



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

**Técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia
aplicadas al estudio cuantitativo de la dinámica
intracelular**

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

Manuela Virginia Gabriel

Directora de tesis: Dra. Laura Estrada

Consejero de estudios: Dr. Gustavo Otero y Garzón

Lugar de trabajo: Laboratorio de Electrónica Cuántica (IFIBA)

Buenos Aires, 2019

Resumen

En esta tesis se aplican técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia para el estudio de la dinámica intracelular en dos sistemas de relevancia biológica diferentes.

Por un lado, se implementó la técnica de seguimiento de partículas únicas por barrido láser orbital combinada con el uso de nanopartículas metálicas como sondas alternativas para estudiar la endocitosis y el movimiento de vesículas en células cromafines neuroendocrinas. La dinámica vesicular extraída de las trayectorias individuales muestra la existencia de un movimiento activo dependiente de la vía de internalización y de los cambios de potenciales de acción en la célula. La implementación de esta técnica requirió el diseño, ensamblaje, y caracterización de un microscopio por absorción de 2 fotones el cual actualmente está disponible y es utilizado diariamente en el laboratorio.

Por otro lado, se pusieron a punto novedosas técnicas de correlación de imágenes de fluorescencia para estudiar la dinámica de la proteína cápside de los virus de Dengue y Zika. Estos experimentos permitieron obtener mapas de flujo molecular que revelaron diferencias sustanciales en la interacción de la proteína viral con las interfaces del núcleo y nucleolo para cada virus.

Finalmente, la construcción y puesta en funcionamiento de un microscopio por absorción de dos fotones que tiene la característica única de realizar barridos completamente arbitrarios del haz de excitación, permitió su utilización como plataforma para la fabricación de microestructuras en tres dimensiones por fotolitografía óptica directa.

Abstract

This work aims to apply advanced fluorescence microscopy techniques for the study of intracellular dynamics in two relevant biological systems.

On one hand, the orbital-scanning single particle tracking technique was implemented in combination with metallic nanoparticles as alternative labels to study endocytosis and mobility of vesicles in chromaffin neuroendocrine cells. The vesicular dynamics obtained from the individual trajectories reveal an active motion that is dependent on the internalization way and changes of action potentials in the cell. The implementation of this technique required the design, assembly and characterization of a two photon microscope that is currently available and daily used in the laboratory.

On the other hand, fluorescence image correlation techniques were applied to capsid protein dynamics in Dengue and Zika viruses. These experiments resulted in molecular connectivity maps that show substantial differences in the interaction of the viral protein with nucleus and nucleolus interfaces for each virus.

These projects involved the construction and set up of a two-photon absorption microscope that gave rise to a project of optic lithography that allows printing arbitrary shapes in three dimensions with multiple applications.

Lista de Publicaciones

[1] Gabriel M., Costa Navarro G., De Borba L., Rossi A.H., Gamarnik A.V. and Estrada L. "Dengue Virus Capsid Protein Dynamics Reveals Spatially Heterogeneous Motion and Interactions in Live-Infected-Cells". Scientific Reports. *En revisión*.

[2] Gabriel M., Anzalone A., Gratton E. and Estrada L. "A tracking-based nano-imaging method for fast detection of surfaces' inhomogeneities using gold nanoparticles". Microscopy Research and Techniques. (2019)

[3] Cabrera R., Gabriel M., Estrada L. and Etchenique R. "Direct Measurement of Two-photon action cross section". Anal. Chem. 91.9 (2019)

[4] Zaza C., Gabriel M. and Estrada L. "Microscopía 3D por barrido orbital y modulación radial". Anales AFA. 29.1 (2018)

[5] Gabriel M., Moya-Diaz J., Gallo L., Marengo F. and Estrada L. "Single particle tracking of internalized metallic nanoparticles reveals heterogeneous directed motion after clathrin dependent endocytosis in mouse chromaffin cells". Methods and Applications in Fluorescence. 6.1 (2017)

[6] Anzalone A., Gabriel M., Estrada L. and Gratton E. "Spectral Properties of Single Gold Nanoparticles in Close Proximity to Biological Fluorophores Excited by 2-Photon Excitation". PLoS ONE 10.4 (2015)

A mi familia

Índice general

Resumen	II
Abstract	III
1. Introducción	1
1.1. Importancia del estudio de la dinámica intracelular	1
1.2. Microscopías de fluorescencia	2
1.2.1. Microscopía confocal y multifotónica	3
1.2.2. El límite de difracción	6
1.3. Enfoques para estudiar procesos dinámicos por microscopía de fluorescencia	7
1.4. Contenidos	10
2. Técnicas de espectroscopía de correlación	13
2.1. Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia	13
2.1.1. Generalidades	13
2.1.2. Principio de funcionamiento de FCS	15
2.1.3. Función de correlación para el caso difusional	17
2.1.4. Técnicas de correlación espacial	19
2.2. Espectroscopía de correlación de imágenes de barrido (RICS) . .	21
2.2.1. Generalidades	21
2.2.2. Derivación de la función de autocorrelación para el caso difusional	24
2.2.3. Cómo eliminar fuentes de ruido	25
2.3. Función de correlación de pares de puntos (pCF)	26
2.3.1. Generalidades	26
2.3.2. Función de correlación entre pares de puntos	27

2.3.3. Análisis pCF en imágenes	30
2.4. Comentarios finales	32
3. Seguimiento de partículas individuales por barrido orbital	35
3.1. Generalidades	35
3.2. Método de barrido orbital en 3 dimensiones	37
3.2.1. Principio de funcionamiento	37
3.2.2. Modo de empleo	42
3.3. Comentarios finales	45
4. Desarrollo de un microscopio multifotónico por barrido orbital	47
4.1. Descripción general	48
4.1.1. Sistema de excitación	51
4.1.2. Sistema de detección	52
4.1.3. Sistema de adquisición	54
4.1.4. Sistema de barrido	55
4.2. Caracterizaciones	57
4.2.1. Iluminación	57
4.2.2. Tamaño de píxel	58
4.3. Comentarios finales	59
5. Microfabricación por iluminación láser	61
5.1. Fabricación de microestructuras por litografía óptica	61
5.1.1. Antecedentes	61
5.1.2. Generalidades	62
5.1.3. Plataforma para la microfabricación	63
5.1.4. Caracterizaciones	65
5.2. Aplicaciones: Experimentos de fotoliberación	67
5.2.1. Compuestos enjaulados fotoliberables	67
5.2.2. Fabricación de microcubetas	68
5.2.3. Determinación de la sección eficaz de dos fotones de un compuesto fotoactivable	70
5.3. Comentarios finales	72
6. Tráfico vesicular en células neuroendocrinas	75
6.1. Motivaciones	76

6.2. Nanopartículas metálicas como marcadores de vesículas individuales	77
6.3. Cultivo primario de células cromafines	79
6.4. Internalización de nanopartículas de oro en células cromafines	80
6.5. Análisis de trayectorias experimentales	84
6.5.1. Velocidad instantánea	86
6.5.2. Desplazamiento Cuadrático Medio	88
6.5.3. Variabilidad de las trayectorias	90
6.6. Movimiento vesicular en respuesta a un estímulo	92
6.7. Comentarios finales	96
7. Dinámica de cápside del virus Dengue	99
7.1. Motivaciones	100
7.2. Preparación de muestras biológicas y arreglo experimental	103
7.2.1. Cultivo celular y transfección del ARN viral	103
7.2.2. Descripción del instrumental utilizado	104
7.3. Localización subcelular de cápside la infección	105
7.4. Estudio de la difusión de cápside en células vivas	108
7.5. Análisis del flujo molecular de cápside en el núcleo celular	113
7.5.1. 2D-pCF en un movimiento isótropo	114
7.5.2. Anisotropía del movimiento de cápside	116
7.5.3. Estudio cualitativo en función de tiempo y distancia	121
7.5.4. Comparación de dinámica de cápside de Dengue y Zika	124
7.6. Comentarios finales	127
8. Conclusiones	131
Bibliografía	137
Agradecimientos	157
Glosario	161
A. Proyecto <i>SPEED</i>	161
B. Proyecto μ<i>FED</i>	165

Capítulo 1

Introducción

1.1. Importancia del estudio de la dinámica intracelular

Dentro de una célula, existen numerosos procesos dinámicos que ocurren simultáneamente y que son necesarios para que ésta pueda cumplir funciones básicas como la nutrición, reproducción y comunicación con las células del entorno. Motores moleculares que transportan diferentes compuestos se mueven sobre microtúbulos desde una región de la célula a otra; iones de calcio y potasio circulan por canales sirviendo como señal de activación de diferentes mecanismos; endosomas encargados de internalizar distintas hormonas y péptidos que se distribuyen luego en el interior celular. Distintas proteínas viajan entre el núcleo y citoplasma para regular la actividad de la célula, además de un enorme caudal de transporte molecular ocurriendo a través de los poros nucleares que conectan ambos compartimentos. Estos son tan sólo algunos de los innumerables procesos que simultáneamente pueden estar ocurriendo en una célula viva.

Hoy en día existe un entendimiento profundo sobre muchos procesos importantes en el campo de la biología molecular y celular [1]. Las preguntas que han motivado los estudios sobre la dinámica intracelular han posibilitado (y lo seguirán haciendo) el entendimiento de numerosas enfermedades junto con la capacidad de prevenir riesgos, hacer diagnósticos tempranos y generar tratamientos efectivos [2–4].

Los avances tecnológicos tanto en biología como en física han permitido que

hoy podemos observar y hacer experimentos sobre tejidos y células individuales en vivo, es decir estudiar la dinámica mientras está ocurriendo. Esto ha sido un avance importante respecto de los procedimientos en vitro que implican, por ejemplo, la fijación de las células, introduciendo artefactos y distorsiones [5]. Poder hacer mediciones de la cinética y el transporte que rigen los procesos moleculares dentro de una célula viva da lugar al desarrollo de modelos que permiten luego extraer información cuantitativa de estos mecanismos. La habilidad para descifrar la dinámica molecular depende fuertemente de los límites de resolución espacial y temporal del método empleado para su estudio.

En este contexto, las microscopías de fluorescencia han probado ser poderosas herramientas por su capacidad para estudiar sistemas vivos en forma casi o totalmente no invasiva con alta resolución espacio-temporal [6].

1.2. Microscopías de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una de las herramientas más utilizadas para estudiar procesos biológicos a nivel molecular y celular. Las dos características que la hacen apta para dichos estudios son la resolución subcelular que alcanza y la capacidad de trabajar sobre sistemas vivos. Esto permite la visualización directa de procesos fisiológicos diversos que incluyen la localización y asociación de proteínas, dinámica, transporte y metabolismo, entre otros [7,8]. Durante las últimas décadas, muchas técnicas han sido desarrolladas dentro de este campo, junto con sondas y marcadores fluorescentes que están en continuo avance [9].

La popularidad de esta herramienta para estudiar la dinámica y la estructura de sistemas vivos ha crecido conjuntamente con la capacidad de marcar selectivamente sitios específicos de la célula. Debido a la influencia que ciertos parámetros del entorno tienen sobre la emisión del fluoróforo (como la temperatura, la viscosidad, el pH, la polaridad y el potencial eléctrico), los marcadores son muy utilizados como sondas de prueba para obtener información espacial y temporal tanto del sistema biológico como de su entorno [10]. En este sentido, existen miles de fluoróforos sintéticos de distintos tamaños que permiten hoy marcar diferentes estructuras celulares de interés [10–13]. Otros fluoróforos sirven para reportar funciones celulares, como los cambios en las concentraciones de Ca^{2+} y Na^+ frente a potenciales de membrana. El advenimiento

de proteínas fluorescentes genéticamente codificadas ha permitido marcar una enorme cantidad de proteínas celulares y medir tanto su distribución como su dinámica [14–16].

Las microscopías de fluorescencia más conocidas y más comúnmente utilizadas en laboratorios de biofísica son: microscopía de campo amplio o *Wide-Field*, microscopía de luz estructurada, confocal, multifotónica (dos o tres fotones), de reflexión total interna (TIRF) y de super-resolución (STED, STORM, PALM) [17]. Cada una presenta ventajas y desventajas respecto a las demás, ya sea por la resolución espacial o temporal, por el nivel de daño a la muestra biológica o en cuanto a costos de implementación.

Los experimentos para estudiar procesos dinámicos en células vivas presentados en esta tesis fueron realizados utilizando microscopía de fluorescencia confocal y por dos fotones, las cuales serán explicadas en la siguiente sección.

1.2.1. Microscopía confocal y multifotónica

El microscopio confocal es un microscopio de barrido láser y en general uno de los más utilizados en los laboratorios de biofísica ya que ofrece la posibilidad de realizar una enorme variedad de experimentos que requieren variar la iluminación de la muestra, el rango de detección y otros parámetros. Hoy en día los microscopios confocales son ampliamente utilizados para estudiar una gran variedad de procesos biológicos en tiempo real y existe una enorme cantidad de técnicas que se han desarrollado en base a este tipo de microscopio. Brevemente, en un microscopio confocal, se ilumina la muestra utilizando el haz de un láser enfocado por una lente objetivo de alta apertura numérica. Esto permite concentrar la excitación en el plano xy en tamaños más pequeños que los obtenidos iluminando con otras fuentes de luz. La capacidad de la lente objetivo para enfocar en el eje z , es decir en la dirección de propagación del haz, es menor y esto conlleva a que la sección de iluminación de la muestra en esta dirección sea más grande. Para aumentar la resolución en esta dirección se coloca un iris o *pinhole* en la rama de detección de forma tal de reducir significativamente la fluorescencia colectada por el detector proveniente de planos por encima y por debajo del plano focal [18, 19]. En la Figura 1.1 se representa la geometría típica del volumen de excitación y el volumen de observación en un microscopio confocal, donde ω_0 y ω_z denotan el tamaño característico del volumen de observación en las direcciones lateral y axial respectivamente.

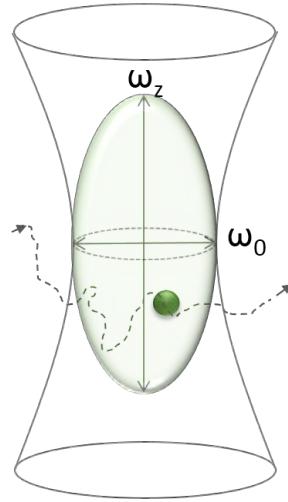


Figura 1.1: Volumen de excitación (en línea negra) y volumen de observación (verde) en un microscopio confocal. La fluorescencia detectada proviene sólo de las moléculas que se encuentran dentro del volumen de observación, de dimensiones ω_0 y ω_z en las direcciones lateral y axial respectivamente.

En este aspecto, la microscopía multifotónica, en particular la microscopía por absorción de dos fotones, presenta algunas ventajas respecto a la microscopía confocal. Probablemente la más relevante en el estudio de sistemas vivos es el seccionamiento inherente a los efectos no lineales que implican la absorción simultánea de dos fotones [20, 21]. Esto hace de la microscopía por absorción de dos fotones una técnica especialmente atractiva para el estudio de sistemas biológicos puesto que al iluminar un volumen menor de la muestra, disminuye el fotodaño y el fotoblanqueo del espécimen.

Si bien estas dos microscopías consisten en barrer un haz de láser enfocado sobre la muestra y coleccionar la fluorescencia emitida en cada punto para reconstruir la imagen, la diferencia fundamental entre el microscopio confocal y el dos fotones radica en el principio físico de excitación de la muestra. Como puede verse en el diagrama de Jablonski de la Figura 1.2, en el caso de la excitación por absorción de un fotón (microscopía confocal), una molécula absorbe un fotón que tiene la energía necesaria para alcanzar el estado excitado, y luego vuelve a su estado fundamental emitiendo un fotón de menor energía. La misma transición molecular puede alcanzarse absorbiendo simultáneamente dos fotones de la mitad de la energía (Figura 1.2b), y decaer emitiendo un

fotón [22]. En la práctica, la absorción casi simultánea de dos fotones se logra iluminando la muestra con un láser de pulsos ultracortos ya que al aumentar la densidad de fotones, aumenta la probabilidad de absorción simultánea.

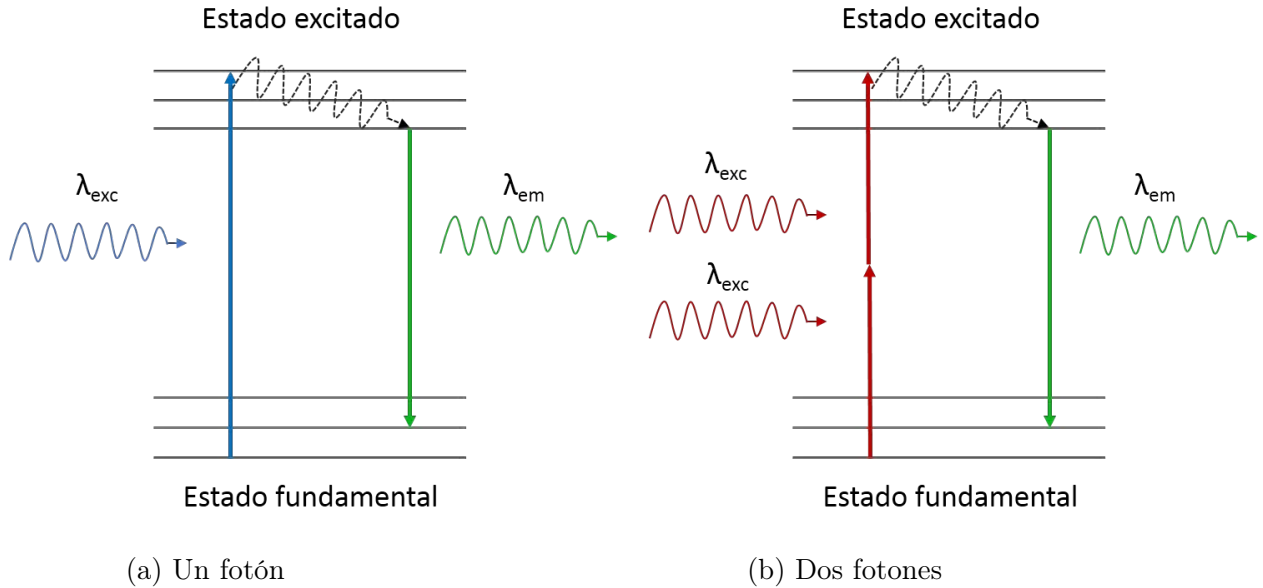


Figura 1.2: Diagrama de Jablonski. Transiciones moleculares para los casos de absorción por un fotón (a) y por dos fotones (b).

En un microscopio por absorción de dos fotones, debido a la naturaleza no lineal del fenómeno, la probabilidad de excitación depende cuadráticamente de la potencia del láser incidente, que implica que la absorción se dará principalmente en la región con máximo flujo de fotones, esto es el plano focal [23]. Otra característica interesante de la microscopía por absorción de dos fotones radica en que tiene una distancia de penetración mayor, lo cual resulta especialmente útil para trabajar sobre tejidos y órganos. Esta propiedad se debe a que la fuente de iluminación es un láser infrarrojo (para tener fotones de menor energía), que genera menos señal de dispersión *scattering* en comparación con láseres de longitudes de onda en el UV y visible.

En el marco de esta tesis se utilizó un microscopio confocal comercial y se construyó un microscopio por absorción de dos fotones. La elección de uno u otro para realizar los estudios de dinámica dependió de las ventajas experimentales que cada sistema presenta para la aplicación de las técnicas que fueron abordadas.

1.2.2. El límite de difracción

La limitación de los microscopios para poder resolver estructuras a escala molecular está dada por el límite de difracción de la luz. Esto fue por primera vez propuesto por el científico alemán Ernst Abbe en 1873 [24], quien lo describió mediante la relación:

$$d = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1.1)$$

donde λ es la longitud de onda de la fuente de iluminación y NA es la apertura numérica de la lente objetivo con la que se enfoca el haz. Cuando se ilumina un objeto brillante por debajo del tamaño de d , la imagen de ese objeto es un patrón que está dado por la interferencia de la luz con el objeto iluminado. Ese patrón consiste en discos concéntricos con un máximo central conocido como disco de Airy [25,26] cuyo tamaño es d . Esto implica, entonces, que un microscopio óptico no puede resolver objetos que estén más cercanos que esa distancia y que cualquier objeto más pequeño se verá de ese tamaño.

La dispersión de la luz producida por un objeto puntual también se conoce como función de dispersión de punto, o PSF por sus siglas en inglés. Los objetivos de microscopio modernos alcanzan aperturas numéricas entre 1.4 - 1.6, de modo que considerando $\lambda = 500$ nm para luz verde por ejemplo, el tamaño de la PSF es de aproximadamente 250 nm (sin considerar aberraciones ni otras imperfecciones en la óptica). La función matemática $W(\vec{r})$ que describe la PSF depende de la iluminación, es decir que no es la misma para un microscopio confocal y para uno por absorción de dos fotones. En el caso de un microscopio confocal, $W(\vec{r})$ se puede describir como una Gaussiana en las tres dimensiones:

$$W(\vec{r}) = e^{-2(x^2+y^2)/\omega_0^2} e^{-2z^2/\omega_z^2} \quad (1.2)$$

con ω_0 y ω_z las distancias en las que la función decae a $1/e^2$ en las direcciones lateral y axial respectivamente. En el caso de un microscopio por absorción de dos fotones, la función que mejor describe el perfil de intensidad en la coordenada axial en vez de tener un perfil Gaussiano es una función Lorentziana, es decir que decae cuadráticamente con z , resultando en un volumen de excitación menor que el del confocal, como fue explicado anteriormente.

1.3. Enfoques para estudiar procesos dinámicos por microscopía de fluorescencia

Cada uno de los procesos dinámicos que se desarrollan en el entorno celular ocurre en cierta escala de espacio y de tiempo (ver Figura 1.3) [27]. En los últimos años, se han desarrollado diferentes técnicas en el campo de la microscopía de fluorescencia que permiten extraer información de cada una de estas dinámicas [28–32]. A modo de resumen, en la Tabla 1.1 se presentan algunos de los métodos más utilizados en el estudio de sistemas biológicos.

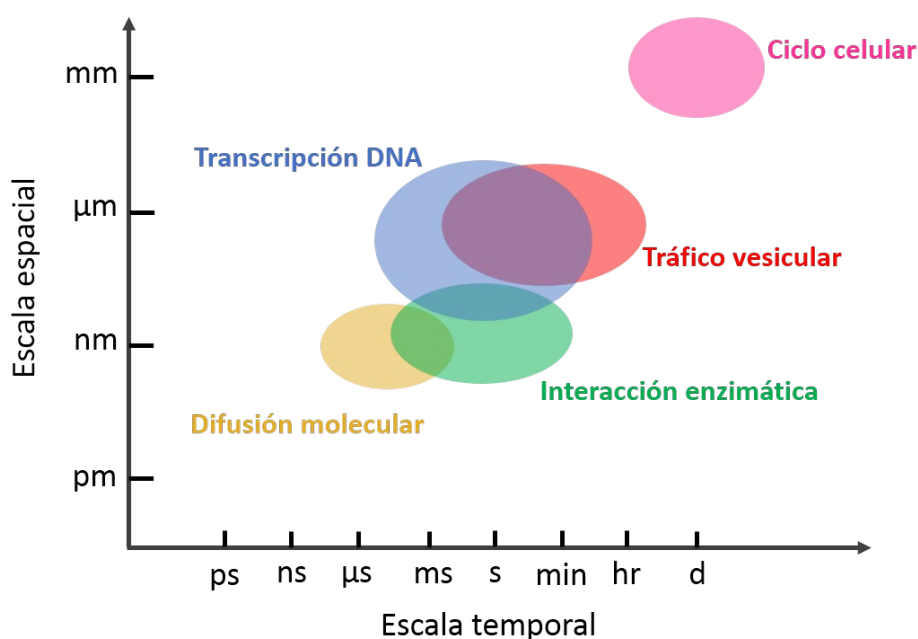


Figura 1.3: Escalas aproximadas de espacio y de tiempo asociadas a distintos procesos biológicos [27].

Dentro de estos métodos, los experimentos de seguimiento de partículas individuales (SPT por sus siglas en inglés) consisten en obtener la trayectoria de las partículas en movimiento de forma individual y luego analizar los parámetros que la caracterizan, como el cambio de velocidad, desplazamiento, área recorrida, direccionalidad, entre otras [33–38]. Todo esto es posible de calcular ya que se conoce la posición de la partícula en cada instante de tiempo [39]. Para lograrlo, es necesario localizar moléculas o partículas individuales, lo cual

Técnicas para el estudio de procesos dinámicos				
Técnica	Descripción	Resolución espacial	Resolución temporal	Aplicaciones
FRAP	Obtiene información de las constantes dinámicas a partir del tiempo de recuperación de la fluorescencia de una región fotoblanqueada.	μm	μs	Difusión molecular, conexión entre compartimentos.
FRET	Se excita un fluoróforo donador y se mide la fluorescencia de un aceptor, que ocurre cuando estos se encuentran a una distancia determinada.	5 - 10 nm	μs	Interacción entre dos moléculas. Doblamiento de proteínas.
FLIM	A partir de la medición del tiempo de vida de las moléculas se extrae información sobre el estado molecular y su entorno.	250 nm	μs - ms	Interacción entre proteínas, concentración de iones.
SPT	Se mide la posición de una partícula en función del tiempo y se conecta cada posición adquirida para obtener una trayectoria.	10 - 250 nm	ms - s	Sistemas de partículas aisladas y muy brillantes.
FCS	La correlación de las fluctuaciones de fluorescencia medida en un punto permite obtener el coeficiente de difusión y concentración de un conjunto de moléculas que difunden en el medio.	250 - 500 nm	μs - ms	Difusión y transporte molecular, interacción entre proteínas y otras moléculas.

Tabla 1.1: Algunos de los métodos más utilizados en el estudio de la dinámica de sistemas biológicos por microscopía de fluorescencia. FCS y SPT son las técnicas utilizadas en el desarrollo de esta tesis.

sólo es posible si las mismas están aisladas. En microscopía de fluorescencia, esto implica que las partículas se encuentren a una distancia mayor al tamaño de la PSF. Dado que las trayectorias obtenidas provienen de partículas individuales, es necesario en estos casos medir sobre muchas partículas para aumentar la estadística y así lograr mayor confianza en los resultados. Si las partículas están formando un aglomerado o no están lo suficientemente aisla-

das, este enfoque no resulta posible. Además, los experimentos de SPT tienen una resolución temporal en la escala de los milisegundos para el mejor caso (ver Capítulo 3), con lo cual la dinámica a estudiar está limitada a ese rango.

Existen casos en que las características que presenta el sistema no permiten medir trayectorias de partículas individuales, ya sea porque no están lo suficientemente aisladas o porque la escala espacial en la que se encuentran es inferior a la que el sistema resuelve, o incluso puede ocurrir que la dinámica del sistema sea más rápida que la máxima resolución temporal alcanzada. En estos casos no se puede medir una trayectoria, pero sí es posible obtener información de su dinámica a partir de la intensidad de fluorescencia.

Las técnicas conocidas como espectroscopías de correlación (o FCS por sus siglas en inglés) consisten en tomar una traza de la intensidad proveniente de una o varias moléculas en el volumen de observación en una solución o en el entorno celular [40, 41]. La difusión de las moléculas genera fluctuaciones en la intensidad que se mide a lo largo del tiempo. A partir de la correlación temporal de esa intensidad se puede extraer información de la dinámica que gobierna el sistema. En este caso, los parámetros que se extraen, como el coeficiente de difusión, la concentración y otras variables dinámicas, provienen del promedio de todas las partículas que se mueven y eso es lo que le aporta la estadística a la medición. A diferencia de SPT, las técnicas basadas en FCS son mediciones indirectas de la dinámica molecular y están sujetas por lo tanto a los efectos que genera promediar. Las espectroscopías de correlación tienen una resolución temporal desde los microsegundos a los milisegundos, razón por la cual son especialmente interesantes para estudiar difusión de moléculas pequeñas que difunden rápidamente.

Cada uno de estos enfoques tiene sus ventajas, y el más apropiado dependerá de la pregunta específica que se persigue, el sistema que se está estudiando y el instrumental disponible. El factor común entre ambos es que se pueden llevar a cabo con un microscopio de fluorescencia, ya sea confocal o multifotónico. En particular, por su versatilidad, el microscopio desarrollado en el marco de esta tesis permite emplear estas y otras técnicas que amplían su campo de aplicaciones. La elección de una u otra dependerá de cómo sea la marcación en el sistema a estudiar y la dinámica a observar. En el caso de que se observen partículas, de unas decenas o centenas de nanómetros, y que estén aisladas, entonces las técnicas de SPT son aplicables. Si se tienen, por el contrario, mo-

léculas que no se distinguen individualmente y difunden muy rápido, entonces la espectroscopía de correlación es una mejor opción.

1.4. Contenidos

En esta tesis se aplican técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia para el estudio de dinámica en células vivas, incluyendo el diseño y desarrollo de nuevo instrumental de microscopía.

Como parte de este trabajo, se puso a punto un microscopio de absorción por dos fotones de alta versatilidad, lo cual lo hace apto para múltiples aplicaciones dentro y fuera del campo de la biofísica. Los resultados de la aplicación de estas técnicas se enmarcan dentro de dos grandes proyectos. Por un lado, se estudió el tráfico de vesículas sinápticas en células cromafines por medio del seguimiento de vesículas individuales marcadas con nanopartículas metálicas. Por el otro, utilizando técnicas de correlación de imágenes se estudió la dinámica de la proteína cápside del virus de Dengue durante el proceso de infección. A lo largo de la tesis se discuten las ventajas de cada técnica, se describe en detalle el instrumental utilizado y se exponen los principales resultados alcanzados de su aplicación en los dos sistemas biológicos estudiados.

En el Capítulo 2 se hace una introducción general a la Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia, incluyendo el desarrollo de las bases teóricas, y se describen las dos técnicas dentro de esta familia que fueron utilizadas en cápside-Dengue.

En el Capítulo 3 se presenta el método de seguimiento de partículas por barrido orbital, su principio de funcionamiento y las ventajas que presenta respecto de los métodos de seguimiento convencionales.

El Capítulo 4 contiene una descripción detallada del microscopio multifotónico por barrido orbital que fue construido bajo la motivación de estudiar dinámica de sistemas vivos y dio lugar a diversas aplicaciones. Esta descripción incluye las especificaciones instrumentales así como las caracterizaciones que fueron realizadas para poner en funcionamiento el instrumento.

Una de las aplicaciones que surgieron a partir de este microscopio es el proyecto de microfabricación con iluminación láser. En el Capítulo 5 se describe el proceso de fabricación y se reporta una aplicación que dio lugar a un trabajo publicado.

Los resultados del estudio de tráfico vesicular a partir del seguimiento de vesículas individuales por medio del método de barrido orbital se reportan en el Capítulo 6.

Finalmente, en el Capítulo 7 se muestran los resultados obtenidos del estudio de la dinámica de la proteína cápside del virus Dengue durante el proceso de infección en células viva y se presentan resultados preliminares de la dinámica de esta misma proteína en Zika.

Por último, las conclusiones de este trabajo junto con las perspectivas que se abren a partir de los resultados obtenidos se describen en el Capítulo 8.

Capítulo 2

Técnicas de espectroscopía de correlación

Las espectroscopías de correlación de fluorescencia son una familia de métodos que, a partir del análisis de las fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia de moléculas excitadas, permite extraer propiedades dinámicas, a nivel molécula única, y en células vivas. En los últimos 20 años las espectroscopías de correlación se han instalado como una herramienta muy poderosa para la determinación de concentraciones locales, coeficientes de difusión, constantes cinéticas de reacción y cambios conformacionales de biomoléculas fluorescentes sin la necesidad de perturbar al sistema en estudio.

En este Capítulo se describen brevemente los conceptos básicos y generales de las espectroscopías de correlación de fluorescencia para luego presentar los métodos de correlación de imágenes que se utilizaron en esta tesis.

2.1. Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia

2.1.1. Generalidades

El campo de la espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS por sus siglas en inglés) ha crecido notablemente en las últimas décadas por sus vastas aplicaciones en el estudio del tráfico molecular, ya sea en solución, en tejidos o en el entorno celular.

La versión original de FCS (FCS en un punto) fue introducida por primera vez en 1972 por Magde, Elson y Webb [42], quienes la utilizaron para medir la concentración de un complejo formado por moléculas fluorescentes de bromuro de etidio y ADN. En su trabajo fundacional Magde y colaboradores demostraron que, cuando el haz de un láser era enfocado sobre una solución que contenía ambas componentes, era posible a partir del análisis de las fluctuaciones en la intensidad medida, determinar la concentración de cada especie. En aquel trabajo, las fluctuaciones de intensidad estaban ocasionadas por variaciones en la eficiencia de emisión de las moléculas fluorescentes, la cual aumentaba cuando las moléculas se asociaban al ADN. Más adelante, en 1974, describieron la capacidad de este método para medir coeficientes de difusión y constantes cinéticas de moléculas fluorescentes en solución [43]. Con el correr de los años, la aparición de nuevos interrogantes y el avance de la tecnología, distintos métodos basados en los mismos principios han aparecido.

Hoy en día existen una variedad enorme de técnicas basadas en la correlación de la señal de fluorescencia que permiten, dependiendo de cuáles sean los interrogantes y las particularidades del sistema de interés, obtener información cuantitativa para estudiar procesos dinámicos a nivel molecular [44, 45]. La recuperación de la fluorescencia luego del fotodaño (o FRAP por sus siglas en inglés) es un método que, por lo sencillo de su implementación, es extensamente utilizado en laboratorios de biofísica de todo el mundo [46, 47]. En un experimento típico de FRAP, un láser de alta intensidad fuertemente enfocado ilumina una región del sistema de interés generando localmente una fuerte perturbación externa. Esta perturbación aparta al sistema de su posición de equilibrio y, cuando la perturbación cesa, el sistema relaja en forma exponencial con un tiempo característico que depende del proceso responsable del retorno al equilibrio.

Un enfoque diferente consiste en estudiar las fluctuaciones espontáneas del sistema. Estas fluctuaciones disipan, en promedio, con el mismo tiempo característico que se obtiene al perturbar al sistema externamente, es decir que dan la misma información dinámica, con la ventaja de que no es necesario someter al sistema a una perturbación adicional. Esta característica distintiva de los experimentos basados en las fluctuaciones espontáneas, hacen de las espectroscopías de correlación métodos mínimamente invasivos y sumamente interesantes para el estudio de dinámica intracelular en organismos vivos.

2.1.2. Principio de funcionamiento de FCS

Como se dijo anteriormente, FCS ha demostrado ser una herramienta muy poderosa para determinar concentraciones locales, coeficientes de difusión y cambios conformacionales de biomoléculas fluorescentes, entre otros parámetros de relevancia. En experimentos de FCS, no es la intensidad media de fluorescencia el observable de interés, sino sus fluctuaciones espontáneas. Es claro que la simple medición de la emisión fluorescente en el tiempo, o $F(t)$, no permite extraer información sobre la dinámica de las moléculas. Sin embargo, un análisis cuidadoso de las fluctuaciones de la señal permite enfatizar aspectos que no son evidentes en la serie temporal de los datos originales. Una manera de hacer esto es a partir del cálculo de la función de correlación de la intensidad de fluorescencia, $G(\tau)$, cuya expresión se escribe en la ecuación (2.1) [48]:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (2.1)$$

donde $\delta F(t)$ es la variación de la señal de fluorescencia medida en el tiempo t , τ es el tiempo de retardo (o *lag time*) y $\langle \dots \rangle$ representa el promedio temporal. Asumiendo que la potencia de iluminación es constante, la fluctuación de la señal de fluorescencia se puede escribir como $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$, donde el término $\langle F \rangle$ corresponde al promedio temporal de $F(t)$. El hecho de que la función de correlación, $G(\tau)$, no dependa del tiempo, t , se debe a que el sistema se encuentra en un estado estacionario [49].

El caso de más simple implementación de FCS es aquel en el que se ilumina un punto fijo sobre la muestra y se colecta, por lo tanto, la emisión proveniente de moléculas contenidas en esa región. A la región de estudio, la llamaremos de aquí en más, volumen de observación, V . La forma y el tamaño del V dependen fuertemente del microscopio utilizado para hacer la adquisición de los datos, así como de la lente objetivo y la longitud de onda de excitación, pero en cualquier caso no superará una fracción de femtolitro ($1 \text{ fl} = 1 \mu\text{m}^3$)

Si bien en promedio la concentración en el sistema permanece constante, localmente la concentración presenta variaciones espontáneas que pueden provenir de la difusión de las moléculas o de reacciones químicas. La intensidad de fluorescencia colectada en el tiempo, entonces, estará caracterizada por fluctuaciones generadas por el cambio en el número medio de moléculas en el

volumen de observación.

En la figura 2.1 se esquematiza un experimento típico de FCS, donde el volumen de observación está fijo en una posición de la muestra, y donde las fluctuaciones de la señal de fluorescencia están originadas por el cambio en la concentración local de moléculas proveniente de la difusión. Considerando únicamente un movimiento puramente difusivo, las fluctuaciones observadas en la traza de intensidad están relacionadas al tiempo de residencia de las moléculas en el volumen, y al número de partículas presentes.

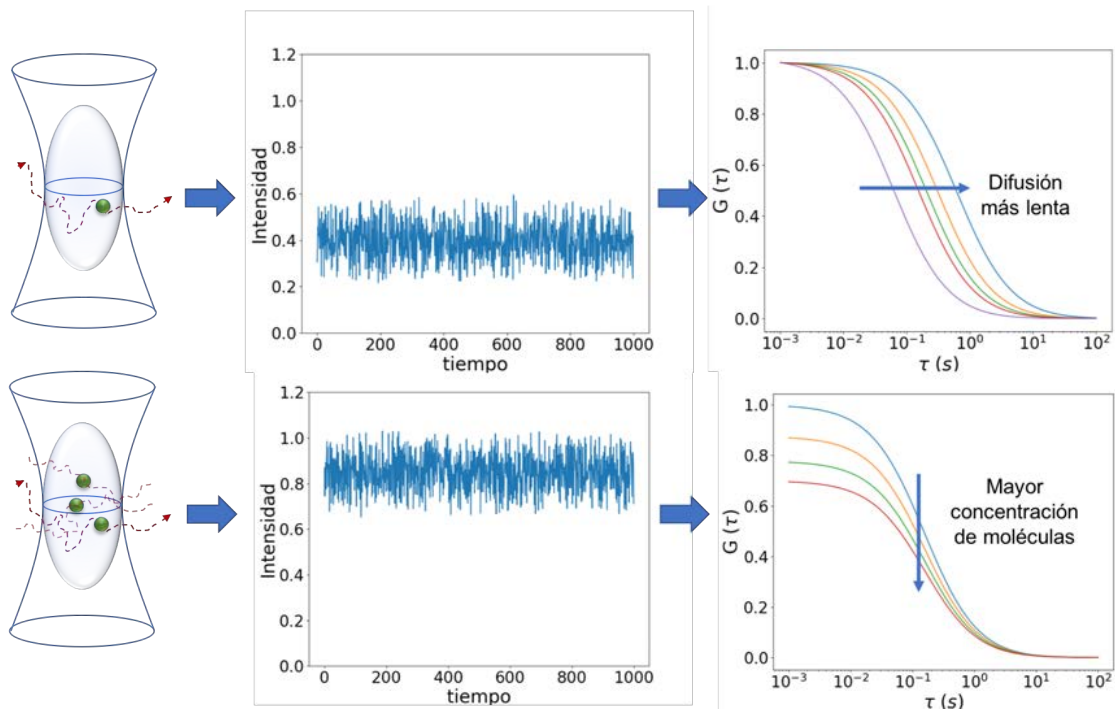


Figura 2.1: Principio de funcionamiento de FCS. Las moléculas difunden a través del volumen de observación generando fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia medida en el tiempo. Se puede observar la función de correlación de la intensidad, $G(\tau)$, para el caso de moléculas difundiéndose con distinto coeficiente de difusión D y a distintas concentraciones. La amplitud de $G(\tau)$ es inversamente proporcional a la concentración de moléculas dentro del volumen. El tiempo característico de $G(\tau)$, definido como el tiempo en el cual la función cae a $1/e$ de su valor inicial, depende inversamente de D .

En términos estadísticos, la función $G(\tau)$ da cuenta de la probabilidad de detectar un fotón a tiempo $t = \tau$ si se detectó un fotón de la misma

molécula a tiempo $t = 0$. Cuando los fotones detectados provienen de dos moléculas diferentes que no interactúan entre sí, no hay correlación entre esos fotones y esto no contribuye a $G(\tau)$ [50]. Sólo los fotones que provengan de una misma molécula aportarán a la función de correlación. Asimismo, el ruido conocido como *shot noise* [51], que está siempre presente debido a la naturaleza estocástica del proceso de detección, tampoco contribuye a la $G(\tau)$.

2.1.3. Función de correlación para el caso difusional

Como se desprende de la figura 2.1, la función de correlación para el caso difusional tiene dos parámetros característicos. Por un lado la amplitud del punto $\tau = 0$, $G(0)$, es inversamente proporcional a la concentración de moléculas dentro del volumen de observación. Por otra parte, el tiempo en el cual la amplitud decae a $1/e$ de su valor inicial se corresponde con el tiempo de residencia medio de las moléculas en el volumen de observación. Por lo tanto, este tiempo, conocido como tiempo de correlación, aumenta cuanto más chico es el coeficiente de difusión de las moléculas.

En el ejemplo presentado, las fluctuaciones de la señal de fluorescencia en el volumen de observación se deben esencialmente a la fluctuación en la concentración local de moléculas. El número de moléculas que hay en el volumen de observación en cada instante de tiempo está gobernado por una distribución Poissoniana y, por lo tanto, la fluctuación relativa es menor cuanto mayor es el número de moléculas. Es por esto que es muy importante, para tener fluctuaciones visibles, que el número de moléculas sobre el volumen de observación sea bajo. En la mayoría de los casos, un experimento de FCS en solución, a una concentración en el orden de 1-100 nM, lo cual corresponde a 0,6 - 60 moléculas por femtolitro, es suficiente para tener fluctuaciones observables.

Suponiendo que las fluctuaciones de fluorescencia se deben únicamente a los cambios de concentración en la cantidad de moléculas en el volumen de observación V , las variaciones de la intensidad de fluorescencia medida, $\delta F(t)$ pueden escribirse como indica la ecuación (2.2) [48]:

$$\delta F(t) = \int_V W(\vec{r}) \delta(\eta C(\vec{r}, t)) dV \quad (2.2)$$

donde $W(\vec{r})$ es la función que describe la distribución espacial de la luz emitida, que se obtiene como combinación de la distribución de intensidad del

haz de excitación con la función espacial que describe la respuesta óptica del microscopio para un objeto puntual o PSF (ecuación (1.2) de la sección 1.2.2). $\eta = K \sigma_{abs} \phi$ siendo K la eficiencia de detección, σ_{abs} es la sección eficaz de absorción de la molécula y ϕ es la eficiencia cuántica de emisión de fluorescencia. $C(\vec{r}, t)$ es la concentración de moléculas en la posición \vec{r} a tiempo t .

Teniendo en cuenta la expresión en (2.2) y reemplazando en la ecuación (2.1), se obtiene para la función de autocorrelación la siguiente expresión:

$$G(\tau) = \frac{\int_V \int_{V'} W(\vec{r}) W(\vec{r}') \langle \delta(\eta C(\vec{r}, t)) \delta(\eta C(\vec{r}', t + \tau)) \rangle dV dV'}{(\int_V W(\vec{r}) \langle \delta(\eta C(\vec{r}, t)) \rangle dV)^2} \quad (2.3)$$

La función $W(\vec{r})$, como se dijo antes, depende de la iluminación y de la respuesta óptica del microscopio. Para un microscopio confocal se puede describir según:

$$W(\vec{r}) = e^{-2 \frac{x^2 + y^2}{\omega_0^2}} e^{-2 \frac{z^2}{\omega_z^2}} \quad (2.4)$$

con ω_0 y ω_z las constantes en las que la función decae a $1/e^2$ en las direcciones lateral y axial respectivamente.

A partir de esta última expresión, y considerando que $V = \pi^{3/2} \omega_0^2 \omega_z$, se obtiene una expresión analítica para la función de autocorrelación de la forma:

$$G(\tau) = \frac{1}{V \langle C \rangle} \frac{1}{(1 + \tau/\tau_D)} \frac{1}{\sqrt{1 + (\frac{\omega_0}{\omega_z})^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad (2.5)$$

donde τ_D es el tiempo de residencia promedio de una molécula en V . Considerando que las moléculas difunden libremente en V , τ_D se relaciona con el coeficiente de difusión D mediante la ecuación (2.6):

$$\tau_D = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad (2.6)$$

Conocida la relación entre τ_D y D , es posible obtener el coeficiente de difusión a partir del ajuste de la función de correlación calculada a partir de la intensidad de fluorescencia medida en el tiempo. Es importante aclarar que la derivación de la expresión para $G(\tau)$ se hizo partiendo del postulado de moléculas que difunden isotrópamente.

2.1.4. Técnicas de correlación espacial

El método más sencillo en Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia consiste en correlacionar temporalmente las fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia medida en un punto sobre la muestra. El tamaño del punto lo define la PSF, que varía para cada microscopio, fuente de iluminación y objetivo utilizados, y que definen la capacidad para enfocar el haz de excitación. Como fue explicado en la sección 1.2.2, para un microscopio confocal convencional, la PSF es del orden de los 200 - 300 nm en el plano.

Las medidas de FCS en un punto solamente arrojan información sobre un volumen muy pequeño de la muestra. Muchos procesos químicos, físicos y biológicos, sin embargo, suceden en una escala espacial más grande y no llegan a ser estudiados si sólo se ilumina un punto de ese tamaño sobre la muestra. Una proteína puede moverse en todo el citoplasma atravesando obstáculos, bordeando membranas o confinándose en determinadas regiones, y al mirar en un sólo punto este tipo de dinámicas no pueden apreciarse. Una posibilidad para vencer esta limitación es hacer mediciones en distintos puntos distribuidos a lo largo de la muestra. Esta alternativa, si bien posible, implica multiplicar la cantidad de experimentos a realizar. Aún así, medir sobre puntos aislados no alcanzaría para ver barreras en la difusión, por ejemplo, porque sólo daría información de lo que sucede en cada punto aislado sin vincularlo con los demás.

