



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES.**  
**CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA**  
**AVANZADA**

**“Estudio de una interpretación de la medición del coeficiente de difusión en membranas celulares mediante la recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo”**

**TESIS:**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES.**

PRESENTA:

**RAFAEL NAVARRO URO**

**TUTOR PRINCIPAL:**

DOCTOR REMY FERNAND ÁVILA FOUCAT

(CFATA)

**COMITÉ TUTOR:**

DOCTORA LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN

(CFATA)

**ASESOR(A) EXTERNO(A):**

DOCTOR, IVÁN SANTAMARÍA HOLECK

(UMDI, FACULTAD DE CIENCIAS)

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO A (31/03/2022)**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Índice

1. Introducción .....	8
2. Marco teórico .....	12
2.1. Microscopía de fluorescencia: .....	12
2.1.1. Marcador Fluorescente: .....	14
2.2. Relación de la Biología de la membrana celular con la fluidez de la membrana celular ..	15
2.3. FRAP .....	19
2.3.1. Técnica de FRAP paso a paso .....	23
2.4. Difusión .....	24
2.4.1. Difusión tangencial .....	25
2.5. MSD (Desplazamiento cuadrático medio) .....	25
3. Metodología experimental .....	30
3.1. Cultivo celular HEK .....	30
3.1.1. Materiales y reactivos para el cultivo celular .....	30
3.1.2. Pase de cultivo .....	31
3.1.3. Materiales y reactivos para preparación de FM4-64 .....	33
3.1.3.1. Metodología para preparación de muestra con FM4-64 .....	34
3.2. Técnica de FRAP en microscopía confocal .....	34
3.3. Análisis de imagen mediante FRAP .....	36
3.3.1. Normalización de fluorescencia en la técnica de FRAP .....	37
4. Resultados .....	39
4.1. Relación paramétrica de FRAP y MSD .....	39
4.2. Técnica de FRAP en microscopía confocal .....	40
4.3. Análisis de imagen mediante FRAP .....	41
4.4. Análisis de datos .....	42
4.5. Ajuste de la curva de FRAP .....	43
5. Discusión .....	49
6. Conclusión .....	55
7. Bibliografía .....	56
8. Apéndice A .....	60

## Índice de Figuras

Figura 1 .....	13
Figura 2 .....	14

Figura 3.....	16
Figura 4.....	17
Figura 5.....	17
Figura 6.....	18
Figura 7.....	21
Figura 8.....	26
Figura 9.....	32
Figura 10.....	33
Figura 12.....	40
Figura 13.....	41
Figura 14.....	42
Figura 15.....	44
Figura 16.....	45
Figura 17.....	46
Figura 18.....	48
Figura 19.....	48
Figura 20.....	51
Figura 21.....	53
Figura 22.....	60
Figura 23.....	61
Figura 25.....	62
Figura 26.....	63
Figura 27.....	64
Figura 28.....	65
Figura 29.....	66
Figura 30.....	67
Figura 31.....	68
Figura 32.....	69
Figura 33.....	70
Figura 34.....	71
Figura 35.....	72
Figura 36.....	73
Figura 37.....	74
Figura 38.....	75
Figura 40.....	77

# Agradecimientos

En este trabajo de tesis agradezco al personal administrativo del CFATA por darme la comodidad del espacio de trabajo, por en la inversión de materiales y reactivos para la experimentación y por estar siempre al tanto de nuestra condición de salud dada la contingencia epidemiológica provocada por la pandemia de covid-19.

Agradezco la atención y dedicación de la Dra. Luz María López Marín por ofrecerme su asesoría en el desarrollo de cultivos de células HEK, por obsequiarnos dos pases de cultivo para la experimentación de la técnica de FRAP. Este proyecto de tesis no se podría haber llevado a cabo sin su apoyo. Agradezco al Dr. Iván Santamaría Hólek por las largas asesorías relativas al modelo teórico al desplazamiento cuadrático promedio (MSD). Agradezco a mi asesor de tesis el Dr. Remy Fernand Avila Foucat por dedicar su tiempo en asesorarme en el uso del microscopio confocal, realizar los experimentos pertinentes al análisis de la interpretación de FRAP y por ofrecer su dedicación en conocimientos de microscopía y óptica física. También agradezco su preocupación por mi estado de salud cuando enferme de covid-19. A mi comité tutor, los Dres. Avila, López Marín y Santamaría, muchas gracias por su dedicación en el seguimiento de mis estudios de maestría. Agradezco al Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales por el uso del microscopio confocal Zeiss. También agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM a través del proyecto IN108420 y al Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP), ambos de la UNAM, por financiar los reactivos y consumibles utilizados en este trabajo.

Agradezco a mi compañero de maestría el físico Harold David Hernández Martínez por haberme compartido su reflexión de vida y conocimientos de la física. Estoy profundamente agradecido por las experiencias que viví desde el 2019 hasta ahora.

Agradezco a mi padre Arturo Navarro Westphal y a mi madre Hilda Cecilia Uro Antillón por apoyarme emocional y económicamente en el tiempo de vida que llevo recorriendo. A mi hermano Arturo Eduardo Navarro Uro quien me fortaleció y fue mi fuerza motriz para superarme.

Agradezco al Conacyt por apoyarme con la beca de maestría. Sin ese apoyo no habría tenido el sustento económico para dedicarle el tiempo necesario a mi formación.

# Resumen

La recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP, por sus siglas en inglés) es una técnica de microscopia confocal que mide la recuperación de fluorescencia después de ocasionar blanqueamiento en una región de la muestra para estudiar la difusión de las moléculas fluorescentes. Esta técnica se usa en particular para caracterizar la fluidez de membranas celulares.

El primer objetivo de este trabajo de tesis es estudiar una interpretación alternativa de mediciones de FRAP, basada en la relación teórica entre la función ajustada de FRAP y el desplazamiento cuadrático medio (MSD) de moléculas fluorescentes, ambas en función del tiempo. El segundo objetivo es aplicar el estudio teórico a la caracterización de la fluidez de la membrana de células de la línea HEK.

Se llevaron a cabo experimentos de FRAP usando el marcador de membrana FM4-64. Las mediciones de recuperación de fluorescencia en función del tiempo fueron ajustadas con la curva empírica de FRAP. Se encontró que existe una equivalencia entre la curva ajustada a FRAP y la expresión del MSD de moléculas en difusión en la membrana celular. Esta equivalencia permite calcular de forma analítica el coeficiente de difusión a partir de los parámetros de ajuste experimentales. También observamos rasgos fenotípicos de apoptosis en la base de la célula que pudiera estar relacionado a las vesículas que producen irregularidades en la intensidad de fluorescencia en la ROI1 y que afectan los resultados de coeficiente de difusión obtenidos por FRAP.

# Abstract

FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) is a confocal microscopy technique that measures the recovery of fluorescence after bleaching a region of the sample to study the diffusion of fluorescent molecules. This technique is used in particular to characterize the fluidity of cell membranes.

The first objective of this thesis is to study an alternative interpretation of FRAP measurements, based on the theoretical relationship between the fitted FRAP function and the mean square displacement (MSD) of fluorescent molecules, both as a function of time and also, we explain the relation about graphic from FRAP with the phenomenom what happens in the cell give interpretation about follow-up visual image in relationship with recovery fluorescence. The second objective is to apply the theoretical study to the characterization of the fluidity of membrane of HEK-line cells.

It was found that there is an equivalence between the curve fitted to FRAP and the MSD expression of molecules in diffusion in the cell membrane. This equivalence allows analytical calculation of the diffusion coefficient from the fitted parameters. We also observed phenotypic features of apoptosis at the base of the cell that could be related to vesicles that produce fluorescence intensity irregularities in ROI1 and can perturb the fluorescence intensity measurements affecting the diffusion coefficient results obtained by FRAP.



# 1.Introducción

La técnica de Recuperación de Fluorescencia después del Fotoblanqueo (FRAP, por sus siglas en inglés) es ampliamente utilizada para caracterizar la movilidad de moléculas en biología celular y ciencia de materiales (Lorén et al., 2015). Esta técnica forma parte de una serie de metodologías que usan fluorescencia para caracterizar movimiento de moléculas en material biológico (Kitamura & Kinjo, et al., 2018). Los siguientes son ejemplos de investigaciones basadas en FRAP: Se ha estudiado la difusión lateral de proteínas fluorescentes (Schlessinger et al., 1976), (Axelrod et al., 1976); la movilidad de proteínas a través del medio citoplasmático en el interior de la célula ha sido cuantificada (D Lansing, B Ware, et al., 1982), (Wojcieszyn et al., 1981); se ha caracterizado la interacción por movilidad de albumina en membrana en tejido neoplásico (Chary & Jain, et al., 1989); la rapidez de interacción de receptores glucocorticoides ha sido analizada en función de la concentración de segregación de hormonas in vivo (McNally et al., 2000); el cambio reológico de membrana de bacteria por fotoblanqueamiento de proteínas verdes fluorescentes ha sido estudiado (Swaminathan et al., 1997); se ha investigado la influencia de la variación del coeficiente de difusión de proteínas por el cambio de forma del retículo endoplasmático usando proteína verde fluorescente (Sbalzarini et al., 2005); se ha puesto en evidencia que radiación láser en el infrarrojo cercano puede aumentar la movilidad de lípidos en la membrana celular de fibroblastos (Avila et al., 2018); en el contexto de la terapia génica, FRAP se ha utilizado para medir la difusión de nanoesferas de poliestireno, de ADN plasmídico y de liposomas en el vítreo de ojos bovinos (Peeters et al., 2005).

Una de las razones del auge de FRAP en investigaciones biomédicas y farmacéuticas es la necesidad de medir el coeficiente de difusión  $D$  de lípidos en la membrana celular, para estudiar la interrelación de biomoléculas con la membrana. En algunos estudios de la difusión de fármacos en la membrana se involucra el análisis de fluidez de lípidos membranales, con el propósito de estudiar la velocidad de propagación de fármacos a escala micrométrica a través de la membrana celular.

FRAP también se ha utilizado para desarrollar nuevas terapias médicas en tejidos, con la finalidad de determinar la eficiencia de propagación de fármacos en la célula (Deschout et al., 2014). El método de FRAP ha sido aplicado para determinar la constante de producto de las proteínas sintetizadas en la membrana celular, mediante la medición de la evolución temporal de la intensidad máxima de fluorescencia recuperada de las proteínas en la membrana (Phair & Misteli, 2001).

Para la técnica de FRAP, se utilizan moléculas fluorescentes que se adsorben química o físicamente a la superficie de la membrana. Los análogos de lípidos marcados con fluorescencia se usan ampliamente para medir la dinámica lateral de los lípidos en las membranas (Prasad & Singh, 2020). Existe una gama de fluoróforos reciclables y que pueden embeberse durante la vesiculación. Existen otros tipos análogos de lípidos fluorescentes que pueden adsorberse en la membrana celular, sin embargo dependiendo de la insaturación de sus colas hidrofóbicas y la fuerza polar del grupo funcional tienen preferencia a desplazarse en una fase particular de la membrana celular como es el DiIc<sub>18</sub> (Prasad & Singh, 2020).

El fluoróforo que se usa en este trabajo de tesis se llama FM4-64 y tienen una amplia movilidad entre las dos fases de membrana (gel y líquida) (Iwabuchi et al., 2014). El nombre FM viene de Fei Mao, el investigador de Molecular Probes, quien desarrolló este colorante a base de styryl. Se trata de fluoróforos que se usan específicamente para los estudios de comunicación vesicular entre la membrana celular y compartimentos internos de la célula (S. Bolte, C. Talbot, Y. Boutte, O. Catrice, 2004) y (Walker, 2015). Los FM fácilmente transitan la fase gel de la membrana celular dependiendo de la concentración de los lípidos en la membrana. También se ha reportado que no afectan la iniciación de la acción vesicular en la membrana celular a una concentración menor a  $50\mu M$  en células animales; puede ser tóxico para la célula a una concentración mayor a  $50\mu M$ . Los FM pueden acoplarse a los injertos de membrana sin perturbar a las proteínas que contraen a las vesículas en la membrana celular en la capa superior de la bicapa lipídica (Walker, 2015) y (Lichius & Zeilinger, 2019).

La fluidez de los fluoróforos FM4-64 se determina midiendo el tiempo en que la fluorescencia se recupera dentro de una zona previamente fotoblanqueada. Esto es consecuencia de la difusión de los fluoróforos no dañados que entran en la zona de

fotoblanqueo (Kappel & Eils, 2004), conocida como región de interés (ROI por sus siglas en inglés). En las dos últimas décadas la metodología de FRAP se ha perfeccionado. Por ejemplo, Jönsson et al. (2008) propusieron un método para mejorar la precisión del análisis de recuperación de fluorescencia usando un promedio circular en las imágenes. La variable que caracteriza a la fluidez membranal es el coeficiente de difusión de lípidos en la membrana celular y se calcula utilizando el ajuste de la curva de FRAP. La gráfica de intensidad de fluorescencia normalizada versus el tiempo se ajusta usando un modelo empírico de FRAP. De dicho ajuste se extrae el tiempo de media recuperación de fluorescencia  $t_{\frac{1}{2}}$ , que es usado para el cálculo del coeficiente de difusión.

El presente trabajo, realizado durante estos dos años, tuvo como propósito realizar una interpretación alternativa en el análisis de FRAP. En las últimas 5 décadas, la técnica de FRAP ha destacado como una metodología interesante en el análisis del coeficiente de difusión. No hemos encontrado en la literatura una relación formal entre la curva de recuperación de fluorescencia y el desplazamiento cuadrático promedio de los fluoróforos. Esta relación es sencilla y precisa y ofrece una interpretación física elegante.

Por otro lado, los cuidados que se deben tomar en el análisis de resultados cuando las muestras presentan vesículas tampoco han sido reportados en la literatura. Es por tanto pertinente reportarlos en esta tesis.

Este trabajo de tesis se enfoca dos aspectos: se explica la relación teórica entre el modelo empírico de FRAP y el modelo teórico de desplazamiento cuadrático promedio (MSD por sus siglas en inglés), y por otro lado se llevan a cabo experimentos de FRAP en células HEK (línea celular de riñón de embrión humano) que son analizados e interpretados usando el modelo MSD.

Hipotetizamos que la proyección de la membrana celular curva sobre el plano de enfoque de un microscopio no afecta la medición del coeficiente de difusión en la membrana, y también que existe una equivalencia entre la curva ajustada a la recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueo y la expresión del

movimiento cuadrático medio de moléculas en difusión en la membrana celular. Esta equivalencia permite calcular de forma analítica el coeficiente de difusión a partir de los parámetros de ajuste experimentales.

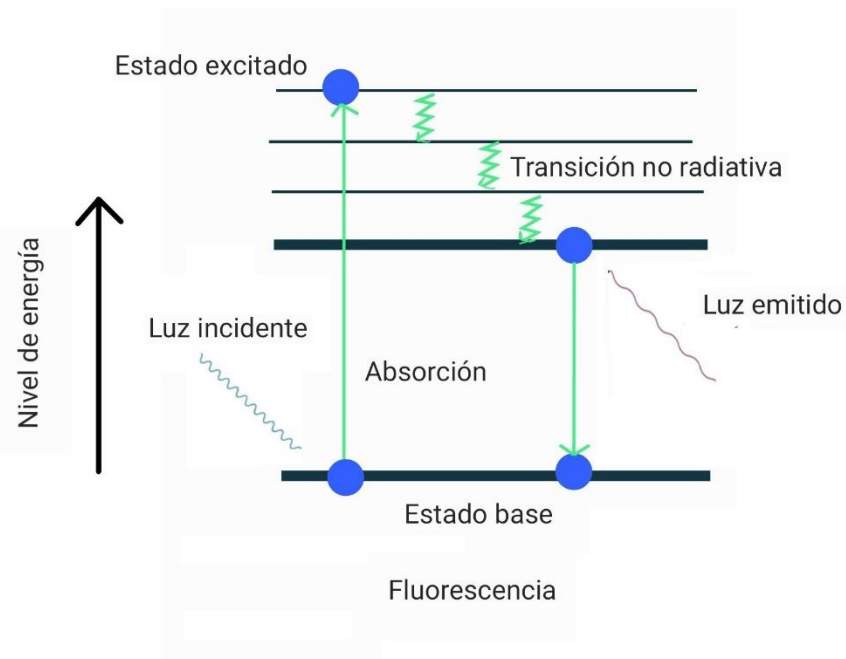
## 2. Marco teórico

### 2.1. Microscopía de fluorescencia:

La fluorescencia es un fenómeno físico, que pertenece a la categoría de la luminiscencia. Este fenómeno es resultado de la emisión de luz que depende de la naturaleza del estado excitado. En estados de singletes excitados, el electrón excitado que pasa del estado basal al estado excitado es apareado (por el spin opuesto) al segundo electrón del estado base del orbital.

Sin embargo, el electrón permanece en el estado excitado. El electrón tiende espontáneamente a relajarse al estado basal. A este proceso se le llama conversión interna y esto ocurre en un femtosegundo. El retorno del electrón al estado fundamental produce la emisión de un fotón, proceso este último que se denomina efecto cascada. El hecho de que la tasa de fluorescencia es de  $10^{-8}s^{-1}$  significa que el tiempo de vida de emisión es de 10 nano segundos (Chakraborty, 1956), aunque puede variar dependiendo de la resonancia molecular.

La manera de explicar ilustrativamente el fenómeno de fotoluminiscencia de una molécula fluorescente se muestra en la Figura 1. En este diagrama se ilustra el proceso que ocurre entre la absorción y la emisión de luz, desarrollado por el profesor Aleksander Jablonski en 1934.



*Figura 1* **Diagrama de Jablonski (Lakowicz, 2006), ilustra el proceso de excitación y desexcitación de los electrones, este proceso conlleva la adsorción de fotones con una longitud de onda menor y como resultado la emisión de fotones con una longitud de onda mayor. La representación de diagrama fue adaptado al español a partir de (Lakowicz, 2006).**

Cada electrón posee un nivel de energía vibracional que está cuantizado. El paso de un electrón del estado base a un estado excitado se representa por una flecha vertical hacia arriba, mientras que la transición opuesta, de un estado excitado al estado base, se representa con una flecha hacia abajo.

Se dice que la luz se absorbe cuando un electrón de un fluoróforo transita hacia algún nivel vibracional de energía superior. El electrón puede bajar a estados intermedios antes de transitar al estado base. En moléculas en fase condensada esta relajación a un estado intermedio ocurre en tiempos del orden de  $10^{-12}$  s. Estos procesos no producen radiación. La emisión radiativa tiene lugar cuando el electrón regresa al estado base. Afortunadamente, estos estados de transición no alteran la geometría de la molécula. El espectro de emisión es típicamente independiente de la longitud de onda de excitación (Chakraborty, 1956).

El tiempo de vida de fluorescencia y su rendimiento cuántico son dos propiedades muy importantes. El rendimiento cuántico es el cociente del número de fotones emitidos sobre el número de fotones absorbidos.

### 2.1.1. Marcador Fluorescente:

El fluoróforo usado en este trabajo es el FM4-64. Su nomenclatura es (N - (3 trietilamoniopropil) -4- (6-(4- (dibutilamino) fenil) hexatrienil dibromuro). Su espectro de absorción y emisión se observa en la Figura 2. Los picos de absorción y emisión ocurren respectivamente a las longitudes de onda de 512 y 710 nm.

El FM4-64 es un lípido análogo, cuya propiedad de fluorescencia es utilizada para sondeo de membrana. Es una molécula anfipática con cola hidrofóbica que es solubilizada en la zona apolar de la membrana. Esta molécula presenta un grupo funcional altamente polar en la zona hidrofílica, conformado por dos grupos cuaternarios,  $NH_4^+$  con interacción polar paralela a la superficie a los ácidos grasos aledaños a la molécula de FM 4-64.

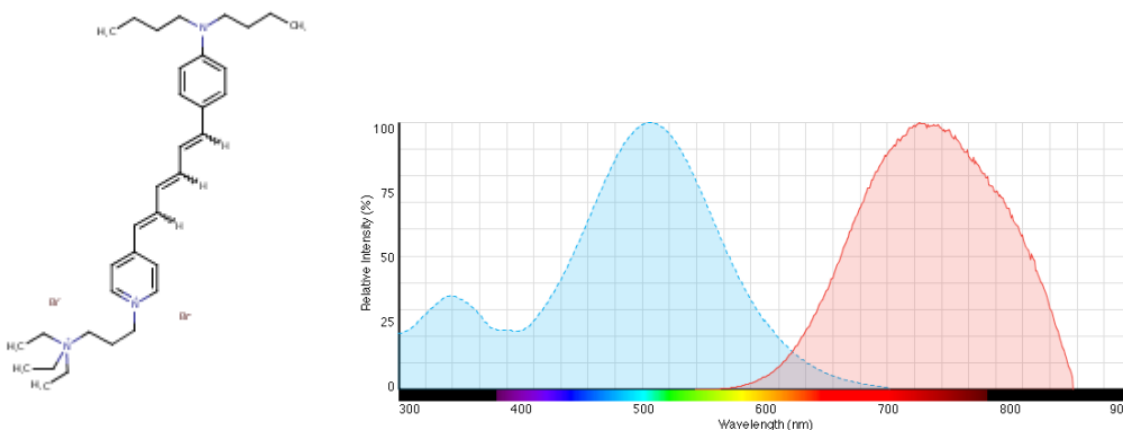


Figura 2 Espectro de absorción emisión de FM4-64 y estructura de polímero ramificado, citado en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/T13320>

¿Qué importancia tienen los fluoróforos en microscopía de fluorescencia para la observación de muestras biológicas?

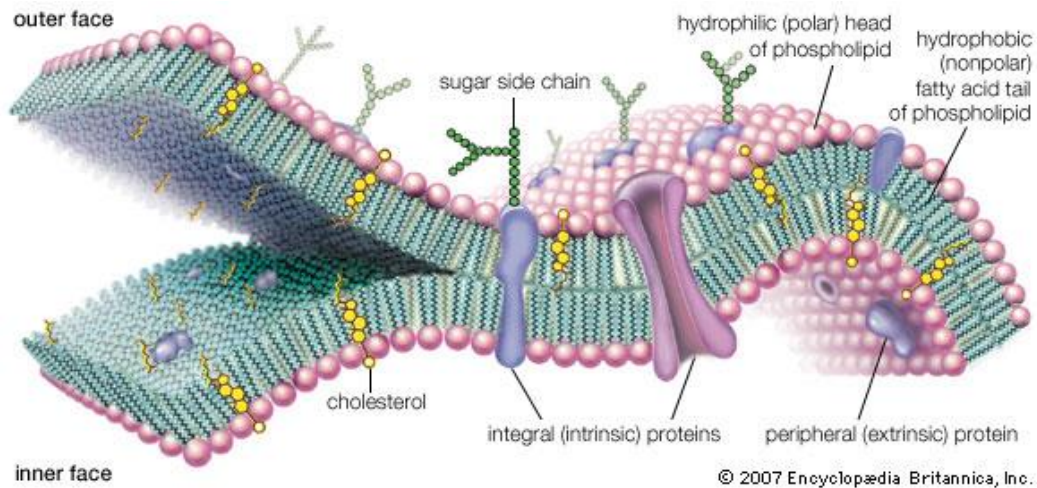
Dependiendo de la naturaleza química del fluoróforo, se puede ilustrar con imágenes la dinámica de membrana e inclusive en compartimentos internos de la célula, la difusión de algún nutriente, el estado vital e, incluso, visualizar la organización metabólica de algún componente dentro de un compartimento particular de la célula. También permite medir del coeficiente de difusión lateral en la membrana por correlación de espectroscopía de fluorescencia (CEF) y por recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueamiento (RFDF) o (FRAP) por sus siglas en inglés. Las particularidades específicas de esta técnica fisicoquímica serán descritas más adelante.

## **2.2. Relación de la Biología de la membrana celular con la fluidez de la membrana celular**

Cada célula constituyente de un organismo complejo está limitada por un compartimento externo que recibe el nombre de membrana celular. Las funciones principales de la membrana son limitar el contacto entre el medio externo y el medio interno, cumplir las exigencias de selectividad controlada de moléculas que la misma célula pueda metabolizar para sobrevivir (endocitosis), así como también expulsar productos residuales o desechos producidos durante el metabolismo celular (exocitosis).

Toda célula está organizada por compartimentos que tienen la función de empaquetar y permeabilizar selectivamente. Estos compartimentos, están delimitados también por membranas. La membrana celular cuya estructura básica es una bicapa lipídica, está constituida por sustancias químicas como lípidos, proteínas y carbohidratos formando una mezcla heterogénea (ver Figura 3).

