

VISUALIZACIÓN MOLECULAR DE PROCESOS CELULARES

Hernán E. Grecco

Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires e
IFIBA (CONICET) Ciudad Universitaria, 1428-Buenos Aires, Argentina
E-mail: hgrecco@df.uba.ar

Resumen

La función celular emerge de la acción conjunta de moléculas nanométricas. Su interacción y movilidad forman patrones que se expanden por micrones a través de toda la célula. A su vez, estos patrones modulan las interacciones que los crearon cerrando un ciclo que cruza escalas espaciales y temporales. Entender cómo emerge la función celular de esta relación causal simultánea, requiere cuantificar fenómenos celulares con resolución molecular. En este trabajo de revisión mostraremos cómo los avances recientes en microscopía de fluorescencia permiten cuantificar la localización, movilidad e interacción de proteínas; y de esta forma la dinámica espacio-temporal de procesos celulares.

Palabras clave: microscopía; biología celular; señalización celular; movilidad molecular; interacciones

Abstract

Molecular visualization of cellular processes. Cellular function emerges from the complex interaction of nanometer sized molecules. Their mobility and interaction create patterns that span over microns throughout the whole cell. Those patterns, in turn, regulate the molecular interactions bridging time and length scales. Understanding such simultaneous bidirectional causation requires quantifying the spatio-temporal progression of cellular processes with molecular resolution. In this review article we will show how recent advances in fluorescence microscopy enable the quantification of protein localization, mobility and interaction; and in this way the spatio-temporal dynamics of cellular processes.

Key words: microscopy; cell biology; signaling; molecular mobility; interactions

Introducción

Medio siglo de biología molecular nos ha brindado un conocimiento de los componentes bioquímicos que forman los seres vivos. Sin embargo, y a pesar de las predicciones iniciales, aún estamos lejos de lograr un entendimiento profundo acerca como esos componentes dan lugar funciones de orden superior [1]. Efectivamente, ha quedado claro que el catálogo de los componentes genómicos de una célula no es suficiente para predecir su dinámica. La respuesta celular emerge principalmente de las múltiples interacciones entre sus componentes [2].

La célula se trata pues de una verdadera “ecología de moléculas” y su estudio posee algunas de las mismas dificultades [3]. Por ejemplo, **cada sistema es único** y su estado actual es determinado por una serie específica de eventos dificultando la preparación de otro sistema idéntico. Otra similitud es la **observabilidad parcial de sus componentes** que dificulta la determinación de los mecanismos y la estimación de sus parámetros. Finalmente la

complejidad de la célula evidenciada por la naturaleza combinatoria de las **interacciones entre sus componentes**.

Estas interacciones no son estáticas ni uniformes, sino que están moduladas temporal y espacialmente. Una de las formas en que las interacciones son moduladas es a través de la compartimentalización cuyo ejemplo más evidente es la célula misma. La membrana plasmática confina las reacciones bioquímicas en su interior protegiéndolas de los efectos entrópicos de la difusión [4]. Adicionalmente facilita ciertas reacciones bioquímicas al proveer una superficie donde la concentración efectiva de reactivos es mayor [5]. Este esquema se repite en otras escalas espaciales, por ejemplo subcelularmente en eucariotas con el núcleo, el retículo endoplasmático, los ribosomas y otras organelas. Compartimentalizar transforma el espacio en una nueva dimensión de cómputo, aumentando la capacidad del organismo para procesar información en paralelo [6].

Toda esta complejidad brinda al sistema la riqueza de sus respuestas, pero también interpone una dificultad para su estudio tanto teórico como experimental. No se trata sólo de estudiar un sistema de múltiples componentes interactuando (una tarea difícil de por sí), sino que además estos sistemas poseen una regulación espaciotemporal que es determinante para entender su funcionamiento [7].

En este trabajo de revisión mostraremos cómo los avances recientes en microscopía permiten cuantificar la localización, movilidad e interacción de proteínas; y de esta forma la dinámica espacio-temporal de procesos celulares.