Con el correr del tiempo, y para resolver estas limitaciones, se fueron expandiendo las técnicas de FCS que en vez de correlacionar la intensidad medida en el mismo punto en función del tiempo, comparan la intensidad medida sobre diferentes puntos de la muestra. Entre las más utilizadas se encuentran las que consisten en medir en varios volúmenes de observación simultáneamente, o las que se propone barrer la muestra moviendo el láser de forma lineal (*line scan*), en un área (*raster scan*) o recorriendo un círculo (*circular scan*), registrando la intensidad en cada píxel de la región barrida en función del tiempo. Estos últimos métodos poseen la ventaja de ser fácilmente realizables en cualquier microscopio confocal convencional, sin la necesidad de comprar instrumentos específicos o difíciles de implementar.

El ejemplo más sencillo de visualizar es FCS sobre una línea (Figura 2.2), que se consigue al mover la posición del haz del láser barriendo una línea sobre la muestra. Desde los primeros desarrollos en el campo de FCS surgió

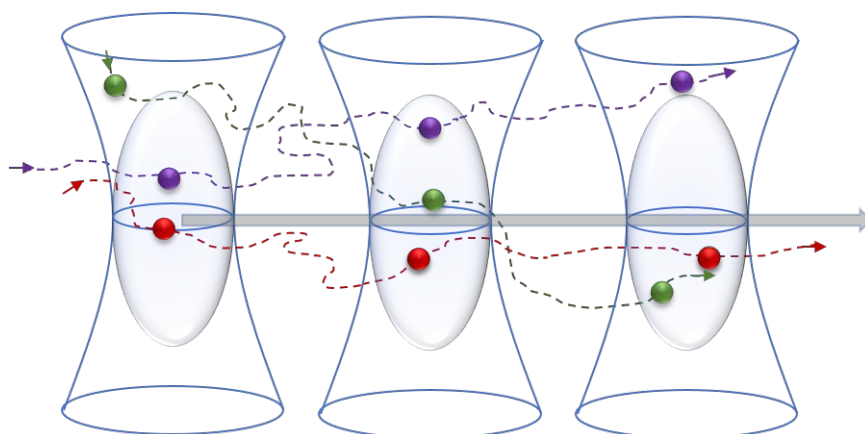


Figura 2.2: Ejemplo de FCS sobre una línea. Se realiza un barrido sobre una línea periódicamente mientras las moléculas difunden en todas las direcciones. Algunas moléculas serán iluminadas en varios puntos durante el barrido (ejemplo molécula en rojo), mientras que otras seguirán trayectorias diferentes y sólo serán iluminadas en algún punto de la línea (casos violeta y verde).

la idea de que moviendo el volumen de iluminación en forma periódica sobre la muestra se podría obtener información espacial a partir de las fluctuaciones [52, 53], siempre que el período de este movimiento fuera más rápido que el movimiento característico de las moléculas. Este enfoque, llamado FCS de barrido (o *Scanning FCS*) hoy en día es aplicado en numerosos laboratorios y ha tenido gran impacto en el área de la microscopía de fluorescencia y la espectroscopía de correlación [54–56].

En este tipo de técnicas en las que el láser barre la muestra con un patrón repitiéndolo durante varios ciclos temporales, cada punto a lo largo del camino del haz es visitado una vez por ciclo. Si se analiza la intensidad en un mismo punto entonces la resolución temporal es el tiempo por ciclo, que en el caso del ejemplo de la Figura 2.2 es el tiempo necesario para barrer línea. Considerando una línea de cientos de píxeles y un tiempo por píxel de algunos microsegundos, el tiempo por línea es del orden de los pocos milisegundos. Si, en cambio, se compara la intensidad entre puntos consecutivos, la resolución temporal es el tiempo por punto, del orden de los microsegundos. A esta correlación se la llama correlación espacio-temporal y si bien el principio es conocido desde los primeros tiempos de FCS, los avances tecnológicos de las últimas décadas han permitido que se desarrollaran estas técnicas más fuertemente en los últimos

años [57–60].

Estas técnicas se originaron a partir de la idea de correlacionar espacialmente la intensidad de fluorescencia en una imagen, que fue usada por el grupo de Petersen y Wiseman [61,62] para obtener los tamaños de agregados de proteínas en membrana. Luego surgió la idea de que tomando varias imágenes a lo largo del tiempo, podía estudiarse la evolución de esos tamaños y más aún, podía calcularse la correlación entre un píxel y el mismo píxel de las imágenes siguientes, obteniendo una correlación temporal de las imágenes. A partir de allí, numerosos métodos de correlación de imágenes han surgido para estudiar distintos procesos dinámicos. Algunos de ellos están resumidos en la Tabla 2.1.

En particular, el método de correlación de imágenes por barrido (o *Raster Image Correlation Spectroscopy - RICS*) y la función de correlación de pares (o *Pair Correlation Function - pCF* - en 2D) fueron los utilizados en esta tesis para estudiar la dinámica de la proteína cápside de Dengue y Zika durante el proceso de infección viral. En las próximas secciones se detalla el funcionamiento de estos métodos y más adelante, en el Capítulo 7, se reportan los resultados obtenidos de su aplicación a un sistema biológico.

2.2. Espectroscopía de correlación de imágenes de barrido (RICS)

2.2.1. Generalidades

RICS compara las fluctuaciones de intensidad entre los píxeles de una imagen tomada por barrido láser, esto es, línea a línea [57,66]. Hay una diferencia sustancial entre tomar la imagen de esta forma y hacerlo con una cámara, donde todos los píxeles de la imagen son adquiridos al mismo tiempo. En este último caso, la resolución temporal está limitada por los cuadros por segundo (o *frame rate*) que es del orden de los cientos de milisegundos a los segundos, según el modelo de la cámara. En cambio, cuando la imagen se toma por barrido, la escala temporal de las correlaciones entre píxeles es el tiempo por píxel para píxeles dentro de una misma línea (del orden de los microsegundos) y el tiempo de línea para píxeles entre líneas diferentes (del orden de los milisegundos).

En la Figura 2.3 se esquematiza el funcionamiento de esta técnica. Para

Técnicas de correlación espacial y temporal			
Técnica	Descripción experimental	Información	Aplicaciones
RICS	Correlación espacial sobre una imagen, promedio de una serie de imágenes	Concentración y coeficiente de difusión promedio de una región espacial	Procesos de difusión y de asociación-disociación.
STICS	Correlación espacio-temporal entre imágenes de una serie temporal de imágenes variando el tiempo entre las mismas	Mapa de transporte y flujo promedio de una región	Medición de flujo molecular
pCF	Correlación entre pares de puntos de una serie temporal de líneas, círculos, o imágenes	Direccionalidad del flujo molecular, detección de obstáculos en el movimiento	Conectividad molecular entre sub-regiones celulares
N&B	Mide el promedio y la varianza de las fluctuaciones en cada punto de una imagen	Número y Brillo de las moléculas móviles en cada punto de la imagen	Medición de estados de agregación molecular
iMSD	Correlación espacio-temporal de una serie temporal de imágenes entre imágenes a distintos tiempos	Desplazamiento Cuadrático Medio (MSD) del promedio de todas las partículas en la imagen	Diferenciación entre movimiento confinado, dirigido, difusivo libre o anómalo

Tabla 2.1: Tabla comparativa con algunas de las técnicas de correlación espacial y temporal de la señal de fluorescencia. Información obtenida y algunas de sus posibles aplicaciones [57, 60, 63–65].

calcular la función de correlación de RICS se toma una imagen haciendo un barrido con el láser sobre la muestra (PSF dibujada en la Figura 2.3a). Mientras el láser se mueve, las moléculas difunden en todas las direcciones. Una vez adquirida la imagen, se compara la intensidad punto a punto con la misma imagen desplazada una cantidad ξ en el eje horizontal y ψ en el vertical, para valores de ξ y ψ expresados en cantidad de píxeles, como se muestra en la Figura 2.3b [57]. El valor de la función de correlación de RICS se calcula a partir del promedio de la correlación entre todos los píxeles a distancias ξ y ψ . Es importante notar que la información de la correlación de cada píxel

se pierde de modo que la resolución espacial de RICS, que está dada por el tamaño total de la imagen, es menor que la de FCS en un punto. Con este enfoque, si bien se pierde en resolución espacial, se gana en estadística y se obtiene información de la dinámica molecular en una región más grande.

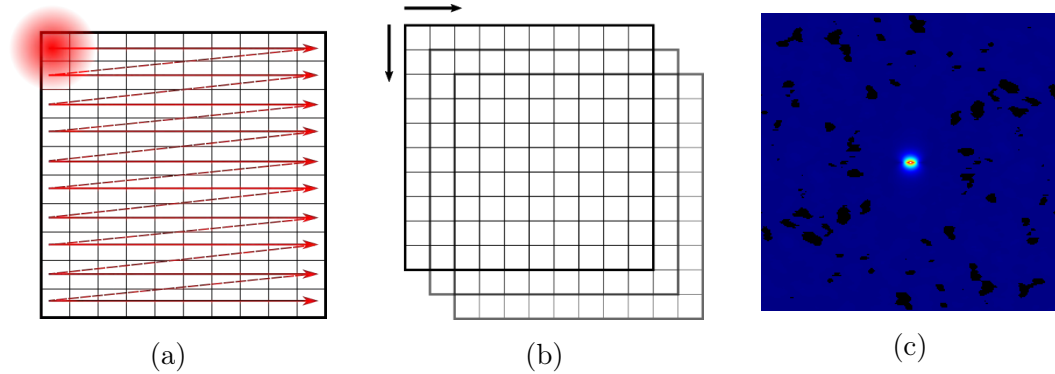


Figura 2.3: Esquema del funcionamiento de RICS. (a) Se toma una imagen de barrido moviendo el haz del láser (círculo rojo) en una línea y volviendo a empezar desde el mismo punto en la línea siguiente. (b) La imagen tomada se correlaciona consigo misma desplazada en ambas direcciones. (c) La función de correlación obtenida ahora tiene dos dimensiones y se grafica en función del desplazamiento entre las imágenes en el eje horizontal y vertical (el origen de coordenadas se encuentra en el centro de la imagen).

La función de correlación de RICS (Figura 2.3c) se grafica en función de ξ y ψ para todos los posibles corrimientos (hacia ambos lados en los dos ejes). Como es una función de autocorrelación (la imagen consigo misma), es simétrica respecto de cada eje. Su forma dependerá del coeficiente de difusión de las moléculas. Como se explicó anteriormente, hay dos escalas de tiempo asociadas a la correlación (una vertical más lenta y una horizontal más rápida), de modo que el tiempo de decaimiento de la función en cada eje puede ser diferente, de acuerdo al coeficiente de difusión. Por ejemplo, para moléculas que difunden con un $D = 100\mu\text{m}^2/\text{s}$, si la imagen es tomada con $10\mu\text{s}$ por píxel y 7ms entre líneas y se tiene un tamaño de píxel de 50nm , entonces habrá correlación positiva en el eje horizontal pero en cambio la función decaerá en un punto para el eje vertical ya que la resolución no es suficiente en esa escala. A medida que el D decrece, la función de RICS se vuelve más simétrica ya que ambas escalas temporales llegan a tener correlación [67].

2.2.2. Derivación de la función de autocorrelación para el caso difusional

En términos cuantitativos, la función de RICS se calcula como (2.7):

$$G_{RICS}(\xi, \psi) = \frac{\langle \delta F(x, y) \delta F(x + \xi, y + \psi) \rangle}{\langle F(x, y) \rangle^2} \quad (2.7)$$

donde $\delta F(x, y)$ es la variación de la señal de fluorescencia medida en la posición x, y y $\langle \dots \rangle$ representa el promedio espacial (sobre toda la imagen). La función de correlación espacial $G_{RICS}(\xi, \psi)$ puede escribirse como el producto de dos términos: uno que describe las fluctuaciones de la señal debidas al movimiento del haz de excitación (el barrido) y otro que describe las fluctuaciones debidas al movimiento de las moléculas. La función total puede escribirse como:

$$G_{RICS}(\xi, \psi) = S(\xi, \psi)G(\xi, \psi) + b \quad (2.8)$$

donde $S(\xi, \psi)$ es el término proveniente del barrido del haz, $G(\xi, \psi)$ describe la dinámica molecular y b es un factor que considera la señal de fondo. En el caso de moléculas que difunden isotrópamente, la expresión analítica que se obtiene para $G(\xi, \psi)$ es [57]:

$$G(\xi, \psi) = \frac{\gamma}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{4D(\tau_P \xi + \tau_L \psi)}{\omega_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D(\tau_P \xi + \tau_L \psi)}{\omega_z^2} \right)^{-1/2} \quad (2.9)$$

En la ecuación (2.9), D es el coeficiente de difusión, $\langle N \rangle$ el promedio del número de moléculas en la PSF, τ_P y τ_L el tiempo de píxel y de línea respectivamente, ω_0 la cintura del haz (medida cuando decae $1/e^2$) en el plano, ω_z la cintura del haz en el eje axial, y γ es un factor que depende del perfil de iluminación (0.35 para un perfil Gaussiano 3D y 0.076 para un perfil 2D Gaussiano-Lorentziano). Para el término de barrido, teniendo un tamaño de píxel δr , la función está dada por:

$$S(\xi, \psi) = \exp \left[\frac{\left(\frac{\xi \delta r}{\omega_0} \right)^2 (\xi^2 + \psi^2)}{1 + \frac{4D(\tau_P \xi + \tau_L \psi)}{\omega_z^2}} \right] \quad (2.10)$$

A partir del ajuste de G_{RICS} se puede obtener el coeficiente de difusión (promedio) de las moléculas en la región de la imagen tomada y el número de

moléculas en el volumen de observación, es decir, la concentración. Como todo método dentro de las espectroscopías de correlación, es importante contar con una calibración confiable de la PSF.

2.2.3. Cómo eliminar fuentes de ruido

Si bien toda la información de la función de correlación está contenida en una sola imagen, en la práctica, la función de RICS obtenida no tiene una relación señal/ruido lo suficientemente alta para lograr un ajuste confiable. Para aumentar esta relación conviene repetir M veces el experimento sobre la misma región y luego promediar todas las funciones de RICS obtenidas. Una forma de llevar esto a cabo es tomar una sucesión consecutiva de imágenes (generalmente entre 50 y 100 suelen ser suficientes [68]) y calcular la función de RICS para cada una de ellas. La función de autocorrelación final se obtiene del promedio de las M funciones de correlación. De esta forma, la función resultante es menos ruidosa y permite hacer un ajuste más confiable.

Otra dificultad muy habitual en experimentos con células vivas es la existencia de artefactos en la imagen que suman un movimiento lento. Esto puede ser, por ejemplo, el mismo movimiento de la célula, que al no estar fijada sobre el vidrio puede sufrir ciertos desplazamientos en el plano, o también vesículas u otros compuestos que atraviesan la imagen siguiendo una dinámica diferente a la dinámica de las moléculas que se quieren estudiar. Para eliminar estos movimientos, que se sumarían a la estadística y afectarían los resultados, existen diferentes métodos. El utilizado en este trabajo considera la fracción de “promedio móvil” (*moving average*). Esto consiste en calcular el promedio de intensidad de un cierto rango consecutivo de imágenes y sustraer ese resultado a la intensidad de la imagen que está en el medio del rango. Esto se hace sobre cada imagen salvo las primeras y las últimas. Por ejemplo, si se tomaron 100 imágenes y el promedio se calcula cada 10, entonces el promedio de intensidad de las imágenes 1-10 será restado de la imagen 5 y así hasta la 95, que será la última sobre la que se realiza la operación. Las imágenes 1 a 4 y 96 a 100 entonces no se tienen en cuenta para el cálculo de la función de RICS.

2.3. Función de correlación de pares de puntos (pCF)

2.3.1. Generalidades

La técnica de RICS descrita en la sección anterior consiste en calcular la correlación espacial de una imagen y obtener, para todas las moléculas de la imagen, un valor de los parámetros involucrados en el modelo dinámico con el que se ajusta la función de autocorrelación obtenida. Como fue explicado anteriormente, RICS promedia la información de todas las moléculas que se mueven dentro del área iluminada. Es importante entonces, para que este promedio sea válido, que el movimiento de las moléculas sea homogéneo en toda la región. En caso de que existan distintos tipos de movilidad, dados por interacciones específicas de las moléculas o por estructuras que se presenten como obstáculos en la difusión, es necesario un enfoque que permita determinar el transporte, lo cual requiere información espacial y temporal.

Para sortear esta dificultad el grupo de Gratton y colaboradores propuso la Función de Correlación de Pares de puntos (pCF por sus siglas en inglés), que permite determinar la movilidad molecular a partir del tiempo característico de la correlación de las fluctuaciones calculada entre dos regiones distantes (dos píxeles) de la muestra. La idea básica subyacente detrás del método de pCF es seguir estadísticamente la misma molécula difundiendo en el interior celular.

La figura 2.4 muestra esquemáticamente el principio de funcionamiento del método. El haz de excitación barre la muestra rápidamente (rápido en comparación con el movimiento de la molécula de interés) y se colecta la intensidad en varios puntos. A medida que las moléculas difunden, éstas aparecerán en diferentes regiones de la muestra. Si, al calcular la función de correlación entre un par de puntos distanciados una distancia, hay un retraso respecto del tiempo promedio esperado para moverse entre los dos puntos, podemos hacer inferencias sobre la existencia de barreras a la difusión entre estos dos puntos. Al repetir el cálculo en varios pares de ubicaciones adyacentes, podemos rastrear el contorno de la barrera, si esta existiera. Una consecuencia importante del método de pCF propuesto es que la difusión se mide a partir del tiempo promedio que las partículas (moléculas) tardan en viajar entre dos puntos.

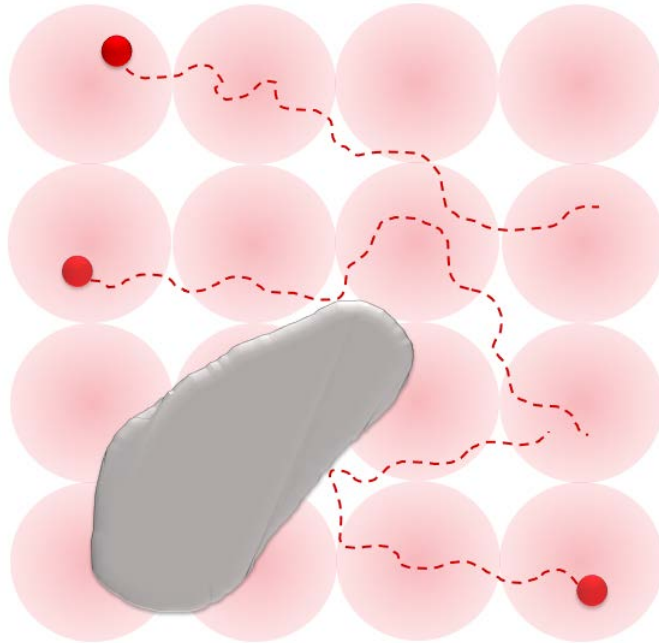


Figura 2.4: Esquema del funcionamiento de pCF. El haz del láser barre la muestra posicionándose en distintos puntos. Los círculos rojos rellenos representan las moléculas y sus trayectorias (línea punteada), mientras que un obstáculo a la difusión es representado en gris. El tiempo que las moléculas tardan en moverse de un punto a otro depende del coeficiente de difusión, D , y de la existencia o no de obstáculos (que deben ser bordeados para llegar de un punto a otro) o barreras impenetrables.

2.3.2. Función de correlación entre pares de puntos

El concepto de pCF fue introducido en 2009 [63] y está basado en el método de foco-dual [69]. El método, que originalmente es implementado haciendo barridos secuenciales sobre una misma línea ubicada en la región de interés [54, 55], consiste en calcular la función de correlación de las fluctuaciones temporales de intensidad entre dos regiones (dos píxeles) a lo largo de la línea y a distintos tiempos.

Si llamamos δr a la distancia entre ambos píxeles y τ a la diferencia de tiempo con que fueron adquiridos, la función de correlación de pares se define según [63] como (2.11):

$$pCF(\delta r, \tau) = \frac{\langle F(r, t)F(r + \delta r, t + \tau) \rangle}{\langle F(r, t)F(r + \delta r, t) \rangle} - 1 \quad (2.11)$$

donde nuevamente $\langle \dots \rangle$ representa el promedio temporal.

La implementación de pCF para un experimento donde se adquiere una secuencia de líneas es sencilla. Para cada píxel de la línea se calcula la correlación entre ese píxel y un píxel ubicado a una distancia δr de una línea posterior. Para calcular la función de correlación entre pares de puntos, primero hay que fijar una distancia entre píxeles δr . Por este motivo la función se denota como pCF(δr). Por ejemplo, si se tiene una línea de 128 píxeles y se selecciona la distancia $\delta r = 10$ píxeles, la función pCF(10) para el píxel 1 corresponde a la correlación temporal entre el píxel 1 y el 11 de cada línea subsiguiente, mientras que la pCF(10) del píxel 2 será entre el 2 y el 12, y así siguiendo. Luego, para cada píxel analizado se tiene una función de correlación pCF temporal. La pCF tendrá tantos puntos como cantidad de líneas se hayan adquirido en la serie temporal, y en el caso de nuestro ejemplo se calcula sólo para los píxeles 1 al 118, ya que para los siguientes píxeles no existe un punto a distancia 10.

Cuando los dos píxeles están suficientemente separados, el máximo de la función de correlación ya no corresponderá al cero de desfase temporal como ocurría en FCS en un punto o RICS ya que no es una autocorrelación. La función pCF tiene su máximo en el tiempo promedio que una molécula tarda en moverse la distancia δr . Esta característica única de pCF permite detectar barreras u obstáculos a la difusión molecular los cuales aparecerán como un retraso del tiempo de máxima correlación.

En la Figura 2.5 se muestran las curvas de pCF(10) para una simulación numérica donde la correlación se calculó entre dos posiciones separadas 10 píxeles para el caso hipotético de moléculas difundiéndose libremente con coeficientes de difusión $D = 0.2$, $D = 1$ y $D = 10 \mu m^2/s$. La amplitud de la pCF para cada tiempo, cuyo paso es el tiempo entre líneas, depende de la cantidad de moléculas que se movieron del primer píxel al segundo en ese determinado tiempo. El máximo de la pCF se encuentra para el tiempo medio que las moléculas tardan en difundir entre un punto y el otro. Para las moléculas que difunden más rápido ($D = 10 \mu m^2/s$) el máximo se encuentra a un tiempo más corto ya que las moléculas tardan menos tiempo en moverse entre esas dos regiones (en este ejemplo separadas una distancia de 10 píxeles). A medida que las moléculas se mueven más lentamente (D más chico), este máximo estará

desplazado hacia tiempos más largos y su amplitud será menor ya que muchas de las moléculas que se encontraban en el primer píxel habrán difundido en otras direcciones habiendo transcurrido ese tiempo.

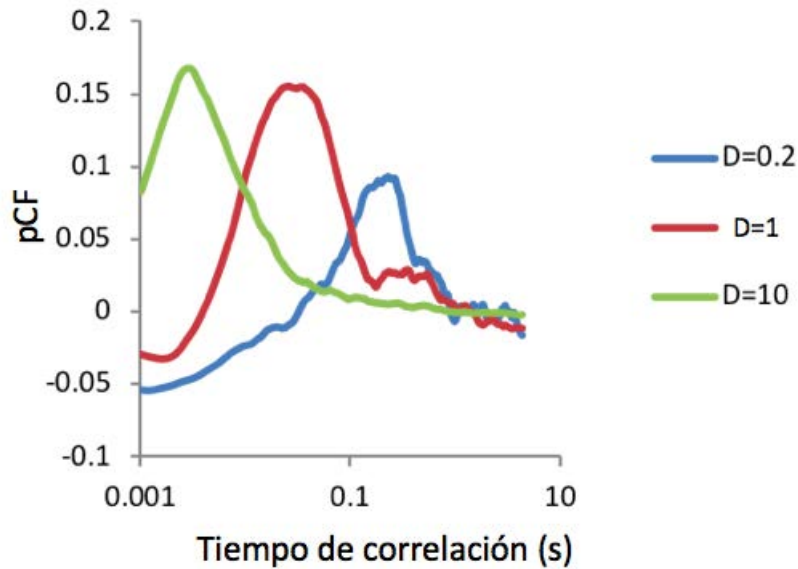


Figura 2.5: Simulación de la función de correlación de pares (pCF) sobre una línea para distintos valores de D . A mayor D , el tiempo de máxima correlación entre el mismo par de puntos disminuye ya que las moléculas llegan más rápido del primer punto al segundo. Figura extraída de [63].

Como se mencionó anteriormente, calcular la correlación temporal entre dos regiones distantes de una muestra permite detectar la presencia de obstáculos y barreras para la difusión. Por ejemplo, si hubiera dos puntos que se encuentran a los dos lados de un obstáculo, es de esperar que el máximo de la función de correlación aparezca retrasado respecto del valor obtenido por simple difusión. Más aún, en caso de tratarse de una barrera impenetrable, no habrá correlación entre los puntos a cada lado de la barrera para ningún tiempo. En los últimos años, varios trabajos han usado este principio para estudiar la conectividad entre diferentes compartimentos celulares [54, 59, 70].

2.3.3. Análisis pCF en imágenes

El análisis de pCF sobre una línea permite ver el transporte molecular únicamente en la dirección en la que está trazada la línea. Si realizamos múltiples líneas en varias direcciones y repetimos el mismo análisis, entonces podemos rastrear el contorno de una barrera, si esta existiera. La forma más rápida de barrer múltiples líneas es tomando una imagen.

En la versión bidimensional de esta técnica, que fue recientemente desarrollada [58], en vez de barrer sobre una línea, se adquieren imágenes. En este caso, se calcula la correlación entre dos píxeles en distintas imágenes de una serie temporal. Para cada píxel, la pCF se calcula para una determinada distancia, como en el caso anterior, pero además en varias direcciones o ángulos. La cantidad de ángulos depende de la distancia elegida. Por ejemplo para una distancia de 8 píxeles, cada punto de la imagen tiene 32 puntos a su alrededor que están a esa distancia. A partir de la pCF calculada en todas las direcciones se puede obtener una distribución angular para cada píxel. Una simulación de este cálculo se presenta en la Figura 2.6. Cada recuadro representa el resultado del cálculo de la 2D-pCF para una partícula que se mueve bajo determinados límites, lo cual se encuentra representado debajo de la 2D-pCF.

Una vez obtenida la distribución 2D-pCF para cada punto de la imagen, se calculan ciertos parámetros de interés a partir de los momentos centrales de la distribución. Para una imagen con distribución de intensidad $I(x, y)$, donde x, y representan la posición de cada píxel, los momentos de la distribución de intensidad se calculan como:

$$M_{i,j} = \frac{\sum_x \sum_y x^i y^j I(x, y)}{\sum_x \sum_y I(x, y)} \quad (2.12)$$

donde $M_{i,j}$ es el momento (no central) cuyo orden está dado por i, j . El momento no central de primer orden, por ejemplo, es el valor medio de la distribución. Para obtener información sobre la “forma” de la distribución, es necesario definir los momentos centrales:

$$\mu_{p,q} = \sum_x \sum_y (x - \bar{x})^p (y - \bar{y})^q I(x, y) \quad (2.13)$$

donde \bar{x} y \bar{y} indican la posición del centro de masa de la distribución. A partir de la ecuación (2.13) se pueden calcular los momentos centrales de se-

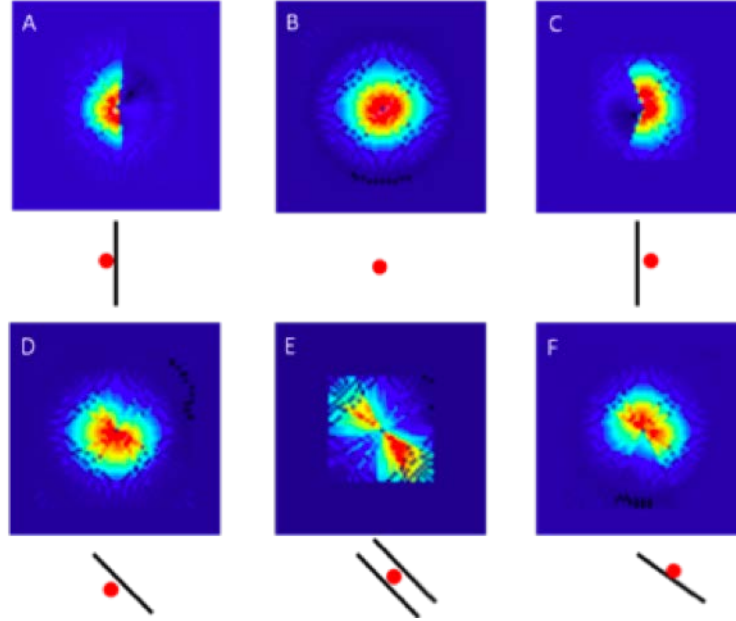


Figura 2.6: Simulación de la función de correlación de pares en 2D para distintos tipos de movimiento molecular. (A) Una partícula difundiéndose a la izquierda de una pared. (B) Una partícula difundiéndose libremente. (C) Una partícula difundiéndose a la derecha de una pared. (D) Una partícula difundiéndose debajo y a la izquierda de una pared. (E) Una partícula difundiéndose en un canal. (F) Una partícula partícula difundiéndose por encima y a la derecha de una pared. Los paneles (A) y (C) muestran que la 2D-pCF depende de la distancia de la partícula al obstáculo, siendo en este caso el obstáculo representado por la pared. Figura extraída de la referencia [58].

gundo orden, que brindan información sobre la orientación. Se define la matriz de covarianza según (2.14):

$$\text{cov}[I(x, y)] = \begin{bmatrix} \mu_{20} & \mu_{11} \\ \mu_{11} & \mu_{02} \end{bmatrix} \quad (2.14)$$

Los autovalores y autovectores de esta matriz indican los ejes principales de la distribución $I(x, y)$, de modo que la orientación se puede extraer a partir del ángulo del eje mayor respecto al origen de coordenadas. Este ángulo se puede calcular según la expresión (2.15):

$$\theta = \frac{1}{2} \arctan \left(\frac{2\mu_{11}}{\mu_{20} - \mu_{02}} \right) \quad (2.15)$$

Por otro lado, los autovalores de la matriz de covarianza dan una idea del largo de los autovectores, es decir, de la forma de la distribución. Estos se definen según:

$$\lambda_{1,2} = \frac{\mu_{20} + \mu_{02}}{2} \pm \frac{\sqrt{4\mu_{11}^2 + (\mu_{20} - \mu_{02})^2}}{2} \quad (2.16)$$

Una vez conocidos los autovalores, si λ_1 es el autovalor más grande y λ_2 el más chico, un parámetro de interés para conocer el movimiento de las moléculas es la Anisotropía, que se define según la ecuación (2.17):

$$Anisotropia = \frac{\lambda_1 - \lambda_2}{\lambda_1 + \lambda_2} \quad (2.17)$$

Este parámetro indica cuán asimétrica es la distribución de 2D-pCF en la dirección dada por el ángulo θ , por lo tanto permite obtener el camino promedio seguido por las moléculas en cada punto de la imagen. En los ejemplos de la Figura 2.6, el parámetro de Anisotropía sería igual a cero para el caso (B) ya que no habría un autovalor más grande que otro porque la distribución es isotrópica. En el caso del panel (E) en cambio, existe con claridad una dirección privilegiada de movimiento ya que la partícula sólo difunde dentro del canal. Es importante notar que el parámetro de Anisotropía permite conocer la dirección del movimiento pero no así el sentido.

La principal ventaja de esta técnica reside en la posibilidad de obtener un mapa de flujo molecular con información proveniente de moléculas individuales y con una resolución que, no sólo no está limitada por el tamaño de la imagen como es el caso de RICS, sino que además es sub-difraccional ya que está dada por el tamaño del píxel.

2.4. Comentarios finales

La Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia tiene enormes ventajas para estudiar dinámica intracelular y es por eso que en las últimas décadas ha sido una de las técnicas más empleadas en el campo de la biofísica y la biología celular. Esta amplia familia de técnicas permite extraer información

cuantitativa de conjuntos de moléculas o partículas, aún cuando las mismas no se puedan resolver individualmente en un microscopio de fluorescencia.

Algunas de estas técnicas consisten en correlacionar imágenes de forma espacial o espacio-temporal. RICS, por un lado, ya tiene una trayectoria considerable y sus aplicaciones han sido ampliamente exploradas sobre distintos sistemas biológicos. Por su parte, 2D-pCF es una poderosa técnica recientemente introducida que ha demostrado su potencialidad para visualizar la difusión molecular de una forma completamente novedosa. La toma de datos para ambas técnicas es la misma, ya que sólo consiste en tomar una serie temporal de imágenes. Lo que cambia para cada una de ellas es el análisis que se hace sobre las imágenes.

En esta tesis se exploran estas dos técnicas para estudiar la movilidad de la proteína cápside del virus Dengue y de Zika, revelando nueva información sobre los mecanismos que gobiernan la dinámica de esta proteína.

Capítulo 3

Seguimiento de partículas individuales por barrido orbital

En el entorno intracelular ocurren continuamente numerosos procesos dinámicos, desde la escala molecular hasta el movimiento de grandes compartimentos. Cuando el sistema que se desea estudiar consiste en partículas aisladas (a distancias que superen el límite de difracción) y la marcación fluorescente permite resolver su posición con alta precisión, entonces es posible estudiar el movimiento siguiendo a las partículas individualmente. Si bien la técnica de SPT más utilizada consiste en barrer continuamente la muestra para tomar imágenes, en este trabajo se utilizó un método alternativo que ha demostrado una numerosas ventajas respecto a las demás.

En este capítulo se describe el método de seguimiento de partículas individuales en tres dimensiones por barrido orbital, su principio de funcionamiento y su modo de empleo.

3.1. Generalidades

El método de seguimiento de partículas individuales tiene como objetivo medir la posición de una única partícula en función del tiempo. Al analizar la trayectoria realizada por la partícula, pueden extraerse diversos parámetros biofísicos de interés acerca del sistema. Por ejemplo, estudiando el movimiento de proteínas y lípidos en las células se puede extraer información sobre la dinámica de membrana [71, 72], o se puede estudiar la dinámica de distintos

compuestos dentro de células vivas [33–38, 73]. Por permitir estudiar la cinemática de partículas individuales en vez de un conjunto de partículas, en los últimos años este método ha despertado gran interés para aplicaciones en el campo de la biofísica y la biología celular.

El método más comúnmente utilizado consiste en tomar una secuencia temporal de imágenes con un microscopio de barrido mientras las partículas están en movimiento. Cada partícula emite una señal, que si es lo suficientemente alta permite que se la pueda localizar en la imagen. De cada imagen de la serie temporal, entonces, se extrae la posición en dos dimensiones de la partícula y para reconstruir la trayectoria basta con unir los puntos tomados de todas las imágenes. Esto significa que la trayectoria no se visualiza durante la medición sino que es construida luego de un análisis de imágenes efectuado a posteriori.

Incluso si el tamaño de las partículas está por debajo del límite de difracción, si están lo suficientemente aisladas puede distinguirse a cada una como un punto brillante y por lo tanto se puede extraer su posición con una resolución aún mejor [74, 75]. El error en la estimación de la posición de la partícula fue estudiado teóricamente por Thompson y colaboradores [76], quienes derivaron la siguiente expresión para las diferentes fuentes de ruido:

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{s^2}{N} + \frac{a^2}{12N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2} \quad (3.1)$$

donde Δx es el error en la posición de la partícula, s es la desviación estándar de la PSF, a es el tamaño de píxel de la imagen, N es el número de fotones colectados y b es el ruido de fondo. Esta expresión contiene esencialmente tres términos: el primero es debido a la fluctuación en el número de fotones colectados en cada intervalo temporal, el segundo proviene de la incerteza en el tamaño del píxel, y el último es el ruido de fondo producido por fotones provenientes de otras fuentes, como puede ser el ruido del detector o fotones del ambiente que no llegan a filtrarse.

Las técnicas basadas en la adquisición secuencial de imágenes permiten estudiar sólo el movimiento en el plano de la imagen. Esto significa que su uso está limitado a movimientos en un plano, como por ejemplo dinámica de membrana [77–79]. Otros métodos utilizan cámaras en distintos planos en z [80, 81], pero estos métodos suelen tener una resolución temporal en el rango de los segundos y, por lo tanto, pueden ser aplicados únicamente a partículas con dinámica lenta. Por otra parte, el fotoblanqueo y el fotodaño que producen

sobre la muestra regiones extensas de iluminación limitan su uso en aplicaciones biológicas. Una técnica alternativa, que presenta ventajas en cuanto a velocidad y precisión sobre la posición de la partícula, y a la vez permite tanto el movimiento en 2D como en 3D, es la técnica de barrido orbital, presentada a continuación.

3.2. Método de barrido orbital en 3 dimensiones

3.2.1. Principio de funcionamiento

La técnica de barrido orbital para el seguimiento de partículas fue estudiada teóricamente por Enderlein en el año 2000 [82, 83] y luego desarrollada y aplicada por Kis-Petikova y Gratton en 2004 [84]. Originalmente aplicada al monitoreo de la dinámica de microesferas fluorescentes en solución, este método fue rápidamente extendido al estudio de procesos dinámicos dentro de una célula. En un comienzo este método servía para seguimiento en dos dimensiones, pero unos años más adelante fue extendida a tres dimensiones [85, 86].

La idea subyacente detrás del método de seguimiento por barrido orbital es que cuando se realiza una órbita circular con el haz de excitación alrededor de la partícula, la radiación emitida producto de la interacción de la luz con el objeto permite obtener información sobre la posición, forma y propiedades espectroscópicas de la partícula. Durante el barrido orbital se mide la intensidad colectada en cada punto a lo largo de la órbita. Luego se calcula la transformada de Fourier (FFT) en los puntos medidos, de donde se extraen los parámetros que describen la intensidad medida. A partir de estos datos, se obtiene información de la distancia de la superficie del objeto al centro de la órbita y la posición angular del objeto respecto de la órbita. La Figura 3.1 muestra un esquema del tamaño de la PSF (círculo sombreado de coordenadas $[A, \theta]$) en comparación con el tamaño de la órbita (línea punteada) y de la partícula (ubicada en las coordenadas $[r, \varphi]$). La elección de los parámetros para hacer el seguimiento (radio de la órbita, período, cantidad de puntos de medición a lo largo de la órbita, cantidad de órbitas en un ciclo, etc) cumplen un rol central para asegurar la efectividad del método y, por lo tanto, es importante que se elijan correctamente. Los cambios en la intensidad a lo largo de la órbita son más pronunciados cuando la PSF tiene la pendiente máxima, esto es, cuando

el radio de la órbita en el plano focal corresponde a $0,5 \omega_0$. En este caso, la precisión en la posición de una partícula centrada en la órbita es máxima. En la práctica, si la partícula está en movimiento, puede ser conveniente utilizar un radio levemente mayor. En el caso del eje axial, el radio óptimo corresponde a $1,8 \omega_0$.

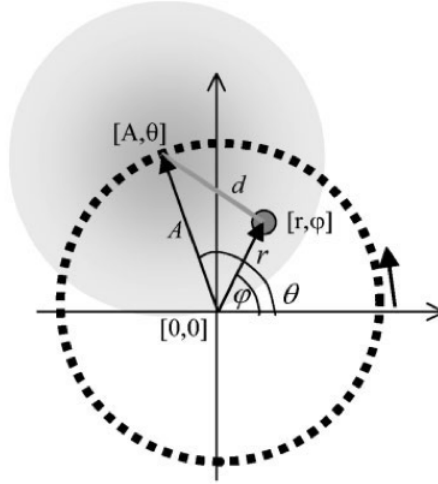


Figura 3.1: Diagrama del recorrido que realiza la PSF (círculo sombreado ubicado en $[A, \theta]$) para una órbita de radio A que se grafica en línea punteada. La partícula está en la posición $[r, \varphi]$ y la flecha marca el inicio del barrido. Figura extraída de la referencia [84].

En términos cuantitativos, Kis-Petikova y Gratton [84] demostraron que la intensidad de fluorescencia medida al realizar un barrido circular alrededor de una partícula brillante puede escribirse como:

$$F(d) = F_0 \exp\left(-\frac{4d^2}{\omega_0^2}\right) \quad (3.2)$$

donde $d^2 = (x - x_s)^2 + (y - y_s)^2$ es la distancia de la posición de la partícula (x, y) a la posición del haz del láser x_s, y_s que hace el recorrido orbital. x_s, y_s son funciones que dependen del tiempo y describen un círculo. Si la órbita tiene un radio A y se realiza a una frecuencia angular ω , la posición del haz se puede escribir según la ecuación (3.3):

$$\begin{aligned}x_s &= A \cos(\omega t) \\y_s &= A \sin(\omega t)\end{aligned}\tag{3.3}$$

Expresando la posición de la partícula en coordenadas (r, φ) , donde r se mide respecto del centro de la órbita y φ denota la posición angular de la partícula, la intensidad de fluorescencia medida en función del tiempo es:

$$F(t) = F_0 \exp\left(-\frac{4}{\omega_0^2}(A^2 + r_0^2 - 2Ar \cos(\omega t - \varphi))\right)\tag{3.4}$$

donde ω_0 es el tamaño de la cintura del haz enfocado. La intensidad medida a lo largo de la órbita puede ser descrita por una serie de Fourier según la ecuación (3.5):

$$F(\theta, r) = \frac{a_0(r)}{2} + \sum_{k=0}^n (a_k(r) \cos(k\theta) + b_k(r) \sin(k\theta))\tag{3.5}$$

Para conocer la posición radial y angular de la partícula respecto de la órbita, alcanza con conocer los coeficientes de orden cero y primer orden de esta serie [87]. La forma más rápida de calcularlas es aplicando la transformada rápida de Fourier (FFT) a la intensidad medida. El tiempo que requiere conocer la posición de la partícula en cada ciclo es la suma del periodo del barrido circular y el cálculo de la FFT. La posición angular de la partícula se calcula como $\varphi = \arctan(b_1/a_1)$, mientras que la distancia r al centro de la órbita se obtiene a partir de un la modulación de la señal, definida según (3.6):

$$MOD = \frac{\sqrt{a_1^2 + b_1^2}}{a_0}\tag{3.6}$$

De este modo, la intensidad y la modulación de la señal colectada en cada órbita permiten definir la posición donde se encuentra la partícula. En la Figura 3.2 se representa esquemáticamente el funcionamiento del método. Si el objeto está centrado respecto del centro de la órbita, la intensidad medida a lo largo de la órbita debe ser constante (curva azul). Si, en cambio, el objeto no está centrado respecto de la órbita, la intensidad detectada estará modulada por la distancia del objeto a la órbita (curva verde), alcanzando un máximo de intensidad en la posición en la que la posición radial de la partícula es igual al radio de la órbita (curva roja). Si la partícula cruza el límite de la órbita, la

intensidad disminuye mientras que la modulación aumenta de forma asintótica (curva amarilla). Una vez determinada la posición de la partícula con respecto a la órbita, movemos la posición macroscópica de la órbita de manera de mantenerla siempre centrada con la posición de la partícula, y un nuevo ciclo de medición comienza. De este modo, utilizando la posición del centro la órbita a lo largo del experimento podemos reconstruir la trayectoria de la partícula en dos dimensiones.

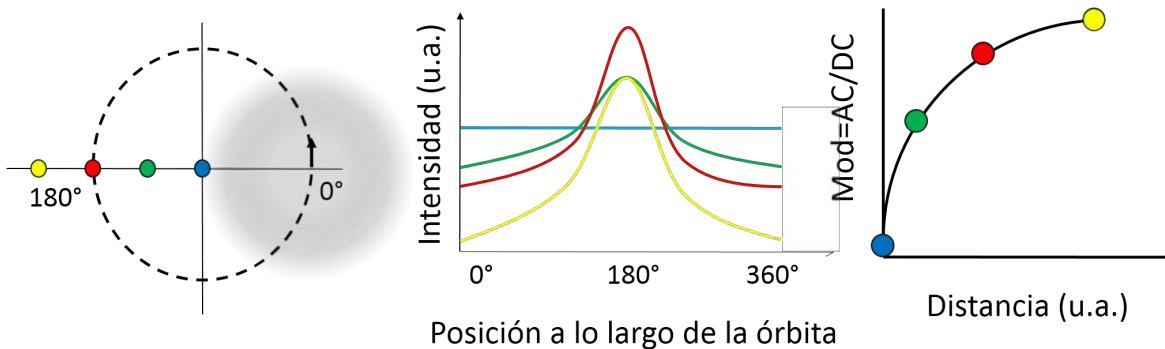


Figura 3.2: Izquierda: El haz del láser (gris) barre una órbita circular alrededor de la partícula (en azul se representa una partícula centrada respecto de la órbita). Medio: El perfil de intensidad dependerá de la distancia de la partícula al centro de la órbita. Derecha: La modulación obtenida a partir del perfil de intensidad aumenta cuanto más alejada se encuentra la partícula respecto del centro de la órbita.

Luego de analizar la intensidad y la modulación, se determina la posición de la partícula respecto de la órbita y se define el centro de la siguiente órbita en esa posición. Este método permite tener una referencia (o *feedback*) lo suficientemente rápido para mover el láser hacia una nueva posición de modo de seguir a la partícula y que la misma se halle siempre dentro de la órbita dibujada por el haz. Si el sistema detecta que la órbita ya no se encuentra alrededor de la partícula, como es el caso de la curva amarilla en la Figura 3.2, la primera corrección que hace es aumentar el radio orbital en búsqueda de la partícula, hasta que vuelva a medir una intensidad que indique que se ha encontrado a la partícula. En caso de encontrarla, el sistema redefine la posición de la órbita y el radio retorna a su amplitud original. En caso de que

esto no funcione, porque la partícula se haya desplazado una distancia aún mayor, se detiene el experimento y se inicia la secuencia de seguimiento desde el comienzo.

