$ en la Ec. (4.17) se concluyó que $\Delta \langle [CaD^L] \rangle / \Delta t$ es despreciable frente a $\Delta(\langle [Ca^L] \rangle + \langle [CaB^L] \rangle) / \Delta t$.

A partir del análisis de los experimentos se obtuvieron cotas inferior y superior para

la variación de la $[\text{Ca}^{2+}]$ total en el citosol (ver Ec. 4.16) y una cota inferior para la variación de $[\text{CaD}]$ en el lumen (ver Ec. 4.19) lo que llevó concluir que $|\Delta\langle[\text{CaD}^L]\rangle/\Delta t| \ll |\Delta(\langle[\text{Ca}^L]\rangle + \langle[\text{CaB}^L]\rangle)/\Delta t|$. Para evaluar la contribución del Ca^{2+} luminal ligado a *buffers* se estimó $\frac{\Delta\langle[\text{Ca}^L]\rangle}{\Delta t}$. Se puede realizar un cálculo rápido asumiendo que el Ca^{2+} libre y el Ca^{2+} ligado al indicador están en equilibrio en el lumen para todo tiempo:

$$[\text{Ca}^L] = K_D \frac{\frac{[\text{CaD}^L]}{[\text{D}_T^L]}}{1 - \frac{[\text{CaD}^L]}{[\text{D}_T^L]}}, \quad (4.20)$$

de forma tal que se tiene:

$$\frac{\Delta\langle[\text{Ca}^L]\rangle}{\Delta t} = \frac{K_D}{[\text{D}_T^L]} \frac{\Delta\langle[\text{CaD}^{(L)}]\rangle}{\Delta t} \left(\frac{1}{1 - \frac{[\text{CaD}^L]}{[\text{D}_T^L]}} \right)^2. \quad (4.21)$$

Con los valores numéricos estimados a partir del análisis de los experimentos en la Sección 4.3 se obtuvo $\frac{\Delta\langle[\text{Ca}^L]\rangle}{\Delta t} = -1,5 \mu\text{M s}^{-1}$ que, en valor absoluto, es mucho menor que los límites impuestos por la Ec. 4.17. En cualquier caso, insertando esta estimación en la Ec. 4.17 se obtiene:

$$-219 \mu\text{M s}^{-1} \leq \frac{\Delta\langle[\text{CaB}^L]\rangle}{\Delta t} \leq -16,1 \mu\text{M s}^{-1}. \quad (4.22)$$

Esta disminución en el Ca^{2+} ligado a *buffers* luminales resulta en un flujo neto de Ca^{2+} libre dentro del RE. Considerando un *buffer* luminal (efectivo) se tiene:

$$\frac{\Delta\langle[\text{CaB}^L]\rangle}{\Delta t} \approx k_{on}^B [\text{Ca}^L] [\text{B}^L] - k_{off}^B [\text{CaB}^L], \quad (4.23)$$

donde se supone que durante los primeros instantes de una liberación, el término dominante es $k_{off}^B [\text{CaB}^L]$. De esta forma, se obtuvo una estimación de la magnitud de este término:

$$\frac{\Delta\langle[\text{CaB}^L]\rangle}{\Delta t} \sim -k_{off}^B [\text{CaB}^L]. \quad (4.24)$$

Usando las estimaciones basales $[\text{Ca}^L] = 200 \mu\text{M}$ y $[\text{Ca}_T^L] = 1 \text{ mM}$ [83], se obtuvo $[\text{CaB}^L] = 800 \mu\text{M}$ que, en combinación con las Ecs. 4.22 y 4.24, da $0,02 \text{ s}^{-1} \leq k_{off}^B \leq 0,3 \text{ s}^{-1}$ (la cota superior corresponde al caso realista en el cual $\Delta\langle[\text{CaD}^c]\rangle = 0,08\Delta[\text{Ca}_T^{(c)}]$). Este valor de k_{off}^B es relativamente pequeño pero es totalmente compatible con tener un *buffer* de Ca^{2+} con constante de disociación pequeña (como los que se proponen en [89]) que podría actuar como un gran depósito de Ca^{2+} en el lumen del RE. Por lo tanto, es la gran concentración de *buffer* luminal la que puede explicar la rápida liberación de Ca^{2+} luminal que puede rápidamente compensar la depleción del Ca^{2+} luminal que ocurre durante un evento de liberación de Ca^{2+} mediado por RIP_3s .

4.5.2. Chequeo de consistencia del modelo

Para chequear la consistencia del modelo propuesto, se puede estimar el flujo a través de los RIP_3s y obtener un valor para la cantidad de receptores abiertos (y por lo tanto involucrados) en un evento de liberación en la región de adquisición. A partir de la Ec. 4.5 se tiene:

$$\frac{\Delta\langle[\text{Ca}_T^{(c)}]\rangle}{\Delta t}\Big|_{lib} \approx \frac{1}{V_c} \left(\int_A \vec{j}_{IP_3R} \cdot d\vec{S} \right) = \frac{I_{IP_3R} N_{IP_3R}}{V_c q_{Ca}}, \quad (4.25)$$

en donde el flujo a través de los receptores abiertos puede ser expresado en términos de la corriente a través de un único receptor, $I_{IP_3R} \sim 0,1 \text{ pA}$, la carga de un ion Ca^{2+} , q_{Ca} , y el número de receptores de IP_3 simultáneamente abiertos, N_{IP_3R} , en el área de intercambio RE-citosol, A . Combinando la Ec. 4.16 y la Ec. 4.25, se pueden estimar cotas para el valor de N_{IP_3R} :

$$15 \leq N_{IP_3R} \leq 184. \quad (4.26)$$

Para estimar el volumen V_c del citosol en la región de adquisición, se considera que el 36 % de todos los píxeles de la imagen adquirida son píxeles citosólicos (ver Sección 3.4.3 del Capítulo 3) y que la fluorescencia en un píxel proviene de un volumen de observación que puede ser calculado usando el tamaño del píxel (resolución lateral) y la resolución axial aproximada de $1 \mu\text{m}$ para un microscopio confocal. Para estimar el área del RE en la región de adquisición se estimó primero el número de píxeles luminales. Con esta estimación y teniendo también el cociente entre área y volumen del RE en píxeles (ver Sección 3.4.3 del Capítulo 3), se puede calcular el número de píxeles de la imagen que corresponden a la membrana del RE. Se estima que la superficie del RE en la región de adquisición es $200 \mu\text{m}^2$. Dado que la distancia media entre cúmulos de RIP_3s en la superficie del RE en ovocitos de *Xenopus* estimada es $2 \mu\text{m}$ [26], en un área de $200 \mu\text{m}^2$ podría haber ~ 50 cúmulos de RIP_3s . Esto resulta, a su vez, en un promedio de entre 0.3 (para el caso poco realista en el cual $\Delta\langle[\text{CaD}^c]\rangle = \Delta[\text{Ca}_T^{(c)}]$) y 4 (para el caso más realista en el cual $\Delta\langle[\text{CaD}^c]\rangle = 0,08\Delta[\text{Ca}_T^{(c)}]$) receptores simultáneamente abiertos por cúmulo. Estos límites son números razonables y comparables con estimaciones previas [53, 90].

4.6. Discusión

Luego de testear el protocolo para marcar Ca^{2+} dentro del RE y seguir la dinámica del Ca^{2+} luminal con el indicador Fluo-5N AM en el Capítulo 3, se estudió la dinámica del Ca^{2+} luminal y del Ca^{2+} citosólico en simultáneo durante una señal de Ca^{2+} . Se usó el indicador luminal ya caracterizado junto con el indicador citosólico Rhod-2. Este

indicador citosólico se utilizó a una concentración tal que provee la misma detectabilidad de señales que el indicador citosólico más comúnmente usado Fluo-4. La elección de concentración fue posible gracias al estudio previo realizado en [88] en donde se introdujo un método para comparar cuantitativamente la detectabilidad en experimentos de visualización de Ca^{2+} . Se observó a partir de los experimentos de liberación que la dinámica de la depleción del Ca^{2+} luminal era más lenta de lo que se esperaba. Esto es consistente con tener un reservorio de Ca^{2+} en el RE que está continuamente abasteciendo nuevo Ca^{2+} libre a medida que se necesita cuando hay una liberación. La posibilidad que este mecanismo de rellenado (o de rápido abastecimiento) sea más relevante en ovocitos que en otros tipos celulares, como células musculares en donde una depleción del Ca^{2+} luminal se ha observado durante señales locales (*sparks* de Ca^{2+}) [87], puede estar relacionada con el distinto volumen que el lumen ocupa en cada tipo celular. Como se mostró en el Capítulo 3, al visualizar el Ca^{2+} luminal en simultáneo con un marcador de la membrana del RE, se pudo caracterizar la geometría de este reservorio en los ovocitos. Se observó que en estas células el volumen interior del RE ocupa una porción relativamente grande de la región observada.

Para analizar lo que ocurre durante una liberación a ambos lados de la membrana del RE, se desarrolló un modelo simple que describe las dinámicas del Ca^{2+} luminal y citosólico. Se combinó al modelo para las variaciones de Ca^{2+} con los resultados de [88] y se obtuvo un modelo que describe las variaciones de la fluorescencia de los indicadores durante los primeros instantes de una liberación. Combinando los resultados experimentales obtenidos y el modelo se estimaron las variaciones del Ca^{2+} a ambos lados de la membrana en los primeros instantes de una liberación de Ca^{2+} mediada por $\text{RIP}_{3\text{s}}$. Los resultados presentados en este capítulo sugieren que el abastecimiento rápido de Ca^{2+} en el lumen puede venir de los *buffers* allí presentes. Se corroboró de esta forma la existencia del abastecimiento rápido de Ca^{2+} luminal durante una liberación a través de los $\text{RIP}_{3\text{s}}$. Se cuantificó además la fracción de Ca^{2+} luminal que está atrapada por los *buffers* en el RE obteniendo valores razonables y compatibles con tener *buffers* luminales de baja afinidad como la calsecuestrina [11].

Para descartar una vez más la hipótesis de que lo que se observa en el canal de fluorescencia del Fluo-5N AM pueda venir del aporte del Ca^{2+} citosólico se realizó el siguiente razonamiento. A partir del modelo presentado en este capítulo, se calculó una estimación del máximo valor que la concentración media de Ca^{2+} libre citosólico, $\langle [Ca] \rangle$, puede alcanzar durante una liberación y se obtuvo el valor $[\text{Ca}^{2+}] = 0,5 \mu\text{M}$. Esta estimación muestra que es muy poco probable que parte de la fluorescencia del indicador luminal Fluo-5N AM venga de tener al indicador ligado a Ca^{2+} citosólico porque aún si la mitad de la cantidad total del Fluo-5N AM inyectado se hubiera quedado en el citosol en vez de entrar al RE, la concentración de indicador que estaría ligado a Ca^{2+} si

$[\text{Ca}^{2+}] = 0,5 \mu\text{M}$ sería entonces $\sim 0,05 \mu\text{M}$. Este valor es 250 veces más pequeño que la concentración de Ca^{2+} ligado a Fluo-5N AM obtenida asumiendo que la concentración final del Fluo-5N AM en el lumen es $[D] = 0,5[\text{Fluo} - 5N](1 + V_c/V_L)$.

Las observaciones experimentales de este capítulo son compatibles con la existencia de un mecanismo de re-abastecimiento relativamente rápido dentro del RE que evita la depleción del Ca^{2+} luminal aún a nivel local. Esto es diferente a lo que se observó en miocitos cardíacos en donde se pudieron detectar *blinks* de Ca^{2+} [87]. Es muy probable que esta diferencia sea una consecuencia de el mayor cociente área-volumen del RE en los miocitos cardíacos comparado con la estimación de este cociente para los ovocitos de *Xenopus laevis* (ver Capítulo 3). Para cuantificar las implicaciones que este cociente área-volumen puede tener en la depleción local de Ca^{2+} luminal se realiza la siguiente estimación. Se considera el ancho típico de un *blink* estimado en [87], $\sim 740\text{nm}$, como una indicación de cuán lejos se extiende la región depletada del lumen a lo largo de una dirección paralela a la membrana del retículo. Esta depleción ocurre en cisternas con ancho externo de $\sim 30\text{nm}$ que es mucho menor que el rango lateral de la región depletada durante el *blink*. Por lo tanto, se puede aproximar el volumen depletado dentro del lumen durante uno de estos eventos por un cilindro de diámetro 740nm y de altura 30nm . Si existe re-abastecimiento de Ca^{2+} en esta región desde el lumen, el flujo correspondiente a este re-abastecimiento debería pasar a través del área lateral del cilindro que mide $\sim 0,07 \mu\text{m}^2$. Si se considera un área de depleción (circular) similar en el caso del ovocito, dado que los túbulos observados en el lumen del RE pueden tener un radio de $\sim 1 \mu\text{m}$ (ver Fig. 3.7 del Capítulo 3), que es mucho más grande que 740nm , se puede suponer que el volumen depletado en esta caso sea más similar a una semi-esfera de diámetro 740nm . En este caso, el flujo de rellenado desde el lumen podría entrar a esta región depletada a través de la superficie de esta semi-esfera que mide $\sim 0,86 \mu\text{m}^2$. Este valor es 12 veces más grande que en el caso de los miocitos cardíacos. Más aún, estas estimaciones muestran porqué parece haber siempre más Ca^{2+} luminal disponible en el caso del ovocito, lo que podría ser además fisiológicamente relevante. Se concluye entonces que también desde el lado luminal la interacción entre la geometría y la dinámica juega un rol relevante en las señales intracelulares que pueden ser evocadas y detectadas.

Capítulo 5

Dinámica espacio-temporal del Ca^{2+} luminal y citosólico durante señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s

5.1. Resumen

Luego de mostrar en capítulos anteriores que el RE provee un reservorio virtualmente inagotable de Ca^{2+} en los ovocitos y que el Ca^{2+} citosólico es clave para determinar la distribución de tamaños de eventos que se puede tener, se analizan en este capítulo distintos aspectos espacio-temporales del Ca^{2+} luminal y citosólico durante liberaciones prolongadas. Usando nuevamente los indicadores Fluo-5N AM y Rhod-2 en conjunto se observaron los cambios del Ca^{2+} luminal y citosólico durante una liberación global luego de un estímulo UV de intensidad variable. Los resultados obtenidos dependieron fuertemente de la intensidad de la luz UV que evocaba la liberación. Se observó la aparición de *spikes* de Ca^{2+} solamente cuando el estímulo UV fue el menos intenso. Se investigaron los factores que determinan la aparición de los *spikes* y se caracterizó el intervalo entre *spikes*. Observando, por otra parte, el Ca^{2+} luminal en distintas regiones espaciales se concluyó que luego de una liberación global se produce una homogeneización del nivel de Ca^{2+} en el RE que es consistente con la hipótesis ya propuesta de que este reservorio es continuo y ocupa un gran volumen en los ovocitos de *Xenopus laevis*.

5.2. Marco general y motivación

La apertura del RIP_3 es regulada tanto por el IP_3 como por el Ca^{2+} . El receptor es regulado tanto positiva como negativamente por el Ca^{2+} citosólico. Esto permite que las señales mediadas por RIP_3 s puedan amplificarse por el mecanismo de CICR y que la apertura de un RIP_3 pueda generar las aperturas de otros receptores vecinos. Esto lleva a su vez a que puedan generarse ondas de Ca^{2+} citosólico si el CICR se propaga entre cúmulos. La iniciación repetitiva de estas ondas genera trenes de pulsos de Ca^{2+} que se conocen como *spikes*. Las secuencias de *spikes* de Ca^{2+} en una misma célula y entre células de un mismo tipo presentan una componente estocástica frente a un mismo estímulo. Estos trenes de pulsos llevan información codificada en su frecuencia. Pueden hacerlo porque la secuencia no es totalmente estocástica. Como fue analizado en [64], la existencia de un mecanismo de retro-alimentación negativa global es la que permite que haya cierta regularidad. En [35] proponen a la depleción del Ca^{2+} luminal como uno de los mecanismos de retro-alimentación negativa.

Poder analizar y cuantificar la dinámica del Ca^{2+} luminal durante señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 s a partir de las observaciones experimentales tiene muchas aplicaciones. Por un lado, sensar Ca^{2+} luminal puede servir para determinar si éste está involucrado en la terminación de las señales. Por otro lado, estos estudios pueden ser útiles para determinar en qué medida el Ca^{2+} luminal podría proveer el mecanismo de realimentación negativo que está aparentemente involucrado cuando las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 s abarcan toda la célula (por ejemplo durante *spikes* de Ca^{2+}) [64, 35]. Este último aspecto es relevante para entender la forma en que funciona la codificación en frecuencia de las señales de Ca^{2+} . A partir de los resultados obtenidos en los Capítulos 3 y 4, se deduce que el Ca^{2+} luminal parece estar siempre disponible. En los ovocitos de *Xenopus laevis* el RE funciona como un reservorio de Ca^{2+} virtualmente inagotable. La caracterización de la relación entre área y volumen en estas células llevó a la conclusión de que el RE ocupa un volumen considerable y continuo. Además de caracterizar la morfología de este reservorio, se estudiaron la dinámica del Ca^{2+} luminal y citosólico durante una liberación y se determinó que al producirse una apertura simultánea de muchos RIP_3 s y por lo tanto una gran liberación de Ca^{2+} desde el RE los *buffers* luminales garantizan que el Ca^{2+} luminal no se agote de forma tal que no sería el responsable de esta retro-alimentación negativa ni de la terminación de las señales. Estos resultados constituyen simplemente un primer paso hacia la respuesta de estos interrogantes y es necesario profundizar el estudio de la dinámica del Ca^{2+} luminal y citosólico en el tiempo y en el espacio.

En el capítulo anterior se estudiaron las variaciones temporales del Ca^{2+} luminal y citosólico durante los primeros instantes de una liberación usando los indicadores Rhod-2 y Fluo-5N AM. En este capítulo se utilizan nuevamente estos indicadores juntos pero para estudiar los aspectos espacio-temporales de liberación prolongada de Ca^{2+} a través de los RIP_3s . Se utilizaron estímulos UV de intensidad variable para evocar distintas liberaciones y se monitoreó la evolución del Ca^{2+} luminal y citosólico durante varios minutos en distintas regiones. Se estudiaron los *spikes* de Ca^{2+} citosólico y los factores que condicionan su aparición y su frecuencia en los ovocitos. Se investigó también la homogeneización del Ca^{2+} luminal en distintas regiones del RE que se observa luego de una liberación global.

5.3. Experimentos de fotoliberación prolongada de intensidad variable

Con el fin de estudiar distintos aspectos espacio-temporales tanto del Ca^{2+} citosólico como luminal durante una liberación mediada por RIP_3s se realizaron experimentos con los indicadores usados en el Capítulo 4 y el compuesto enjaulado. En este caso, sin embargo, no se enfocó el análisis en los primeros instantes de la liberación. Los experimentos fueron más largos y se estudió la diferencia entre regiones además de la evolución temporal de la fluorescencia promediada sobre todo el cuadro de adquisición.

5.3.1. Descripción de los experimentos

En todos los experimentos presentados en este capítulo se utilizaron los indicadores Fluo-5N AM y Rhod-2 para seguir la dinámica del Ca^{2+} luminal y del Ca^{2+} citosólico respectivamente. Para evocar las señales se fotoliberó IP_3 enjaulado dentro de las células. Las concentraciones intracelulares de Fluo-5N AM, Rhod-2 e IP_3 enjaulado fueron de 15 μM , 68 μM y 7 μM respectivamente. La fluorescencia de los indicadores se adquirió con el microscopio confocal usando un objetivo 60 $\times$. El compuesto enjaulado se fotoliberó con exposiciones UV prolongadas de intensidad variable (se utilizaron cuatro intensidades distintas). Se adquirió la fluorescencia proveniente de un cuadro de 100 $\times$ 100 píxeles con zoom 1 $\times$ resultando en una región escaneada dentro del ovocito de 41 $\times$ 41 μm^2 . Se realizó este tipo de experimento 31 veces en 8 ovocitos distintos. Los canales de emisión de los fluoróforos se procesaron primero para eliminar posibles efectos no deseados de sangrado del canal del Rhod-2 en el canal del Fluo-5N AM (ver Apéndice B para más detalles). En estos experimentos, como se quiere analizar el comportamiento del Ca^{2+} luminal y citosólico no sólo durante el inicio de la liberación como se hizo en el capítulo

anterior, la adquisición fue más larga resultando en registros que duraron varios minutos. El estímulo UV se encendió y se dejó encendido durante el resto de la adquisición.

Se muestran a continuación dos ejemplos (en un mismo ovocito) de los resultados obtenidos al realizar los experimentos. Los resultados para la fluorescencia del canal del Fluo-5N AM fueron similares para todas las intensidades de UV utilizadas. En todos los casos, la fluorescencia del indicador bajó luego del estímulo UV como se mostró en la Fig. 4.1 del Capítulo 4. Los resultados para la fluorescencia del indicador citosólico Rhod-2 sin embargo se clasificaron en dos categorías como se detalla a continuación.

5.3.2. Variación de la respuesta frente a distintos estímulos

Para los experimentos realizados usando estímulos UV de intensidad media o alta el comportamiento de la fluorescencia media del Rhod-2 fue similar al descrito en el Capítulo 4. Se muestra un ejemplo de este comportamiento en la Fig. 5.1. Se grafica en esta figura la evolución temporal de la fluorescencia media del Rhod-2 sobre todo el cuadro (toda la región de adquisición de 100×100 píxeles), $\langle F_{Rhod-2} \rangle$. Se indica el estímulo UV con una barra horizontal en la parte superior del gráfico. El ancho de la barra representa la intensidad del estímulo que en este caso fue alta. La fluorescencia media del Rhod-2 presentó un pico justo después del estímulo y luego subió de forma constante y más lenta como ya se había observado en la Fig. 4.2 del Capítulo 4. Se observó este comportamiento en todos los experimentos realizados con estímulos UV intensos.