Determinando la localización de proteínas

Por su capacidad para resolver estructuras por debajo de la resolución del ojo humano, la microscopía óptica ha sido una herramienta fundamental para la biología celular desde finales del siglo XVII cuando **Antonie van Leeuwenhoek** observó por primera vez organismos unicelulares. En esa misma época, **Robert Hook** acuñó la palabra célula para describir los compartimientos en plantas que le recordaban a las celdas en las que dormían los monjes. Hacia finales del siglo XIX la microscopía toma un nuevo impulso con la convergencia de distintas disciplinas. Entre otros, contribuyen **Ernst Abbe** al demostrar que el límite de resolución de un microscopio se relaciona con la inversa de la apertura numérica. **Otto Schott** desarrolla nuevos tipos de vidrio como el borosilicato que por su bajo coeficiente de dilatación permitió generar elementos ópticos más estables y que al combinar varios tipos de vidrio compensen aberraciones ópticas. **August Köhler** desarrolla el mecanismo de iluminación que lleva su nombre y permite una iluminación uniforme en intensidad y en frecuencias espaciales. Muchos de estos desarrollos se realizaron vinculados con **Carl Zeiss**, un óptico y emprendedor que fundó la empresa que lleva su nombre.

En la segunda mitad del siglo XX la microscopía dejó de ser una herramienta meramente cualitativa para tornarse cuantitativa, permitiendo medir con especificidad la distribución espacial y dinámica de varias moléculas de interés como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Entre los descubrimientos que transformaron la microscopía óptica moderna, los más significativos fueron sin duda el descubrimiento de **la proteína fluorescente verde** y la invención del **microscopio confocal**.

La proteína fluorescente verde (GFP del inglés *Green Fluorescent Protein*) obtenida de la medusa *Aequorea victoria* fue la primera de muchas proteínas fluorescentes (FP) cuyos genes fueron aislados y secuenciados [8,9] para su posterior utilización como marcadores y reporteros [10]. La mayoría de las FP tienen un peso molecular cercano a 27 KDa y constan de

un barril de cadenas betas en el centro del cual se encuentran hélices alfas que contienen un cromóforo unido covalentemente. El cromóforo absorbe fotones de una longitud de onda (ej. Cyan ~480 nm) y emite a una longitud de onda mayor (ej. Verde ~ 510 nm). El barril excluye las moléculas de solvente protegiendo al cromóforo de ser desactivado (*quenching*) por moléculas de agua. Para estudiar una proteína de interés, puede crearse una versión fluorescente de la misma mediante la **fusión génica con una FP**. Con esta nueva proteína, usualmente llamada **quimera** en referencia al monstruo mitológico compuesto por partes de distintos animales, puede monitorearse su localización y dinámica en célula vivas. A diferencia de otras técnicas basadas en afinidad, la fusión génica garantiza la especificidad del marcado. Sin embargo deben realizarse los controles adecuados ya que la funcionalidad de la proteína de interés puede verse afectada.

Mientras que el descubrimiento y utilización como herramienta de las FP produjo una mejora en el contraste de la imagen, la microscopía confocal hizo lo propio con la resolución [11,12]. Por difracción, un microscopio es un filtro pasa bajo en frecuencias espaciales, que reconstruye una fuente puntual en la muestra como una imagen borrosa en el detector. Las dimensiones de esta imagen llamada función de dispersión del punto (PSF por sus siglas en inglés de *Point Spread Function*) son del orden de la longitud de onda de la luz y para un microscopio convencional puede alcanzar un mínimo cercano a los 250 nm de diámetro en la dirección lateral y varios micrones en la dirección axial (colineal a la propagación del haz). Esto es lo que imposibilita la observación de estructuras sub-micrométricas ya que las imágenes de dos puntos vecinos (más cercanos entre sí que la longitud de onda) se fusionan en uno solo (**Fig. 1a**). **La microscopía confocal** utiliza una apertura (*pinhole*) colocada en el plano conjugado de la muestra para rechazar la luz fuera de foco, llevando la resolución axial por debajo del micrómetro. Esto brinda **la capacidad de realizar un seccionamiento óptico de la célula**.

Si bien la microscopía confocal logra reducir el volumen de observación por debajo de 1 μm^3 (1 fL), sus dimensiones son mucho mayores que el tamaño típico de una proteína típica (80 KDa o equivalentemente 10-7 fL para una proteína globular). Esto tiene consecuencias importantes sobre el estudio de interacciones ya que dos proteínas pueden colocalizar (aparecer juntas en una imagen) y sin embargo estar lejos en términos moleculares. En otras palabras, es importante notar que **dos proteínas colocalizan si están interactuando, pero lo opuesto no es necesariamente cierto** ya que depende del volumen de observación [13].