Para extender la técnica de dos a tres dimensiones es necesario obtener información sobre la posición en z del objeto. Para ello, una vez que el objeto a estudiar se encuentra en la posición del foco, se realiza una órbita en un plano xy por encima de la partícula y otra órbita en un plano por debajo de la partícula, como se muestra en la Figura 3.3. Si las intensidades medias medidas en cada plano son I_1 y I_2 , de la relación $(I_1 - I_2)/(I_1 + I_2)$ se puede determinar la posición del objeto en el eje z y volver a centrar las órbitas respecto de esa posición. En otras palabras, si la intensidad detectada en la órbita de arriba es mayor a la intensidad detectada en la órbita de abajo, eso significa que el objeto no está centrado respecto de estas dos órbitas, sino que está por encima de la posición central. Para centrarlo hay que redefinir la nueva posición de las órbitas a partir de la diferencia en la intensidad detectada por cada una. El mecanismo es análogo al seguimiento en 2D: se determina la posición de la partícula y se vuelve a centrar la posición de las órbitas.

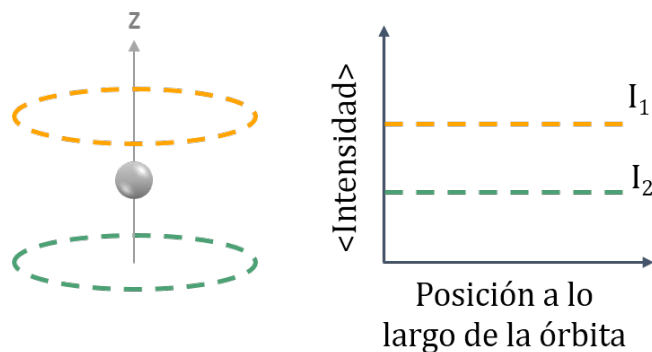


Figura 3.3: Esquema del método de seguimiento de partículas en 3 dimensiones.

En la práctica resulta conveniente realizar más de una órbita por encima y por debajo para tener una mejor determinación de la posición de la partícula. En general se realiza un ciclo de n órbitas por encima y n órbitas por debajo, y suele resultar suficiente tomar $n = 4$, pero este número puede variar para cada experimento según la dinámica del sistema a estudiar. Debido a la diferencia en el tamaño de la PSF en la dirección z con respecto al tamaño en xy , la

incerteza en la posición vertical es mayor a la que se obtiene en el plano.

3.2.2. Modo de empleo

En la Figura 3.4 se presenta un diagrama de bloques que describe el funcionamiento básico del algoritmo para la rutina de seguimiento de partículas, que puede resumirse en los siguientes pasos:

1. Se toma una imagen por barrido común (es decir, de izquierda a derecha y de arriba a abajo) para definir los parámetros básicos de la adquisición (tamaño de la imagen, tiempo de integración por píxel, potencia incidente) y ubicar el objeto. Para ello, se realiza un barrido de $n \times n$ píxeles, donde n suele ser una potencia de 2. En general se toman imágenes de 256×256 o 128×128 píxeles.
2. Una vez ubicado el objeto que se desea seguir y definido el nivel de aumento que se va a utilizar (teniendo en cuenta no sólo el tamaño sino también el rango típico de movimiento del objeto), se configuran los parámetros involucrados en la medición:
 - **Radio:** El radio de la órbita se expresa en píxeles, que tienen las dimensiones definidas por el zoom. Gratton y colaboradores [85] estudiaron que para obtener la mejor relación señal/ruido el radio de la órbita debía ser aproximadamente $\omega_0/2$.
 - **Puntos por órbita:** Se eligen 2^n puntos por órbita para agilizar los cálculos del algoritmo de feedback, ya que el mismo realiza una FFT de la intensidad medida.
 - **Período:** El período se obtiene multiplicando la cantidad de puntos o píxeles de la órbita por el tiempo por píxel. Períodos más largos significa más tiempo por píxel, es decir más fotones colectados por punto. Asimismo, períodos más cortos implican menor intensidad colectada por órbita. Teniendo esto en cuenta, para definir el período hay que considerar la eficiencia cuántica de fluorescencia de la sonda (cuántos fotones emite y cuál es la tasa de fotoblanqueo) y la velocidad media de la partícula. El período orbital no debe ser más lento que el tiempo de residencia de la partícula en un punto,

pero por otro lado si se hacen órbitas demasiado rápidas se miden muchos puntos innecesarios.

- **Distancia axial:** Cuando se trabaja en 3D, la distancia axial, expresada en píxeles, define la distancia entre la órbita superior y la inferior. Para estimar un valor razonable para este parámetro, se realizaron mediciones de trayectorias variando la distancia axial para un radio determinado y se tomó como criterio usar una distancia igual a cinco veces el radio.
- **Cantidad de períodos:** Una forma de mejorar la relación señal/ruido es realizar más de una órbita consecutiva en cada punto y hacer un promedio. Esto se define como un ciclo, y se debe considerar que el tiempo de cada punto de la trayectoria es el tiempo del ciclo. Para este trabajo, fue suficiente con promediar la señal de 4 órbitas para tener una buena estimación de la posición de la partícula.
- **Cantidad de ciclos:** Es el largo del experimento total si no se detiene antes. El programa SimFCS permite un máximo de 50000 ciclos, que para los parámetros típicos utilizados en los experimentos equivale a más de 40 minutos de medición. En general los experimentos de este trabajo finalizaron antes de llegar a esta duración.
- **Umbral de intensidad:** Este parámetro se usa para que el algoritmo pueda distinguir cuándo la señal que está midiendo es producida por una partícula y cuándo está midiendo fondo. Esto sirve para saber cuándo ampliar el radio de búsqueda en caso de haber perdido la partícula. Para definir este valor, se mide la intensidad del entorno donde se encuentra la partícula orbitando sobre un punto fijo, y se toma un promedio entre ese valor y la intensidad media sobre la partícula de interés.

Generalmente, una primera medición a modo de prueba permite seleccionar los parámetros óptimos para cada sistema.

3. Se inicia la rutina de seguimiento seleccionando en forma manual el punto inicial, que debe corresponder a la posición donde se observa la partícula. Es importante para esto que no transcurra mucho tiempo entre la

adquisición de la imagen y el inicio del seguimiento. La órbita recibe la orden de moverse según el algoritmo de feedback explicado en la sección anterior. Cuando la intensidad medida es menor que el valor umbral, el programa entiende que ha “perdido” a la partícula y entonces aumenta el radio (este parámetro llamado “radio de búsqueda” también se configura al comienzo) hasta volver a medir una intensidad mayor que el umbral. En caso de que la partícula se hubiera perdido completamente, es necesario volver a comenzar desde el primer paso.

Para finalizar la medición, se detiene la rutina y se toma una nueva imagen de la muestra para verificar que la partícula seguida se encuentre en el mismo lugar donde se encuentra la órbita, como una forma adicional de verificar que la haya seguido correctamente. Además, el parámetro descrito como Modulación es un indicador de cuán bien la órbita estuvo centrada sobre la partícula por lo cual siempre se tiene en cuenta al momento de considerar la medición como exitosa.

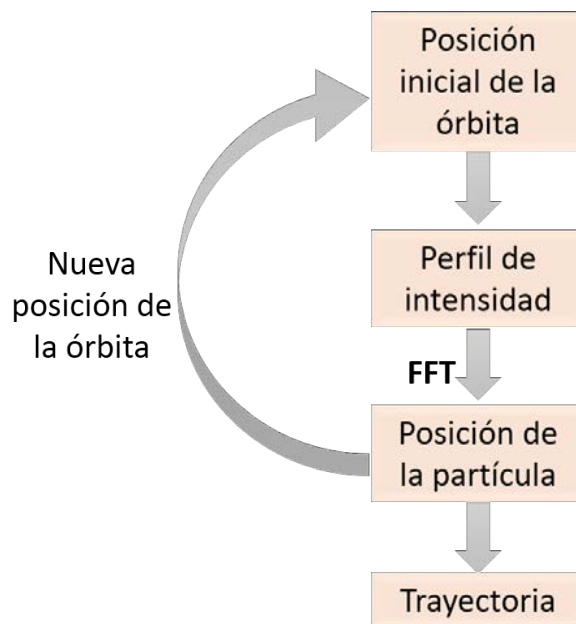


Figura 3.4: Diagrama de bloques descriptivo del algoritmo en un experimento de seguimiento de partículas.

3.3. Comentarios finales

El seguimiento de partículas individuales es ampliamente utilizado en el estudio de la dinámica en células vivas ya que permite conocer la posición de una partícula en el entorno celular durante un intervalo de tiempo con cierta precisión temporal y espacial. Los métodos más comúnmente utilizados consisten en localizar partículas en una imagen y tomar una serie de imágenes, de las cuales a posteriori se extrae la posición de cada partícula y se construyen las trayectorias.

Un enfoque completamente diferente es el método de seguimiento de partículas individuales por barrido orbital introducido en este capítulo. Luego de barrer una órbita alrededor de la partícula, se obtiene la posición de la misma por medio de la FFT de la señal colectada, de modo que la resolución temporal está dada por el tiempo que lleva barrer una órbita y calcular la FFT, del orden de los milisegundos. Esto presenta una gran ventaja respecto de los métodos convencionales ya que el barrido para tomar una imagen puede ser de cientos de milisegundos a un par segundos. Por su parte, la resolución espacial que se obtiene con este método está dada principalmente por la precisión con que se conoce la posición del centro de la PSF que depende inversamente del número de fotones detectados.

Este método además tiene la particularidad de permitir una visualización de la trayectoria de la partícula en el momento de la medición, en vez de ser a posteriori. Por otro lado, ya que el haz del láser está continuamente realizando el barrido orbital, no se pueden tomar imágenes de la partícula y su entorno durante el experimento.

Las aplicaciones de esta técnica son variadas y dependen de las características dinámicas de cada sistema, además de la marcación. Una proteína con un coeficiente de difusión de $3\text{-}5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ en el citoplasma puede ser eficientemente seguida realizando órbitas de 2 ms si la cantidad de fotones emitida en ese tiempo es suficiente para detectarla.

En esta tesis se aplicó la técnica de seguimiento por barrido orbital en tres dimensiones en un microscopio por absorción de dos fotones. Esto presenta además la ventaja de estudiar procesos celulares minimizando el fotodaño sobre la muestra, con buena relación señal/ruido y mayor penetración que la permitida con otras microscopías. En el Capítulo 4 se describe el microscopio por absorción de dos fotones que fue adaptado para poder realizar experimen-

CAPÍTULO 3. SEGUIMIENTO DE PARTÍCULAS INDIVIDUALES

tos de SPT por barrido orbital y en el Capítulo 6 se muestra la aplicación de esta técnica al estudio del tráfico vesicular en células neuroendocrinas.

Capítulo 4

Desarrollo de un microscopio multifotónico por barrido orbital

Para la puesta en funcionamiento del método de seguimiento de partículas individuales por barrido orbital, es necesario contar con un microscopio de barrido que permita hacer movimientos circulares (órbitas) del haz de excitación en tres dimensiones. Los microscopios hasta ahora utilizados como plataformas experimentales para estas aplicaciones son variaciones de microscopios confocales o por absorción de dos fotones a los que se los ha adaptado para permitirles barrer el haz de excitación de manera circular.

La excitación por absorción de dos fotones infrarrojos tiene principalmente dos ventajas respecto de la excitación por un fotón visible. Por un lado, la distancia de penetración en tejidos es mayor para longitudes de onda en el IR con respecto al rango visible del espectro. Por el otro, dado que la absorción simultánea de dos fotones se trata de un fenómeno no lineal, el volumen donde las moléculas son excitadas es considerablemente más pequeño que el volumen obtenido para un fotón, no siendo necesaria la utilización de aberturas para restringir el volumen de colección de la luz emitida.

Al momento de iniciar este trabajo de tesis, el laboratorio contaba con un primer prototipo a nivel básico de un microscopio por absorción de dos fotones realizado durante mi tesis de licenciatura [88]. En este capítulo se describe el diseño, armado y puesta en funcionamiento de un microscopio por absorción de dos fotones con barrido arbitrario del haz de excitación para implementar la técnica de SPT por barrido orbital propuesta. Se describe el arreglo expe-

rimental, así como las caracterizaciones y calibraciones de las distintas partes que lo componen.

4.1. Descripción general

A partir de un microscopio óptico Olympus IX71 con el que se contaba en el laboratorio, se construyó un microscopio multifotónico con ciertas particularidades que lo hacen apto para la aplicación de distintas técnicas.

En la Figura 4.1a se muestra un esquema de la configuración experimental del microscopio. En líneas generales, el sistema de excitación cuenta con dos láseres pulsados que son dirigidos hacia la entrada del microscopio de forma alternada. Uno de ellos es un Ti:Zafiro sintonizable entre 760 nm y 840 nm que provee pulsos ultracortos de 50 fs (KMLabs) bombeado por un láser Verdi continuo de 5W (Coherent). El otro laser de excitación es un láser de fibra que emite pulsos de 86 fs a 777 nm (Calmar). La potencia media de ambos láseres oscilan alrededor de los 250 mW, por lo que se agregó un polarizador (P) y un obturador (O) para regular la potencia a un rango de valores adecuado o incluso bloquear el haz de excitación de acuerdo al experimento específico. El haz se refleja en dos espejos (E1 y E2) y es dirigido por los mismos hacia los espejos galvanométricos (EG xy) (General Scanning VM500) que realizan el barrido. Luego de atravesar un espejo dicróico (D) (Chroma Technology 680DCSPXR) que refleja longitudes de onda mayores a 680 nm y transmite por debajo de ese umbral, el haz entra en una lente objetivo, que se selecciona de acuerdo a cada experimento. La lente objetivo enfoca el haz sobre la muestra y colecta la fluorescencia emitida por la misma. Debajo de esta lente, para controlar el movimiento en el eje transversal a la mesa óptica, se colocan alternativamente dos sistemas. Uno de ellos es un posicionador piezoeléctrico (PZT) (Phisik Instrumente, PIFOCP- 721) conectado a una fuente (Thorlabs, MDT694A). El otro sistema consiste en una lente eléctricamente sintonizable (LE) (Optotune, EL-30-10 VIS-LD). Una vez que la fluorescencia es transmitida por el espejo dicróico (D), esta atraviesa un filtro BG39 que elimina cualquier residuo que pueda haber quedado del haz de excitación. Finalmente, la señal entra en el sistema de detección que cuenta con dos canales, separados por un divisor de haz (DH). En la posición del divisor se pueden colocar distintos componentes ópticos, ya sea para separar la emisión en dos colores, en polarización o intensi-

dad. La detección se realiza con dos fotomultiplicadores o PMT (Hamamatsu, H7422 P-40), cada uno conectado a un amplificador (Becker Hickl, ACA-4-35N) y un discriminador de pulsos (Phillips Scientific, 6915) que deja pasar pulsos con ancho por encima de 9 ns y altura por encima de 1,5 V. Se puede ver una fotografía del microscopio y de los detectores en las Figuras 4.2 y 4.3.

Tanto el movimiento de los espejos galvanométricos como el del piezoeléctrico y la lente eléctrica son controlados por una tarjeta DAQ (Iotech, 3001 PCI) conectada a una computadora. Tres salidas analógicas de la placa controlan el barrido en sus tres dimensiones, mientras que dos entradas digitales están conectadas a los discriminadores y reciben la señal detectada. Para controlar la placa se utiliza el software comercial *SimFCS* (Universidad de California, Irvine) alternadamente con algoritmos escritos en Python.

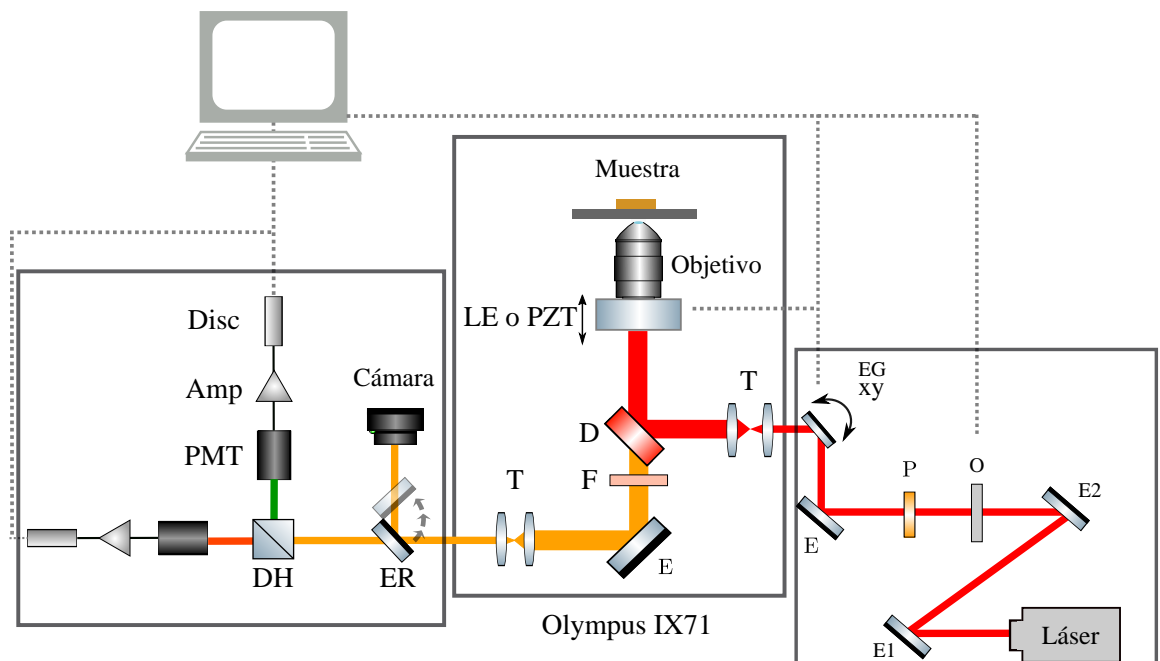


Figura 4.1: Esquema experimental del microscopio. O: Obturador, P: polarizador, D: dichroico, E: espejo, EG xy: espejos galvanométricos, ER: espejo rebatible, F: filtro BG 39, DH: divisor de haz, T: telescopio, LE: lente eléctrica, PZT: posicionador piezoeléctrico, PMT: tubo fotomultiplicador, Amp: amplificador, Disc: discriminador.

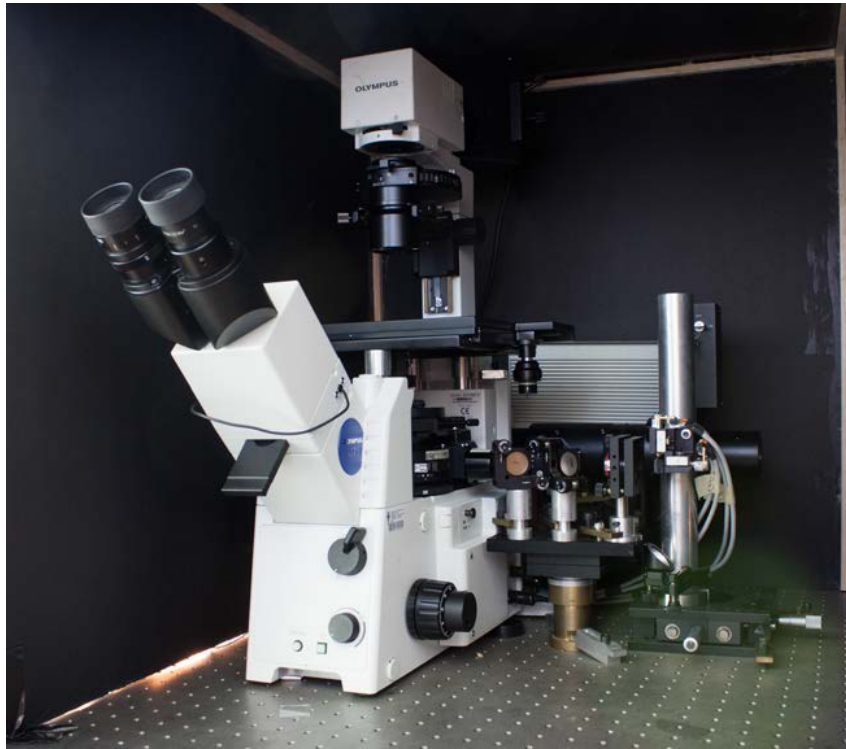


Figura 4.2: Fotografía del microscopio Olympus IX71 adaptado visto desde el lado de la excitación.

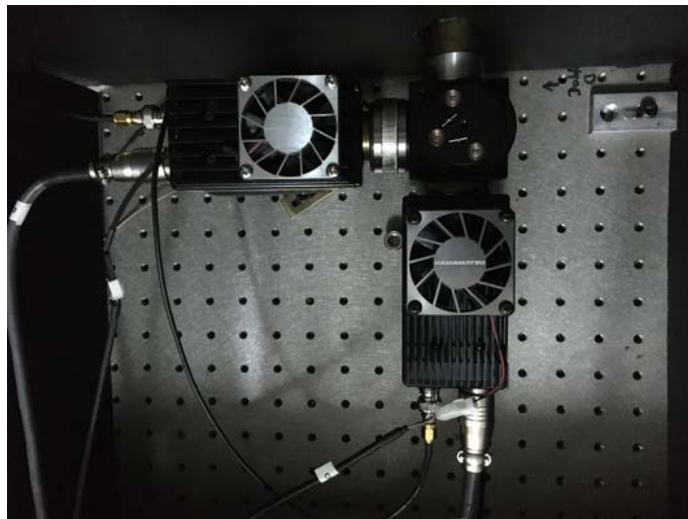


Figura 4.3: Fotografía del sistema de detección.

4.1.1. Sistema de excitación

Como fuente de excitación el microscopio cuenta con dos láseres IR pulsados. El primero es un láser de Ti:Zafiro sintonizable en el rango 760 y 840 nm, de 300 mW de potencia media. Este rango de longitudes de onda permite acceder a una variedad de compuestos fluorescentes muy habitualmente utilizados en biología molecular y celular como pueden ser las proteínas fluorescentes verdes y cyan (GFP, CFP), algunas sondas fluorescentes (DAPI, NADH), y algunos compuestos orgánicos como Celurean, Cumarina, Fluoresceina (pH 11), Rhodamina B, entre otros [23]. El segundo es un láser de longitud de onda fija a 777 nm. Este último fue adquirido en el transcurso de esta tesis y cuenta con una corriente semilla (0 - 2,8 A) y una corriente de bombeo (0 - 9 A) regulables. Como parte de su caracterización, se midió la potencia de salida del láser en función de la corriente de bombeo (Figura 4.4a), que presentó una buena coincidencia con el dato brindado por el fabricante, y su espectro de emisión para la corriente de máxima potencia (Figura 4.4b). Para cada láser hay un sistema de espejos en la mesa óptica que dirigen el haz hacia la entrada del microscopio. Cambiar de uno a otro implica simplemente colocar (o quitar) un espejo montado sobre una base magnética fija.

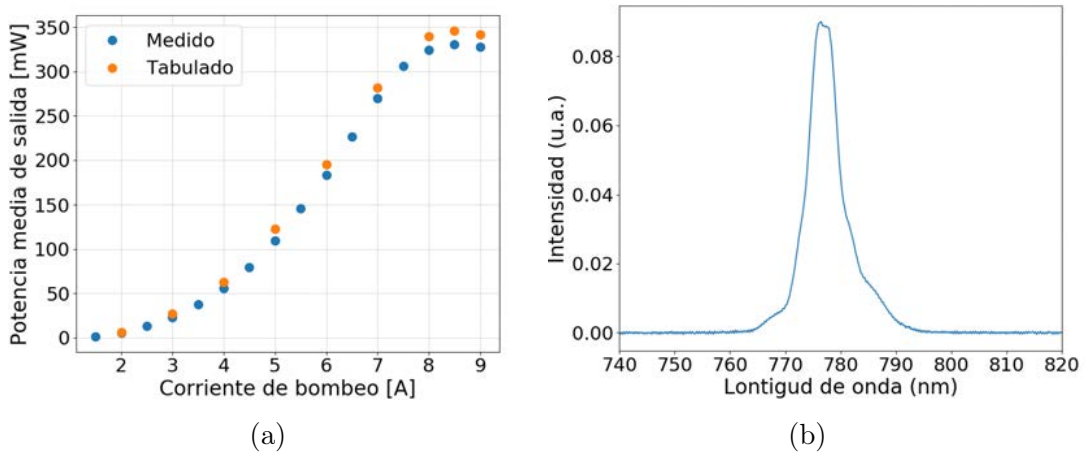


Figura 4.4: Caracterización del láser de fibra (Calmar). (a) Calibración de la potencia de salida. En azul se muestran los datos medidos y en naranja los tabulados por el fabricante. (b) Espectro de emisión medido para una corriente de bombeo de 8,5 A.

Antes de la entrada del microscopio, se colocó un polarizador (Thorlabs) montado sobre un posicionador angular que permite regular la potencia de entrada. Se colocó también un obturador o *shutter* automatizado con el fin de obturar el haz de manera controlada. Este obturador se construyó con un disco rígido y una impresora 3D, y se controla mediante una placa Arduino Uno (Arduino). Este dispositivo forma parte de la plataforma de optomecánica libre SOMA (DF, FCEyN, UBA) y todos sus planos se encuentran disponibles en la web (www.lec.df.uba.ar/soma).

Una vez que ingresa en el microscopio, el haz se refleja en los espejos galvanométricos para incidir en un espejo dicróico. El espejo dicróico tiene una reflectividad mayor al 90 % para longitudes de onda mayores a 680 nm y una transmisión mayor al 90 % para longitudes de onda por debajo de 680 nm. Dado que para excitar la muestra se trabaja con longitudes de onda entre 760 y 840 nm y que la emisión de fluorescencia ocurre en el rango visible, el espejo está colocado de forma tal que la luz incidente sea reflejada hacia la muestra y que la señal emitida se transmita por el mismo hacia el detector.

Tras reflejarse en el espejo dicróico, el haz se enfoca sobre la muestra con un objetivo de microscopio intercambiable, pudiendo elegir el objetivo más adecuado según cada experimento. Los objetivos con los que se cuenta actualmente son UIS2 aire 40x/0.95 (Olympus), UIS2 aceite 40x/1.3 (Olympus), aceite 60x/1.55 (Zeiss) y agua 63x/1.2 (Zeiss).

4.1.2. Sistema de detección

La señal de intensidad emitida por la muestra se colecta a través del mismo objetivo que se usó para la excitación y atraviesa el mismo espejo dicróico por el que se reflejó la señal de excitación. A continuación atraviesa un filtro BG39 que elimina definitivamente cualquier componente de la señal de excitación y se refleja por un espejo ingresando en el camino hacia el sistema de detección.

La señal de fluorescencia atraviesa una lente acromática de distancia focal 33,4 mm colocada de modo que su foco coincide con el punto donde se enfoca del haz que sale del microscopio, de forma que el haz sale colimado de la lente. Esto permite poder poner distintos elementos ópticos previo a la entrada al detector.

Luego de la lente acromática, el haz incide en un cubo de filtros (Thorlabs, modelo) que separa la señal en dos canales, contando cada uno con un detector.

Este cubo cuenta con una posición para un divisor de haz que puede separar por colores (espejo dicróico), polarización o intensidad. Este divisor transmite la señal que va hacia el primer canal y refleja la que parte hacia el segundo canal. Además, para cada canal el cubo cuenta con una posición para filtros de una pulgada de diámetro de modo que la señal de fluorescencia puede separarse en dos colores.

Dado que la intensidad de la señal que se desea medir proviene de una partícula única, es importante minimizar toda la luz de fondo y aumentar al máximo la señal colectada. Para esto se requiere que tanto la eficiencia de detección como la relación señal-ruido del fotomultiplicador sean altas. Otro requerimiento importante para este tipo de experimentos es detectar la mayor cantidad de pulsos (mayor cantidad de cuentas), en el tiempo de detección. Ambas cosas se logran con detectores en el modo de conteo de fotones de tiempo de respuesta corto. Una manera de cuantificar el tiempo de respuesta de un detector es a partir de su tiempo de trepada (o *rise time*) que se define como el tiempo que tarda el pulso de salida del fotomultiplicador en aumentar del 10 % al 90 % de su tamaño final [13]. Un tubo fotomultiplicador (o PMT, por sus siglas en inglés) es un tipo de detector de fotones que satisface estas condiciones. Sin entrar en detalles, un PMT consiste en un fotocátodo que convierte a los fotones incidentes en electrones; estos electrones pasan por una serie de dínodos, cada uno de los cuales emite electrones adicionales creando un efecto de avalancha. La señal emitida llega al ánodo, y luego pasa por un amplificador de pulsos, que les da una amplificación suficiente para poder ser contados por una placa de adquisición [89].

Para este trabajo se utilizaron dos fotomultiplicadores modelo H7422-P40 de Hamamatsu. El H7422-P40 es un PMT cuya área tiene 5 mm de diámetro sensible en el rango espectral 380 - 720 nm, teniendo su máxima sensibilidad en 580 nm. El tiempo de trepada es de aproximadamente 2 ns. Los pulsos emitidos por cada fotomultiplicador son enviados a un amplificador (Becker Hickl, ACA-4-35N) y luego pasan por un discriminador (Phillips Scientific, 6915) que filtra todos los pulsos por debajo de cierto umbral provenientes de la señal de ruido. Es por esto que en el modo conteo de fotones la intensidad de la señal se define como la suma de los pulsos y el cociente S/N es alto en comparación a otros modos de detección. La conformación de los pulsos se hace teniendo en cuenta las características de la placa contadora que se utilice. En

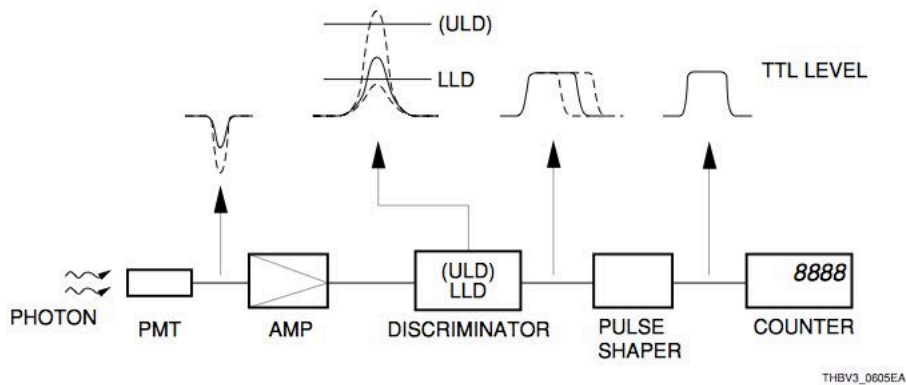


Figura 4.5: Diagrama de la conexión de los componentes del sistema de detección. El PMT convierte los fotones detectados en pulsos que luego son conformados adecuadamente para tener la forma (ancho y altura) que la placa de adquisición reconoce para ser contado. Esquema extraído de la referencia [89].

este trabajo se configuró el sistema amplificador/ discriminador para obtener pulsos de ancho mayor a 9 ns y 1,5 V de altura.

Por último, previo a la lente acromática que dirige la señal hacia los fotomultiplicadores, el microscopio cuenta con un espejo móvil en dos posiciones que puede o bien dejar pasar la señal hacia los detectores, o bien reflejar la luz hacia una webcam (Genius, FaceCam 1000X). La webcam se usa para adquirir imágenes por campo claro utilizando una lámpara halógena ubicada en la parte superior del microscopio para iluminar la muestra. En este caso, la muestra se puede observar tanto con la webcam como con los oculares del microscopio.

4.1.3. Sistema de adquisición

Tanto para el movimiento de los espejos galvanométricos, del posicionador piezoeléctrico y la lente eléctricamente sintonizable, como para la adquisición de la señal que colectan los detectores, se utiliza una placa de adquisición de alta resolución modelo DaqBoard/3001 PCI, IOtech. La placa cuenta con 24 salidas o entradas digitales, 16 entradas y 4 salidas analógicas. Actualmente, se utilizan tres salidas analógicas: dos de ellas para controlar el movimiento de los espejos galvanométricos (barrido en xy) y una de ellas para controlar el posicionador (PZT) o lente eléctrica (LE). Dos entradas digitales se conectan a los detectores.

Para que los pulsos sean contabilizados por la placa, el ancho mínimo del pulso debe ser de 9 ns mientras que la frecuencia máxima de conteo es de 24 MHz (separación entre pulsos mayor a 40 ns). Es decir que la placa no medirá pulsos provenientes del discriminador que tengan un ancho menor a 9 ns o que estén separados menos de 40 ns entre pulsos consecutivos. Esta frecuencia es mucho mayor a la frecuencia de saturación de los detectores (1 MHz) y por lo tanto no implica ninguna limitación al sistema.

Actualmente, se utilizan dos interfaces independientes para procesar la señal de la placa de adquisición. El programa comercial *SimFCS* (Universidad de California - Irvine) se utiliza en la adquisición de imágenes de fluorescencia y para controlar la rutina del método de seguimiento por barrido orbital. Alternativamente un programa propio escrito en entorno Python con interfaz gráfica se utiliza para controlar el barrido del láser de modo sincronizado con la apertura y cierre del obturador del haz. El control del microscopio con este programa se utiliza principalmente para la fabricación de microestructuras por litografía por iluminación láser, experimentos que se describen en el Capítulo 5.

4.1.4. Sistema de barrido

El barrido en el plano xy se realiza mediante los espejos galvanométricos (General Scanning, VM500). Cada espejo posee un actuador realimentado que permite un ángulo de barrido máximo de 50° hacia cada lado con una precisión angular de 10^{-4} radianes y una frecuencia máxima de 1,4 kHz. El área barrida sobre la muestra depende del aumento de la lente objetivo utilizada. Para un objetivo de magnificación 40X, el área máxima barrida, es decir para el máximo ángulo de barrido de los espejos, corresponde a $100 \times 100 \mu m^2$, mientras que para un objetivo de 60X, esta área es de aproximadamente $64 \times 64 \mu m^2$. En el eje axial se cuenta con un posicionador piezoeléctrico (Phisik Instrumente, PIFOCP- 721) alimentado por una fuente (Thorlabs, MDT694A) que tiene un recorrido total de $140 \mu m$. Este posicionador se encarga de mover la posición de la lente objetivo y es controlado desde la placa de adquisición.

Adicionalmente, como parte de esta tesis se desarrolló un sistema de desplazamiento axial alternativo, basado en la utilización de una lente eléctricamente sintonizable (Optotune, EL-30-10 VIS-LD). Esta lente se encuentra rodeada de una membrana flexible que cambia su radio de curvatura dependiendo de la

presión ejercida en su zona exterior mediante una bobina conductora. La presión es ejercida por un actuador electromagnético que transforma la corriente aplicada en un movimiento mecánico, de modo que es posible variar la distancia focal de la lente controlando la intensidad de la corriente aplicada. La lente eléctrica puede modificar su distancia focal con una resolución de unos pocos micrones y alcance de varios milímetros (dependiendo del objetivo con el que se trabaja). Como la lente eléctrica sólo puede modificar el plano de enfoque por encima del plano original (corrimiento del foco en una dirección), debajo de la misma se colocó una lente divergente de distancia focal -75 mm (Newport, KPC019AR) para que el corrimiento del foco se produjera en ambas direcciones (por encima y por debajo del plano original donde enfoca el objetivo).

El desarrollo de este sistema de enfoque al que llamamos SPEED (Sistema de Enfoque Eléctricamente Dirigido) fue presentado en el Concurso Nacional de Innovaciones INNOVAR 2016, obteniendo un premio en el área Innovación en las Universidades. Un desglose de los componentes ópticos que conforman el SPEED así como una fotografía donde se ve el sistema y la electrónica de control pueden verse en la Figura 4.6. Ambas lentes se encuentran acopladas dentro de una carcasa metálica. La misma tiene en un extremo rosca interna para montar el objetivo, y en el otro rosca externa para montarlo en la calesita del microscopio.

Este sistema presenta varias ventajas respecto del piezoeléctrico. Por un lado, se trata de un cambio de foco que no implica desplazar mecánicamente el objetivo y puede hacerse 10 veces más rápido, lo cual es particularmente interesante para experimentos de seguimiento de partículas en 3D. Por otra parte, el SPEED alcanza distancias de barrido mayores, que dependen del objetivo utilizado ($150\ \mu\text{m}$ para un 40X, $250\ \mu\text{m}$ para un 60X y $3\ \text{mm}$ para un 10X) y que permiten explorar zonas más profundas de la muestra. Por último, considerando que en un experimento de seguimiento de partículas individuales en tres dimensiones es necesario variar el plano de enfoque con alta velocidad, el uso de un objetivo de inmersión en aceite no resulta ventajoso si el mismo debe desplazarse mecánicamente debido a la resistencia que presenta la viscosidad del medio. Esto no presenta una limitación para el sistema de enfoque propuesto y por ende permite trabajar con objetivos independientemente de su medio de inmersión.



(a)



(b)

Figura 4.6: Sistema de enfoque axial desarrollado. (a) El SPEED consiste en una lente eléctricamente sintonizable y una lente divergente. Ambas lentes se encuentran dentro de una carcasa metálica. La misma tiene en un extremo rosca para montar el objetivo, y en el otro rosca para montarlo en el microscopio. (b) Fotografía del SPEED con un objetivo montado, un adaptador de rosca y el gabinete de control.

4.2. Caracterizaciones

4.2.1. Iluminación

Una forma de verificar la alineación general del microscopio y la homogeneidad espacial en la iluminación del haz sobre la muestra es estudiar la emisión de un objeto fluorescente espacialmente uniforme. Se utilizó para ello un portaobjetos comercial fluorescente (Chroma Technology) y se tomaron imágenes de barrido del mismo. En la Figura 4.7a se muestra una imagen por absorción de dos fotones de 256×256 píxeles que fue tomada iluminando el área más grande posible, que para un objetivo 40X tiene $100 \mu\text{m}$ de lado. A partir de una inspección visual de la imagen no se observan heterogeneidades en la distribución de intensidad. Una proyección de la intensidad en 3D muestra la misma información (Figura 4.7b). Para analizar las diferencias de intensidad entre píxeles se calculó el gradiente de la imagen con el método de Sobel [90]. Para cada punto, este operador da la magnitud del mayor cambio posible, junto con su dirección y sentido, mostrando cuan abrupto es el cambio en cada punto analizado. El resultado (Figura 4.7c) permitió concluir que la iluminación es

uniforme en todo el rango de barrido.

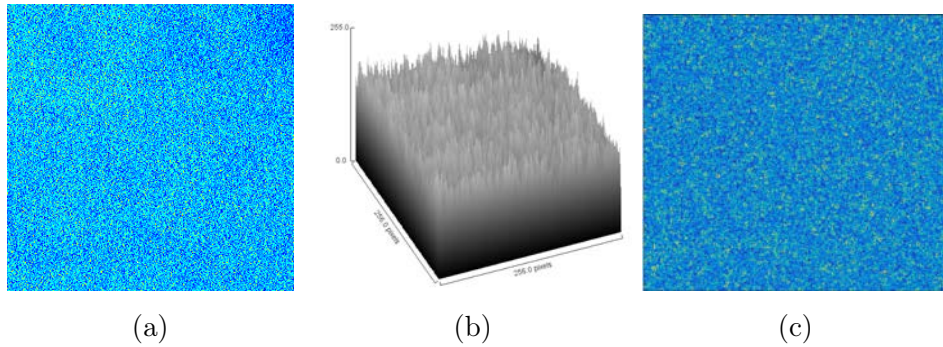


Figura 4.7: Uniformidad en la iluminación. (a) Imagen por absorción de dos fotones de un portaobjetos fluorescente para un campo visual de $100 \mu\text{m}$ de lado. (b) Gráfico 3D de la intensidad de cada píxel. (c) Gradiente superficial.

4.2.2. Tamaño de píxel

El tamaño del píxel de las imágenes tomadas por el microscopio depende del objetivo de microscopio utilizado, de la resolución o cantidad de píxeles por imagen y del aumento o *zoom* utilizado. Esto último refiere al voltaje aplicado sobre los espejos galvanométricos. Cuanto mayor es ese voltaje, mayor es el área barrida y por lo tanto la imagen es más grande. Manteniendo constante la cantidad de píxeles por imagen, a medida que disminuye el voltaje aplicado, el píxel tendrá un tamaño cada vez menor.

Para determinar el tamaño del píxel se utilizó una muestra de esferas fluorescentes de $6 \mu\text{m}$ de diámetro cuyo espectro de emisión se encuentra entre 480-520 nm (Bangs Laboratories Inc.). Es importante que el tamaño de la muestra sea mucho mayor (un orden de magnitud al menos) que la PSF del microscopio para que el tamaño en la imagen sea el tamaño real de la muestra. Se tomaron imágenes de 256×256 píxeles de una esfera fluorescente para distintos aumentos y para cada imagen se determinó la cantidad de píxeles que corresponde al diámetro de la esfera utilizando el programa *ImageJ*. De esta forma se construyeron los gráficos de la Figura 4.8, donde puede verse el tamaño de píxel para cada voltaje aplicado a los espejos para dos objetivos de microscopio de distinta magnificación. Del ajuste lineal se obtuvo una relación de 16 nm/V para el objetivo 60X y 25 nm/V para el objetivo 40X.

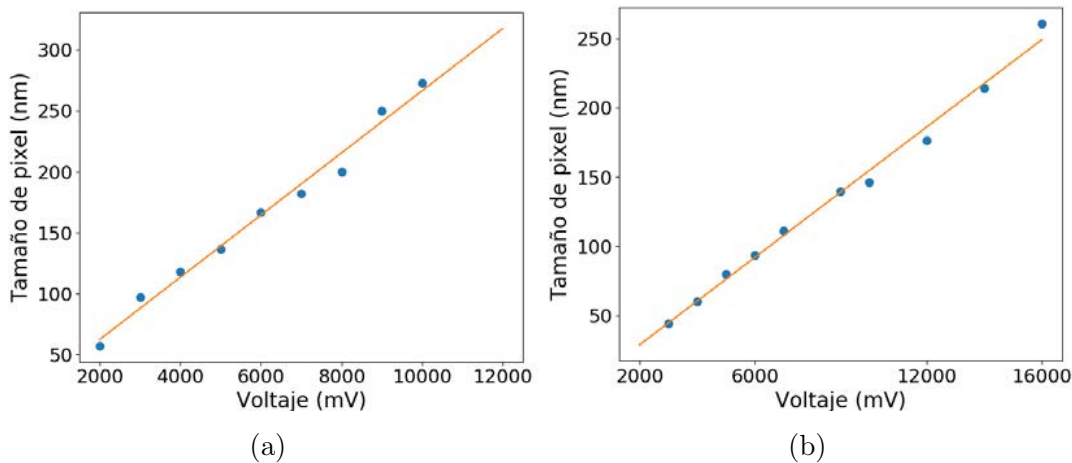


Figura 4.8: Tamaño de píxel en nm en función del aumento (voltaje aplicado sobre los espejos). (a) Objetivo de aire 40X. (b) Objetivo de aceite 60X.

4.3. Comentarios finales

El microscopio por absorción de dos fotones descrito en este capítulo fue construido enteramente en el laboratorio, cuesta 10 veces menos que un instrumento comercial de estas características y, por ser un microscopio abierto, es más versátil que su par comercial. Este microscopio se encuentra disponible a través del Sistema Nacional de Láseres para que usuarios externos al laboratorio tengan acceso a esta tecnología.

La motivación original para la construcción de este microscopio fueron los experimentos de seguimiento de partículas individuales por barrido orbital en tres dimensiones. Para ello, se puso a punto cada sistema que lo compone (barrido, excitación, detección, adquisición) y se hicieron las calibraciones necesarias para verificar su correcto funcionamiento. Esta no es, sin embargo, la única aplicación que tiene actualmente el equipo. En el siguiente capítulo se presenta una aplicación que ha crecido enormemente en los últimos 2 años, y que consiste la fabricación de microestructuras por iluminación láser.

Capítulo 5

Microfabricación por iluminación láser

A partir de la necesidad de contar con estructuras de dimensiones específicas para ser utilizadas como patrones de calibración del microscopio construido, estudiamos la posibilidad de utilizar la plataforma experimental para la fabricación de microestructuras a partir del curado por iluminación láser de resinas fotosensibles.

En este Capítulo se describe el protocolo desarrollado para la fabricación rápida y de bajo costo de estructuras micrométricas en 2 y 3 dimensiones. Finalmente se muestra la aplicación de una de las estructuras fabricadas como soporte en un experimento de cinética química.

5.1. Fabricación de microestructuras por litografía óptica

5.1.1. Antecedentes

Uno de los desafíos actuales en el ámbito de las nanociencias es el desarrollo de métodos que permitan fabricar de manera rápida y reproducible dispositivos en la microescala. El desarrollo de métodos alternativos para la fabricación de dispositivos se ha convertido en un objetivo de gran interés en muchos campos de la ciencia y la tecnología. Dentro de los métodos hoy en día más utilizados se encuentra la litografía óptica (o fotolitografía), que consiste en transferir un

diseño sobre un compuesto químico sensible a la luz (o foto-resina).

Existen muy diversas aplicaciones que van desde la microfluídica y la confección de máscaras para la industria semiconductor, el diseño de sustratos biocompatibles, la fabricación de películas porosas para la liberación controlada de fármacos, la microfabricación de estructuras con propiedades conductoras o magnéticas, y la fabricación de películas flexibles, entre muchas otras. [91, 92]. La fabricación óptica de dispositivos semiconductores o circuitos integrados es un área que ha crecido enormemente en los últimos años. En el campo de la biomedicina, la fotolitografía se utiliza para la microfabricación de andamiaje (o *scaffold*) e hidrogeles para la generación de tejidos que permiten estudiar la adhesión y migración celular [93, 94]. La posibilidad de fabricar dispositivos utilizando técnicas de litografía, ha permitido el desarrollo de plataformas miniaturizadas que pueden imitar complejos entornos biológicos de forma bastante precisa y reproducibilidad aceptable [91, 92, 95, 96]. Dentro de este campo, las celdas de microfluídica permiten modelar entornos biológicos, imitar físicamente tejidos y órganos, así como sistemas más complejos mediante la combinación de varios de estos elementos, proporcionando de este modo una plataforma experimental que permite estudiar sistemas de forma masiva y a escala de laboratorio [97]. En el área de la farmacéutica, y con el fin de predecir la respuesta clínica de nuevos fármacos, contar con un modelo de laboratorio para cultivo celular que sea fiel al comportamiento in vivo es una alternativa prometedora a los métodos de cultivo celular convencionales [98]. En ingeniería de materiales, por su parte, esta técnica es muy utilizada para la construcción de sistemas micro-electro-mecánicos (MEMS) en la fabricación de microchips [99].

