







**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**IZTAPALAPA** DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E  
INGENIERÍA--POSGRADO EN INGENIERÍA  
BIOMÉDICA.

**EFFECTO DE LA DESNUTRICIÓN GRAVE EN EL  
METABOLISMO ENERGÉTICO DE LAS CÉLULAS  
MONONUCLEARES**

**T E S I S QUE PRESENTA**

**Miguel Angel Aceves Pacheco**

Para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Asesores

Dr. Rafael Godínez Fernández

Dr. Manuel Fernández Guasti

Jurado calificador:

Presidente: Dr. Rafael Godínez Fernández

Secretaria: Dra. Edith Cortés Barberena

Vocal: Dr. Francisco Javier Renero Carrillo

México, D.F. 2015



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00102

Matrícula: 2121800406

EFFECTO DE LA DESNUTRICION GRAVE EN EL METABOLISMO ENERGETICO DE LAS CELULAS MONONUCLEARES

En México, D.F., se presentaron a las 9:00 horas del día 7 del mes de diciembre del año 2015 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ  
DR. FRANCISCO JAVIER RENERO CARRILLO  
DRA. EDITH CORTES BARBERENA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: MIGUEL ANGEL ACEVES PACHECO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



MIGUEL ANGEL ACEVES PACHECO  
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE

DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ

VOCAL

DR. FRANCISCO JAVIER RENERO CARRILLO

SECRETARIA

DRA. EDITH CORTES BARBERENA



## Contenido

Resumen.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
1.0 NUTRICIÓN Y DESNUTRICIÓN.....	11
1.1 Nutrición .....	11
1.2 Desnutrición.....	12
1.2.1 Clasificación de la desnutrición.....	12
1.2.2 Patologías de la desnutrición.....	13
1.3.2 Patologías de la desnutrición en el sistema inmunológico.....	14
1.3.3 Patologías de la desnutrición en el metabolismo energético.....	16
2.0 SISTEMA INMUNOLÓGICO.....	17
2.1 Organización del sistema inmunológico .....	17
2.2 Sistema Inmunológico innato.....	19
2.3 Sistema inmunológico adquirido.....	22
2.3.1 Respuesta inmunitaria humoral.....	25
2.4 Inflamación.....	26
2.5 Inmunodeficiencia .....	26
3.0 METABOLISMO CELULAR .....	28
3.1 Glucólisis.....	28
3.2 Ciclo de Krebs.....	29
3.3 Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa .....	30
4.0 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	36
4.1 Interacción de la materia y la luz.....	36
4.2 Absorción .....	38
4.3 Procesos de desactivación o relajación.....	40
4.4 Luminiscencia y fluorescencia.....	41
4.4.1 Emisión de fluorescencia.....	42
4.4.2 Tiempo de vida.....	44
4.4.3 Eficiencia cuántica.....	45
4.4.4 Polarización.....	46
4.4.5 Extinción de fluorescencia (“quenching”).....	46
4.4.6 Extinción dinámica .....	47
4.4.7 Extinción estática.....	47

4.4.8 Efecto de filtro interno.....	48
4.4.9 Efecto del ambiente sobre la fluorescencia .....	49
4.4.10 Transferencia de energía de fluorescencia.....	49
4.4.11 Fluoróforos .....	50
4.4.12 Aplicación biomédica.....	51
5.0 MOLÉCULA FLUORESCENTE. ....	52
6.0 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS. ....	56
6.1 Hipótesis .....	56
6.2 Objetivo general.....	56
6.3 Objetivos particulares .....	56
7.0 ARREGLO EXPERIMENTAL.....	57
7.1 Láser Nd:YAG .....	57
7.2 Filtros de densidad neutra .....	62
7.3 Celda de cuarzo. ....	63
7.4 Arreglo 2f y fibra óptica.....	63
7.5 Espectrómetro .....	63
7.5.1 Fotodetectores CCD.....	64
7.5.2 Monocromador tipo Czerny-Turner.....	65
7.5.3 Integrador-promediador.....	66
7.6 Funcionamiento del sistema. ....	67
7.7 Obtención de la muestra. ....	75
7.7.1 Obtención de las células mononucleares. ....	77
7.8. Ajuste de curvas de espectros de fluorescencia del NADH del grupo de ratas desnutridas y bien nutridas.....	78
8.0 RESULTADOS .....	80
8.1 Resultados de los espectros de fluorescencia del NADH de células mononucleares de ratas con desnutrición y bien nutridas .....	80
8.2 Resultados de ajuste de curvas.....	92
9. DISCUSIÓN.....	100
9.1 Arreglo experimental .....	100
9.2 Obtención de espectros de NADH purificado, NADH de células mononucleares de ratas desnutridas y controles.....	101
9.3 Deconvolución de espectros promedio de grupo de ratas bien nutridas y desnutridas.....	103