En la última década han tomado impulso diversas técnicas que permiten resolver por debajo del límite de difracción de Abbe llegando rutinariamente a 20 nm. A grandes rasgos, pueden agruparse en dos categorías. En primer lugar se encuentran aquellas **disminuyen el tamaño de la PSF** mediante algún proceso no lineal o de *desexcitación* de la muestra. Por ejemplo, la microscopía de barrido por láser STED (del inglés *STimulated Emission Depletion microscopy*) utiliza un haz infrarrojo con forma de anillo co-lineal al haz de excitación de fluorescencia [14]. Por emisión estimulada, este haz fuerza a las moléculas a caer del estado excitado. De esta forma previene la emisión fluorescente en la periferia resultando en una PSF efectiva de menor tamaño (**Fig. 1b**). Recientemente, se ha utilizado STED para visualizar simultáneamente múltiples proteínas sinápticas en secciones de cerebro de rata y se ha encontrado evidencia que existen diferencias tanto moleculares como estructurales en las vesículas que operan en los nervios presinápticos [15]. También se ha utilizado STED para observar la corteza cerebral de un ratón vivo con una resolución menor que 70 nm [16].

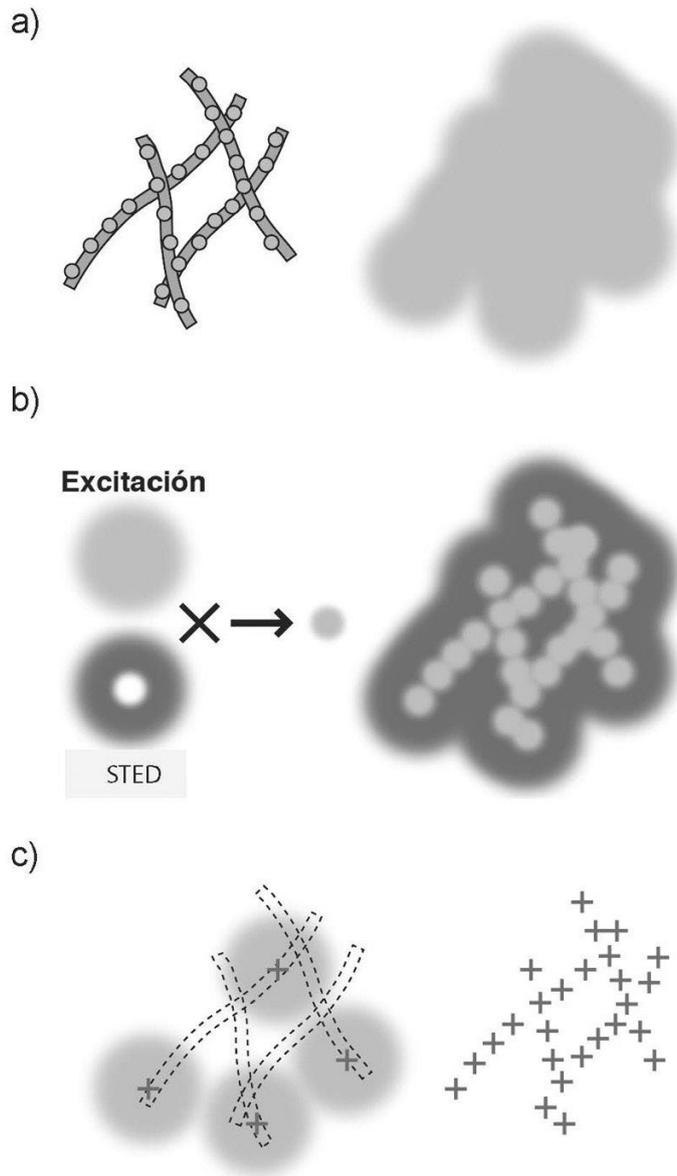


Fig. 1. Comparación de métodos de superresolución. a) En microscopía convencional, cada molécula fluorescente (puntos) aparece en la imagen como un punto más grande por causa de la difracción. No se puede resolver la estructura original. b) En STED, co-lineal al haz de excitación se barre un anillo infrarrojo que fuerza el decaimiento por emisión estimulada. De esta forma se restringe la fluorescencia al centro obteniendo una PSF más fina. c) En los métodos de localización de moléculas individuales se reconstruye la imagen final de una secuencia de capturas donde en cada una de ellas se observa un número pequeño de moléculas (cruces) de forma tal que sus PSF (puntos) estén bien separadas. *Adaptado con permiso de [34]*

En un segundo grupo de técnicas se encuentran aquellas que **localizan fluoróforos individuales** con una precisión que mejora la resolución del microscopio como la inversa de la raíz cuadrada del número de fotones detectados. Por ejemplo, un fluoróforo del que se obtienen 100 fotones puede localizarse con una incerteza de ~ 25 nm. Es importante remarcar que **localizar no es resolver**. Lo primero se refiere a determinar las coordenadas espaciales de una molécula, mientras que lo segundo es la capacidad para distinguir dos moléculas muy cercanas. Estas técnicas resuelven moléculas cercanas mediante la captura de múltiples imágenes. En cada una se realiza una excitación esparza de los fluoróforos y por lo tanto la probabilidad de observar dos cercanos es muy baja.