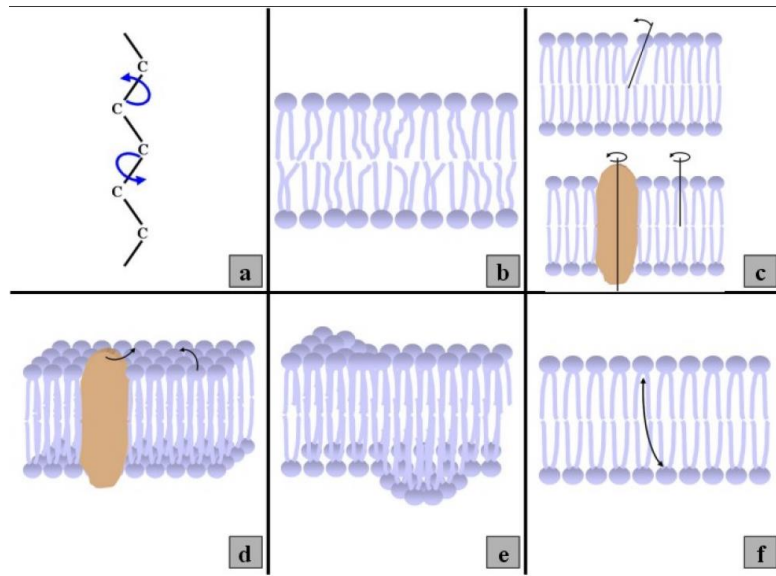




**Figura 3 Ilustración de la composición de membrana celular (adaptada de Blanca, 2012). Cuya composición principal que le permite tener su forma compactada es de la clase de lípidos o ácidos grasos de diferente estructura y composición. También está constituida por proteínas y carbohidratos complejos, que le permiten tener otras actividades específicas.**

La dinámica celular depende, entre otras cosas, de los movimientos de los lípidos que a su vez son función de los siguientes grados de libertad de movimiento (Meir Shinitzky, 1993)

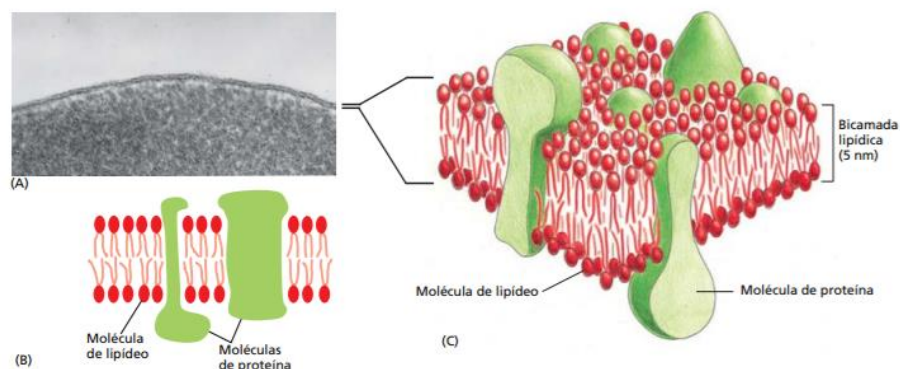
- 1.- Rotación de los enlaces de carbono (Fig. 2-a)
- 2.- Flexibilidad de la cadena hidrocarbonada (Fig. 2-b)
- 3.- Difusión rotacional (Fig. 2-c)
- 4.- Difusión lateral (Fig. 2-d)
- 5.- Fluctuaciones (Fig. 2-e)
- 6.- Difusión transmembrana (Fig. 2-f)



*Figura 4* **Representación de los grados de libertad en la región interna de la membrana (Meir Shinitzky., 1993)**

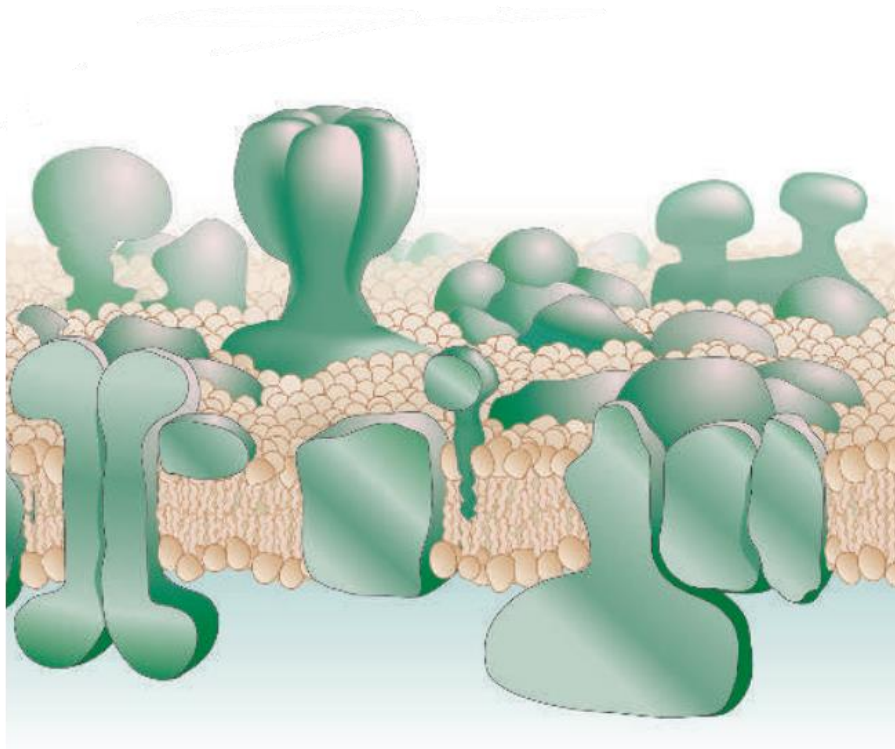
En las células eucariotas, las moléculas que componen la bicapa lipídica son esfingolípidos, ácidos grasos, triacilgliceroles, ésteres de ceras, fosfolípidos (fosfoglicéridos y esfingomielinas) e isoprenoides.

La membrana celular se encuentra dividida en dos dominios celulares denominados macro y micro dominios. Los macros dominios están conformados por proteínas anfipáticas, donde una determinada porción de volumen es apolar e interaccionan con la fase apolar de la membrana celular. Los extremos son hidrofílicos e interactúan con la zona externa e interna de la célula ver Figura 5.



*Figura 5* **Proteínas anfipáticas representadas de color verde, son moléculas que se encuentran embebidas en la membrana celular, formando injertos de membranas que cada una de ellas posee una actividad específica en la membrana celular. La bicapa lipídica está conformada por los ácidos grasos, que están identificadas de color rojo (Alberts et al., 2011)**

Por su parte, los microdominios están conformados por lípidos como el colesterol o los esfingolípidos (Kai S. & Elina I., 1997). El modelo teórico de la bicapa lipídica mosaico, esquematizado por (Singer & Nicolson, 1972), ha sido modificado. Una versión más actualizada se muestra en la Figura 6, donde se puede observar que las proteínas transmembranales se distribuyen de manera azarosa. Actualmente se sabe que estas las proteínas tienen una posición desordenada en el plano de la membrana celular y que cada proteína está incorporada y orientada específicamente por sus características fisicoquímica y bioquímicas. Las proteínas pueden encontrarse expuestas al medio hidrofílico, incorporadas al interior de la bicapa lipídica siendo embebidas por el medio hidrofóbico de la bicapa lipídica y/o dirigidas en dirección interior de la célula incorporadas en la capa inferior de la bicapa lipídica (Engelman, 2005).



*Figura 6* El modelo actualizado tomado de (Engelman, 2005) que representa a la bicapa lipídica actualmente, representa a la complejidad y no uniformidad en la composición de la membrana celular, a su vez la fluidez de la bicapa lipídica es limitada, esto es debido a que las proteínas en diferentes puntos de anclaje y distribuidas de manera azarosa, varía el movimiento browniano de los ácidos grasos.

Los lípidos pueden encontrarse en dos fases diferentes: fase gel (las cadenas hidrocarbonadas del lípido son rígidas y saturadas) y la fase cristal-líquido (la cadena de los lípidos es insaturada o fluida y móvil) (Merino et al., 2003). La fase en que se encuentren los lípidos depende de la temperatura y el cambio de fase se produce en la temperatura de transición ( $T_c$ ). Por debajo de  $T_c$ , los lípidos están en fase gel y la membrana es rígida. Por encima de  $T_c$ , prevalece la fase cristal-líquido y la membrana es fluida. La temperatura de transición es distinta en distintos tejidos y en distintas especies.

Experimentos de calorimetría han reportado que el aumento del número de carbonos en la cola hidrofóbica causa el aumento de la temperatura de transición y los movimientos dinámicos son más fluidos (Martínez-Balbuena et al., 2010).

### **2.3. FRAP**

La recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueado (FRAP, por sus siglas en inglés) se gráfica mediante la medición de la magnitud de fluorescencia y el tiempo de la recuperación de fluorescencia en una zona fotoblanqueado de la muestra. Para este tipo de técnica de microscopía de fluorescencia se puede usar cualquier tipo de marcador de membrana celular para realizar FRAP. Esta técnica es precisa y útil para estimar la fluidez de la membrana celular.

El análisis en FRAP consiste en medir la evolución temporal de la intensidad de fluorescencia después del fotoblanqueo y determinar el tiempo medio y el porcentaje de recuperación de fluorescencia. La Figura 7 ilustra el proceso. La gráfica representa la intensidad de fluorescencia dentro de la una región de interés (ROI) circular indicada en las imágenes de la parte superior. La fluorescencia antes del blanqueo tiene un valor  $F_i$ . Al tiempo  $t_0$ , el láser de excitación es escaneado dentro de la ROI a su máxima potencia, provocando la destrucción fotoquímica de los fluoróforos dentro de la ROI (Reits & Neefjes, 2001), una de las preocupaciones de láser a alta

potencia es la posibilidad de calentamiento localizado por el láser. Por esta razón, el evento de blanqueo en sí, que ocurre usando una fuente de luz de alta potencia, generalmente se restringe a 20 mseg o menos, minimizando así el calentamiento localizado (Axelrod, 1977) y (Carla de Los Santos et al., 2015) . A este proceso se le llama fotoblanqueo. Se puede elegir escanear varias veces para aumentar la eficiencia del blanqueo. Inmediatamente después se comienza a adquirir una serie temporal de imágenes de la célula completa, esta vez con una potencia del láser de excitación igual 3.28 mW de salida del objetivo que se usó en las imágenes previas al blanqueo. Los datos reportados en la gráfica (Figura 7) representan la intensidad de fluorescencia medida dentro de la ROI.  $F_0$  representa la intensidad mínima. La curva de la fase de recuperación de fluorescencia puede ajustarse con la siguiente función (Miura, 2005):

$$f(t) = A \left( 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right). \quad (1)$$

Más adelante se demuestra que esta forma funcional se obtiene al considerar que la intensidad de fluorescencia recuperada es proporcional al desplazamiento cuadrático promedio de los fluoróforos. El tiempo medio de recuperación de fluorescencia  $t_{1/2}$  se define como el valor de  $t$  para el cual  $f(t)=A/2$ :

$$t_{\frac{1}{2}} = \tau \ln(2) \quad (2)$$

Despejando  $\tau$ ,  $f(t)$  queda:

$$f(t) = A \left( 1 - e^{-\frac{\ln(2)}{t_{\frac{1}{2}}} t} \right). \quad (3)$$

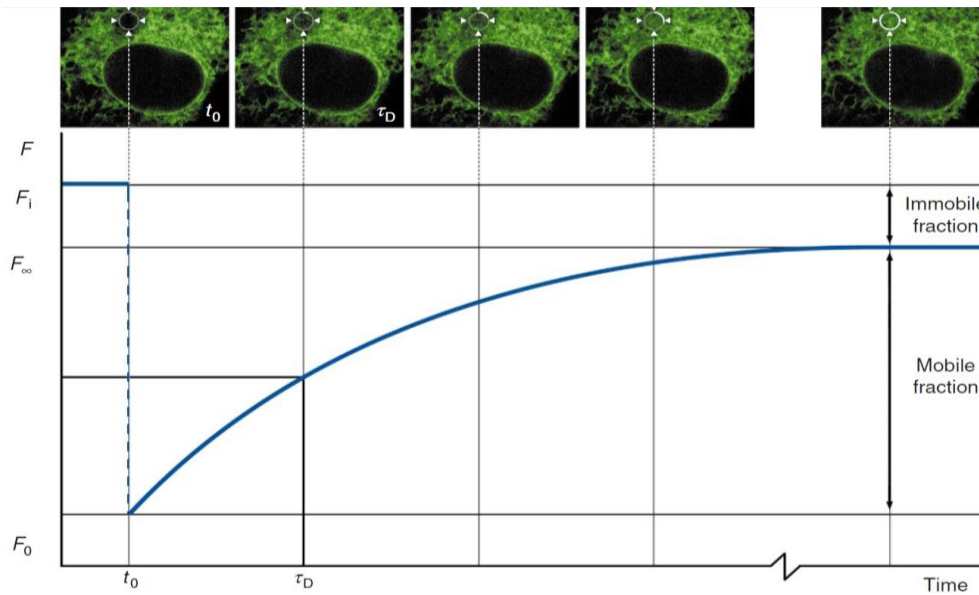
La constante  $A$  representa el valor de  $f$  para  $t$  tendiendo a infinito, es decir el valor de la intensidad de fluorescencia en la meseta  $F_{\infty}$ .

Las moléculas fluorescentes móviles contribuyen a la recuperación de la fluorescencia mientras que las que fueron blanqueadas y permanecen estáticas no contribuyen. Bajo esta lógica, se definen la fracción móvil  $\Phi_m$  y la fracción inmóvil  $\Phi_i$  de fluoróforos como (Avila et al., 2018):

$$\Phi_m = \frac{F_\infty - F_0}{F_i - F_0} \quad (4)$$

y

$$\Phi_i = \frac{F_i - F_\infty}{F_i - F_0} \quad (5)$$



**Figura 7** Representación gráfica del método FRAP. Intensidad de fluorescencia versus tiempo. La región circular en las imágenes es blanqueada al un tiempo  $t_0$ . En la figura,  $\tau_D$  representa  $t_{1/2}$  descrito en el texto y en la Eq. (2). (Reits & Neefjes, 2001)

Una vez obtenido el tiempo medio de recuperación de fluorescencia  $t_{1/2}$  y conociendo el radio  $r_0$  de la zona blanqueada, se puede calcular el coeficiente de difusión  $D$ . La expresión para  $D$  es la utilizada por (Pincet et al., 2016) en la sección de medición del coeficiente de difusión utilizan la simplificación de la ecuación de  $D$  en el artículo de

(Kappel & Eils, 2004) debido a que ambas aproximaciones de  $\tau$  y  $t_{\frac{1}{2}}$  serían inexactos utilizando la ecuación  $D = \frac{r_0^2}{(4\tau)}$  y por eso  $(4\tau)$  está entre parentesis, por lo tanto se sugiere utilizar valores medibles de  $t_{\frac{1}{2}}$  a través de la curva de ajuste, así como también mencionan en el apartado de principio del método en (Klein et al., 2003) y en el apartado de la simplificación compleja de D utilizando a  $t_{\frac{1}{2}}$  (Axelrod et al., 1976), se prefiere utilizar la Ec. (6) en el caso del movimiento natural molecular en una superficie 2D para región preblanqueada circular

$$D = 0.88 \frac{r_0^2}{4t_{\frac{1}{2}}} \quad (6)$$

En la buena práctica de FRAP es importante realizar la normalización para evitar datos de fluorescencia arbitrarios en la gráfica de FRAP. La normalización es un proceso del control de fluorescencia, donde en este metodo consiste en el cambio de escala de la curva de datos que se recolectan en cada imagen de la célula, La normalización es el cambio de escala de la curva de datos que se recolectan en cada imagen de la célula de tal manera que la intensidad normalizada previa al blanqueamiento sea igual a 1 y la intensidad medida inmediatamente después del blanqueo sea igual a 0. El análisis de la recuperación de fluorescencia se basó en la doble normalización de las mediciones de intensidad propuesta por (Avila et al., 2018) e inspirada de (Phair & Misteli, 2000).

Esta técnica involucra la normalización de la señal de recuperación respecto a la señal previa al blanqueo y al mismo tiempo toma en cuenta la eventual pérdida de señal debida al debilitamiento de la fluorescencia en la adquisición de imágenes después del blanqueo. También se corrige la intensidad de fondo. Definamos la intensidad promedio corregida por la intensidad de fondo (BG) dentro de la ROI y en la célula completa (CELL) (Avila et al., 2018) como:

$$I'_{ROI}(t) = I_{ROI}(t) - I_{BG}(t) \quad (7)$$

$$I'_{CELL}(t) = I_{CELL}(t) - I_{BG}(t) \quad (8)$$

La ROI es fotoblanqueada al tiempo  $t_p$ . La intensidad normalizada se define como

$$I_{FRAP}(t) = \frac{I'_{ROI}(t) - I'_{ROI}(t_p)}{\langle I'_{ROI} \rangle_{t < t_p} - I'_{ROI}(t_p)} * \frac{\langle I'_{CELL} \rangle_{t < t_p}}{I'_{CELL}(t)} \quad (9)$$

donde el símbolo  $\langle I'_{ROI} \rangle_{t < t_p}$  representa un promedio para tiempos anteriores al blanqueo, de forma que  $\langle I'_{ROI} \rangle_{t < t_p}$  es la intensidad promedio antes del fotoblanqueo en la ROI y  $\langle I'_{CELL} \rangle_{t < t_p}$  es la intensidad promedio antes del fotoblanqueo en toda la célula.

### 2.3.1. Técnica de FRAP paso a paso

Los experimentos de FRAP en membrana celular consisten en los siguientes pasos:

1. Preparar la muestra con marcador fluorescente de membrana.
2. Seleccionar una región de interés ROI en la muestra.
3. Medir la intensidad de fluorescencia en la ROI durante 5 a 10 pasos de tiempo
4. Fotoblanqueo: Iluminar la ROI varias veces con el láser de excitación a su máxima potencia. Es recomendable que el escaneo del láser en la ROI ejecute una secuencia de 3 o 4 veces.
5. Medir la fluorescencia en la ROI durante varios minutos, a la máxima cadencia temporal que permite el microscopio. (La ecuación de normalización es el control de la intensidad de fluorescencia del promedio en cada margen de muestra de fluorescencia en la membrana de la célula).
6. Graficar intensidad de fluorescencia contra el tiempo
7. Ajustar curva y determinar parámetros de recuperación



## 2.4. Difusión

La transferencia de masa interviene en muchas de las experiencias de la vida diaria. Un terrón de azúcar que se agrega a una taza de café llega finalmente a disolverse y entonces se difunde de forma uniforme en todo el café. La experiencia muestra que el lapso que se requiere para distribuir el azúcar dependerá de la temperatura del líquido.

De acuerdo con la segunda ley de la termodinámica, los sistemas que no se encuentran en equilibrio, con el tiempo tenderán a desplazarse hacia el equilibrio (Welty et al., 1991). En términos de la termodinámica química, la fuerza impulsora general de la difusión es (R. Byron Bird, Warren E. Stewart, 1972):

$$F_m = -\frac{d\mu_c}{dz} \quad (10)$$

donde  $\mu_c$  es el potencial químico del componente en fase dispersada y  $z$  es la coordenada de flujo en dirección de  $z$  que es direccionado por efecto de gravedad, adsorción y absorción. La velocidad de difusión molar del componente en la fase dispersa se define en términos del potencial químico.

La velocidad o la cantidad de movimiento de masa transferida de un fluido en un sistema de componentes tiene una tendencia natural a alcanzar las condiciones del equilibrio en la cuales tanto el potencial químico como la concentración de la fase dispersada se tornan homogéneos en el volumen de la muestra. Cuando esto ocurre, el flujo difusivo de masa se disipa y el sistema llega al equilibrio termodinámico. Este comportamiento de movimiento depende de la temperatura, de la presión y de la diferencia de densidades en un sistema multicomponente (Welty et al., 1991).

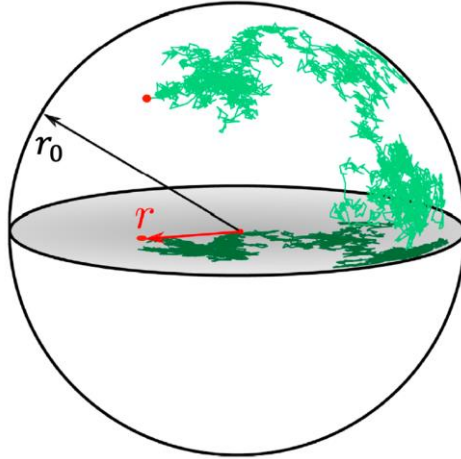
### **2.4.1. Difusión tangencial**

La difusión tangencial se refiere al proceso de difusión cuando este tiene lugar sobre una superficie. Este fenómeno se presenta en sustancias coloidales organizadas como lo son, en particular, sistemas de membranas. La difusión pasiva se refiere a los movimientos brownianos o azarosos, y es causada por las fluctuaciones térmicas de las moléculas que componen la membrana a través de las interacciones de fuerzas intermoleculares. Las propiedades fisicoquímicas de la membrana celular correspondientes a la difusión tangencial son la temperatura y la viscoelasticidad.

El coeficiente de difusión de membrana mide la rapidez del crecimiento del área que cubren las moléculas durante su movimiento, que puede ser calculada por la ecuación (6) o por el modelo teórico físico de MSD, el cual será descrito a continuación

## **2.5. MSD (Desplazamiento cuadrático medio)**

El desplazamiento cuadrático medio (MSD por sus siglas en inglés) se define como el área efectiva cubierta por una partícula Browniana al tiempo  $t$ , durante su movimiento. El cálculo teórico del MSD parte de la caracterización geométrica de la superficie del confinamiento de las partículas (moléculas de fluoróforo) en la membrana celular y la ecuación de difusión correspondiente. El MSD se explica a partir del desplazamiento de una molécula fluorescente confinada en la membrana celular. La Figura 8 muestra esquemáticamente el proceso de difusión sobre una superficie con curvatura diferente de cero (Ledesma-Durán et al., 2021), y su proyección sobre el plano focal del microscopio.



**Figura 8** Representación de un modelo de esfera que simula a un liposoma, donde  $r_0$  es el radio de la esfera,  $r$  es la posición del fluoróforo en función del tiempo. El trazo de color verde muestra la trayectoria de una molécula como función del tiempo y el punto rojo da referencia al fluoróforo. Tomado de (Ledesma-Durán et al., 2021)

Para poder entender el modelo de MSD tenemos que partir desde la termodinámica irreversible. Supongamos que la sección de ROI de la superficie de la membrana celular puede aproximarse a una esfera cuya curvatura tiene radio  $R$  (Figura 8).

Ledesma-Durán et al. demostraron que la difusión de los fluoróforos sobre la membrana celular curvada puede describirse a través de la probabilidad de hallar una molécula fluorescente en el plano de medición de la fluorescencia en la posición  $r$ , sobre el plano, al tiempo  $t$ :  $P(r, t)$

La evolución espacial y temporal de la densidad de probabilidad ( $P(r, t)$ ) satisface una ecuación tipo difusión (Ledesma-Durán et al., 2021)

$$\frac{\partial P}{\partial t} = D \frac{\partial^2 P}{\partial r^2} - \frac{D_m}{k_B T} \frac{\partial P}{\partial r} (PF) \quad (11)$$

donde  $F$  es una fuerza de superficie que restringe a las partículas en movimiento y  $D$  es la difusión de la molécula de FM sobre la Membrana. El promedio del desplazamiento cuadrático  $\langle r^2 \rangle$  en el disco restringido del sistema está dado por la siguiente ecuación

$$\langle r^2 \rangle = \int r^2 P dA \quad (12)$$

Donde  $dA$  es un elemento de área sobre el plano de observación,  $r$  es el radio de proyección al plano y  $P$  es la posición en la superficie. Tomando la derivada en el tiempo de la Ec. (12), usando coordenadas polares, suponiendo que  $P$  solo depende de  $r$  y que el flujo en la frontera es nulo, es decir que  $\left(\frac{\partial P}{\partial t}\right)_R = 0$ , Ledesma-Durán et al., 2021 demuestran que:

$$\frac{d}{dt} \langle r^2 \rangle = 4D - 2 \frac{D_m}{K_b T} K_0 \langle r^2 \rangle. \quad (13)$$

En la obtención de esta ecuación se usó la definición de la fuerza entrópica efectiva (Ledesma-Durán et al., 2021)

$$F = -K_0 r \quad (14)$$

donde  $K_0$  es el coeficiente de restauración efectivo. Ledesma-Durán et. Al. 2021 dan como solución a la Ec. (13) :

$$\langle r^2 \rangle = \frac{2}{3} r^2 \left( 1 - e^{-\frac{4Dt}{r^2}} \right) \quad (15)$$

donde se usó la expresión  $K_0(r) = \frac{2k_B T}{r^2}$ , válida para 2 dimensiones y si se desprecian las interacciones. La ecuación (15) se explica de la manera siguiente:

Las moléculas de colorante de FM recorren una superficie de área  $\langle r^2 \rangle$  como función del tiempo, es decir  $\langle r^2 \rangle$  es también la probabilidad de encontrar una molécula de FM en una posición de radio en función del tiempo. Para tiempos infinitos, la proyección del área cubierta máxima adquiere el valor  $\frac{2}{3} R^2$ . La Ec. (15) describe satisfactoriamente la difusión tangencial en la zona de blanqueado de los

FM, y será usada para determinar las características de recuperación de la fluorescencia. La relación entre el MSD y la intensidad de fluorescencia  $F(t)$  se obtiene por medio de la relación

$$F(t) = \frac{2}{3} r_0^2 S \left( 1 - e^{-\frac{4Dt}{r^2}} \right) \quad (16)$$

donde  $S$  es el factor de proporcionalidad entre la cantidad de fluoróforos que han entrado a la ROI y la fluorescencia. Por lo tanto, por medio de ajuste de parámetros con los datos recolectados de intensidad de fotoluminiscencia obtenidos por el sensor cromático de la cámara del microscopio confocal, se obtiene el coeficiente de difusión de membrana  $D$  y el tiempo característico de difusión  $\tau$ .