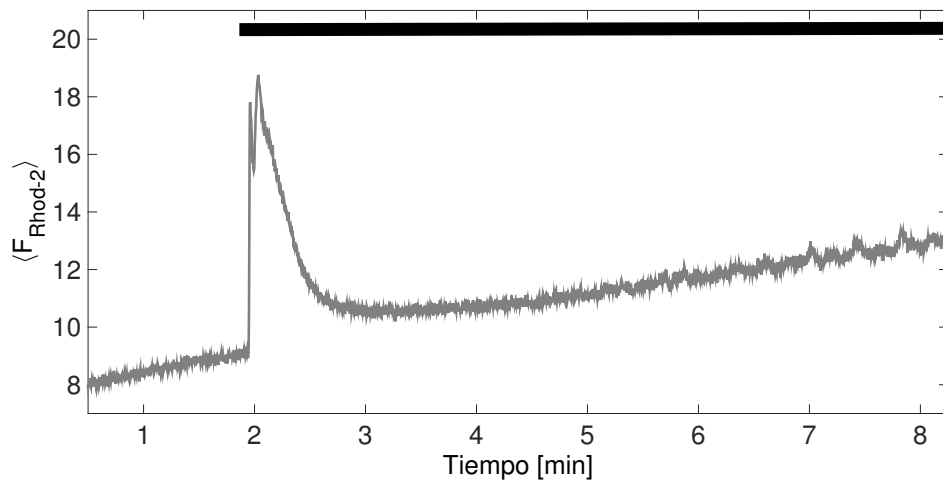


Figura 5.1: Evolución temporal de la fluorescencia media del Rhod-2 durante una liberación prolongada. La barra en la parte superior del gráfico indica que el estímulo UV de fotoliberación fue intenso.

En los experimentos en los que se utilizó el estímulo UV menos intenso, sin embargo, los resultados obtenidos fueron diversos. En algunos casos se observaron comportamientos similares a los de la Fig. 5.1 pero en otros casos luego de una primera liberación global y simultánea en toda la región de adquisición se observó la aparición de trenes de pulsos en el canal del Rhod-2 mientras que en el canal del Fluo-5N AM las observaciones fueron siempre similares. Se muestra un ejemplo de este comportamiento en la Fig. 5.2. Se observa en esta figura la fluorescencia media del Rhod-2. Se indica nuevamente el estímulo UV con una barra horizontal en la parte superior de los gráficos. En este caso la barra es más angosta que en el gráfico de la Fig. 5.1 indicando que el estímulo fue de menor intensidad. Como se puede esperar, los estímulos más intensos evocan libe-

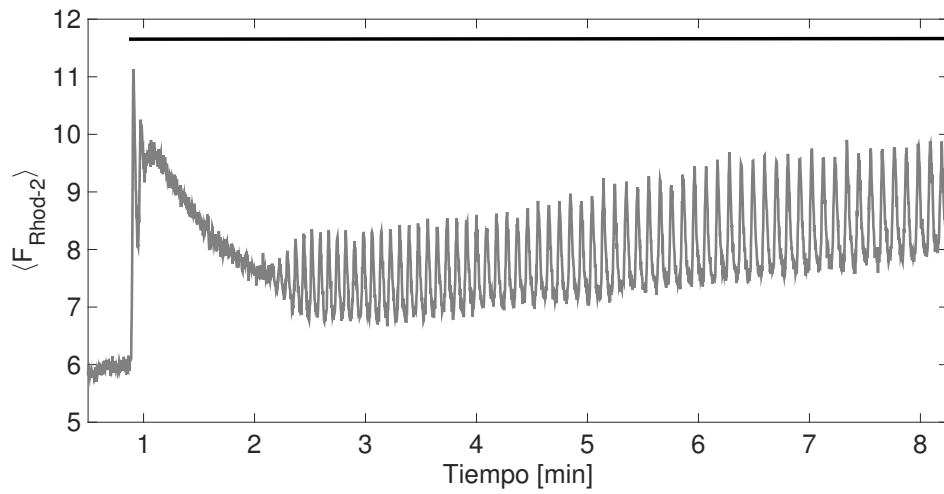


Figura 5.2: Evolución temporal de la fluorescencia media Rhod-2 durante una liberación prolongada. La barra en la parte superior del gráfico indica que el estímulo UV de fotoliberación fue de baja intensidad.

raciones más grandes y por lo tanto cambios más notables en la fluorescencia. Esto se puede apreciar comparando la altura del pico de liberación en las Figs. 5.1 y 5.2. Luego de esta primera liberación global, la fluorescencia del Rhod-2 vuelve a bajar y aumenta luego en el caso del estímulo UV intenso mientras que en el caso del estímulo UV débil aparece un tren de pulsos que continúa hasta el final de la adquisición. Estos pulsos se observaron en 8 experimentos realizados en 4 ovocitos diferentes. Es importante aclarar que la aparición o no de pulsos no era una propiedad del ovocito ya que en una misma célula se observaron los dos comportamientos (aparición o no de trenes de pulsos). Los experimentos mostrados en las Figs 5.1 y 5.2 fueron realizados en el mismo ovocito y por eso se descarta que la aparición de los trenes de pulsos, o *spikes* de Ca^{2+} , sean producto simplemente de la variabilidad entre células. Se puede decir, sin embargo, que la aparición de los trenes de pulsos dependió de la intensidad del estímulo UV ya que solamente se observó este fenómeno en los experimentos realizados con el estímulo UV menos intenso.

Para analizar estos experimentos con más detalle, se trabajó a continuación con la fluorescencia promediada sobre regiones más pequeñas y no sobre todo el cuadro adquirido. De esta forma, se quiere investigar no sólo el comportamiento temporal de la fluorescencia sino sus variaciones en distintas regiones espaciales. En particular, se quiere estudiar qué determina la aparición de los pulsos en algunos experimentos y también su frecuencia. En las secciones siguientes, por lo tanto, cuando se habla de la fluorescencia media se promedia sobre sub-regiones de distintos tamaños dentro de la región de adquisición.

5.4. Estudio de los *spikes* de Ca^{2+}

Como se mostró en la Fig. 5.2 se observaron trenes de pulsos en los experimentos en los que el estímulo UV fue poco intenso. Luego de la liberación global inicial (inmediatamente después de que comienza el estímulo de fotoliberación) el Ca^{2+} citosólico puede empezar a oscilar de forma rítmica y formar estos trenes de pulsos o *spikes* de Ca^{2+} . Se muestra a continuación la caracterización del intervalo entre *spikes* y un análisis de los factores que podrían modular la frecuencia de estos trenes de pulsos y condicionar su aparición.

5.4.1. Análisis del intervalo entre *spikes*

Los *spikes* de Ca^{2+} observados en los experimentos presentaron gran variabilidad en términos de la frecuencia. Se estudió esta variabilidad analizando el intervalo entre *spikes* (*ISI* del inglés *Interspike Interval*). Para cada una de las mediciones en donde se registraron *spikes* se dividió a la región de adquisición en 16 sub-regiones de 25×25 píxeles ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$). En cada una de las sub-regiones se computó la fluorescencia media $\langle F_{Rhod-2} \rangle$. Se obtuvo por lo tanto un gráfico de la evolución temporal de $\langle F_{Rhod-2} \rangle$ en cada sub-región. Se identificaron de forma automatizada en estos gráficos todos los picos correspondientes a los *spikes* de Ca^{2+} . Se calculó a partir de los tiempos en los que ocurrían los picos el intervalo entre *spikes* o *ISI* como se ilustra en la Fig. 5.3. Se muestra en esta figura un ejemplo del gráfico de la fluorescencia media del Rhod-2 en una sub-región de 25×25 píxeles, $\langle F_{Rhod-2} \rangle$, en donde se indica un *ISI*. Se computó luego para cada sub-región el valor medio de los *ISIs*, T_{av} , y su desvío estándar, σ . Se obtuvieron de esta manera valores de T_{av} y σ para las 16 sub-regiones de cada medición en donde se registraron *spikes* de Ca^{2+} .

Se graficaron los valores de σ en función de los correspondientes T_{av} en todos los casos analizados. Se muestra en la Fig. 5.4 el gráfico obtenido. Para cada sub-región

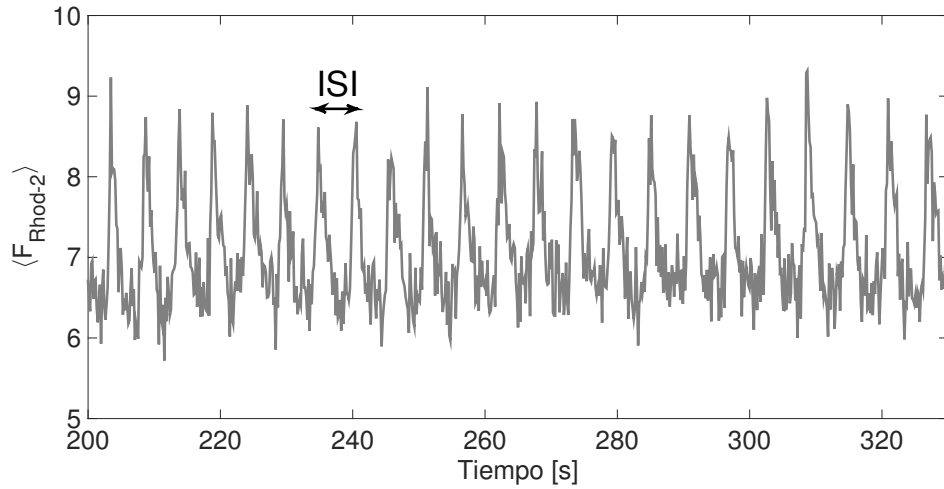


Figura 5.3: Tren de pulsos o *spikes* de Ca^{2+} observado al promediar la fluorescencia del Rhod-2 en una sub-región de 25×25 píxeles. Se indica la estimación del *ISI*, intervalo entre los *spikes*, en el gráfico.

analizada se obtiene un punto en el gráfico de σ vs T_{av} (puntos negros en la figura). A pesar de la gran variabilidad de tiempos entre *spikes* (T_{av} abarca un rango de ~ 30 s), existe una relación entre la variabilidad del ISI, σ , y el tiempo medio entre *spikes*, T_{av} , que se conserva en los distintos experimentos analizados. Para cuantificar esta relación, se ajustaron los datos experimentales con una función lineal (recta gris en la figura). La pendiente obtenida para el ajuste lineal fue 0,39 y se estimó la bondad del ajuste con el coeficiente $\mathcal{R}^2$ que dio 0,8. Este valor es similar a los valores presentados para la relación $T_{av} - \sigma$ en distintos tipos celulares en [64].

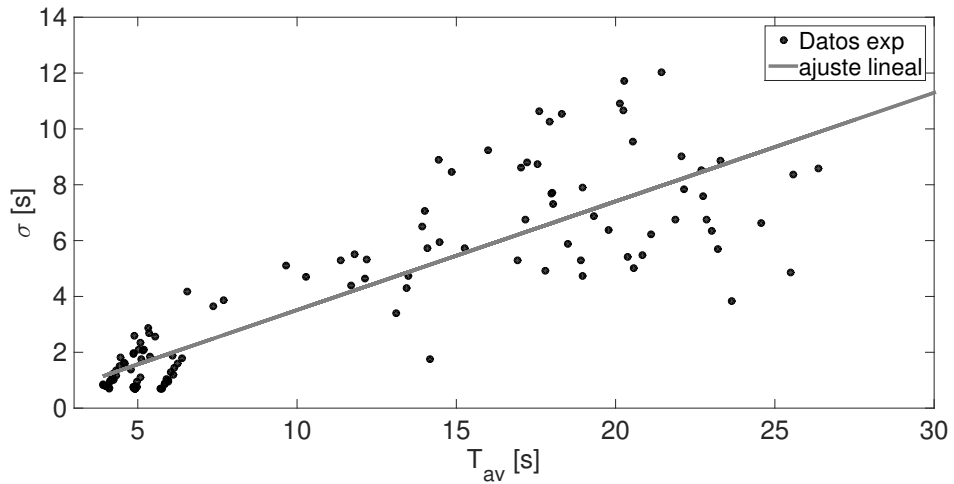


Figura 5.4: Valor medio del ISI, T_{av} , para cada sub-región y su correspondiente variabilidad, σ . Los puntos negros representan los resultados experimentales y la recta gris es el ajuste lineal realizado.

5.4.2. Influencia de la liberación inicial sobre el ISI

Como se mencionó en la sección 5.3.2 solamente se observó la aparición de *spikes* en los experimentos en los que el estímulo UV fue bajo. Se sabe que la intensidad del estímulo UV determina la cantidad de IP_3 enjaulado que se fotolibra y por lo tanto es de esperarse que esto afecte también la cantidad de RIP_3 s que se abren inicialmente. Si se abren más RIP_3 s al inicio, se espera tener una liberación de Ca^{2+} más grande y por lo tanto una mayor variación de la fluorescencia del Rhod-2 respecto de la fluorescencia basal (antes del estímulo). Para estudiar esta variación de la fluorescencia luego del inicio del estímulo se computó el valor ΔF como la diferencia entre la fluorescencia basal F_b y el pico de fluorescencia que ocurre en la primera liberación luego del estímulo. La fluorescencia basal del Rhod-2 se calculó en cada sub-región como el promedio temporal de todos los valores de $\langle F_{\text{Rhod-2}} \rangle$ anteriores al estímulo UV (ver Apéndice B para más detalle).

Se quiere investigar si distintos valores de esta variación ΔF tienen influencia sobre la frecuencia de los *spikes* y por lo tanto sobre el ISI . Para ello se computaron los valores ΔF y F_b en todas las sub-regiones en donde se habían detectado *spikes* y se habían medido los $ISIs$. Se calculó luego para cada sub-región el cociente $\Delta F/F_b$ que representa el cambio relativo de la fluorescencia durante la liberación inicial respecto de la fluorescencia basal. Como ya se mencionó antes, en los casos en que la liberación era muy intensa y por lo tanto la correspondiente variación en la fluorescencia del Rhod-2 era muy alta (ver Fig. 5.1) no se observaron *spikes* de Ca^{2+} . Para explorar si las variaciones locales en la liberación inicial afectan el tiempo entre *spikes*, se graficó T_{av} en función de $\Delta F/F_b$ para cada sub-región analizada.

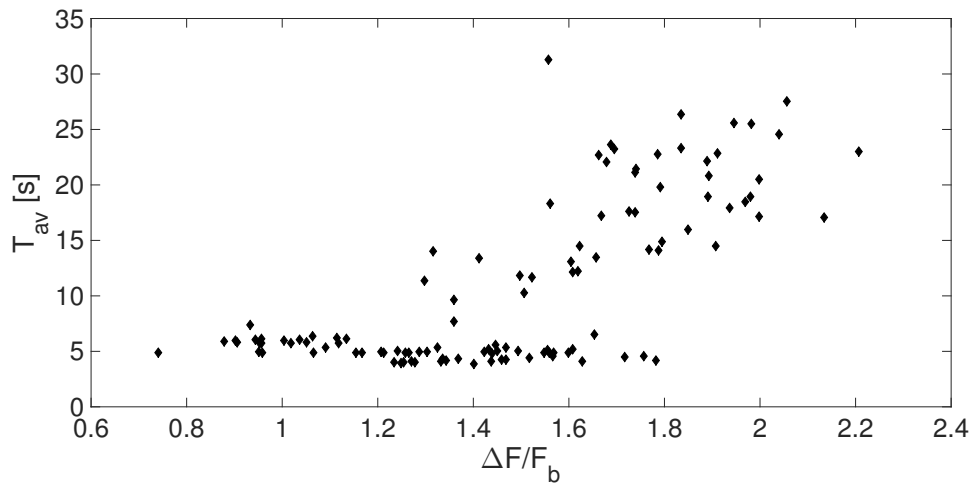


Figura 5.5: Influencia de la liberación inicial sobre los $ISIs$. Valor medio de los $ISIs$, T_{av} , en función de la variación relativa de la fluorescencia $\Delta F/F_b$.

Se muestra este gráfico en la Fig. 5.5. Se puede ver que para los valores más pequeños de $\Delta F/F_b$, T_{av} se mantiene bajo y no varía demasiado. A medida que $\Delta F/F_b$ aumenta, el valor medio de los *ISIs* no solo aumenta sino que aumenta su variabilidad. Para analizar esto se graficó también el desvío estándar σ de los *ISIs* en función de la variación $\Delta F/F_b$ como se muestra en la Fig. 5.6. La variabilidad de los *ISIs* que se cuantifica con el desvío estándar σ también aumenta cuando aumenta la variación $\Delta F/F_b$.

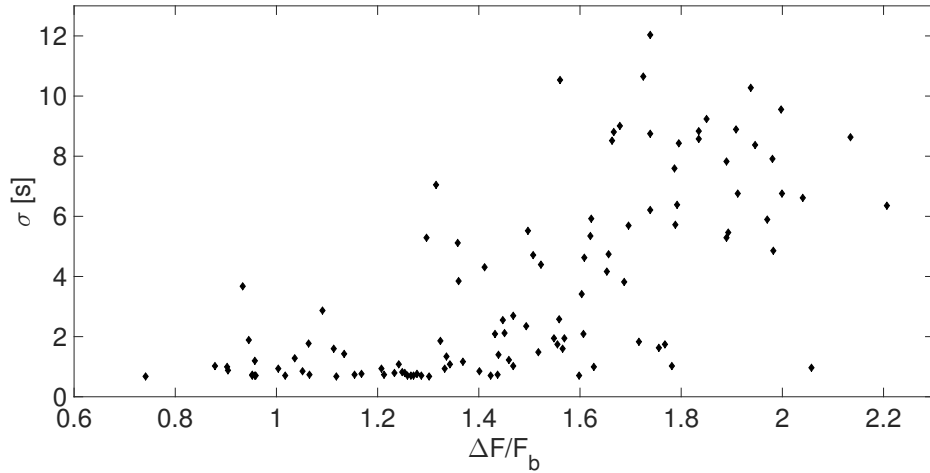


Figura 5.6: Influencia de la liberación inicial sobre los *ISIs*. Desvío estándar de los *ISIs*, σ , en función de la variación relativa de la fluorescencia $\Delta F/F_b$

Del análisis de las Figs. 5.5 y 5.6 y de las observaciones experimentales mostradas en la Sección 5.3.2 se deduce que la liberación inicial evocada por el estímulo UV condiciona no sólo la aparición subsiguiente de *spikes* sino también su frecuencia. Para estímulos UV intensos no se observaron *spikes*. Para los estímulos menos intensos se observaron *spikes* de frecuencias variables. Se puede estimar cuán intensa fue la liberación de Ca^{2+} inicial en el citosol computando la variación relativa de la fluorescencia del indicador respecto de la fluorescencia basal. El *ISI* medio aumentó para las regiones en que esta liberación inicial fue mayor. La variabilidad del *ISI* también aumentó. Esto indica que la cantidad de Ca^{2+} liberado inicialmente afecta fuertemente el tipo de señal que puede evocarse a continuación.

5.4.3. Tiempo de inicio de los *spikes*

Además de estudiar los intervalos entre *spikes* y su variabilidad, se estimó también el tiempo de inicio de los *spikes*, t_{in} , como el tiempo en el que se detectó el primer *spike* para todas las sub-regiones analizadas. Se observó que los *spikes* se iniciaban en distintos tiempos luego de la liberación inicial. Para investigar la influencia de esta liberación inicial sobre el tiempo de inicio de los *spikes* se estudió la dependencia de

t_{in} con la variación inicial de la fluorescencia. Se muestra en el gráfico de la Fig. 5.7 el tiempo de inicio de los *spikes* en función de $\Delta F/F_b$. Se puede ver como a medida que $\Delta F/F_b$ aumenta el tiempo de inicio se hace cada vez más grande indicando que los *spikes* tienen una latencia mayor luego de la liberación inicial.

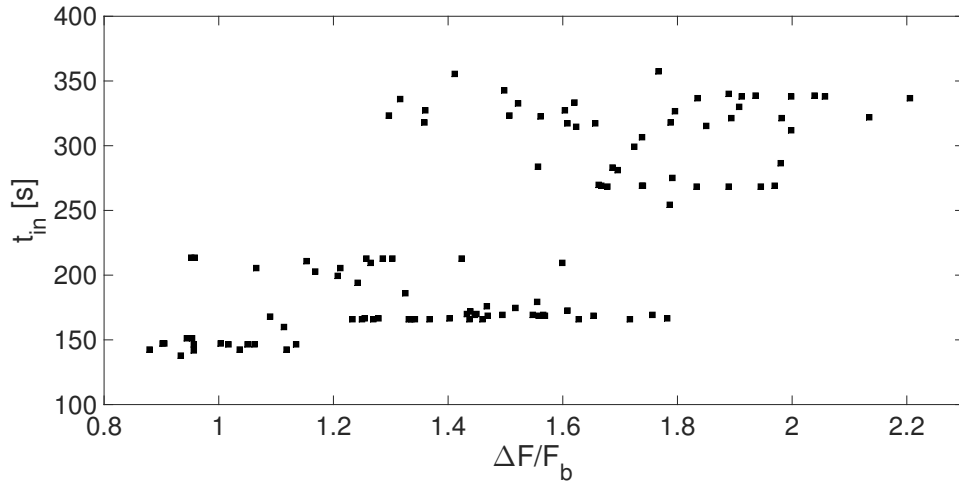


Figura 5.7: Influencia de la liberación inicial sobre el tiempo de inicio de los *spikes*.

En esta sección se analizaron los factores que pueden condicionar la aparición de *spikes* de Ca^{2+} , su latencia luego de una liberación inicial y su frecuencia. Del análisis de los resultados experimentales se concluyó que ninguno de estos parámetros dependía de las variaciones del Ca^{2+} luminal sino que estaban vinculadas a la cantidad de Ca^{2+} citosólico liberado inicialmente.