Las variantes de esta familia difieren en cómo se realiza la excitación esparza (**Fig. 1c**). En PALM (del inglés *Photoactivated localization microscopy* [17]) se utilizan proteínas fluorescente que son activadas mediante un pulso de luz UV. Se activa con pulso calibrado para excitar solo unas pocas moléculas en el campo visual y luego se captura una imagen hasta que se fotodestruyen las moléculas activas. Este proceso se repite hasta que todos los fluoróforos hayan sido activados y observados. Utilizando esta técnica se ha podido cuantificar la distribución interna de proteínas en estructuras submicrométricas como las adhesiones focales [18]. Por otro lado, en STORM (del inglés *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) se utiliza un marcado con sondas orgánicas cuyo parpadeo (*photoblinking*) se utiliza para distinguir moléculas vecinas [19].

Determinando la movilidad e interacción de proteínas

A pesar de los notables y continuos avances de las técnicas de super-resolución, la determinación de interacciones moleculares, cambios conformacionales y dinámicas rápidas sigue siendo difícil mediante estas técnicas. Por este motivo, se han desarrollado un conjunto de técnicas usualmente denominadas como “**funcionales**” que cuantifican directamente estos observables. El ejemplo más común y uno de los primeros en desarrollarse es FRAP (del inglés *Fluorescence Recovery After Photobleaching*). En esta técnica se fotodestruyen las proteínas fluorescentes en una región de la célula y luego se monitorea la recuperación de la fluorescencia causada por el intercambio con las regiones circundantes [20]. De esta forma pueden inferirse los mecanismos moleculares que controlan la movilidad de las proteínas observadas así como sus escalas temporales. En algunos casos, la fluorescencia no se recupera completamente indicando que existe un fracción de proteína inmovilizada probablemente ancladas directa o indirectamente a estructuras celulares. Existen otras técnicas similares como por ejemplo FLIP (del inglés *Fluorescence Loss In Photobleaching*) donde se fotodestruye repetidamente una región de la células y se monitorea el cambio en la regiones vecinas. Esta técnica provee información acerca de la dinámica en la célula como un todo.

Estos métodos de fácil implementación permiten determinar directamente la movilidad de proteínas sin embargo hay algunas consideraciones a tener en cuenta al inferir parámetros cuantitativos tales como coeficientes de difusión. En primer lugar, es difícil monitorear dinámicas muy rápidas por el tiempo que se tarda en realizar la fotodestrucción. También es complejo cuantificar con precisión dinámicas lentas ya que la síntesis proteica debe ser tenida en cuenta. Más aún, el ajuste de los datos asume un modelo geométrico de la región de interés así como de los mecanismos de movilidad y los valores obtenidos pueden ser fácilmente mal interpretados si los modelos subyacentes son incorrectos [21].

Utilizando proteínas fotoactivables como las mencionadas anteriormente o fotoconvertibles (que cambian de color al ser iluminadas con luz UV) es posible realizar los experimentos de FRAP/FLIP a la inversa: en lugar de monitorear la pérdida de fluoróforos es posible seguir la trayectoria de las moléculas fotoactivadas. Mediante esta técnica (tipo *pulse and chase*) se determinó que durante el desarrollo embrionario de la mosca de la fruta existe una compartimentalización previa a la celularización [22].

Las técnicas mencionadas anteriormente registran la dinámica del *ensemble* de moléculas promediando las fluctuaciones. En un sistema ergódico, la observación en una región del espacio limitada de un número suficientemente grande de eventos es equivalente a observar la distribución estadística de todos los eventos posibles del *ensemble*. **Las fluctuaciones contienen información de los mecanismos fisicoquímicos subyacentes.** Este principio es utilizado en FCS (del inglés *Fluorescence Correlation Spectroscopy*) para

determinar, entre otras propiedades, concentraciones absolutas y coeficientes de difusión [23]. En esta técnica de molécula única, se cuantifica la fluorescencia en función del tiempo en el volumen confocal situado en una región de interés de la célula. A diferencia de otras técnicas de microscopía de fluorescencia, la relación señal ruido no está dada por la intensidad total sino por la amplitud de las fluctuaciones. Por esto es fundamental maximizar el brillo por molécula y reducir su número en el volumen observado de forma tal que el ingreso o egreso de una de ellas produzca una variación significativa de la intensidad [24]. Esto se logra trabajando con volúmenes ($< fL$) y concentraciones pequeñas (nanoMolar).