La comparación entre las ecuaciones del modelo empírico de FRAP y el modelo teórico de MSD permiten identificar el tiempo característico de difusión como

$$\tau = \frac{r^2}{4D_m} . \quad (17)$$

Despejando a  $\tau$  de la Ec. (2) y sustituyendo en la Ec. (17) obtenemos una expresión en término del tiempo medio de recuperación  $t_{\frac{1}{2}}$

$$\frac{t_{\frac{1}{2}}}{\ln(2)} = \frac{r^2}{4D} \quad (18)$$

y a la fracción móvil de fluorescencia queda como

$$A = \frac{2}{3} r_0^2 S \quad (19)$$

Es interesante notar que las Ecs. (17) y (19) relacionan el tiempo característico de difusión y la fluorescencia con el radio de la ROI.

El modelo presentado en esta sección permite comprender las mediciones de FRAP en términos de un mecanismo físico bien establecido y por lo tanto explicar la cinética de la fluorescencia en términos de la dinámica de los fluoróforos. Es por tanto la demostración de la relación empírica antes mencionada.

## **3. Metodología experimental**

Para poder dar una interpretación particular en el método de FRAP en células eucariotas, se realizó el cultivo de células de riñón de embriones humanos (HEK por sus siglas en inglés) y su tinción con FM4-64. También se recibió el asesoramiento sobre el uso correcto de microscopía confocal, análisis de imagen, de datos, ajuste de parámetros de la curva de FRAP e interpretación de los resultados. Nota importante: esta técnica puede utilizarse para otro tipo de células.

Las observaciones se realizaron con el microscopio confocal Zeiss LSM880 del Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales del CFATA. Para ello se realizó la metodología pertinente a FRAP en células HEK, como se describe en los siguientes subcapítulos.

### **3.1. Cultivo celular HEK**

El protocolo del cultivo celular que se siguió es el mismo que el utilizado para cultivar células MCF7 (adenocarcinoma humano de mama) en el laboratorio de nanobio-óptica del CFATA. A continuación, se menciona la metodología.

#### **3.1.1. Materiales y reactivos para el cultivo celular**

1. Tubo ependorf
2. Tubos falcon con faldón
3. Microscopio invertido
4. Caja Petri (cultivo)

5. Pipeta
6. Micropipeta
7. Campana con barrera de flujo laminar
8. Suero fetal bovino (FBS)
9. Solución salina buffer fosfatado (PBS)
10. Pensilina/estreptomicina 1 molar
11. Línea celular HEK
12. Trpsina EDTA
13. Centrifugadora
14. El medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)
15. incubadora con CO<sub>2</sub>

### **3.1.2. Pase de cultivo**

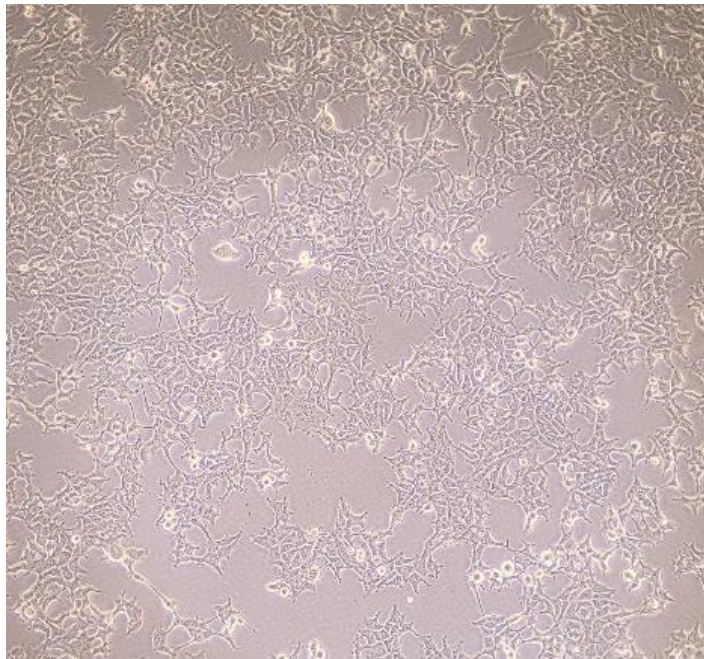
Las células HEK ya habían sido previamente cultivadas y preservadas por criogenización en el Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Querétaro. Se procedió a realizar 1 pase de células HEK, los pasos a seguir son los siguientes:

El procedimiento de preparación del pase de cultivo se llevó a cabo en la campana con barrera de flujo laminar en medio aéreo y sólido estéril, se recolecta 1 ml de Células HEK postcriogenizado y se cultivan en cajas de petri de plástico estériles. En poscriogenización se añadió 10 ml de DMEM complementado con 1 ml de FBS. Se incubó a 37° C al 5 % de CO<sub>2</sub> por 30 horas, al finalizar el periodo de incubación, se observó en el microscopio invertido que hubo proliferación celular. Se lavó la caja con 7 ml de PBS, después se extrajo todas las trazas del suero con una pipeta de pasteur estéril con ayuda de una bomba peristáltica, el cual contendría inhibidor de tripsina. Para despegar las células de la matriz extracelular se agregó 2.0 ml de Tripsina EDTA en la caja, incubamos a 37° C al 5 % de CO<sub>2</sub> por 10 min y observamos en el microscopio invertido para observar las células suspendidas en el medio de cultivo; las observamos con un factor de magnificación 10x (Figura 10). Se prosiguió a observar las células despegadas de la base de la caja.



Después se aspiró suavemente la suspensión celular con ayuda de una pipeta estéril, se depositó la suspensión en un tubo falcon estéril y se centrifugó a 1250 rpm por 5 a 10 minutos. Al finalizar el ciclo de centrifugación retiramos la fase acuosa que conlleva tripsina separándolo del botón celular. Se añadió al tubo de falcon con nuevo medio de cultivo resuspendiendo las células. Se prepararon alícuotas de la suspensión celular, diluyéndola en volúmenes finales de 10 ml, se sembraron en 2 cajas de cultivo de fluorodish y se incubó a  $37^{\circ}C$  por 14 horas.

Al realizarse los pases de cultivos en cajas de fluorodish, las células fueron observadas en un microscopio invertido con un objetivo 5x para verificar si las células se encontraban en buen estado y adheridas a la base de la caja de fluorodish. La Figura 9 muestra un ejemplo de este control.



*Figura 9* **Foto de células HEK en monocapa proliferadas después de 10 horas de incubación, observadas en el microscopio invertido con un objetivo de 5x**

Como se observa en la Figura 9, se destaca un cultivo de células vivas multiplicadas y adheridas a la base en condiciones apropiadas para teñirlas con FM4-64. Para

cultivar las células HEK en cajas de fluorodish fueron tratados previamente con  $2 \frac{\mu g}{\mu l}$  de colágeno tipo 1.



*Figura 10* Células HEK despegadas del sustrato, observadas por microscopía de campo claro con una magnificación 10x.

### **3.1.3. Materiales y reactivos para preparación de FM4-64**

1. FM 4-64
2. Solución salina balanceada Hank's (SSBH)
3. El medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)
4. Suero fetal inactivado bovino (FBS)
5. Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etano sulfónico (HEPES)-
6. Trypsina-EDTA 1 mol
7. Penicilina/estreptomicina 1%
8. El colágeno tipo I
9. Solución salina tampón fosfatado (SBF)
10. Caja de fluorodish 35 mm<sup>2</sup>

### **3.1.3.1. Metodología para preparación de muestra con FM4-64**

Al cabo de 36 horas de crecimiento de células, se prepararon las células con el procedimiento de tinción usando el marcador de FM4-64.

A partir de un pase de cultivo, preparamos los platos de fondo de vidrio (fluorodish) con células de la línea HEK incubadas en medio de cultivo. Al vial de FM 4-64 liofilizado se agrega 100  $\mu\text{L}$  de DMSO. Se mezcla 5  $\mu\text{L}$  de la solución de FM4-64 obtenida en el paso anterior con 995  $\mu\text{L}$  de PBS. A esta solución le llamamos FM 4-64(1). De la caja que contiene las células se extrajo el medio de cultivo sin retirar las células con una pipeta estéril. Después se agregó 0.5 mL de la solución FM4-64(1) en el plato e incubamos por 15 minutos. Después quitamos la solución de marcaje celular de las células con una pipeta estéril, agregamos 2 mL del medio de cultivo suplementado con 22  $\mu\text{L}$  de HEPES 1 M. Se lleva la muestra al microscopio cubriendo de la luz para evitar blanqueamiento.

## **3.2. Técnica de FRAP en microscopía confocal**

Una vez realizada la tinción fluorescente de la membrana celular de las células HEK, se lleva la muestra a un microscopio confocal evitando la iluminación la muestra para minimizar el riesgo de fotodaño en las moléculas de FM4-64. Se usó el microscopio confocal Zeiss LSM880, con el Objetivo Plan Apo 63x de apertura numérica 1.4 e inmersión en aceite.

El procedimiento de observación fue el siguiente:

Se preparó la microcámara donde se soporta y se mantiene el fluorodish a una temperatura de 37 °C. Se utilizó el láser de excitación de Argón que tiene una longitud de onda  $\lambda = 514.03 \text{ nm}$  así como se muestra en la *Tabla 1*. La potencia de

excitación para formación de imágenes fue menor o igual al 7% de la potencia máxima del láser, la potencia del láser de Argón es de 3.28 mW. La emisión de fluorescencia de los FM4-64 se detecta en 675 nm de longitud de onda. El diámetro del pinhole era de 100 micras. Se selecciona alguna célula HEK en particular. Es importante no incrementar el porcentaje de potencia del láser ya que puede ocurrir posible fotodaño en los FM 4-64 durante un determinado tiempo antes de realizar FRAP. La siguiente *Tabla 1* muestra los parámetros de potencia de salida con su respectivo laser, cada módulo del láser está instalado al microscopio a parte, el láser

Láser con longitud de onda (nm)	Medición en la salida del objetivo (10X) [mW]
405 (diodo)	4.64
458 (diodo)	1.17
488 (argón)	5.52
514 (argón)	3.28
543 (Helio Neón)	0.46
633 (Helio Neón)	1.26

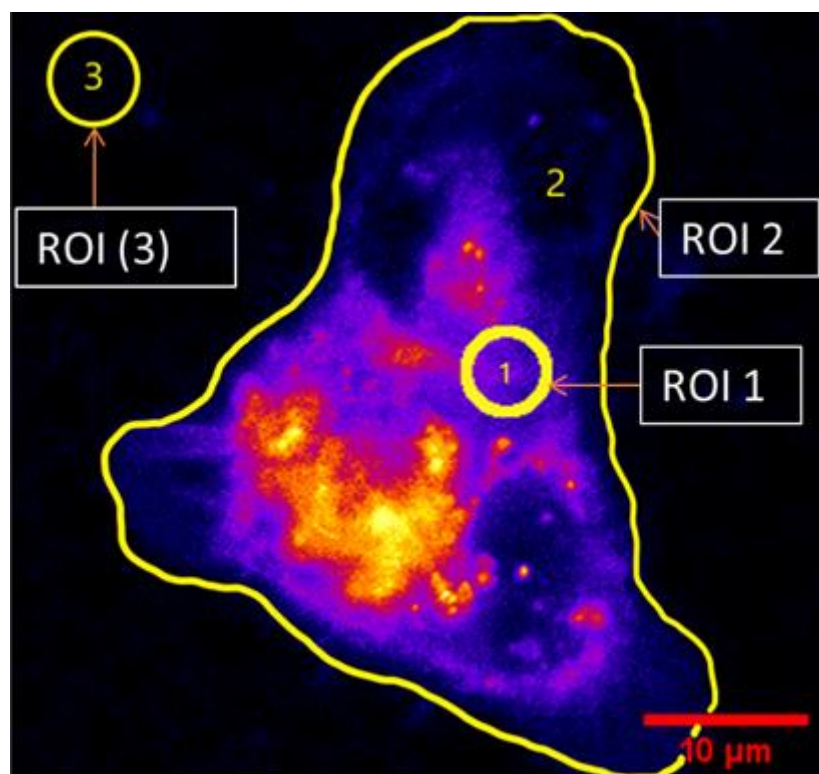
*Tabla 1* Cuadro técnico del microscopio confocal Zeiss LSM880, cada longitud de onda corresponde a un módulo del láser distinto, cada láser le corresponde su potencia de salida

Seleccionamos un nivel de altura en el plano Z de la muestra celular. Se selecciona una región donde se observe la membrana celular teñida con los fluoróforos. Se definió una ROI circular de diámetro entre 2 y 5 micrómetros aproximadamente. Establecemos el número de mediciones previas al blanqueado (entre 2 y 9). El blanqueado consiste en iluminar la ROI1 a la potencia máxima del láser. Después del blanqueo se adquirieron imágenes de la célula durante tiempos que variaron entre 40 y 200 s. Los datos se almacenan en el formato czi.

Las imágenes de muestras celulares HEK obtenidas en el presente trabajo de tesis se exhiben en el Apéndice A.

### 3.3. Análisis de imagen mediante FRAP

Una vez terminadas las pruebas de FRAP en el microscopio, se buscó detectar efectos adversos que se pudieran presentar en un organismo vivo a través del vídeo. Únicamente en la membrana celular, el efecto adverso que se puede observar son las vesículas producidas por los mecanismos propios de la membrana celular. Para el análisis de imagen de los resultados de la prueba de FRAP, las vesículas de endocitosis móviles que se observen en la ROI del plano focal interno de la célula, cambiar de región con la ROI. También se recomienda no sobrepasar dos horas de observación. Después de dos horas de observación las células inician un proceso de apoptosis. Esto sucede en experimentos como los nuestros en que no hay control de CO<sub>2</sub>, y evitar cambios de pH únicamente añadiendo HEPES.



*Figura 11* Representación de las 3 ROI, La ROI1 es donde se lleva a cabo el blanqueo y donde se mide la recuperación de fluorescencia. La ROI2 es el contorno de la célula y la ROI3 es una región del fondo, fuera de la célula.

### 3.3.1. Normalización de fluorescencia en la técnica de FRAP

Esta fase de la metodología se basa en utilizar un código de programación en imageJ. Una parte del código del programa desarrollado tiene como objetivo obtener una medición de fluorescencia normalizada, de forma que se eliminen fluctuaciones que no provengan de la recuperación de fluorescencia que se quiere caracterizar.

Los datos de fluorescencia se recolectan en tres regiones de la muestra celular (Figura 11): la ROI 1 (región de interés donde ocurre FRAP), la ROI 2 (contorno celular) y ROI 3 (fondo oscuro del medio). La ROI 3 es necesaria para restar la intensidad de fondo (ecuaciones (7) y (8)). En la ecuación (9), la primera división de normalización es la que se utiliza para graficar valores de fluorescencia entre 0 y 1. El factor  $\frac{\langle I_{CELL} \rangle_{t < t_p}}{I_{CELL}(t)}$  de la ecuación (9) representa la segunda normalización. Su función es compensar una eventual disminución de fluorescencia que pudiera ser ocasionada por blanqueamiento gradual de los fluoróforos, conforme se suceden las exposiciones al láser de excitación para adquirir las imágenes.

Se elaboró un código de programación en mathematica wolfram por el Dr. Iván Santamaría Holek para los parámetros de ajuste de la ecuación (15) y para el ajuste paramétrico de la ecuación (3) se desarrolló un código de programación en Jython en la plataforma de fiji, desarrollado en un ordenador MAC por el Dr. Remy Fernand Ávila Foucat, y actualizado en un ordenador de Windows por el Ingeniero Rafael Navarro Uro.

El código de programación de análisis de datos ajusta por mínimos cuadrados una función del tipo de la Ec. (1) y entrega los parámetros ajustados (tiempo medio de recuperación de fluorescencia y fracción móvil de fluoróforos) en forma de un archivo de texto. Adicionalmente grafica los datos de fluorescencia normalizada y la curva ajustada.

Una vez que se han determinado los parámetros de la curva de ajuste de FRAP con respecto a la ecuación (1), se realiza el cálculo del valor del coeficiente de difusión relativo a la ROI1.

## 4. Resultados

### 4.1. Relación paramétrica de FRAP y MSD

El principal resultado de este trabajo lo constituye el siguiente resultado teórico. En la sección 2.5, se demostró que el desplazamiento cuadrático promedio de las moléculas de marcadores fluorescentes que se difunden sobre la superficie curva de la membrana dentro de la ROI circular de radio  $r_0$ , está dada por la **Ec. (15)**. La intensidad de fluorescencia proporcionada por estas moléculas tiene la expresión dada por la **Ec. (16)**. El resultado importante es que esta expresión tiene una forma funcional idéntica a la de la función de FRAP, es decir la **Ec. (1)**. Las relaciones entre los parámetros de ambas ecuaciones indican que la fracción de fluoróforos móviles  $A$  está dada por la **Ec. (19)** que aquí recordamos:

$$A = \frac{2}{3} r_0^2 S \quad (20)$$

y el tiempo característico de recuperación de fluorescencia está dado por la **Ec. (15)**, también recordada aquí:

$$\tau = \frac{r_0^2}{4D_m}. \quad (21)$$

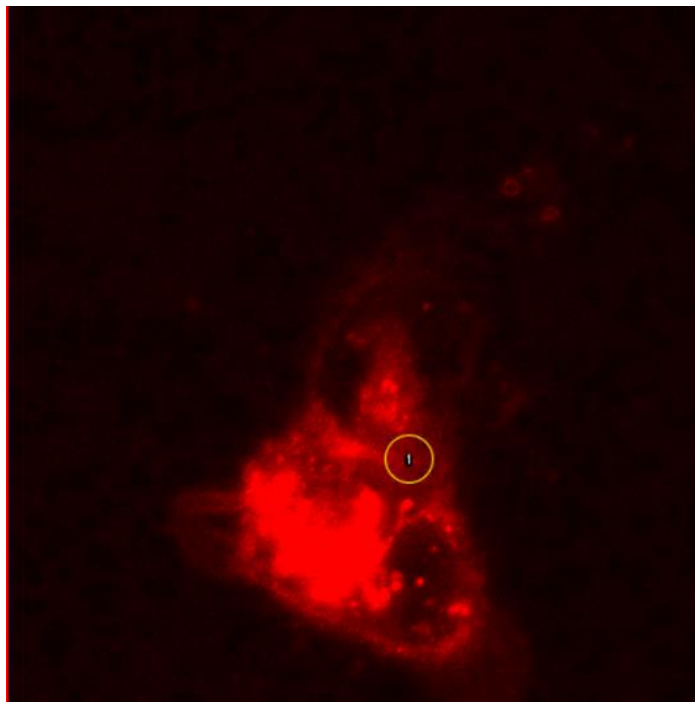
Midiendo  $\tau$  y conociendo  $r_0$  se puede determinar el coeficiente de difusión  $D_m$ .



Otro resultado es que la proyección del MSD de moléculas en la membrana sobre el plano de observación (ver Figura 8) no afecta la estimación del coeficiente de difusión  $D$ .

## 4.2. Técnica de FRAP en microscopia confocal

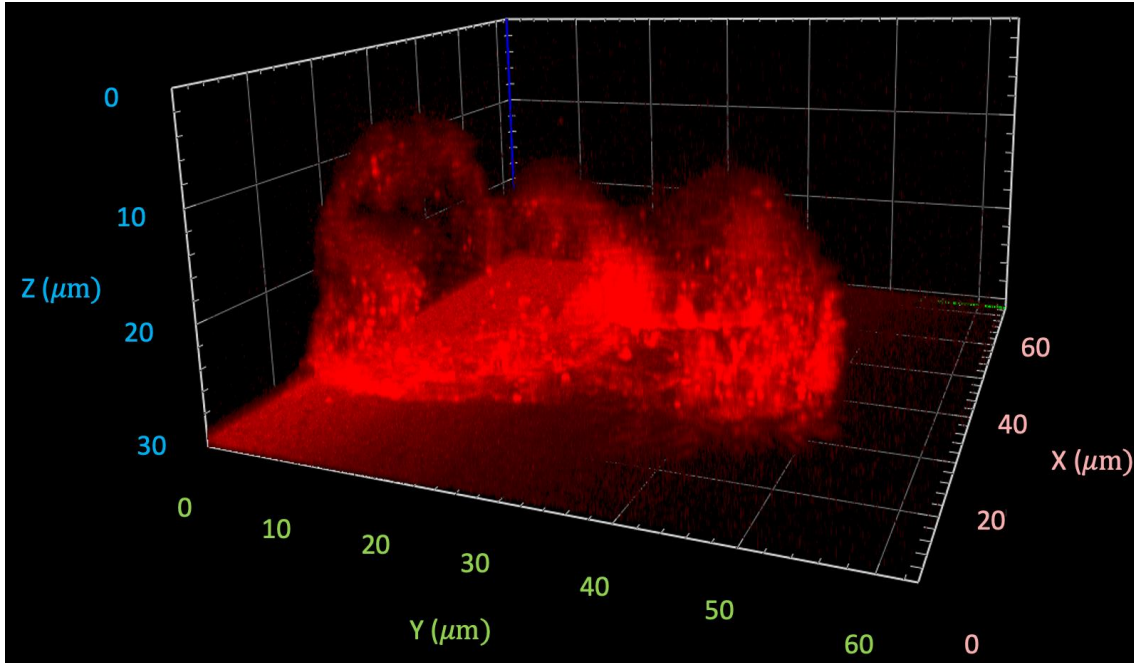
La Figura 12 muestra una foto del plano focal de una célula que ilustra la fluorescencia de una célula HEK. La imagen se obtuvo con uno de los fotomultiplicadores del sistema confocal del microscopio.



*Figura 12* Imagen de una célula HEK en el microscopio confocal tomada en el microscopio confocal Zeiss LSM880 del Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales del CFATA. La diferencia de intensidad de fluorescencia que se observa en distintas zonas de la membrana celular se debe a la concentración no uniforme de FM4-64 diluidos en la membrana celular, la ROI que definimos es de  $2.5\mu\text{m}$  de radio.

Las células HEK que se observaron y fueron analizadas con la técnica de FRAP, recibieron distintos radios en la ROI1. Estas imágenes de las pruebas de FRAP en

células HEK se encuentran en el **Apéndice A**. Realizamos la prueba de FRAP en alguna zona de la membrana celular a distintas alturas de la célula. La Figura 13 muestra una imagen tridimensional de una muestra analizada.



*Figura 13* Imagen de célula HEK en 3D, construida a partir de 30 imágenes obtenidas a distintos planos de enfoque.