5.5. Homogeneización espacial del Ca^{2+} luminal

Si bien no se encontró correlación entre los valores de la fluorescencia del Fluo-5N AM (ni sus variaciones) y la aparición o no de *spikes*, al analizar las diferencias entre distintas sub-regiones de un mismo experimento se observó lo siguiente. Había una gran variabilidad de la fluorescencia del indicador Fluo-5N AM al inicio del experimento entre sub-regiones de una misma medición. Se observó también que en todos los casos luego de que la liberación inicial ocurriera los valores de la fluorescencia del Fluo-5N AM además de bajar, como se esperaba, se volvían espacialmente homogéneos. Para estudiar diferencias espaciales dentro de la región de adquisición se dividió en este caso a la imagen en 10 sub-regiones de 10×10 píxeles cada una. De esta forma se observó el comportamiento de la fluorescencia del Fluo-5N AM en sub-regiones de $4,11 \times 4,11 \mu\text{m}^2$. En cada una de estas sub-regiones se calculó el valor medio de la fluorescencia del Fluo-5N AM, $\langle F_{\text{Fluo-5N}} \rangle$. Para cada experimento se obtuvieron por lo tanto 100

gráficos de $\langle F_{\text{Fluo-5N}} \rangle$ en función del tiempo, t , en donde el promedio espacial es sobre la sub-región de 10×10 píxeles y no sobre toda la región de adquisición.

Para ilustrar estas observaciones, se muestra en la Fig. 5.8 un ejemplo de la evolución de la fluorescencia media del Fluo-5N AM para 5 sub-regiones elegidas al azar en una medición. La barra negra en la parte superior del gráfico indica el estímulo UV. La fluorescencia del Fluo-5N AM al inicio del experimento no es homogénea. Como se puede ver, antes de que se presente el estímulo UV de fotoliberación, los valores de la fluorescencia media en las 5 sub-regiones son muy distintos abarcando un rango amplio. Luego de que ocurre la fotólisis del IP_3 enjaulado y por lo tanto se inicia la liberación de Ca^{2+} , la fluorescencia disminuye y en todos los casos permanece en un valor inferior al valor inicial. Los valores de la fluorescencia de las 5 sub-regiones al final del experimento son muy similares.

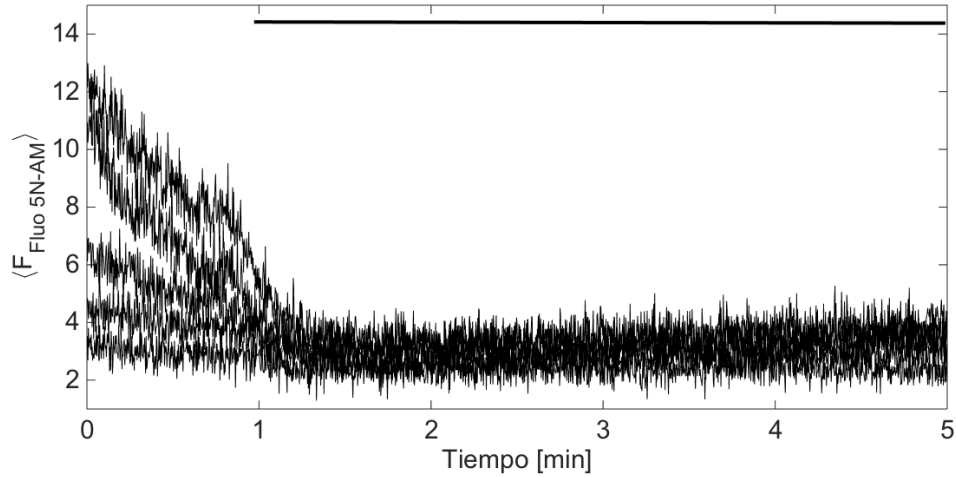


Figura 5.8: Evolución temporal de la fluorescencia del Fluo-5N AM promediada sobre 5 sub-regiones de 10×10 píxeles dentro de la región de adquisición. La barra negra en la parte superior indica el estímulo UV.

Para cuantificar la variación que se observa entre la fluorescencia de las sub-regiones al inicio de la medición (en situación basal) y al final de la medición se computaron las siguientes cantidades para cada traza temporal de la fluorescencia media del Fluo-5N AM. En cada una de las 100 sub-regiones de los 31 experimentos analizados, se calculó la fluorescencia basal del Fluo-5N AM como el promedio de todos los valores que tomaba $\langle F_{\text{Fluo-5N}} \rangle$ antes del tiempo en el que se presentó el estímulo UV. Se calculó también la fluorescencia final del Fluo-5N AM como el promedio de todos los valores que tomaba $\langle F_{\text{Fluo-5N}} \rangle$ para los últimos 300 tiempos adquiridos. Se obtuvieron de esta forma pares de valores $\langle F_b \rangle$ (fluorescencia basal) y $\langle F_f \rangle$ (fluorescencia final) para cada sub-región de cada medición. Se muestran en la Fig. 5.9 las distribuciones de estos valores para una medición a modo de ejemplo. El histograma gris claro muestra la distribución de los 100

valores de $\langle F_b \rangle$ calculados mientras que el histograma gris oscuro muestra la distribución de los valores de $\langle F_f \rangle$ para la misma medición.

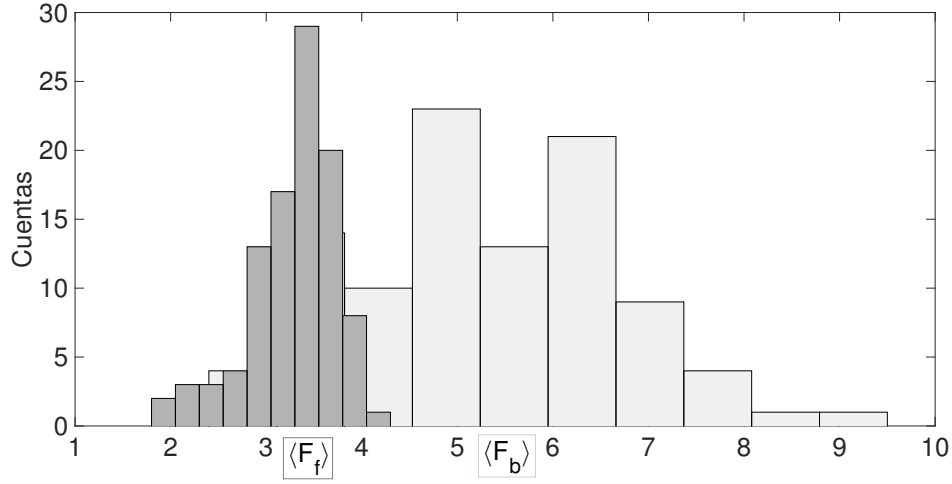


Figura 5.9: Ejemplo de las distribuciones de $\langle F_b \rangle$ (histograma gris claro de la derecha) y $\langle F_f \rangle$ (histograma gris oscuro de la izquierda) en un experimento.

Como se puede observar en los histogramas de la Fig. 5.9, la distribución de las fluorescencias finales es mucho más angosta que la distribución de las fluorescencias basales. Para cuantificar la diferencia entre $\langle F_b \rangle$ y $\langle F_f \rangle$ para todas las mediciones se realizó lo siguiente. Para cada medición se calcularon los 100 valores de $\langle F_b \rangle$ y $\langle F_f \rangle$. Se computó luego la varianza de los valores obtenidos de $\langle F_b \rangle$ y $\langle F_f \rangle$. Se obtuvo así para cada una de las 31 mediciones un par de valores $\text{Varianza}\langle F_b \rangle$ y $\text{Varianza}\langle F_f \rangle$. En todos los casos la varianza de la fluorescencia final fue inferior a la varianza de la fluorescencia inicial. Para ilustrar esto se graficaron los valores de $\text{Varianza}\langle F_f \rangle$ en función de los valores de $\text{Varianza}\langle F_b \rangle$. Se muestra este gráfico en la Fig. 5.10.

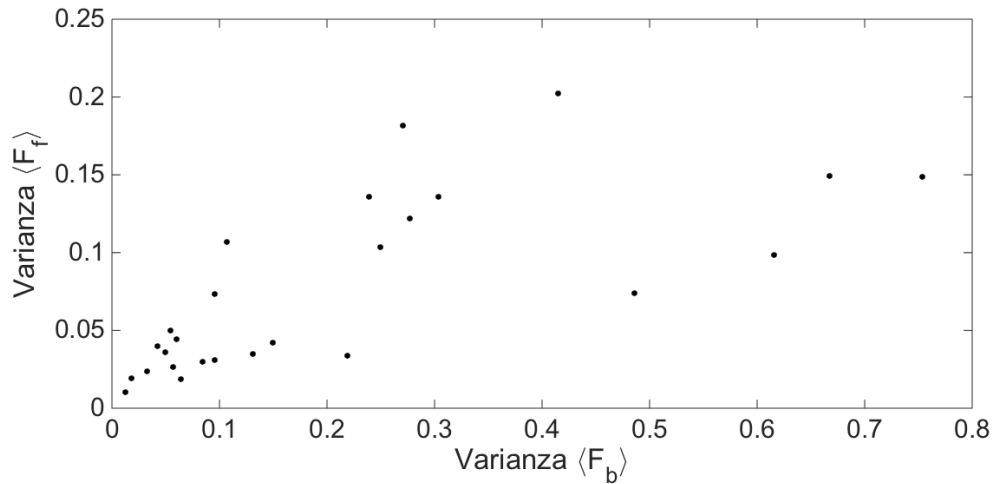


Figura 5.10: Varianza de la fluorescencia final y de la fluorescencia basal del indicador Fluo-5N AM para las 100 sub-regiones analizadas de cada uno de los 31 experimentos.

5.6. Discusión

En este capítulo se observó el comportamiento tanto del Ca^{2+} citosólico como del Ca^{2+} luminal al fotoliberar IP_3 en el interior del ovocito de manera persistente y con intensidades de fotoliberación variables. Se utilizaron nuevamente los indicadores Fluo-5N AM y Rhod-2 para sensar Ca^{2+} luminal y citosólico respectivamente. En todos los experimentos realizados el comportamiento medio de la fluorescencia del Fluo-5N AM fue similar e independiente de la intensidad del estímulo. Se observó nuevamente como la fluorescencia del indicador disminuía luego del estímulo UV reflejando la salida del Ca^{2+} luminal a través de los RIP_3 s. El comportamiento del Ca^{2+} citosólico, sin embargo, dependió fuertemente de la intensidad del estímulo presentado. Mientras que para estímulos UV intensos el comportamiento fue siempre similar (y como el presentado en el Capítulo 4), para estímulos UV menos intensos se observó la aparición de *spikes* de Ca^{2+} citosólico. Estos trenes de pulsos iniciaron luego de un período más o menos largo después de la liberación inicial. Para entender porqué estas oscilaciones no se observaron en el registro de la fluorescencia del indicador luminal hay que tener en cuenta dos factores. En primer lugar, es posible que los cambios del lado luminal durante las oscilaciones sean inobservables ya que son disminuciones sobre un fondo alto. Mientras que en el citosol los *spikes* se manifiestan como aumentos transitorios de la fluorescencia, en el lumen estos cambios pueden ser indetectables ya que la fluorescencia basal es muy alta. Por otro lado, se puede argumentar (como se hizo en [91] para el núcleo y el citosol) que se observen dinámicas distintas en ambos reservorios por la diferencia en las propiedades difusivas del Ca^{2+} en el citosol y en el RE. Como ya se mencionó, la composición de *buffers* de ambos reservorios es muy distinta y esto afectará el transporte del Ca^{2+} en ellos. En particular, en [92] se caracterizaron los coeficientes de difusión del Ca^{2+} en el citosol y el RE (usando el indicador Fluo-5N AM) y se halló que en este reservorio el coeficiente de difusión era menor que en el citosol. Esto puede deberse a la geometría del RE sumada a la distinta composición de *buffers* endógenos.

Se analizó también el comportamiento espacio-temporal del Ca^{2+} luminal durante las liberaciones prolongadas. Se observó que existía una heterogeneidad espacial en la distribución de la fluorescencia del indicador luminal en situación basal. Luego de la liberación, esta heterogeneidad desaparecía. Se cuantificaron las varianzas de la fluorescencia basal y final en las distintas regiones analizadas para ilustrar esta homogeneización. Esta observación es consistente con tener una distribución basal de Ca^{2+} fuertemente dependiente de los *buffers* luminales. Luego de la liberación, la difusión intraluminal desde regiones no depletadas responsable del mecanismo de rellenado rápido del RE [93] homogeneiza el contenido del RE.

Si bien no se encontró ninguna correlación entre la aparición de *spikes* y los niveles de Ca^{2+} luminal, se observó que la aparición de estos trenes de pulsos sólo ocurría en los casos en los que la liberación inicial en el citosol era menos intensa (e respuesta al estímulo UV más débil). En un mismo ovocito en el que se observaban *spikes*, estas oscilaciones desaparecían al aumentar la intensidad del estímulo UV (ver Figs. 5.2 y 5.1). Se exploraron los intervalos entre *spikes*, *ISIs*, observados en los experimentos en los que la intensidad del UV fue menor. Se halló una gran variabilidad en los valores medios de los *ISIs*, T_{av} , en una misma célula y también entre células distintas. Como se muestra en [64] esta variabilidad tiene que ver con la componente estocástica del *ISI*. El *ISI* comprende la duración del pulso, el período refractario del sistema y un período estocástico. Éste último está asociado al tiempo que tarda el sistema en volver a disparar un *spike*. La escala de tiempo de la recuperación de la inhibición es un parámetro crítico para determinar cómo será la relación entre σ y T_{av} . Se estudió la relación entre T_{av} y la variabilidad del *ISI*, σ , y se obtuvo una relación lineal entre ambos parámetros. La relación T_{av} - σ obtenida en los experimentos realizados en ovocitos en este capítulo (0,39) es comparable a las halladas para otros tipos celulares [64].

Se cuantificó luego la variación inicial de la fluorescencia del indicador citosólico respecto de la fluorescencia basal para estimar la magnitud de la liberación inicial. Se estudió la relación entre esta liberación inicial y la frecuencia de los *spikes*. Se mostró que T_{av} aumentaba cuando la liberación inicial era más grande y que su variabilidad σ también lo hacía. Esto indica que la cantidad de Ca^{2+} citosólico liberada inicialmente afecta la temporalidad y la regularidad de las oscilaciones así como también la probabilidad de tener *spikes*. Se observó que el tiempo de inicio de los *spikes* luego de la liberación inicial también dependía de la cantidad de Ca^{2+} liberado. Mientras más intensa era la liberación inicial, más tiempo transcurría hasta que iniciaban los trenes de pulsos. En [94] se halló que el período entre oscilaciones de Ca^{2+} repetitivas está principalmente determinado por la recuperación de la sensibilidad del RIP_3 . Los RIP_3 s deben recuperarse del estado refractario (inhibición luego de una apertura) después de una onda de Ca^{2+} de forma tal que la excitabilidad del citosol pueda volver a permitir la propagación de otra onda. Los resultados presentados en este capítulo indican que el Ca^{2+} citosólico parece ser el mecanismo de inhibición global propuesto por los autores de [64].

Capítulo 6

Obtención y procesamiento de imágenes wide-field para la observación de señales de Ca^{2+} con alta resolución temporal y seccionado tipo confocal

6.1. Resumen

Las señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s presentan un amplio rango de patrones espacio-temporales. En este capítulo se presenta un método simple y económico para la detección de estas señales que tiene alta resolución temporal y buena resolución espacial. Mediante el uso de un microscopio wide-field, iluminación LED y una cámara EMCCD se puede obtener una resolución axial de $\sim 1 \mu\text{m}$ (agregando un telescopio $5\times$ antes de la cámara). El uso de la cámara EMCCD provee una buena resolución temporal (hasta 500 cuadros por segundo). Se caracterizó primero la PSF del set-up para cuantificar su resolución espacial. Se utilizó luego el microscopio para obtener imágenes fluorescentes (estáticas) de distintas estructuras internas de ovocitos de *Xenopus laevis* que se comparan razonablemente bien con las obtenidas con un microscopio confocal. Finalmente, se usó este set-up para observar señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3s obteniendo imágenes bidimensionales con resolución temporal similar a la de imágenes confocales en modo line-scan. Se propone un método relativamente fácil para el análisis automatizado de las imágenes que permite ubicar posibles sitios de liberación de Ca^{2+} aún cuando las imágenes adquiridas son muy ruidosas.

6.2. Marco general y motivación

Obtener imágenes en las que se distingue la apertura individual de los RIP_3s dentro de un cúmulo es crucial para entender cómo ocurre el mecanismo de CICR y cómo puede ser afectado por la presencia de diferentes *buffers* de Ca^{2+} [95, 96]. Esto requiere que las resoluciones espacial y temporal del sistema de adquisición de imágenes sean suficientemente altas. Una opción que ofrece buena resolución espacial es la microscopía confocal [26]. La principal ventaja de esta técnica es la reducción de luz fuera de foco proveniente de planos no focales. El seccionado óptico permite distinguir estructura fina y detectar pequeños cambios en la fluorescencia que ocurren en sitios específicos dentro de la célula. Mientras que el uso de microscopía confocal permite lograr alta resolución espacial, la resolución temporal está limitada por la velocidad de escaneo del láser en la región observada [97]. Una posibilidad es trabajar con imágenes adquiridas en modo line-scan (escaneando con el láser sobre una misma línea) directamente pero de esta forma la probabilidad de que la línea elegida para escanear pase por al menos dos cúmulos de RIP_3s es baja. La adquisición de imágenes (bidimensionales) usando microscopía wide-field y una cámara rápida aumenta la resolución temporal respecto de la de la microscopía confocal. Sin embargo el uso de microscopía wide-field para este propósito resulta en un seccionado axial mucho más bajo [98] y por lo tanto en una pérdida considerable de contraste y resolución. La microscopía de fluorescencia de reflexión total interna (o TIRF del inglés *Total Internal Reflection Microscopy*) mejora lo último y por lo tanto permite la adquisición de imágenes con cámaras rápidas. Esta técnica ha sido usada para observar señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 en células SH-SY5Y porque en ellas los RIP_3s están suficientemente cerca de la membrana celular [54, 99]. En estas células se usa una forma de IP_3 permeable a membrana para evocar las señales que no se metaboliza tan rápido como la versión nativa o la micro-inyectable [100]. Esta última es la que se usa para evocar señales de Ca^{2+} en ovocitos de *Xenopus laevis*. No es fácil utilizar microscopía TIRF directamente en ovocitos [101] debido a la distancia de $\sim 5 \mu\text{m}$ entre la membrana plasmática y la localización de los cúmulos de RIP_3s [39]. En este tipo de células se ha usado microscopía wide-field para obtener imágenes bidimensionales [98] pero con poca resolución axial.

En este capítulo se presenta un método que combina el uso de una interfaz de amplificación en un microscopio wide-field con un procesamiento de imágenes que permite obtener imágenes bidimensionales de señales de Ca^{2+} en ovocitos con alta resolución temporal y con resolución espacial equivalente a la de un microscopio confocal. Se muestran, en primer lugar, imágenes estáticas del interior del ovocito. Es posible mejorar el contraste de dichas imágenes mediante diferentes tipos de procesamientos. Se muestra luego que es posible evocar y detectar señales de Ca^{2+} con el microscopio. Se propone

finalmente un método de análisis de las imágenes wide-field que permite detectar automáticamente los eventos de Ca^{2+} localizados, aún en imágenes muy ruidosas. El código desarrollado para este fin está basado en el abordaje propuesto en [87] para identificar señales de Ca^{2+} en miocitos desde el lado luminal ya que la observación en wide-field y la observación de señales desde el lumen comparten la dificultad de poder identificar pequeñas (pero significativas) variaciones de fluorescencia en un entorno muy ruidoso o de mucha luminosidad. El método propuesto permite hallar de forma rápida sitios en donde puede haber ocurrido una liberación de Ca^{2+} en secuencias de imágenes. La combinación del método de adquisición y el análisis automatizado de las imágenes conforman un primer paso necesario para determinar cómo se propaga una señal de Ca^{2+} dentro de un cúmulo de RIP_3s mediante CICR. La posibilidad de avanzar en este aspecto es muy importante, especialmente en vista de observaciones recientes que han mostrado que la difusión del IP_3 en las células se ve dificultada probablemente debido a la presencia de RIP_3s silenciosos [19].

6.3. Modificación del microscopio wide-field

Los experimentos presentados en este capítulo fueron realizados utilizando un microscopio wide-field en el que se modificó la fuente de iluminación y una cámara EMCCD (del inglés *Electron-multiplying Charge Coupled Device*) antes de la cual se colocó una interfaz que provee un aumento adicional de $5\times$. A continuación se describe la modificación realizada al sistema de iluminación del microscopio y la interfaz utilizada para proveer el aumento adicional antes de la cámara. Puede hallarse en el Apéndice A una descripción detallada del cuerpo del microscopio (que se comparte con el microscopio confocal). En todos los experimentos que se presentan en este capítulo, se utilizó el objetivo de inmersión en aceite $60\times$.