5.1.2. Generalidades

La fotolitografía es un método óptico que consiste en transferir un patrón sobre una resina fotosensible a partir de su curado por exposición lumínica. La irradiación luminosa induce una alteración fisicoquímica del estado molecular de la resina que permitirá transferir el diseño deseado.

Para que esa transformación fisicoquímica sea posible, es necesario que los fotones con los que se ilumina la muestra tengan la energía necesaria para excitar un cambio de estado molecular, lo cual depende del espectro de absorción del material. Las resinas más comúnmente utilizadas tienen su rango de absor-

ción en el ultravioleta [100], es decir que para el curado se necesitan fotones de longitud de onda por debajo de los 400 nm. Otra alternativa para que las moléculas alcancen esa cantidad de energía es absorbiendo dos fotones en el rango infrarrojo de forma simultánea [101, 102]. Aprovechando este fenómeno y el microscopio por absorción de dos fotones construido durante esta tesis, surgió el proyecto de microlitografía óptica.

Actualmente la litografía óptica sobre resinas poliméricas se realiza en pocos lugares del país: la CNEA, el INTI y más recientemente en una empresa incubada a partir de un proyecto del Instituto Balseiro-Centro Atómico Bariloche. Con respecto a las alternativas existentes, la plataforma desarrollada durante esta tesis puede implementarse en cualquier laboratorio de investigación, hospital, o empresa que tenga acceso a un microscopio láser de barrido, y permite la fabricación rápida y de bajo costo de estructuras en 2D y 3D con una resolución espacial por debajo del micrón. La posibilidad de tener un sistema de microfabricación de estructuras de bajo costo instalado en el laboratorio, y que no requiere del uso de salas limpias para la preparación de las muestras, resulta una ventaja central respecto a la situación actual en el área de la microfabricación de dispositivos donde es necesaria la utilización de insumos costosos y que requieren de largos procesos de importación.

5.1.3. Plataforma para la microfabricación

El proceso de fabricación [103] se inicia colocando en el microscopio un cubreobjetos de vidrio sobre el que previamente se ha colocado una gota de la foto-resina. En este trabajo se utilizó una resina fotosensible de tipo negativo que se comercializa como adhesivo óptico (NOA 60, (Norland Optical Adhesive 60 [104]). Luego, el haz del láser se enfoca en la interfaz vidrio-gota de modo que la muestra una vez curada quede adherida al vidrio.

Para la fabricación de un patrón determinado se sincroniza el barrido del haz del láser con el obturador de forma tal que el haz haga un barrido rectangular (de la misma forma que lo hace para tomar una imagen) y el obturador se abra y se cierre en determinadas posiciones. De esta manera se logra que el haz sólo cure en determinadas zonas, siguiendo con el patrón elegido. El procedimiento se puede describir resumidamente en los siguientes pasos:

- Se elige un patrón y se crea una imagen binaria de ceros y unos (blanco

y negro) de $N \times N$ puntos de forma tal que haya un cero donde no hay imagen y un uno en los puntos donde se encuentra el patrón.

- Se carga la imagen en el programa, que la transforma en una matriz. La amplitud del barrido de los espejos dependerá del tamaño de la matriz dada. Previamente se define el tiempo del paso, que es un parámetro que debe ajustarse junto con la potencia incidente para llegar a curar la muestra sin llegar a quemar fuera del volumen de excitación.
- El programa envía la señal a la placa DAQ y al Arduino de forma que estén sincronizadas y el obturador se abra en todos los puntos donde la matriz tenga un 1 y se cierre en donde sea 0.

Previo al fotocurado es posible disolver en la resina compuestos fluorescentes o materiales conductores. Entre los compuestos fluorescentes y dependiendo del intervalo espectral y la resina, pueden usarse cianinas, rodaminas, oxazinas o cumarinas, y entre los compuestos conductores, nanoestructuras de oro o plata comerciales.

Una vez finalizada la rutina de fabricación, se retira el cubreobjetos y se lo sumerge en acetona por cinco minutos para remover el excedente no curado. Finalmente se deja secar la muestra y como resultado se tiene el patrón transferido. En la Figura 5.1 se muestran imágenes de transmisión tomadas con la cámara web del microscopio de muestras fabricadas a partir de imágenes arbitrarias descargadas de la web y en la Figura 5.2 se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido de las muestras fabricadas.

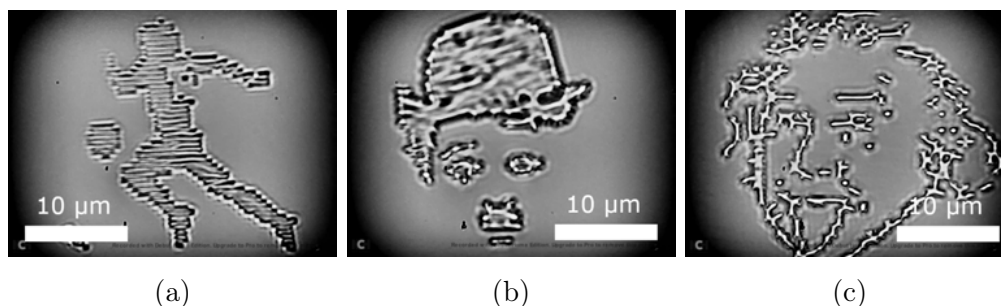


Figura 5.1: Imágenes de transmisión de algunas de las estructuras fabricadas. Para la fabricación se utilizaron imágenes arbitrarias obtenidas de internet las cuales fueron previamente binarizadas y luego cargadas en el programa de control del microscopio.

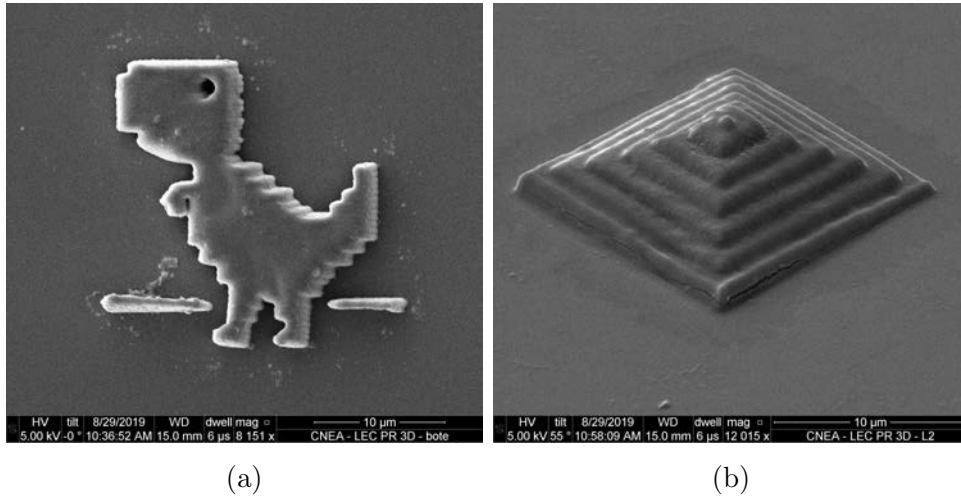


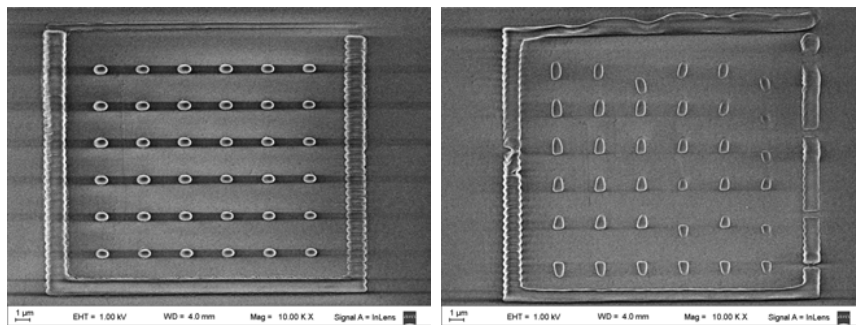
Figura 5.2: Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de algunas de las estructuras fabricadas. (a) En 2D. (b) En 3D.

5.1.4. Caracterizaciones

El área máxima de fabricación depende del objetivo de microscopio utilizado, y del voltaje que puede aplicarse a los espejos que se limita a $\pm 10V$. Esto es $100 \times 100 \mu m^2$ para un objetivo de 40X, y $30 \times 30 \mu m^2$ para un objetivo de 60X. Actualmente, en el grupo se está trabajando en el diseño y fabricación de una platina motorizada de forma de poder extender el tamaño de las litografías y poder hacer más de una de manera automatizada.

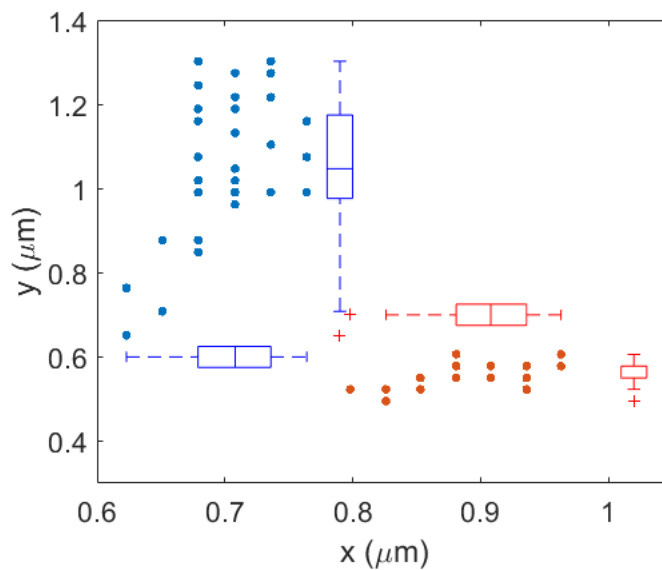
Un parámetro importante a determinar es el tamaño mínimo de punto alcanzado con esta técnica, ya que esto determina la resolución espacial con la que puede realizarse cualquier estructura en dos o tres dimensiones. Este tamaño depende fuertemente de la potencia del láser incidente, el tiempo de irradiación por punto (o tiempo de píxel) y la separación entre líneas sucesivas. La potencia del láser debe ser lo suficientemente baja para que el curado se efectúe únicamente sobre el área iluminada por el haz (y que no afecte las zonas aledañas) pero lo suficientemente alta para que la estructura se adhiera a la superficie del vidrio y no haya riesgo de que sea removida junto con el excedente en la etapa de remoción. En la Figura 5.3 se muestran las imágenes SEM de dos grillas de puntos equiespaciados que fueron fabricadas para medir el tamaño mínimo del punto. En el panel (c) se puede ver la dispersión del tamaño medido para los puntos fabricados con una potencia de 10 mW en azul y 20 mW en

rojo. Tanto en las imágenes como en el gráfico de dispersión se observa que los puntos no son completamente simétricos sino que hay una dirección levemente más alargada que la otra. Esto puede deberse a dos factores: por un lado, la velocidad de apertura y cierre del obturador, y por el otro la dirección en la que fue movido el cubreobjetos durante la remoción del excedente no curado.



(a)

(b)



(c)

Figura 5.3: Dependencia del tamaño de punto con la potencia. Imágenes SEM de estructuras de puntos realizadas en condiciones experimentales similares variando la potencia incidente del láser: (a) 10 mW, (b) 20 mW. (c) Dispersión en el tamaño en cada dirección para las grillas de puntos de 10 mW (azul) y 20 mW (rojo). Se representa la mediana y los percentiles 25 y 75 de cada distribución.

El tamaño de las estructuras fabricadas en la dirección axial, depende del grado de enfoque en esa dirección. Para estudiarlo, se tomaron imágenes por microscopía de fuerza atómica de una grilla previamente fabricada (Figura 5.4a) y se realizó un histograma de las alturas (Figura 5.4b) medidas en cada píxel.

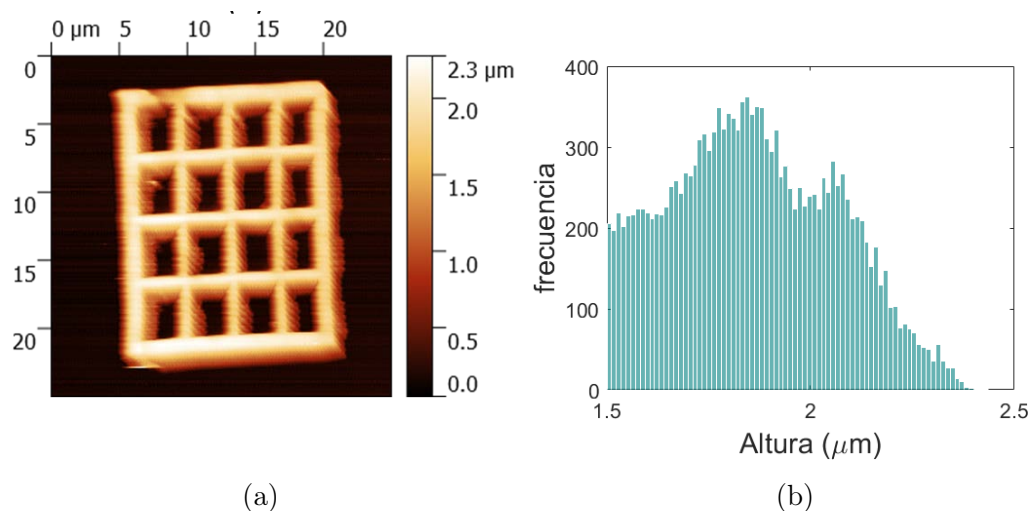


Figura 5.4: (a) Imagen de AFM de una grilla de $15\mu m \times 20\mu m$. (b) Histograma de alturas medidas por AFM.

5.2. Aplicaciones: Experimentos de fotoliberación

5.2.1. Compuestos enjaulados fotoliberables

Los compuestos enjaulados son entidades moleculares capaces de liberar partes de ellas al ser irradiadas con luz. Esta fotólisis permite liberar una molécula con precisión espacio-temporal en un tejido biológico. En particular, los compuestos enjaulados de neurotransmisores son utilizados en la elucidación de circuitos neuronales, estudios cinéticos rápidos en canales iónicos, mapeo de receptores, entre otros. Un importante neurotransmisor en el sistema nervioso es la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5HT). La serotonina aparece relacionada con las conductas apetitivas, con estados emocionales como la ansiedad, la alegría y la depresión. Los déficit en la regulación de la serotonina pueden

conducir a desórdenes psiquiátricos de fuerte impacto social, y su maquinaria molecular es blanco de varios productos farmacéuticos.

En el grupo de Roberto Etchenique del Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE, FCEN, UBA) desarrollaron un compuesto liberador de serotonina, el RuBi-5HT, que es sensible a luz visible [105, 106]. Parte de la caracterización de este nuevo compuesto consistió en evaluar su sensibilidad para ser fotolizado en UV, en el rango visible y con luz infrarroja en el régimen de dos fotones. Esto último es de especial interés por las ventajas que presenta la excitación por dos fotones para experimentos sobre tejidos y células vivas.

La microscopía por absorción de dos fotones ha tenido un amplio desarrollo desde que fue introducida por primera vez [20] por sus vastas aplicaciones para el estudio de propiedades físicas de los materiales, fotoliberación [107, 108], y especialmente estudios de sistemas biológicos [109, 110]. Un desafío que esta técnica presenta, sin embargo, es la baja absorción de dos fotones que tienen la mayoría de las moléculas en comparación con aquellas alcanzadas por un fotón. Esto lleva a la necesidad de iluminar la muestra con potencias que en caso de las muestras biológicas pueden producir daños o calentamiento no deseado. Por este motivo, en las últimas décadas se ha trabajado extensamente en el desarrollo de sondas, fluoróforos y fotoactivadores, tanto de forma experimental como a partir del modelado molecular. Resulta necesario, para evaluar la utilidad de estos compuestos, medir sus propiedades no lineales, siendo la sección eficaz de absorción (o *cross section*) la más importante de ellas.

El objetivo de esta caracterización fue verificar si RuBi-5HT, este nuevo compuesto liberador de serotonina, absorbe en el régimen de dos fotones y, siendo así, medir su sección eficaz. Se desarrolló un método para la medición directa de la sección eficaz de dos fotones utilizando cubetas micrométricas, aprovechando nuestra capacidad de litografiar patrones arbitrarios de forma fácil y rápida, en el microscopio por absorción de dos fotones desarrollado en esta tesis. Los resultados dieron lugar a la publicación de un trabajo (Cabrera R., Gabriel M., Estrada L., y Etchenique R., *Annal. Chem.*, 2019 [111]).

5.2.2. Fabricación de microcubetas

Debido a que el compuesto enjaulado tiene mayor intensidad de fluorescencia que el liberado, la fotólisis producida por efecto de la absorción de dos

fotones puede ser detectable a partir de un decaimiento de la intensidad de emisión. Para que esto sea medible, es necesario que la fotólisis se produzca en la totalidad del compuesto, es decir en todo el volumen, ya que la difusión de compuesto enjaulado sobre el liberado no permitiría apreciar este efecto. Esto requirió que el experimento se realizara sobre nanovolúmenes, lo cual motivó la fabricación de microcubetas, dentro de las cuales se volcaría el compuesto RuBi-5HT para la medición de fotólisis.

En la sección 5.1.3 se presentó el método de litografía óptica para impresión de estructuras micrométricas. La utilización de un láser infrarrojo junto con la plataforma de microlitografía desarrollada sobre el microscopio presenta la enorme ventaja de realizar estructuras con un ancho de línea del orden del medio micrón, en tres dimensiones y completamente arbitrarias. Para el objetivo de este trabajo la geometría de la cubeta no es un parámetro fundamental, sino que el único requerimiento consiste en que las microcubetas tengan un volumen tal que sea válida la aproximación de fotólisis en un entorno infinito. Es necesario, por otra parte, contar con una cantidad de microcubetas que permita medir la repetitividad del resultado.

Para fabricar una gran cantidad de microcubetas en forma rápida, se colocó una gota de una solución 1:100 de NOA en etil acetato de aproximadamente 5 μL sobre un cubreobjetos de vidrio y se colocó la muestra en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TS100) disponible en INQUIMAE. Un láser de 405 nm se enfocó con un objetivo 4X o 10X, dependiendo el tamaño de microcubetas deseado, y se configuró una secuencia de prendido-apagado con el movimiento de los espejos galvanométricos a fin de que se curara la resina en las regiones deseadas. El barrido se efectuó en forma de espiral, comenzando a litografiar en el centro de la gota. Finalizado el proceso de curado, se removió el excedente de material sumergiendo en acetona y se secó la muestra con gas comprimido.

Un ejemplo de las microcubetas fabricadas se presenta en la Figura 5.5. La distribución de forma y tamaño permite realizar ensayos y elegir el volumen más adecuado para la fotólisis que se quiere realizar. Al llenar las microcubetas fabricadas con un fluoróforo (en este caso, fucsina) cuya absorbancia molar y concentración son conocidas, es posible determinar en forma precisa el espesor. Las cubetas fabricadas tienen entre 20 y 100 μm de lado, y aproximadamente 50 μm de espesor.

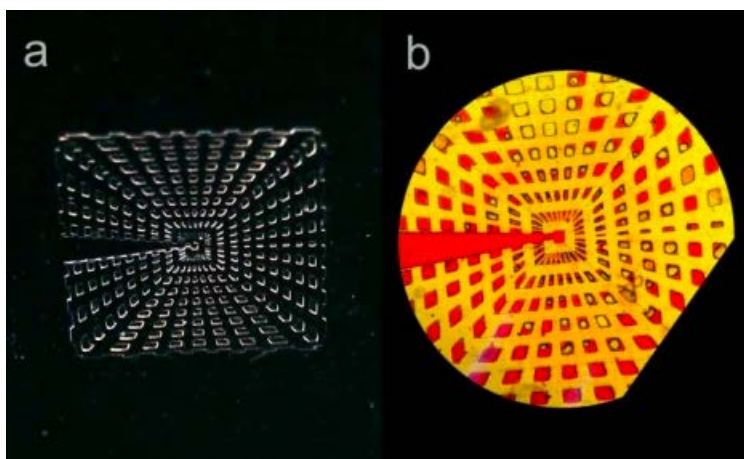


Figura 5.5: (a) Microcubetas (vacías) observadas por campo oscuro (b) Microcubetas rellenas con fucsina observadas por campo claro (Créditos: Ricardo Cabrera).

5.2.3. Determinación de la sección eficaz de dos fotones de un compuesto fotoactivable

Las microcubetas fabricadas se llenaron con RuBi-5HT y se colocaron en el microscopio por absorción de dos fotones. Para excitar la muestra se utilizó el láser de 777 nm, con pulsos de 90 fs de duración a una frecuencia de 50 MHz. Se mantuvo la potencia media sobre la muestra en 15.5 mW. Se utilizó un objetivo 20X/0.5 (Olympus) para enfocar el haz y colectar la señal de fluorescencia.

Sobre la microcubeta seleccionada, se tomaron 200 imágenes a una velocidad de 1,5 segundos por imagen iluminando la microcubeta completa. Con el programa ImageJ se analizó la intensidad detectada de cada imagen. En la Figura 5.6 se pueden observar los resultados de esta medición junto con el ajuste de los datos.

Es importante aclarar que una medición previa de la fotólisis por un fotón sobre la misma cubeta permitió observar que durante la irradiación las moléculas del compuesto difunden de una cubeta a otra, por lo tanto este fenómeno no puede ser excluido del análisis. La constante característica de esta difusión, k_{diff} se midió a partir de la recuperación de la intensidad luego de la fotólisis total sobre la microcubeta, resultando en $k_{diff} = 7,9 \times 10^{-3} s^{-1}$. El proceso medido que se muestra en la curva de la Figura 5.6, entonces, es consecuencia

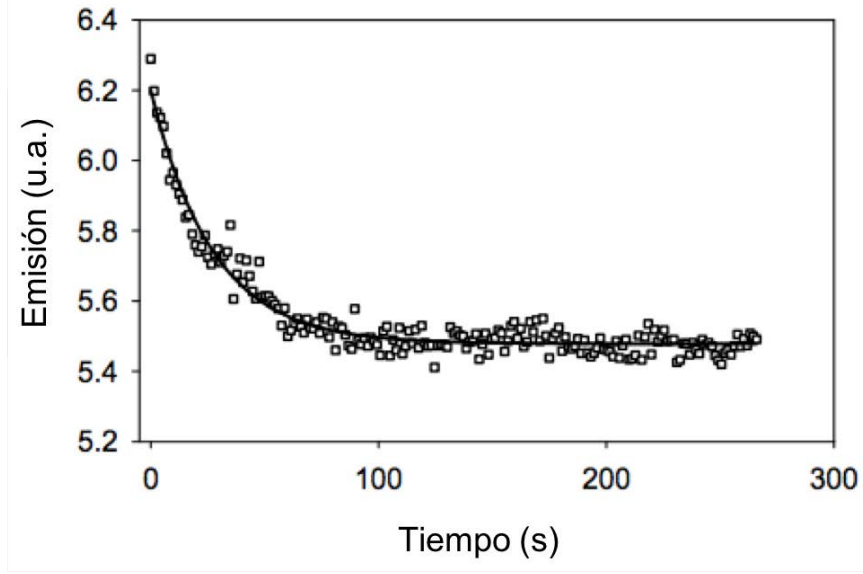


Figura 5.6: Emisión de RuBi-5HT durante la irradiación por dos fotones con 777 nm. En línea sólida se muestra el mejor ajuste por una función exponencial decreciente con $k_{exp} = 3,5 \times 10^{-2} s^{-1}$.

de la difusión más la fotólisis, es decir $k_{exp} = k_{diff} + k_{fot}$. La constante de decaimiento asociada a la fotólisis resulta entonces $k_{fot} = 2,7 \times 10^{-2} s^{-1}$.

Por otro lado, la cantidad de fotoproducto, es decir, la cantidad de moléculas fotolizadas, se puede conocer utilizando la expresión [112]:

$$N = \frac{1}{2} g \phi_{phot} C \delta \frac{8nP^2}{\pi\lambda} \Delta t \quad (5.1)$$

donde g es el cociente entre el tiempo entre pulsos y la duración del pulso del láser con el que se realiza la fotólisis, P es la potencia media sobre la muestra, ϕ_{phot} es la eficiencia cuántica de fotoliberación, C es la concentración, δ es la sección eficaz de dos fotones, n es el índice de refracción de la muestra, y λ la longitud de onda del láser.

Reemplazando $N/\Delta t$ en la ecuación (5.1) por k_{fot} y considerando que ϕ_{phot} es 0.034 tanto para 1 fotón como 2 fotones, la sección eficaz de dos fotones δ resultante es 1.24 ± 0.12 GM (esta unidad se llama Göeppert-Mayer en honor a quien dio nacimiento a la técnica de excitación por dos fotones).

Para tener un valor con el que comparar este resultado, se midió la sección eficaz por un método indirecto estándar. Esto consiste en utilizar la expresión

que describe la cantidad de fotones emitidos por un fluoróforo por unidad de tiempo [112]:

$$N = \frac{1}{2} k_m g \phi_{fluor} C \delta \frac{8nP^2}{\pi\lambda} \Delta t \quad (5.2)$$

donde N es la cantidad de fotones absorbidos, k_m la eficiencia de colección del sistema y ϕ_{fluor} es la eficiencia cuántica de fluorescencia del fluoróforo. Para poder utilizar esta ecuación con RuBi-5HT es necesario conocer el valor de k_m , que depende solamente del instrumento. Este valor se estimó midiendo con una solución de fluoresceína ($\delta = 34 \pm 1$, $\phi_{fluor} = 0.95$ [113]). El resultado de la sección eficaz de dos fotones de RuBi-5HT con este método fue 1.40 ± 0.09 GM, valor que concuerda con la medición directa presentada en este trabajo.

5.3. Comentarios finales

En este Capítulo se presentó el desarrollo de una plataforma de microlitografía óptica por absorción de dos fotones, actualmente disponible a la comunidad científica a través del Sistema Nacional de Láseres. Este proyecto presenta una alternativa a los sistemas de litografía óptica comúnmente disponibles en el mercado, los cuales son generalmente más caros y en algunos casos más lentos, y por la especificidad del producto en general requieren de un representante regional y largos tiempos para su importación. La plataforma de litografía óptica aquí implementada puede ponerse a punto en cualquier microscopio óptico de barrido y solo requiere del control de los espejos de barrido para la fabricación de estructuras de trazo continuo; y de la incorporación de un obturador que permita bloquear el paso del haz de excitación para estructuras de trazo discontinuo.

Una aplicación inmediata que tuvo este desarrollo fue la fabricación de microcubetas para medir la fotoliberación de un compuesto enjaulado desarrollado por un grupo de la facultad. Las reacciones de liberación de productos por excitación en dos fotones ocurren a una escala espacial minúscula, que corresponde exclusivamente a la zona focal del haz de luz. Esto dificulta la medición de la fotorreacción en volúmenes típicos de la investigación en química. El método aquí descrito consistió, básicamente, en restringir el volumen de reacción hasta valores en los que la aparición de producto sea detectable

por emisión. Mediante esta técnica se pudo determinar la sección eficaz de absorción de RuBi-5HT en régimen de 2 fotones, obteniendo un valor del mismo orden que el de otros compuestos enjaulados similares.

Por último, este proyecto disparó un estudio de las propiedades fisicoquímicas que conducen al fotocurado, que se desarrolló por fuera del objetivo de este trabajo (Angriman *et. al.*, 2019, manuscrito enviado).

Capítulo 6

Tráfico vesicular en células neuroendocrinas

Las células cromafines neuroendocrinas son importantes reguladores de parámetros fisiológicos críticos como el ritmo cardíaco, el metabolismo, y la presión arterial durante el descanso y bajo condiciones de estrés. En respuesta a los potenciales de acción, estas células exocitan vesículas encargadas de transportar mensajeros químicos necesarios para regular estas funciones. Luego de la exocitosis, estas células desencadenan un proceso de endocitosis que compensa los cambios en la membrana plasmática y recupera membrana intracelular lo que constituye el primer paso para regenerar vesículas secretorias.

En este capítulo se presenta un análisis cuidadoso de las trayectorias observadas en vesículas endocitadas de células cromafines, a partir de la implementación del método de seguimiento 3D de partículas individuales por barrido orbital puesto a punto en el transcurso de esta tesis.

Como se comentó anteriormente, el seguimiento por barrido orbital disminuye los efectos de fototoxicidad celular debido el reducido volumen de irradiación. Una consecuencia directa de esta característica es la posibilidad de seguir a la partícula de interés por tiempos más largos. Dado que el tiempo total de seguimiento de una partícula estará limitado por la duración de la marca fluorescente, para aprovechar al máximo esta característica del barrido orbital se utilizaron nanopartículas de oro como sondas alternativas a los tradicionales compuestos fluorescentes como marcadores de vesículas individuales.

6.1. Motivaciones

El sistema nervioso simpático de cualquier organismo se encarga de actividades que incluyen el control de la frecuencia y la fuerza de contracción cardíaca, la contracción y dilatación de vasos sanguíneos, la contracción y relajación de músculos lisos, tamaño pupilar y secreción de glándulas exocrinas y endocrinas, regulando funciones tan importantes como la digestión, la circulación sanguínea, la respiración y el metabolismo. Los axones del sistema nervioso simpático llegan a ganglios intermedios y es desde allí de donde parten las fibras que se dirigen a cada órgano [114]. La médula de la glándula suprarrenal ubicada en el extremo superior de los riñones, está compuesta por células cromafines, que son neuronas modificadas que no poseen axones y liberan sus productos de secreción directamente al torrente sanguíneo [115].

Las células cromafines son importantes reguladores de parámetros fisiológicos críticos como el ritmo cardíaco, metabolismo, contracción y presión arterial durante el descanso y bajo condiciones de estrés. Estas células están encargadas de secretar adrenalina y otras sustancias activas a la sangre constituyendo un elemento esencial de respuesta al estrés. Las células cromafines almacenan sus productos de secreción en vesículas secretoras que son compartimentos limitados por una membrana lipídica y que actúan como “nano-vehículos” transportando productos de secreción (neurotransmisores y neuropéptidos) que las células utilizan como mensajeros químicos para comunicarse entre sí y con las células del organismo cuyas funciones controlan. La liberación de los productos de secreción se dispara con corrientes de Ca^{2+} que son activadas en respuesta a potenciales de acción [116].

Por las similitudes que guardan con las neuronas, las células cromafines son interesantes modelos neurobiológicos. Como sistema experimental presentan ventajas respecto de éstas, ya que permiten la visualización directa de procesos que son difíciles de estudiar en terminales nerviosas. Es por ello que las mismas han sido extensamente utilizadas para estudiar los mecanismos involucrados en la endocitosis y exocitosis de vesículas [114]. Desde el momento en que es formada hasta que es liberada, una vesícula debe pasar por una sucesión de etapas. Estas comienzan con la biogénesis de la vesícula en el Golgi, el transporte por el citoesqueleto, su llenado con sustancias activas, su disociación del citoesqueleto, el anclado físico a la membrana plasmática, y finalmente su secreción [117,118]. Luego de la secreción por exocitosis, se produce un proceso

de endocitosis donde se generan vesículas de características diferentes a las vesículas secretorias. Estas vesículas endocitadas deben seguir un complejo proceso de transformación y maduración que llevan finalmente a la formación de nuevas vesículas secretorias. Estudios previos revelan que existen diferentes tipos de movimiento en la trayectoria de vesículas luego de la endocitosis, sugiriendo la existencia de distintos mecanismos involucrados en su movimiento [119].

El objetivo de este trabajo fue estudiar la dinámica intracelular de vesículas en células cromafines a partir del seguimiento individual de vesículas por tiempos largos (5 a 10 minutos) luego de la endocitosis. Para ello se aplicó la técnica de seguimiento por barrido orbital en tres dimensiones y se estudió la dinámica para procesos de endocitosis y exocitosis inducidos con estímulos de variada intensidad. Este trabajo fue realizado en colaboración con el grupo del Dr. Fernando Marengo y la Dra. Luciana Gallo del Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE, UBA - CONICET).

6.2. Nanopartículas metálicas como marcadores de vesículas individuales

Para poder visualizar las vesículas en un microscopio de fluorescencia, es necesario marcarlas fluorescentemente. Existen diferentes sondas que permiten realizar una marcación fluorescente sobre la muestra. Algunas de ellas sirven para marcar una región determinada de la célula ya que se adhieren de forma específica [120, 121]. Entre las sondas más usadas se encuentran las moléculas orgánicas o *dyes*, las proteínas fluorescentes, los puntos cuánticos (Q-dots) y las nanopartículas metálicas, entre otras.

La disponibilidad de sondas fluorescentes para la marcación de biocompuestos ha crecido en las últimas décadas, y la elección de uno u otro depende de las ventajas que presenten sus propiedades para el método a emplear. Un aspecto importante a tener en cuenta es que el acoplamiento de una sonda molecular con una proteína o sitio celular puede afectar la funcionalidad del compuesto biológico marcado. Es por ello necesario que la marca fluorescente sea inerte, que no genere citotoxicidad y que no interactúe con las proteínas u otros componentes celulares para poder asegurar que su incorporación no

afecte las propiedades biológicas del sistema en estudio, en particular la dinámica [122]. Otro factor importante a considerar es el brillo, definido como el número de fotones absorbidos en promedio, por la eficiencia cuántica de emisión, y la fotoestabilidad de la sonda fluorescente, definida como el número de fotones absorbidos en promedio antes de la descomposición fotoquímica.

Para obtener la trayectoria de una partícula durante varios minutos con alta resolución temporal (milisegundos) es necesario iluminarla continuamente y esto sólo es posible si la marca no se ve afectada por procesos fotofísicos y/o fotoquímicos indeseables como el parpadeo (*blinking*) o el fotoblanqueo (*bleaching*). Generalmente, lo primero afecta a los Q-dots y lo segundo ocurre en el caso de las moléculas fluorescentes, limitando la duración de las trayectorias que se pueden medir a unos pocos segundos.

Una forma de vencer esta limitación es utilizar nanopartículas metálicas (NPs) como marcadores alternativos. Las NPs de metales como el oro o la plata tienen una frecuencia de resonancia en el visible y se excitan también en el rango infrarrojo. Las secciones eficaces de absorción y emisión de las NPs metálicas son órdenes de magnitud mayores a una molécula fluorescente [123]. Trabajos previos han estudiado sus propiedades de excitación y emisión por absorción de dos fotones, probando que tienen un brillo mucho mayor al de las proteínas fluorescentes excitadas con la misma irradiancia [124, 125]. Por este motivo además no es necesario excitarla con potencias altas que podrían dañar el entorno celular. Las NPs no parpadean, no se fotodegradan, y son muy resistentes a una iluminación prolongada. Otra característica importante de estos nanocompuestos es que su emisión cambia dependiendo del material, el tamaño y la forma. La nanoplasmónica entonces ha tenido un auge gracias a la posibilidad de sintetizar NPs de manera controlada y con una reproducibilidad aceptable. Actualmente NPs de varias formas y tamaños están disponibles comercialmente, a partir de lo cual muchos grupos han propuesto interesantes aplicaciones en el campo de la biología, la medicina y la ciencia de los materiales [126–129].

Por las ventajas que presentan las NPs metálicas, en este trabajo se utilizaron nanopartículas de oro de 10 y 30 nm de diámetro para marcar vesículas individuales y poder seguirlas por varios minutos. Para la elección del tamaño de las NPs se tuvo en cuenta, por un lado, el tamaño aproximado de las vesículas, que según reportes previos puede ser de 40 a 200 nm [130, 131]. Por otro

lado, se consideró la diferencia en las propiedades de absorción y de emisión en función del tamaño y se trabajó con NPs que no generaran fotodaño sobre la célula (es decir, que no se sobrecalienten con la potencia utilizada) y al mismo tiempo tengan la señal necesaria para experimentos de SPT.

Para marcar a las vesículas que se desea estudiar, cuando se incorporan las NPs en el medio de cultivo celular, los mecanismos de endocitosis mencionados anteriormente inducen la internalización de las NPs metálicas que se encuentran en el medio.

6.3. Cultivo primario de células cromafines

Para la preparación de cada cultivo primario de células cromafines se extrajeron las glándulas adrenales de 1-2 ratones de cepa sv129 de edades entre 13 y 20 días. En este preparado, la principal dificultad se relaciona con la pequeña cantidad de tejido disponible en la médula adrenal.

Luego de extraer las glándulas adrenales se colocan en una caja de petri estéril sobre una lupa para su disección. Allí se separa la médula adrenal que es donde se encuentran las células cromafines. La disección es un paso crítico en el resultado del cultivo, ya que si la remoción de la corteza no es total se observa una disminución en la proporción de células cromafines en relación a otros tipos celulares como fibroblastos. Una vez disecadas, las cuatro médulas fueron colocadas en un tubo de 1,5 ml y digeridas en una solución de Hanks conteniendo 0,5-1 mg/ml de papaína durante 25 minutos a 37°C.

Luego de remover la enzima con tres lavados con 200 μ l de medio de cultivo DMEM suplementado, las médulas fueron disgregadas y se las suspendió en un volumen final de 600 μ l de DMEM suplementado. Esta suspensión fue filtrada secuencialmente a través de mallas con poros de 200 y 50 μ m para remover agregados celulares y remanentes de tejido no disgregado. Finalmente, las células fueron plaqueadas sobre cubreobjetos cortados en cuartos previamente polilisinados. Luego de incubar por 45 minutos en estufa a 37 °C y 5% CO₂, se agregó medio de cultivo DMEM y se mantuvieron en la estufa. Las células fueron utilizadas para las mediciones hasta 48 horas después.

6.4. Internalización de nanopartículas de oro en células cromafines

Antes de comenzar a estudiar la movilidad vesicular en el citoplasma, se estudió la internalización de NPs por dos vías: la endocitosis estimulada y la endocitosis constitutiva. La primera está regulada por la concentración de Ca^{2+} citosólico, la cual al superar cierto nivel activa la exocitosis y endocitosis de vesículas. En la exocitosis regulada por Ca^{2+} las vesículas se fusionan ante un estímulo específico y liberan al medio extracelular señales específicas (hormonas, neuropéptidos, neurotransmisores), ya sea para dar una señal a otra célula (por ejemplo, entre neuronas) o en la sangre (para que llegue la señal a otro órgano). Luego de la exocitosis regulada por Ca^{2+} ocurre como ya dijimos una endocitosis compensatoria. La endocitosis constitutiva, en cambio, forma parte del normal reciclado de proteínas y lípidos de la membrana plasmática y del interior celular. Las vesículas endocitadas por vía constitutiva se fusionan continuamente a la membrana aún en bajas concentraciones citosólicas de Ca^{2+} . Son importantes para regenerar la membrana plasmática, incorporando (o reciclando) componentes de membrana como receptores, canales, etc., o bien secretando continuamente componentes al medio extracelular, dependiendo del estado de la célula. Las vesículas endocitadas de forma estimulada o constitutiva, entonces, responden a diferentes funciones y es por ello que es importante distinguir la vía de internalización de las vesículas a estudiar.

Para comparar las dos formas de internalización, en ambos casos las células fueron incubadas en un medio con 30 pM de NPs de oro de 10 nm. En el primer caso, para promover la endocitosis estimulada, se agregó una solución de potasio (50 mM K^+) y se incubaron las células por 5 minutos. La presencia de potasio extracelular estimula la exocitosis y endocitosis vesicular masivas [132]. Finalizado ese tiempo, se cambió el medio celular por una solución normal sin potasio. En el segundo caso, para la endocitosis constitutiva, las células en el medio con NPs se incubaron durante toda la noche en medio celular estándar.

Luego de la internalización, se tomaron imágenes por microscopía de fluorescencia de las células haciendo un recorrido axial para contar la cantidad de NPs internalizadas en todo el volumen celular. Los experimentos fueron realizados utilizando el microscopio multifotónico construido como parte de esta tesis, cuyo funcionamiento está detallado en el Capítulo 4. Se sintonizó

la longitud de onda de excitación del láser de Ti:Za en 800 nm ya que a esta longitud de onda se obtiene una señal suficiente de autofluorescencia de las células que permite tener un registro de la superficie cubierta por la célula en el plano focal, sin la necesidad de utilizar otro marcador fluorescente. Por otra parte a 800 nm las NPs son claramente observadas independientemente de su tamaño. Se utilizó un objetivo 60X/0.65 NA de aire. Para la detección no se colocó ningún filtro ya que la señal de autofluorescencia de la célula y la señal proveniente de las NPs son fácilmente diferenciables. Para la adquisición de las imágenes se utilizó el programa comercial *SimFCS* (Universidad de California - Irvine).

Un ejemplo de una imagen de fluorescencia por absorción de dos fotones de una célula con unas cuantas NPs internalizadas se puede ver en la Figura 6.1. La célula se distingue con claridad por su señal de autofluorescencia y las NPs se observan como puntos brillantes limitados por difracción, ubicándose la mayoría de ellos en las cercanías a la membrana. No todas las NPs que se observan aparentan tener el mismo brillo. Esto puede deberse a que, dado que la imagen está limitada por difracción, un conjunto de pocas (2 o 5) NPs muy cercanas se ve del mismo tamaño que una única NP, pero su brillo es mayor. También es posible que las NPs estén ubicadas en distintos compartimentos celulares y por ende cambia el entorno, lo cual afecta fuertemente su emisión [133]. Otro factor a considerar es que cada imagen se adquiere sobre un plano, con lo cual algunas NPs estarán mejor enfocadas que otras.

Se contabilizaron las NPs endocitadas para ambas vías de internalización. En el caso de la endocitosis estimulada con K^+ , se observaron en el microscopio luego de 5 minutos de incubación y se obtuvo un promedio de $16,9 \pm 1,5$ NPs por célula analizando 25 células de tres cultivos diferentes (Figura 6.2a). En el caso de la endocitosis constitutiva fue necesario esperar 24 horas para observar NPs en el interior celular y de las 13 células analizadas se obtuvo un promedio de 7 ± 1 NPs por célula. Es decir que la cantidad de NPs internalizadas luego de 5 minutos por vía estimulada con K^+ es significativamente mayor a las que se internalizan luego de 24 horas por vía constitutiva. Considerando la internalización de NPs por minuto (Figura 6.2b) se obtiene $0,0048 \pm 0,0008$ para la vía constitutiva y $8,44 \pm 0,74$ para la vía estimulada. Este resultado demuestra que las NPs de oro internalizadas a partir de un estímulo de K^+ , luego de unos pocos minutos están marcando vesículas.

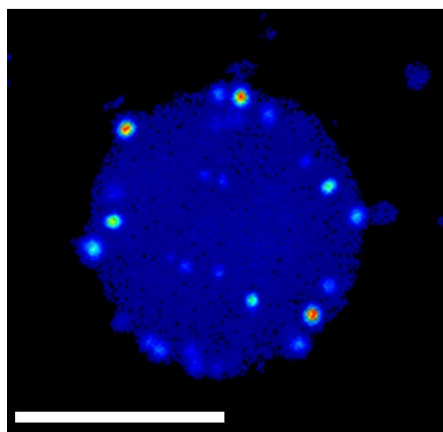
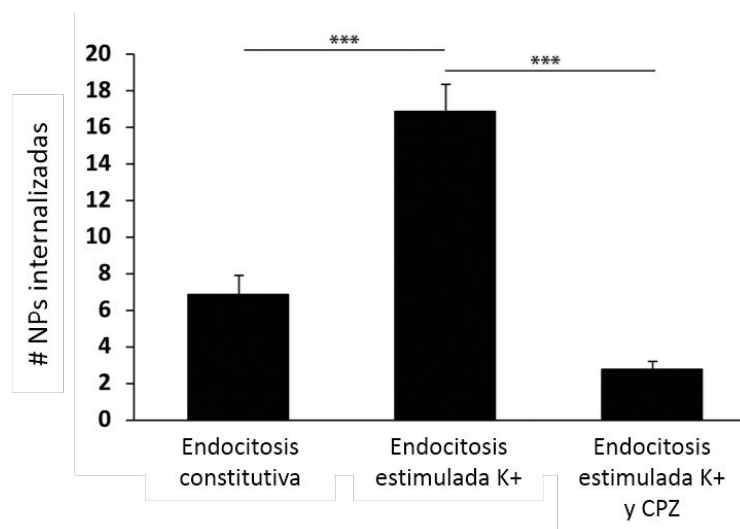


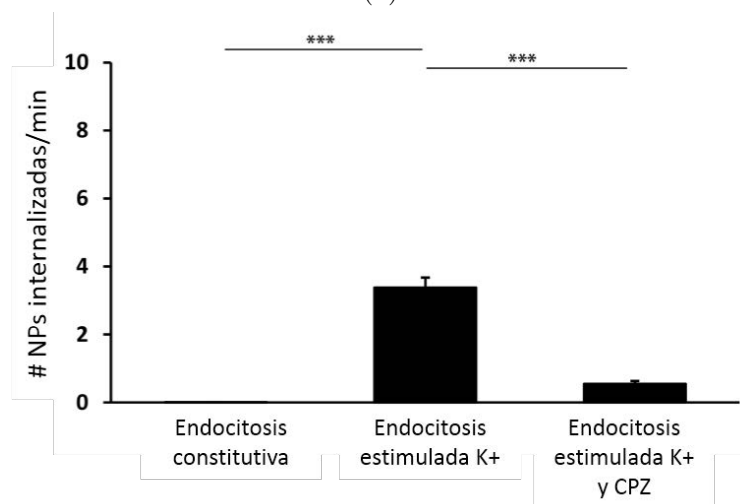
Figura 6.1: Imagen de fluorescencia tomada en el microscopio construido de una célula con NPs de oro de 10 nm de diámetro internalizadas por un estímulo externo de K^+ . Las NPs se observan como puntos brillantes limitados por difracción. La escala es 10 μm .

Como siguiente paso, se estudió si el tipo de endocitosis de las vesículas observadas estaba regulada por la proteína clatrina. La endocitosis mediada por clatrina se produce en condiciones de actividad moderada, cuando los cambios de concentración de Ca^{2+} intracelular permiten que una cierta cantidad de vesículas se fusionen con la membrana plasmática. Los casos de endocitosis tipo *bulk*, en cambio, son aquellos en los que la actividad es intensa y la gran concentración de Ca^{2+} generada produce una fusión masiva de vesículas [114]. Se preincubaron las células con clopromazina (CPZ) 15 μM durante 5 minutos previos a la internalización de NPs por vía de estimulación con K^+ . La clopromazina es un inhibidor del ensamblado de clatrina en la membrana celular, lo cual inhibe la formación de vesículas recubiertas de clatrina [134]. Los resultados del análisis de la internalización de NPs para endocitosis constitutiva, estimulada con K^+ sin CPZ, y estimulada con K^+ en presencia de CPZ, se presentan en la Figura 6.2. Es evidente que hay una disminución significativa en la formación de vesículas para el caso de las células tratadas con CPZ, que resulta en $1,36 \pm 0,22$ NPs internalizadas por minuto. Esto indica que la internalización de las vesículas cargadas con NPs es principalmente una endocitosis clatrina-dependiente.