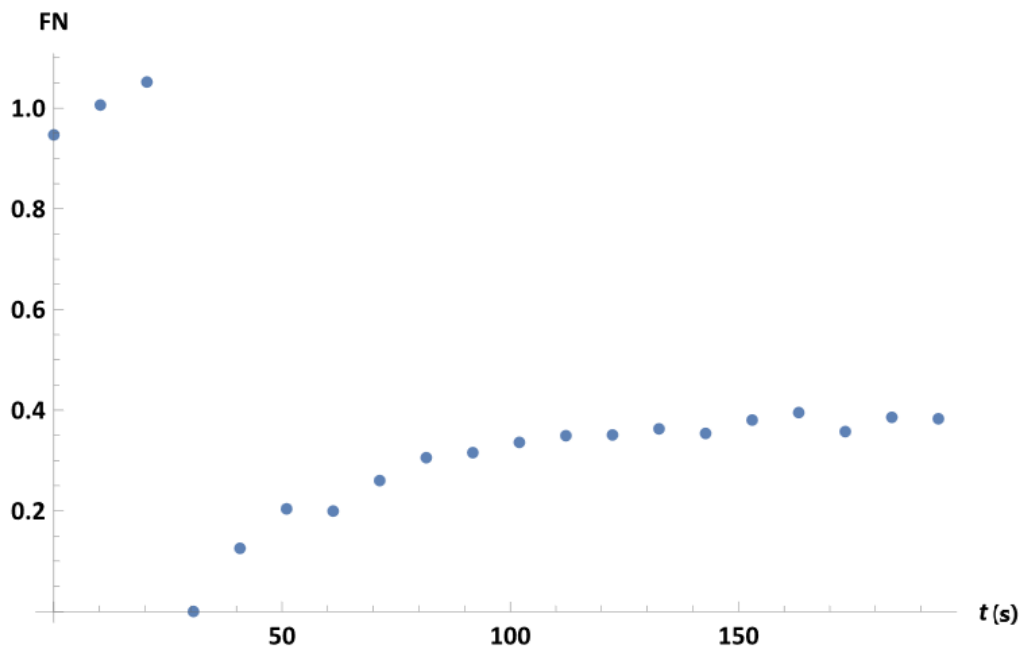
### 4.3. Análisis de imagen mediante FRAP

Algunas imágenes de células HEK presentaron fluctuaciones provocadas por eventos inapropiados como fue la entrada y salida de vesículas en la ROI1, dando como resultado fluctuaciones de intensidad durante la recuperación de la fluorescencia. En otras imágenes se obtuvo una recuperación suave de fluorescencia sin presentarse ningún evento inoportuno.

En algunas células se observó alta actividad en el transporte de vesículas. Esto ocurrió cuando sobrepasamos más de 2 horas de la observación.

## 4.4. Análisis de datos

Presentamos en la Figura 14 una curva representativa de FRAP que ilustra los datos normalizados de fluorescencia contra tiempo.



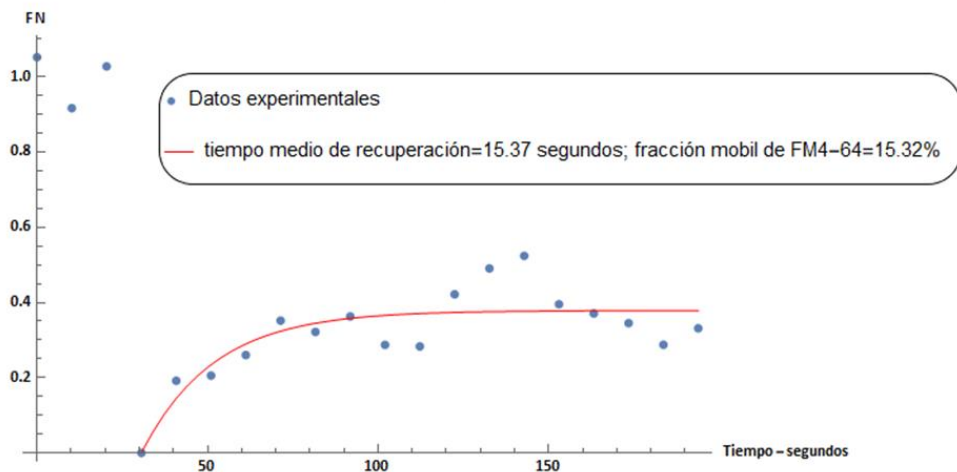
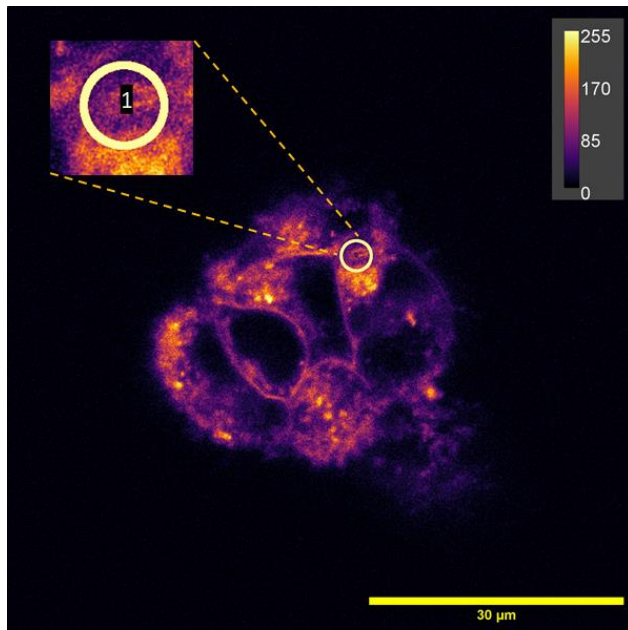
*Figura 14* Curva representativa de FRAP. Los valores en ordenada corresponden a fluorescencia normalizada dada por la Ec (9) en función del tiempo.

El tiempo entre cada valor de fluorescencia es de 10 segundos. El fotoblanqueo se hace entre los 30 segundos. A partir de ese momento comienza la recuperación de fluorescencia hasta llegar a un valor máximo de 0.4 aproximadamente. Esto quiere decir que el 40% de las moléculas FM4-64 son móviles y el 60 % son inmóviles.

## 4.5. Ajuste de la curva de FRAP

El ajuste de la curva de la **Ec (1)** a los datos de fluorescencia normalizada se hace por mínimos cuadrados. El coeficiente de determinación  $R^2$  representa en cada gráfica la diferencia que existe entre los datos experimentales la curva de ajuste. El valor de  $R^2$  es una medida de confiabilidad del ajuste y califica la validez del ajuste del modelo de FRAP con los datos de fluorescencia. Los valores posibles de  $R^2$  están en el intervalo  $0 \leq R^2 \leq 1$ . El límite superior se logra cuando el ajuste a los datos es perfecto, es decir, cuando todos los residuales son cero (E. Walpole Ronald , H. Myers Raymond, L. Myers Sharon, 2012). En nuestros ajustes útiles, es decir aquellos que nos presentan anomalías debidas a vesículas,  $R^2$  es mayor a 0.85, lo cual indica ajustes confiables para el cálculo del coeficiente de difusión.

Durante las primeras 2 horas de observación en el microscopio confocal se seleccionaron células con distintos planos focales. Algunas gráficas de recuperación de fluorescencia como las FRAP-HEK-02 y FRAP-HEK-03 del Apéndice A presentan picos y valles de fluorescencia. Estas fluctuaciones se deben al paso de vesículas muy luminosas por la ROI1 a lo largo de las mediciones, y a consecuencia del incremento de fluorescencia en plazo corto de tiempo, afectan la medición de la recuperación de fluorescencia con relación al cálculo del coeficiente de difusión tangencial a la membrana celular. La Figura 15 y la Figura 16 muestran ejemplos de este tipo de mediciones no adecuadas para la determinación del coeficiente de difusión.



*Figura 15* Ilustración de imagen de célula de la muestra (HEK-FRAP-2-07) junto a su correspondiente gráfica de FRAP. La imagen de la célula representa a la selección del área de la ROI1 en donde se realizó FRAP, la imagen de la célula HEK fue modificada con diferente gama de color con el mismo contraste y la calidad de imagen fue filtrada con Gaussian blur. La gráfica que se muestra debajo muestra los datos de recuperación de fluorescencia, junto con la curva de ajuste de FRAP y con su etiqueta de parámetros. Esta gráfica tiene un  $R^2 = 0.70671$ . Aun teniendo el valor de la  $R^2$  cercano a 1, hemos observado en la ROI1 entradas y salidas de vesículas, cuyas fluctuaciones de fluorescencia se reflejan en la gráfica como valles y crestas de fluorescencia.

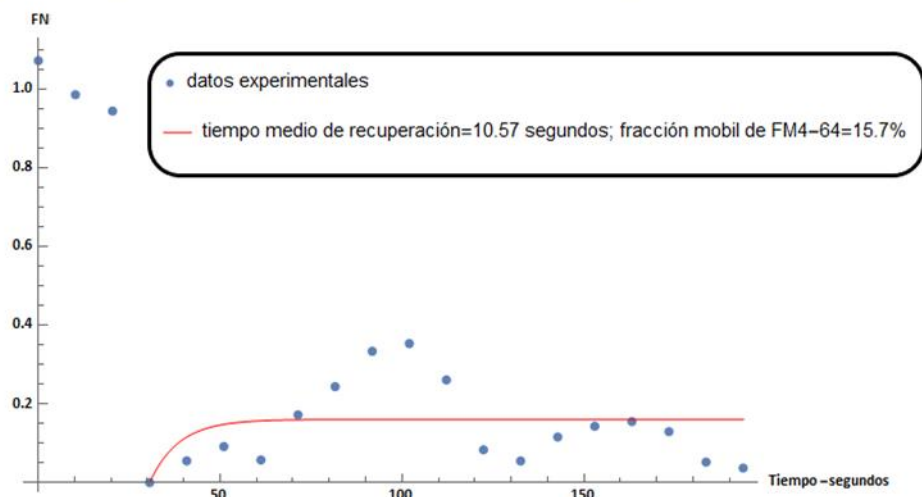
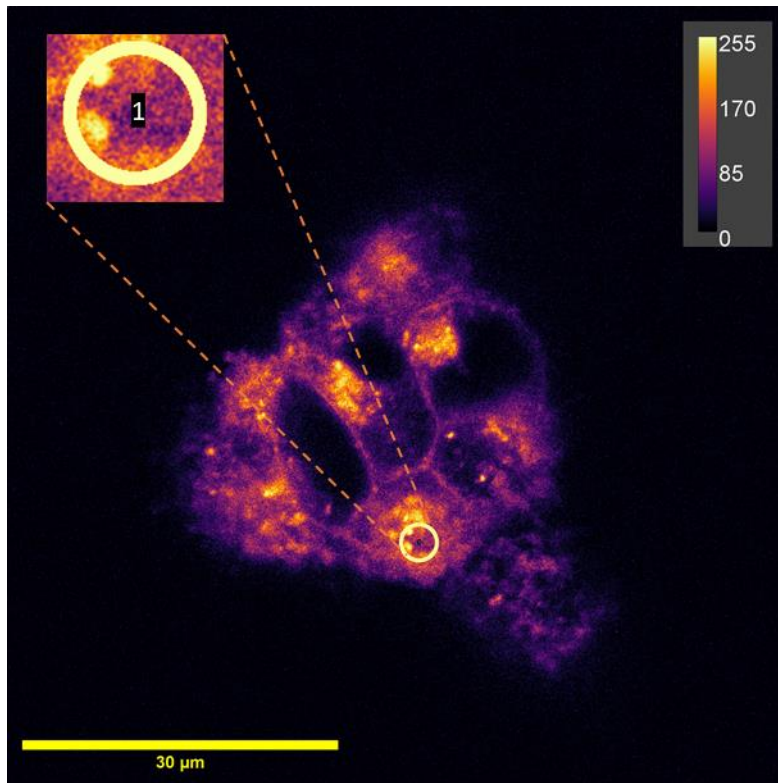
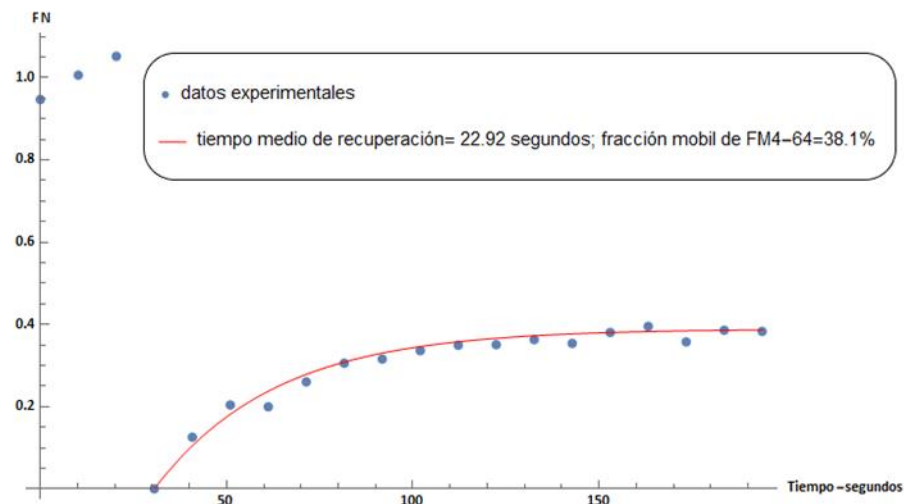
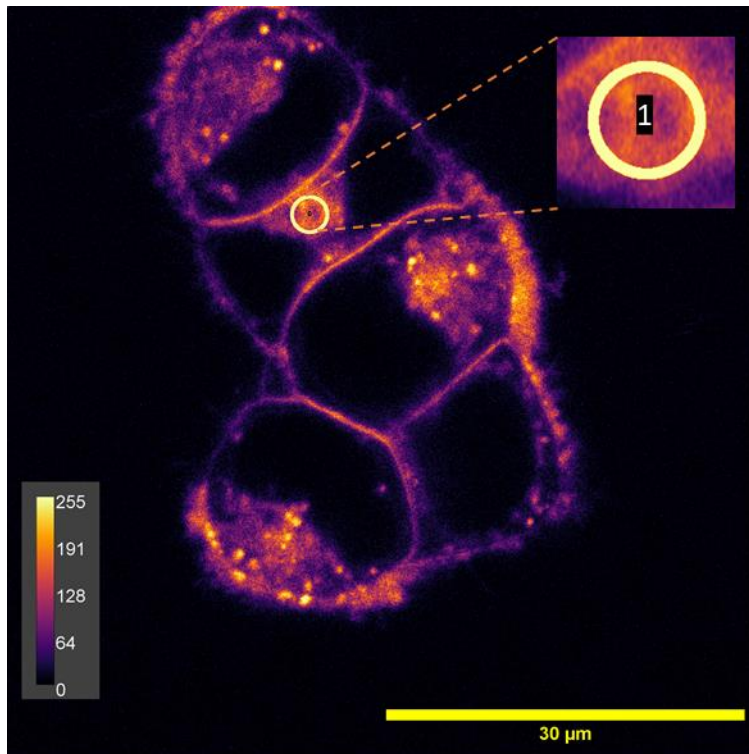


Figura 16 Ilustración de imagen de célula de la muestra (HEK-FRAP-2-05), la descripción es similar a la de la Figura 15 con  $R^2= 0.18577$ .

La Figura 17 muestra un resultado positivo en los datos experimentales de FRAP para el cálculo del **D**.



*Figura 17* Ilustración de imagen de célula de la muestra (HEK-FRAP-1-01), Ilustración de la curva de ajuste de la una prueba de FRAP relevante para el cálculo del coeficiente de difusión con una  $R^2= 0.98020$ .

En el Apéndice A se muestran las gráficas todas de mediciones de fluorescencia con las correspondientes curvas de ajuste de FRAP.

Muestra celular	$\tau_1$ (s)	Radio ( $\mu\text{m}$ )	$F_m$ (%)	$D$ ( $\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ )
HEK-FRAP-01-1	22.92	1.49	38.1	0.02130986
HEK-FRAP-02-1	10.57	1.68	15.7	0.05874437*
HEK-FRAP-02-2	15.32	1.775	37.8	0.04524396*
HEK-FRAP-03-1	10.41	1.785	31.9	0.06733617
HEK-FRAP-04-1	0.44	2.35	22.3	2.76125*
FRAP-HEK-04-2	1.61	2.35	38.1	0.75462733
FRAP-HEK-04-3	0.74	2.35	22.2	1.64182432*
FRAP-HEK-04-4	1.22	2.35	68.4	0.99586066
FRAP-HEK-04-5	1.37	2.35	55.4	0.88682482*
FRAP-HEK-04-6	2.15	2.35	33.8	0.56509302
FRAP-HEK-05-1	6.30	2.27	24.8	0.17994254
FRAP-HEK-06-1	6.68	2.36	43.4	0.18342994
FRAP-HEK-07-1	4.94	1.51	23.0	0.10154291
FRAP-HEK-08-1	0.49	0.63	5.1	0.1782*
FRAP-HEK-08-2	2.27	0.865	38.2	0.0725152*
FRAP-HEK-09-1	0.58	0.9	8.3	0.30724138*
FRAP-HEK-10-1	4.70	0.83	73.4	0.03224638*
FRAP-HEK-11-1	0.78	0.83	55.4	0.19430513
FRAP-HEK-11-2	2.15	0.76	80.2	0.05910326

**Tabla 2** Resultados experimentales. La primera columna representa un indicador de experimento. De la segunda a la cuarta columnas se indican el tiempo medio de recuperación de fluorescencia, el radio de la ROI, el porcentaje de fluoróforos móviles y el coeficiente de difusión. El \* marcado en los valores del coeficiente de difusión, significa que la  $R^2$  es menor a .75, cuyos gráficos de FRAP no son relevantes para un análisis de fluidez de la membrana celular.

La Tabla 2 resume los valores experimentales: el radio de la ROI, el tiempo medio de recuperación de fluorescencia, el coeficiente de difusión y la fracción móvil o porcentaje de moléculas fluorescentes móviles en la membrana. La Figura 18 y la Figura 19 muestran los histogramas del coeficiente de difusión y de la fracción móvil, respectivamente. Claramente, el valor más frecuente de  $D$  es menor a  $0.25 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ . El valor mediano de  $D$  es  $0.62 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ . El porcentaje de moléculas móviles tiene una distribución con un pico entre 30 y 40 por ciento. El valor mediano es de 33.8 %. Esto quiere decir que solo esa fracción del total de las moléculas de



FM4-64 insertadas en la membrana se pueden mover libremente. El 66.2% restante no se mueven libremente y no salió de la zona blanqueada.

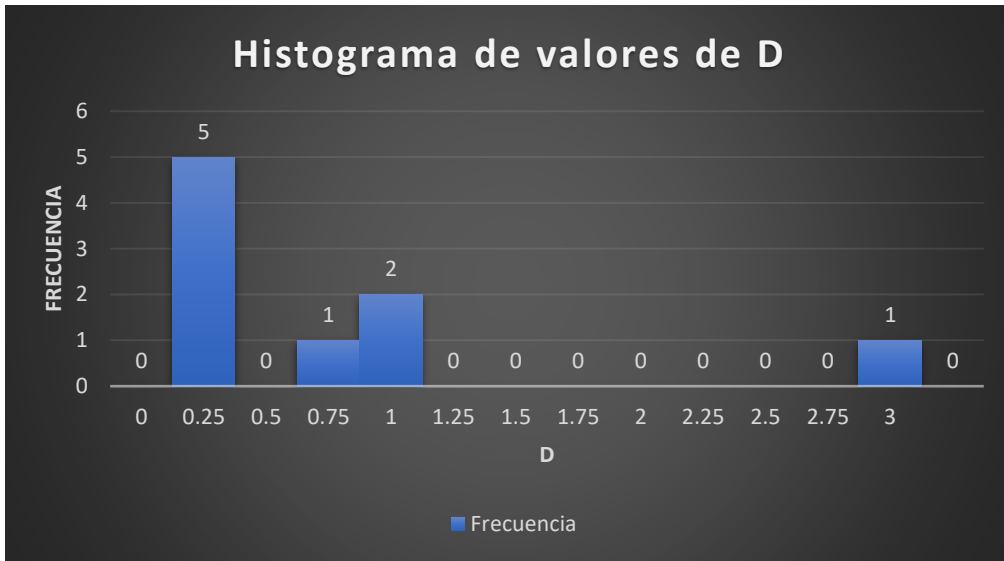


Figura 18 Histograma del coeficiente de difusión de membrana  $D_m$  de los FM4-64. La mediana es  $0.62088364 \mu m^2 s^{-1}$

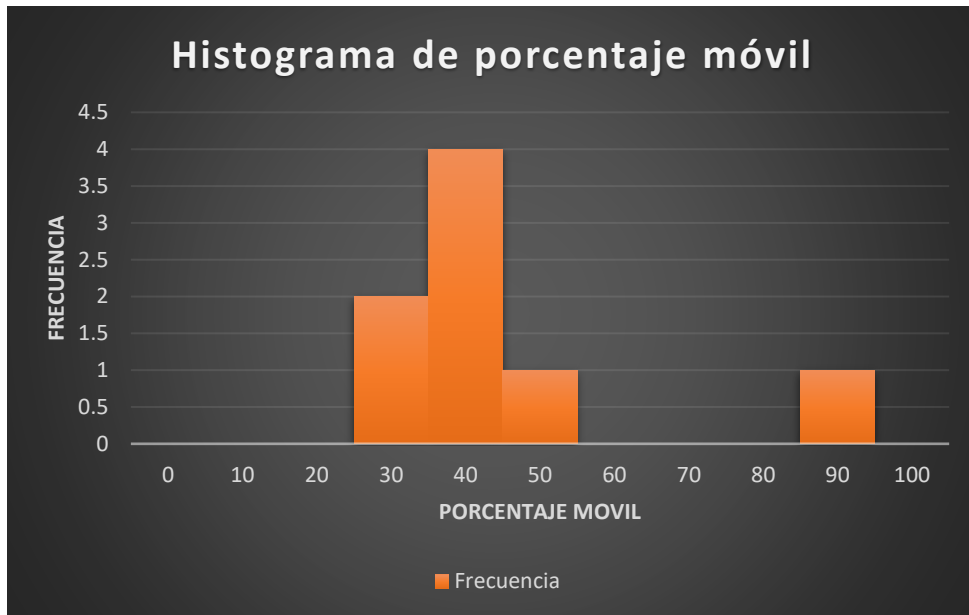


Figura 19 Histograma de la fracción móvil A de fluoróforos FM4-64, en porcentaje. El valor mediano es 38.1 %.

## 5. Discusión

El coeficiente de difusión tangencial de la membrana celular define la velocidad de los movimientos azarosos de los FM4-64, esto es que, describe el grado de fluidez de estas mismas moléculas.

Se demostró que al calcular analíticamente el movimiento cuadrático promedio (MSD) proyectado en un plano de moléculas que se difunden en una superficie curva, se obtiene una expresión análoga a la de la función ajustada a los datos de recuperación de fluorescencia. De esta forma, se obtiene una interpretación física, ya no solo empírica, de los parámetros ajustados. En particular, se llega a una expresión sencilla para calcular el coeficiente de difusión a partir del tiempo de recuperación media de la fluorescencia.

En la Figura 13 mostramos una representación en 3D de una muestra celular. El relieve que se observa es seguramente debido a que en esta muestra varias células están apiladas. Llegamos a esta conclusión porque se sabe que el diámetro típico de células HEK está entre 11 y 15  $\mu\text{m}$  (<https://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?s=n&v=1&id=108918>), mientras que la Figura 13 muestra un espesor del orden de 30  $\mu\text{m}$ .

Así mismo la característica estructural de las células es muy importante para interpretar las imágenes. La mayoría de las imágenes de fluorescencia de la membrana celular muestra huecos, ya que lo que se está observando es la parte interna de la célula y el perímetro que es conformado por la membrana de la célula es lo que fluoresce. Recomendamos escoger imágenes en las que el plano de observación coincida con una sección plana de la membrana celular teñida con marcador fluorescente. También es importante que el radio de la ROI sea mayor a 1  $\mu\text{m}$ .