Las técnicas basadas en fluctuaciones también pueden utilizarse para detectar la interacción de proteínas ya sea de forma directa o indirecta (mediada por otra). En FCCS (del inglés *Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy*) cada proteína es marcada con un color diferente. Su interacción resultará en la co-difusión por el volumen confocal y por lo tanto una alta tasa de coincidencias entre ambos colores. Utilizando FCCS se determinó la fracción de cada uno de los complejos en la cascada de MAPK en levadura [25]. Esta variante no es efectiva para cuantificar la formación de homo-oligómeros por la dilución de la señal, pero pueden utilizarse variantes basadas en cuantificar el brillo molecular aparente ya que este depende del estado de agregación [26,27].

Es interesante remarcar un desarrollo reciente denominado pCF (del inglés *pair Correlation Function*) que combina FCS y el seguimiento de partículas individuales. Se basa en medir el tiempo que tarda una dada molécula en transitar de un punto a otro de la célula utilizando métodos de correlación y se utilizó para mostrar el movimiento dirigido de proteínas a través del poro nuclear [28].

Determinar si existe una interacción directa entre dos proteínas o un cambio conformacional requiere sensar distancias (o cambios en distancias) del orden de unos pocos nanómetros. En las técnicas basadas en transferencia de energía resonante de Förster (FRET, por sus siglas en inglés), **una molécula fluorescente** (llamada donante) **transfiere no radiativamente energía a otra** (llamada aceptor) **sólo cuando se encuentran a distancias más cercanas que el radio de Förster R_0** (típicamente < 5 nm para los fluoróforos usados en biología) [29]. Puede utilizarse como donante y aceptor sendas quimeras fluorescentes de las proteínas de interés obtenidas. Sólo cuando las proteínas de interés estén interactuando, se producirá una transferencia de energía que puede detectarse por la reducción en la emisión del donante o por el aumento en la emisión del aceptor (**Fig. 2a**). FRET no mejora la resolución del instrumento pero es capaz de sensar proximidad en escalas relevantes para las interacciones moleculares.

Si bien existen muchas formas de medir FRET en el microscopio una de la más robusta es a través del cambio en el tiempo de vida de fluorescencia donante y se denomina FLIM (del inglés *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) [13,30]. Efectivamente, la reducción en la eficiencia cuántica del donante es equivalente a una reducción en su tiempo de vida. Esta medición si bien es técnicamente más sofisticada, permite distinguir FRET de otros procesos (p.ej. reducción del número de moléculas por fotodestrucción) con similar efecto en la emisión de un *ensemble* de moléculas. Se ha utilizado para cuantificar la fracción fosforilada del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) con alta resolución espacial (**Fig. 2b**) [31]. También se ha utilizado para determinar la interacción N-RAS y PDE-Delta así como también la acción de una droga que rompe su interacción [32]. Esta técnica permite cuantificar con exactitud y precisión la fracción de proteína en complejo con otra (**Fig. 3b**) [33].