6.3.1. Cambio en la iluminación

El microscopio comercial Olympus IX-81 cuenta con una lámpara de mercurio (Hg) como fuente de iluminación. Según el fluoróforo que se quiera utilizar, se selecciona el cubo de fluorescencia necesario para filtrar la longitud de onda de excitación necesaria. Si bien la lámpara ofrece varias líneas de emisión, no se tiene control independiente de cada una de ellas. Al usar esta fuente de iluminación la única forma de seleccionar qué longitudes de onda llegan a la muestra es usando filtros. Si bien se pueden usar dos longitudes de onda simultáneamente, no se puede tener control individual de la temporalidad de cada una de ellas ni de su intensidad. En particular, para los experimentos de señalización, se quiere excitar al fluoróforo con luz azul mientras que se fotolibera al compuesto

enjaulado con luz UV. Como se quiere tener control independiente de ambas fuentes de luz, la lámpara de Hg no sirve para este fin. Con el fin de poder realizar la excitación del fluoróforo y la fotoliberación del IP₃ enjaulado en simultáneo, se cambió este sistema de iluminación. Se reemplazó a la lámpara por un sistema de LEDs (Tk-LEDs de Tolket) que cuenta con 3 LEDs (azul, verde y UV). Se muestran en el gráfico de la Fig. 6.1 los espectros de los LEDs utilizados en los experimentos de este capítulo. Este sistema otorga una gran ventaja frente a la lámpara de Hg ya que permite seleccionar el espectro de iluminación sin tener que recurrir al filtrado óptico. Cada LED puede controlarse de manera independiente y muy rápida. Esta modificación permite, por ejemplo, tener una excitación continua del fluoróforo y a su vez fotoliberar al compuesto enjaulado de forma pulsada o continua según el experimento que se desee realizar.

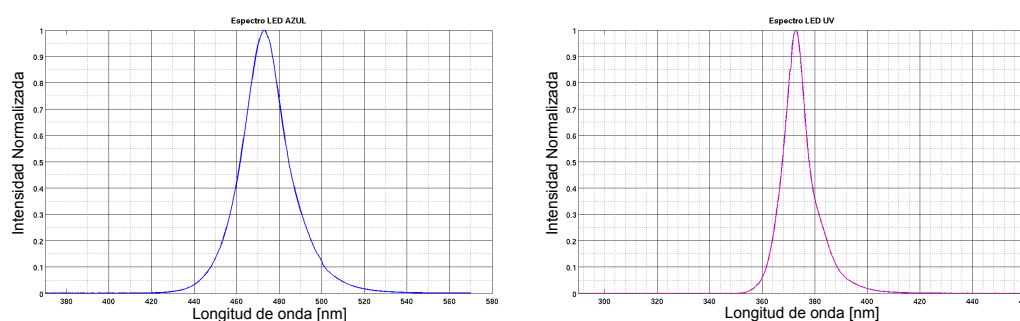


Figura 6.1: Espectros de los LEDs utilizados. Se representa en línea azul el espectro del LED azul y en línea violeta el espectro del LED UV.

Además de cambiar el sistema de iluminación, se modificó el cubo de fluorescencia utilizado para el fluoróforo Fluo-4 para poder iluminar a la muestra con el LED azul y simultáneamente fotoliberar al IP₃ enjaulado con el LED UV. Se removió el filtro de excitación (470/40 nm) del cubo y se lo colocó frente al LED azul. No se modificaron el espejo dicroico (500 nm) ni el filtro de emisión (525/50 nm) del cubo. Utilizando este cubo modificado pueden ingresar a la muestra las longitudes de onda necesarias para fotoliberar al compuesto enjaulado (355 nm) y para excitar al fluoróforo Fluo-4 (494 nm).

6.3.2. Detección de la fluorescencia

Se utilizó una cámara EMCCD (Cascade 128+ de Photometrics) para la adquisición de imágenes. Este dispositivo puede adquirir hasta 500 imágenes por segundo. El microscopio cuenta con un puerto lateral en donde se puede acoplar a la cámara. En lugar de colocar la cámara directamente al puerto lateral se agregó en este camino un ocular 5× (Olympus PE 125) y se modificó la salida del puerto agregando un tubo adaptador con el ocular en su interior. El agregado de este ocular modifica el tamaño del píxel (ya que cambia el campo de observación del microscopio) y la resolución espacial. Se

muestra en la Fig. 6.2 un esquema del microscopio wide-field modificado. Pueden verse en este esquema los LEDs y el agregado del ocular 5× en el camino de la detección.

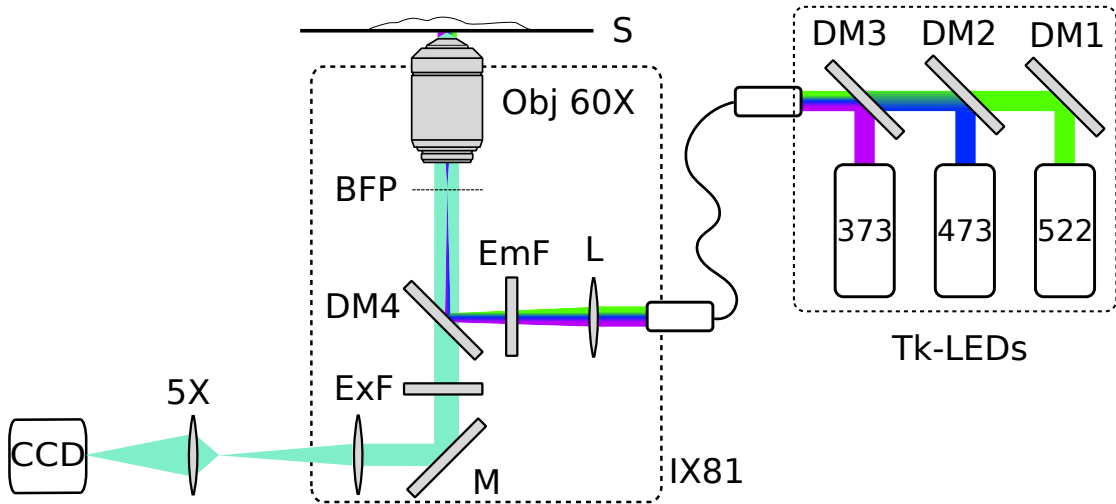


Figura 6.2: Esquema del set-up wide-field modificado utilizado para realizar los experimentos de este capítulo.

6.4. Resolución espacial del microscopio wide-field

Para caracterizar y cuantificar la resolución espacial del microscopio se adquirió la PSF (del inglés *Point Spread Function*) experimental. El método utilizado para adquirir la PSF se describe a continuación y se muestran luego los resultados obtenidos tanto para la resolución lateral como para la resolución axial.

6.4.1. Método para adquirir la PSF experimental

Para obtener las PSF radial y axial del set-up se realizó el siguiente procedimiento. Se preparó primero una muestra que contenía microesferas fluorescentes de ~ 40 nm de diámetro cuya emisión y absorción coincidiera con la del fluoróforo que se utilizó luego (FluoSpheres Yellow-Green de Molecular Probes). Se disolvieron primero las microesferas para obtener una solución poco concentrada. Se depositó una gota de esta solución sobre un cubreobjetos. Una vez que se evaporó el líquido se cubrió con una gota del aceite de inmersión que se utiliza con el objetivo 60×. La solución debe estar poco concentrada para poder luego observar (idealmente) una única microesfera a la vez en el campo de observación del microscopio. Se colocó la muestra en el microscopio y se adquirieron imágenes de las microesferas utilizando los mismos parámetros de adquisición que se utilizarían luego para adquirir imágenes de la estructura del ovocito y de las señales de Ca^{2+} en su interior. Se adquirió una pila de imágenes en la dirección axial (o dirección Z) que corresponde a la dirección perpendicular al plano de observación (plano XY). El

paso elegido entre cada imagen fue de $0.02 \mu\text{m}$. Se procesaron luego las imágenes para reconstruir la PSF del set-up. Para estimar la resolución se ajustaron los datos de la PSF experimental con una función gaussiana.

6.4.2. Resolución lateral

Para cuantificar la resolución lateral (o radial, es decir en el plano XY) se construyó la PSF experimental radial. Usando el método descrito en la sección anterior se obtuvieron imágenes de microesferas fluorescentes de tamaño sub-resolución y con estas imágenes se puede reconstruir la PSF del sistema. Se muestra en la Fig. 6.3 el gráfico correspondiente a la PSF radial del microscopio. Los datos experimentales obtenidos (puntos) se ajustaron con una función gaussiana (línea) que se superpone en el gráfico. Se usa el FWHM (del inglés *Full Width at Half Maximum*) de la función gaussiana de ajuste como estimación de la resolución lateral. Se estimó un FWHM de $0.56 \mu\text{m}$ a partir del ajuste de los datos experimentales adquiridos.

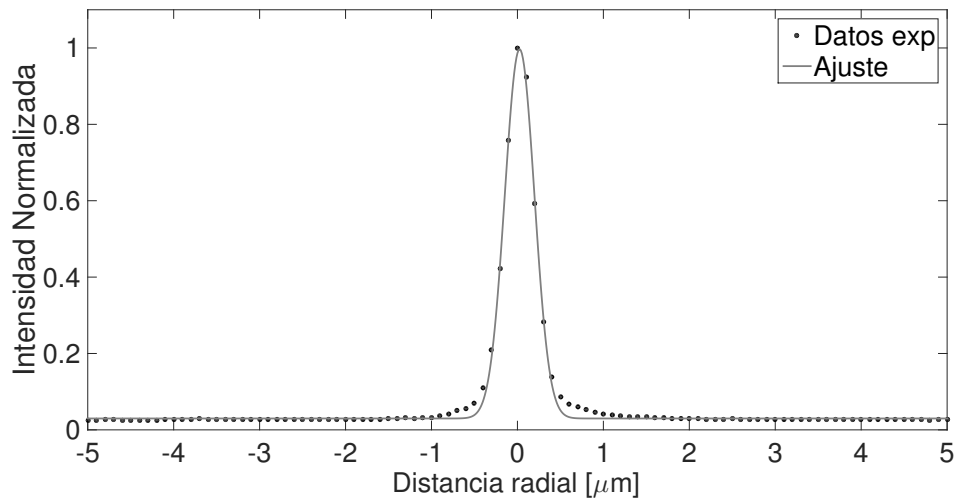


Figura 6.3: PSF lateral del microscopio wide-field obtenida experimentalmente. Perfil de intensidad normalizado como función de la coordenada lateral. Los puntos representan los datos experimentales y la línea sólida el ajuste gaussiano.

6.4.3. Resolución axial

El gráfico de la Fig. 6.4 muestra la PSF axial experimental adquirida (puntos) junto con el ajuste gaussiano correspondiente (línea). Como se puede observar en el gráfico de la Fig. 6.4 los datos experimentales presentan asimetría. Esto indica que el sistema no es ideal. Se puede sin embargo ajustar los datos con buena precisión y así estimar la resolución axial del set-up. A partir del ajuste de los datos experimentales, se estima que el FWHM en la dirección axial es de $1.2 \mu\text{m}$.

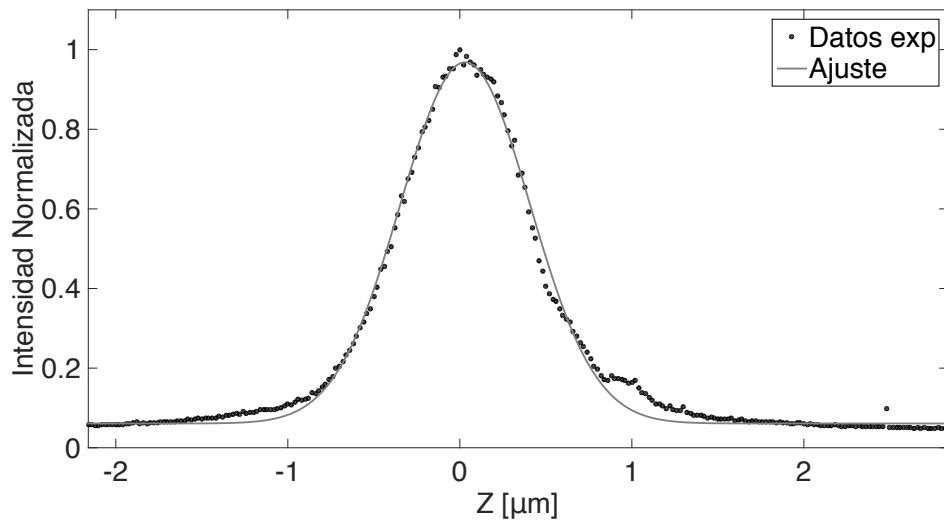


Figura 6.4: PSF axial del microscopio wide-field obtenida experimentalmente. Perfil de intensidad normalizado como función de la coordenada axial. Los puntos representan los datos experimentales y la línea sólida el ajuste gaussiano.

6.5. Imágenes estáticas

Como paso previo a la observación de señales y con el fin de caracterizar la capacidad del set-up wide-field de distinguir y resolver estructuras intracelulares se adquirieron imágenes de distintas estructuras estáticas del ovocito. En esta sección se muestran imágenes de la distribución del Ca^{2+} citosólico y de la membrana del RE.

Los experimentos para observar la distribución de Ca^{2+} citosólico fueron realizados usando el indicador Fluo-4 dentro del ovocito. Las características principales de este fluoróforo se describen en el Apéndice A. Se utilizó una concentración intracelular de Fluo-4 de $37 \mu\text{M}$. Se utilizó el LED azul para excitar al fluoróforo y se enfocó el objetivo en el interior del ovocito, aproximadamente a la altura de los gránulos. La adquisición se realizó con un tiempo de exposición de la cámara largo para coleccionar mucha luz en cada píxel. En la Fig. 6.6 A se puede observar el tipo de imágenes que se obtiene de este modo. En ella se distinguen los gránulos en donde el Fluo-4 no ingresa y por lo tanto la fluorescencia es mucho más baja. Los bordes de estas estructuras, sin embargo, no se llegan a resolver con mucha precisión.

Los experimentos para observar la membrana del RE fueron hechos con el fluoróforo Dil cuyas propiedades se describen en el Apéndice A. En este caso se iluminó a la muestra con el LED verde y nuevamente se colectó la fluorescencia con el objetivo $60\times$. En la Fig. 6.7 A se muestra el tipo de imágenes que se obtiene de este modo. Como en el caso anterior el contraste no es óptimo lo que dificulta la observación de la estructura marcada.

6.5.1. Métodos de procesamiento de imágenes

Con el objetivo de mejorar el contraste de las imágenes obtenidas con el microscopio wide-field y poder resolver mejor las estructuras internas del ovocito se proponen dos métodos de procesamiento de las imágenes. Se describen a continuación los dos métodos utilizados para procesar las imágenes adquiridas con el microscopio wide-field. El primer método está basado en el análisis de la distribución de intensidades de las imágenes mientras que el segundo es la aplicación de un filtro.

6.5.1.1. Aplicación de un umbral a partir del análisis de la distribución de intensidades

El primer procesamiento aplicado para mejorar el contraste de las imágenes estáticas adquiridas consistió en elegir y aplicar un umbral de intensidad. Para determinar el valor del umbral apropiado para cada imagen se analizó primero el histograma de intensidad de cada una de ellas. Se elaboró un criterio con el fin de separar los píxeles de ruido de los de fluorescencia de un indicador. Suponiendo que las distribuciones de los píxeles de ruido y de fluorescencia son gaussianas, se ajustó el histograma de intensidad de cada imagen con dos funciones gaussianas como se explica a continuación. Se computó primero el máximo de la distribución total y se ajustó con la primer gaussiana, G_1 , hasta ese valor. Se restó luego a la distribución total la función G_1 . Se obtuvo de esta forma la distribución de píxeles de mayor intensidad que se ajustó también con una función gaussiana, G_2 . Se tomó como umbral T al valor medio de la gaussiana G_1 correspondiente a los píxeles de menor intensidad (los que se consideran ruido). Se muestra en la Fig. 6.5 un esquema que ejemplifica el procedimiento descrito para elegir el umbral de intensidad de las imágenes wide-field adquiridas. La línea punteada proviene de un experimento del estilo del ilustrado en la Fig. 6.6 A. Se trata de un histograma de intensidad de fluorescencia de los píxeles de la imagen obtenida. Las curvas rayada y entera corresponden a las dos gaussianas con las que se ajusta el histograma. El valor T del umbral está también indicado en la figura. Se asocia la función gaussiana graficada con línea rayada G_1 a la sub-población de píxeles que se supone son de ruido mientras que se identifica a la de línea sólida G_2 con la distribución de píxeles de fluorescencia del indicador. Una vez determinado el valor del umbral, T , (que corresponde al valor medio de la fluorescencia para la primera gaussiana), todos los píxeles con intensidades por debajo de este valor se consideran de ruido y se lleva su intensidad a 0. De esta forma se obtienen imágenes en las que se maximiza el contraste para poder identificar mejor estructuras y minimizar el ruido.

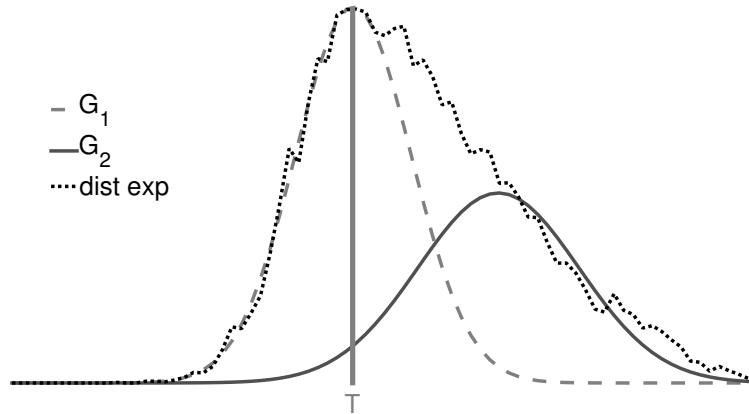


Figura 6.5: Esquema del procedimiento utilizado para elegir un umbral y mejorar el contraste de las imágenes wide-field. La línea punteada ejemplifica una distribución de intensidad de píxeles de una imagen. La línea rayada es el ajuste con una función gaussiana G_1 de la primera sub-población de píxeles (considerados de ruido) y la línea sólida es el ajuste G_2 de la segunda sub-población (píxeles de fluorescencia no ruidosa).

Se indica el umbral T tomado como el valor medio de la primera distribución.

Para verificar que este criterio para mejorar el contraste fuera útil, se aplicó también el método de Otsu [102] a las imágenes analizadas obteniendo valores similares para el umbral en cada caso.

6.5.1.2. Aplicación de un filtro pasabanda

Otra forma de mejorar el contraste de las imágenes y deshacerse de la luz de planos no focales es aplicar un filtro pasabanda. Este procesamiento se realizó de forma automatizada con un plug-in del programa ImageJ [103]. El método para filtrar la imagen consiste en deshacerse de las frecuencias espaciales muy altas o muy bajas para eliminar luz fuera de foco (estructuras muy grandes) y ruido (estructuras muy pequeñas). El filtrado se realiza luego de hacer la transformada de Fourier de la imagen y pasar al espacio de las frecuencias espaciales. Se probaron distintos filtros y finalmente se trabajó con un filtro que suaviza las estructuras menores a 3 píxeles y elimina las estructuras superiores a 20 píxeles.

6.5.2. Imágenes procesadas de estructuras internas del ovocito

Se muestran en esta sección las imágenes de la distribución del Ca^{2+} citosólico y de la membrana del RE ya descriptas a las que se les aplicó el método del umbral y el filtro pasabanda.

6.5.2.1. Observación del Ca^{2+} citosólico

Como ya se indicó, la Fig. 6.6 A muestra una imagen de la distribución de la fluorescencia del indicador Fluo-4 dentro del ovocito obtenida antes de aplicar el procesamiento. En la Fig. 6.6 B se muestra la misma imagen pero luego de haberle aplicado el umbral descrito en la Sección 6.5.1.1. En este caso se distinguen mejor los contornos de las estructuras citosólicas en donde el indicador no entró. En la imagen de la Fig. 6.6 B se pueden identificar por ejemplo los gránulos de pigmento como estructuras esféricas opacas. De esta forma, se mejora el contraste de las imágenes wide-field y esto permite ubicarse con mayor precisión dentro de la célula y distinguir sus estructuras. Se muestra en la imagen de la Fig. 6.6 C el resultado de aplicar el filtro pasabanda descrito en la Sección 6.5.1.2. En este caso también mejora el contraste y se distinguen mejor las estructuras como los gránulos y sus contornos.

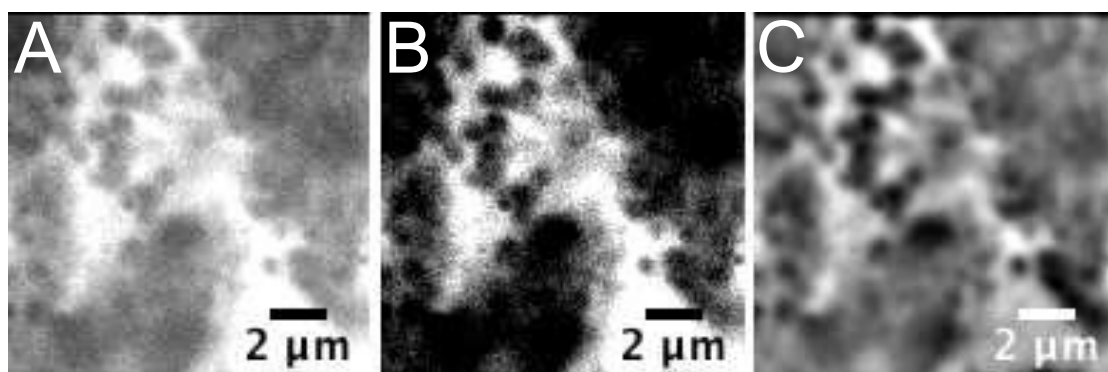


Figura 6.6: Imagen de la fluorescencia del indicador Fluo-4 dentro del ovocito. **A** Imagen sin procesamiento. **B** Misma imagen que **A** luego de aplicarle el umbral descrito en la sección 6.5.1.1. **C** Misma imagen que **A** luego de aplicarle el filtro descrito en la sección 6.5.1.2.