Dentro de los resultados experimentales observados en esta investigación encontramos una mayor actividad de vesiculación en el interior de las células HEK la cual se refiere

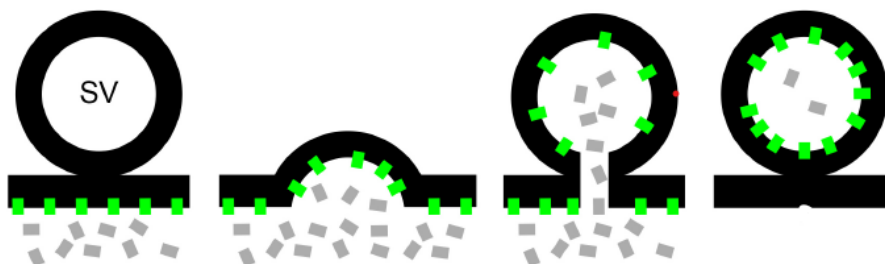
al tránsito de vesículas, que sirve como un medio de transporte de material celular (proteínas, grasas, carbohidratos y minerales) y una comunicación que mantiene el equilibrio del flujo de componente de membrana y moléculas solubles entre los organelos (compartimentos internos delimitados por membranas) y la membrana celular. Estos complejos de membranas internos son útiles para eliminar y añadir proteínas en la superficie de la membrana celular tales como canales iónicos, receptores y transportadores (Alberts Bruce, Johnson Alexander, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, 2010). Las células para cumplir sus funciones continuamente ajustan el contenido de sus membranas. Existen dos mecanismos que contribuyen con el flujo de composición celular las cuales se mencionan a continuación:

El proceso exocitosis, es una ruta de secreción biosintética-secretora suministra proteínas de nueva síntesis, carbohidratos y lípidos, tanto a la membrana celular como también al exterior de la célula. El proceso complementario, la endocitosis es un proceso de eliminación de contenido de membrana celular dirigidos al interior celular para su degradación en compartimentos internos de la célula llamadas endosomas, donde pueden ser reciclados hacia el mismo o diferente sitio de membrana celular o pueden ser dirigidos a los lisosomas para su eliminación por degradación. La endocitosis puede ser empleado también para la introducción de nutrientes como lípidos, hierro, colesterol y carbohidratos. Éstos son ingeridos junto con las macromoléculas a las que se unen y son liberados en los endosomas o lisosomas y transportados al citosol donde son utilizados en diferentes procesos biosintéticos (Alberts Bruce, Johnson Alexander, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, 2010).

El espacio de carga de cada vesícula en las rutas biosintética-secretora y endocítica delimitados por membrana topológicamente son equivalentes. Las proteínas son encapsulados y transportados por estos compartimentos desplazados en ese espacio sin tener que atravesar la membrana y pasan de un compartimento a otro mediante numerosos contenedores de transporte membranosos y reciben el nombre de vesículas. Algunos de estos contenedores son pequeñas vesículas esféricas, mientras otros son vesículas irregulares o túbulos formados a partir del compartimento dador. A estas vesículas también se le recibe un nombre convencional a su función como vesículas de transporte. Las vesículas de transporte para cumplir su función deben emerger a partir de un compartimento de membrana de manera selectiva, es así como también que su ruta de transporte es específica debido a que solo se fusionan con la membrana diana

apropiada. Un ejemplo es que no pueden llevarse proteínas que deben residir en el complejo de Golgi y solo debe fusionarse con la membrana plasmática y no con otros organelos (Alberts Bruce, Johnson Alexander, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, 2010).

Los efectos de la vesiculación provocada por el estrés químico en la membrana celular se observan claramente en la gráfica de FRAP de la Figura 16. Estos efectos se reflejan en valores fluctuantes, que están relacionados con las manchas de fluorescencia provocadas por la acumulación de FM4-64 en el interior de las vesículas. En las vesículas se sabe que los FM4-64 se mantienen insertados en la capa interna de la membrana. Durante la síntesis de vesículas que ocurre en la membrana celular, los FM4-64 se invierten quedando en la capa inferior interna de la vesícula. Esto ocurre al momento de atrapar algún nutriente por el mecanismo de contracción de la membrana, así como se muestra en la Figura 20. Estas vesículas son detectadas en la ROI1 por cada imagen registrada durante el proceso de FRAP.



*Figura 20* Imagen modificada de (Iwabuchi, Kakazu, Kho et al., 2014) que muestra la tinción de vesículas en la membrana celular teñida con moléculas de FM. Se ilustra la captación de moléculas de FM del medio externo de la célula aumentando la concentración en el interior de la vesícula.

Mencionado lo anterior sobre el estrés fisiológico en la membrana celular, observamos rasgos fenotípicos que presenta una célula en fase apoptótica: uno es el aumento de tránsito vesicular en el interior de la célula hacia el exterior de las células y la segunda observación fue que estas células HEK presentaron fragmentación de la membrana celular por ruptura del citoesqueleto subcortical el cuál es una

degradación citoesquelética, este mecanismo apoptótico es la etapa final conocido como fase de ejecución (Susan Elmore, 2007) y (Cruz-Martín-del-Campo et al., 2020). Esta fase es accionada por enzimas activas de las caspasas, a consecuencia de este mecanismo da a la formación de cuerpos apoptóticos en la superficie de la célula como se podrá observar en la Figura 21. Esta observación caracteriza probablemente a células HEK induciendo 2al estado de apoptosis, ya que en el experimento de FRAP no contamos con evidencia por viabilidad celular o marcaje de apoptosis celular para comprobar que se trata de una célula apoptótica.

Otra señal de apoptosis que observamos durante la prueba de FRAP es que en una de las células HEK, en la ROI1, durante el fotoblanqueo de los FM4-64, las vesículas transitorias teñidas con moléculas de FM4-64 en su bicapa lipídica fueron blanqueadas, estas vesículas transitorias blanqueadas no se fusionaron con otras vesículas intactas al láser al introducirse en la ROI1, e inclusive se observa la omisión de fusión entre vesículas fluorescentes no fotoblanquedados al introducirse también en la ROI1. De acuerdo a la literatura, esta falta de fusión es indicativa de un estado apoptótico y constituye un mecanismo de autofagia de contenido intracelular (Cruz-Martín-del-Campo et al., 2020) y (Akers et al., 2013).

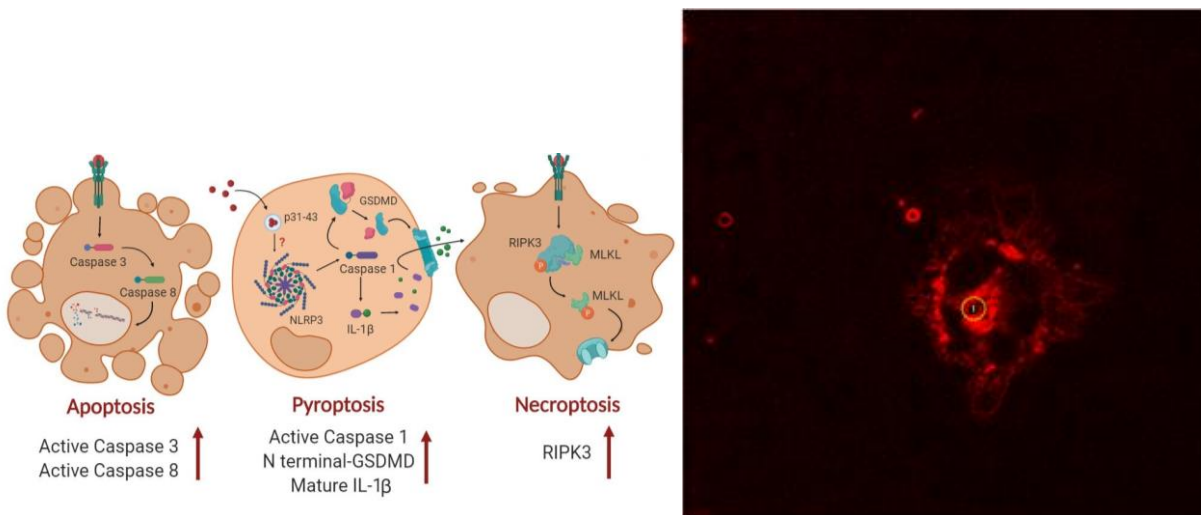
Los cuerpos apoptóticos o vesículas extracelulares derivados de células apoptóticas (ApoEVs por sus siglas en inglés) son un grupo de vesículas extracelulares unidos a membranas subcelular generadas durante la descomposición de una célula muriendo, se ha descubierto que los ApoEV actúan como contenedores para transportar los restos de las células apoptóticas para promover la regeneración. Aún en las publicaciones más recientes la clasificación de los ApoEVs todavía es controversial. Los cuerpos apoptóticos (ApoBds por sus siglas en inglés) fueron las primeras identificadas AporEVs, en la literatura de investigación científica sobre la ruta de vesiculación de apoptosis, todavía no se ha definido un criterio sobre el funcionamiento específico para distinguir a un ApoBds de un ApoEVs. sin embargo, se han clasificado las vesículas por su diámetro (Li et al., 2020), las cuales son las siguientes:

1. Las vesículas más grandes envueltas en membrana denominadas ApoBs/AB tienen diámetros de 1000 a 5000 nm (Atkin-smith et al., 2015).

2. Las vesículas más pequeñas denominadas microvesículas apoptóticas (ApoMv) o similares a exosomas (Park et al., 2018) tienen diámetros de 50 a 1000 nm (Schiller et al., 2012) y (Ainola et al., 2018).

Tal como el resultado de la imagen de una células HEK en la Figura 21 la clasificación del tamaño de esta vesícula con un tamaño de diámetro de  $2 \mu m$  entra en ApoBds.

En la parte izquierda de la Figura 21 se ilustran vesículas de una célula en apoptosis y en la imagen de la derecha se observa claramente cerca del centro de la imagen una vesícula grande y muy fluorescente en forma de dona. Esta forma corresponde a un corte diametral de la vesícula.



*Figura 21* Ilustración esquematizada de muerte celular y al lado una imagen de la célula HEK presentando rasgos visuales alrededor de la membrana celular vacuolas y vesículas, así como se muestra la apoptosis en el esquema.

Los experimentos de FRAP que fueron realizados al principio de las observaciones de las primeras células fueron exitosos. Se observó una recuperación de fluorescencia suave. Posteriormente se hicieron mediciones en otros niveles de altura de la célula y así poder determinar el coeficiente de difusión de membrana celular en distintas zonas.

Considerando aquellas muestras celulares HEK que están señalizados con el \* en la *Tabla 2*, indica que los resultados del coeficiente de difusión de membrana celular no están relacionados a los movimientos laterales de FM4-64 y esto se observa en las gráficas de FRAP como fluctuaciones de fluorescencia muy altos, las fluctuaciones de fluorescencia son provocados por la interacción entre la membrana celular y las vesículas apoptóticas saturados con FM4-64 que se cruzan a través de la ROI1 apareciendo y desapareciendo por cada tiempo de imagen, esto provoca que cambie drásticamente la fluorescencia en el transcurso de la evolución temporal de fluorescencia y no permita tener parámetros de ajuste confiables para el cálculo del coeficiente de difusión de membrana celular.

## 6. Conclusión

En la relación analítica de parámetros del modelo de FRAP con el modelo teórico de MSD, se demostró que la ecuación (1) es un modelo preciso. Los parámetros de ajuste presentan practicidad para el cálculo del coeficiente de difusión tangencial a la membrana celular. El modelo empírico de FRAP de la ecuación (1), el cuál es recomendable para el estudio de difusión de marcadores fluorescentes diluidos en la membrana celular, tiene ahora una interpretación física.

Nuestros resultados sugieren que un valor mayor o igual a 0.75 de  $R^2$  es un valor confiable para utilizar los parámetros de ajuste para un análisis relevante a la fluidez de la membrana celular.

La suministración de nuevo medio de cultivo celular después de realizar la tinción con FM4-64 o cualquier otro FM, podría aminorar los eventos inoportunos que ocurren cuando las células se encuentran en estrés fisiológico provocado por condiciones desfavorables como es la falta de nutrientes, aumentos de  $\text{CO}_2$ , disminución de PH, contaminación por bacterias que se encuentren en el medio, aumento de exosomas y desechos en el medio de cultivo. Otra recomendación sería el control activo de la concentración de  $\text{CO}_2$  como una forma de controlar el pH de la muestra.



## 7. Bibliografía

- [1] Cruz-Martín-del-Campo, S. L., González-Espinosa, C., Ruiz-Quiñonez, A. K., & Carranza-Aguilar, C. J. (2020). Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. *El Residente*, 15(3), 97–112. <https://doi.org/10.35366/95960>
- [2] Ainola, M., Porola, P., Takakubo, Y., Przybyla, B., Kouri, V. P., Tolvanen, T. A., Hänninen, A., & Nordström, D. C. (2018). Activation of plasmacytoid dendritic cells by apoptotic particles – mechanism for the loss of immunological tolerance in Sjögren’s syndrome. *Clinical and Experimental Immunology*, 191(3), 301–310. <https://doi.org/10.1111/cei.13077>
- [3] Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles ( EV ): exosomes , microvesicles , retrovirus-like vesicles , and apoptotic bodies. *Springer*, 113, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>
- [4] Alberts Bruce, Johnson Alexander, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, P. W. (2010). *Biología molecular de la célula* (Omega).
- [5] Atkin-smith, G. K., Tixeira, R., Paone, S., Mathivanan, S., Collins, C., Liem, M., Goodall, K. J., Ravichandran, K. S., Hulett, M. D., & Poon, I. K. H. (2015). A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure. *Nature Communication*, May, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms8439>
- [6] Avila, R., Tamariz, E., Medina-Villalobos, N., Andilla, J., Marsal, M., & Loza-Alvarez, P. (2018). Effects of near infrared focused laser on the fluorescence of labelled cell membrane. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36010-1>
- [7] Axelrod, D. (1977). Cell surface heating during fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical Journal*, 18(1), 129–131. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(77\)85601-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(77)85601-4)
- [8] Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E., & Webb, W. W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal*, 16(9), 1055–1069. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(76\)85755-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(76)85755-4)
- [9] Carla de Los Santos, Chang, C.-W., Mycek, M.-A., & Cardullo, R. A. (2015). FRAP, FLIM, and FRET: Detection and analysis of cellular dynamics on a molecular scale using fluorescence microscopy. *Molecular Reproduction and Development*, 82(7–8), 587–604. <https://doi.org/10.1002/mrd.22501>
- [10] Chary, S. R., & Jain, R. K. (1989). Direct measurement of interstitial convection and diffusion of albumin in normal and neoplastic tissues by fluorescence photobleaching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(14), 5385–5389. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.14.5385>

- [11]D Lansing, B Ware, L. P. (1982). *Mobility of cytoplasmic and membrane-associated actin in living cells*. 79(August), 4660–4664.
- [12]De, E., Para, R., Al, O., En, S., De, D. E. L. A. A., El, E. N., Fase, D. D. E., Por, R., & De, I. (2007). . 200427014 a.
- [13]Deschout, H., Raemdonck, K., Demeester, J., Smedt, S. C. De, & Braeckmans, K. (2014). *FRAP in Pharmaceutical Research : Practical Guidelines and Applications in Drug Delivery*. 255–270. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1146-9>
- [14]E. Walpole Ronald , H. Myers Raymond, L. Myers Sharon, Y. K. (2012). *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias* (9th ed.). PEARSON. [https://verenciafunez94hotmail.files.wordpress.com/2014/08/8va-probabilidad-y-estadistica-para-ingenier-walpole\\_8.pdf](https://verenciafunez94hotmail.files.wordpress.com/2014/08/8va-probabilidad-y-estadistica-para-ingenier-walpole_8.pdf)
- [15]Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- [16]Engelman, D. M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438(7068), 578–580. <https://doi.org/10.1038/nature04394>
- [17]Iwabuchi, S., Kakazu, Y., Koh, J. Y., Goodman, K. M., & Charles Harata, N. (2014). Examination of synaptic vesicle recycling using FM dyes during evoked, spontaneous, and miniature synaptic activities. *Journal of Visualized Experiments*, 85, 1–10. <https://doi.org/10.3791/50557>
- [18]Kappel, C., & Eils, R. (2004). Fluorescence recovery after photobleaching with the Leica TCS SP2. *Cancer Research*, 18. <http://www.dkfz.de/ibios/index.jsp>
- [19]Kitamura, A., & Kinjo, M. (2018). State-of-the-art fluorescence fluctuation-based spectroscopic techniques for the study of protein aggregation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19040964>
- [20]Klein, C., Pillot, T., Chambaz, J., & Drouet, B. (2003). Determination of plasma membrane fluidity with a fluorescent analogue of sphingomyelin by FRAP measurement using a standard confocal microscope. *Brain Research Protocols*, 11(1), 46–51. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(03\)00016-3](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(03)00016-3)
- [21]Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Vol. 33, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/BF02629943>
- [22]Ledesma-Durán, A., Munguía-Valadez, J., Moreno-Razo, J. A., Hernández, S. I., & Santamaría-Holek, I. (2021). Entropic Effects of Interacting Particles Diffusing on Spherical Surfaces. *Frontiers in Physics*, 9(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphy.2021.634792>
- [23]Li, M., Liao, L., Tian, W., & Gregory, C. (2020). Extracellular Vesicles Derived From Apoptotic Cells : An Essential Link Between Death and Regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.573511>
- [24]Lichius, A., & Zeilinger, S. (2019). Application of Membrane and Cell Wall Selective Fluorescent Dyes for Live- Cell Imaging of Filamentous Fungi. *Jove*, 153(November), 1–16. <https://doi.org/10.3791/60613>
- [25]Lorén, N., Hagman, J., Jonasson, J. K., Deschout, H., Bernin, D., Cella-Zanacchi,

- F., Diaspro, A., McNally, J. G., Ameloot, M., Smisdom, N., Nydén, M., Hermansson, A. M., Rudemo, M., & Braeckmans, K. (2015). Fluorescence recovery after photobleaching in material and life sciences: Putting theory into practice. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *48*(3), 323–387. <https://doi.org/10.1017/S0033583515000013>
- [26] Martínez-Balbuena, L., Maldonado-Arce, A., & Hernández-Zapata, E. (2010). Elasticidad de las membranas biológicas. *Revista Mexicana de Física E*, *56*(1), 107–122.
- [27] McNally, J. C., Müller, W. G., Walker, D., Wolford, R., & Hager, G. L. (2000). The glucocorticoid receptor: Rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science*, *287*(5456), 1262–1265. <https://doi.org/10.1126/science.287.5456.1262>
- [28] Miura, K. (2005). *Analysis of FRAP Curves*. EMBL. <https://www.embl.de/eamnet/frap/FRAP6.html>
- [29] Park, S. J., Kim, J. M., Kim, J., Hur, J., Park, S., Kim, K., Shin, H. J., & Chwae, Y. J. (2018). Molecular mechanisms of biogenesis of apoptotic exosome-like vesicles and their roles as damage-associated molecular patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(50), E11721–E11730. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811432115>
- [30] Peeters, L., Sanders, N. N., Braeckmans, K., Boussery, K., Van De Voorde, J., De Smedt, S. C., & Demeester, J. (2005). Vitreous: A barrier to nonviral ocular gene therapy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *46*(10), 3553–3561. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0165>
- [31] Phair, R. D., & Misteli, T. (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *NATURE*, *404*(April), 604–608.
- [32] Phair, R. D., & Misteli, T. (2001). *KINETIC MODELLING APPROACHES TO IN VIVO IMAGING*. *2*(December), 898–907. <https://doi.org/10.1038/35103000>
- [33] Pincet, F., Adrien, V., Yang, R., Delacotte, J., Rothman, J. E., Urbach, W., & Tareste, D. (2016). FRAP to characterize molecular diffusion and interaction in various membrane environments. *PLoS ONE*, *11*(7), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158457>
- [34] Prasad, R., & Singh, A. (2020). *Analysis of membrane lipids* (A. S. Rajendra Prasad (ed.)). Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0631-5>
- [35] R. Byron Bird, Warren E. Stewart, E. N. L. (1972). fenómenos de transporte. *Transport Phenomenon*, *148*, 148–162.
- [36] Reits, E. A. J., & Neefjes, J. J. (2001). From fixed to FRAP: Measuring protein mobility and activity in living cells. In *Nature Cell Biology* (Vol. 3, Issue 6, pp. E145–E147). <https://doi.org/10.1038/35078615>
- [37] S. Bolte, C. Talbot, Y. Boutte, O. Catrice, N. D. R. & B. S.-J. (2004). *FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells*. *214*(May), 159–173. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.0022-2720.2004.01348.x>
- [38] Sbalzarini, I. F., Mezzacasa, A., Helenius, A., & Koumoutsakos, P. (2005). Effects of organelle shape on fluorescence recovery after photobleaching. *Biophysical*

*Journal*, 89(3), 1482–1492. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.057885>

- [39] Schiller, M., Parcina, M., Heyder, P., Foermer, S., Ostrop, J., Leo, A., Heeg, K., Herrmann, M., Lorenz, H.-M., & Bekeredjian-Ding, I. (2012). Induction of Type I IFN Is a Physiological Immune Reaction to Apoptotic Cell-Derived Membrane Microparticles. *The Journal of Immunology*, 189(4), 1747–1756. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100631>
- [40] Schlessinger, J., Koppel, D. E., Axelrod, D., Jacobson, K., Webb, W. W., & Elson, E. L. (1976). Lateral transport on cell membranes: mobility of concanavalin A receptors on myoblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7), 2409–2413. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2409>
- [41] Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. In *Nature* (Vol. 387, Issue 6633, pp. 569–572). <https://doi.org/10.1038/42408>
- [42] Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, 175(4023), 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
- [43] Swaminathan, R., Hoang, C. P., & Verkman, A. S. (1997). Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: Cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophysical Journal*, 72(4), 1900–1907. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78835-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78835-0)
- [44] Walker, J. M. (2015). *Plant Cell Expansion* (J. M. Estevez (ed.); Academic). Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1902-4\\_9](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1902-4_9)
- [45] Welty, J. R., Wicks, C. E., & Wilson, R. E. (1991). *Fundamentos de transferencia de momento, calor y masa / James R. Welty, Charles E. Wicks, Robert E. Wilson*. [http://148.206.53.84/tesiuami/Libros/L28.pdf%0Ahttps://encore.uib.es/iii/encore/record/C\\_\\_Rb1116265;jsessionid=F13AD561CE9C96B7F6572C122BD6CF3B?lang=cat](http://148.206.53.84/tesiuami/Libros/L28.pdf%0Ahttps://encore.uib.es/iii/encore/record/C__Rb1116265;jsessionid=F13AD561CE9C96B7F6572C122BD6CF3B?lang=cat)
- [46] Wojcieszyn, J. W., Schlegel, R. A., Wu, E. S., & Jacobson, K. A. (1981). Diffusion of injected macromolecules within the cytoplasm of living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(7 I), 4407–4410. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.7.4407>
- [47] Meir Shinitzky. (1993). *Biomembranes signal transduction across membranes*. VCH: Balaban Publishers

## 8.Apéndice A

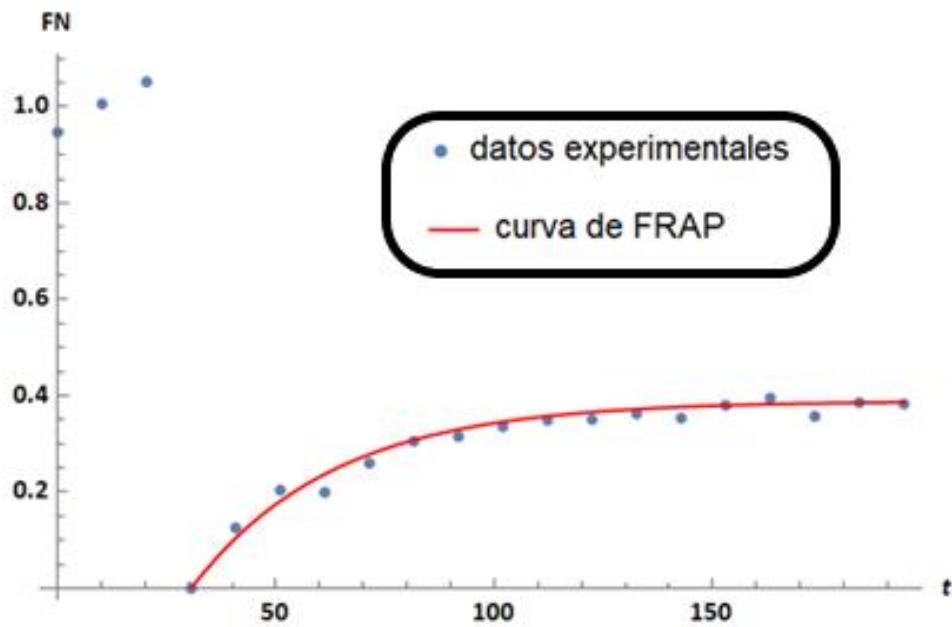
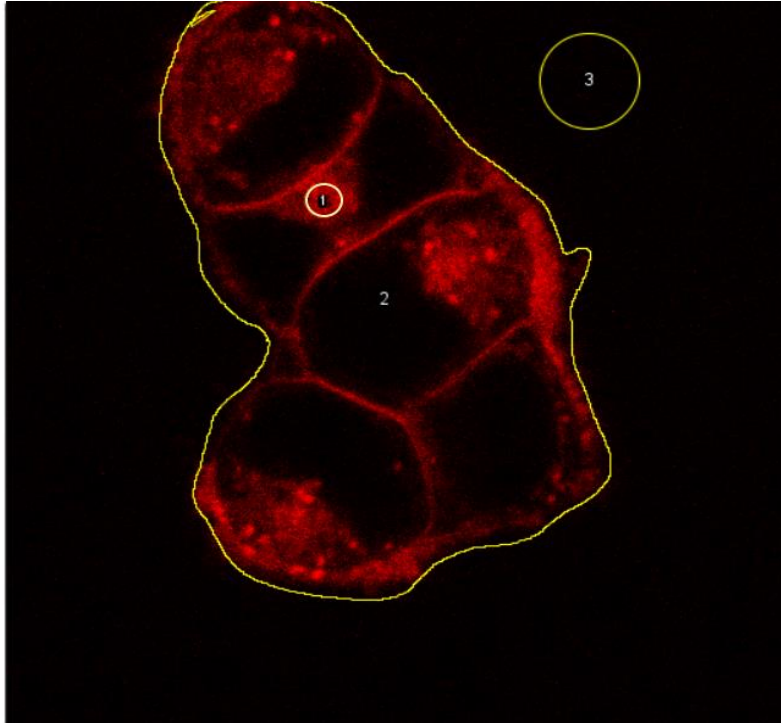