9.4 Conclusiones.....	104
9.5 Trabajo a Futuro.....	107
10 ANEXO.....	108
10.1 Implementación del arreglo experimental.....	108
10.2 Primer arreglo experimental.....	108
10.2.1 Láseres de pigmento.....	108
10.2.2 Medio activo.....	109
10.2.3 Resonador óptico.....	109
10.2.4 Funcionamiento del láser de pigmento.....	110
10.2.5 Sistema de medición.....	112
10.2.5.1 Características del sistema de medición.....	112
10.2.5.2 Funcionamiento del primer arreglo experimental.....	114
10.2.5.3 Resultados del primer arreglo experimental.....	115
10.3 Segundo Arreglo experimental.....	118
10.4 Tercer Arreglo experimental.....	124
10.5 Cuarto arreglo experimental.....	134
11.0 REFERENCIAS.....	139



## **Resumen.**

La desnutrición grave es un problema que afecta a países subdesarrollados como México. Sectores como la población infantil y el adulto hospitalizado son víctimas de enfermedades oportunistas causadas por este problema. El sistema inmunitario puede verse afectado tanto en órganos (por ejemplo, timo y bazo) como en células (mononucleares: linfocitos y monocitos). Diversos estudios muestran que en algunos tejidos hay daño en la bioenergética celular debido a la desnutrición, sin embargo, se requieren estudios de desnutrición en células mononucleares. El presente trabajo aborda el metabolismo energético de este tipo celular a través de la implementación de una técnica de espectroscopía de fluorescencia por láser.

El NADH (nicotinamina adenina dinucleótido reducido) es una molécula fluorescente que juega un papel fundamental en la producción de ATP (Adenosin Trifosfato). Los resultados presentados de fluorescencia de NADH, muestran que células mononucleares de ratas con desnutrición grave, tienen emisión máxima de fluorescencia promedio, disminuida en un 42 % comparada al de ratas bien nutridas. También se muestra que el NADH ligado a proteínas en las ratas experimentales es 50% menor que el de ratas bien nutridas, por lo tanto, linfocitos y monocitos en ratas con desnutrición grave, presentan cambios en el metabolismo bioenergético que podrían explicar las diversas alteraciones que se han observado en las células del sistema inmunológico.

## **INTRODUCCIÓN.**

Los alimentos deben contener los elementos nutritivos necesarios para la dieta humana, donde los más importantes son las proteínas, que sirven para el mantenimiento de las funciones biológicas en los seres vivos. De no proporcionar estos elementos nutritivos, pueden causar desnutrición.

El hambre y la desnutrición son un problema global que ha tenido la humanidad desde sus comienzos, por ejemplo, la Europa medieval sufrió de 2000 hambrunas y en México se tiene un registro de más de doscientas en los 500 años transcurridos entre los siglos XV y XIX (Muñoz y Chávez, 2007) , y que continúa en la actualidad, especialmente en los países en vías de desarrollo, pese a sus políticas de tratar de disminuir el problema del hambre y de la desnutrición .

Se ha estimado que 178 millones de niños menores de cinco años en el mundo sufren de desnutrición crónica (baja talla de acuerdo a la edad). En el tercer mundo existe un gran índice de mortalidad en el sector infantil por este problema (Maíz y Velasco, 1994). Por otro lado, puede darse en pacientes hospitalizados una lenta recuperación del enfermo y un estadío prolongado en el hospital, donde el factor importante en este problema es la falta de requerimientos energético-proteínicos hacia el paciente (Espinoza, Zafra-Tanaka, Saavedra, Flores, Sanchez, 2008).

La desnutrición puede presentarse en sectores de la población tanto infantil (Cepeda et al., 2002) como el adulto mayor (Maiz y Velasco, 1994), que provoca daños en diferentes órganos y sistemas. Uno de los sistemas afectados, es el sistema inmunológico. Existe una disminución en órganos de este sistema, como bazo y timo, así también, se encuentra una disminución en el número de células inmunológicas (Cortés, González, Gómez y Ortiz, 2008)

Otro hallazgo acerca de las consecuencias de la desnutrición, es la afectación en el metabolismo bioenergético, ya que se presenta una disminución en la producción de ATP y una alteración en las proteínas mitocondriales, no obstante, estos estudios se han hecho en hepatocitos y miocitos, por lo que en este trabajo se aborda el estudio en células mononucleares, para dar una mayor explicación a los problemas que con lleva la desnutrición grave en el sistema inmunológico (Ferreira y Gil, 1984).