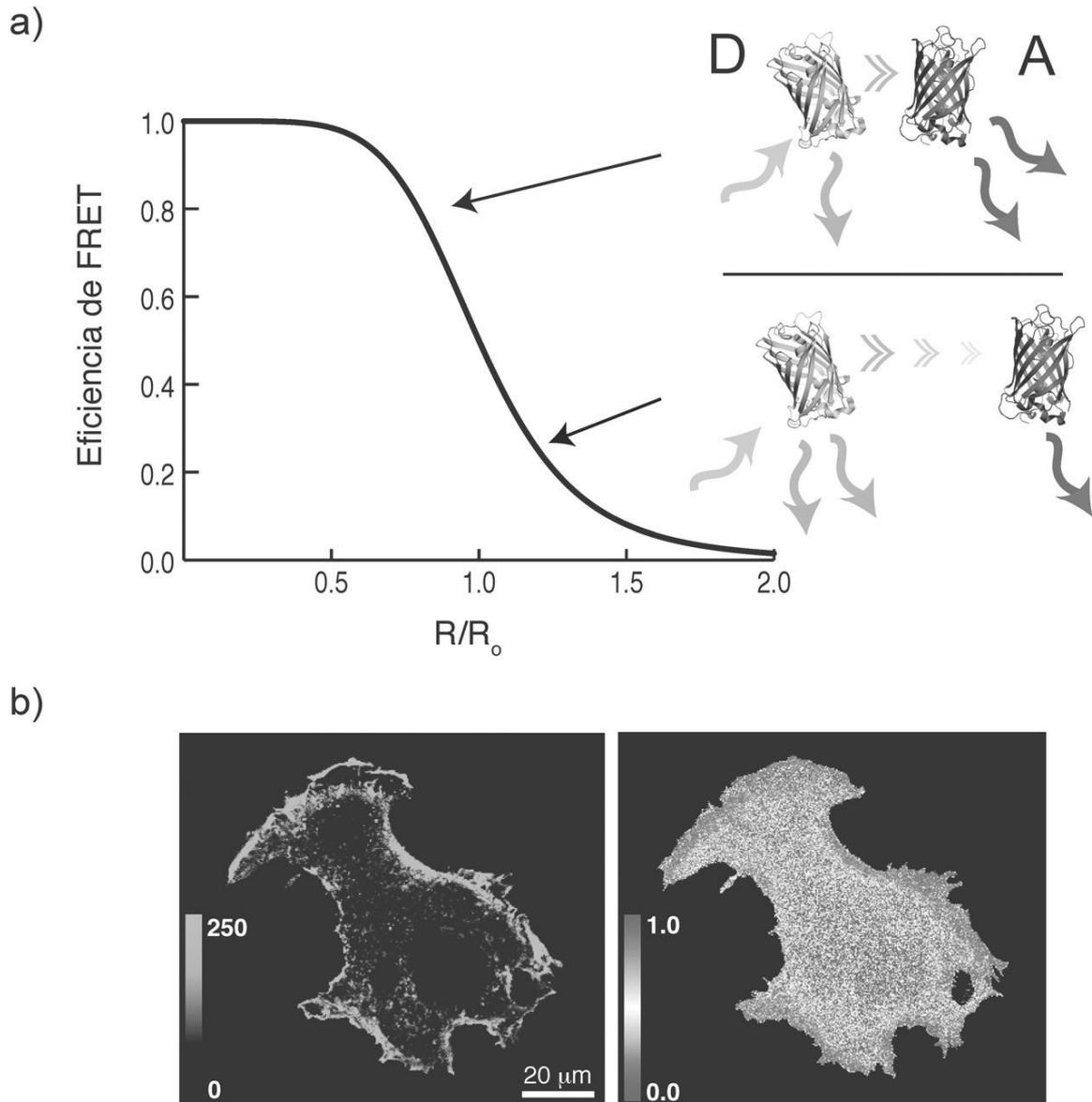


Fig. 2. Transferencia de Energía Resonante de Förster. a) La eficiencia de transferencia disminuye abruptamente en función de la distancia donante (D) – aceptor (A). La escala espacial está determinada por el radio de Förster (R_0) (típicamente ~ 5 nm para los fluoróforos usados en biología). Si la transferencia es eficiente, el donante cede parte de su energía, emite menos (flechas saliendo de D) y el aceptor emite más (flechas saliendo de A) b) Ejemplo de aplicación de FRET-FLIM a la determinación fracción de proteína fosforilada. Células MCF-7 son transfectadas con el receptor de crecimiento epidérmico unido a una variante de la proteína fluorescente amarilla (mCitrine). Luego de fijar y permeabilizar, se agrega un anticuerpo anti-fosfotirosina marcado con Cy3.5, un buen aceptor para mCitrine. (izq) Localización del receptor (der) Fracción de receptor fosforilado. *Adaptado con permiso de [30]*