Figura 22 HEK-FRAP-01-1; teniendo un  $R^2 = 0.98020$ , FM=38.1 % fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 38.1$  segundos

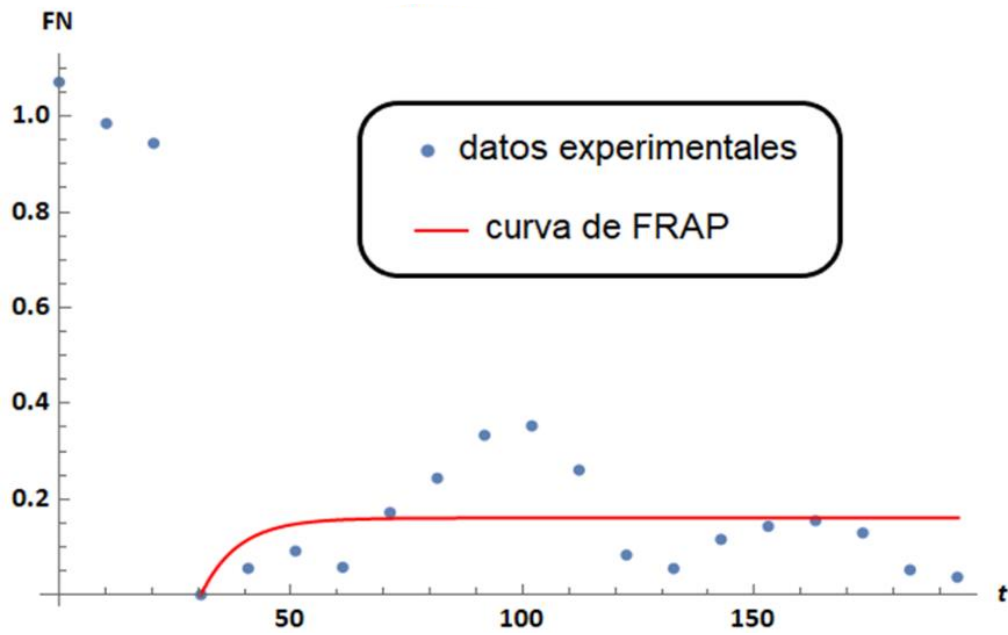
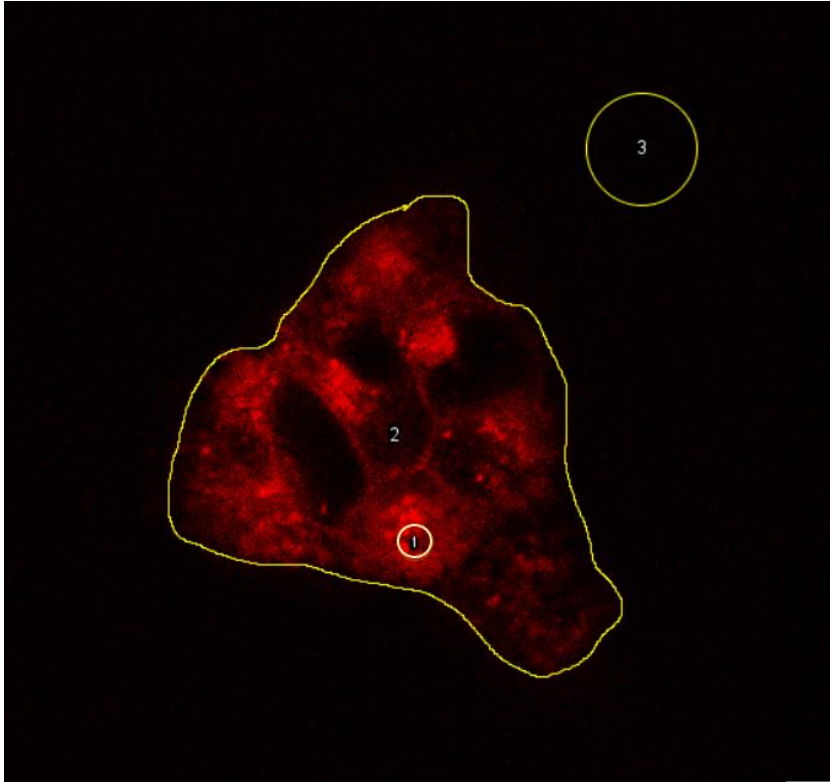


Figura 23 HEK-FRAP-02-1; teniendo un  $R^2 = 0.18577$ , FM=15.7 % fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 10.57$  segundos

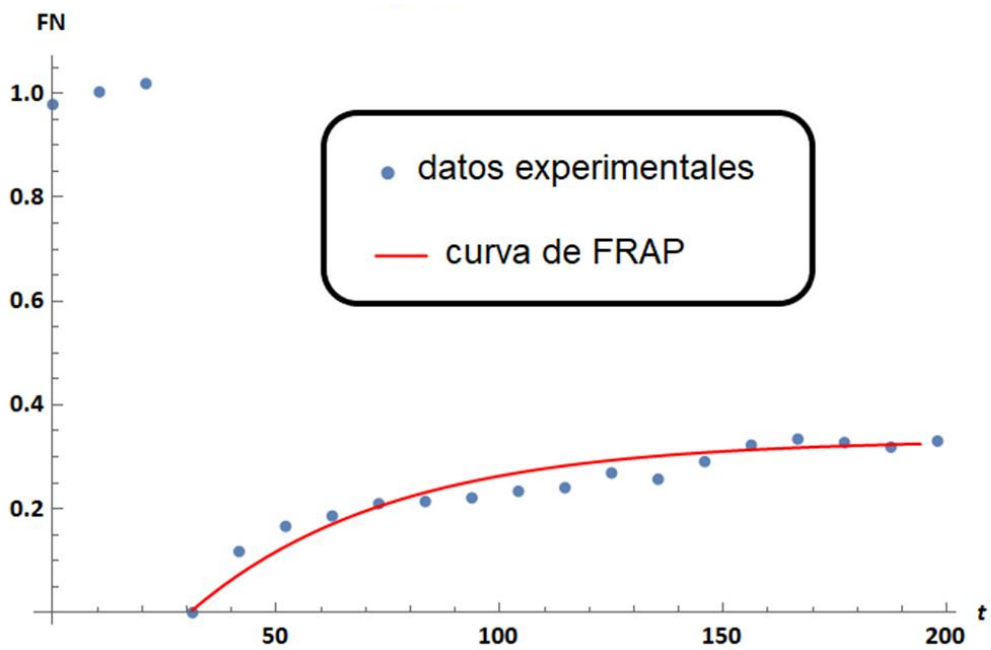
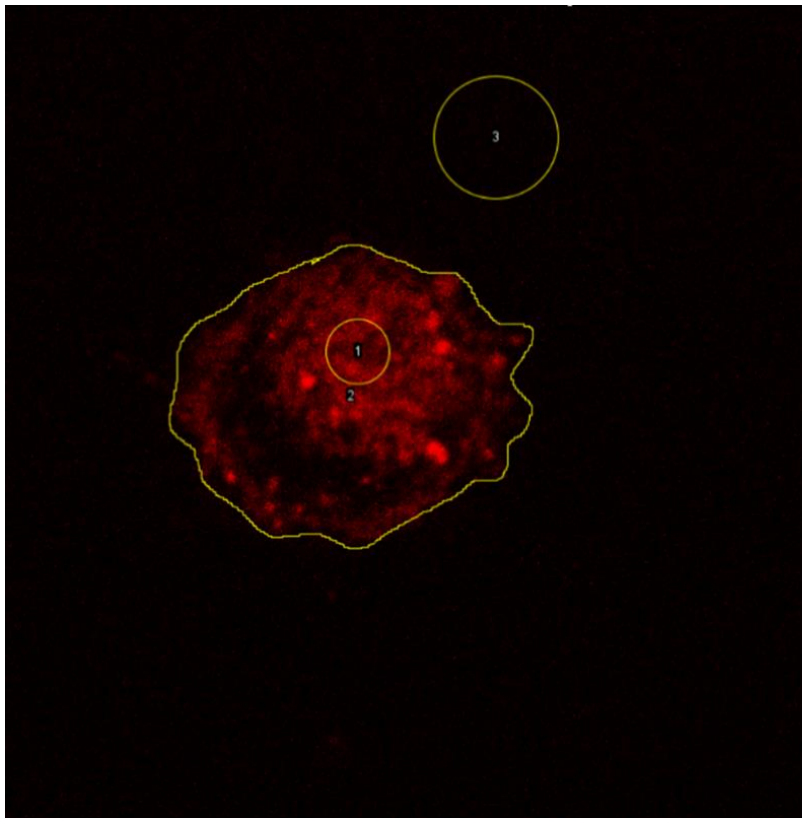


Figura 24 HEK-FRAP-03-1; teniendo un  $R^2 = 0.91400$  , FM=31.9 % fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 29.20$  segundos

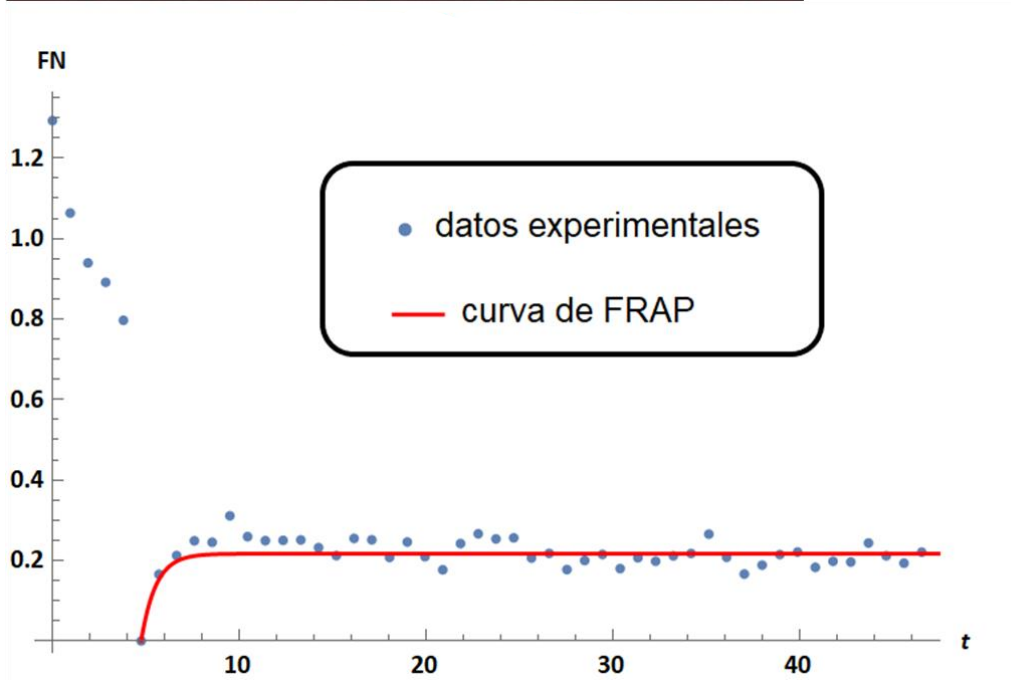
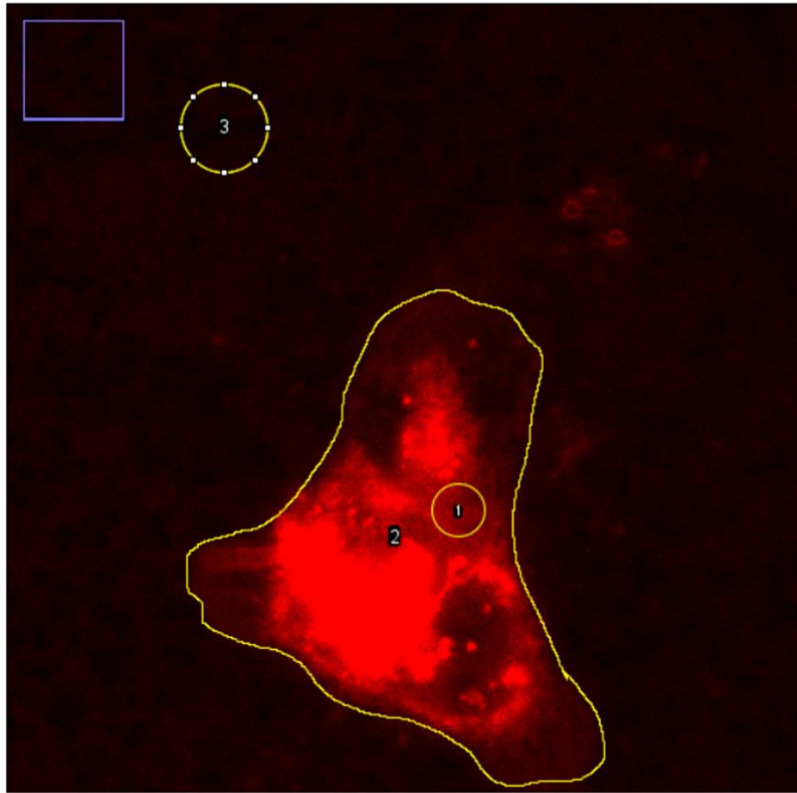


Figura 25 **HEK-FRAP-04-1**; teniendo un  $R^2 = 0.56746$ , FM=22.3 % fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 0.44$  segundos



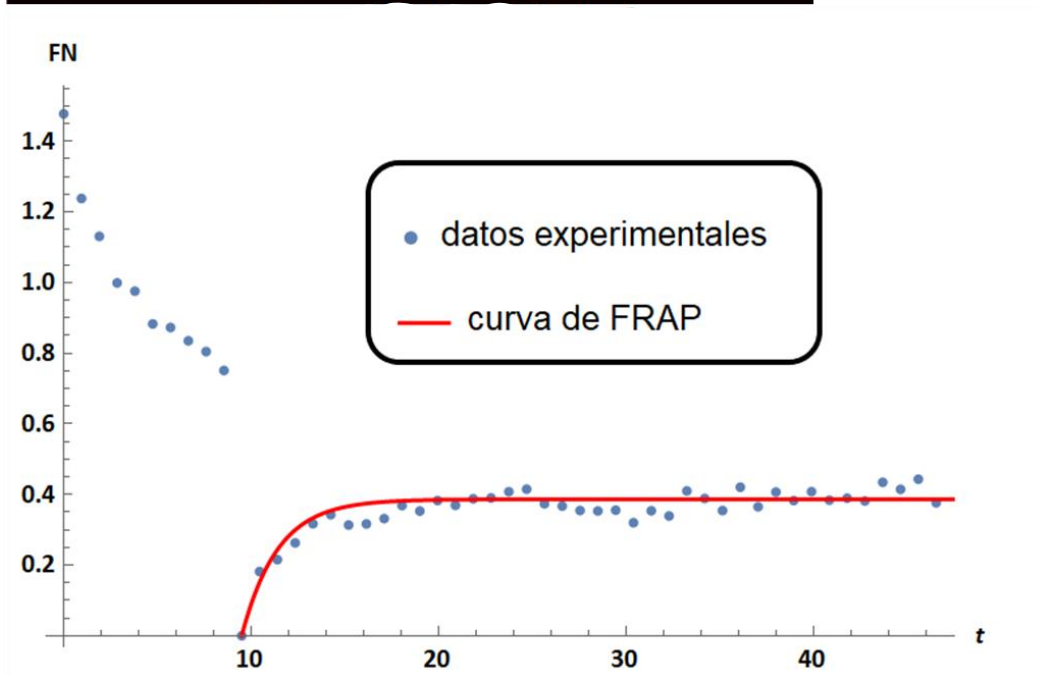
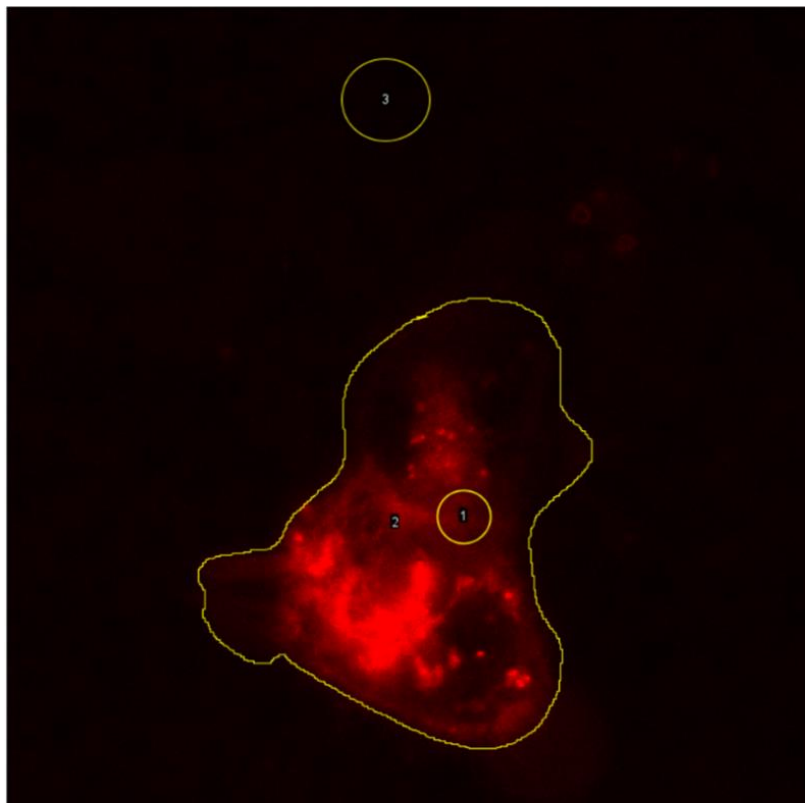


Figura 26 FRAP-HEK-04-2; teniendo un  $R^2 = 0.86710$ , FM=38.1 % fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 1.61$  segundos

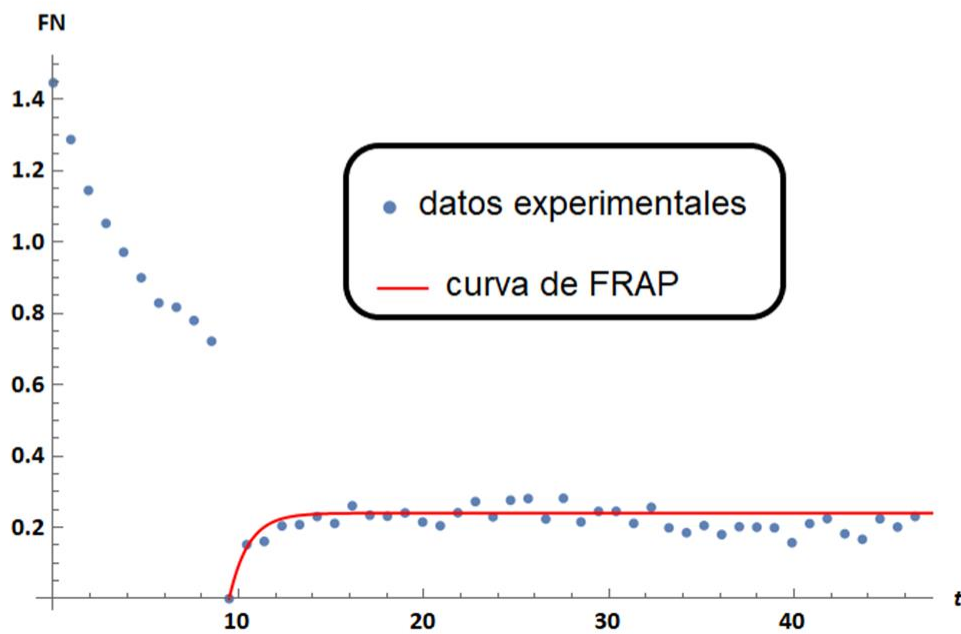
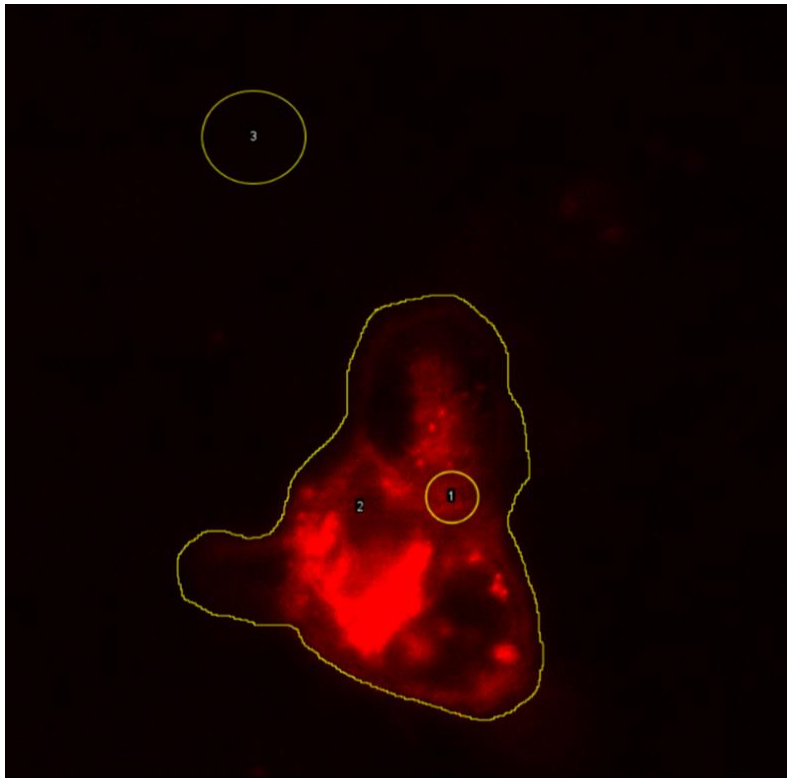


Figura 27 FRAP-HEK-04-3; teniendo un  $R^2 = 0.61249$  , FM=22.2 % fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 0.74$  segundos