En la Figura 6.3 se esquematiza un proceso de endocitosis de vesículas mediada por clatrina. Una vez determinado el mecanismo que domina la en-



(a)



(b)

Figura 6.2: Número de NPs internalizadas según el tipo de endocitosis. (a) Cantidad de NPs contabilizadas a partir de imágenes adquiridas luego de 24 hs (constitutiva) o 5 minutos (estimulada con y sin CPZ). (b) Fracción de NPs internalizadas por minuto. Se analizaron 19, 25 y 26 células de al menos 3 cultivos diferentes para las diferentes vías de endocitosis: constitutiva, estimulada, y estimulada en presencia de CPZ respectivamente. *** $p < 0.0001$.

docitosis de estas vesículas, se procedió en la medición y el análisis de las trayectorias de vesículas individuales en el citoplasma de células cromafines.

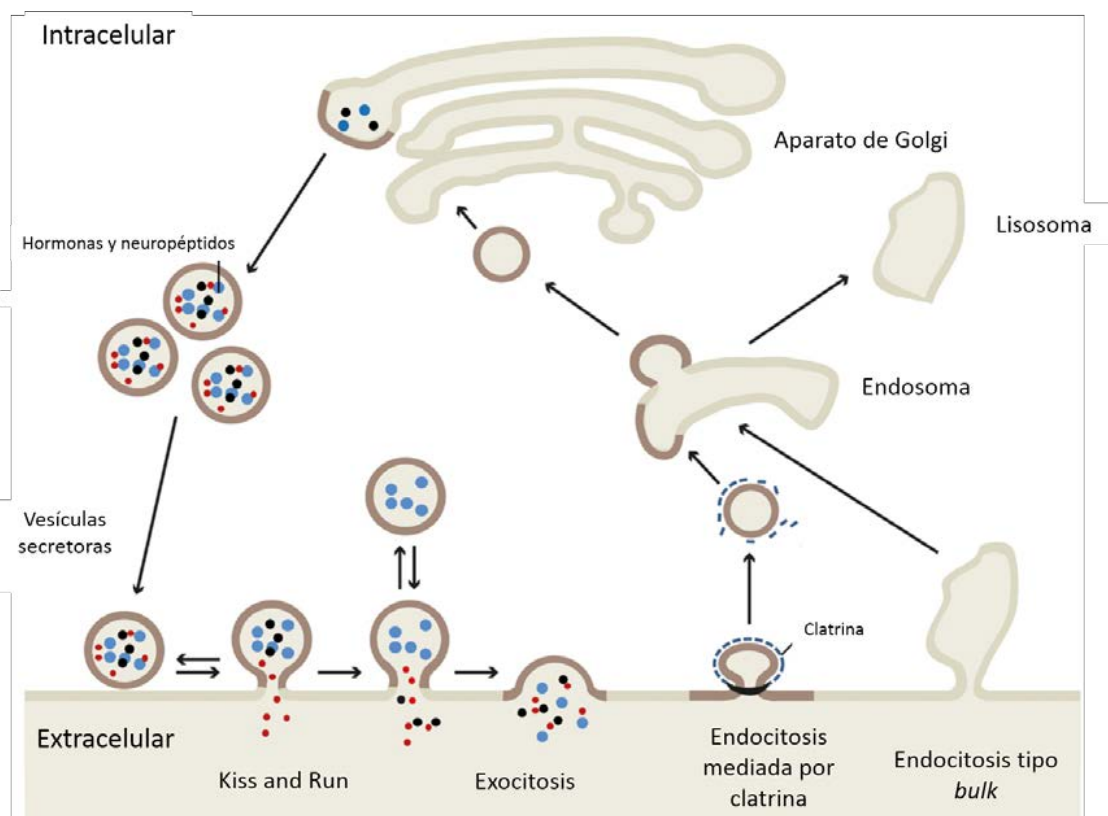


Figura 6.3: Endocitosis y reciclado vesicular. A partir de la estimulación, la entrada de Ca^{2+} dispara la fusión de vesículas, que puede ser transitoria, de tipo bulk o por la vía dependiente de clatrina. Las vesículas endocitadas por clatrina son transportadas hacia endosomas y luego al Golgi, donde se cargan de las hormonas y neuropéptidos que serán encargadas de transportar. Si la estimulación continúa, las vesículas cargadas comienzan una vía secretoria y finalmente se excitan a la región extracelular. Figura modificada de la referencia [135].

6.5. Análisis de trayectorias experimentales

Se midieron las trayectorias en tres dimensiones de NPs individuales utilizando el método de seguimiento por barrido orbital. Para ello, al finalizar los 5 minutos de incubación de NPs con K^+ , se colocaron las células en el microscopio y se observaron primero por campo claro para elegir aquellas cuya geometría y contraste evidenciaran que se encontraban en condiciones fisiológicas.

gicas normales. Luego de elegir una célula, se tomaron imágenes de barrido de la célula ampliada y centrada en el campo de visión para localizar las NPs internalizadas.

Durante los primeros minutos luego de la internalización, las NPs se observan a no más de $1,5 \mu\text{m}$ del borde celular (identificado a partir de la señal de autofluorescencia de la célula). Esto concuerda con resultados previos que reportan la localización de vesículas a los pocos minutos luego de la aplicación del estímulo [136].

Antes de comenzar a medir la trayectoria de una NP, es importante seleccionar los parámetros involucrados en la medición (como fue descrito en la sección 3.2.2). En primer lugar, se adquiere una imagen de la célula usando un aumento o *zoom* lo más grande posible pero conservando a toda la célula dentro de la imagen. Esto define el tamaño del píxel, que es en definitiva el tamaño del paso de la trayectoria medida. Durante los experimentos presentados en esta sección se utilizó una órbita de 150 nm de radio, un periodo entre 8 y 32 ms , 128 puntos por órbita, y una distancia axial (entre la órbita superior e inferior) de $1,5 \mu\text{m}$. En todos los casos se promediaron 4 periodos por ciclo para mejorar la relación señal/ruido.

En la Figura 6.4a se puede ver el ejemplo de una trayectoria de 5 minutos de duración superpuesta sobre la imagen de fluorescencia de la célula. El inicio de la trayectoria, marcado con un punto verde, se observa en el lugar donde se encuentra la NP (cercana a la membrana plasmática) ya que la imagen de la célula fue adquirida unos instantes antes de comenzar el seguimiento. Se puede inferir de la imagen la ubicación del núcleo de la célula en la región más oscura, es decir, con menor señal de autofluorescencia.

En (b) se muestra la trayectoria coloreada según el valor de la intensidad de cada punto (obtenido como el valor medio de las 4 órbitas del ciclo). Los cambios de intensidad son característicos de la emisión de una NP de oro en un entorno heterogéneo. Como fue estudiado en trabajos previos [124, 137], debido a las propiedades plasmónicas de las nanopartículas metálicas, la señal proveniente de la nanopartícula varía según las moléculas que se encuentran en su cercanía (a pocos nanómetros de su superficie). No es sorprendente, entonces, que a medida en que la NP recorre la célula, la intensidad detectada presente variaciones.

Por último en (c) se puede observar la trayectoria en tres dimensiones.

Es evidente que en el eje axial la medición tiene un ruido mayor, debido a que en esta dirección la posición de la partícula se define únicamente con la información de dos puntos (promedio de intensidad de las dos órbitas). Por este motivo, si bien todos los experimentos de seguimiento fueron realizados en tres dimensiones, para el análisis que se presenta en las siguientes secciones se tuvieron en cuenta las trayectorias en xy .

6.5.1. Velocidad instantánea

Las trayectorias de vesículas individuales medidas en este trabajo tienen varios minutos de duración (10 minutos en su mayoría, y hasta una hora las más extensas) con una resolución temporal del orden de 8 a 32 ms, dependiendo de la cantidad de ciclos promediados en cada caso. Lograr trayectorias de esta duración es producto de que con el método de barrido orbital al iluminar sólo un punto de la muestra, se genera un fotodaño mucho menor al de las técnicas que hacen seguimiento de partículas por imágenes, además de ser mucho más veloz la adquisición de cada punto. Al mismo tiempo, el uso de nanopartículas metálicas soluciona el problema del fotoblanqueo o *bleaching* que también suele limitar la duración de este tipo de experimentos. Al tratarse entonces de trayectorias de varios minutos, es importante considerar los cambios en la dinámica intracelular que suelen suceder dentro de esta escala de tiempo.

Una forma de hacerlo es calculando la velocidad instantánea, es decir, la velocidad punto a punto a lo largo de la trayectoria medida. Considerando las posiciones r_i y r_{i+1} y el tiempo t entre la medición de cada punto de la trayectoria (que corresponde al tiempo del ciclo), la velocidad instantánea se calcula como $(r_{i+1} - r_i)/t$. En dos dimensiones, se tiene:

$$v_i = \sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2}/t \quad (6.1)$$

Utilizando la expresión (6.1), se calculó la velocidad instantánea para cada punto de la trayectoria. La Figura 6.6a muestra una trayectoria típica en la cual la escala de colores codifica velocidad instantánea. Se puede observar que, efectivamente, la velocidad no es uniforme a lo largo de la trayectoria. Esto indica que pueden existir cambios en el tipo de movimiento de la vesícula a medida que explora diferentes regiones celulares. El método clásico para distinguir entre tipos de movimiento es el Desplazamiento Cuadrático Medio.

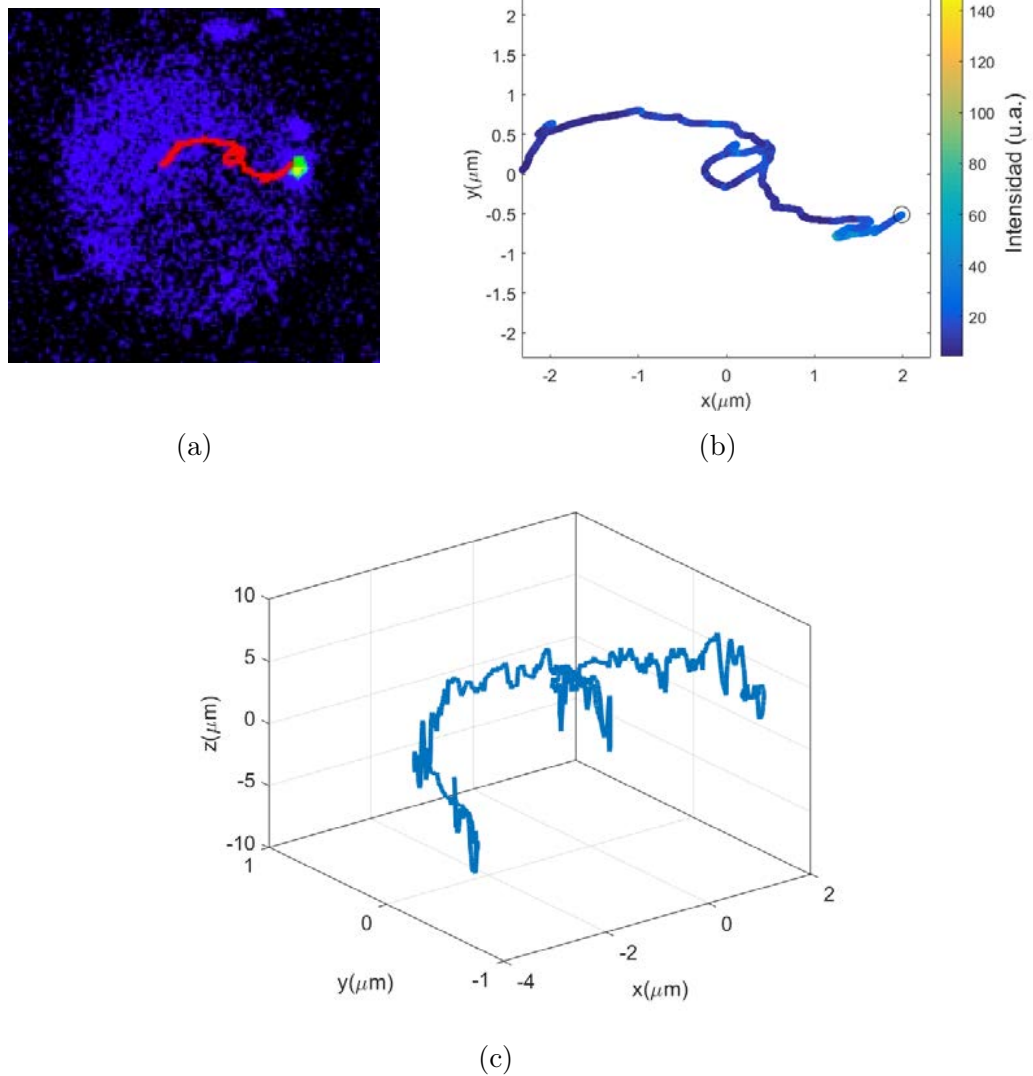


Figura 6.4: Ejemplo de una trayectoria experimental medida en el citoplasma de una célula cromafin. (a) La trayectoria superpuesta con la imagen de fluorescencia de la célula muestra la región explorada por la NP en los 5 minutos de duración del experimento. (b) Variaciones de intensidad a lo largo de una trayectoria observadas en código de colores. (c) Gráfico en 3D de la trayectoria completa.

6.5.2. Desplazamiento Cuadrático Medio

Existen diversas herramientas para analizar trayectorias. El Desplazamiento Cuadrático Medio (MSD por sus siglas en inglés) es uno de los métodos más utilizados [38, 138, 139]. El MSD es una medida del desplazamiento de la partícula respecto de un punto de referencia y tiene una expresión analítica conocida para distintos tipos de movimiento (Browniano, confinado, dirigido, con deriva, entre otros) [71]. Para calcularlo, se consideran segmentos de n puntos, variando n , y para cada uno se calcula el MSD según la expresión (6.2):

$$MSD(n) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} (x_{i+n} - x_i)^2 \quad (6.2)$$

donde N es el número total de puntos de la trayectoria. Si τ es el tiempo de adquisición de cada punto de la trayectoria (que equivale al tiempo por ciclo en nuestro caso), los puntos x_i y x_{i+n} están separados un tiempo $n\tau$. Se llama $t=n\tau$ el tiempo de retardo o *lag time* y es el parámetro del que depende el MSD. La cantidad total de desplazamientos que se promedian para cada punto de la curva del MSD es $N-n$, de modo que para n cercanos a N la significancia estadística es menor. Para este trabajo, se calculó el MSD para $n = 1, \dots, N/4$ ya que el criterio más aceptado considera segmentos de hasta el 25 % de la duración total de la trayectoria [34, 71, 140].

La forma más general de describir el desplazamiento cuadrático medio de una partícula en movimiento con un coeficiente de difusión D es:

$$MSD(t) = 4Dt^\alpha \quad (6.3)$$

con α un parámetro que depende del tipo de movimiento, siendo $\alpha = 1$ para movimiento difusivo libre, $\alpha > 1$ para movimiento activo y $\alpha < 1$ para movimiento confinado. En la Figura 6.5 se muestra la forma de la curva de MSD para distintos tipos de movimiento. A partir del ajuste de esta curva es posible extraer el valor de α y, por ende, se puede estimar el tipo de movimiento que domina la dinámica descrita por la trayectoria analizada. Trabajos previos [141–143] sugieren que las distintas situaciones biológicas que transcurren en el entorno celular suelen dar lugar a cambios en el tipo de transporte, pasando de ser Browniano a activo en pocos minutos.

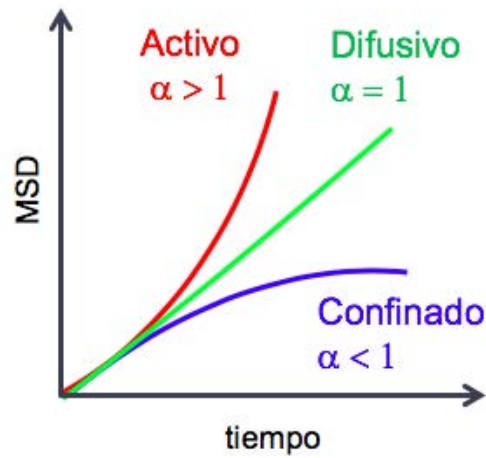


Figura 6.5: Forma característica de la curva de MSD según el tipo de movimiento: activo ($\alpha > 1$), difusivo ($\alpha = 1$) y confinado o restringido ($\alpha < 1$).

Una forma de tener una idea del MSD a nivel local es calculando un valor del parámetro α para cada punto de la trayectoria. Para hacer esto, se comienza tomando un segmento con los primeros M puntos de la trayectoria, es decir desde el punto 1 hasta el $1+M$ (en este caso $M = 1000$), se calcula el MSD y a partir del ajuste se obtiene un valor de α . Este valor es asignado al punto que se encuentra en el medio del segmento. Se repite este procedimiento para el segmento desde 2 hasta $2+M$, y así hasta completar la trayectoria. En total, se tendrá un valor de α para cada punto de la trayectoria, exceptuando los primeros y los últimos $M/2$ puntos. La Figura 6.6b muestra la trayectoria coloreada según el parámetro α .

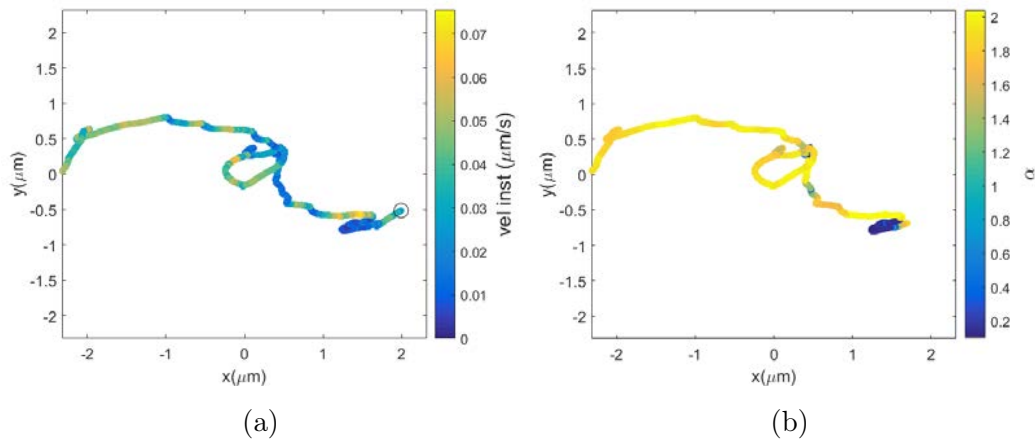


Figura 6.6: Análisis local de la movilidad de la partícula a lo largo de la trayectoria. (a) Velocidad punto a punto. (b) Análisis del MSD punto a punto indicando el tipo de movimiento ($\alpha > 1$ activo, $\alpha < 1$ restringido).

La Figura 6.6 muestra un ejemplo de las variaciones que presenta el movimiento de una vesícula durante su recorrido. Al comienzo de la trayectoria, cuando la vesícula aún se encuentra próxima a la membrana, se distingue una región donde la velocidad instantánea adquiere los valores más bajos y esto coincide con el resultado del MSD que muestra que el movimiento es restringido o confinado ($\alpha < 1$, tonos azules). Los puntos siguientes de la trayectoria están descritos principalmente por un movimiento activo ($\alpha > 1$, tonos amarillos) en el que la velocidad de la vesícula varía casi un orden de magnitud.

6.5.3. Variabilidad de las trayectorias

El análisis descrito en la sección anterior se repitió sobre todas las trayectorias medidas en los minutos posteriores a la internalización, y el resultado mostró un comportamiento heterogéneo. Cada trayectoria presenta diferentes variaciones de velocidad y de desplazamiento medio, independientemente del tiempo transcurrido desde la internalización. La Figura 6.7 muestra las trayectorias de 60 experimentos diferentes. La variabilidad es evidente. En algunos casos el movimiento es casi despreciable, mientras que en otros casos la vesícula explora una región considerable de la célula.

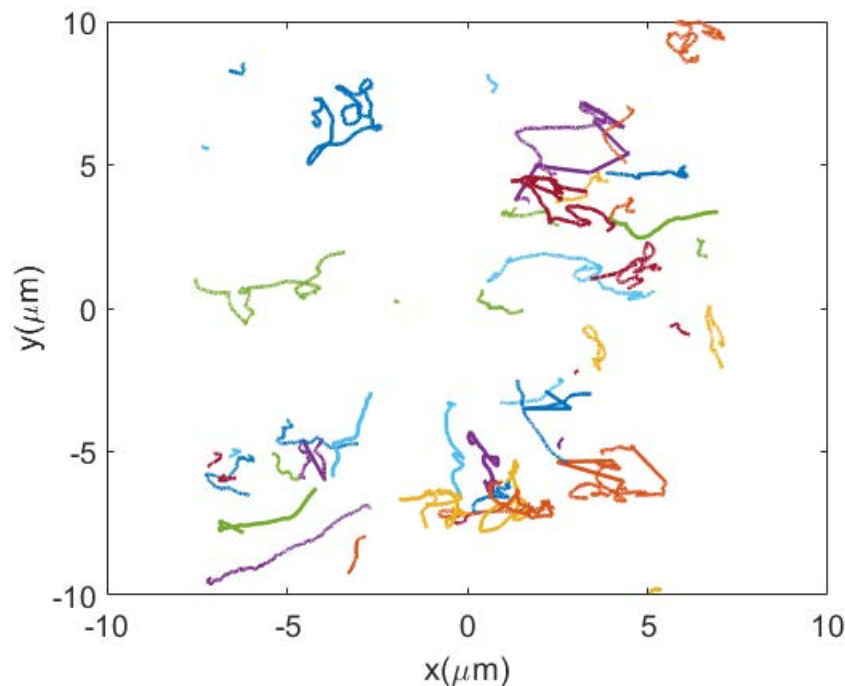


Figura 6.7: Las trayectorias obtenidas de 60 mediciones diferentes reflejan la variabilidad en el tipo de movimiento, desplazamiento, distancia recorrida y direccionalidad.

De la Figura 6.7 se desprende asimismo que no todas las vesículas se transportan en la misma dirección. Cuando se incuban las NPs con una solución de K^+ , la concentración de iones en el medio induce un cambio en el potencial de acción sobre la membrana y esto estimula la exocitosis y como consecuencia la endocitosis. En el momento de seleccionar una NP internalizada para seguir, en principio no es posible distinguir si se trata de una vesícula que se encuentra en el proceso de endocitosis, o si se trata de una vesícula secretora.

Para determinar si las vesículas estudiadas se dirigen desde la periferia celular hacia el núcleo, o desde el interior hacia la membrana, se analizó la superposición de la imagen de fluorescencia de la célula con cada trayectoria. Sorpresivamente, la dirección del movimiento no es unívoca sino que evidencia variaciones, tanto en una misma trayectoria como comparando entre las trayectorias diferentes. Se clasificaron las trayectorias según la dirección del movimiento (Figura 6.8). Este análisis mostró que el 29 % de las vesículas analizadas se transportan en forma directa desde la membrana hacia el núcleo

(N), mientras que el 24 % se dirige desde el interior directamente hacia la membrana (M). Existen además casos en los que la vesícula cambia su dirección a lo largo de la trayectoria. Los resultados muestran que un 17 % de las vesículas se dirigen hacia el núcleo y luego lo bordean (N-B), 14 % permanecen en el borde del núcleo (B), 7 % primero se encuentran bordeando el núcleo y luego se dirigen hacia la membrana (B-M), 3 % de las vesículas van hacia la membrana primero y bordean el núcleo después (M-B) mientras que otro 3 % van hacia la membrana y luego hacia el núcleo directamente sin bordearlo (M-N), y el último 2 % se dirige hacia el núcleo, luego lo bordea y finalmente cambia su dirección hacia la membrana (N-B-M).

6.6. Movimiento vesicular en respuesta a un estímulo

En el grupo de nuestros colaboradores observaron previamente que en células cromafines de ratón una estimulación intensa y prolongada con alto K^+ genera exocitosis masiva y por ende endocitosis masiva, en la cual se internaliza una importante fracción de membrana que es rápidamente (≤ 2 minutos) reciclada hacia vesículas liberables. Para estudiar este comportamiento, en esta parte del trabajo se estudió el movimiento de las vesículas después de una segunda aplicación de K^+ . Esto es, una vez que las NPs fueron internalizadas por vía estimulada, se repitieron los experimentos pero aplicando un segundo estímulo de K^+ durante la medición, sin dejar de seguir a la NP.

La complejidad de esta condición experimental radica en que, para no interrumpir el experimento, la solución de K^+ debe agregarse en total oscuridad (el PMT está encendido) y con el cuidado necesario para no inducir movimiento sobre la muestra, ya que esto afectaría la medición. Un leve movimiento (pocos micrones) dejaría a la célula fuera del campo visual. Por este motivo, muchas mediciones tuvieron que ser descartadas y sólo fueron consideradas para el análisis aquellas en las que se pudo agregar la solución sin dejar de medir la trayectoria de las vesículas. En total las trayectorias medidas duran entre 5 y 10 minutos y, sabiendo el instante en el que se aplicó el segundo estímulo, se separaron las trayectorias medidas en una parte pre-estimulada y otra post-estimulada.

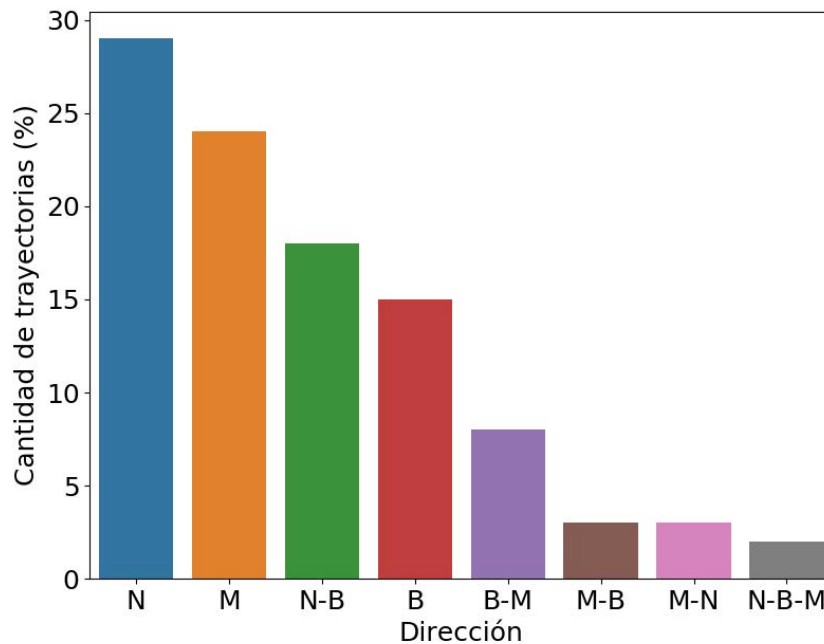


Figura 6.8: Análisis de direccionalidad del movimiento. M: se dirige directamente hacia la membrana. N: se dirige directamente hacia el núcleo. N-B: se dirige hacia el núcleo y luego lo bordea. B-M: comienza bordeando el núcleo y luego va hacia la membrana. B: permanece en el borde o cercanía del núcleo. N-B-M: se dirige hacia el núcleo, luego lo bordea y finalmente va hacia la membrana. N-M: se dirige hacia el núcleo y luego hacia la membrana. M-N: se dirige hacia la membrana y luego hacia el núcleo. N-B-M: se dirige hacia el núcleo, lo bordea y va hacia la membrana.

Para distinguir entre la movilidad de las vesículas antes y después del estímulo, se analizó el MSD de las trayectorias pre y post estimuladas. Teniendo en cuenta que un MSD global no describe los cambios de movilidad intermedios que puede haber en la trayectoria, para calcular el MSD se segmentaron las trayectorias por minuto, y se calculó el MSD y su ajuste sobre cada sub-trayectoria. El análisis realizado sobre una trayectoria representativa se muestra en la Figura 6.9, donde se separan los resultados de las sub-trayectorias antes (a) y después (b) de aplicar el segundo estímulo. Se analizaron 68 sub-trayectorias de las cuales en el 92,6% de los casos el MSD se ajustó exitosa-

mente por un modelo de transporte dirigido ($\alpha > 1$). Este resultado indica que el movimiento de las vesículas que fueron internalizadas y estimuladas por segunda vez con K^+ es dirigido tanto antes como después de este segundo estímulo.

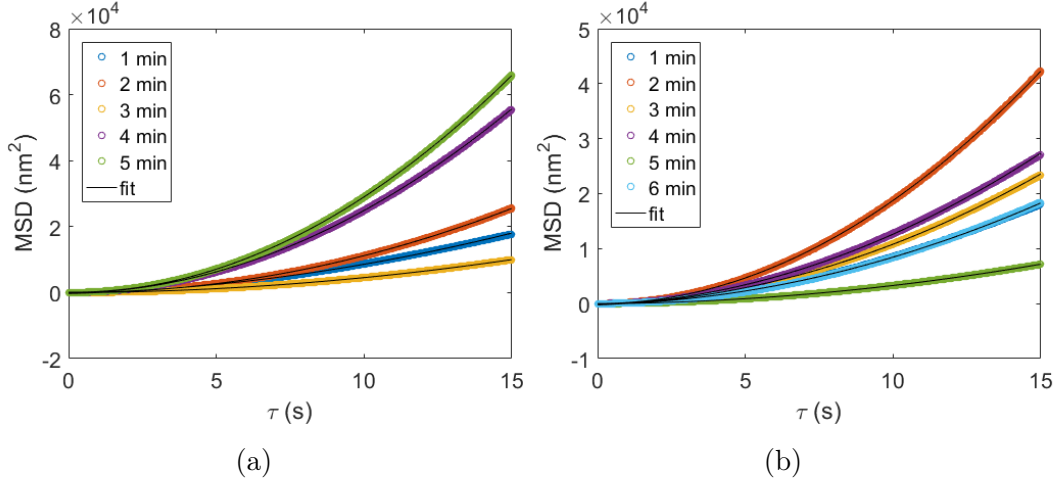


Figura 6.9: Desplazamiento cuadrático medio de trayectorias segmentadas por minuto y ajustadas por un modelo de movimiento dirigido ($\alpha = 2$). (a) Trayectorias pre-estimuladas. (b) Trayectorias post-estimuladas.

Como paso siguiente, se calculó la velocidad instantánea para cada punto de la trayectoria utilizando la expresión (6.1). La Figura 6.10 muestra una trayectoria pre-estimulada (a) y una post-estimulada (b) coloreadas según su velocidad instantánea. Para comparar entre las dos condiciones, se realizó un histograma con la distribución de los valores de velocidad instantánea de la misma trayectoria separando entre pre y post estimulada (Figura 6.11). Lo que se puede observar a simple vista es que para la trayectoria post-estimulada aumenta la cantidad de velocidades más bajas mientras que disminuyen las velocidades más altas. Un test de Mann-Whitney [144, 145] sobre ambas distribuciones para todas las células medidas confirma que son diferentes. Esto quiere decir que luego de aplicar el segundo estímulo de K^+ las vesículas internalizadas enlentecen su movimiento.

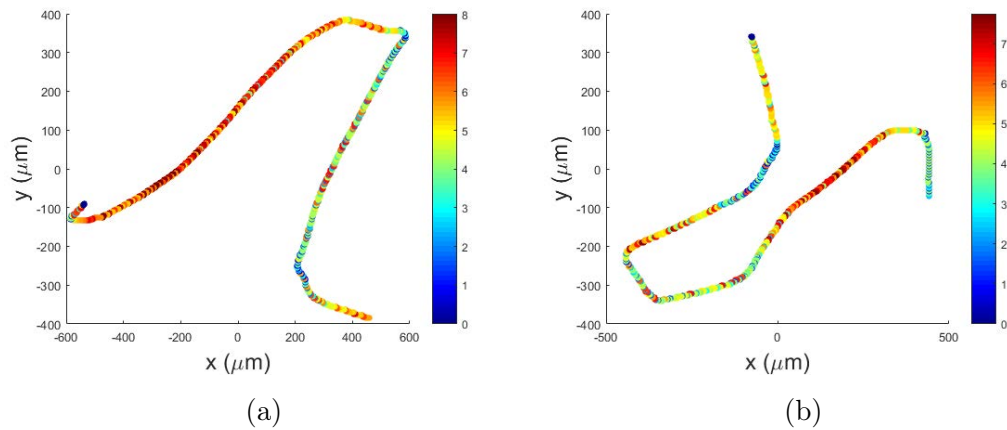


Figura 6.10: Trayectorias coloreadas por velocidad instantánea. Para obtener una mejor visualización, se promedia la velocidad instantánea cada 40 puntos. (a) Trayectorias pre-estimuladas. (b) Trayectorias post-estimuladas.

En un primer momento, estos resultados podrían parecer anti-intuitivos. Dado que el estímulo activa los canales de Ca^{+2} provocando un incremento del Ca^{+2} citosólico durante varios segundos [146] sería razonable esperar un incremento en el movimiento dirigido de las vesículas a través del citoesqueleto [147]. Sin embargo, una posible explicación al movimiento observado es que la estimulación favorece que las vesículas ingresen en compartimentos como endosomas o el Golgi [148–150]. Fue previamente reportado que en células neuronales y neuroendocrinas, las vesículas internalizadas a través de endocitosis clatrina-dependiente se fusionan fácilmente con endosomas [150] y esta fusión es estimulada por la concentración de Ca^{+2} citosólico [147].

Por último, se analizó la distancia recorrida a lo largo de la trayectoria. Esto es igual a la suma de las distancias entre puntos consecutivos en toda la trayectoria, normalizada por el tiempo de duración de cada experimento. Este parámetro provee otra forma de cuantificar el movimiento de la partícula. Un diagrama de la densidad de probabilidades de distancia recorrida, o diagrama de “violín”, puede verse en la Figura 6.12. Este diagrama muestra que los intervalos de distancia recorrida en ambos casos se superponen, pero en el caso pre-estimulado (azul) la densidad tiene un máximo mayor que en el caso post-estimulado (rojo), donde la dispersión en distancias es más grande.

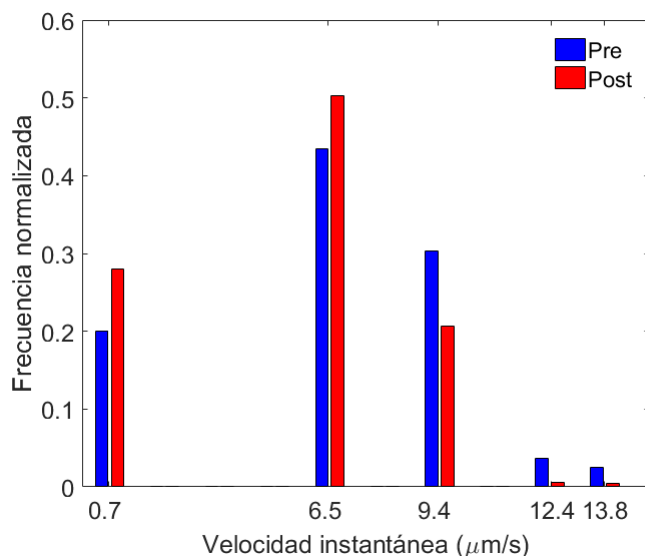


Figura 6.11: Histograma de velocidades instantáneas para una trayectoria separando en pre (azul) y post (rojo) estímulo. Un test estadístico de Mann-Whitney confirma que las distribuciones son diferentes con un nivel de significancia de 0,05.

6.7. Comentarios finales

Los métodos convencionales que son más comúnmente utilizados para experimentos de seguimiento de partículas individuales permiten obtener trayectorias con resolución espacial de unos pocos nanómetros, pero están generalmente limitados en la duración del experimento. Esto es en gran parte debido a que las sondas fluorescentes utilizadas para marcar las partículas de interés sufren de fotoblanqueo. En este Capítulo presentamos la combinación del método de seguimiento por barrido orbital en un microscopio por absorción de dos fotones junto con el uso de nanopartículas metálicas para estudiar el tráfico vesicular en células cromafines neuroendocrinas.

Estudios previos han sugerido que estas vesículas tienen un movimiento complejo y variable [119]. La posibilidad de seguir nanopartículas metálicas por decenas de minutos nos permitió en este trabajo determinar los cambios en el movimiento vesicular a lo largo de su trayectoria, lo cual fue analizado a partir del cálculo de la velocidad, el desplazamiento cuadrático medio y la direccionalidad de las mismas. Se estudió asimismo la respuesta frente al

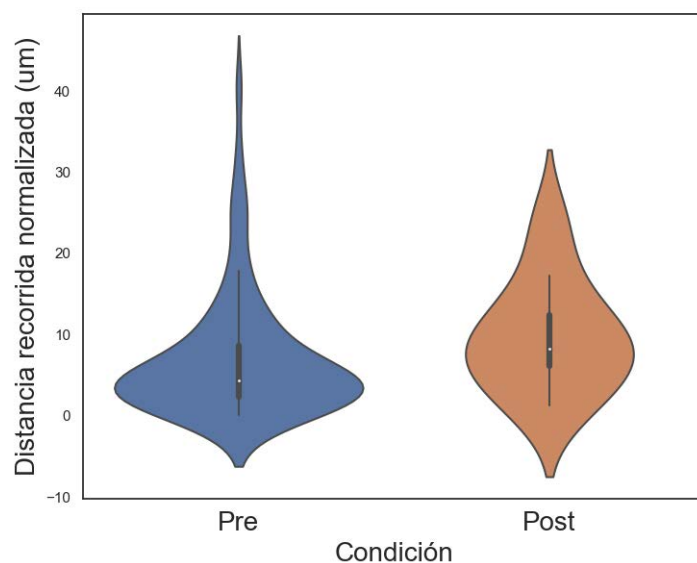


Figura 6.12: Distribuciones de la distancia recorrida normalizada por el tiempo de duración de la trayectoria para las condiciones pre y post estímulo.

cambio del potencial de acción de la membrana inducido por la aplicación de un estímulo externo de alto potasio. Los resultados permitieron determinar que las vesículas se mueven respondiendo a un transporte dirigido y disminuyen su velocidad en respuesta al estímulo.

El análisis realizado en este capítulo muestra que cuando se obtienen trayectorias de larga duración, es importante analizar el comportamiento en cada punto, ya que un análisis global de las mismas permite visualizar los cambios y variaciones que la partícula experimenta en su recorrido.

Capítulo 7

Dinámica de la proteína cápside del virus Dengue

En el interior celular co-existen una amplia variedad de procesos dinámicos que ocurren a distintas escalas espaciales y temporales. Desde pequeñas moléculas que difunden libremente, hasta grandes complejos que interactúan con el entorno. Para poder seguir la trayectoria de partículas individuales es necesario que las mismas estén lo suficientemente aisladas para distinguirlas y que la resolución espacio-temporal del método supere a las variables dinámicas que rigen el movimiento de las partículas. En casos en los que se quiere estudiar la dinámica de un conjunto de moléculas, los métodos basados en la correlación de la señal de fluorescencia aparecen como herramientas capaces de extraer información cinética de manera no invasiva. En particular, como se mencionó anteriormente, las técnicas de correlación de imágenes mantiene las ventajas de la espectroscopia de correlación de la fluorescencia en un punto, agregando información espacial.

La proteína de cápside del virus del dengue al igual que la de otros flavivirus, como el Zika y el virus de fiebre amarilla, cumple un rol central en el desnudamiento del genoma viral durante los primeros pasos del proceso de infección. Por este motivo la proteína de cápside ha surgido en el último tiempo como importante candidata para el diseño de agentes antivirales. En este Capítulo se estudia la dinámica de cápside del virus del Dengue durante el proceso de infección.

7.1. Motivaciones

Dengue es la enfermedad viral humana transmitida por insectos más importante a nivel mundial. El virus del Dengue (DENV) pertenece a la familia de los flavivirus junto con otros importantes patógenos humanos, como el Zika, el virus de la fiebre amarilla o el Nilo Occidental. Se estiman 390 millones de infecciones de dengue cada año en el mundo [151]. América Latina es una de las zonas más afectadas por esta enfermedad, presentando un número de infecciones que ha ido aumentando cada vez más en la última década. Las epidemias explosivas que se presenciaron en los últimos años en nuestro país, Bolivia, Paraguay y Brasil, son una muestra concreta de la urgencia para atender este tipo de infecciones.

A pesar de los esfuerzos y el creciente interés público para desarrollar antivirales contra este virus, aún no están disponibles vacunas efectivas, agentes terapéuticos ni fármacos específicos para controlar la replicación del virus. Una importante limitación para encontrar soluciones a este problema es la falta de conocimiento acerca del virus de su interacción y proceso de replicación en la célula huésped.

La partícula de DENV es un icosaedro de 50 nm conformado por una membrana lipídica (obtenida de las células del huésped), sobre la cual se insertan las proteínas estructurales de envoltura (E) y membrana (M), y en cuyo interior contiene al complejo nucleocápside formado por el genoma viral (una sola molécula de ARN de polaridad positiva) asociada a múltiples copias de la proteína de cápside (C) [152, 153].

La entrada del virus tanto en células de mamífero como en las de mosquito, se inicia con el acercamiento del virus a la superficie de la célula que será infectada (o célula huésped) [154]. Luego, la proteína de envoltura del virus interactúa con proteínas de la membrana de la célula huésped, favoreciendo la entrada por endocitosis del virus [155, 156]. Ya en el interior celular se libera el genoma viral, iniciando así el ciclo de infección [157, 158]. La infección induce una reorganización de las membranas celulares que originan los complejos de replicación, en los cuales tiene lugar la amplificación del genoma por la ARN-polimerasa. Este proceso está esquematizado en la Figura 7.1. Una vez amplificados los componentes virales y habiéndose replicado el genoma viral, el ensamblado de la nueva partícula viral ocurre en la membrana del retículo endoplasmático (ER), donde cápside recluta al genoma viral para formar la

nucleocápside. Al liberarse del ER, la membrana de la partícula viral contiene las proteínas de membrana y envoltura, y viaja a través de la vía secretora para ser liberada fuera de la célula por exocitosis [159].

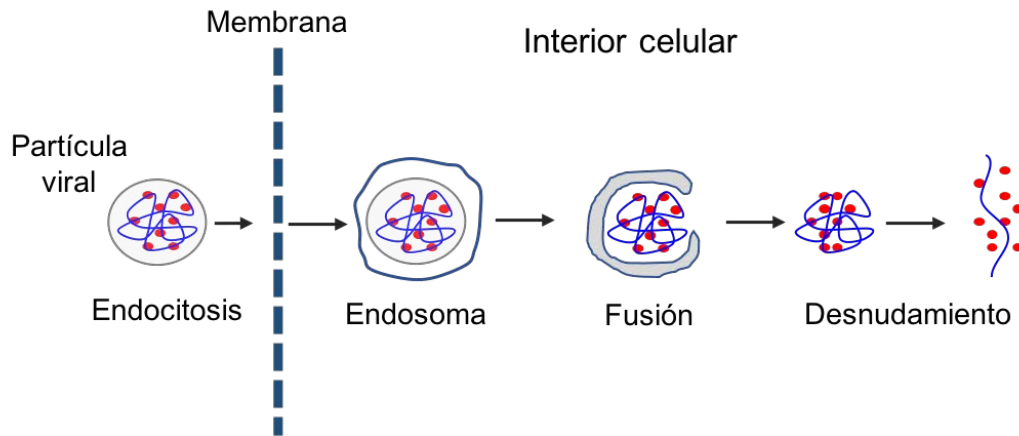


Figura 7.1: Representación esquemática de la vía de infección del virus dengue. La partícula viral consiste en una molécula de ARN (representada en azul) con múltiples copias de la proteína cápside (rojo). La partícula ingresa a la célula formando un endosoma. A partir de la fusión de la membrana del endosoma con la membrana de la partícula, se desnuda el genoma viral en el citoplasma celular y comienza la replicación.

La proteína de cápside tiene el rol de reclutar al genoma viral durante la formación de nuevas partículas virales, pero también tiene la función de liberar al genoma viral durante una nueva infección [160]. Estos dos roles, la encapsidación y desnudamiento del genoma, son procesos fundamentales en el ciclo de replicación viral. Sin embargo, sus mecanismos son poco conocidos tanto para dengue como para otros flavivirus [161].

Como fue explicado anteriormente, cuando el virus infecta una célula y sus proteínas estructurales son sintetizadas a partir de la maquinaria celular, la nueva proteína C generada se distribuye en distintos compartimentos celulares. A pesar de que su función en la encapsidación de nuevas partículas se lleva a cabo principalmente en el retículo endoplásmico, se ha observado la presencia de C en el citoplasma, en nucleolo y en gotas lipídicas a partir de ensayos de inmunofluorescencia (ver Figura 7.2) [162, 163]. Esta distribución se observa de forma temprana luego de la infección, lo cual sugiere que no se trata de

una consecuencia por daño celular durante la replicación viral. La función y los procesos intracelulares que llevan a esta distribución de cápside durante la infección son desconocidos.