Para cuantificar cuán bien resuelve estructuras internas el set-up wide-field agregándole el procesamiento de datos descrito en la sección 6.5.1.1, se analizaron distintas imágenes provenientes de distintos ovocitos y se midió el diámetro de los gránulos de pigmento como referencia. Se obtuvo un diámetro medio de valor $1.47 \pm 0.20 \mu\text{m}$ que se compara relativamente bien con el valor obtenido al medir estas estructuras a partir de imágenes adquiridas con el microscopio confocal ($1.11 \pm 0.31 \mu\text{m}$) como las que se muestran en la Fig 3.5 del Capítulo 3 por ejemplo. Si bien el contraste que ofrece la microscopía confocal es mucho mayor, al aplicar los procesamientos de imágenes descritos en la sección anterior se pueden caracterizar las mismas estructuras internas con ambos set-ups.

6.5.2.2. Observación de la membrana del RE

Como ya se indicó, la Fig. 6.7 A muestra una imagen de la distribución de la fluorescencia del marcador de membrana Dil dentro del ovocito obtenida antes de aplicar

el procesamiento. Al aplicar los procesamientos descritos anteriormente a esta imagen se obtuvieron las imágenes de las Figs. 6.7 B y C. En este caso al aplicar el umbral el contraste obtenido es mayor que al pasarle a la imagen el filtro pasabanda. Ambos procesamientos mejoran la detectabilidad de las estructuras respecto de la imagen sin procesar.

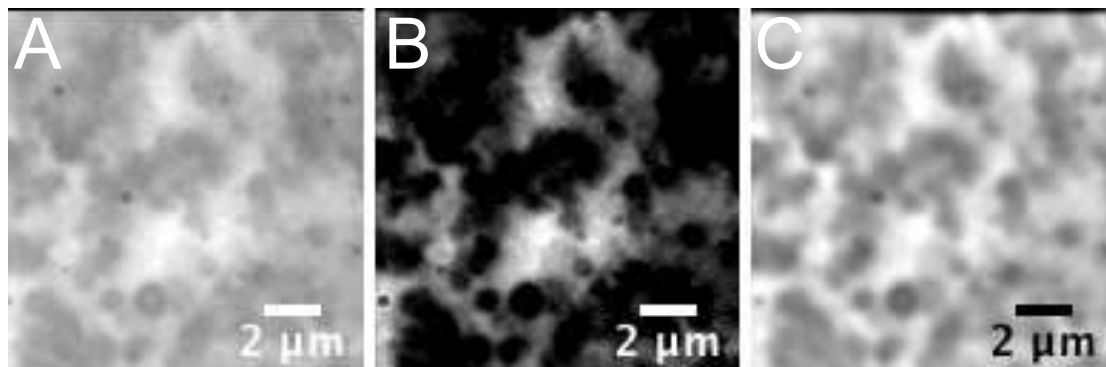


Figura 6.7: Imagen de la fluorescencia del indicador Dil dentro del ovocito. **A** Imagen sin procesamiento. **B** Misma imagen que **A** luego de aplicarle el umbral descrito en la sección 6.5.1.1. **C** Misma imagen que **A** luego de aplicarle el filtro descrito en la sección 6.5.1.2

Se puede afirmar luego de haber obtenido imágenes del Ca^{2+} citosólico y de la membrana del RE que el set-up wide-field logra resolver distintas estructuras internas del ovocito y que al aplicarle a las imágenes procesamientos relativamente simples y rápidos se logra una mejora considerable del contraste. Esto es importante ya que el fin último de este set-up es poder observar señales de Ca^{2+} dentro de los ovocitos y para ello es indispensable poder ubicarse dentro de la célula y poder tener buena resolución espacial y buen contraste.

6.6. Detección de señales intracelulares de Ca^{2+}

Luego de utilizar el set-up wide-field modificado para obtener imágenes de estructuras internas del ovocito se lo utilizó en experimentos dinámicos de señalización de Ca^{2+} . Se describen en esta sección los experimentos realizados y el método utilizado para detectar automáticamente eventos a partir de las imágenes adquiridas.

6.6.1. Experimentos de adquisición de señales de Ca^{2+} con el set-up wide-field

Para evocar y detectar señales de Ca^{2+} con el set-up wide-field se utilizaron los LEDs UV y azul para fotoliberar IP_3 enjaulado y para excitar al fluoróforo Fluo-4 respectivamente. La fotoliberación del compuesto enjaulado se realizó presentando un

pulso UV de duración ~ 100 ms poco después de comenzar la adquisición de imágenes con la cámara. Para los experimentos presentados a continuación las concentraciones intracelulares de Fluo-4 e IP_3 en los ovocitos fueron $37 \mu\text{M}$ y $9 \mu\text{M}$ respectivamente. Se utilizó también el *buffer* exógeno EGTA para favorecer la localización espacial de las señales (evitar la generación de ondas de Ca^{2+} o eventos grandes como se explica en el Apéndice A). La concentración de EGTA utilizada fue de $370 \mu\text{M}$. Se utilizó el objetivo $60\times$ para coleccionar la fluorescencia. Antes de empezar la adquisición se tomaron una serie de imágenes similares a las presentadas en la sección 6.5.2.1 con tiempos de exposición de la cámara largos y de esta forma se eligió la ubicación dentro de la célula. Como en estos experimentos se quiere detectar señales breves (*puffs* de Ca^{2+}), el tiempo de exposición de la cámara durante el experimento de fotoliberación de IP_3 fue breve. Esto significa que las imágenes obtenidas son más ruidosas que las obtenidas en los experimentos estáticos de la Sección 6.5.2 y por eso no se distinguen las estructuras internas durante este experimento dinámico. Se tomaron imágenes de una región de $13 \mu\text{m} \times 13 \mu\text{m}$ dentro del ovocito a la altura de los gránulos. Se toma una imagen cada 10 ms y en total se adquirieron 500 imágenes. El resultado de un experimento de este tipo es una pila de imágenes, en este caso de $128 \text{ píxeles} \times 128 \text{ píxeles} \times 500$ cuadros.

Un ejemplo de los resultados obtenidos al evocar señales de Ca^{2+} fotoliberando IP_3 enjaulado se observa en la Fig. 6.8. En el panel de la izquierda de la Fig. 6.8 se muestra una imagen (o cuadro) de la fluorescencia normalizada $F_N = (F - F_0)/F_0$ observada luego del estímulo de fotoliberación respecto de la fluorescencia basal previa al estímulo (F_0). Se detalla en el Apéndice B la forma en que se calcula el valor F_0 para cada píxel y se normalizan luego todas las imágenes con esta fluorescencia basal. Se trabaja con esta fluorescencia y no con la fluorescencia cruda (F) para distinguir mejor los eventos. Como se puede ver en la imagen de la Fig. 6.8, al adquirir con tiempos de exposición muy breves no sólo no se distinguen las estructuras internas sino que todo lo que se ve parece ser ruido. Como primera aproximación para verificar que se podían detectar señales de Ca^{2+} con este set-up, se identificaron manualmente los sitios en las imágenes que presentaban mayores aumentos de la fluorescencia luego del estímulo. Se identificaron visualmente 5 sitios en donde ocurren eventos. Éstos se indican con puntos numerados de 1 a 5 en la imagen de la Fig. 6.8. En cada uno de los 5 sitios indicados se promedia espacialmente la fluorescencia normalizada sobre una región de ~ 16 píxeles ($0.4 \mu\text{m} \times 0.4 \mu\text{m}$). El tamaño de las regiones sobre las que se promedia en este caso es tal que típicamente abarcaría la extensión de un único cúmulo de RIP_3s . La evolución temporal del promedio espacial de F_N sobre la región seleccionada, $\langle F_N \rangle(t)$, en estos sitios se muestra en el panel de la derecha de la Fig. 6.8. A pesar de que los gráficos son ruidosos, se distinguen elevaciones marcadas y breves (picos en los gráficos) de $\langle F_N \rangle$ en los 5 sitios. Se observa una elevación de la fluorescencia en los sitios 1, 2 y 3 que ocurre de

forma simultánea (dentro de la resolución temporal del experimento) ~ 1 s después de que se presenta el estímulo UV. Estos tres sitios están suficientemente separados como para considerar que estos eventos surgen de cúmulos de $\text{RIP}_{3\text{s}}$ distintos. De esta forma, este set-up permite la detección de eventos simultáneos en sitios distantes. Por otro lado, los sitios 2 y 4 están muy próximos pero presentan eventos que no necesariamente están correlacionados entre sí. Esto indica que este set-up permite diferenciar este tipo de eventos aún si espacialmente son muy cercanos.

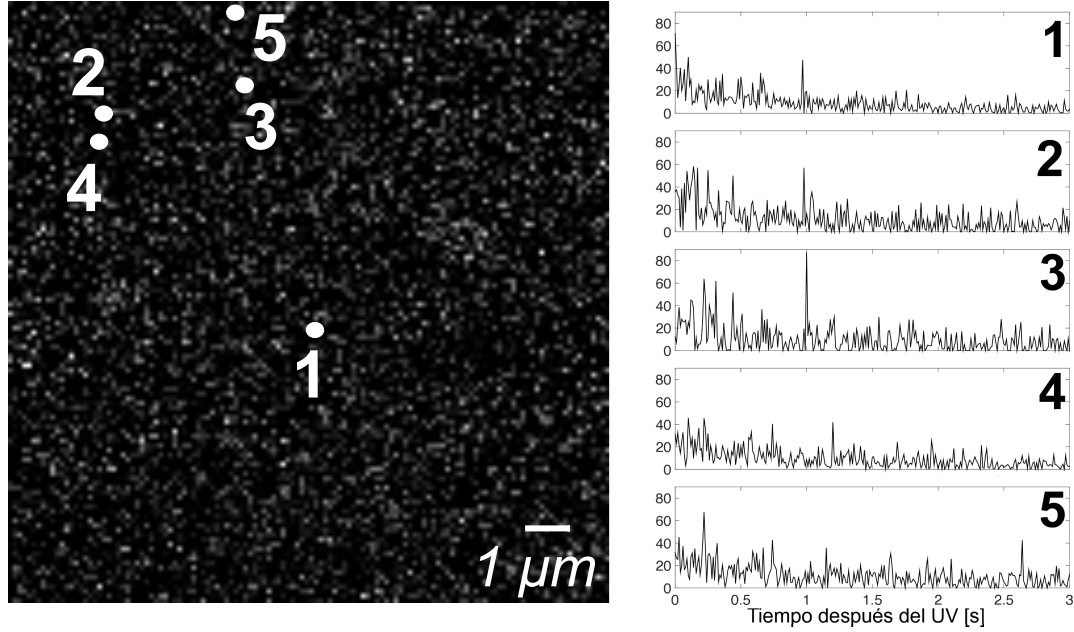


Figura 6.8: Señales de Ca^{2+} detectadas con el set-up wide-field modificado. A la izquierda, una imagen de la región observada en donde se marcan los sitios de liberación (1-5) identificados manualmente. A la derecha, perfiles temporales de $\langle F_N \rangle$ en los sitios marcados.

Hasta ahora se mostró que el set-up wide-field modificado tiene la capacidad de adquirir señales de Ca^{2+} localizadas con alta resolución temporal. Se quiere saber además si es posible distinguir eventos que ocurren en puntos muy cercanos entre sí utilizando las imágenes wide-field. Para tal fin se analizó también el comportamiento de la fluorescencia en una pequeña región alrededor del sitio 3 de la Fig. 6.8 para estudiar la capacidad del set-up de resolver eventos con alta resolución espacial. Como se muestra en el esquema de la izquierda de la Fig. 6.9 se elige una región de 16 píxeles que se divide a su vez en 4 sub-regiones del mismo tamaño. Se promedia la fluorescencia normalizada para cada una de estas sub-regiones de $0.2 \mu\text{m} \times 0.2 \mu\text{m}$ y se estudia su evolución temporal. Se muestran en el panel de la derecha de la Fig. 6.9 estas 4 evoluciones temporales. Los perfiles temporales de las 4 sub-regiones presentan elevaciones breves en distintos tiempos. A pesar de que las sub-regiones analizadas son adyacentes y de que se está casi en el límite de la resolución espacial, los comportamientos observados son distintos. Esto indica que este set-up además de ofrecer alta resolución temporal tiene la capacidad de

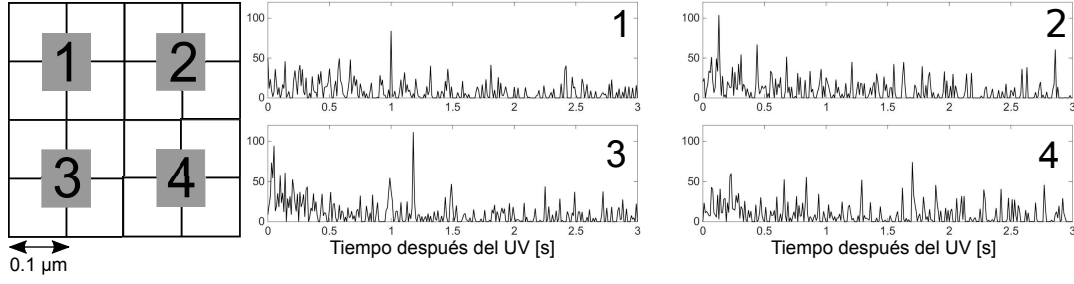


Figura 6.9: Señales de Ca^{2+} detectadas con el set-up wide-field modificado. Detalle de la evolución temporal de 4 subregiones dentro del sitio 3 de la Fig. 6.8.

detectar eventos individuales en regiones muy cercanas. Se podría inclusive pensar que las 4 sub-regiones indicadas forman parte del mismo cúmulo de RIP_3s y que se están observando eventos dentro del cúmulo.

6.6.2. Procesamiento de imágenes de señales y método de detección automática de eventos breves de liberación de Ca^{2+}

Luego de realizar experimentos dinámicos y de identificar liberaciones de Ca^{2+} de forma manual, se desarrolló un método que permite identificar posibles sitios de liberación en las pilas de imágenes wide-field. El objetivo de este método fue obtener las coordenadas espaciales de los sitios en donde ocurrieron liberaciones de Ca^{2+} de forma automatizada y rápida. El método tiene distintas etapas de procesamiento de los datos. Todas estas etapas forman parte de una rutina de MATLAB [104] escrita específicamente para este análisis. El procesamiento de las imágenes realizado se resume en el esquema de la Fig. 6.10. Como se ve en este esquema se puede partir de la pila de imágenes sin ningún procesamiento F o de la pila filtrada F_F . El filtrado es el descrito en la sección 6.5.1.2 que se puede realizar sobre todas las imágenes de la pila. En primer lugar, como se hizo en la sección anterior, se normalizaron todas las imágenes de una pila respecto de la fluorescencia basal antes del estímulo UV. Se obtiene de esta forma una imagen $F_N(i, j)$ para cada tiempo en donde (i, j) son las coordenadas espaciales de cada píxel en la imagen. Para distinguir e identificar los sitios en donde ocurren elevaciones de la fluorescencia notables, se propone como segunda etapa del procesamiento la aplicación de un umbral de intensidad. Para cada píxel (i, j) se definió un umbral $U(i, j)$ que tiene en cuenta el promedio temporal de la fluorescencia normalizada en ese píxel antes del UV, $\overline{F_N(i, j)}_{t < T_{UV}}$, y su desvío estándar, $\sigma_N(i, j)$. Se tomó como umbral al valor $U(i, j) = \overline{F_N(i, j)}_{t < T_{UV}} + 8\sigma_N(i, j)$ y se utilizó este valor para binarizar las imágenes. Para cada imagen (es decir para cada tiempo t) si $F_N(i, j) > U(i, j)$ se reemplazó la intensidad en ese píxel por 1 y si $F_N(i, j) < U(i, j)$ se reemplazó la intensidad de ese píxel por 0. De esta forma se obtuvo una pila de imágenes binarias F_B . En esta etapa, se podría haber realizado una inspección visual (como se realizó en la sección anterior) de

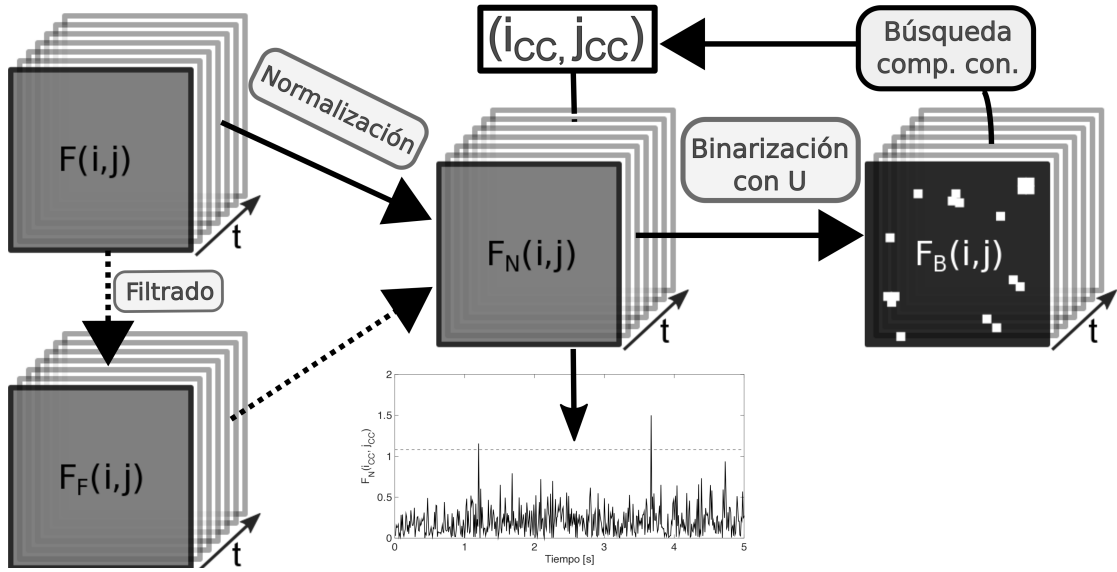


Figura 6.10: Esquema del método para realizar la búsqueda automática de los sitios de liberación. Se representan las distintas etapas del procesamiento de las pilas de imágenes. F representa la fluorescencia cruda, F_N representa la fluorescencia normalizada respecto de la fluorescencia basal F_0 , F_B representa la imagen binaria obtenida luego de aplicar el umbral U en cada píxel de cada imagen normalizada.

las pilas de imágenes binarias para identificar los sitios (i, j) en donde había conjuntos de píxeles 1.

Para identificar de forma automatizada la localización de los sitios candidatos a ser sitios de liberación de Ca^{2+} no alcanza solamente con identificar píxeles 1 aislados en las imágenes binarizadas F_B sino que se buscaron los píxeles 1 conectados entre sí en las dimensiones espaciales y en la dimensión temporal ya que un píxel 1 aislado puede ser ruido o una fluctuación aleatoria muy alta. Para encontrar estos píxeles 1 conectados en la pila de imágenes F_B se utilizó una función de MATLAB [104] que busca componentes conectadas (objetos) de un cierto tamaño en imágenes binarias (pueden ser imágenes 2D o como en este caso imágenes 3D). El resultado de esta búsqueda en la pila de imágenes binarizadas es una lista de coordenadas espaciales (i_{CC}, j_{CC}) en donde se encuentran las componentes conectadas.

Finalmente, para comprobar si en los sitios (i_{CC}, j_{CC}) hay elevaciones de la fluorescencia durante el registro, se graficaron las series temporales de la fluorescencia en cada uno de esos sitios. En el esquema de la Fig. 6.10 se representa a esta etapa con un gráfico de F_N vs t en un sitio (i_{CC}, j_{CC}) . Se muestran en la Fig. 6.11 algunos de los eventos detectados automáticamente usando el método descrito en esta sección aplicado a la medición presentada en la Fig. 6.8.

Los 4 perfiles temporales que se muestran en los gráficos de la Fig. 6.11 corresponden a la evolución temporal de la fluorescencia en 4 píxeles en la imagen de fluorescencia

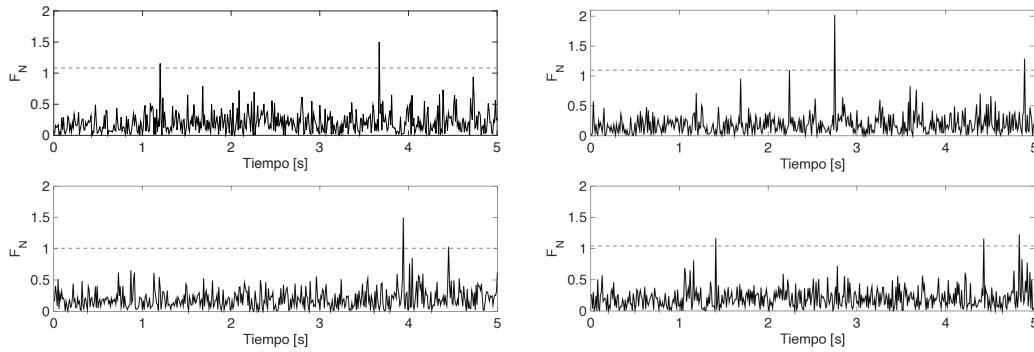


Figura 6.11: Eventos detectados automáticamente con el algoritmo presentado en esta sección. Cada gráfico corresponde a la fluorescencia normalizada F_N en un sitio (un pixel) en función del tiempo.

normalizada F_N . En este caso no se realiza ningún promedio espacial. A pesar de que los registros son ruidosos, se puede apreciar la aparición de elevaciones breves que se distinguen claramente del fondo ruidoso. Para descartar que se trate de posibles fluctuaciones, se graficó para cada uno de los registros una línea vertical que en cada caso corresponde al umbral U que se define respecto del valor medio y el desvío estándar de cada serie temporal como $U = \langle F_N \rangle + 5\sigma$.