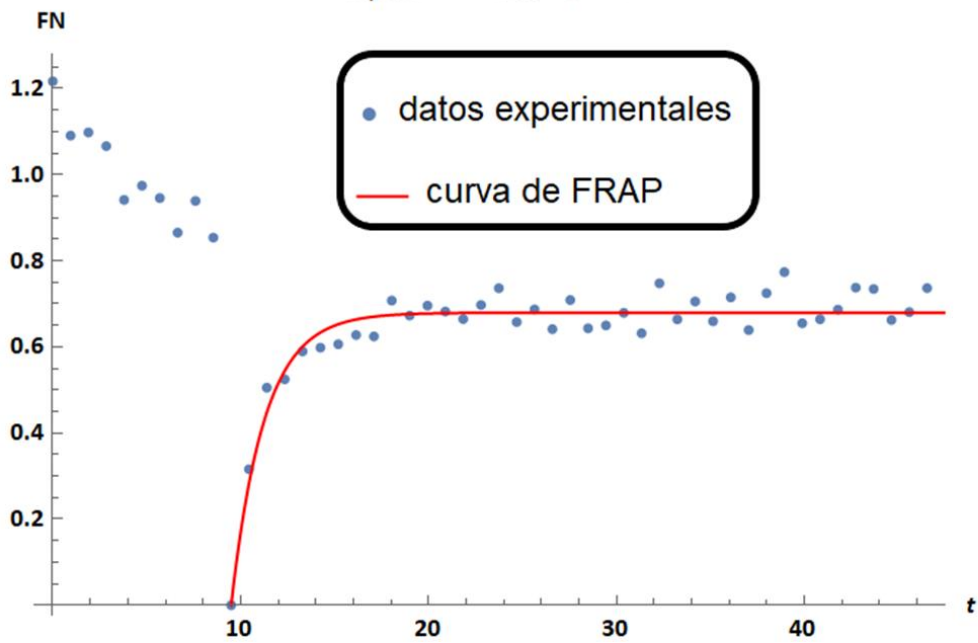
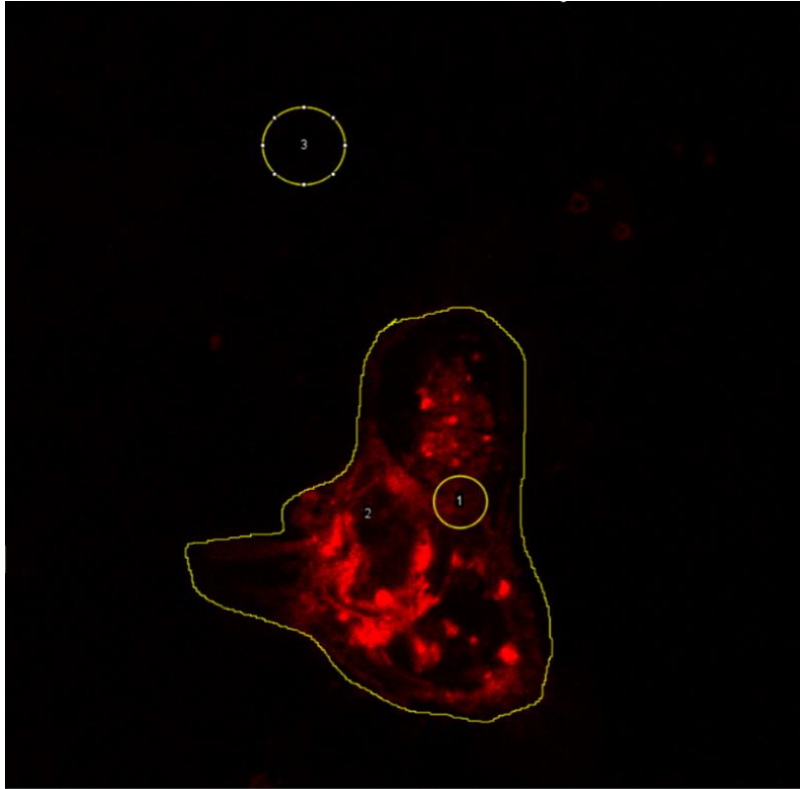


Figura 28 FRAP-HEK-04-4; teniendo un  $R^2 = 0.91838$  , FM=68.4 % fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 1.22$  segundos

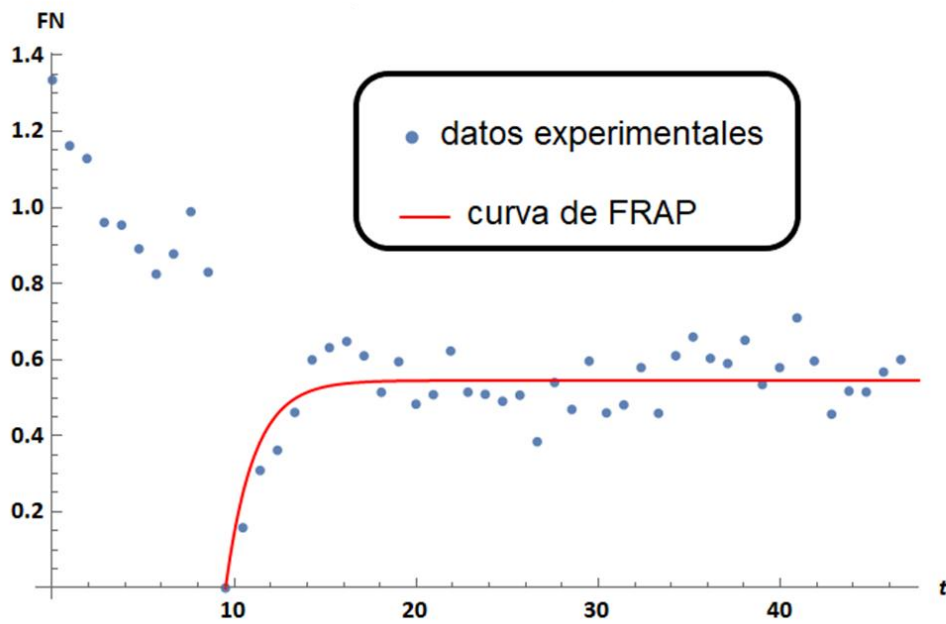
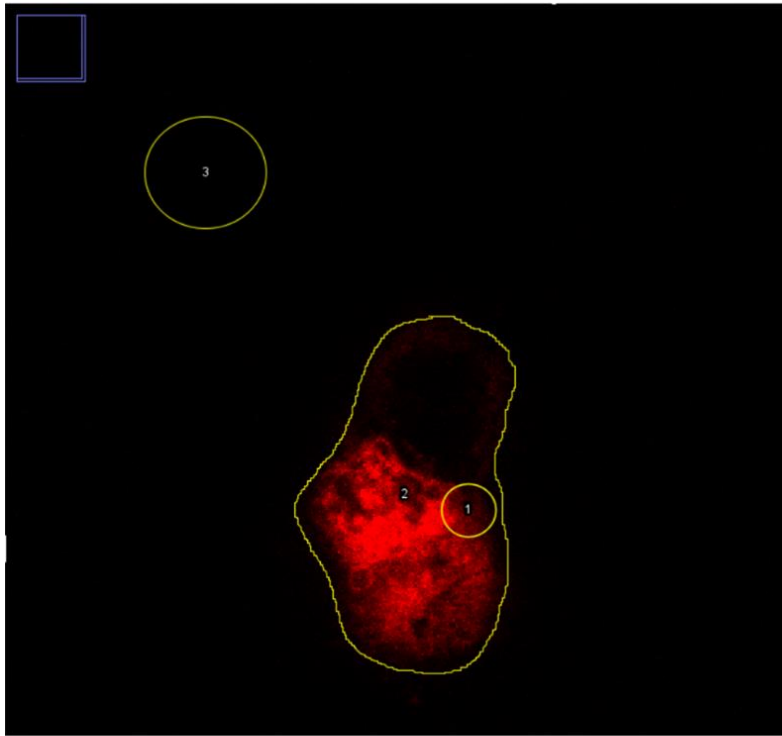


Figura 29 FRAP-HEK-04-5; teniendo un  $R^2 = 0.70853$  , FM=55.4 % fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 1.37$  segundos

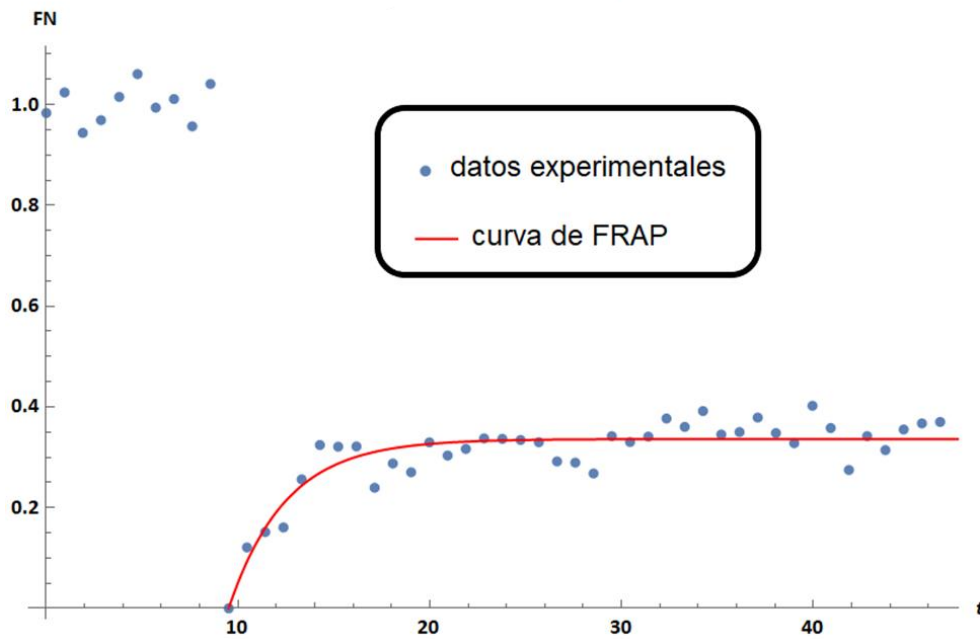
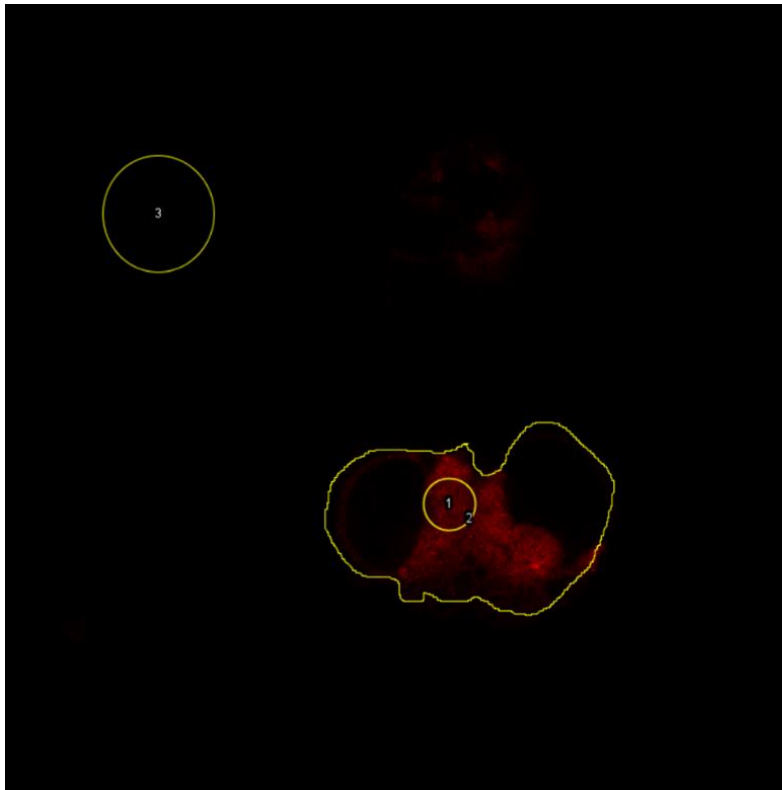


Figura 30 FRAP-HEK-04-6; teniendo un  $R^2 = 0.81266$  , FM=33.8 % fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 2.15$  segundos

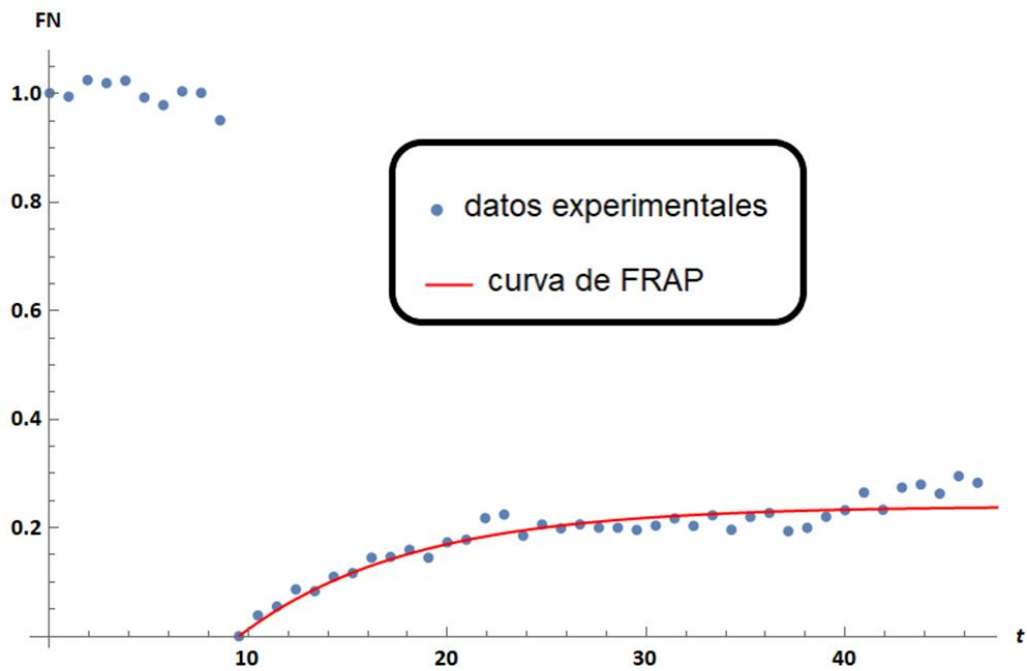
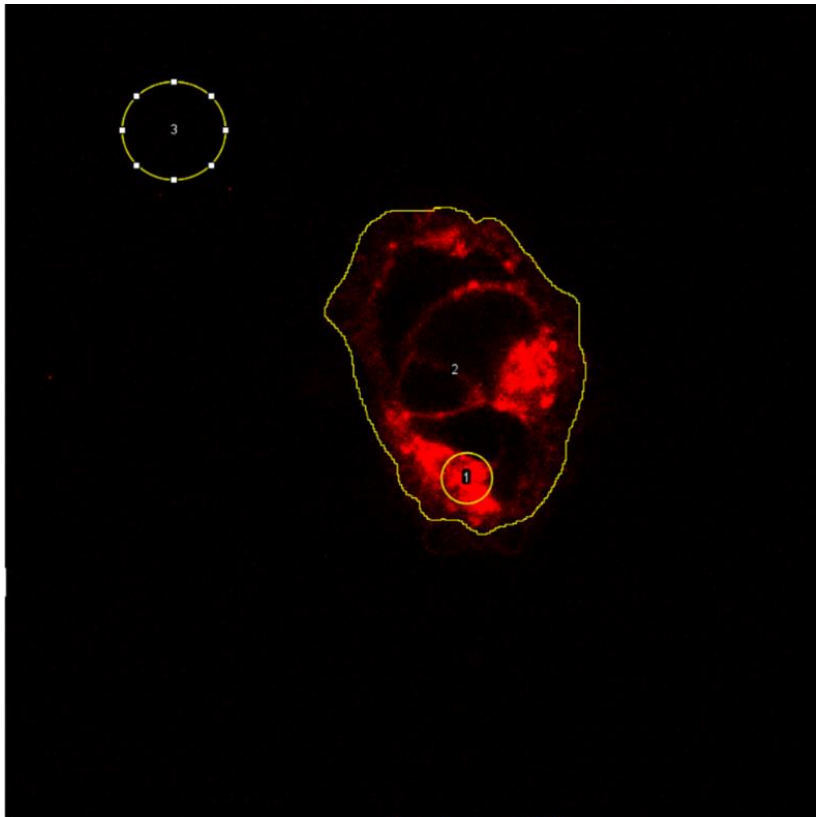


Figura 31 FRAP-HEK-05-1; teniendo un  $R^2 = 0.89351$  , FM=24.8 % fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 6.30$  segundos

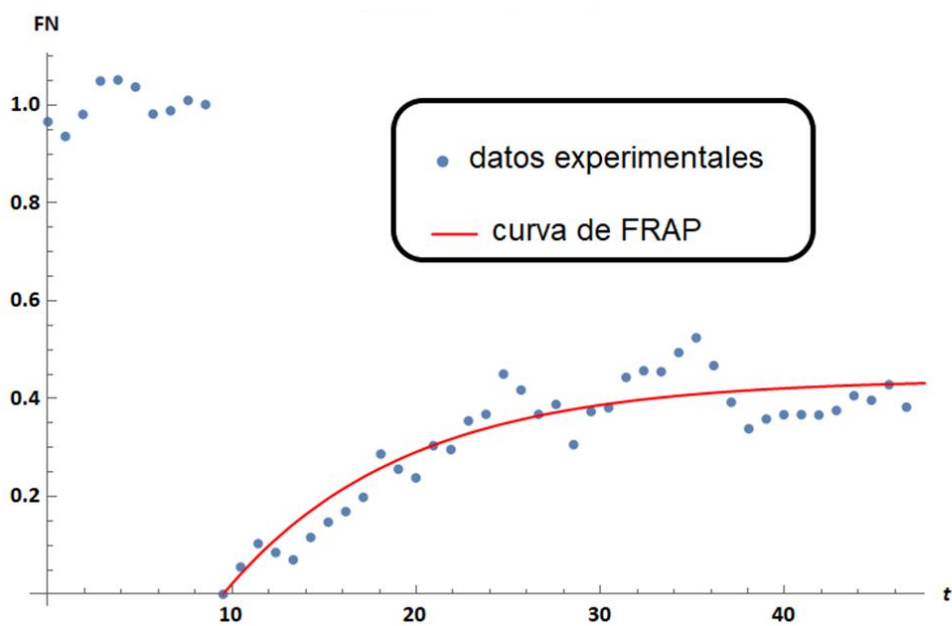
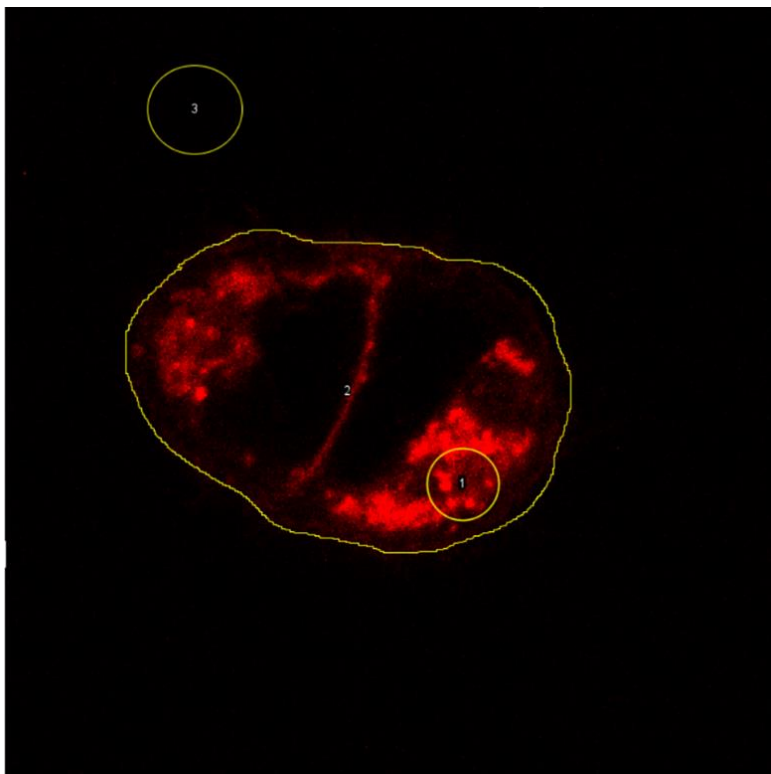


Figura 32 FRAP-HEK-06-1; teniendo un  $R^2 = 0.85585$  , FM=43.4 % fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 6.68$  segundos

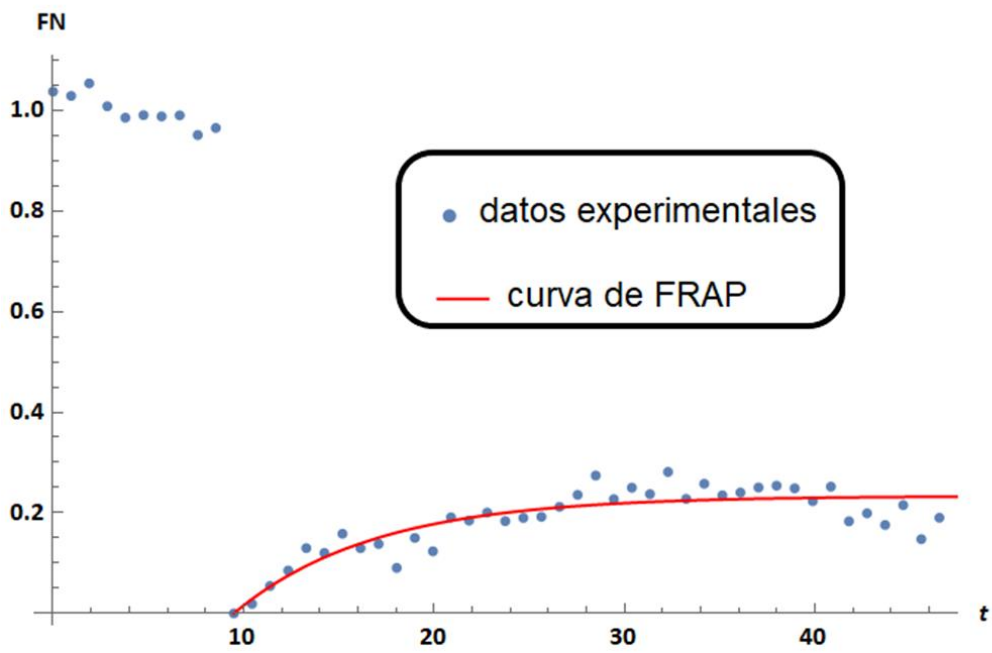
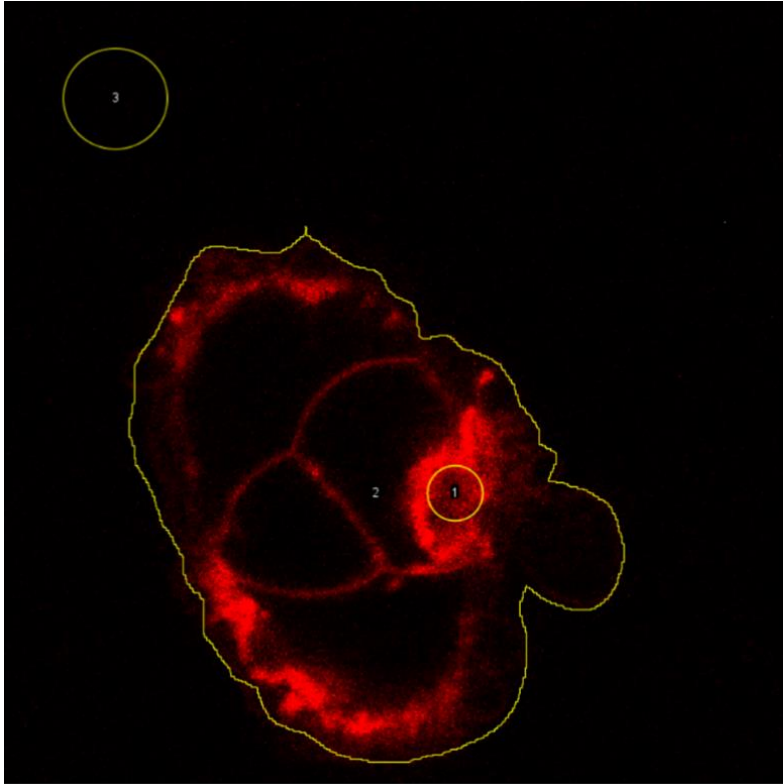


Figura 33 FRAP-HEK-07-1; teniendo un  $R^2 = 0.78381$  , FM=23 % fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 4.94$  segundos