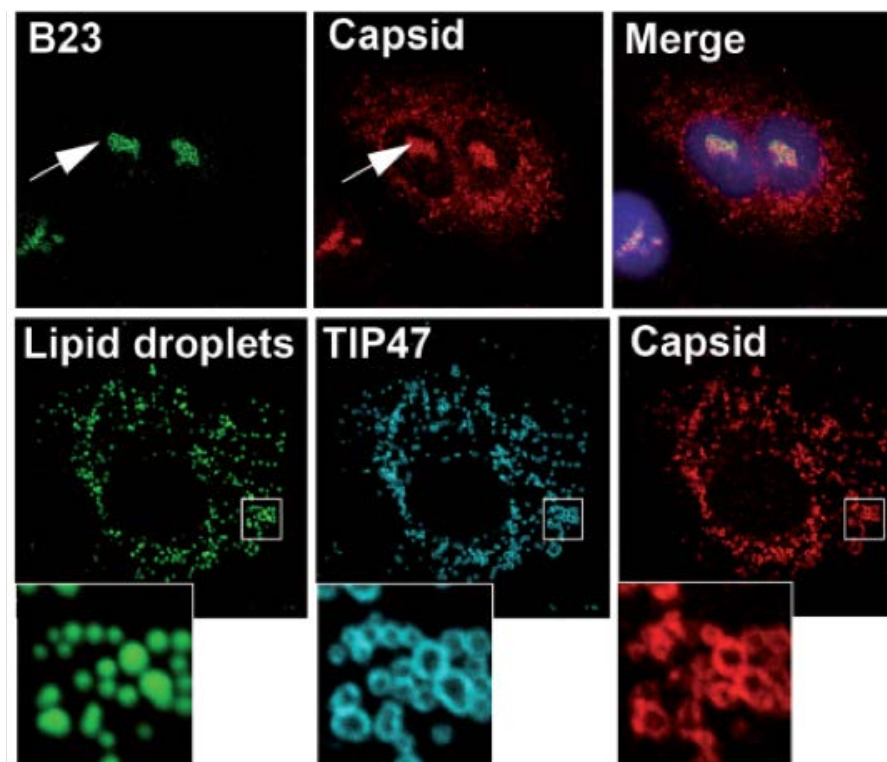


Figura 7.2: Localización subcelular de cápside de DENV en células infectadas. Inmunofluorescencia de C respecto a distintos marcadores. Arriba: anti-B23 (nucleolo). Abajo: anti-TIP47 (gotas lipídicas o LDs). Figura extraída de la referencia [163].

La capacidad de poder marcar fluorescentemente a las proteínas estructurales del virus permite visualizar la distribución intracelular de las mismas y, en algunos casos, permite también obtener información sobre su dinámica e interacciones. Gran parte de los trabajos realizados hasta el momento sobre dinámica de virus de Dengue se han basado en la marcación de las proteínas de la envoltura y de membrana, limitándose entonces al estudio de la primera etapa de la infección hasta la liberación del genoma viral [35]. Kumar y colaboradores [164] han estudiado la cinética de cápside dentro del entorno celular por medio de FRAP y FLIP, lo cual es posible fusionando la proteína a un

fluoróforo. Para ello, transfectan un plásmido con la proteína ya fusionada al fluoróforo, es decir que no trabajan con el genoma viral completo y por lo tanto no se trata de una infección real.

Recientemente, el grupo de Andrea Gamarnik del Instituto Leloir ha logrado diseñar virus recombinantes a partir de clones infecciosos, donde la región codificante para la proteína C se fusiona a la secuencia de una proteína fluorescente. De esta forma se obtienen proteínas de cápside marcadas en el contexto de células donde el genoma viral se traduce y se replica. Esto permite realizar ensayos de microscopía de fluorescencia a nivel de molécula individual. Cada proteína C que es sintetizada en la célula infectada, se encuentra asociada a una proteína fluorescente. Por las características de este sistema, en donde muchas moléculas fluorescentes difunden en un medio y no se las puede visualizar de forma aislada, las técnicas de espectroscopía de correlación resultan una alternativa atrayente para el estudio de la dinámica molecular. El estudio profundo y cuantitativo de la dinámica de la proteína C durante el proceso de infección, apunta a la comprensión de su actividad biológica, lo cual podría tener un impacto en el desarrollo de antivirales contra Dengue.

7.2. Preparación de muestras biológicas y arreglo experimental

Dado que las condiciones de seguridad biológicas de nuestro laboratorio no permiten trabajar con ARN viral, el cultivo celular, la transfección del ARN viral y los experimentos sobre células transfectadas se llevaron a cabo en el Instituto Leloir que cuenta con condiciones de bioseguridad aptas para el trabajo con dengue.

7.2.1. Cultivo celular y transfección del ARN viral

Para poder visualizar la proteína de cápside por microscopía de fluorescencia es necesario modificarla genéticamente para obtener una variante fluorescente. En este trabajo, se utilizó un genoma viral modificado para producir cápside asociada a la proteína mCherry. Cuando la célula es transfectada con el ARN viral modificado, la nueva proteína de cápside que se sintetiza tiene una proteína de mCherry adosada, de modo que es posible visualizarla por

fluorescencia.

La línea celular de riñón de hámster (BHK-21) se cultivó en medio mínimo esencial alfa (α -MEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco) y se mantuvo en estufa a 37 °C con 5 % de CO₂. Los plásmidos con el genoma completo de DENV se linealizaron con la enzima de restricción XbaI. El ARN genómico de DENV se obtuvo por transcripción in vitro utilizando la enzima T7 ARN polimerasa, y se incorporó un CAP m7GpppA. Las transfecciones del ARN infeccioso se realizaron con Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific) y medio Opti-MEM (Gibco) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para todos los experimentos, se transfectaron 50 ng de ARN por pocillo en células BHK-21 crecidas en placas cubreobjetos de vidrio de 8 pocillos (8-wells Thermo Fisher Scientific). Las mediciones se realizaron inmediatamente después de la adición del reactivo de transfección con el ARN viral.

Para los experimentos control con mCherry sola, se transfectaron 500 ng del plásmido pmCherry-C1 (Clontech) en células BHK utilizando el protocolo detallado previamente.

7.2.2. Descripción del instrumental utilizado

Para estudiar la distribución de C-mCherry a partir del momento en que el ARN se introduce en la célula y hacer experimentos de RICS en función de las horas post transfección, se utilizó un microscopio confocal comercial marca *Zeiss* modelo LSM 880 (Carl Zeiss) que se encuentra en el Instituto Leloir y está disponible a través del Sistema Nacional de Microscopía. El microscopio está equipado con seis líneas de láser: un diodo de 405 nm, tres líneas de 458 nm, 488 nm y 514 nm provenientes de un Argón (Argon-Multiline Laser LGK7812 ML5), un He-Ne de 543 nm y un He-Ne de 633 nm. La potencia del láser se ajustó de forma que el fotoblanqueo de la muestra durante el experimento no superara el 10 %. De las lente objetivo disponibles, descritas en esta tesis se utilizó un objetivo C-Apochromat 40x/1.2 w (Carl Zeiss). Para la detección se utilizó un canal espectral con un detector GaAsp (Hamamatsu). El microscopio cuenta además con una cabina termostatazada con temperatura regulable (que se mantuvo a 37 °C para todos los experimentos) y control de CO₂ (que se mantuvo en 5 %).

Todas las mediciones presentadas en este capítulo fueron realizadas utili-

zando este dispositivo.

7.3. Localización subcelular de cápside la infección

Durante el proceso de infección, la proteína C de Dengue se asocia a diferentes compartimentos celulares [165–168]. Ha sido demostrado que cápside se acumula en núcleo y citoplasma, y en este último se distribuye principalmente en la membrana del ER y la superficie de LDs [163]. Para verificar que el genoma viral modificado no afecta la funcionalidad de cápside, se realizó un análisis por inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos contra cápside para el virus *wild type* (WT) (Figura 7.3). Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia muestran que C-mCherry tiene la misma distribución celular que C del virus WT. Por lo tanto, esta construcción permite estudiar las propiedades de cápside en el ciclo de replicación viral.

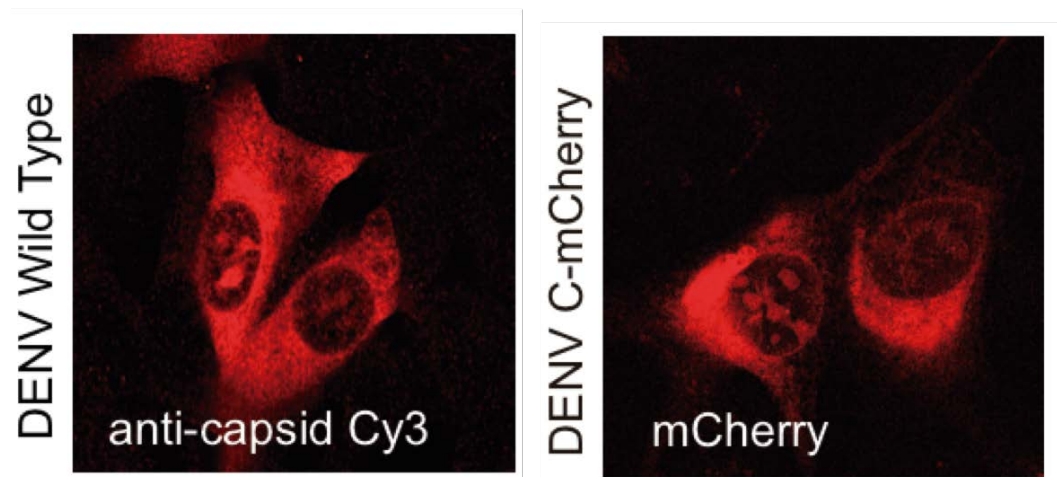


Figura 7.3: Los experimentos de inmunofluorescencia muestran que la distribución de cápside del virus WT y del genoma modificado son equivalentes. (Créditos: Guadalupe Costa Navarro).

Para los experimentos con células vivas, se colocaron las células transfectadas en el microscopio confocal manteniendo la temperatura a 37 °C y el CO₂ en 5%. Se iluminó con el laser de 543 nm y se configuró la detección en 550

- 650 nm de acuerdo con el espectro de emisión de mCherry. Bajo las mismas condiciones, se observaron células control, es decir, células BHK que se cultivaron simultáneamente y se sometieron a los mismos tratamientos pero no fueron transfectadas con el ARN viral. En un primer momento luego de la transfección no se observa diferencia entre las células tratadas y las células control. A medida que comienza a sintetizarse nueva C-mCherry la señal comienza a aumentar y a partir de 1,5 - 2 horas post transfección se empieza a distinguir en unas pocas células la señal de mCherry, localizándose la fluorescencia primero en citoplasma y unos minutos más tarde en nucleolo. Siguiendo el mismo protocolo, se transfectaron las células con un plásmido de mCherry monomérica y se observaron en el microscopio bajo las mismas condiciones. La Figura 7.4a muestra una imagen confocal donde en rojo se puede ver la marca fluorescente que reporta mCherry. La intensidad de la señal observada en nucleolo es esperable dada la alta afinidad de cápside con el ARN [160]. Como se puede observar en la Figura 7.4b, la distribución de intensidad de la célula transfectada con mCherry sola se ve uniformemente distribuida ya que mCherry no interactúa específicamente con ningún componente celular [169, 170].

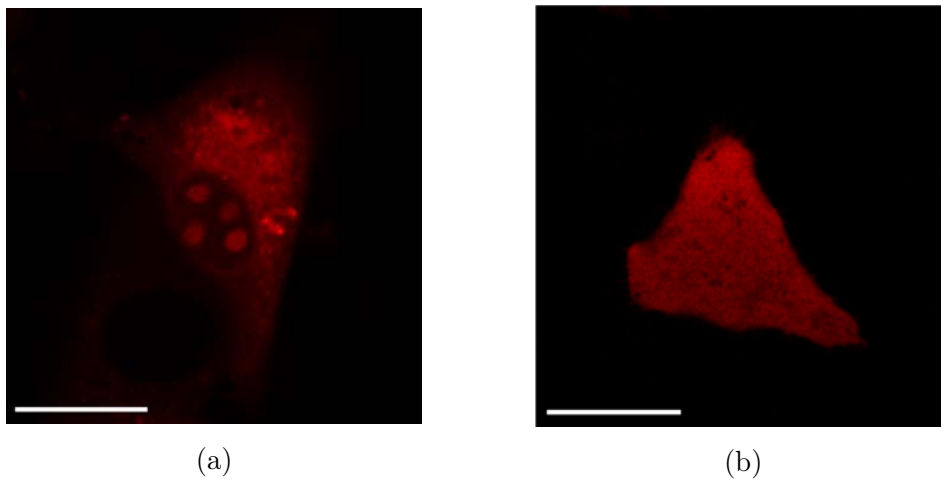


Figura 7.4: Imagen de fluorescencia luego de 4 horas post transfección. (a) Célula transfectada con C-mCherry. (b) Célula transfectada con mCherry. La escala es $20 \mu m$.

A continuación, se estudió la localización de C en la célula a lo largo del ciclo de infección. Para ello, se observó el mismo preparado de células durante las primeras 6 horas desde la transfección. Se seleccionaron 5 regiones de 152

μm de lado, $0,15 \mu\text{m}$ por píxel, y se tomaron imágenes de barrido de cada región cada 5 minutos a una velocidad de 0,94 segundos por imagen. Para el análisis se utilizó el programa *ImageJ* (NIH) mediante el cual se calculó el promedio de intensidad de cada compartimento en cada célula y se le restó la señal de fondo. Por el tiempo que llevó la configuración de la adquisición, la medición comenzó 1,5 horas post transfección, coincidiendo con el tiempo mínimo necesario para comenzar a ver señal de C-mCherry. Se analizaron 5 células diferentes y se promediaron los valores para cada tiempo. En la Figura 7.5 se grafican las intensidades promedio normalizadas medidas en núcleo y citoplasma en función del tiempo. En ambas regiones se observa un incremento en la intensidad a medida que transcurre el tiempo luego de la transfección. Esto se debe a que la producción de C-mCherry es continua y a medida que más proteína se produce, más intensidad de fluorescencia de mCherry se observa en las regiones donde esta proteína se acumula.

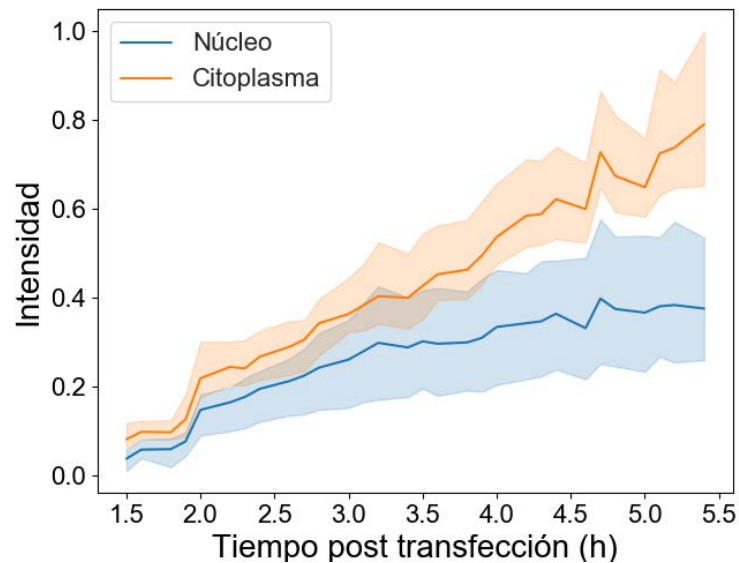


Figura 7.5: Intensidad de fluorescencia de C-mCherry en función del tiempo luego de la transfección en núcleo (azul) y citoplasma (naranja). En línea oscura se grafican los valores medios y el sombreado corresponde al percentil 25 y 75 de la distribución de datos.

7.4. Estudio de la difusión de cápside en células vivas

Para estudiar la movilidad de cápside durante el proceso de infección en el entorno celular, aplicamos la técnica de correlación de imágenes de barrido - RICS - que fue introducida en el Capítulo 2.

Brevemente, RICS calcula la correlación espacial de una imagen consigo misma permitiendo obtener información sobre las moléculas a partir de la correlación de las fluctuaciones de intensidad. Del mismo modo que FCS sobre un punto correlaciona las fluctuaciones de intensidad sobre un mismo punto a distintos tiempos y realiza un ajuste de la función de autocorrelación por un modelo dinámico, RICS correlaciona las fluctuaciones entre píxeles de una imagen corrida respecto de sí misma. Para distintos “corrimientos” (o *pixel shift*) la función de autocorrelación se obtiene con el promedio de todos los píxeles. Dado que las imágenes y, por lo tanto los corrimientos, son bidimensionales la función de autocorrelación de RICS tiene dos dimensiones donde cada eje corresponde a los corrimientos en una dirección.

En la práctica, en un experimento de RICS se adquiere más de una imagen, se calcula la correlación de cada una de ellas para finalmente calcular la correlación promedio. Este mecanismo permite aumentar la relación señal/ruido de la función final. Finalmente, a través de un ajuste por un modelo dinámico se obtienen los parámetros que caracterizan al sistema.

Todos los experimentos de RICS fueron realizados en células transfectadas con el ARN viral y a su vez sobre una muestra control de células no transfectadas, sobre las cuales se tomaron imágenes cada una hora para poder asegurar que la señal medida sobre las células tratadas fuera proveniente de C-mCherry y no fuera autofluorescencia ni se deba a ningún artefacto producido por el instrumento.

Cuando se encuentra una célula fluorescente, se selecciona el área sobre el cual se tomarán las imágenes para RICS. Para cada célula estudiada, se tomaron imágenes de 256×256 píxeles de 50 nm ($12,5 \times 12,5 \mu m^2$) en el núcleo y en el citoplasma con el fin de comparar la dinámica de cápside dentro y fuera del núcleo. De experimento a experimento se varió el tiempo por píxel de 10 a 16 μs , eligiendo el mismo de modo que la cantidad de fotones detectados fuera suficiente para poder observar correlación y que al mismo tiempo la potencia

del láser utilizada no dañe la célula. Para aumentar la señal, se adquirieron 100 imágenes seguidas de cada región, de las cuales se obtuvo la función de RICS promediando la autocorrelación obtenida de cada imagen individual.

En la Figura 7.6a se muestra la imagen de una célula donde nuevamente se observa la distribución de intensidad característica de C-mCherry, que se localiza principalmente en citoplasma y nucleolos. Se indican en línea punteada blanca las regiones iluminadas para analizar la dinámica en núcleo y en citoplasma. Para hacer el análisis de RICS cada imagen se correlaciona consigo misma desplazada una cantidad ξ en el eje horizontal y ψ en el eje vertical (Figuras 7.6b y 7.6c). Dichos parámetros adquieren valores desde 0 (que equivale a correlacionar la imagen consigo misma sin desplazarla) hasta la mitad del tamaño de la imagen. Es decir que dada una imagen de 256×256 píxeles, la función de correlación de RICS tiene a lo sumo 128×128 puntos. Se puede hacer el cálculo variando ξ y ψ hasta 32 o 64 píxeles si la función de correlación decae en los primeros puntos, ya que no tiene sentido calcular para corrimientos grandes donde la correlación es nula.

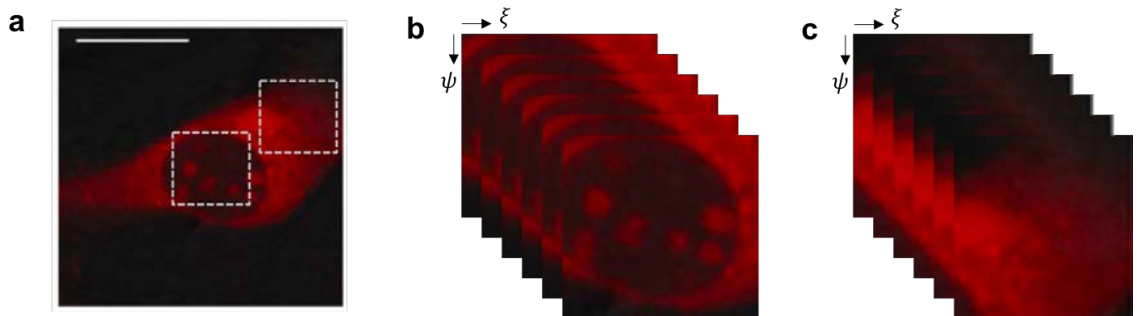


Figura 7.6: Experimento de RICS para células transfectadas con C-mCherry. (a) Se elige una célula y se seleccionan las regiones de interés (núcleo y citoplasma). Se toma una serie temporal de 100 imágenes de (b) núcleo y (c) citoplasma, para luego calcular la correlación espacial. La escala es $10 \mu\text{m}$.

Un ejemplo del resultado de un experimento de RICS puede verse en la Figura 7.7. En (a) se grafica la función de RICS obtenida para el núcleo de una célula a las 3 horas post transfección. En esta imagen, la amplitud de la correlación se representa en colores, indicando los colores cálidos mayor correlación. La función de correlación espacial se grafica en función del corrimiento (en píxeles) de modo que el el punto $(\xi, \psi) = (0, 0)$ está centrado en la imagen.

Es por esto que la correlación más alta se observa en el centro y a medida que los corrimientos ξ y ψ aumentan, la correlación disminuye hasta llegar a anularse. En (b) se muestra la función graficada en tres dimensiones (arriba) y la función obtenida a partir del ajuste (abajo).

La función de autocorrelación resultante se puede ajustar por diferentes modelos dinámicos. El modelo más utilizado para proteínas moviéndose en el entorno celular es el de difusión isótropa, aunque existen distintos modelos disponibles. Dado que cápside es una proteína que tiene mucha interacción con su entorno, es posible que un modelo de difusión isótropa y libre no describa su dinámica con total precisión. Sin embargo, como una primera aproximación y para lograr una descripción cualitativa de la movilidad de cápside dentro y fuera del núcleo, se ajustaron las funciones de RICS por un modelo de difusión libre. Como fue detallado en la sección 2.2, la forma funcional que describe a la función de correlación espacial de imágenes de barrido para un movimiento difusivo en tres dimensiones es [68]:

$$G(\xi, \psi) = G(0) \left(1 + \frac{4D(\tau_P\xi + \tau_L\psi)}{\omega_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D(\tau_P\xi + \tau_L\psi)}{\omega_z^2} \right)^{-1/2} \quad (7.1)$$

donde $G(0)$ es la amplitud, que depende del número de moléculas en el volumen de observación, τ_P y τ_L son el tiempo de píxel y de línea respectivamente, ω_0 es la cintura del haz y δr es el tamaño de píxel, que para estos experimentos se mantuvo en 50 nm. Como puede verse en la Figura 7.7, la función de RICS no es simétrica en las dos coordenadas, sino que el decaimiento de la curva de correlación en la coordenada vertical es más “rápido” (en términos de píxel *shift*) que en la coordenada horizontal. Dicho comportamiento se debe a la diferencia en escala temporal en una y otra coordenada (τ_P del orden de los microsegundos y τ_L del orden de los milisegundos).

Para obtener un valor del parámetro ω_0 , se calibró la PSF del microscopio para el láser y objetivo utilizados con una solución de Rhodamina 6G . Dado que RICS mide el tiempo de residencia de las moléculas en la PSF, si el coeficiente de difusión de las moléculas en la solución es conocido, una calibración de la PSF se puede realizar si se fija ese parámetro y se deja ω_0 libre para el ajuste. El coeficiente de difusión de esta molécula ha sido extensamente estudiado [171–173] y como resultado del ajuste de la función de RICS por un modelo difusivo se obtuvo $\omega_0 = 280$ nm.

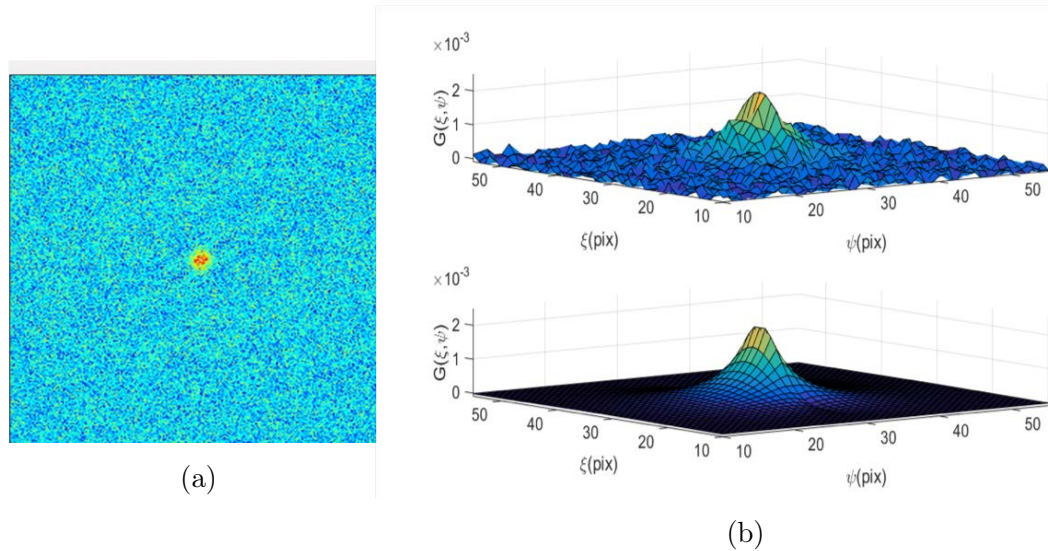


Figura 7.7: (a) Función de RICS obtenida para una serie temporal de imágenes en el núcleo, donde los colores representan amplitud de correlación. (b) Función graficada en 3 dimensiones (arriba) y su respectivo ajuste (abajo) por un modelo dinámico difusivo.

Los experimentos fueron realizados para distintos tiempos post transfección, desde 3 a 6 horas. Antes de esa cantidad de horas, la intensidad de fluorescencia no es suficiente para tener la relación señal/ruido necesaria para el análisis. La curva con la que se ajustan los datos, que tiene la forma funcional de la ecuación (7.1), es elegida por el método de cuadrados mínimos, el cual calcula los parámetros de la función que minimizan la suma de los residuos, valor conocido como χ^2 . La estabilidad del ajuste está determinada por cuánto varía este valor ante la variación de los parámetros del ajuste. Los casos en que la distribución del χ^2 tuviera más de un mínimo en el espacio de los parámetros del ajuste fueron descartados para el análisis. Del total de 80 células analizadas de al menos 10 cultivos diferentes, sólo se presentan los resultados de 20 citoplasmas y 20 núcleos, ya que el resto de los datos tuvo que ser descartado por no presentar estabilidad en el ajuste. Tanto el cálculo de la función de RICS como el ajuste fueron realizados utilizando el programa comercial SimFCS (Universidad de California - Irvine).

A partir del ajuste se obtiene un coeficiente de difusión efectivo promedio para la región analizada, es decir, un valor promedio para el núcleo y uno para

el citoplasma sobre cada célula analizada. Se obtuvo un rango de valores de 1 - 4 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ para núcleo y 1 - 17 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ en el caso de citoplasma. En la Figura 7.8 cada una de las barras verticales representa una medición, las cuales se encuentran ordenadas por hora y por compartimento. Los valores medios para cada hora, reportados en la Tabla 7.1, revelan que en promedio el movimiento en el citoplasma es más rápido que en el núcleo. Es decir, analizando la dinámica por un modelo simplificado que tiene en cuenta únicamente un movimiento difusivo isótropo, se obtuvo que la proteína C difunde con un coeficiente de difusión mayor en citoplasma que en núcleo. La diferencia es más acentuada a las 3 horas de haber comenzado la transfección y disminuye a medida que transcurre el tiempo, hasta 6 horas.

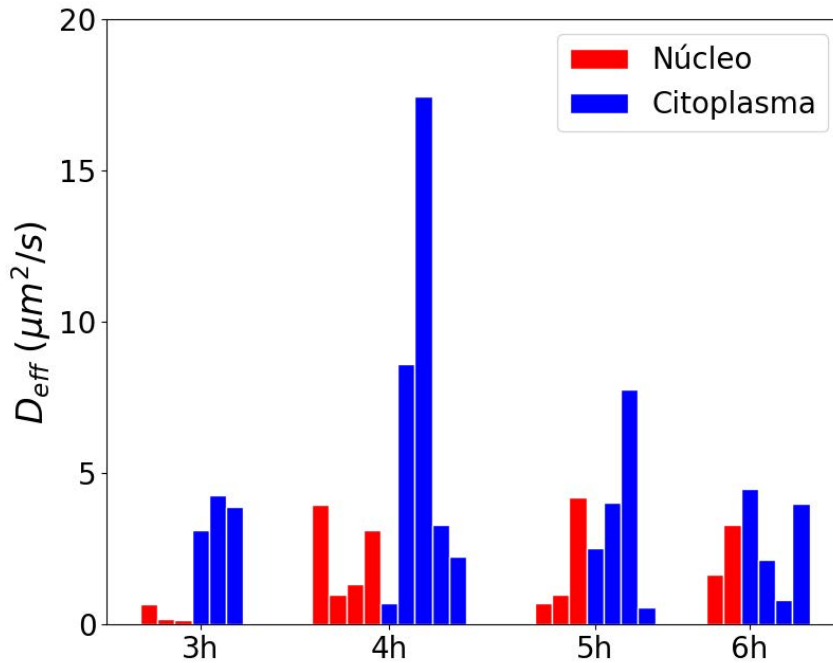


Figura 7.8: Valores de D hallados para distintas horas post transfección ajustando los datos en núcleo y citoplasma con un modelo de difusión isótropa. Cada barra vertical representa el resultado de un ajuste.

En este tipo de análisis, es muy importante tener una verificación de que el resultado de las observaciones que se realizan sea una propiedad del sistema

D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)			
Horas	CITOPLASMA	NUCLEO	CITO/NUC
3	1.0	3.8	3.8
4	2.3	6.5	2.8
5	2.0	3.7	1.9
6	2.5	2.9	1.2

Tabla 7.1: Promedio de D en núcleo y citoplasma para cada hora, y cociente entre ambos.

biológico que se está estudiando y no se deba a artefactos que provengan de problemas en la óptica o fallas en el análisis. Una forma ampliamente aceptada de hacer ese control consiste en aplicar la misma técnica en idénticas condiciones experimentales para una muestra cuya dinámica sea conocida. Como experimento control, las mismas células fueron transfectadas con un plásmido de mCherry monomérica, bajo las mismas condiciones de la transfección con el ARN viral. Esta proteína no interactúa con nada específico dentro de la célula con lo cual se espera que difunda libremente. Las imágenes de intensidad de fluorescencia de mCherry en las células BHK (Figura 7.4b) muestran que, en este caso, no hay una especificidad en la localización de la proteína fluorescente y, en cambio, se observa una intensidad uniforme en toda la célula. Se aplicó RICS usando los mismos parámetros sobre una región dentro del citoplasma y como resultado de 5 células analizadas se obtuvo $D = (18 \pm 2) \mu\text{m}^2/\text{s}$, valor que se encuentra dentro de lo reportado para esta proteína en citoplasma [174, 175]. Se concluye de esta medición que la técnica de RICS utilizada para estudiar la dinámica de cápside y su implementación permite obtener el coeficiente de difusión real de las moléculas.

7.5. Análisis del flujo molecular de cápside en el núcleo celular

Los coeficientes de difusión efectivos reportados en la sección anterior se obtuvieron mediante la función de autocorrelación de toda la región de interés que fue escaneada. Para observar en mayor detalle el movimiento de cápside en estas regiones, donde existen heterogeneidades espaciales y más de un mecanismo pueden regir el movimiento de esta proteína a la vez, se aplicó la técnica

de correlación de pares de puntos en imágenes: 2D-pCF.

La técnica de 2D-pCF, como fue explicado en la sección 2.3 del Capítulo 2, compara la fluctuación de intensidad entre cada par de puntos de una imagen y calcula para cada uno el parámetro que define la anisotropía del movimiento. Este valor, que varía entre 0 y 1, se obtiene a partir de la distribución de la función de correlación de pares (pCF) calculada para una distancia dada en todas las direcciones. La anisotropía para cada punto de la imagen tiene asociada una dirección privilegiada del movimiento, con la cual se obtiene un mapa de flujo molecular. Esta es la gran ventaja de esta técnica, que la convierte en una poderosa herramienta para ver movimiento a nivel molecular.

7.5.1. 2D-pCF en un movimiento isótropo

Como un primer control y para la familiarización con la técnica, se estudió 2D-pCF sobre un movimiento puramente isótropo. Si bien el marco teórico sobre el que se desarrolla esta técnica predice que este tipo de movimiento debería dar una anisotropía nula, en la aplicación práctica siempre hay un mínimo valor de anisotropía. La dirección de movimiento privilegiado, sin embargo, corresponde al de una distribución azarosa a lo largo de la imagen, sin evidenciar un flujo particular. El análisis de un movimiento isótropo permite definir un umbral para la anisotropía, que será luego considerado en el análisis del movimiento de la proteína cápside de Dengue en células vivas.

Se realizó una simulación de un experimento de 2D-pCF sobre un movimiento difusivo. Para ello, se simularon 8000 imágenes de 100 partículas difundiendo isótropamente (es decir, caminata al azar en 3 dimensiones) con un coeficiente de difusión de $90 \mu\text{m}^2/\text{s}$ dentro de una cavidad de 256 píxeles de lado con 50 nm por píxel y una PSF de $0.25 \mu\text{m}$ de diámetro. Se calculó la distribución 2D-pCF para esta serie de imágenes, calculado entre pares de puntos a una distancia de 4 píxeles (equivalente a 200 nm). Una forma de visualizar el flujo molecular es graficando la dirección de anisotropía en cada punto con una línea. La orientación de la línea corresponde a la orientación de la distribución 2D-pCF en cada punto. Esta representación es también llamada mapa de conectividad. Como se puede ver en la Figura 7.9a, no hay una orientación privilegiada para la difusión y, por lo contrario, se observan líneas en todas las direcciones sin un orden evidente. Un histograma de los valores de anisotropía obtenidos en la imagen (Figura 7.9b) muestra que a pesar de que el

movimiento es isótropo en su conjunto, sobre cada píxel existe una anisotropía que toma valores distintos a cero. El valor medio de este histograma es 0,41 con una desviación estándar de 0,19.

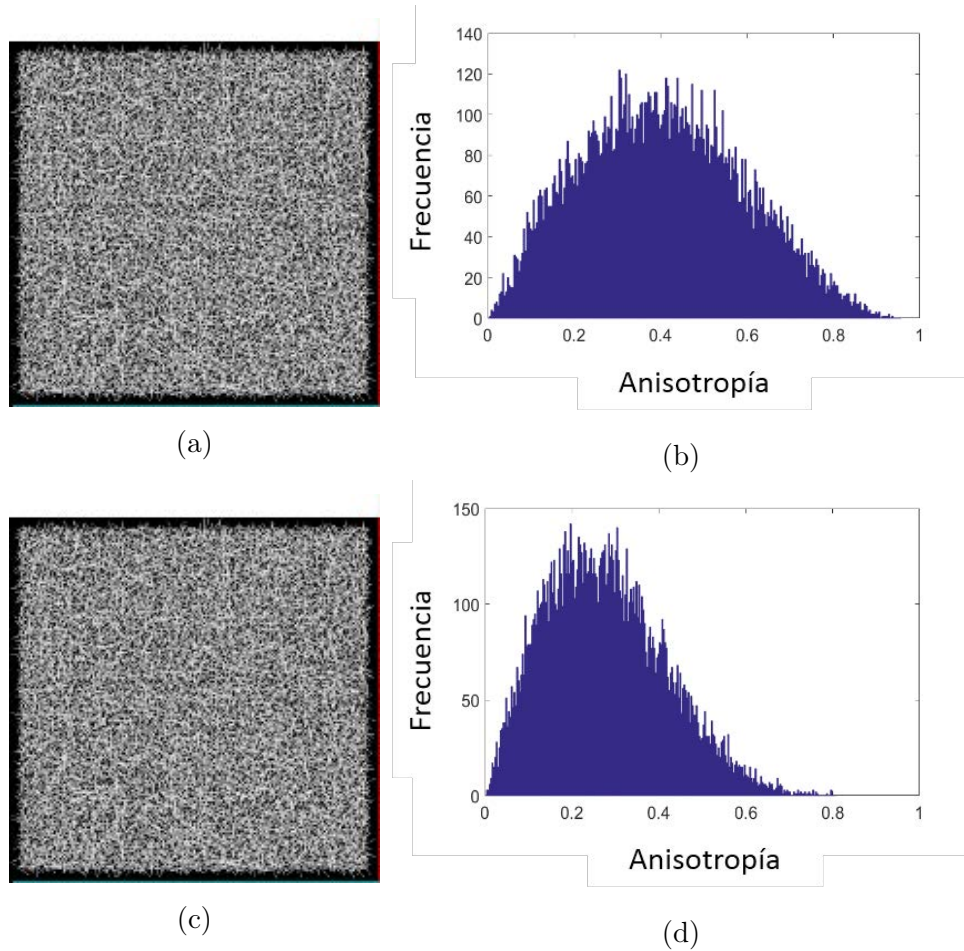


Figura 7.9: 2D-pCF de un movimiento isótropo. (a-b) Mapa de conectividad e histograma de valores de anisotropía de la imagen para una simulación de un movimiento difusivo isótropo. Se simuló un experimento de 8000 imágenes con $\text{PSF} = 250 \text{ nm}$ y 100 partículas con $D = 90 \mu\text{m}^2/\text{s}$. (c-d) Mapa de conectividad e histograma de valores de anisotropía para un experimento de una solución 20 nM de GFP.

Para tener un control experimental, se realizó una medición sobre una solución de GFP 10 nM en PBS. Para ello, se vertió una gota de solución sobre un cubreobjetos de vidrio y se colocó en el microscopio confocal Zeiss LSM 880,

inciendiando esta vez con una longitud de onda de 488 nm para excitar GFP. Se tomaron 8192 imágenes de 128 x 128 píxeles de 80 nm por píxel, a una velocidad de 0,98 μ s por píxel. En la Figura 7.9 c y d se muestran los resultados obtenidos del mapa de difusión e histograma de anisotropía repitiendo el mismo análisis que en la simulación. El valor medio para la anisotropía en este caso es $0,27 \pm 0,13$.

Los resultados de este experimento permitieron definir un umbral de Anisotropía para ser considerado en el análisis realizado sobre las mediciones de cápside en células vivas. Valores por debajo de 0,3 serán considerados como movimiento isótropo y por lo tanto son excluidos del análisis para visualizar el flujo molecular.

7.5.2. Anisotropía del movimiento de cápside

Una vez estudiada la técnica sobre una solución, se procedió al estudio de la movilidad de cápside en el entorno celular. Para ello, se siguió el mismo protocolo de transfección y se colocaron las células en el microscopio, manteniendo la temperatura en 37 °C y el CO₂ en 5%. Una vez elegida una célula y la región a estudiar, se tomaron 8192 imágenes de 128 × 128 píxeles de 80 nm a una velocidad de 0,98 μ s por píxel. La idea de tomar imágenes con menos puntos tiene por un lado el objetivo de aumentar la velocidad del barrido, para que el movimiento molecular sea perceptible, y por el otro agilizar el análisis que lleva un tiempo de cómputo considerablemente mayor al de RICS.

En la Figura 7.10 se muestran los resultados para un núcleo celular luego de 6 horas de la transfección. El panel (a) muestra el promedio de intensidad de todas las imágenes indicada en escala de colores del azul (intensidades más bajas) al rojo (intensidades más altas). Para esta escala de tiempo, donde la traducción y replicación de ARN viral están en actividad continua, cápside se acumula en nucleolo. El nucleoplasma, en cambio, se identifica como la región de intensidad más baja y el citoplasma se observa alrededor con una intensidad mayor, delineando claramente la interfaz en la membrana nuclear. Se calculó 2D-pCF para una distancia de 8 píxeles (equivalente a 640 nm) y se realizó el mapa de conectividad con la dirección de máxima anisotropía en cada punto (Figura 7.10b. Esta representación permite visualizar barreras y obstáculos en la difusión. La superposición con la imagen de intensidad en 7.10c permite identificar un movimiento particular ocurriendo en las interfaces citoplasma-

núcleo y nucleoplasma-nucleolo.

El mismo experimento se repitió sobre células transfectadas con la proteína fluorescente mCherry sola. Como fue antes explicado, no se espera que haya interacción entre esta proteína y el entorno celular ya que ha sido previamente reportado que la misma difunde libremente tanto en núcleo como en citoplasma. [169,170]. En la Figura 7.10d se muestra la intensidad promedio de la serie de imágenes, mientras que en 7.10e se ve el mapa de flujo molecular obtenido para mCherry. En este caso, este mapa tiene una apariencia parecida a lo que se había obtenido para la simulación y para GFP en solución, reportados en la Figura 7.9. No se observa visualmente ningún tipo de orden en el movimiento, a pesar de la heterogeneidad que tiene el entorno nuclear debida a la distribución de cromatina y presencia de nucleolos. Este resultado también es indicador de que los simples cambios de intensidad entre un píxel y otro píxel vecino no genera artefactos en el mapa de conectividad, induciendo una dirección de anisotropía artificial.

La comparación de las Figuras 7.10b y 7.10d evidencia que en el caso de las células con C-mCherry hay regiones donde la difusión es ordenada, esto es, que la dirección de anisotropía cambia de forma suave entre píxel y píxel, mientras que en otras regiones la distribución aparenta ser arbitraria y no hay una organización visible en el flujo molecular. Esta forma de movimiento ordenado indica un comportamiento dinámico específico de cápside que ocurre en las interfaces citoplasma-núcleo y nucleoplasma-nucleolo.

Si bien la diferencia entre las células transfectadas con C-mCherry y el control es visualmente apreciable, es necesario cuantificar esta información para separar el tipo de movimiento que se observa en cada caso. Con este propósito, se estudiaron las distribuciones de anisotropía en cada caso. En la Figura 7.11a se grafica la dirección de anisotropía de la misma célula representando en escala de colores el ángulo de la dirección de máxima anisotropía (es decir, los mismos ángulos con el que se orientan las líneas en los mapas de flujo). El azul indica movimiento vertical mientras que los píxeles de color rojo indican movimiento horizontal, y cada ángulo en el medio se representa con un color correspondiente a esa escala. La información que muestra el mapa de flujo molecular de la Figura 7.10b y esta no es diferente; sólo cambia la forma de representarlo. En la Figura 7.11b puede verse un histograma de esta distribución, cuya uniformidad indica que no hay en principio una dirección de movimiento

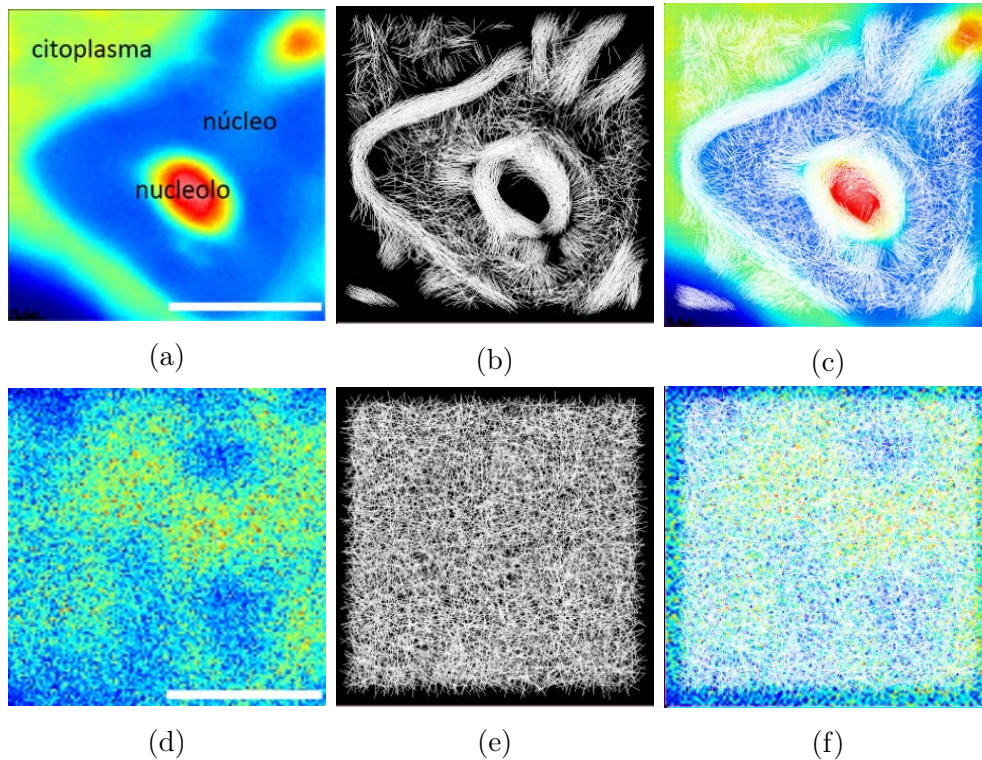


Figura 7.10: 2D-pCF aplicado al núcleo de una célula transfectada con C-mCherry de Dengue. (a) Promedio de intensidad de la serie temporal. (b) Mapa de conectividad; cada línea representa la dirección de anisotropía en cada punto. (c) Superposición de la intensidad y el mapa de conectividad. Puede verse una mayor distribución de líneas alrededor del nucleolo y en la membrana perinuclear. Los paneles (d), (e) y (f) muestran el mismo análisis para un núcleo de células transfectadas con la proteína fluorescente mCherry sola monomérica.

más frecuente que otras. Esto refleja que para obtener un parámetro de orden, es necesario tener en cuenta la información espacial de cómo está distribuida la dirección de anisotropía.