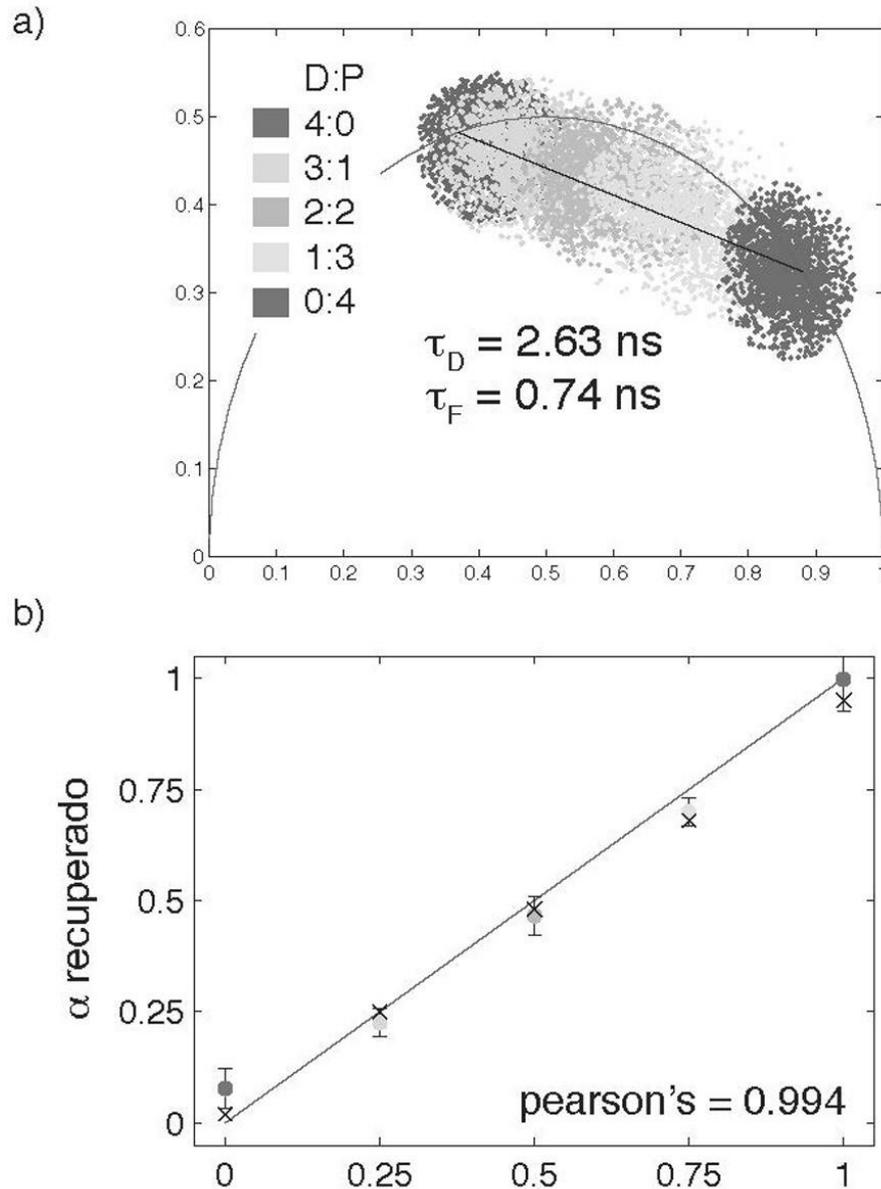


Fig. 3. Exactitud y precisión del ensayo de FRET-FLIM. Para validar el ensayo, se sintetizó *in vitro* un sustrato fosforilado y otro desfosforilado unidos a una variante de la proteína fluorescente amarilla (mCitrine). Se los mezcló en diferentes proporciones estequiométricas y se agregó anticuerpo anti-fosfotirosina marcado con Cy3.5, un buen aceptor para mCitrine. **a)** Análisis en el plano complejo de las diferentes muestras. De izquierda a derecha aumenta la fracción fosforilada en la muestra. Como se espera, las mezclas intermedias aparecen en la línea que une ambos puntos. La fracción de proteína fosforilada en cada medición puede obtenerse su la proyección sobre esta recta. **b)** Valores medios recuperados con FRET-FLIM (eje y) en función del valor esperado (eje x). Superpuesto se observa la recta de pendiente 1. El coeficiente de correlación cercano a la unidad muestra la calidad del método.

Adaptado con permiso de [32]

Conclusión

La célula es un organismo complejo, en constante movimiento. De forma similar a los atlas del cuerpo humano que con diferentes transparencias superponen los diversos sistemas que lo componen, cada técnica de microscopía revela distintos aspectos del funcionamiento celular. Entender la regulación requiere una batería de métodos capaz de obtener una versión integral (sistémica) del funcionamiento. En este trabajo hemos

mencionado sólo algunos de los métodos disponibles, pero la microscopía para biología es un campo en constante desarrollo motivado por medir lo que hoy no es medible.

Sin embargo, a pesar de los avances mencionados en este trabajo, el desafío sigue siendo (1) discernir cuáles de esas componentes e interacciones definen esencialmente al sistema, (2) desarrollar métodos para medirlos (3) generar modelos con capacidad predictiva a partir de esos datos. Avanzar en estos tres aspectos requiere un abordaje interdisciplinario más allá de la mera yuxtaposición de las soluciones de cada disciplina específica. Avanzar en el entendimiento de sistemas complejos requiere, como decía Rolando García, comenzar por una formulación conjunta del problema, realizando nuevas preguntas a viejos problemas (y a nuevos también) [34].