6.7. Discusión

En este capítulo se presenta una forma de detectar señales de Ca^{2+} en ovocitos de *Xenopus laevis* con alta resolución temporal mediante el uso de un microscopio wide-field modificado. Se cambió el sistema tradicional de iluminación fluorescente (lámpara de Hg) por un sistema de LEDs de control independiente. Para lograr excitar fluorescencia y evocar señales fotoliberando IP_3 enjaulado, se modificó el cubo standard de fluorescencia de forma tal que a la muestra lleguen simultáneamente las longitudes de onda de excitación y de fotólisis. Se agregó además un ocular adicional $5\times$ frente a la cámara. Se cuantificó la resolución espacial del set-up midiendo la PSF experimental. El set-up modificado se utilizó luego para observar estructuras internas del ovocito. Las estructuras observadas son comparables a las que se pueden observar en el microscopio confocal (ver Figs. 3.5 y 3.7 del Capítulo 3). A pesar de que el contraste de las imágenes adquiridas con el microscopio wide-field modificado no es tan bueno como el de las imágenes confocales, pueden aplicarse procesamientos de las imágenes para mejorar este aspecto. Aplicando un umbral a las imágenes wide-field se logró cuantificar el tamaño de las estructuras observadas y se obtuvieron resultados comparables a los obtenidos en imágenes confocales. Se puede también mejorar las imágenes aplicándoles un filtro pasabanda y descartando de esta forma estructuras muy grandes o ruido.

Se utilizó finalmente el set-up wide-field para evocar y detectar señales de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 s en ovocitos. Aprovechando la alta resolución temporal de la cámara EMCCD, se obtuvieron registros de imágenes de la fluorescencia de un indicador de Ca^{2+} en una región dentro del ovocito mientras que se fotoliberó simultáneamente IP_3 enjaulado. Esto fue posible gracias a la modificación realizada en la iluminación del set-up que permite la entrada simultánea de las dos longitudes de onda necesarias. Se observaron señales breves y localizadas. Algunos de estos eventos se detectaron simultáneamente en sitios distintos y distantes que no hubieran sido detectados de haber usado microscopía confocal. Al incorporar el ocular $5\times$ a la detección se pudo detectar fluorescencia de una región más pequeña y mejorar el seccionado óptico en la dirección axial. Se pudo de esta forma detectar *puffs* de Ca^{2+} en distintos sitios con relativamente alta precisión y sin tener que sacrificar una dimensión espacial. Esto representa una ventaja si se quiere estudiar el acoplamiento entre sitios de liberación o la propagación de ondas de Ca^{2+} a través de la célula.

A pesar de que las imágenes obtenidas con este set-up no tienen tan buen contraste como las imágenes obtenidas con microscopía confocal, el ruido de fondo puede reducirse para permitir la identificación de regiones marcadas adentro del oocito. Pueden además obtenerse imágenes de señales de Ca^{2+} de una región que abarca $0.2\ \mu\text{m} \times 0.2\ \mu\text{m}$. Dado que se supone que los cúmulos de RIP_3 s cubren un área de $\sim 0.25\ \mu\text{m}^2$, la obtención de dichas imágenes abre la posibilidad de realizar análisis de super-resolución como los utilizados en las técnicas de fPALM [105] o STORM [106] para inferir la localización desde donde el Ca^{2+} es liberado durante los *puffs* de Ca^{2+} en oocitos. A pesar de que todavía no está claro que estos análisis puedan ser directamente aplicados para este propósito, esta estrategia se ha seguido para analizar imágenes de microscopía TIRF de *puffs* de Ca^{2+} [107].

Estos resultados prueban en primer lugar que se pueden inducir y detectar señales con el set-up wide-field. A pesar de que este tipo de microscopía ofrece menor contraste y por lo tanto la relación señal ruido de las imágenes no es la ideal, se lograron detectar señales de Ca^{2+} en distintos sitios simultáneamente y que se distinguen de forma significativa del ruido. Este set-up ofrece una ventaja que es la alta resolución temporal de la adquisición de imágenes. Esto permite poder observar eventos muy breves que ocurren en sitios distantes dentro del ovocito en tiempos muy cercanos y hasta simultáneamente.

Capítulo 7

Conclusiones

El estudio de las señales intracelulares de Ca^{2+} es de gran interés dado que estas señales están involucradas en una gran variedad de procesos fisiológicos. El Ca^{2+} es universal y específico a la vez. La información transmitida por este mensajero viaja codificada en el patrón espacio-temporal que adquiere la concentración intracelular de Ca^{2+} . Para tener un entendimiento profundo de los mecanismos que moldean estas señales y su propagación es necesario abordar su estudio tanto desde los experimentos como desde el modelado. En esta tesis se investigaron en particular las señales intracelulares de Ca^{2+} mediadas por RIP_3 s en un tipo celular particular, el ovocito de *Xenopus laevis*. En esta célula el Ca^{2+} es liberado desde el interior del RE al citosol a través de los RIP_3 s. Estos receptores están organizados en cúmulos sobre la membrana del RE y pueden abrirse al ligar IP_3 y Ca^{2+} . A su vez, los receptores pueden inhibirse en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} citosólico. De esta forma, el Ca^{2+} citosólico puede modular su propia liberación. Una de las características poco estudiadas de estos receptores es su regulación por parte del Ca^{2+} contenido en el lumen del retículo.

Se observaron señales de Ca^{2+} en el interior de ovocitos utilizando distintos indicadores fluorescentes, IP_3 enjaulado y *buffers* de Ca^{2+} exógenos. Para inducir la apertura de los RIP_3 s se fotoliberó al IP_3 enjaulado dentro de las células. El Ca^{2+} es liberado desde el RE al citosol y se pueden sentir los cambios en las concentraciones del Ca^{2+} usando los indicadores. Para adquirir la fluorescencia se utilizó microscopía confocal y también microscopía wide-field. Para el análisis y la caracterización de los distintos resultados experimentales se utilizaron rutinas específicas y distintas técnicas de procesamiento de imágenes. Se desarrollaron además modelos matemáticos y simulaciones que se compararon con los resultados experimentales y sirvieron para interpretarlos.

Se estudió en primer lugar el rol del Ca^{2+} citosólico como mecanismo de acoplamiento global en la liberación de Ca^{2+} a través de los RIP_3 s. Se realizaron experimentos

y simulaciones de modelos simples para estudiar la distribución de tamaño de las señales de Ca^{2+} . Se halló que la distribución de tamaños de señales locales obtenida a partir de los experimentos presentaba una cola larga. En el Capítulo 2 se estudió la distribución de tamaños de eventos usando un modelo simple que tenía en cuenta la acumulación de Ca^{2+} citosólico luego de cada evento. Se investigaron las distribuciones de tamaños de eventos al variar distintos parámetros del modelo. En particular, se encontró que el tipo de distribución obtenida dependía fuertemente del parámetro δ_{Ca} que representaba la tasa de remoción del Ca^{2+} citosólico luego de una señal. Si la tasa de remoción era baja, es decir si el Ca^{2+} citosólico se removía lentamente del citosol y permanecía alto por más tiempo, la distribución de eventos era de tipo gaussiana. Si, en cambio, la tasa de remoción aumentaba en un orden de magnitud y por lo tanto se removía al Ca^{2+} más rápido del citosol, el tipo de eventos que se podían observar era más variable. La distribución de tamaños ya no era gaussiana sino que presentaba una cola larga. Existió por lo tanto una transición en cuanto a la propagación de las señales cuando se consideró que se podía acumular Ca^{2+} en el citosol luego de una señal. Cuando el Ca^{2+} no es removido del citosol a una tasa lo suficientemente alta, la transición desde un estado inhibido a un estado activo del RIP_3 lleva a la liberación inmediata de Ca^{2+} y a la propagación de una señal de baja intensidad (acotada espacio-temporalmente).

Para investigar el rol del Ca^{2+} luminal, se desarrolló primero un protocolo para marcar Ca^{2+} en el RE. En el Capítulo 3 se presenta el método para cargar el RE con el indicador Fluo-5N AM y se presentan distintas pruebas de que este indicador sigue la dinámica del Ca^{2+} luminal en los ovocitos de *Xenopus laevis*. Se utilizó luego el indicador luminal en combinación con un indicador citosólico y un marcador de la membrana del RE para caracterizar las estructuras internas del ovocito. Se cuantificó a partir de estos experimentos la relación entre el área y el volumen del RE en los ovocitos. Se investigó usando el indicador luminal la tasa de recarga del Ca^{2+} luminal al RE a través de las bombas SERCA analizando los cambios en la fluorescencia del Fluo-5N AM luego de evocar una liberación de Ca^{2+} . Se interpretaron los resultados experimentales con un modelo simple para cuantificar el flujo de recarga.

Combinando luego el uso del Fluo-5N AM y de un indicador citosólico cuya emisión es complementaria a la del indicador luminal, el Rhod-2, se estudió la dinámica del Ca^{2+} luminal y citosólico en simultáneo durante los primeros instantes de una liberación de Ca^{2+} mediada por RIP_3 s. En el Capítulo 4 se muestran los resultados experimentales obtenidos al seguir simultáneamente la fluorescencia de los indicadores citosólico y luminal durante una liberación. Se cuantificaron las variaciones de la fluorescencia de ambos indicadores durante una liberación global de Ca^{2+} mediada por RIP_3 s. Se aplicó un modelo simple para obtener estimaciones de los flujos de Ca^{2+} a ambos lados de la membrana del RE durante los primeros instantes de la liberación. Se interpretaron los

resultados experimentales gracias al modelo y se concluyó que el lumen actúa como un reservorio casi inagotable de Ca^{2+} durante las liberaciones. Se atribuyó esta capacidad a los *buffers* luminales que pueden liberar Ca^{2+} muy rápido y así compensar las depleciones que ocurren en las vecindades de los RIP_3s durante una liberación. Esta propiedad junto con la geometría del RE caracterizada en el Capítulo 3 es lo que explica porqué en los ovocitos no se han podido observar depleciones locales y breves de Ca^{2+} luminal. Luego de estudiar la geometría del RE y la dinámica del Ca^{2+} luminal durante eventos de Ca^{2+} mediados por RIP_3s se observó que en los ovocitos existe un mecanismo de rellenado rápido del RE desde el interior que evita la depleción del Ca^{2+} luminal durante las señales mediadas por RIP_3s . El gran volumen que este reservorio ocupa en los ovocitos y la capacidad de liberar Ca^{2+} de los *buffers* luminales garantizan la disponibilidad de Ca^{2+} luminal aún cuando se produzca una liberación global. Se concluyó por lo tanto que el Ca^{2+} luminal no es responsable de la terminación de las señales mediadas por RIP_3s en estas células.

Usando nuevamente los indicadores luminal y citosólico en conjunto se analizaron los aspectos espacio-temporales de la dinámica del Ca^{2+} durante liberaciones prolongadas evocadas por estímulos de intensidad variable. En el Capítulo 5 se analizaron las dinámicas espacio-temporales del Ca^{2+} luminal y citosólico en este tipo de experimentos de liberación. Se observó la aparición de *spikes* de Ca^{2+} luego de una liberación inicial solamente en los casos en los que la liberación inicial de Ca^{2+} era menos intensa. Se caracterizaron los tiempos entre *spikes* así como también el tiempo de inicio de estas oscilaciones en relación a los niveles iniciales de Ca^{2+} citosólico. El análisis de estos datos sugiere que mientras más Ca^{2+} citosólico se haya liberado inicialmente, más tiempo hay que esperar para que puedan iniciar los trenes de pulsos y más largos son los *ISIs* de estos trenes. El Ca^{2+} citosólico provee por lo tanto el mecanismo de inhibición necesario para terminar las señales y parece ser el principal mecanismo de acoplamiento entre RIP_3s tanto para la propagación inicial de las señales (como se vio en el Capítulo 2) como para el tiempo que tardan los RIP_3s en recuperarse y permitir que pueda evocarse una nueva onda global.

Luego de ver el rol fundamental que juega el Ca^{2+} citosólico en la determinación del tipo de señales evocadas al acoplar receptores más o menos lejanos se trabajó en la caracterización de un set-up alternativo al microscopio confocal que permitió adquirir imágenes bidimensionales de señales de Ca^{2+} . Poder discernir la dinámica del acoplamiento entre RIP_3s de un mismo cúmulo y de cúmulos distintos y de qué modo la misma es afectada requiere resolver escalas espaciales y temporales muy pequeñas. En el Capítulo 6 se presenta un método simple y económico para la detección de señales intracelulares de Ca^{2+} que tiene alta resolución temporal y buena resolución espacial. Se muestra como con un microscopio wide-field se pueden obtener imágenes de señales de Ca^{2+} con alta

resolución temporal. Si bien la resolución axial es similar a la de la microscopía confocal mientras que la temporal es mucho mejor (ya que no es necesario escanear la muestra) el contraste no es tan bueno. Esto hace que la observación de señales de calcio se vuelva más difícil. Para poder identificar señales de forma automatizada en estas imágenes, se desarrolló un método de análisis que permite identificar variaciones pequeñas de la fluorescencia sobre un fondo ruidoso relativamente alto. El set-up junto con el tratamiento de imágenes propuesto abre las puertas para el estudio del acoplamiento mediado por Ca^{2+} de RIP_3 s pertenecientes a un mismo cúmulo incluso en células, como los ovocitos, donde los receptores se encuentran a varios μms de la membrana plasmática.

Apéndice A

Materiales y métodos

En este apéndice se describen los materiales y las técnicas utilizados para realizar los distintos experimentos presentados en los Capítulos 2 a 6 de esta tesis. Todos los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Microscopía y Microespectroscopía (LMM) del DF-UBA.

A.1. Ovocitos de *Xenopus laevis*

En todos los experimentos se utilizaron ovocitos inmaduros de *Xenopus laevis*. Se detallan a continuación los protocolos para la obtención, conservación y uso de estas células.

A.1.1. Obtención de las células

En las ranas *Xenopus laevis* hembra adultas, los ovocitos se encuentran en lóbulos ováricos distribuidos en toda la cavidad abdominal. Para poder obtener ovocitos, es necesario operar a la rana y extraerle algunos de estos lóbulos. Se detalla a continuación el protocolo para operar a las ranas y extraerles los lóbulos con ovocitos.

Se prepara primero una solución con anestesia en la cual se sumerge a la rana y se espera unos minutos a que la anestesia pase por la piel del animal y haga efecto. Se traslada a la rana al recipiente donde se realiza la operación y se la coloca con el vientre hacia arriba. Las incisiones se realizan en las líneas marcadas en la fotografía de la Fig.A.1 en donde se puede ver una rana durante una operación. Una vez realizada una incisión en la piel, se puede ver la pared abdominal. Para acceder a los lóbulos ováricos, es necesario realizar un corte en la pared abdominal. Se extraen varios lóbulos que se

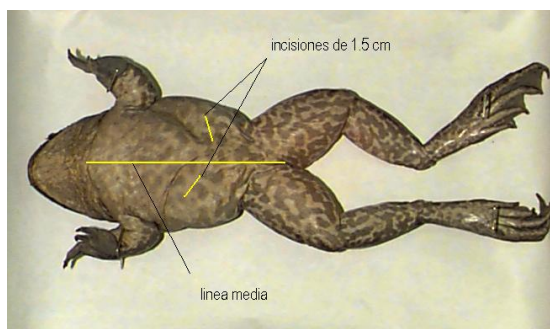


Figura A.1: Fotografía tomada durante una operación de rana *Xenopus* en el ranario del INGBI. Se muestran las incisiones que se realizan para extraer los ovocitos de la rana.

colocan inmediatamente en solución Barth. Se sutura la pared abdominal y luego la piel de la rana. La rana operada debe quedar en cuarentena por dos semanas.

Una vez que se obtienen los lóbulos llenos de ovocitos, es necesario separarlos sin dañarlos. Dentro de los lóbulos, los ovocitos están irrigados y conectados. Se somete a estos lóbulos a un proceso de colagenización que aísla a los ovocitos. La colagenización también remueve la capa folicular que recubre a cada célula. Luego de este proceso, se obtienen ovocitos separados y sin tejido conectivo como se puede ver en la Fig. A.2.



Figura A.2: Ovocitos de *Xenopus laevis* luego de haber sido colagenizados y listos para la micro-inyección.

Los procedimientos detallados anteriormente para operar a las ranas y obtener los ovocitos se realizaron por distintos grupos experimentales (grupo de Daniel Calvo en INGBI y grupo de Gabriela Amodeo en Química Biológica).

A.1.2. Mantenimiento y selección de las células

Como la rana es un anfibio, su temperatura corporal está alrededor de los 18°C por lo que los ovocitos deben estar siempre a temperaturas similares a ésta para conservarse frescos. Además, se los debe mantener en soluciones adecuadas. Estas condiciones imponen restricciones a la hora de hacer experimentos con estas células, sobretodo porque

no se puede usar una misma célula durante un tiempo prolongado ya que se la expone a un importante deterioro a temperatura ambiente.

Se utilizan dos soluciones denominadas Ringer y Barth para manipular y conservar a los ovocitos respectivamente. La preparación de ambas se realiza en el cuarto de muestras del DF en donde se pesan las cantidades necesarias de drogas en una balanza calibrada para luego ser disueltas en agua y obtener soluciones finales de 1 L con las concentraciones deseadas. Para homogeneizar, se utiliza un agitador magnético y para terminar se mide el pH de cada solución utilizando un pH-metro digital previamente calibrado con soluciones de pH conocido. En la Tabla A.1 se detallan las drogas utilizadas, las masas que se necesitan, la concentración y el pH en la solución final para cada solución. Una diferencia importante entre las dos soluciones es que la solución Barth contiene gentamicina, un antibiótico. Por este motivo, se guarda a los ovocitos en esta solución mientras que se los manipula en solución Ringer.

Solución Ringer pH 7.1-7.3		
Droga	Concentración en la solución	Masa utilizada
NaCl	120 mM	7013 mg
KCl	2 mM	149 mg
CaCl ₂ + 2H ₂ O	1.8 mM	265 mg
HEPES	5 mM	1192 mg
Solución Barth pH 7.3-7.5		
Droga	Concentración en la solución	Masa utilizada
NaCl	88 mM	5142.7 mg
KCl	1 mM	74.6 mg
NaHCO ₃	2.4 mM	201.6 mg
CaCl ₂ + 2H ₂ O	0.41 mM	60.3 mg
MgSO ₄ + 7H ₂ O	0.82 mM	202.1 mg
Ca(NO ₃) ₂ + 4H ₂ O	0.33 mM	77.9 mg
HEPES	5 mM	1192 mg
gentamicina	0.5 mg/mL	

Tabla A.1: Preparación soluciones Ringer y Barth.

Luego de ser colagenizados, los ovocitos pueden durar hasta una semana en la heladera (sumergidos en abundante solución Barth). Si pasa más de una semana, muchos mueren y hay que descartarlos tomando las precauciones necesarias. Se seleccionan para los experimentos los ovocitos en mejor estado. Estos son los que presentan dos hemisferios de igual tamaño bien diferenciados con respecto a la pigmentación. Si el hemisferio vegetal comienza a adquirir un color más oscuro, el ovocito está empezando a degradarse. Se seleccionan para las mediciones los ovocitos más grandes y esféricos, con pigmentación

más definida. Es importante también prestar atención a la forma del ovocito, si está abollado y perdió su forma esférica esto indica que se empezó a degradar.

A.1.3. Micro-inyección de los compuestos en las células

Para poder estudiar señales de Ca^{2+} en ovocitos, es necesario introducir distintos compuestos en estas células. Para tal fin, se utiliza el protocolo de micro-inyección descrito en [38]. Se utiliza un micro-inyector Drummond Nanoject II y se preparan micropipetas de vidrio con un puller. La punta de las micropipetas debe ser muy fina ($\sim 20 \mu\text{m}$) de forma de poder inyectar al ovocito generándole el menor daño posible. Para poder utilizar el micro-inyector, se debe llenar primero a la micropipeta con aceite mineral (fluido incompresible) evitando la formación de burbujas de aire. Luego de colocar la micropipeta con el aceite en el micro-inyector, se vacían aproximadamente $1 \mu\text{L}$ o $2 \mu\text{L}$ de aceite. Para cargar el micro-inyector, se preparan gotas de aproximadamente $1 \mu\text{L}$ de cada sustancia a micro-inyectar. El micro-inyector automático utilizado varía el volumen de micro-inyección desde 2.3 nl hasta de 69.0 nl , aumentando de a pasos discretos de acuerdo a una configuración de llaves variable. Dispone de dos velocidades de inyección, lenta y rápida.

El volumen de micro-inyección está previamente fijado para obtener las concentraciones deseadas dentro del ovocito. Para calcular las concentraciones intracelulares se supone que el volumen del ovocito es de $\sim 1 \mu\text{L}$ [108]. La micro-inyección se realiza bajo una lupa y se busca inyectar a los ovocitos en la línea que separa el lado animal del vegetal (ecuador de la célula) para no perforar al núcleo.

A.1.4. Uso de las células

En todos los experimentos realizados los ovocitos se colocaron en el microscopio teniendo cuidado de hacer foco en el hemisferio animal. Como se sabe que en este hemisferio es donde hay más densidad de $\text{RIP}_{3\text{s}}$, hay más probabilidad de evocar y de detectar eventos de Ca^{2+} mediados por $\text{RIP}_{3\text{s}}$. En particular, se ajustó el foco para escanear regiones a una profundidad de entre 5 y $10 \mu\text{m}$ dentro de la MP que es donde se estima que están localizados la mayoría de los $\text{RIP}_{3\text{s}}$ en los ovocitos.

A.2. Compuestos utilizados

Se describen a continuación los distintos compuestos utilizados para realizar los experimentos. Se utilizaron cuatro indicadores fluorescentes, un compuesto enjaulado y

dos buffers de Ca^{2+} exógenos. Los indicadores fluorescentes utilizados en este trabajo son todos indicadores de emisión única, exhiben un cambio en la intensidad de la emisión al ligarse sin presentar corrimiento del espectro de absorción/emisión a diferencia de los indicadores de tipo ratiométrico.

Los indicadores utilizados y el IP_3 enjaulado son de Molecular Probes y el EGTA y el BAPTA de Sigma Aldrich.