Con este fin, se construyeron dos imágenes nuevas a partir de la imagen de anisotropía codificada en colores. La primera (Figura 7.11c) se hizo tomando los mismos colores que en la imagen original y distribuyéndolos de forma aleatoria sobre los mismos píxeles. El histograma de la distribución de colores para esta imagen (Figura 7.11d) no muestra diferencias con la imagen original,

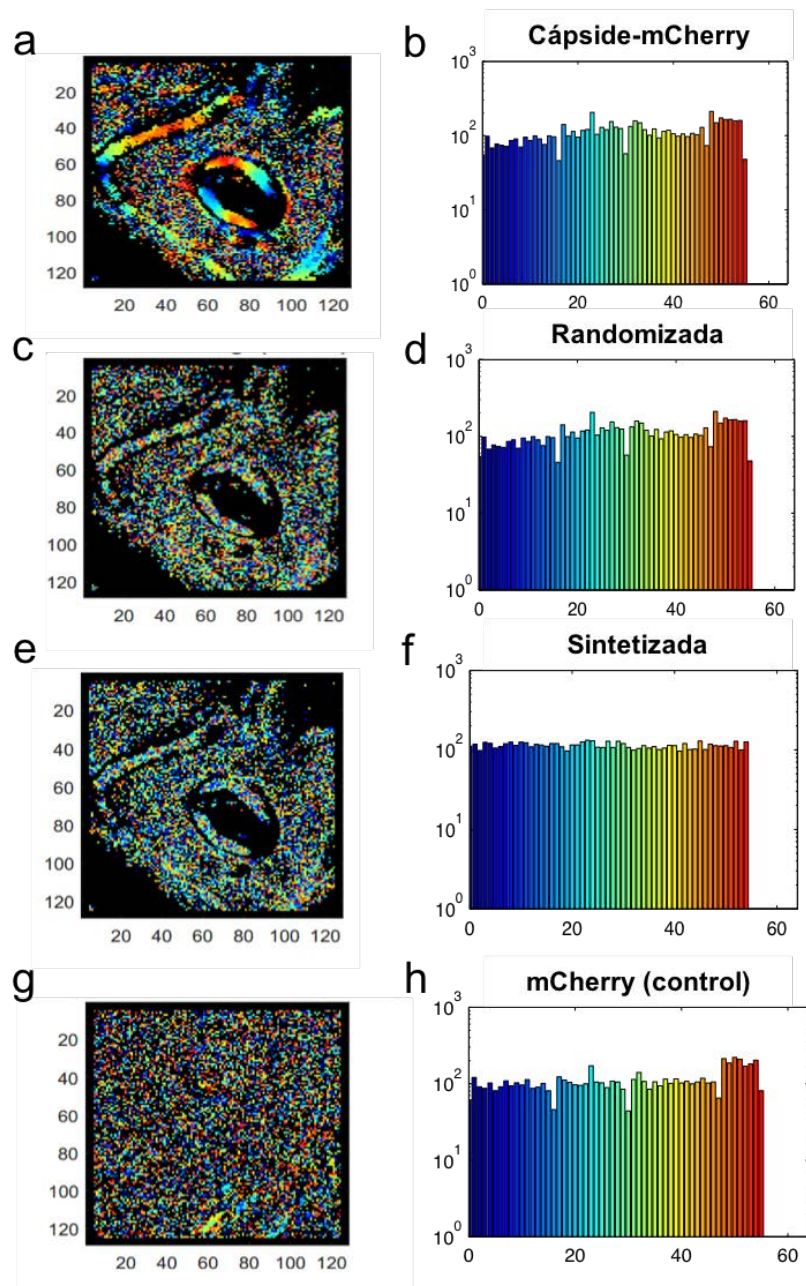


Figura 7.11: Mapa de dirección de anisotropía e histograma de la distribución para (a, b) una célula transfectada con C-mCherry, (c, d) Una imagen construida distribuyendo al azar los mismos colores que (a). (e, f) Una imagen formada por una distribución de colores creada al azar dentro del mismo rango. (g, h) Una célula transfectada con mCherry (control).

como es esperable ya que son los mismos. La segunda imagen sintetizada (Figura 7.11e) se construyó generando una distribución aleatoria de colores dentro del mismo rango que las imágenes anteriores. Su histograma (Figura 7.11f) muestra una distribución uniforme, indicando que los colores fueron tomados aleatoriamente. Ambas imágenes fueron construidas considerando solamente los píxeles que tuvieran valores no nulos en la imagen original. Finalmente, se consideró la distribución de dirección de anisotropía (Figura 7.11g) y su histograma (Figura 7.11h) para la muestra control de mCherry sola (sin cápside).

Los histogramas de la Figura 7.11 no evidencian la diferencia que es visible en cada distribución. Para establecerla, es necesario considerar la diferencia de color entre píxeles vecinos. Una distribución más “ordenada” tendría que reflejar menos diferencias entre puntos contiguos mientras que las más desordenadas equivaldrían a diferencias más altas. El análisis consistió en calcular para cada píxel no negro de la imagen las diferencias de color con sus píxeles vecinos. Se calcula la diferencia cuadrática de color entre píxeles vecinos (para tener valores positivos) y se atribuye un valor de “orden” a cada píxel sumando las diferencias obtenidas para todos vecinos (normalizada por la cantidad de vecinos).

En la Figura 7.12 se muestran las distribuciones obtenidas para las cuatro imágenes de la figura anterior. Las diferencias cuadráticas de color entre píxeles vecinos están centradas en 13.1 y 13.3 para los casos de las imágenes sintéticas donde la distribución de colores es aleatoria. En el caso control la distribución se centra en 15.1, debido a unos pocos puntos que elevan el valor medio por encima del obtenido para las distribuciones aleatorias. Los intervalos de confianza, sin embargo, se superponen. Este análisis refleja que en el caso control no hay un ordenamiento en el movimiento, lo cual concuerda con que mCherry es una proteína que difunde libremente en el entorno celular, y ningún tipo de interacción es esperable. El caso de la célula transfectada con C-mCherry, en cambio, presenta una distribución centrada en 9.6, que es significativamente menor a las demás. Estas diferencias resultan aún más claras en escala logarítmica (Figura 7.12b). Esta importante contribución de diferencias pequeñas de color entre píxeles vecinos que sólo ocurre para el caso de las células tratadas con el ARN viral indica que la dinámica de C-mCherry no es producto de un movimiento aleatorio y proporciona un valor cuantitativo para concluir que el movimiento de cápside en el núcleo presenta cierta organización o camino

preferencial.

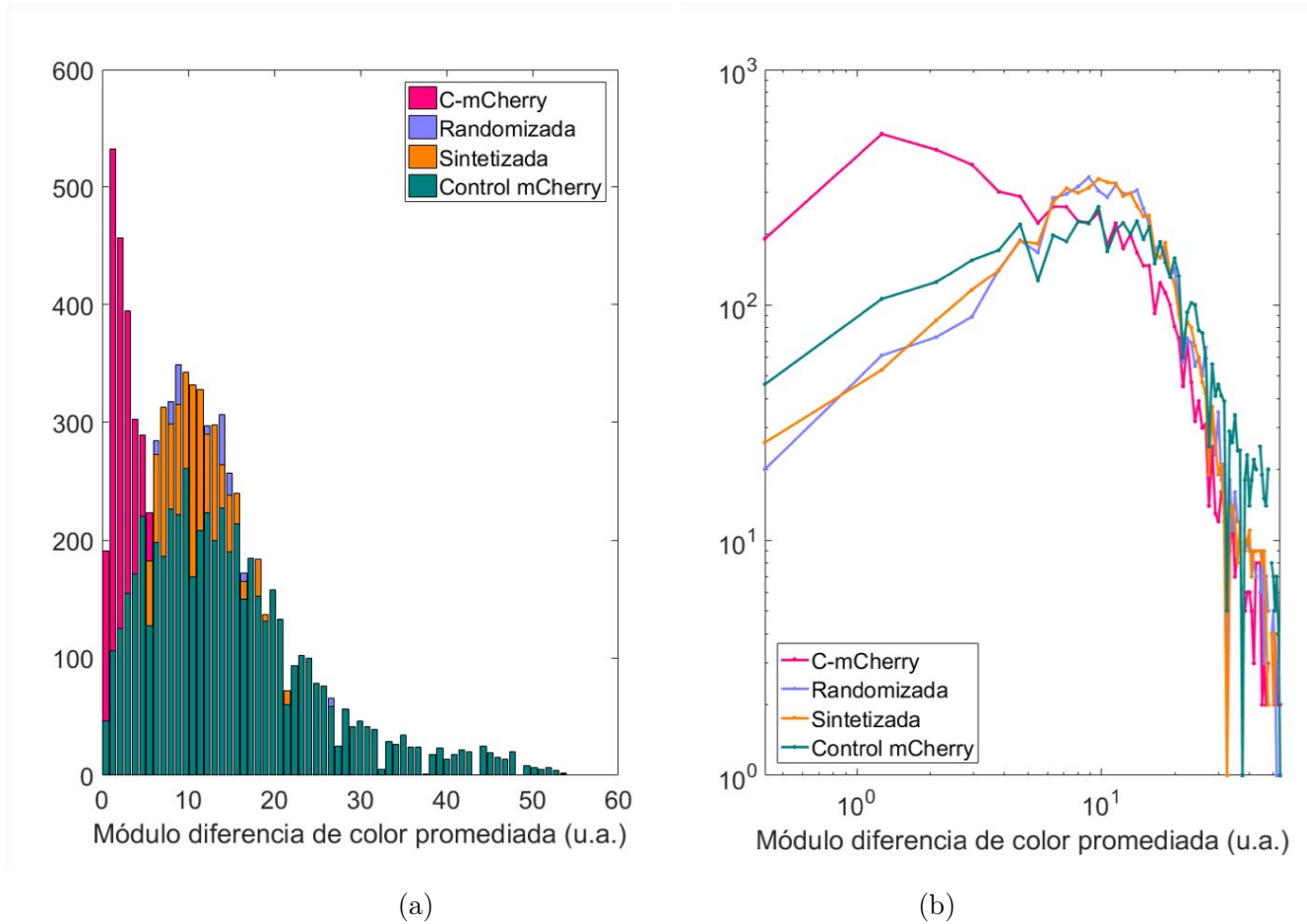


Figura 7.12: Diferencia de color (dirección) entre píxeles vecinos: (a) en escala normal y (b) en escala logarítmica.

7.5.3. Estudio cualitativo en función de tiempo y distancia

Los resultados de la sección 7.4 mostraron una disminución en la movilidad de cápside en núcleo y en citoplasma al transcurrir el tiempo de infección. Para estudiar esto en mayor detalle, se aplicó el análisis 2D-pCF en función del tiempo. Las células fueron observadas a 3, 6, 18 y 25 horas luego de la transfección del RNA viral. La intensidad detectada proveniente de C-mCherry aumenta

con las horas, como puede verse en la Figura 7.13 a-d. Esto se debe a que el ARN viral está en continua replicación y la nueva cápside que se forma se acumula en nucleolo (delineados en la imagen), como fue previamente reportado. Los paneles e-h muestran los correspondientes mapas de conectividad de cada imagen, realizados de la misma forma que en la sección anterior, teniendo en cuenta sólo anisotropías por encima del umbral definido. A las 3 horas luego de la transfección, C-mCherry difunde en el núcleo y unos pocos píxeles con algo de anisotropía se pueden identificar dentro de nucleolo. Esto indica que hay algo de movimiento de cápside dentro de nucleolo. A las 6 horas comienza a ser evidente el movimiento de cápside alrededor de los nucleolos, lo cual se puede observar más claramente en los mapas de conectividad de 18 y 25 horas.

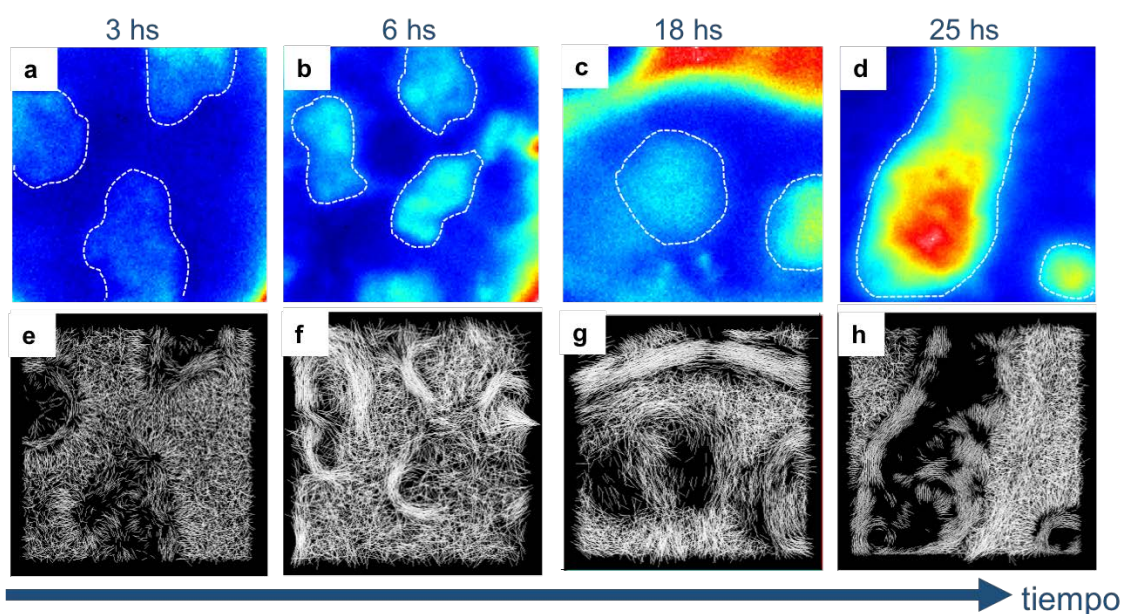


Figura 7.13: Movilidad de cápside en el núcleo como función del tiempo transcurrido desde la transfección del genoma viral. (a-d) Intensidad promedio de 4 células diferentes a 3, 6, 18 y 25 horas, donde los nucleolos se visualizan como regiones de alta intensidad (marcados con línea punteada). (e-h) Mapas de conectividad correspondientes calculados a una distancia de 8 píxeles (640 nm).

Para comprender los resultados de este análisis es importante notar el significado de los píxeles donde no hay una línea de conectividad trazada, es decir

no hay una dirección de anisotropía por encima del umbral. Existen dos motivos por los que esto pueda pasar: que el movimiento en ese punto sea isótropo y por lo tanto la anisotropía esté por debajo del valor umbral, o que las moléculas ahí estén inmóviles y la correlación en todas las direcciones sea nula. Es razonable que, dentro del nucleolo, a medida que cápside se acumula, el movimiento se vea más restringido. La falta de movimiento puede deberse a interacciones de cápside con componentes del nucleolo como el ARN u otras proteínas, o puede ser también consecuencia de la estructura compacta del nucleolo.

Un parámetro importante en el análisis de 2D-pCF es la distancia δr . La correlación se calcula entre píxeles que estén a esa distancia, en todas las direcciones. Las distancias más cortas permiten ver el movimiento en el entorno más próximo, mientras que las distancias más largas permiten ver si existen obstáculos en la difusión. Se realizó un análisis cualitativo variando la distancia para el cálculo de 2D-pCF. A modo de ejemplo, en la Figura 7.14 se muestran los resultados obtenidos aplicando este análisis sobre la imagen de la Figura 7.13d (25 horas post transfección). Los paneles a-d de la Figura 7.14 corresponden a una distancia de 4, 8, 12 y 18 píxeles, que en escala real corresponden a 320 nm, 640 nm, 960 nm y 1,28 μm respectivamente.

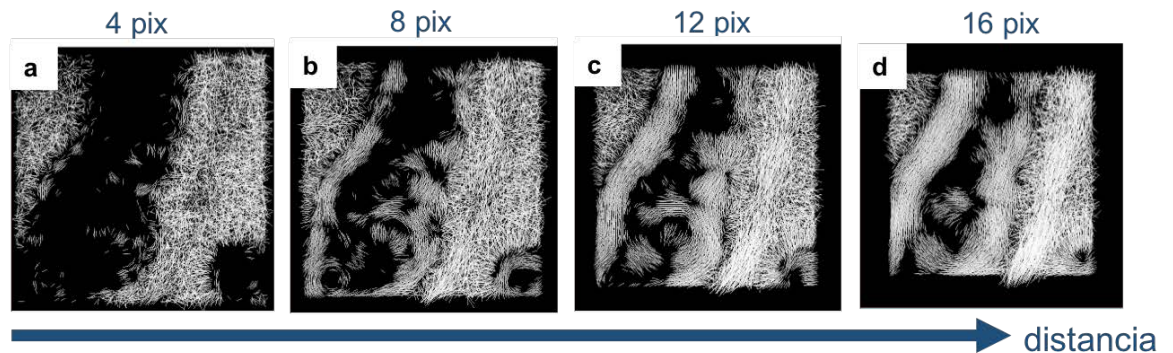


Figura 7.14: pCF calculada aumentando la distancia entre píxeles muestra diferentes obstáculos a la difusión dentro del núcleo. (a-d) Mapas de conectividad calculados a distancias de 4, 8, 12 y 16 píxeles.

Es evidente de la Figura 7.14 la diferencia de 2D-pCF calculado para distintas distancias δr sobre una misma serie de imágenes. Para $\delta r = 4$ el mapa de conectividad muestra movimiento isótropo en el nucleoplasma mientras que el

nucleolo está prácticamente vacío. Es decir que para esta distancia no hay movimiento detectado en el nucleolo, ni tampoco se observa un orden particular en la interfaz nucleoplasma-nucleolo. A medida que δr aumenta se distinguen zonas de mayor anisotropía y movimiento ordenado. Para $\delta r = 16$ la presencia del nucleolo como un obstáculo en la difusión es evidente. Este análisis cualitativo demuestra que la elección de la distancia δr en el cálculo de la 2D-pCF determina las características que se hacen visibles a partir de este análisis.

7.5.4. Comparación de dinámica de cápside de Dengue y Zika

El virus de Zika también se encuentra dentro de la familia de los flavivirus que, al igual que Dengue, afecta a millones de personas cada año alcanzando niveles pandémicos. En Brasil, los niveles de infección en 2016 llevaron a que Zika sea declarado de emergencia sanitaria de interés internacional por la Organización Mundial de la Salud, siendo asociada a la microcefalia en neonatales y síndrome de Guillain-Barre en adultos [176]. En la actualidad no existen vacunas ni tratamientos para su prevención, siendo este el principal motivo de su estudio.

La partícula viral de Zika tiene la misma estructura de Dengue: el complejo nucleocápside, formado por la proteína C y una molécula de ARN positiva, rodeado de una membrana que contiene las proteínas M y E. Asimismo, el proceso de infección y replicación dentro de la célula huésped de ambos virus es compartido [152, 153, 177]. Para estudiar la distribución de cápside de Zika, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia (Figura 7.15) marcando nucleolo, LDs y retículo endoplásmico.

Los experimentos de 2D-pCF detallados en la sección anterior fueron repetidos bajo las mismas condiciones en cápside de Zika. En este caso, se cuenta con un ARN genómico de Zika que sintetiza cápside fusionada a mCherry y otro que sintetiza cápside fusionada a la proteína fluorescente GFP.

En la Figura 7.16a se presenta una imagen de intensidad de una célula transfectada con Zika-mCherry luego de 5 horas de iniciada la transfección. Las condiciones de iluminación y detección son las mismas que para el caso anterior ya que se trata del mismo fluoróforo. En las células de la imagen se puede observar que C-mCherry se distribuye nuevamente en el citoplasma y los

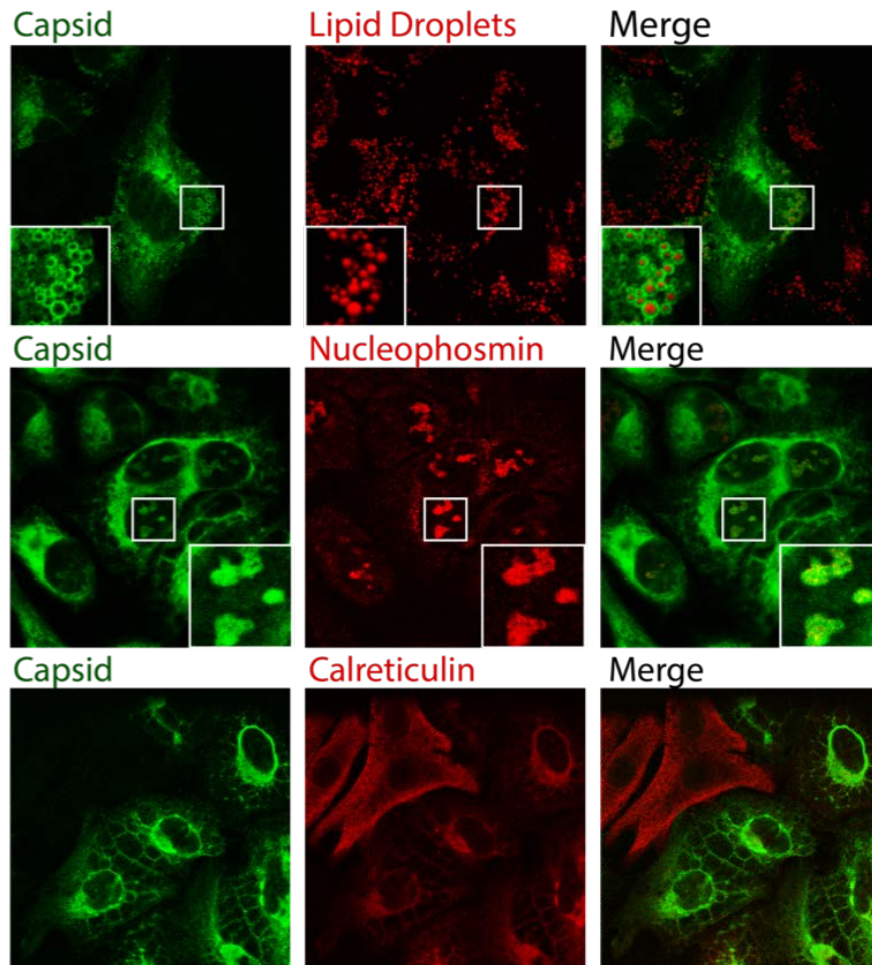


Figura 7.15: Experimentos de inmunofluorescencia de ZIK-C. Durante la infección, cápside se acumula en LDs (arriba), nucleolo (medio) y retículo endoplásmico (abajo). (Créditos: Guadalupe Costa Navarro).

nucleolos, pero a diferencia del caso de Dengue, se observa más fluorescencia en el contorno alrededor del núcleo.

Para el análisis de 2D-pCF se adquirieron nuevamente 8192 imágenes de 128×128 píxeles de 80 nm, a una velocidad de $0.98 \mu s$ por píxel sobre el núcleo de las células transfectadas. El promedio de intensidad de la serie temporal se muestra en 7.16b. Se calculó la función de 2D-pCF para una distancia de 8 píxeles y se calculó la anisotropía (c). Una visualización directa de esta imagen en principio no muestra una distribución de anisotropía privilegiada. Al igual

que en el experimento anterior, la dirección de anisotropía se puede graficar en colores (d), o equivalentemente como líneas dibujadas en la dirección de mayor anisotropía sobre cada punto (e). Finalmente se puede observar en el panel (f) que no hay un ordenamiento del flujo molecular alrededor de los nucleolos, como se fue observado para dengue, ni de otras interfaces. Cabe destacar que la intensidad emitida por la muestra de Zika y la de Dengue es del mismo orden de magnitud y los experimentos fueron realizados en idénticas condiciones.

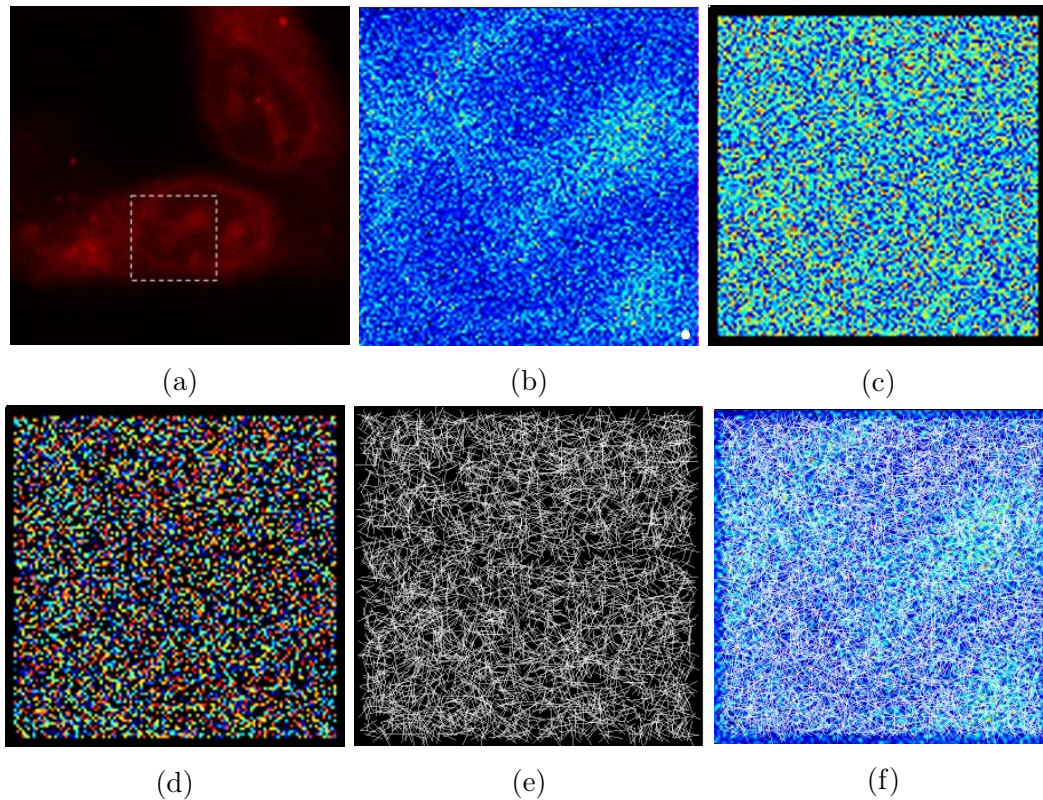


Figura 7.16: Resultados de 2D-pCF en células infectadas con Zika. (a) Imagen de fluorescencia de dos células a las 5 hs post transfección de ZIKV C-mCherry. El recuadro blanco indica la zona donde se realizó la medición. (b) Promedio de intensidad de las 8192 imágenes de la región de interés. (c) Anisotropía. (d) Dirección de anisotropía pintada en escala de colores. (e) Mapa de conectividad. (f) Mapa de conectividad sobre la intensidad media.

Para cuantificar estos resultados, se procedió con el mismo análisis realizado para cápside-DENV. Con los datos de la dirección de anisotropía de

cápside-ZIKV codificada en colores, se construyó una imagen distribuyendo aleatoriamente esos colores y otra generando colores uniformemente distribuidos dentro del mismo rango de la imagen original. A estas dos imágenes sintéticas se les sumó el control de mCherry sola difundiendo libremente en el núcleo para comparar a las tres con la imagen de dirección de anisotropía de cápside-ZIK. Se compararon las cuatro imágenes según la diferencia de color entre píxeles vecinos que, una vez más, indica diferencia en la dirección de anisotropía, por lo tanto es una medida del orden del movimiento molecular. En la Figura 7.17 se presenta el histograma de la diferencia de color para cada imagen en escala normal (a) y logarítmica (b). En este caso lo que se observa claramente de los dos gráficos es que no existe una diferencia significativa en la distribución de cápside con las distribuciones de procesos aleatorios. Es decir que la organización del movimiento de cápside no es diferente a la de mCherry sola y, más aún, ambas se asimilan a una distribución aleatoria. Esto indicaría que a diferencia de lo que se observó para cápside de Dengue, la proteína cápside de Zika no presenta una interacción particular con las estructuras del núcleo y en particular en las interfaces citoplasma-núcleo y núcleo-nucleolo. Los mismos resultados se repiten para todas las horas post transfección estudiadas (1 a 8 hs).

7.6. Comentarios finales

La proteína cápside cumple múltiples funciones y se asocia a distintos componentes del virus y de la célula huésped. Sin embargo, las implicancias de esta interacción y de su localización intracelular aún permanecen desconocidas. Para el caso de una proteína marcada fluorescentemente que difunde en el entorno celular, las técnicas de FCS resultan las más adecuadas.

En este Capítulo se mostraron los resultados del estudio de la dinámica de cápside en el núcleo y citoplasma de células transfectadas con el genoma viral por medio de dos técnicas de correlación espacial sobre imágenes de microscopía confocal. Por un lado, con RICS se estudió la difusión de cápside promedio en el citoplasma y en el núcleo, estimando un coeficiente de difusión mayor en citoplasma durante las primeras seis horas de infección viral. Por otro lado, un análisis espacial más detallado se logró mediante 2D-pCF, cuya resolución espacial supera a la de RICS y permite obtener para cada punto de

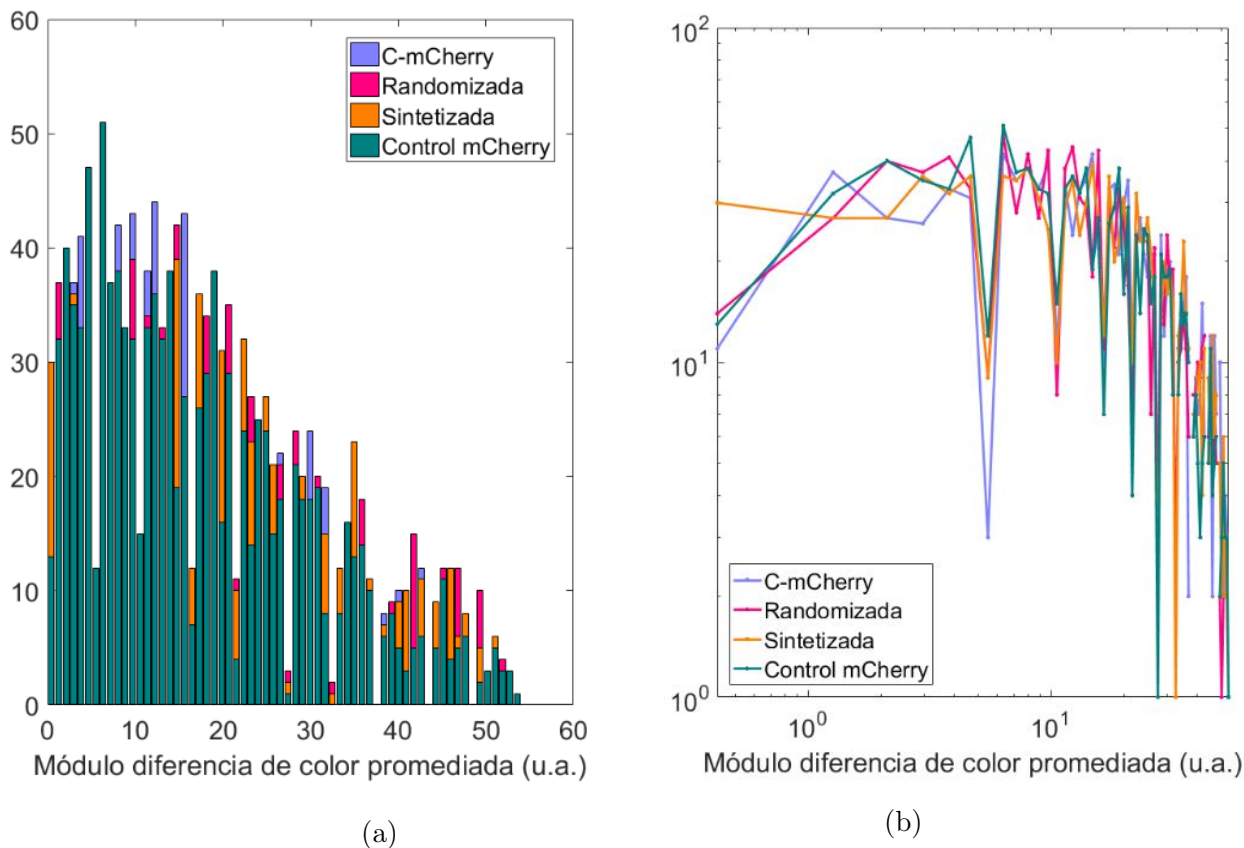


Figura 7.17: Diferencia de color (dirección) entre píxeles vecinos para cápside Zika y tres controles: (a) en escala normal y (b) en escala logarítmica.

la imagen la dirección del movimiento promedio de las moléculas. Con esto, se construyeron mapas del flujo molecular de cápside en el núcleo descubriendo un movimiento particular de esta proteína en la cercanía de la membrana nuclear y de nucleolo. La misma técnica aplicada sobre una proteína fluorescente no interactuante con la célula y sobre cápside del Zika permitió determinar que este comportamiento es particular de cápside de Dengue. Estos resultados sugieren que la localización de cápside y su movilidad observada responden a una función específica de esta proteína.

El movimiento ordenado de cápside-DENV que se observa en la interfaz citoplasma-núcleo refleja la presencia de la membrana nuclear como una barrera para la difusión. Cuando cápside ingresa en el núcleo, rápidamente se

acumula en nucleolo y en menos de dos horas luego de la transfección del ARN viral es posible observar la presencia de la proteína allí. Los nucleolos son estructuras sin membrana pero organizadas por una separación de fase de tipo líquido-líquido con el nucleoplasma. A pesar de ser organelas dinámicas, cuentan con una estructura altamente densa. El movimiento reducido de la proteína dentro de estas estructuras puede deberse a la viscosidad, que ha sido previamente reportada [178, 179], así como a la interacción de cápside con proteínas y ácidos nucleicos allí presentes.

Capítulo 8

Conclusiones

Este trabajo se centró en el desarrollo de un nuevo instrumento de microscopía, así como en la puesta a punto de técnicas de espectroscopía de correlación de fluorescencia avanzadas y de seguimiento de partícula única, para estudiar la dinámica de distintos procesos biológicos en células vivas. Las conclusiones de esta tesis se separan, por un lado, en lo que se realizó en cuanto a desarrollo de nuevo instrumental de microscopía y, por el otro, en los resultados de las aplicaciones a los sistemas biológicos estudiados.

Desarrollo instrumental

Como parte de esta tesis se desarrolló íntegramente y se puso en funcionamiento un microscopio por absorción de dos fotones que está actualmente en funcionamiento en el laboratorio (IFIBA-CONICET). Este equipo tiene un costo ~ 10 veces menor al de un instrumento comercial semejante y tiene la ventaja adicional de contar con una gran versatilidad. Fue parte del trabajo: el diseño de piezas mecánicas, el montaje y alineación de las partes, el desarrollo de la electrónica para el módulo de barrido y de detección, la programación de las rutinas para la automatización en la operación del instrumento, la calibración completa del instrumento, y la programación de las rutinas para el análisis de los datos. Actualmente este equipamiento es utilizado en proyectos que van desde la física básica a la frontera interdisciplinaria con la biología, la química y ciencias de los materiales. El microscopio construido además de funcionar en el modo tradicional para tomar imágenes por absorción de dos fotones cuenta con la capacidad de hacer barridos arbitrarios con el haz de excitación. Esta

característica permitió implementar una novedosa técnica para el seguimiento de partículas (o moléculas) individuales en tres dimensiones, que no había sido hasta ahora implementada en nuestro país.

Durante el último tiempo, extendimos las aplicaciones de la plataforma para implementar un método de microfabricación láser por absorción de dos fotones. En este momento somos capaces de fabricar estructuras fluorescentes micrométricas en dos e incluso tres dimensiones utilizando resinas curables en el UV en pocos minutos. Si bien la litografía sobre polímeros es una técnica que está fuertemente desarrollada en Argentina, la fotolitografía tradicional es una capacidad que está centrada en unos pocos centros en el país ya que requiere de la utilización de costoso instrumental además de ser necesaria su utilización salas limpias, lo cual limita la producción en escala de prototipos de exploración. La posibilidad de fabricar prototipos micrométricos funcionales, de bajo costo, y en muy poco tiempo, hace de nuestra plataforma una herramienta útil y complementaria a los grandes equipos de litografía actualmente disponibles.

El equipamiento desarrollado en el marco de esta tesis está accesible a la comunidad científico-tecnológica a través del Sistema Nacional de Láseres como: (i) microscopio por absorción de dos fotones, (ii) plataforma para experimentos de seguimiento 3D, y (iii) plataforma de litografía óptica.

Estudio de dinámica en sistemas biológicos

Por un lado, en colaboración con el grupo del Dr. F. Marengo y la Dra. L. Gallo aplicamos el método de seguimiento de partículas en tres dimensiones al estudio del tráfico de vesículas en células neuroendocrinas marcadas con nanopartículas de oro. Con este abordaje se consiguieron trayectorias de decenas de minutos de duración, sin producir daño sobre la célula, con alta resolución espacial y temporal (en el orden del nanómetro y del milisegundo). A partir de las trayectorias obtenidas en vesículas endocitadas fue posible determinar que el transporte vesicular se da principalmente por un mecanismo de transporte dirigido y que el mismo se ve afectado por los cambios de potenciales de acción inducidos por estímulos de K^+ extracelular. El análisis de todas las trayectorias reveló que el movimiento de las vesículas varía fuertemente a lo largo de su recorrido. Estas variaciones se ven reflejadas como cambios en la velocidad instantánea, el desplazamiento cuadrático medio local y la dirección del movimiento. Como consecuencia de este resultado concluimos que al trabajar

con trayectorias de milisegundos de resolución temporal y varios minutos de duración es necesario analizarlas a partir de enfoques locales, es decir, punto a punto a lo largo de la trayectoria.

Por otro lado, en colaboración con el grupo de la Dra. A. Gamarnik, utilizamos técnicas basadas en la correlación espacio temporal de las imágenes de fluorescencia para estudiar la dinámica de la proteína cápside del virus de Dengue en células huésped durante el ciclo de infección viral. Los resultados obtenidos en esta tesis permitieron visualizar mapas del flujo molecular, contruidos a partir de la determinación de la anisotropía de movimiento. Este análisis demostró que el movimiento de cápside en las interfaces citoplasmático-núcleo y núcleo-nucleolo está fuertemente ordenado, comportamiento que no fue observado en la proteína cápside de Zika ni en el control con la proteína fluorescente mCherry no vinculada a cápside. Estos resultados revelaron por primera vez que los nucleolos no actúan como simples barreras en la difusión de la proteína, sino que intervienen en un proceso de interacción, lo cual podría dar indicios sobre las funciones de esta proteína para la replicación viral. Más allá del sistema estudiado, la técnica de correlación de imágenes presentada es una poderosa herramienta que permite obtener trayectorias de moléculas en la nanoescala, venciendo el límite de difracción. Este enfoque difiere completamente de los clásicos métodos utilizados para estudiar dinámica molecular, que sólo proveen información del movimiento promedio.

Perspectivas

El instrumental desarrollado durante este trabajo al haber sido ensamblado íntegramente en el laboratorio es un sistema abierto. Esto significa que es relativamente fácil la modificación e incorporación de nuevos componentes. Actualmente, por ejemplo, ya se encuentra en marcha un proyecto para motorizar la platina del microscopio, posibilitando la automatización del desplazamiento de la muestra, lo cual abre nuevas perspectivas tanto para experimentos en sistemas biológicos como para su utilización como plataforma de microfabricación. Otra actualización que ya fue desarrollada pero aún no implementamos fue la fabricación por impresión 3D de dos ruedas de filtros para ubicar en ambos canales de detección. Esta mejora del sistema permitirá controlar de forma automatizada la elección de los filtros de emisión, es decir que durante

un mismo experimento se podrán mirar la emisión en dos colores con un mismo canal en forma secuencial.

La disposición actual del microscopio permite además agregar un nuevo canal de excitación, desde el cual se puede hacer ingresar un láser de longitud de onda en el rango visible. Esto puede tener más de una utilidad. Por un lado, aumenta la versatilidad del microscopio al poder aplicar las técnicas ya descritas pero excitando muestras tanto por uno como por dos fotones, lo cual amplía la variedad de sondas fluorescentes que pueden utilizarse. Por otro lado, la entrada de un láser adicional se puede aprovechar para el desarrollo un sistema de control de foco, lo cual abre un nuevo panorama permitiendo realizar experimentos de varias horas de duración.

Por otra parte, la puesta a punto de técnicas avanzadas de microscopía abre nuevas perspectivas para los estudios dinámicos en sistemas biológicos. El hecho de que sea posible extraer distinta información sobre una misma serie temporal de imágenes con sólo variar la forma de analizarlas es uno de los tantos motivos por los cuales la correlación de imágenes está surgiendo como una herramienta de gran interés en la microscopía de fluorescencia. Los métodos de análisis aquí presentados pueden combinarse con otros que brindan información complementaria. Por ejemplo, las mismas imágenes que fueron tomadas para realizar el análisis de RICS sobre cápside pueden ser analizadas desde otro enfoque para determinar estados de agregación en distintas regiones. Esto permitiría saber, por ejemplo, si la proteína que está dentro del nucleolo se encuentra en un estado agregado diferente de la cápside que difunde en el citoplasma. En nuestro grupo estamos actualmente estudiando algunos de estos interrogantes.

En un microscopio de barrido, además de imágenes, se puede correlacionar la información proveniente de una línea o un círculo o cualquier otra geometría que sea más adecuada para el sistema a estudiar (si el microscopio permite realizar barridos arbitrarios). Si se barre una línea que conecte al núcleo con el citoplasma, por ejemplo, o que atraviese un nucleolo, se puede estudiar la difusión de una proteína en esa dirección. Este es uno de los análisis que actualmente nos encontramos realizando para estudiar la entrada y salida de cápside en núcleo y nucleolo. Por otro lado, la posibilidad de correlacionar distintos puntos sobre un barrido circular abre la perspectiva de combinar el método de seguimiento por barrido orbital con la función de correlación de

pares de puntos. Se puede obtener la trayectoria de un pequeño compartimento dentro de una célula al mismo tiempo que la dinámica de las moléculas que difunden alrededor, o incluso entran y salen del mismo, usando los mismos datos experimentales.

Estas son tan sólo algunas de las perspectivas que se abren en el desarrollo de nuevas técnicas que permitan conocer cada vez en mayor profundidad procesos dinámicos en células vivas.

Bibliografía

- [1] T. D. Pollard, “No Question about Exciting Questions in Cell Biology,” *PLoS Biology*, vol. 11, 12 2013.
- [2] R. Singh and H. S. Nalwa, “Medical Applications of Nanoparticles in Biological Imaging, Cell Labeling, Antimicrobial Agents, and Anticancer Nanodrugs,” *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 7, pp. 489–503, 8 2011.
- [3] H. Clevers, “The cancer stem cell: premises, promises and challenges,” *Nature Medicine*, vol. 17, pp. 313–319, 3 2011.
- [4] J. Reichert, “Development trends for new cancer therapeutics and vaccines,” *Drug Discovery Today*, vol. 13, pp. 30–37, 1 2008.
- [5] U. Schnell, F. Dijk, K. A. Sjollema, and B. N. G. Giepmans, “Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging,” *Nature Methods*, vol. 9, pp. 152–158, 2 2012.
- [6] Z. Liu, L. D. Lavis, and E. Betzig, “Imaging Live-Cell Dynamics and Structure at the Single-Molecule Level,” 5 2015.
- [7] C. A. Combs, “Fluorescence Microscopy: A Concise Guide to Current Imaging Methods,” in *Current Protocols in Neuroscience*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1 2010.
- [8] J. W. Dobrucki and U. Kubitscheck, “Fluorescence Microscopy,” in *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications: Second Edition*, pp. 85–132, Wiley-VCH Verlag, 4 2017.
- [9] M. Renz, “Fluorescence microscopy-A historical and technical perspective,” *Cytometry Part A*, vol. 83, no. 9, pp. 767–779, 2013.

- [10] B. Valeur, *Bernard Valeur Molecular Fluorescence Principles and Applications*. New York: Wiley-VCH Verlag, 2001.
- [11] K. Svoboda and R. Yasuda, “Principles of Two-Photon Excitation Microscopy and Its Applications to Neuroscience,” *Neuron*, vol. 50, pp. 823–839, 6 2006.
- [12] R. P. Haugland, M. T. Z. Spence, and I. D. Johnson, *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. Molecular Probes, 1996.
- [13] J. R. Lakowicz, ed., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US, 1983.
- [14] R. Y. Tsien, “The green fluorescent protein,” *Annual Review of Biochemistry*, vol. 67, pp. 509–544, 6 1998.
- [15] J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, and R. Y. Tsien, “Creating new fluorescent probes for cell biology,” 12 2002.
- [16] K. M. Dean and A. E. Palmer, “Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging,” *Nature Chemical Biology*, vol. 10, pp. 512–523, 7 2014.
- [17] J. S. Danial, Y. Aguib, and M. H. Yacoub, “Advanced fluorescence microscopy techniques for the life sciences,” *Global Cardiology Science and Practice*, vol. 2016, 10 2016.
- [18] J. A. Conchello and J. W. Lichtman, “Optical sectioning microscopy,” 12 2005.
- [19] K. Svoboda, W. Denk, D. Kleinfeld, and D. W. Tank, “In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons,” *Nature*, vol. 385, pp. 161–165, 1 1997.
- [20] W. Denk, J. Strickler, and W. Webb, “Three-Dimensional Optical Storage Memory,” *Science*, vol. 245, pp. 843–845, 4 1990.
- [21] W. Denk and K. Svoboda, “Photon Upmanship: Why Multiphoton Imaging Is More than a Gimmick,” *Neuron*, vol. 18, pp. 351–357, 3 1997.

-
- [22] M. Göppert-Mayer, “Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen,” *Annalen der Physik*, vol. 401, no. 3, pp. 273–294, 1931.
- [23] P. T. C. So, C. Y. Dong, B. R. Masters, and K. M. Berland, “Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy,” tech. rep., 2000.
- [24] Ernst Abbe, “Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung,” *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, vol. 9, p. 413–418, 1873.
- [25] E. Hecht, *Optics*. Pearson, 1974.
- [26] Y. G. Soskind, *Field Guide to Diffractive Optics*. SPIE, 8 2011.
- [27] S. Hou, C. Johnson, and K. Welsher, “Real-Time 3D Single Particle Tracking: Towards Active Feedback Single Molecule Spectroscopy in Live Cells,” *Molecules*, vol. 24, p. 2826, 8 2019.
- [28] P. Annibale and E. Gratton, “Advanced fluorescence microscopy methods for the real-time study of transcription and chromatin dynamics,” *Transcription*, vol. 5, p. e28425, 4 2014.
- [29] T. Matsuda and T. Nagai, “Quantitative measurement of intracellular protein dynamics using photobleaching or photoactivation of fluorescent proteins,” *Microscopy*, vol. 63, pp. 403–408, 12 2014.
- [30] S. Veerapathiran and T. Wohland, “Fluorescence techniques in developmental biology,” *Journal of Biosciences*, vol. 43, pp. 541–553, 7 2018.
- [31] J. Lippincott-Schwartz, N. Altan-Bonnet, and G. H. Patterson, “Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells,” *Nature cell biology*, vol. Suppl, pp. 7–14, 9 2003.
- [32] H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, and G. P. C. Drummen, “Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM,” *Molecules*, vol. 17, pp. 4047–4132, 4 2012.
- [33] H. Jin, D. A. Heller, and M. S. Strano, “Single-Particle Tracking of Endocytosis and Exocytosis of Single-Walled Carbon Nanotubes in NIH-3T3 Cells,” *Nano Letters*, vol. 8, pp. 1577–1585, 6 2008.