Referencias

- [1] D. Noble, *The music of life: Biology Beyond Genes*, Oxford University Press, Oxford, 2006.
- [2] J.D. Scott & T. Pawson. *Science* **326**, 1220 (2009).
- [3] S. Sarkar, Ecology, en *The Stanford Encyclopedia of Philosophy*, E. N. Zalta (Ed.), Standford, 2014.
- [4] H.E. Grecco, M. Schmick & P.I.H. Bastiaens. *Cell* **144**, 897 (2011).
- [5] G. Griffiths. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 1018 (2007).
- [6] A. Kinkhabwala & P.I.H. Bastiaens, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**, 31 (2010).
- [7] B.N. Kholodenko, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 165 (2006).
- [8] O. Shimomura, F. Johnson & Y. Saiga, *J. Cell Comp. Physiol.* **59**, 223 (1962).
- [9] D. Prasher, V. Eckenrode, W. Ward, F. Prendergast & M. Cormier, *Gene* **111**, 229 (1992).
- [10] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward & D. Prasher, *Science* **263**, 802 (1994).
- [11] M. Minsky, *Scanning* **10**, 128 (1988).
- [12] J.G. White & W. B. Amos, *Nature* **328**, 183 (1987).
- [13] H.E. Grecco & P.I.H. Bastiaens, en *Live Cell Imaging: A Laboratory Manual*, 2nd. Edit., Cap. 6, R. D. Goldman, J. R. Swedlow & D. L. Spector (Eds.), CSHL Press, Woodbury, 2010.
- [14] S.W. Hell & J. Wichmann, *Optics Lett.* **19**, 780 (1994).
- [15] C. Kempf, T. Staudt, P. Bingen, H. Horstmann, J. Engelhardt, S.W. Hell & T. Kuner, *PLoS One* **8**, 62893 (2013).
- [16] S. Berning, K.I. Willig, H. Steffens, P. Dibaj & S.W. Hell, *Science* **2012**, 335 (2013).
- [17] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz & H. F. Hess, *Science* **313**, 1642 (2006).
- [18] P. Kanchanawong, G. Shtengel, A.M. Pasapera, E.B. Ramko, M.W. Davidson, H.F. Hess & C.M. Waterman, *Nature* **468**, 580 (2010).
- [19] M. J. Rust, M. Bates & X. Zhuang, *Nature Meth.* **3**, 793 (2006).
- [20] D. Axelrod, D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson & W.W. Webb, *Biophys. J.* **16**, 1055 (1976).
- [21] F. Mueller, D. Mazza, T.J. Stasevich & J.G. McNally, *Curr. Op. in Cell Biol.* **22**, 403 (2010).
- [22] M. Mavrikakis, R. Rikhy & J. Lippincott-Schwartz, *Dev. Cell.* **16** (2009).
- [23] D. Madge, E.L. Elson & W.W. Web. *Biopolymers* **13**, 29 (1974).
- [24] S.A. Kim, K.G. Heinze & P. Schwill. *Nature. Meth.* **4**, 963 (2007).
- [25] C.I. Maeder, M.A. Hink, A. Kinkhabwala, R. Mayr, P.I.H. Bastiaens & M. Knop, *Nature Cell Biol.* **9**, 1319 (2007).
- [26] Y. Chen, J.D. Müller, P.T. So & E. Gratton, *Biophys. J.* **77**, 533 (1999).
- [27] J.D. Müller, *Biophys. J.* **86**, 3981 (2004).
- [28] F. Cardarelli, L. Lanzano & E. Gratton. *PNAS* **109**, 9863 (2012).

- [29] T. Förster, *Ann. Phys.* **2**, 55 (1948).
- [29] E.A. Jares-Erijman & T.M. Jovin. *Nature Biotechnol.* **21**, 1387 (2003).
- [30] H.E. Grecco, P. Roda-Navarro & P.J. Vermeer, *Optics Express* **17** (2009).
- [31] A. Chandra, H.E. Grecco, V. Pisupati, D. Perera, L. Cassidy, F. Skoulidi, S.A. Ismail, C. Hedberg, M. Hanzal-Bayer, A.R. Venkitaraman, A. Wittinghofer & P.I.H. Bastiaens, *Nature Cell Biol.* **14**, 148 (2011).
- [32] H.E. Grecco, P. Roda-Navarro, A. Girod, J. Hou, T. Frahm, D.C. Truxius, R. Pepperkok, A. Squire & P.I.H. Bastiaens, *Nature Meth* **7**, 467 (2010).
- [33] R. Garcia, *Sistemas Complejos*, Editorial Gedisa, Buenos Aires, 2007.
- [34] H.E. Grecco & P.J. Vermeer, *ChemPhysChem* **12**, 484 (2011).

Manuscrito recibido el 21 de abril de 2014.

Aceptado el 25 de abril de 2014.