A.2.1. Indicadores de Ca^{2+} citosólico

Se utilizaron dos indicadores fluorescentes de Ca^{2+} citosólico en los diferentes experimentos presentados, Fluo-4 y Rhod-2. Ambos indicadores se usan en su forma dextrano, es decir que se agrega un dextrano a las moléculas. Esto resulta en indicadores que no son permeables a membranas y que por lo tanto exhiben poca compartimentalización dentro de las células [40]. Para poder micro-inyectarlos en los ovocitos, es necesario disolverlos en agua bidestilada.

El Fluo-4 dextrano es un indicador de Ca^{2+} derivado del Fluo-3. Es más fotoestable y tiene mayor intensidad de fluorescencia que el Fluo-3. La K_d de este indicador es de 770 nM. Sus espectros de emisión y excitación pueden verse en la Fig. A.3 A. El pico de absorción (o excitación) está cerca de los 490 nm y la máxima emisión está alrededor de los 520 nm.

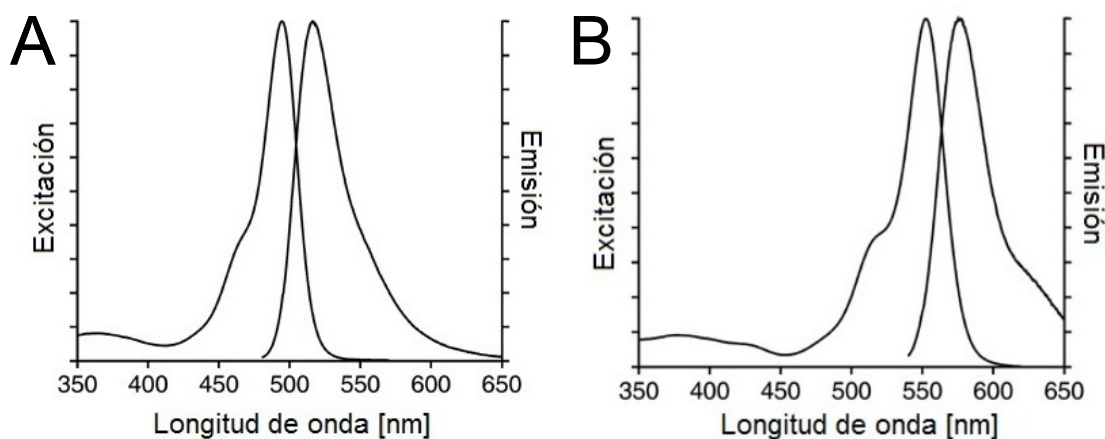


Figura A.3: **A** Espectros de excitación y emisión de los indicadores Fluo-4 y Fluo-5N AM. **B** Espectros de excitación y emisión del indicador Rhod-2.

El Rhod-2 dextrano es un indicador de Ca^{2+} de la familia de las rodaminas. En la Fig. A.3 B se pueden ver el espectro de excitación y emisión de este indicador. El pico de absorción (o excitación) está cerca de los 550 nm y la máxima emisión está alrededor de los 600 nm. La K_d de este indicador es de 2000 nM.

A.2.2. Indicador de Ca^{2+} luminal

El indicador Fluo-5N AM es la versión AM ester del Fluo-5N, un análogo de baja afinidad del Fluo-4. Esta clase de indicadores se usa para medir Ca^{2+} dentro de compartimentos subcelulares donde las concentraciones son relativamente altas. La K_d óptima para medir Ca^{2+} en el RE es entre 22 μM y 250 μM dado que la concentración de Ca^{2+} en esta organela está entre 100 μM y 1000 μM [109]. La K_d del Fluo5N-AM es de 90 μM . Los espectros de excitación y emisión de este indicador son como los del Fluo-4 y por lo tanto se muestran también en la en la Fig. A.3 A.

Como este indicador no se utilizó nunca en ovocitos, no se halló un protocolo para su preparación. En trabajos previos [87, 74], se diluye el indicador en un medio extracelular en donde se baña a la célula y se espera que el indicador permee la membrana. Como se quiere micro-inyectar el indicador, se debe preparar una solución mucho más concentrada que la que se prepara al incubar células.

El Fluo-5N AM viene en viales de 50 μg cada uno. Se prepara una solución de Fluo-5N AM lo más concentrada posible. Se usa dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver inicialmente los indicadores AM. Una ventaja del DMSO es que inhibe o frena la hidrólisis de los ésteres en ambientes húmedos y esto ayuda a preservar la actividad del indicador. También se usa Pluronic-F127 para ayudar a dispersar los indicadores AM puesto que estos tienen baja solubilidad en soluciones acuosas. La solución preparada con DMSO y Pluronic es de color amarillo y su estado es viscoso. Al no ser líquida a temperatura ambiente, la solución de Fluo-5N AM preparada debió ser calentada antes de cada micro-inyección.

A.2.3. Marcador de membrana del RE

Para poder estudiar la morfología interna del ovocito y localizar el origen de las señales intracelulares de Ca^{2+} , es útil marcar el retículo endoplasmático ya que es el principal reservorio interno de Ca^{2+} . Para este fin, se utiliza un marcador fluorescente, el Dil 3886. El Dil es un marcador lipofílico que difunde rápido en membranas sin afectar la viabilidad celular ni las propiedades fisiológicas de la célula. Debido a su naturaleza hidrofóbica, el Dil sólo difunde en membranas lipídicas continuas. Este marcador se utilizó para localizar el retículo en ovocitos de *Xenopus* en trabajos anteriores mostrando ser efectivo [39, 80]. Las propiedades espectrales de este marcador fluorescente son parecidas a las de una rodamina. La excitación se produce alrededor de los 540 nm y el pico de emisión es en 610 nm. Los espectros de absorción y emisión del Dil pueden verse en la Figura A.4.

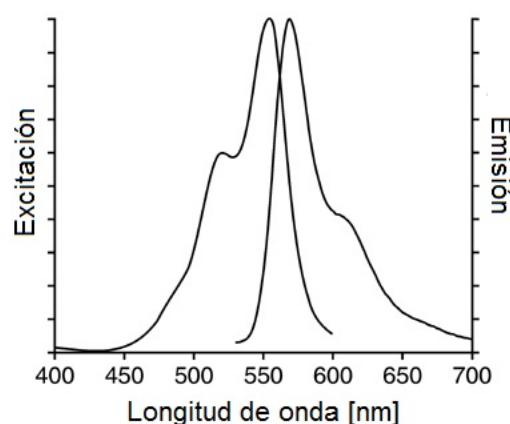


Figura A.4: Espectros de excitación y emisión del Dil.

Para poder micro-inyectar este marcador es necesario disolverlo ya que en su forma original es un sólido. Por ser altamente hidrofóbico, no se puede disolver al Dil en agua. En trabajos anteriores [39], se disuelve al Dil en alcohol etílico pero no se especifica a qué concentración. Como el Dil es muy pegajoso y ,por lo tanto, muy difícil de manipular resulta imposible pesar una cierta cantidad para disolver. Es por esto que se toma una cantidad no medida de este sólido y se lo diluye en algunos μL de alcohol etílico hasta obtener una solución para micro-inyectar.

A.2.4. IP_3 enjaulado

Para controlar la apertura de los receptores de IP_3 es necesario introducir IP_3 en los ovocitos. La forma de hacer esto y poder elegir el momento de activación de los receptores, es trabajar con IP_3 enjaulado. Las sustancias enjauladas poseen un grupo foto-escindible que enmascara su actividad biológica. La foto-activación de estos grupos con luz UV lleva a la rápida foto-degradación de estas sustancias que liberan finalmente sus compuestos biológicos activos. El proceso de fotoliberación dura algunos ms. El IP_3 enjaulado se introduce junto con el indicador de Ca^{2+} pero recién se activa al fotolizar el ovocito con un flash de luz UV. La duración y la intensidad de este flash determinan cuanto IP_3 se libera.

A.2.5. *Buffers* de Ca^{2+} exógenos

Se utilizaron dos *buffers* exógenos de Ca^{2+} , EGTA (las siglas en inglés de *ethylene glycol tetraacetic acid*) y BAPTA (de *1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid*). Ambos buffers tienen afinidades similares y, sin embargo, las cinéticas

de ligado de Ca^{2+} son muy distintas. El buffer EGTA tiene una velocidad de unión ($k_{on} \sim (3 - 10)\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) lo suficientemente rápida como para unirse a los iones de Ca^{2+} que difunden a distancias micrométricas entre los sitios de liberación, pero demasiado lenta como para afectar la difusión entre RIP_3 s de un mismo cúmulo. Típicamente se agrega este buffer en muchos experimentos para favorecer la aparición de puffs [94]. Por otro lado, BAPTA tiene una velocidad de unión mucho más rápida ($k_{on} \sim (100 - 1000)\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), interrumpiendo la difusión dentro de los cúmulos de RIP_3 .

A.3. Microscopía confocal

Para medir la fluorescencia de los distintos indicadores se utilizó un microscopio confocal multiespectral. Como en algunos experimentos se debió fotolizar el compuesto enjaulado mientras se medía la fluorescencia, fue necesario enviar pulsos de luz UV mientras se escaneaba con el láser. Esto fue posible gracias a una modificación previamente realizada al microscopio [110].

A.3.1. El microscopio

Se trabajó con un microscopio invertido Olympus IX81 como el que muestra la imagen de la Fig. A.5 y con la unidad confocal FluoView FV1000. El equipo cuenta con un módulo combinador de láseres que permite enviar luz desde distintos láseres para tener iluminación confocal. Se pueden utilizar distintos objetivos pero a lo largo de este trabajo se utilizaron dos objetivos, un objetivo $60\times$ de inmersión (en aceite) cuya apertura numérica es de 1.42 y un objetivo $10\times$ de aire cuya apertura numérica es de 0.4. El microscopio se controla con un software de Olympus desde el cual se controlan los distintos parámetros de la iluminación y la adquisición.

Para poder fotolizar el IP_3 enjaulado, es necesario contar con una entrada para UV en el microscopio que permita en simultáneo barrer la muestra con los láseres y enviar pulsos de luz UV. Se realizó una modificación al camino óptico que permite acceder a la muestra con la iluminación láser y con la luz UV necesaria para la fotólisis. Esta modificación fue realizada por la Dra. Lorena Sigaut permitiendo así su utilización para generar y medir señales de Ca^{2+} .

Desde el software de Olympus del microscopio se diagraman los experimentos y se sincronizan los tiempos de fotólisis, la intensidad de los láseres, la región que se va a escanear, la duración del experimento y la intensidad de la lámpara de mercurio a través



Figura A.5: Microscopio confocal Olympus similar al del LMM.
Imagen tomada de <http://olympus-global.com>.

de la elección de un filtro neutro que va delante de la lámpara. El tiempo de fotólisis se comanda manualmente desde el controlador del obturador.

Al preparar la medición, se elige de una lista de indicadores que tiene cargado el software el o los indicadores con los que se trabaja. Esto determina qué espejos y filtros utilizará el microscopio para detectar la señal. Otro parámetro que es muy importante fijar es el tamaño del pinhole. Mientras más confocalidad se quiera (secciones más finas), más se debe achicar su ancho mientras que si se quiere aumentar la cantidad de luz que llega al detector, se lo debe agrandar. Para todas las mediciones se fijó el tamaño del pinhole en $115\ \mu\text{m}$. Se dispone además de un zoom digital entre $1\times$ y $10\times$ que se controla también desde el software.

A.3.2. Iluminación y detección

Los láseres disponibles para iluminar la muestra son un láser de argón multilínea y un láser de helio-neón ($543\ \text{nm}$). A lo largo de los distintos experimentos se usaron ambos láseres, juntos y por separado. La potencia de los láseres puede variarse en un amplio rango. Suele trabajarse con potencias bajas (algunos μW) para no dañar el ovocito.

El equipo cuenta con tres detectores de tipo PMT (siglas del inglés *Photomultiplier tubes*) que pueden contar fotones, por lo que se pueden realizar mediciones con varios indicadores a la vez. Los detectores no discriminan la longitud de onda de los fotones que llegan es por eso que es muy importante trabajar con los elementos ópticos (filtros,

redes, espejos) adecuados para cada medición. En los experimentos realizados en este trabajo se utilizaron hasta dos canales de detección distintos en simultáneo.

Los indicadores Fluo-4 y Fluo-5N AM se excitaron con la línea 488 nm del láser de Argón y los indicadores Rhod-2 y Dil con el láser de He-Ne, respectivamente. La fluorescencia emitida fue detectada entre (500 – 600) nm para Fluo-4 y Fluo-5N AM y entre (555 – 655) nm para Dil y Rhod-2. Para la adquisición simultánea la emisión de los indicadores fue detectada en el rango de (500 – 600) nm para Fluo-4 y Fluo-5N AM y en el rango de (600 – 630) nm para Dil y Rhod-2.

Para la fotoliberación con luz UV se utilizaron dos tipos de iluminación: una lámpara de Mercurio (Hg) junto con un filtro o un LED UV. Inmediatamente después de la lámpara se encuentran un obturador mecánico (Uniblitz) y una rueda motorizada con 6 filtros neutros que pueden ser comandados desde el software de Olympus. El obturador se puede controlar también desde el software pero la duración de los pulsos se elige desde un controlador independiente. El LED tiene un controlador que permite variar su intensidad de forma continua con una perilla y también su prendido y apagado.

A.3.3. Modos de adquisición

El microscopio ofrece distintos modos de adquisición entre los cuales se encuentra el modo line-scan que permite barrer una cantidad de veces definida una misma línea. Puesto que adquirir cuadros (o frames) es un proceso lento comparado con las dinámicas del Ca^{2+} intracelular, conviene resignar una dimensión espacial y medir en modo line-scan para ganar resolución temporal. Esto permite seguir de forma rápida los cambios en la fluorescencia de una línea dentro de la muestra.

Las imágenes en el modo line-scan fueron obtenidas escaneando con el zoom digital 10× una línea fija de 250 píxeles. La velocidad de escaneo por píxel se fijó en 10 μs . El tiempo de adquisición por línea fue de 3.62 ms. Este modo de adquisición se utilizó para los experimentos de adquisición de *puffs* de la Sección 2.3 del Capítulo 2 y el experimento control presentado en la Sección 3.3.3 del Capítulo 3.

Las imágenes en modo frame, en las que se escanea una región, se realizaron con y sin zoom digital sobre regiones de tamaño variable que se detallan en los experimentos descritos en los distintos capítulos. El tiempo por frame o tiempo por cuadro fue variable.

Apéndice B

Análisis de las imágenes

En este apéndice se describen los distintos pre-procesamientos realizados a las imágenes. Todos estos análisis se realizaron con rutinas escritas en MATLAB [104].

B.1. Fluorescencia media, fluorescencia basal y normalización

Se describe en esta sección la forma en que se computa la fluorescencia media sobre las imágenes 2D (cuadros) y las imágenes de tipo line-scan. En ambos casos se normalizó a la fluorescencia en relación a la fluorescencia basal. Se denomina fluorescencia basal a la señal fluorescente del indicador en situación basal o de reposo, es decir antes de evocar cualquier tipo de evento de liberación de Ca^{2+} . Se detalla cómo se calculó la fluorescencia basal en cada caso y cómo se la usó luego para normalizar la fluorescencia.

B.1.1. Imágenes 2D

En los experimentos de los Capítulos 3, 4 y 5 se adquirieron series de imágenes 2D con el microscopio confocal y se analizó en algunos casos el comportamiento de la fluorescencia media sobre todo el cuadro adquirido para cada tiempo. Se explica a continuación cómo se computó esta fluorescencia media. Si se denomina $F(i, j, t)$ a la intensidad de la fluorescencia colectada en el píxel (i, j) para el tiempo t , se puede calcular la fluorescencia media sobre todo el cuadro (o imagen) $\langle F \rangle$ como el promedio de la fluorescencia sobre todos los píxeles de la imagen:

$$\langle F \rangle = \sum_{(i,j) \in \text{imagen}} \frac{F(i, j, t)}{\#(i, j)}. \quad (\text{B.1})$$

Se obtiene de esta forma un valor $\langle F \rangle$ para cada tiempo t . Se pueden seguir así las variaciones temporales de toda una región.

Los valores basales medios para este tipo de imágenes se calcularon de forma análoga pero promediando además sobre todos los tiempos previos al tiempo en el que se presentó el estímulo UV, t_{UV} :

$$\langle F_b \rangle = \sum_{\substack{(i,j) \in \text{imagen} \\ t < t_{UV}}} \frac{F(i,j,t)}{\#(i,j)\#t}. \quad (\text{B.2})$$

En varios experimentos de se presentan los datos de fluorescencia media normalizada respecto de la fluorescencia basal. Se define la fluorescencia media normalizada $\langle F_N \rangle$ como en cociente entre la fluorescencia media en cada tiempo y la fluorescencia media basal:

$$\langle F_N \rangle = \frac{\langle F \rangle}{\langle F_b \rangle}. \quad (\text{B.3})$$

B.1.2. Imágenes 2D wide-field

En el caso de las imágenes wide-field analizadas en el Capítulo 6 se normalizó a la fluorescencia en cada píxel. Para ello se calculó primero la fluorescencia basal en cada píxel que se denomina $F_0(i,j)$ como:

$$F_0(i,j) = \sum_{t < t_{UV}} \frac{F(i,j,t)}{\#t}. \quad (\text{B.4})$$

B.1.3. Line-scans

En el caso de las imágenes adquiridas en modo line-scan, se obtienen imágenes en donde el eje vertical es la línea escaneada y el eje horizontal es el tiempo. En estos casos se denomina $F(i,t)$ a la fluorescencia en el sitio i de la línea escaneada para el tiempo t . Se define por lo tanto la fluorescencia promediada sobre la línea $\overline{F}$ como:

$$\overline{F} = \sum_{i \in \text{linea}} \frac{F(i,t)}{\#i}, \quad (\text{B.5})$$

Análogamente, se puede computar la fluorescencia basal de una medición line-scan como:

$$\overline{F}_b = \sum_{\substack{i \in \text{linea} \\ t < t_{UV}}} \frac{F(i,t)}{\#i\#t}, \quad (\text{B.6})$$

Y finalmente para obtener la fluorescencia normalizada promedio en el caso de una imagen linescan se computó:

$$\overline{F_N} = \frac{\overline{F}}{\overline{F_b}}, \quad (\text{B.7})$$

En el caso del análisis de los puffs de los experimentos de la Sección 2.3 del Capítulo 2, se trabajó con la fluorescencia normalizada de la siguiente forma:

$$F_R(i, t) = \frac{F(i, t) - \overline{F_b}}{\overline{F_b}}, \quad (\text{B.8})$$

B.2. Separación de los canales de fluorescencia

La multiespectralidad del microscopio confocal permite excitar varios indicadores a la vez pero hay que tener cuidado con la fluorescencia que llega a cada detector. Como se puede ver al observar simultáneamente los espectros de emisión de los indicadores Fluo-5N AM (o Fluo-4) y Rhod-2 (ver Figs. A.3 en el Apéndice A), la cola de la emisión del Fluo-5N AM está en el rango $600 - 630nm$. Este rango se superpone con las longitudes de onda de emisión del Rhod-2. Para la adquisición simultánea de la fluorescencia de ambos indicadores hay que poder separar la contribución de cada uno. En algunos de los experimentos realizados en este trabajo, se sabe que la fluorescencia del canal 1 (Ch_1) entra al canal 2 (Ch_2) pero la del canal 2 no se mezcla con la del 1. Una técnica utilizada para evitar el sangrado de un canal sobre el otro es lo que se conoce como "linear unmixing-[111] y consiste en ir limpiando cada canal. En estos casos, el proceso de unmixing es particularmente sencillo pues consiste en evaluar que cantidad del canal 1 se filtra al canal 2. Para limpiar luego el canal 2 de esta contribución parásita, alcanza con realizar una sencilla sustracción píxel a píxel. Para aplicar esta técnica fue necesario realizar primero una medición control adquiriendo imágenes con los dos canales (Ch_1 y Ch_2) pero sólo excitando al indicador Fluo-4 (o Fluo-5N AM). A partir del valor medio de la fluorescencia en cada canal, se calculó el coeficiente $R = \langle Ch_2 \rangle / \langle Ch_1 \rangle$ que representa la proporción de la fluorescencia de Fluo-4 que entra en el canal de Rhod-2. Luego, cuando se adquirieron imágenes excitando ambos indicadores, se restó en el canal de Rhod-2 la emisión del Fluo-4, esto es, $Ch_2_{\text{limpio}} = Ch_2 - R \cdot Ch_1$ y con esto se determinó la fluorescencia asociada a la emisión del Rhod-2. Se obtuvo el valor $R = 0,16$ para el coeficiente de unmixing.