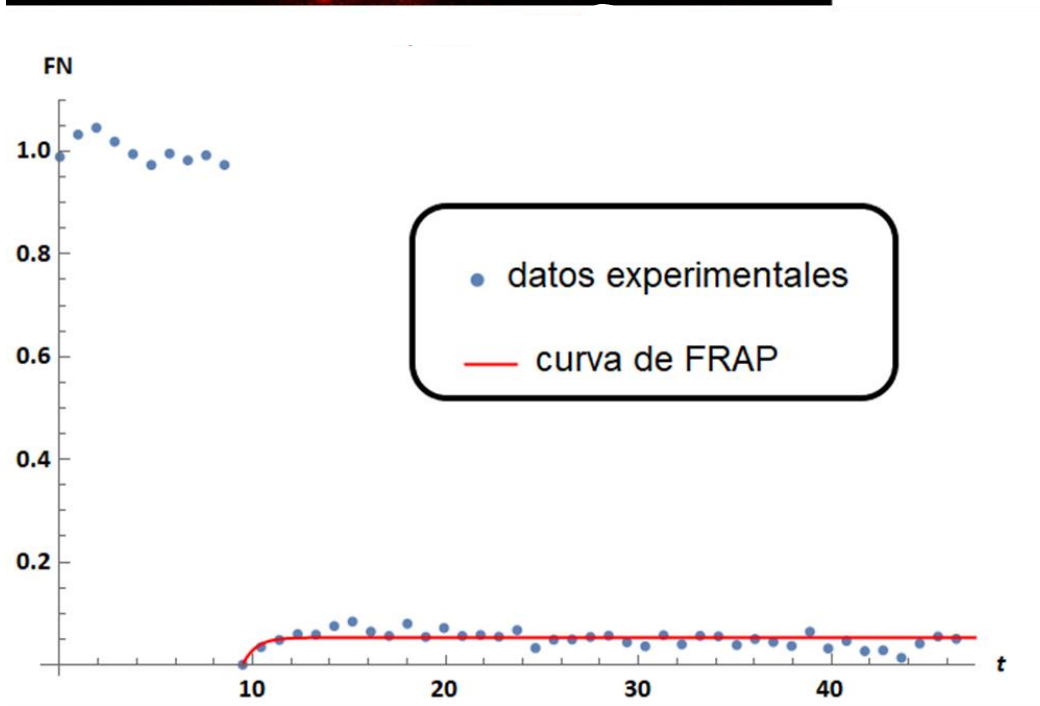
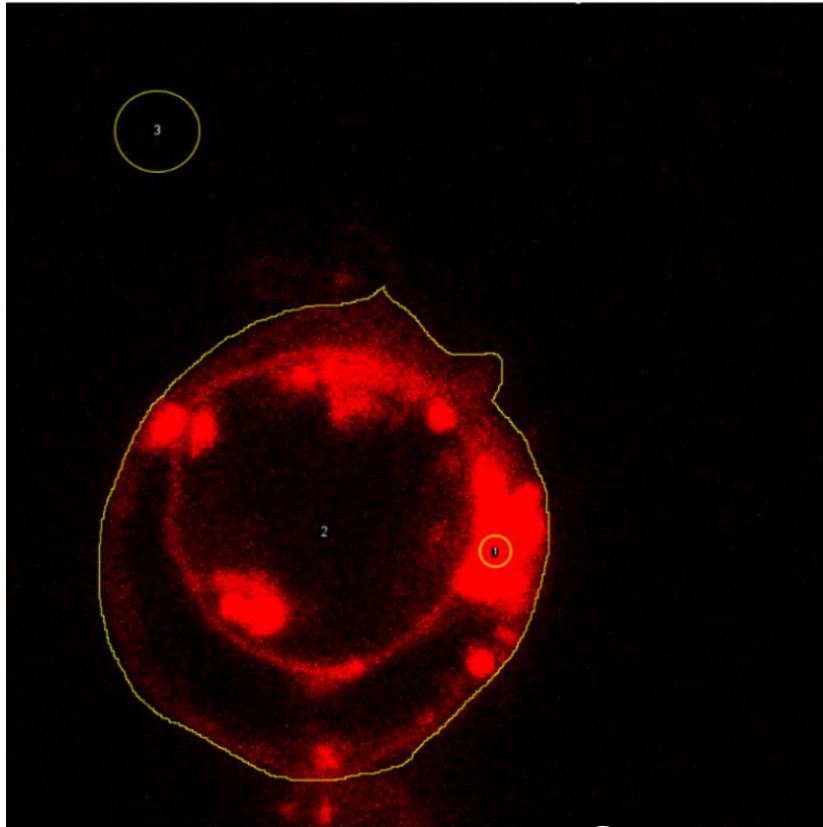


Figura 34 FRAP-HEK-08-01; teniendo un  $R^2 = 0.25194$  , FM=5.1% fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 0.49$  segundos

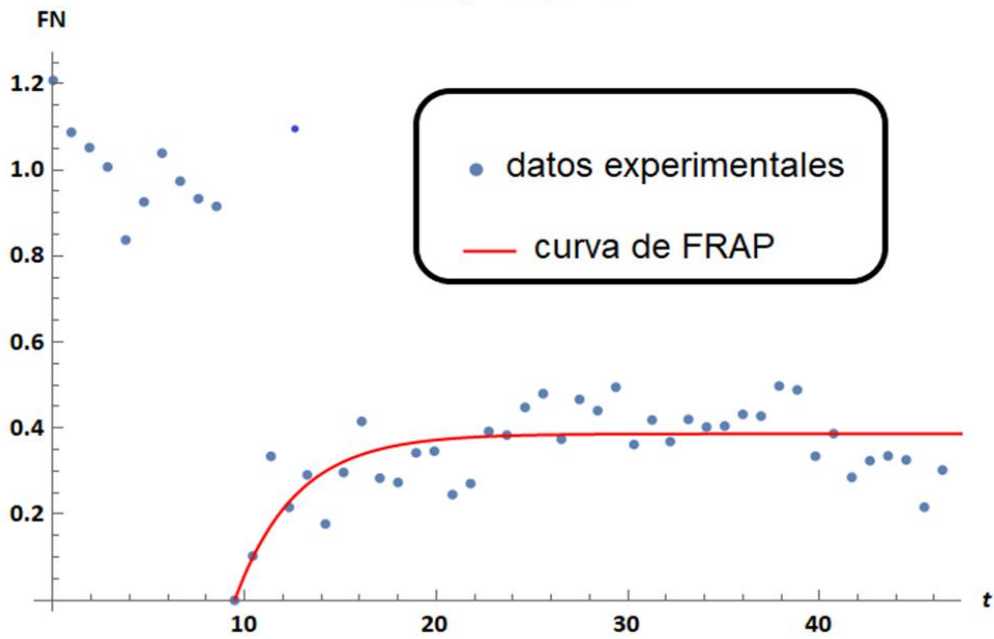
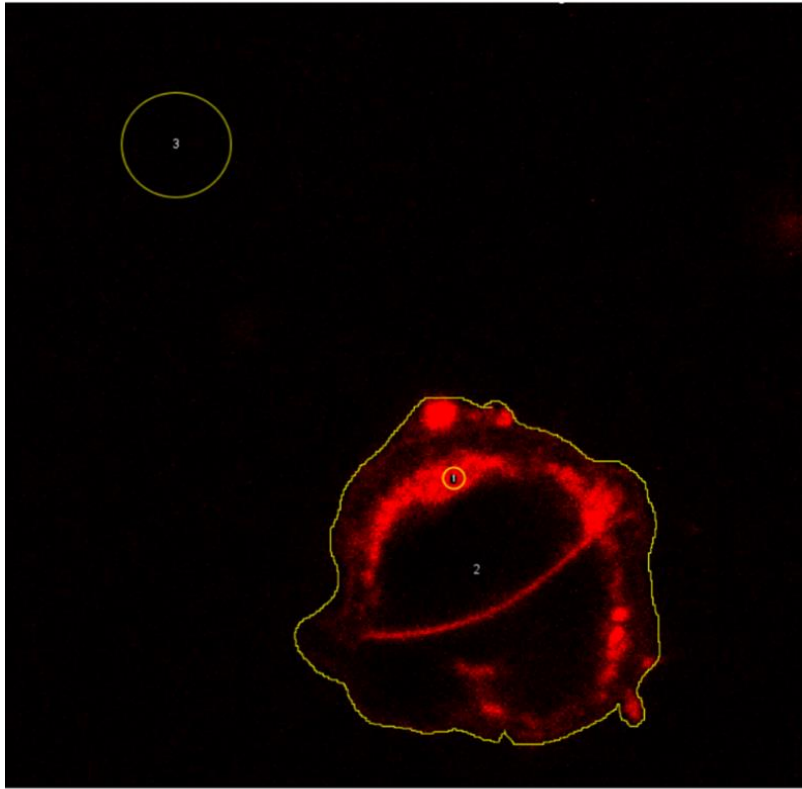


Figura 35 FRAP-HEK-08-02; teniendo un  $R^2 = 0.51432$ , FM=38.2 % fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 2.27$  segundos

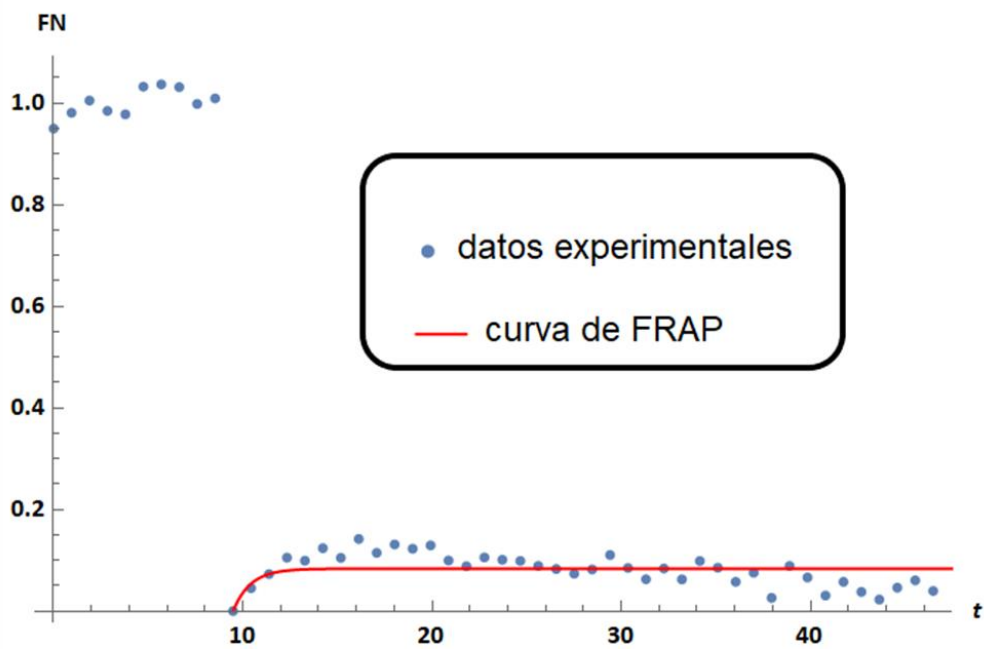
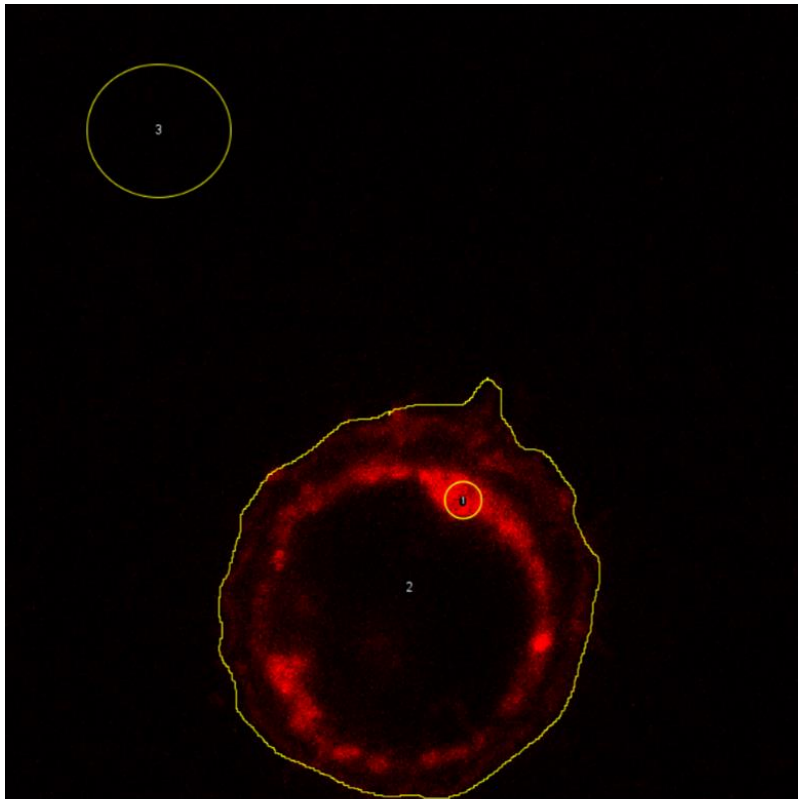


Figura 36 **FRAP-HEK-09-1; teniendo un  $R^2 = 0.18576$  , FM=8.3 % fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 0.58$  segundos**

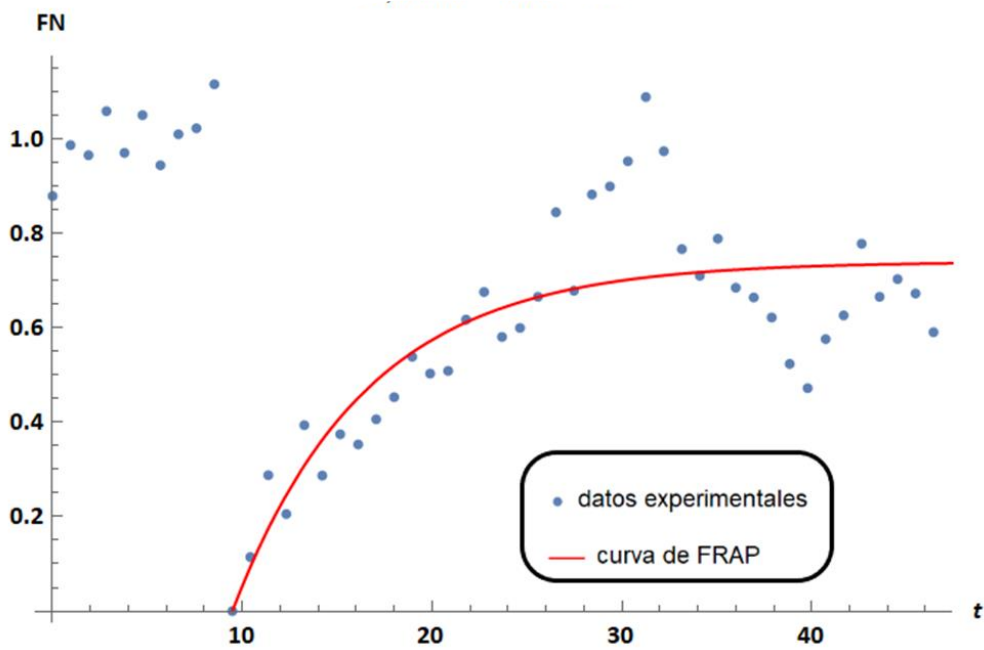
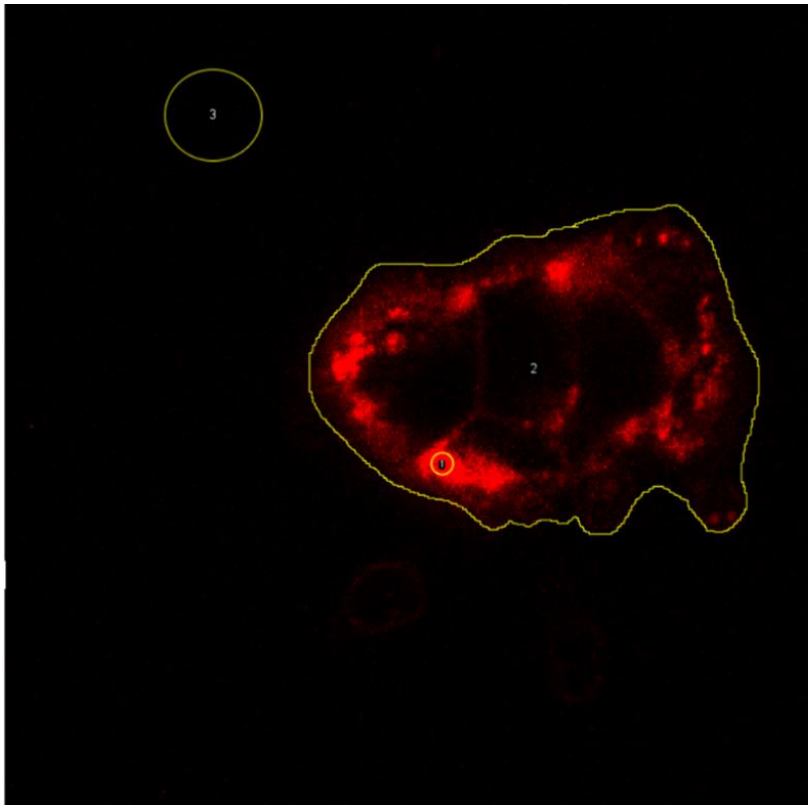


Figura 37 **FRAP-HEK-10-1; teniendo un  $R^2 = 0.68633$  , FM=73.4% fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 4.70$  segundos**

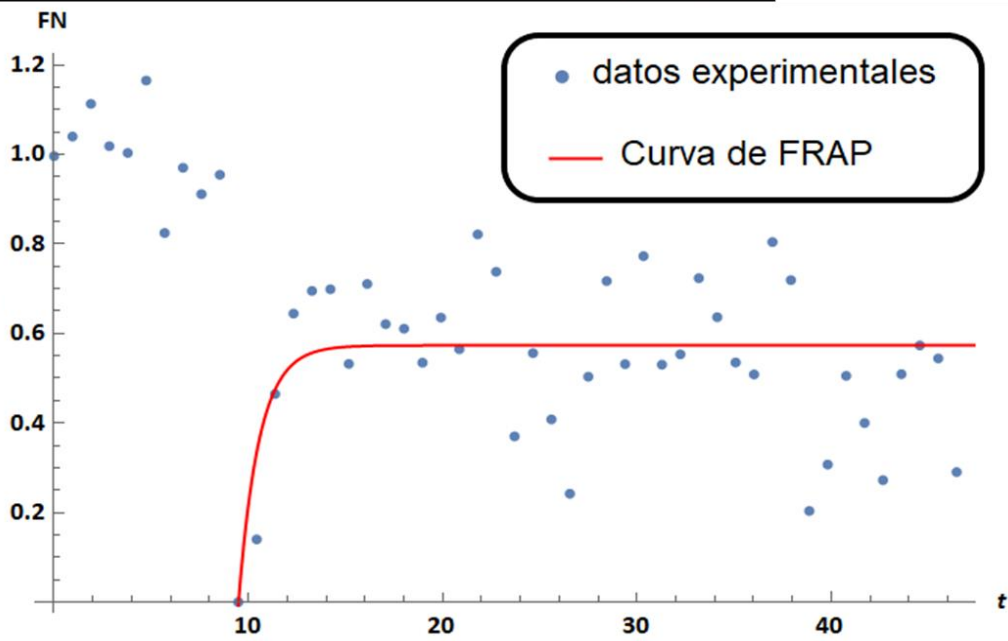
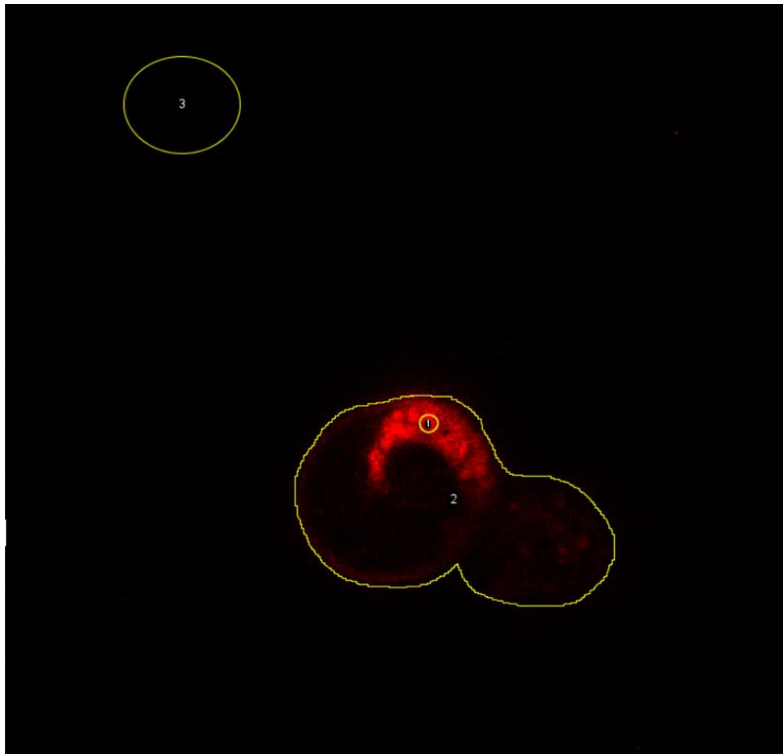


Figura 38

FRAP-HEK-11-1; teniendo un  $R^2 = 0.29871$  , FM=55.4% fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 0.78$  segundos

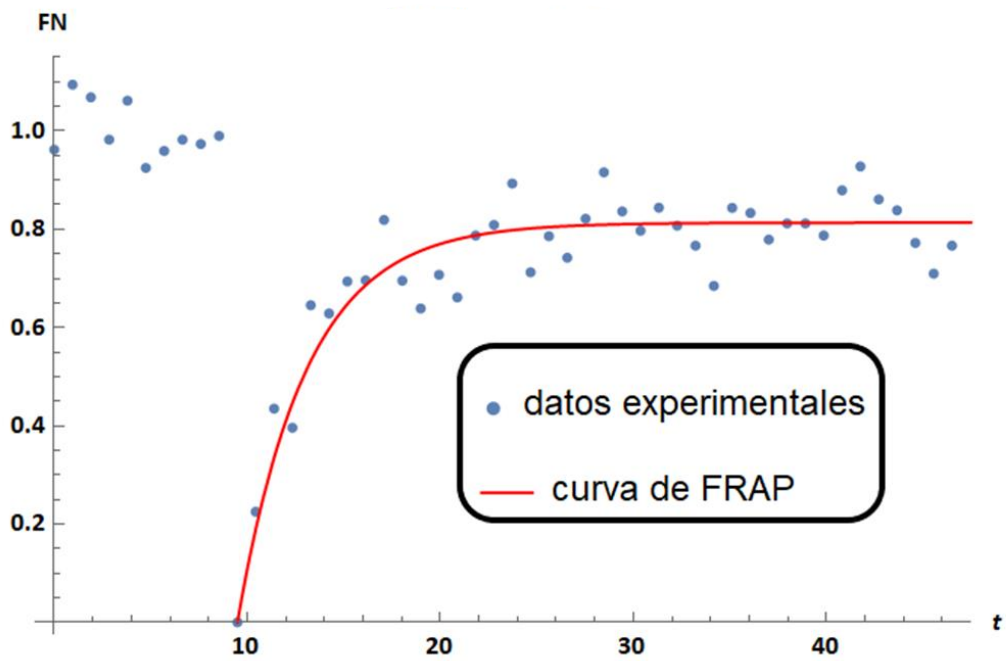
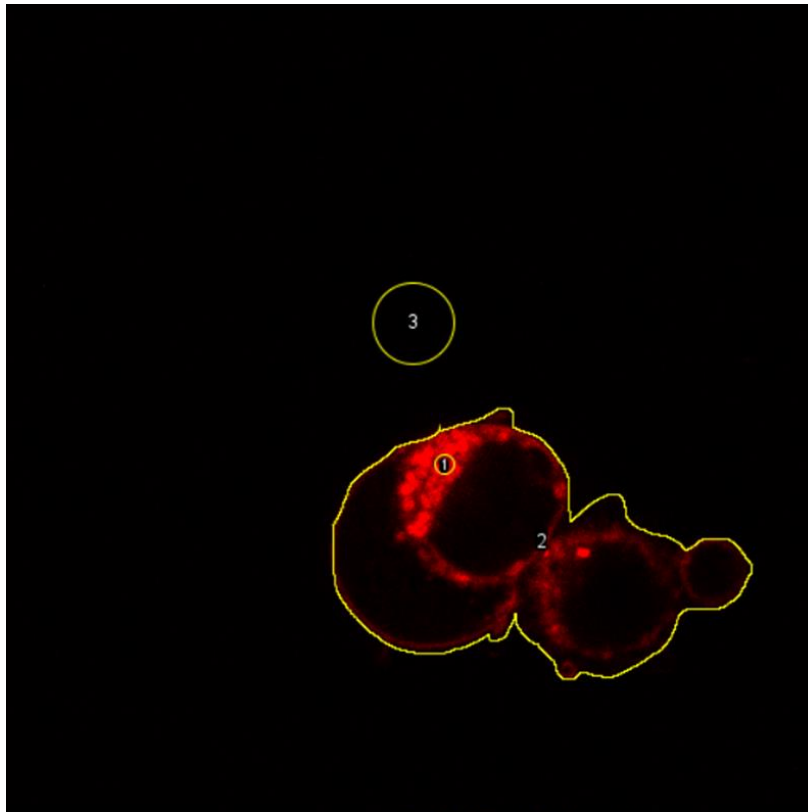


Figura 39 FRAP-HEK-11-2; teniendo un  $R^2 = 0.87746$  , FM=80.2 % fluoróforos FM4-64 incorporados al interior de la ROI y  $t_{\frac{1}{2}} = 2.15$  segundos