- [34] N. Ruthardt, D. C. Lamb, and C. Bräuchle, “Single-particle Tracking as a Quantitative Microscopy-based Approach to Unravel Cell Entry Mechanisms of Viruses and Pharmaceutical Nanoparticles,” *Molecular Therapy*, vol. 19, pp. 1199–1211, 7 2011.
- [35] H. M. van der Schaar, M. J. Rust, C. Chen, H. van der Ende-Metselaar, J. Wilschut, X. Zhuang, and J. M. Smit, “Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells,” *PLoS Pathogens*, vol. 4, p. e1000244, 12 2008.
- [36] A. Dupont, M. Gorelashvili, V. Schüller, F. Wehnekamp, D. Arcizet, Y. Katayama, D. C. Lamb, and D. Heinrich, “Three-dimensional single-particle tracking in live cells: news from the third dimension,” *New Journal of Physics*, vol. 15, p. 075008, 7 2013.
- [37] X. Zhou and L. Wang, “Uses of single-particle tracking in living cells.,” *Drug discoveries & therapeutics*, vol. 4, pp. 62–9, 4 2010.
- [38] A. Kusumi, Y. Sako, and M. Yamamoto, “Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells.,” *Biophysical journal*, vol. 65, pp. 2021–40, 11 1993.
- [39] M. J. Saxton, “Single-particle tracking: connecting the dots,” *Nature Methods*, vol. 5, pp. 671–672, 8 2008.
- [40] P. Schwille, “Fluorescence Correlation Spectroscopy and Its Potential for Intracellular Applications,” *Cell Biochemistry and Biophysics*, vol. 34, no. 3, pp. 383–408, 2001.
- [41] N. González Bardeci, J. F. Angiolini, M. C. De Rossi, L. Bruno, and V. Levi, “Dynamics of intracellular processes in live-cell systems unveiled by fluorescence correlation microscopy,” *IUBMB Life*, vol. 69, pp. 8–15, 1 2017.
- [42] D. Magde, E. Elson, and W. W. Webb, “Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy,” *Physical Review Letters*, vol. 29, pp. 705–708, 9 1972.

-
- [43] D. Magde, E. L. Elson, and W. W. Webb, "Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization," *Biopolymers*, vol. 13, pp. 29–61, 1 1974.
- [44] R. Macháň and T. Wohland, "Recent applications of fluorescence correlation spectroscopy in live systems," *FEBS Letters*, vol. 588, pp. 3571–3584, 10 2014.
- [45] E. L. Elson, "40 Years of FCS," in *Methods in Enzymology*, vol. 518, pp. 1–10, Academic Press Inc., 2013.
- [46] D. Axelrod, D. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W. Webb, "Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics," *Biophysical Journal*, vol. 16, pp. 1055–1069, 9 1976.
- [47] E. A. Reits and J. J. Neefjes, "From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells," *Nature Cell Biology*, vol. 3, pp. E145–E147, 6 2001.
- [48] P. Schwille and E. Haustein, "Fluorescence Correlation Spectroscopy An Introduction to its Concepts and Applications," tech. rep.
- [49] E. L. Elson, "Fluorescence Correlation Spectroscopy: Past, Present, Future," *Biophysical Journal*, vol. 101, pp. 2855–2870, 12 2011.
- [50] K. Bacia, E. Haustein, and P. Schwille, "Fluorescence correlation spectroscopy: principles and applications.," *Cold Spring Harbor protocols*, vol. 2014, pp. 709–25, 7 2014.
- [51] H. Qian, "On the statistics of fluorescence correlation spectroscopy," *Biophysical Chemistry*, vol. 38, no. 1-2, pp. 49–57, 1990.
- [52] M. Weissman, H. Schindler, and G. Feher, "Determination of molecular weights by fluctuation spectroscopy: application to DNA.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73, pp. 2776–80, 8 1976.
- [53] D. Koppel, F. Morgan, A. Cowan, and J. Carson, "Scanning concentration correlation spectroscopy using the confocal laser microscope," *Biophysical Journal*, vol. 66, pp. 502–507, 2 1994.

- [54] F. Cardarelli and E. Gratton, “In Vivo Imaging of Single-Molecule Translocation Through Nuclear Pore Complexes by Pair Correlation Functions,” *PLoS ONE*, vol. 5, p. e10475, 5 2010.
- [55] E. Hinde, F. Cardarelli, M. A. Digman, and E. Gratton, “In vivo pair correlation analysis of EGFP intranuclear diffusion reveals DNA-dependent molecular flow,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 38, 2010.
- [56] P. Bianchini, F. Cardarelli, M. D. Luca, A. Diaspro, and R. Bizzarri, “Nanoscale Protein Diffusion by STED-Based Pair Correlation Analysis,” *PLoS ONE*, vol. 9, p. e99619, 6 2014.
- [57] M. A. Digman, C. M. Brown, P. Sengupta, P. W. Wiseman, A. R. Horwitz, and E. Gratton, “Measuring Fast Dynamics in Solutions and Cells with a Laser Scanning Microscope,” *Biophysical Journal*, vol. 89, pp. 1317–1327, 8 2005.
- [58] L. Malacrida, E. Rao, and E. Gratton, “Comparison between iMSD and 2D-pCF analysis for molecular motion studies on in vivo cells: The case of the epidermal growth factor receptor,” *Methods*, vol. 140-141, pp. 74–84, 5 2018.
- [59] F. Cardarelli, “Time-resolved biophysical approaches to nucleocytoplasmic transport,” *Computational and Structural Biotechnology Journal*, vol. 15, pp. 299–306, 1 2017.
- [60] B. Hebert, S. Costantino, and P. W. Wiseman, “Spatiotemporal Image Correlation Spectroscopy (STICS) Theory, Verification, and Application to Protein Velocity Mapping in Living CHO Cells,” *Biophysical Journal*, vol. 88, pp. 3601–3614, 5 2005.
- [61] N. O. Petersen, P. L. Höddelius, P. W. Wiseman, O. Seger, and K. E. Magnusson, “Quantitation of membrane receptor distributions by image correlation spectroscopy: concept and application,” *Biophysical Journal*, vol. 65, no. 3, pp. 1135–1146, 1993.
- [62] N. O. Petersen, C. Brown, A. Kaminski, J. Rocheleau, M. Srivastava, and P. W. Wiseman, “Analysis of membrane protein cluster densities and

-
- sizes in situ by image correlation spectroscopy,” *Faraday discussions*, no. 111, pp. 289–305, 1998.
- [63] M. A. Digman and E. Gratton, “Imaging barriers to diffusion by pair correlation functions,” *Biophysical journal*, vol. 97, pp. 665–73, 7 2009.
- [64] M. A. Digman, R. Dalal, A. F. Horwitz, and E. Gratton, “Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope,” *Biophysical Journal*, vol. 94, pp. 2320–2332, 3 2008.
- [65] C. Di Rienzo, F. Cardarelli, M. Di Luca, F. Beltram, and E. Gratton, “Diffusion Tensor Analysis by Two-Dimensional Pair Correlation of Fluorescence Fluctuations in Cells,” *Biophysical Journal*, vol. 111, pp. 841–851, 8 2016.
- [66] M. A. Digman and E. Gratton, “Lessons in Fluctuation Correlation Spectroscopy,” 2011.
- [67] C. M. Brown, R. B. Dalal, B. Hebert, M. A. Digman, A. R. Horwitz, and E. Gratton, “Raster image correlation spectroscopy (RICS) for measuring fast protein dynamics and concentrations with a commercial laser scanning confocal microscope,” *Journal of Microscopy*, vol. 229, pp. 78–91, 1 2008.
- [68] M. J. Rossow, J. M. Sasaki, M. A. Digman, and E. Gratton, “Raster image correlation spectroscopy in live cells,” *Nature protocols*, vol. 5, pp. 1761–1774, 11 2010.
- [69] T. Dertinger, A. Loman, B. Ewers, C. B. Müller, B. Krämer, and J. Enderlein, “The optics and performance of dual-focus fluorescence correlation spectroscopy,” *Optics Express*, vol. 16, p. 14353, 9 2008.
- [70] E. Hinde, K. Thammasiraphop, H. T. T. Duong, J. Yeow, B. Karagoz, C. Boyer, J. J. Gooding, and K. Gaus, “Pair correlation microscopy reveals the role of nanoparticle shape in intracellular transport and site of drug release,” *Nature Nanotechnology*, vol. 12, pp. 81–89, 1 2017.
- [71] M. J. Saxton, “Single-Particle Tracking : The Distribution of Diffusion Coefficients,” vol. 72, no. April, 1997.

- [72] Y. Cui, M. Yu, X. Yao, J. Xing, J. Lin, and X. Li, “Single-Particle Tracking for the Quantification of Membrane Protein Dynamics in Living Plant Cells,” *Molecular Plant*, vol. 11, pp. 1315–1327, 11 2018.
- [73] T. A. Tsunoyama, Y. Watanabe, J. Goto, K. Naito, R. S. Kasai, K. G. Suzuki, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi, “Super-long single-molecule tracking reveals dynamic-anchorage-induced integrin function,” *Nature Chemical Biology*, vol. 14, pp. 497–506, 5 2018.
- [74] N. Bobroff, “Position measurement with a resolution and noise limited instrument,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 57, pp. 1152–1157, 6 1986.
- [75] E. Betzig and R. J. Chichester, “Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy,” *Science*, vol. 262, no. 5138, pp. 1422–1425, 1993.
- [76] R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb, “Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes,” *Biophysical Journal*, vol. 82, pp. 2775–2783, 5 2002.
- [77] M. Dahan, “Diffusion Dynamics of Glycine Receptors Revealed by Single-Quantum Dot Tracking,” *Science*, vol. 302, pp. 442–445, 10 2003.
- [78] P. R. Smith, I. E. Morrison, K. M. Wilson, N. Fernández, and R. J. Cherry, “Anomalous Diffusion of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on HeLa Cells Determined by Single Particle Tracking,” *Biophysical Journal*, vol. 76, pp. 3331–3344, 6 1999.
- [79] K. M. Wilson, I. E. Morrison, P. R. Smith, N. Fernandez, and R. J. Cherry, “Single particle tracking of cell-surface HLA-DR molecules using R-phycoerythrin labeled monoclonal antibodies and fluorescence digital imaging,” *Journal of cell science*, vol. 109, pp. 2101–9, 8 1996.
- [80] H. Bornfleth, P. Edelmann, D. Zink, T. Cremer, and C. Cremer, “Quantitative Motion Analysis of Subchromosomal Foci in Living Cells Using Four-Dimensional Microscopy,” *Biophysical Journal*, vol. 77, pp. 2871–2886, 11 1999.

-
- [81] D. Thomann, D. R. Rines, P. K. Sorger, and G. Danuser, “Automatic fluorescent tag detection in 3D with super-resolution: application to the analysis of chromosome movement,” *Journal of Microscopy*, vol. 208, pp. 49–64, 10 2002.
- [82] J. Enderlein, “Tracking of fluorescent molecules diffusing within membranes,” *Applied Physics B*, vol. 71, pp. 773–777, 11 2000.
- [83] J. Enderlein, “Positional and Temporal Accuracy of Single Molecule Tracking,” *Single Molecules*, vol. 1, pp. 225–230, 9 2000.
- [84] K. Kis-Petikova and E. Gratton, “Distance measurement by circular scanning of the excitation beam in the two-photon microscope,” *Microscopy Research and Technique*, vol. 63, pp. 34–49, 1 2004.
- [85] C. Hellriegel and E. Gratton, “Real-time multi-parameter spectroscopy and localization in three-dimensional single-particle tracking,” *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 6, 2 2009.
- [86] V. Levi, Q. Ruan, and E. Gratton, “3-D Particle Tracking in a Two-Photon Microscope: Application to the Study of Molecular Dynamics in Cells,” *Biophysical Journal*, vol. 88, pp. 2919–2928, 4 2005.
- [87] F. Wehnekamp, G. Plucińska, R. Thong, T. Misgeld, and D. C. Lamb, “Nanoresolution real-time 3D orbital tracking for studying mitochondrial trafficking in vertebrate axons in vivo,” *eLife*, vol. 8, 6 2019.
- [88] M. Gabriel, *Caracterización de nanopartículas metálicas como sondas alternativas para microscopía de fluorescencia y estudio de estructura en la nanoescala*. Universidad de Buenos Aires, 2015.
- [89] Hamamatsu Corporation, “H7422-P40 Datasheet.”
- [90] I. Sobel, “An Isotropic 3x3 Image Gradient Operator,” *Machine Vision for Three-Dimensional Scenes*, no. June, p. 376–379, 1990.
- [91] W. B. Glendinning and J. N. Helbert, *Handbook of VLSI microlithography : principles, technology, and applications*. Noyes Publications, 1991.

- [92] H. J. Levinson, *Principles of Lithography*. SPIE, third edit ed., 2011.
- [93] G. W. CW Li, “MEMS manufacturing techniques for tissue scaffold devices,” in *Mems for Biomedical Applications*, pp. 192–213, Woodhead Publishing, 2012.
- [94] C. A. Van Blitterswijk and J. De Boer, *Tissue Engineering: Second Edition*. Elsevier Inc., 12 2014.
- [95] S. Wu, J. Serbin, and M. Gu, “Two-photon polymerisation for three-dimensional micro-fabrication,” *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 181, pp. 1–11, 7 2006.
- [96] D. Wu, Q.-D. Chen, L.-G. Niu, J.-N. Wang, J. Wang, R. Wang, H. Xia, and H.-B. Sun, “Femtosecond laser rapid prototyping of nanoshells and suspending components towards microfluidic devices,” *Lab on a Chip*, vol. 9, no. 16, p. 2391, 2009.
- [97] N. Brandenberg and M. P. Lutolf, “In Situ Patterning of Microfluidic Networks in 3D Cell-Laden Hydrogels,” *Advanced Materials*, pp. 7450–7456, 2016.
- [98] M. H. Wu, S. B. Huang, and G. B. Lee, “Microfluidic cell culture systems for drug research,” *Lab on a Chip*, vol. 10, no. 8, pp. 939–956, 2010.
- [99] M. Ram and J. P. Davim, *Advanced applications in manufacturing engineering*. Woodhead Publishing, 2019.
- [100] C. Mendes-Felipe, J. Oliveira, I. Etxebarria, J. L. Vilas-Vilela, and S. Lanceros-Mendez, “State-of-the-Art and Future Challenges of UV Curable Polymer-Based Smart Materials for Printing Technologies,” *Advanced Materials Technologies*, vol. 4, p. 1800618, 3 2019.
- [101] D. Kunik, S. Ludueña, S. Costantino, and O. Martinez, “Fluorescent two-photon nanolithography,” *Journal of Microscopy*, vol. 229, pp. 540–544, 3 2008.
- [102] S. Costantino, K. G. Heinze, O. E. Martínez, P. De Koninck, and P. W. Wiseman, “Two-photon fluorescent microlithography for live-cell imaging,” *Microscopy Research and Technique*, vol. 68, pp. 272–276, 12 2005.

-
- [103] M. P. Caral and I. M. Gomez Florenciano, “Microfabricación óptica de estructuras funcionales,” tech. rep., Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 2018.
- [104] “Norland Optical Adhesive 65.”
- [105] R. Cabrera, O. Filevich, B. García-Acosta, J. Athilingam, K. J. Bender, K. E. Poskanzer, and R. Etchenique, “A Visible-Light-Sensitive Caged Serotonin,” *ACS Chemical Neuroscience*, vol. 8, pp. 1036–1042, 5 2017.
- [106] R. Cabrera, *Desarrollo y aplicación biológica de Desarrollo y aplicación biológica de serotonina enjaulada serotonina enjaulada*. PhD thesis, Universidad de Buenos Aires, 2018.
- [107] M. Matsuzaki and H. Kasai, “Two-Photon Uncaging Microscopy,” *Cold Spring Harbor Protocols*, 5 2011.
- [108] G. Bort, T. Gallavardin, D. Ogden, and P. I. Dalko, “From One-Photon to Two-Photon Probes: “Caged” Compounds, Actuators, and Photoswitches,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 52, pp. 4526–4537, 4 2013.
- [109] R. K. Benninger and D. W. Piston, “Two-Photon Excitation Microscopy for the Study of Living Cells and Tissues,” *Current protocols in cell biology*, vol. 0 4, p. Unit, 2013.
- [110] R. Niesner, V. Andresen, J. Neumann, H. Spiecker, and M. Gunzer, “The Power of Single and Multibeam Two-Photon Microscopy for High-Resolution and High-Speed Deep Tissue and Intravital Imaging,” *Biophysical Journal*, vol. 93, no. 7, p. 2519, 2007.
- [111] R. Cabrera, M. Gabriel, L. C. Estrada, and R. Etchenique, “Direct Measurement of Two-Photon Action Cross Section,” *Analytical Chemistry*, vol. 91, pp. 5968–5972, 5 2019.
- [112] C. Xu and W. W. Webb, “Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm,” *Journal of the Optical Society of America B*, vol. 13, p. 481, 3 1996.

- [113] B. Xu, Y. Coello, V. V. Lozovoy, and M. Dantus, “Two-photon fluorescence excitation spectroscopy by pulse shaping ultrabroad-bandwidth femtosecond laser pulses,” *Applied Optics*, vol. 49, p. 6348, 11 2010.
- [114] A. V. Belingheri, *Endocitosis rápida en células cromafines de ratón: mecanismos asociados, su regulación por Ca^{2+} y su participación en el reciclado vesicular*. PhD thesis, Universidad de Buenos Aires, 2016.
- [115] L. Díaz Flores, R. Gutiérrez, H. Varela, F. Valladares, H. Alvarez-Argüelles, and R. Borges, “Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells,” *Acta Physiol*, vol. 192, pp. 145–163, 2008.
- [116] A. M. G. de Diego, L. Gandía, and A. G. García, “A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla.,” *Acta physiologica (Oxford, England)*, vol. 192, pp. 287–301, 2 2008.
- [117] M. A. Bittner and R. W. Holz, “Kinetic analysis of secretion from permeabilized adrenal chromaffin cells reveals distinct components.,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 267, pp. 16219–25, 8 1992.
- [118] E. Neher and R. S. Zucker, “Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells.,” *Neuron*, vol. 10, pp. 21–30, 1 1993.
- [119] M. Joensuu, P. Padmanabhan, N. Durisic, A. T. D. Bademosi, E. C. Williams, I. C. Morrow, C. B. Harper, W. Jung, R. G. Parton, G. J. Goodhill, A. Papadopoulos, and F. A. Meunier, “Subdiffractive tracking of internalized molecules reveals heterogeneous motion states of synaptic vesicles,” *Journal of Cell Biology*, vol. 215, no. 2, 2016.
- [120] A. F. L. Schneider and C. P. R. Hackenberger, “Fluorescent labelling in living cells,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 48, pp. 61–68, 12 2017.
- [121] C. J. Fahrni, “Fluorescent probes and labels for cellular imaging,” *Chimia*, vol. 63, pp. 714–720, 11 2009.

-
- [122] O. S. Wolfbeis, “An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging,” *Chemical Society Reviews*, vol. 44, pp. 4743–4768, 7 2015.
- [123] P. Bharadwaj, P. Anger, and L. Novotny, “Nanoplasmonic enhancement of single-molecule fluorescence,” *Nanotechnology*, vol. 18, 1 2007.
- [124] A. Anzalone, M. Gabriel, L. C. Estrada, and E. Gratton, “Spectral Properties of Single Gold Nanoparticles in Close Proximity to Biological Fluorophores Excited by 2-Photon Excitation,” *PLOS ONE*, vol. 10, p. e0124975, 4 2015.
- [125] H. Wang, T. B. Huff, D. A. Zweifel, W. He, P. S. Low, A. Wei, and J.-X. Cheng, “In vitro and in vivo two-photon luminescence imaging of single gold nanorods,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, pp. 15752–15756, 11 2005.
- [126] L. C. Estrada and E. Gratton, “3D Nanometer Images of Biological Fibers by Directed Motion of Gold Nanoparticles,” pp. 4656–4660, 2011.
- [127] B. Chen, L. C. Estrada, C. Hellriegel, and E. Gratton, “Nanometer-scale optical imaging of collagen fibers using gold nanoparticles,” *Biomedical Optics Express*, vol. 2, p. 511, 3 2011.
- [128] S. K. Nune, P. Gunda, P. K. Thallapally, Y.-Y. Lin, M. Laird Forrest, and C. J. Berkland, “Nanoparticles for biomedical imaging,” *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 6, pp. 1175–1194, 11 2009.
- [129] N. J. Durr, T. Larson, D. K. Smith, B. A. Korgel, K. Sokolov, and A. Ben-Yakar, “Two-Photon Luminescence Imaging of Cancer Cells Using Molecularly Targeted Gold Nanorods,” *Nano Letters*, vol. 7, pp. 941–945, 4 2007.
- [130] L. Koval, E. Yavorskaya, and E. Lukyanetz, “Electron Microscopic Evidence for Multiple Types of Secretory Vesicles in Bovine Chromaffin Cells,” *General and Comparative Endocrinology*, vol. 121, pp. 261–277, 3 2001.

- [131] W. G. Annaert, I. Liona, A. C. Backer, W. A. Jacob, and W. P. Potter, “Catecholamines Are Present in a Synaptic-Like Microvesicle-Enriched Fraction from Bovine Adrenal Medulla,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 60, pp. 1746–1754, 5 1993.
- [132] A. E. Perez Bay, L. I. Ibañez, and F. D. Marengo, “Rapid recovery of releasable vesicles and formation of nonreleasable endosomes follow intense exocytosis in chromaffin cells,” *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 293, pp. C1509–C1522, 11 2007.
- [133] M. Gabriel, J. Moya-Díaz, L. I. Gallo, F. D. Marengo, and L. C. Estrada, “Single particle tracking of internalized metallic nanoparticles reveals heterogeneous directed motion after clathrin dependent endocytosis in mouse chromaffin cells,” *Methods and Applications in Fluorescence*, vol. 6, p. 014003, 12 2017.
- [134] D. Dutta and J. G. Donaldson, “Search for inhibitors of endocytosis,” *Cellular Logistics*, vol. 2, pp. 203–208, 10 2012.
- [135] S. Houy, P. Croisé, O. Gubar, S. Chasserot-Golaz, P. Tryoen-Tóth, Y. Bailly, S. Ory, M.-F. Bader, and S. Gasman, “Exocytosis and Endocytosis in Neuroendocrine Cells: Inseparable Membranes!,” *Frontiers in Endocrinology*, vol. 4, no. OCT, 2013.
- [136] A. Patzak, “Exocytotic exposure and recycling of membrane antigens of chromaffin granules: ultrastructural evaluation after immunolabeling,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 102, pp. 510–515, 2 1986.
- [137] M. Gabriel, A. Anzalone, E. Gratton, and L. C. Estrada, “A tracking based nanoimaging method for fast detection of surfaces inhomogeneities using gold nanoparticles,” *Microscopy Research and Technique*, 7 2019.
- [138] M. Saxton, “Lateral diffusion in an archipelago. Single-particle diffusion,” *Biophysical Journal*, vol. 64, pp. 1766–1780, 6 1993.
- [139] X. Michalet, “Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error: Brownian motion in an isotropic medium,” *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, vol. 82, 10 2010.

-
- [140] N. Monnier, S.-M. Guo, M. Mori, J. He, P. Lénárt, and M. Bathe, “Bayesian Approach to MSD-Based Analysis of Particle Motion in Live Cells,” *Biophysical Journal*, vol. 103, pp. 616–626, 8 2012.
- [141] D. Arcizet, B. Meier, E. Sackmann, J. O. Rädler, and D. Heinrich, “Temporal Analysis of Active and Passive Transport in Living Cells,” *Physical Review Letters*, vol. 101, p. 248103, 12 2008.
- [142] J. Mahowald, D. Arcizet, and D. Heinrich, “Impact of External Stimuli and Cell Micro-Architecture on Intracellular Transport States,” *ChemPhysChem*, vol. 10, pp. 1559–1566, 7 2009.
- [143] C. Loverdo, O. Bénichou, M. Moreau, and R. Voituriez, “Enhanced reaction kinetics in biological cells,” *Nature Physics*, vol. 4, pp. 134–137, 2 2008.
- [144] A. Hart, “Mann-Whitney test is not just a test of medians: differences in spread can be important.,” *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 323, pp. 391–3, 8 2001.
- [145] N. Nachar, “The Mann-Whitney U: A Test for Assessing Whether Two Independent Samples Come from the Same Distribution,” Tech. Rep. 1, 2008.
- [146] A. E. Perez Bay, A. V. Belingheri, Y. D. Álvarez, and F. D. Marengo, “Membrane cycling after the excess retrieval mode of rapid endocytosis in mouse chromaffin cells,” *Acta Physiologica*, vol. 204, pp. 403–418, 3 2012.
- [147] M. I. Colombo, W. Beron, and P. D. Stahl, “Calmodulin regulates endosome fusion,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 12, pp. 7707–7712, 1997.
- [148] J. H. Phillips, K. Burridge, S. P. Wilson, and N. Kirshner, “Visualization of the exocytosis/endocytosis secretory cycle in cultured adrenal chromaffin cells,” *Journal of Cell Biology*, vol. 97, no. 6, pp. 1906–1917, 1983.
- [149] D. E. Knight, “Calcium-dependent transferrin receptor recycling in bovine chromaffin cells,” *Traffic*, vol. 3, no. 4, pp. 298–307, 2002.

- [150] F. C. Bronfman, M. Tcherpakov, T. M. Jovin, and M. Fainzilber, “Ligand-induced internalization of the p75 neurotrophin receptor: A slow route to the signaling endosome,” *Journal of Neuroscience*, vol. 23, pp. 3209–3220, 4 2003.
- [151] S. Bhatt, P. W. Gething, O. J. Brady, J. P. Messina, A. W. Farlow, C. L. Moyes, J. M. Drake, J. S. Brownstein, A. G. Hoen, O. Sankoh, M. F. Myers, D. B. George, T. Jaenisch, G. R. W. Wint, C. P. Simmons, T. W. Scott, J. J. Farrar, and S. I. Hay, “The global distribution and burden of dengue,” *Nature*, vol. 496, pp. 504–507, 4 2013.
- [152] R. J. Kuhn, W. Zhang, M. G. Rossmann, S. V. Pletnev, J. Corver, E. Lenches, C. T. Jones, S. Mukhopadhyay, P. R. Chipman, E. G. Strauss, T. S. Baker, and J. H. Strauss, “Structure of Dengue Virus,” *Cell*, vol. 108, pp. 717–725, 3 2002.
- [153] W. Zhang, P. R. Chipman, J. Corver, P. R. Johnson, Y. Zhang, S. Mukhopadhyay, T. S. Baker, J. H. Strauss, M. G. Rossmann, and R. J. Kuhn, “Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus,” *Nature Structural Biology*, vol. 10, pp. 907–912, 11 2003.
- [154] M. Perera-Lecoin, L. Meertens, X. Carnec, and A. Amara, “Flavivirus entry receptors: An update,” 12 2013.
- [155] E. G. Acosta, V. Castilla, and E. B. Damonte, “Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis,” *Journal of General Virology*, vol. 89, pp. 474–484, 2 2008.
- [156] E. G. Acosta, V. Castilla, and E. B. Damonte, “Differential Requirements in Endocytic Trafficking for Penetration of Dengue Virus,” *PLoS ONE*, vol. 7, 9 2012.
- [157] J. M. Smit, B. Moesker, I. Rodenhuis-Zybert, and J. Wilschut, “Flavivirus cell entry and membrane fusion,” *Viruses*, vol. 3, pp. 160–171, 2 2011.

-
- [158] Y. Modis, S. Ogata, D. Clements, and S. C. Harrison, "Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion," *Nature*, vol. 427, pp. 313–319, 1 2004.
- [159] I.-M. Yu, W. Zhang, H. A. Holdaway, L. Li, V. A. Kostyuchenko, P. R. Chipman, R. J. Kuhn, M. G. Rossmann, and J. Chen, "Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation," *Science*, vol. 319, pp. 1834–1837, 3 2008.
- [160] L. A. Byk and A. V. Gamarnik, "Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein," *Annual Review of Virology*, vol. 3, pp. 263–281, 9 2016.
- [161] T. M. Colpitts, S. Barthel, P. Wang, and E. Fikrig, "Dengue Virus Capsid Protein Binds Core Histones and Inhibits Nucleosome Formation in Human Liver Cells," *PLoS ONE*, vol. 6, p. e24365, 9 2011.
- [162] L. A. Byk, N. G. Iglesias, F. A. De Maio, L. G. Gebhard, M. Rossi, and A. V. Gamarnik, "Dengue Virus Genome Uncoating Requires Ubiquitination," *American Society for Microbiology*, vol. 7, no. 3, pp. 1–10, 2016.
- [163] N. G. Iglesias, J. A. Mondotte, L. A. Byk, F. A. D. Maio, M. Marcelo, C. Alvarez, and A. V. Gamarnik, "Dengue Virus Uses a Non-Canonical Function of the Host GBF1- Arf-COPI System for Capsid Protein Accumulation on Lipid Droplets," *Traffic.*, vol. 16, no. 9, pp. 962–977, 2015.
- [164] A. K. Tiwary and D. Cecilia, "Kinetics of the association of dengue virus capsid protein with the granular component of nucleolus," *Virology*, vol. 502, no. November 2016, pp. 48–55, 2017.
- [165] M. M. Samsa, J. A. Mondotte, J. J. Caramelo, and A. V. Gamarnik, "Uncoupling cis-Acting RNA elements from coding sequences revealed a requirement of the N-terminal region of dengue virus capsid protein in virus particle formation.," *Journal of virology*, vol. 86, pp. 1046–58, 1 2012.

- [166] R. Bulich and J. G. Aaskov, “Nuclear localization of dengue 2 virus core protein detected with monoclonal antibodies,” *Journal of General Virology*, vol. 73, no. 11, pp. 2999–3003, 1992.
- [167] M. Tadano, y. Makino, T. Fukunaga, Y. Okuno, and K. Fukai, “Detection of dengue 4 virus core protein in the nucleus. I. A monoclonal antibody of dengue 4 virus reacts with the antigen in the nucleus and cytoplasm,” *Journal of General Virology*, vol. 70, no. 6, pp. 1409–1415, 1989.
- [168] S. H. Wang, W. J. Syu, K. J. Huang, H. Y. Lei, C. W. Yao, C. C. King, and S. T. Hu, “Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus,” *Journal of General Virology*, vol. 83, pp. 3093–3102, 12 2002.
- [169] N. C. Shaner, P. A. Steinbach, and R. Y. Tsien, “A guide to choosing fluorescent proteins,” 2005.
- [170] K. D. Piatkevich and V. V. Verkhusha, *Guide to red fluorescent proteins and biosensors for flow cytometry*, vol. 102. 2011.
- [171] C. B. Müller, A. Loman, V. Pacheco, F. Koberling, D. Willbold, W. Richter, and J. Enderlein, “Precise measurement of diffusion by multi-color dual-focus fluorescence correlation spectroscopy,” *EPL (Europhysics Letters)*, vol. 83, p. 46001, 8 2008.
- [172] P.-O. Gendron, F. Avaltroni, and K. J. Wilkinson, “Diffusion Coefficients of Several Rhodamine Derivatives as Determined by Pulsed Field Gradient–Nuclear Magnetic Resonance and Fluorescence Correlation Spectroscopy,” *Journal of Fluorescence*, vol. 18, pp. 1093–1101, 11 2008.
- [173] C. B. Müller, A. Loman, V. Pacheco, F. Koberling, D. Willbold, W. Richter, and J. Enderlein, “Precise measurement of diffusion by multi-color dual-focus fluorescence correlation spectroscopy,” *EPL*, vol. 83, 8 2008.
- [174] B. Wu, Y. Chen, and J. D. Müller, “Fluorescence Fluctuation Spectroscopy of mCherry in Living Cells,” *Biophysical Journal*, vol. 96, pp. 2391–2404, 3 2009.

-
- [175] A. Kitamura and M. Kinjo, “Determination of diffusion coefficients in live cells using fluorescence recovery after photobleaching with wide-field fluorescence microscopy,” *Biophysics and Physicobiology*, vol. 15, no. 0, pp. 1–7, 2018.
- [176] H. Tang, C. Hammack, S. C. Ogden, Z. Wen, X. Qian, Y. Li, B. Yao, J. Shin, F. Zhang, E. M. Lee, K. M. Christian, R. A. Didier, P. Jin, H. Song, and G.-l. Ming, “Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth,” *Cell Stem Cell*, vol. 18, pp. 587–590, 5 2016.
- [177] R. G. Huber, X. N. Lim, W. C. Ng, A. Y. Sim, H. X. Poh, Y. Shen, S. Y. Lim, K. B. Sundstrom, X. Sun, J. G. Aw, H. K. Too, P. H. Boey, A. Wilm, T. Chawla, M. M. Choy, L. Jiang, P. F. de Sessions, X. J. Loh, S. Alonso, M. Hibberd, N. Nagarajan, E. E. Ooi, P. J. Bond, O. M. Sessions, and Y. Wan, “Structure mapping of dengue and Zika viruses reveals functional long-range interactions,” *Nature Communications*, vol. 10, 12 2019.
- [178] S. Hihara, C.-G. Pack, K. Kaizu, T. Tani, T. Hanafusa, T. Nozaki, S. Takemoto, T. Yoshimi, H. Yokota, N. Imamoto, Y. Sako, M. Kinjo, K. Takahashi, T. Nagai, and K. Maeshima, “Local Nucleosome Dynamics Facilitate Chromatin Accessibility in Living Mammalian Cells,” *Cell Reports*, vol. 2, pp. 1645–1656, 12 2012.
- [179] C. M. Caragine, S. C. Haley, and A. Zidovska, “Surface Fluctuations and Coalescence of Nucleolar Droplets in the Human Cell Nucleus,” *Physical Review Letters*, vol. 121, p. 148101, 10 2018.

Agradecimientos

Son muchas las personas hacia las cuales me siento agradecida por lo que me brindaron durante esta etapa. No podría mencionar a cada una en estas breves líneas de agradecimientos, pero pienso que toda la gratitud que siento la he manifestado en estos años, ya sea a través de hechos o de palabras, y eso es lo que me parece más importante.

A Laura, por todo lo que me enseñó, por su paciencia y dedicación. Por ser ejemplo de que es posible ser madre y científica.

A los grupos de Andrea Gamarnik y de Fernando Marengo, quienes me permitieron aprender del maravilloso mundo de la biología.

A Enrico Gratton por estar siempre dispuesto a brindar su ayuda.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por su excelencia, y al CONICET por la oportunidad de realizar este doctorado.

Al Laboratorio de Electrónica Cuántica por el ambiente y la alegría.

A todas las personas que conocí en esta Facultad que me permitieron aprender y disfrutar tantos buenos momentos. Gracias por la amistad.

A mi familia, por los valores, el afecto y el acompañamiento.

A mis papás.

Glosario

Símbolo	Descripción	Primera cita
PSF	Respuesta óptica del microscopio a un objeto puntual	Capítulo 1
λ	longitud de onda	Capítulo 1
NA	apertura numérica de la lente objetivo	Capítulo 1
ω_0	Cintura de la PSF en la dirección lateral	Capítulo 1
ω_z	Cintura de la PSF en la dirección axial	Capítulo 1
FCS	Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia	Capítulo 1
SPT	Seguimiento de partículas individuales	Capítulo 1
$F(t)$	intensidad de fluorescencia en el tiempo t	Capítulo 2
$G(\tau)$	función de correlación temporal de la intensidad	Capítulo 2
K	eficiencia de detección del microscopio	Capítulo 2
σ_{abs}	sección eficaz de absorción molecular	Capítulo 2
η	eficiencia total de colección	Capítulo 2
$C(\vec{r}, t)$	concentración de moléculas en \vec{r} a tiempo t	Capítulo 2
$G(0)$	amplitud de la función de correlación a $\tau = 0$	Capítulo 2

Símbolo	Descripción	Primera cita
D	coeficiente de difusión	Capítulo 2
V	volumen de observación	Capítulo 2
RICS	Espectroscopía de Correlación de Imágenes de Barrido	Capítulo 2
pCF	Función de correlación de pares	Capítulo 2
ϕ_{phot}	eficiencia cuántica de fotoliberación	Capítulo 5
δ	sección eficaz de dos fotones	Capítulo 5
k_{diff}	constante de difusión molecular	Capítulo 5
k_{fot}	constante de decaimiento asociada a la fotólisis	Capítulo 5
ϕ_{fluo}	eficiencia cuántica de fluorescencia	Capítulo 5
MSD	Desplazamiento Cuadrático Medio	Capítulo 6
v_i	velocidad instantánea	Capítulo 6
α	parámetro del tipo de movimiento	Capítulo 6

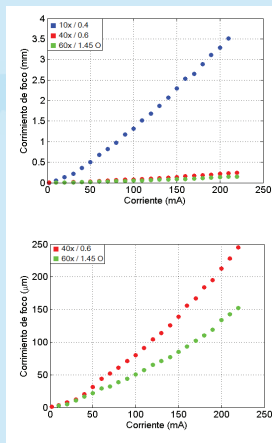
Apéndice A

Sistema de Enfoque Eléctricamente Dirigido

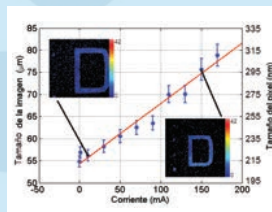
Datos técnicos

Aumento en el rango de trabajo y el campo visual

El rango de distancias de trabajo del SPEED depende de la amplificación de la lente objetivo con la cual se lo combine. En la figura se puede observar que para una lente objetivo de 10X, es posible barrer distancias de hasta 3 milímetros, rango 30 veces mayor que el accesible con el posicionador piezoeléctrico de referencia (Physik Instrumente PIFOC 721). Asimismo, si se trabaja con objetivos de mayor magnificación, se obtiene un rango de hasta 250 micrones y 150 micrones para objetivos de 40X y 60X respectivamente.



Aumentando la corriente de alimentación del SPEED, también aumenta el campo visual que se puede observar. Esta propiedad fue caracterizada con una muestra patrón, y se obtuvo un aumento de 0.5 nm/mA utilizando un objetivo de magnificación 60X. Asimismo el SPEED puede cambiar la posición entre dos planos de enfoque distantes algunos micrones en aproximadamente 2 milisegundos lo cual representa un orden de magnitud más rápido que lo alcanzado en las mismas condiciones experimentales con el posicionador piezoeléctrico de referencia. Tanto el rango de barrido como la velocidad de respuesta del SPEED fueron extensamente caracterizados, encontrando ser muy superiores a las versiones disponibles actualmente en el mercado.



Rapidez

El SPEED puede cambiar la posición entre dos planos distantes algunos micrones en aproximadamente 2 milisegundos, lo cual representa un orden de magnitud más rápido que lo alcanzado en las mismas condiciones experimentales con el posicionador piezoeléctrico de referencia.



Sistema Para Enfoque Eléctricamente Dirigido

El SPEED es un sistema de enfoque rápido en el orden de los kiloHertz destinado a la microscopía, fácilmente adaptable a diferentes aplicaciones tanto en la industria como en la ciencia básica. Está basado en la utilización conjunta de dos lentes: una lente eléctricamente sintonizable y una lente divergente que están acopladas mediante una carcasa metálica diseñada para que el sistema sea adaptable a distintas necesidades de uso.

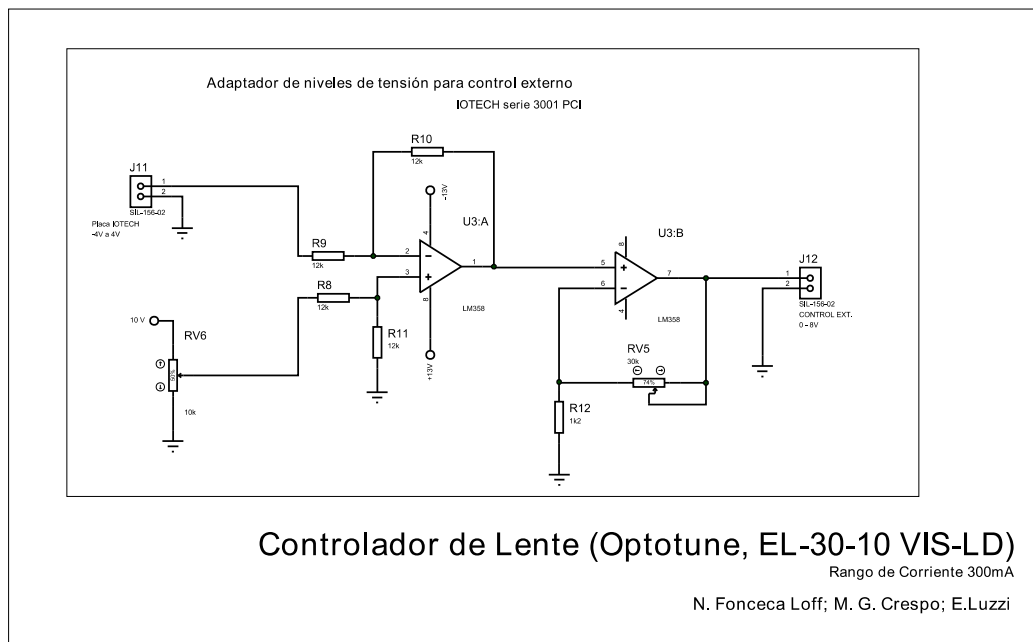
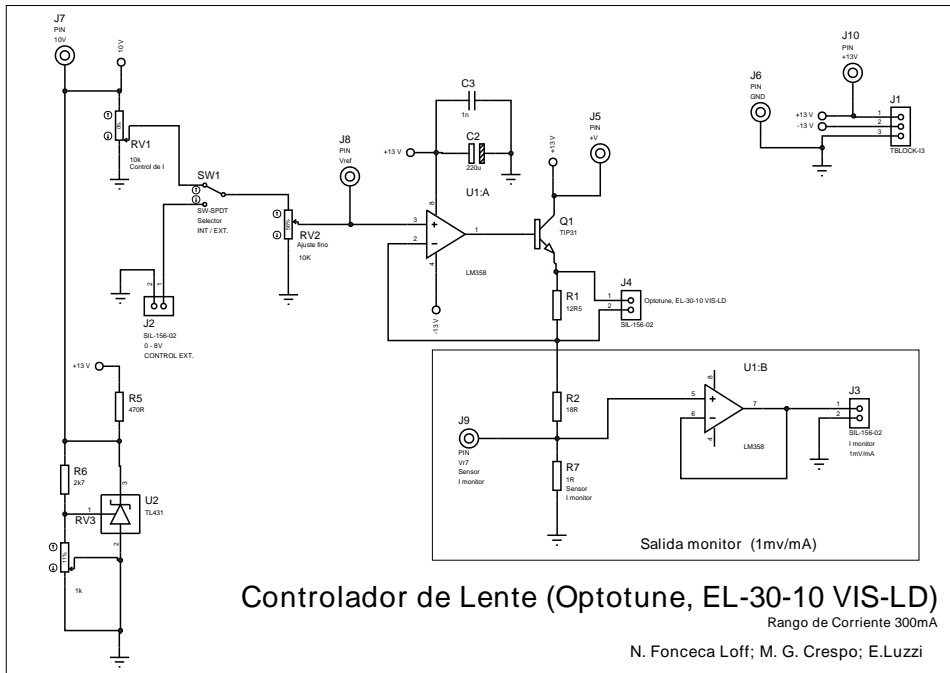
Este sistema reemplaza a los sistemas de enfoque tradicionales basados en el desplazamiento mecánico de una lente objetivo, y ofrece un mejor rendimiento, incrementando en un orden de magnitud la velocidad de enfoque y -dependiendo de la lente objetivo utilizada- en dos órdenes de magnitud su rango de barrido. El SPEED puede ser utilizado con objetivos de inmersión en aceite sin que esto represente una disminución en la velocidad de funcionamiento.

El SPEED está diseñado para utilizarse en cualquier microscopio óptico que requiera de un sistema de barrido rápido, reemplazando dispositivos comerciales importados y de alto costo.

Todas estas características convierten al SPEED en un sistema competitivo ante las alternativas vigentes en el mercado.



APÉNDICE A. PROYECTO *SPEED*



Apéndice B

Microfabricación por Escritura Directa

¿Cómo funciona?

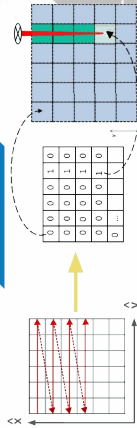
La técnica es muy rápida y sencilla. Consiste en el curado óptico de resinas fotosensibles. El proceso completo de fabricación demanda solo 10 minutos y 3 pasos:

- ✓ depósito de una gota de la resina sobre un cubreobjetos de vidrio;
- ✓ irradiación de la resina con un láser para promover el curado de las regiones iluminadas;
- ✓ remoción del excedente no curado sumergiendo la muestra unos minutos en una solución de acetona.

Depósito



Grabado

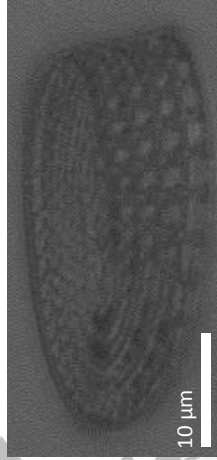


Remoción



La posibilidad de tener un procedimiento de bajo costo instalado en el laboratorio, que no requiere del uso de salas especiales para la preparación de las muestras y con la versatilidad de fabricación de la muestra μ FED resulta una gran ventaja respecto a la situación actual en el área de la microfabricación de dispositivos que utiliza equipos asociados a grandes facilidades.

Microfabricación por escritura directa



μ FED (Micro Fabricación por escritura directa) utiliza un láser enfocado como fuente de iluminación. La técnica de microfabricación propuesta es muy rápida y sencilla y consiste en el curado óptico de resinas fotosensibles disponibles actualmente en el mercado, a las que se les pueden disolver previamente compuestos adicionales para otorgar funcionalidades específicas.

La técnica soluciona dos problemas concretos: los largos tiempos involucrados, y el altísimo costo asociado a las técnicas de microfabricación actuales, permitiendo fabricar muestras de diseño totalmente arbitrario, extremadamente rápido (menos de 10 min para una muestra de $100 \times 100 \mu\text{m}$ con una resolución de línea de 500 nm), y con un costo menor a 1 US\$ por muestra.



μ FED permite la fabricación de microdispositivos con una resolución espacial mayor que la de su par comercial regional y con un costo menor a 1US\$ por muestra.

Aplicaciones

- ◇ Microfluídica.
- ◇ Máscaras para la industria semiconductor.
- ◇ Películas porosas para la liberación controlada de fármacos.
- ◇ Microestructuras con propiedades conductoras o magnéticas.
- ◇ Películas flexibles.
- ◇ Diseño de dispositivos biocompatibles de fabricación rápida y bajo costo.

Para más información:

<http://www.lec.df.uba.ar/microfed>