Apéndice C

Abreviaturas utilizadas

Ca^{2+}	Calcio
$[\text{Ca}^{2+}]$	Concentración de Ca^{2+}
$[\text{Ca}^{2+}]_b$	Concentración de Ca^{2+} basal
RE	Retículo Endoplasmático
IP_3	Inositol (1,4,5)-trifosfato
RIP_3	Receptor de IP_3
RIP_{3s}	Receptores de IP_3
CICR	Liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}
RRi	Receptor de Rianodina
MP	Membrana Plasmática

Bibliográfia

- [1] M. Berridge, M. Bootman, and P. Lipp, “Calcium - a life and death signal,” *Nature* **395**, 645–648 (1998).
- [2] A. G. Szent-Györgyi, “Calcium regulation of muscle contraction,” *Biophysical Journal* **15**, 707–723 (1975).
- [3] B. L. Sabatini and W. G. Regehr, “Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain,” *Nature* **384** (1996).
- [4] B. Draznin, “Intracellular calcium, insulin secretion, and action,” *The American Journal of Medicine* **85**, 44–58, 2018/01/29.
- [5] M. D. Bootman and M. J. Berridge, “The elemental principles of calcium signaling,” *Cell* **83**(5), 675–678 (1995).
- [6] D. E. Clapham, “Calcium signaling,” *Cell* **131**(6), 1047 – 1058 (2007).
- [7] H. Cheng, W. Lederer, and M. Cannell, “Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle,” *Science* **262**(5134), 740–744 (1993).
- [8] M. Whitaker, “Calcium at fertilization and in early development,” *Physiological reviews* **86**, 25–88 (2006).
- [9] M. P. Mattson and S. L. Chan, “Calcium orchestrates apoptosis,” *Nature Cell Biology* **5**, 1041 EP – (2003).
- [10] C. W. Taylor and a. J. Laude, “IP 3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca 2+,” *Cell Calcium* **32**, 321–334 (2002).
- [11] J. Meldolesi and T. Pozzan, “The Heterogeneity of ER Ca 2+,” *J. Cell Biol.* **142**(6), 1395–1398 (1998).
- [12] C.-u. Choe and B. E. Ehrlich, “The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (ip3r) and its regulators: Sometimes good and sometimes bad teamwork,” *Science Signaling* **2006**(363) (2006).

- [13] J.-W. Shuai and P. Jung, “Stochastic Properties of Ca^{2+} Release of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Clusters,” *Biophys. J.* **83**(1), 87–97 (2002).
- [14] I. Moraru, E. Kaftan, B. Ehrlich, and J. Watras, “Regulation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate-gated calcium channels by insp3 and calcium,” *The Journal of General Physiology* **113**(6), 837–849 (1999).
- [15] Ilya Bezprozvanny, W. James, and E. B. E., “Bell-shaped calcium-response curves of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum,” *Nature* **351**, 751–754 (1991).
- [16] D.-O. D. Mak, S. McBride, and J. K. Foskett, “Inositol 1,4,5-tris-phosphate activation of inositol tris-phosphate receptor Ca^{2+} channel by ligand tuning of Ca^{2+} inhibition,” *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 15821–15825 (1998).
- [17] D.-O. D. Mak and J. K. Foskett, “Single-Channel Kinetics, Inactivation, and Spatial Distribution of Inositol Trisphosphate (IP_3) Receptors in *Xenopus* Oocyte Nucleus,” *J. Gen. Physiol.* **109**(5), 571–587 (1997).
- [18] N. Callamaras, J. S. Marchant, X. P. Sun, and I. Parker, “Activation and coordination of InsP_3 -mediated elementary Ca^{2+} events during global Ca^{2+} signals in *Xenopus* oocytes,” *J. Physiol.* **509**(1), 81–91 (1998).
- [19] I. F. Smith, S. M. Wiltgen, J. Shuai, and I. Parker, “ $\text{Ca}(2+)$ puffs originate from preestablished stable clusters of inositol trisphosphate receptors,” *Science signaling* **2** (2009).
- [20] I. C. Marshall and C. W. Taylor, “Two calcium-binding sites mediate the interconversion of liver inositol 1,4,5-trisphosphate receptors between three conformational states,” *Biochemical Journal* **301**(2), 591–598 (1994).
- [21] Y. Yao, J. Choi, and I. Parker, “Quantal puffs of intracellular Ca^{2+} evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes,” *J. Physiol.* **482**, 533–553 (1995).
- [22] B. Schwaller, “Cytosolic $\text{ca}(2+)$ buffers,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a004051 (2010).
- [23] D. Fraiman, B. Pando, S. Dargan, I. Parker, and S. P. Dawson, “Analysis of puff dynamics in oocytes: interdependence of puff amplitude and interpuff interval,” *Biophysical journal* **90**(11), 3897–907 (2006).
- [24] M. a. Huertas and G. D. Smith, “The dynamics of luminal depletion and the stochastic gating of Ca^{2+} -activated Ca^{2+} channels and release sites,” *J. Theor. Biol.* **246**(2), 332–354 (2007).

- [25] E. C. Thrower, H. Mobasheri, S. Dargan, P. Marius, E. J. a. Lea, and a. P. Dawson, "Interaction of luminal calcium and cytosolic ATP in the control of type 1 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor channels," *J. Biol. Chem.* **275**(46), 36049–36055 (2000).
- [26] X.-P. Sun, N. Callamaras, J. S. Marchant, and I. Parker, "A continuum of InsP3-mediated elementary Ca^{2+} signalling events in *Xenopus* oocytes," *J Physiol (Lond)* **509**(1), 67–80 (1998).
- [27] J. D. Lechleiter and D. E. Clapham, "Molecular mechanisms of intracellular calcium excitability in *X. laevis* oocytes.," *Cell* **69**(2), 283–294 (1992).
- [28] J. S. Marchant, N. Callamaras, and I. Parker, "Initiation of IP3-mediated Ca^{2+} waves in *Xenopus* oocytes," *The EMBO Journal* **18**(19), 5285–5299 (1999).
- [29] 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**, 105–121 (1996).
- [30] M. J. Boulware and J. S. Marchant, "Timing in cellular Ca^{2+} signaling," *Current biology : CB* **18**, R769–R776 (2008).
- [31] E. Smedler and P. Uhlén, "Frequency decoding of calcium oscillations," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1840**(3), 964 – 969 (2014).
- [32] P. De Koninck and H. Schulman, "Sensitivity of cam kinase ii to the frequency of Ca^{2+} oscillations," *Science* **279**(5348), 227–230 (1998).
- [33] A. Skupin, H. Kettenmann, U. Winkler, M. Wartenberg, H. Sauer, S. C. Tovey, C. Taylor, and M. Falcke, "How Does Intracellular Ca^{2+} Oscillate: By Chance or by the Clock?," *Biophys. J.* **94**(6), 2404 – 2411 (2008).
- [34] A. Skupin and M. Falcke, "Statistical properties and information content of calcium oscillations," *Genome Informatics* **18**, 44–53 (2007).
- [35] K. Thurley and M. Falcke, "Derivation of Ca^{2+} signals from puff properties reveals that pathway function is robust against cell variability but sensitive for control.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**(1), 427–432 (2011).
- [36] D. Terentyev, S. Viatchenko-Karpinski, H. H. Valdivia, A. L. Escobar, and S. Györke, "Luminal Ca^{2+} controls termination and refractory behavior of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in cardiac myocytes," *Circ. Res.* **91**(5), 414–420 (2002).
- [37] M. Bootman and M. J. Berridge, "Subcellular Ca^{2+} signals underlying waves and graded responses in HeLa cells," *Curr Biol* **6**(2), 855–865 (1996).

- [38] S. L. Dargan, A. Demuro, and I. Parker, *Imaging Ca²⁺ Signals in Xenopus Oocytes*, 103–119. Humana Press, Totowa, NJ (2006).
- [39] N. Callamaras and I. Parker, “Radial localization of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive ca²⁺ release sites in xenopus oocytes resolved by axial confocal linescan imaging,” *The Journal of General Physiology* **113**(2), 199–213 (1999).
- [40] R. M. Paredes, J. C. Etzler, L. T. Watts, W. Zheng, and J. D. Lechleiter, “Chemical calcium indicators,” *Methods (San Diego, Calif.)* **46**, 143–51 (2008).
- [41] S. R. Adams, , and R. Y. Tsien, “Controlling cell chemistry with caged compounds,” *Annual Review of Physiology* **55**(1), 755–784 (1993).
- [42] J. Kaplan and A. Somlyo, “Flash photolysis of caged compounds: New tools for cellular physiology,” *Trends in Neurosciences* **12**(2), 54 – 59 (1989).
- [43] Taufiq-Ur-Rahman, A. Skupin, M. Falcke, and C. W. Taylor, “Clustering of InsP3 receptors by InsP3 retunes their regulation by InsP3 and Ca²⁺,” *Nature* **458**, 655–9 (2009).
- [44] J. Keizer, G. D. Smith, S. Ponce-Dawson, and J. E. Pearson, “Saltatory Propagation of Ca²⁺ Waves by Ca²⁺ Sparks,” *Biophysical journal* **75**, 595–600 (1998).
- [45] J. E. Pearson and S. Ponce-Dawson, “Crisis on skid row,” *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **257**(14), 141 – 148 (1998).
- [46] S. Ponce Dawson, J. Keizer, and J. E. Pearson, “Fire-diffuse-fire model of dynamics of intracellular calcium waves,” *PNAS* **96**, 6060–6063 (1999).
- [47] S. Coombes and Y. Timofeeva, “Sparks and waves in a stochastic fire-diffuse-fire model of ca²⁺ release,” *Phys. Rev. E* **68**, 021915 (2003).
- [48] A. Calabrese, D. Fraiman, D. Zysman, and S. Ponce Dawson, “Stochastic fire-diffuse-fire model with realistic cluster dynamics,” *Physical Review E* **82**, 1–12 (2010).
- [49] A. Skupin, H. Kettenmann, and M. Falcke, “Calcium Signals Driven by Single Channel Noise,” *PLoS Computational Biology* **6**, e1000870 (2010).
- [50] K. Thurley, I. F. Smith, S. C. Tovey, C. W. Taylor, I. Parker, and M. Falcke, “Timescales of IP3-Evoked Ca²⁺ Spikes Emerge from Ca²⁺ Puffs Only at the Cellular Level,” *Biophys. J.* **101**(11), 2638–2644 (2011).
- [51] J. S. Marchant and I. Parker, “Role of elementary ca²⁺ puffs in generating repetitive ca²⁺ oscillations,” *The EMBO Journal* **20**(1-2), 65–76 (2001).

- [52] L. Diambra and J. S. Marchant, “Inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor micro-architecture shapes Ca^{2+} puff kinetics,” *Biophysical Journal* **100**(4), 822–831 (2011).
- [53] G. Solovey and S. Ponce Dawson, “Intra-Cluster Percolation of Calcium Signals,” *PLoS ONE* **5**(2), e8997 (2010).
- [54] I. F. Smith and I. Parker, “Imaging the quantal substructure of single IP3R channel activity during Ca^{2+} puffs in intact mammalian cells,” *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(15), 6404–6409 (2009).
- [55] N. Allbritton, T. Meyer, and L. Stryer, “Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate,” *Science* **258**, 1812–1815 (1992).
- [56] A. Clauset, C. R. Shalizi, and M. Newman, “Power-law distributions in empirical data,” *SIAM Review* **51**, 661–703 (2009).
- [57] L. Lopez, E. Piegari, L. Sigaut, and S. Ponce Dawson, “Using two dyes to observe the competition of Ca^{2+} trapping mechanisms and their effect on intracellular Ca^{2+} signals.” (unpublished).
- [58] M. Nivala, C. Y. Ko, M. Nivala, and Z. Weiss, James N.; Qu, “Criticality in intracellular calcium signaling in cardiac myocytes,” *Biophys J* **102**, 2433–2442 (2012).
- [59] K. Machaca, “Increased sensitivity and clustering of elementary Ca^{2+} release events during oocyte maturation,” *Devel Biol* **275**, 170–182 (2004).
- [60] K. Machaca, “ Ca^{2+} signaling differentiation during oocyte maturation,” *J. Cell. Physiol.* **213**, 331–340 (2007).
- [61] G. Ullah, P. Jung, and K. Machaca, “Modeling Ca^{2+} signaling differentiation during oocyte maturation,” *Cell Calcium* **42**, 556–564 (2007).
- [62] E. Piegari, *Interacción entre geometría y dinámica en la modulación de señales intracelulares de calcio*. PhD thesis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires (2016).
- [63] M. Whitaker, “Calcium at fertilization and in early development,” *Physiol Rev* **86**, 25–88 (2006).
- [64] K. Thurley, S. C. Tovey, G. Moenke, V. L. Prince, A. Meena, A. P. Thomas, A. Skupin, C. W. Taylor, and M. Falcke, “Reliable encoding of stimulus intensities within random sequences of intracellular Ca^{2+} spikes,” *Sci. Signal.* **7**(331) (2014).

- [65] S. Györke, I. Györke, V. Lukyanenko, T. F. Wiesner, and S. Viatchenko-karpinski, "Regulation of sarcoplasmic reticulum calcium release by luminal calcium in cardiac muscle," *Front. Biosci.*, 1354–1363 (2002).
- [66] W. Chen, R. Wang, B. Chen, X. Zhong, H. Kong, Y. Bai, Q. Zhou, C. Xie, J. Zhang, A. Guo, X. Tian, P. P. Jones, M. L. O'Mara, Y. Liu, T. Mi, L. Zhang, J. Bolstad, L. Semeniuk, H. Cheng, J. Zhang, J. Chen, D. P. Tieleman, A. M. Gillis, H. J. Duff, M. Fill, L.-S. Song, and S. R. W. Chen, "The ryanodine receptor store-sensing gate controls Ca^{2+} waves and Ca^{2+} -triggered arrhythmias," *Nat Med* **20**(2), 184–192 (2014).
- [67] I. Sienaert, H. De Smedt, J. B. Parys, L. Missiaen, S. Vanlingen, H. Sipma, and R. Casteels, "Characterization of a cytosolic and a luminal Ca^{2+} binding site in the type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor," *J. Biol. Chem.* **271**(43), 27005–27012 (1996).
- [68] T. Higo, M. Hattori, T. Nakamura, T. Natsume, T. Michikawa, and K. Mikoshiba, "Subtype-specific and ER lumenal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44," *Cell* **120**(1), 85–98 (2005).
- [69] B. Y. L. Missiaen, C. W. Taylort, and M. J. Berridge, "Luminal Ca^{2+} Promoting Spontaneous Ca^{2+} Release from Inositol Trisphosphate-Sensitive Stores in Rat Hepatocytes," *J. Physiol.* **455**, 623–640 (1992).
- [70] M. Yamasaki-Mann, A. Demuro, and I. Parker, "Modulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} store filling by cyclic ADP-ribose promotes inositol trisphosphate (IP3)-evoked Ca^{2+} signals," *J. Biol. Chem.* **285**(32), 25053–25061 (2010).
- [71] H. Vais, J. K. Foskett, G. Ullah, J. E. Pearson, and D.-O. Daniel Mak, "Permeant calcium ion feed-through regulation of single inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel gating," *J. Gen. Physiol.* **140**(6), 697–716 (2012).
- [72] C. W. Taylor and S. C. Tovey, "Ip3 receptors: Toward understanding their activation," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a004010 (2010).
- [73] M. Park, A. V. Tepikin, and O. H. Petersen, "What can we learn about cell signalling by combining optical imaging and patch clamp techniques?," *Pflügers Archiv* **444**(3), 305–316 (2002).
- [74] A. A. Kabbara and D. G. Allen, "The use of the indicator fluo-5N to measure sarcoplasmic reticulum calcium in single muscle fibres of the cane toad," *J. Physiol.* **534**(Pt 1), 87–97 (2001).

- [75] A. P. Ziman, C. W. Ward, G. G. Rodney, W. J. Lederer, and R. J. Bloch, “Quantitative measurement of Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum lumen of mammalian skeletal muscle,” *Biophysical Journal* **99**(8), 2705 – 2714 (2010).
- [76] T. R. Shannon, T. Guo, and D. M. Bers, “ Ca^{2+} scraps local depletions of free $[\text{Ca}^{2+}]$ in cardiac sarcoplasmic reticulum during contractions leave substantial Ca^{2+} reserve,” *Circ. Res.* **93**(1), 40–45 (2003).
- [77] J. Jaepel and R. Blum, “Capturing ER calcium dynamics,” *Eur. J. Cell Biol.* **90**(8), 613–619 (2011).
- [78] J. V. Gerasimenko, O. H. Petersen, and O. V. Gerasimenko, “Monitoring of intra-ER free Ca^{2+} ,” *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* **3**(3), 63–71 (2014).
- [79] N. Callamaras and I. Parker, “Radial localization of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} release sites in *Xenopus* oocytes resolved by axial confocal linescan imaging,” *J. Gen. Physiol.* **113**(2), 199–213 (1999).
- [80] L. M. Mehlmann, M. Terasaki, L. A. Jaffe, and D. Kline, “Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte,” *Developmental Biology* **170**(2), 607 – 615 (1995).
- [81] M. Terasaki, L. L. Runft, and a. R. Hand, “Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation,” *Mol. Biol. Cell* **12**(4), 1103–1116 (2001).
- [82] S. Papp, E. Dziak, M. Michalak, and M. Opas, “Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca^{2+} -handling proteins,” *J. Cell Biol.* **160**(4), 475–479 (2003).
- [83] D. Prins and M. Michalak, “Organellar calcium buffers,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**(3), 1–16 (2011).
- [84] H. Mogami, A. V. Tepikin, and O. H. Petersen, “Termination of cytosolic Ca^{2+} signals: Ca^{2+} reuptake into intracellular stores is regulated by the free Ca^{2+} concentration in the store lumen,” *EMBO J.* **17**(2), 435–442 (1998).
- [85] J. Sneyd, K. Tsaneva-Atanasova, J. I. E. Bruce, S. V. Straub, D. R. Giovannucci, and D. I. Yule, “A model of calcium waves in pancreatic and parotid acinar cells,” *Biophys. J.* **85**(3), 1392–1405 (2003).
- [86] J. Sneyd, K. Tsaneva-Atanasova, D. I. Yule, J. L. Thompson, and T. J. Shuttleworth, “Control of calcium oscillations by membrane fluxes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**(5), 1392–1396 (2004).

- [87] D. X. P. Brochet, D. Yang, A. Di Maio, W. J. Lederer, C. Franzini-Armstrong, and H. Cheng, “Ca²⁺ blinks: rapid nanoscopic store calcium signaling.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**(8), 3099–3104 (2005).
- [88] E. Piegari, L. Lopez, E. Perez Ipiña, and S. Ponce Dawson, “Fluorescence fluctuations and equivalence classes of Ca²⁺ imaging experiments,” *PLoS One* **9**(4) (2014).
- [89] I. Baran, “Integrated luminal and cytosolic aspects of the calcium release control,” **84**(March), 1470–1485 (2003).
- [90] L. a. Lopez, E. a. Piegari, L. Sigaut, and S. Ponce Dawson, “Intracellular calcium signals display an avalanche-like behavior over multiple lengthscales.,” *Frontiers in Physiology* **3**(350) (2012).
- [91] T. V. Martins, M. J. Evans, D. B. Wysham, and R. J. Morris, “Nuclear pores enable sustained perinuclear calcium oscillations,” *BMC Systems Biology* **10**, 55 (2016).
- [92] C. Villarruel, *Cuantificación del transporte que subyace a las señales intracelulares de calcio*. PhD thesis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires (2018).
- [93] Y. Okubo, J. Suzuki, K. Kanemaru, N. Nakamura, T. Shibata, and M. Iino, “Visualization of ca²⁺ filling mechanisms upon synaptic inputs in the endoplasmic reticulum of cerebellar purkinje cells,” *Journal of Neuroscience* **35**(48), 15837–15846 (2015).
- [94] J. S. Marchant and I. Parker, “Role of elementary Ca²⁺ puffs in generating repetitive Ca²⁺ oscillations,” *EMBO Journal* **20**(1), 65–76 (2001).
- [95] D. Fraiman and S. P. Dawson, “Buffer regulation of calcium puff sequences,” *Physical Biology* **11**(1), 016007 (2014).
- [96] E. Piegari, L. Sigaut, and S. 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).
- [97] J. Pawley, *Handbook of biological confocal microscopy*, Springer Science & Business Media (2010).
- [98] M. Yamasaki-Mann and I. Parker, “Enhanced {ER} ca²⁺ store filling by overexpression of {SERCA2b} promotes ip₃-evoked puffs,” *Cell Calcium* **50**(1), 36 – 41 (2011).

- [99] G. D. Dickinson, K. L. Ellefsen, S. P. Dawson, J. E. Pearson, and I. Parker, “Hindered cytoplasmic diffusion of inositol trisphosphate restricts its cellular range of action,” *Science Signaling* **9**(453) (2016).
- [100] K. Dakin and W.-H. Li, “Cell membrane permeable esters of d-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate,” *Cell Calcium* **42**(3), 291 – 301 (2007).
- [101] A. Demuro and I. Parker, “Picomolar sensitivity to inositol trisphosphate in xenopus oocytes,” *Cell Calcium* **58**(5), 511 – 517 (2015).
- [102] N. Otsu, “A threshold selection method from gray-level histograms,” *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* **9**, 62–66 (1979).
- [103] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, “Nih image to imagej: 25 years of image analysis,” *Nature Methods* **9**, 671 EP – (2012).
- [104] MATLAB, *version 8.4.0 (R2014b)*, The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts (2014).
- [105] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess, “Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution,” *Science* **313**(5793), 1642–1645 (2006).
- [106] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, “Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm),” *Nat Meth* **3**(10), 793–796 (2006).
- [107] S. M. Wiltgen, I. F. Smith, and I. Parker, “Superresolution localization of single functional {IP3R} channels utilizing ca2+ flux as a readout,” *Biophysical Journal* **99**(2), 437 – 446 (2010).
- [108] S. M. Kelly, J. P. Butler, and P. T. Macklem, “Control of cell volume in oocytes and eggs from *Xenopus laevis*,” *Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol.* **111**(4), 681–691 (1995).
- [109] R. M. Paredes, J. C. Etzler, L. T. Watts, W. Zheng, and J. D. Lechleiter, “Chemical calcium indicators,” *Methods* **46**(3), 143–151 (2008).
- [110] L. Sigaut, M. Barella, R. Espada, M. L. Ponce, and S. P. Dawson, “Custom-made modification of a commercial confocal microscope to photolyze caged compounds using the conventional illumination module and its application to the observation of Inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signals,” *J. Biomed. Opt.* **16**(6), 066013 (2011).

-
- [111] T. Zimmermann, J. Marrison, K. Hogg, and P. O'Toole, *Clearing Up the Signal: Spectral Imaging and Linear Unmixing in Fluorescence Microscopy*, 129–148. Springer New York, New York, NY (2014).