## 1.0 NUTRICIÓN Y DESNUTRICIÓN

### 1.1 Nutrición

El estudio de la nutrición ha cobrado importancia desde el siglo XX, se ha visto que en todas las edades una buena nutrición ayuda a contraer menos enfermedades encontrándose relacionado con el sistema inmunitario, que le permite al individuo gozar de una buena salud (Mayevsky y Rogatsky, 2007).

La nutrición según la OMS es el proceso a través del cual los organismos vivos toman y transforman en su interior sustancias sólidas y líquidas, que le son extrañas y que necesita para el mantenimiento de la vida, esto es, el funcionamiento de sus órganos, la producción de energía y el crecimiento, por lo que es importante para los seres vivos y en particular para el ser humano, tener una buena alimentación que provea los nutrientes esenciales (aquellos compuestos orgánicos o inorgánicos presentes en los alimentos que son utilizados por el cuerpo para sus funciones vitales).

Entre los nutrientes para la dieta de un ser humano tenemos a las vitaminas, minerales, carbohidratos, grasas y proteínas que aportan la energía necesaria para el cuerpo. Los investigadores han ideado una forma de medir esa energía en los alimentos y es a través de la caloría, esta se define como la cantidad necesaria para elevar la temperatura de un gramo de agua un grado centígrado, la forma más común de expresar las unidades es en calorías (Prentice, 1999).

En la siguiente tabla se encuentran la cantidad de calorías que aportan los 3 nutrientes:

Nutriente (1 gramo)	Cal
Grasas	9
Proteínas	4
Carbohidratos	4

Tabla 1.1 Cantidad de calorías que aportan los nutrientes (Prentice 199).

## 1.2 Desnutrición

Las proteínas son el material de construcción de los seres vivos, estos tienen una gran diversidad en la naturaleza, esta versatilidad es gracias a la combinación de los aminoácidos. Estas sustancias son esenciales para el hombre, donde su aportación puede venir de alimentos de origen animal o vegetal siendo el conjunto de estos productos alimenticios la mejor alternativa para la dieta del ser humano. Ahora bien, la deficiencia en la cantidad o calidad de aminoácidos puede llevar a problemas de desnutrición. La desnutrición se define por tanto como una ingesta incorrecta o deficiente de nutrientes indispensables para la vida.

### 1.2.1 Clasificación de la desnutrición

La desnutrición se clasifica en primaria y secundaria (Muñoz y Chávez, 2007); la primera es debido a una deficiencia en el aporte alimentario debido a distintos factores, sociales, familiares o por falta de recursos en cantidad o calidad. La segunda se debe a enfermedades que alteran el apetito, la función digestiva, como el cáncer, la diabetes avanzada, etc.

Existen sin embargo, otras clasificaciones sobre todo en desnutrición infantil, que son leve, moderada y grave, las cuales se pueden determinar a partir del peso del paciente (Muñoz y Chávez, 2007). La desnutrición que cursa con una disminución entre el 10 y 25 % del peso y de la talla, se diagnostica como *desnutrición leve*. Cuando dicha disminución es del 26 al 39 % se considera una *desnutrición moderada*. La *desnutrición grave* es diagnosticada cuando la disminución del peso y talla es mayor al 40 %. Por otro lado, se ha clasificado la desnutrición por insuficiencia calórica-proteínica y por micronutrientes, esta última no es común que llegue a ser muy grave y no obstante, es la que más importancia se ha dado a nivel nacional como internacional (Muñoz y Chávez, 2007).

Los diferentes grados de desnutrición se resumen en la siguiente tabla.

Tipos de desnutrición (subdivisión)	Porcentaje de bajo peso
Leve	10%
Moderada	25%
Grave	40%

Tabla 1.2. Tipos de desnutrición presentados son a partir del peso corporal de un organismo bien nutrido.

### 1.2.2 Patologías de la desnutrición

Se ha estimado que el mundo puede producir suficiente comida para proveer a una persona con más de 2700 calorías por día, lo que es una cantidad apropiada para una buena alimentación (Parra, Téllez y Briones, 2003). Por lo que un aporte menor de calorías tiene como resultado cierto tipo de patologías, sin embargo, esas calorías deben ser provistas por cada uno de los nutrientes como los carbohidratos, las grasas y las proteínas, siendo cada una de ellas necesarias, no sólo como aporte calórico, sino también como material importante en la construcción celular, como es el caso de las proteínas, que proveen de los aminoácidos que necesita el organismo para fabricar proteínas.

Tipo de deficiencia que presenta en la desnutrición (deficiencia calórico proteínica).	Fisiopatología
Desnutrición-Moderada	<p>Puede presentar desde el punto de vista clínico, un síndrome carencial múltiple, con deficiencia calórica, cuyos signos son los siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Falta de lustre en el pelo, color y grosor del mismo, además de que se torna escaso.</li> <li>2. Flacidez corporal (pérdida de tono muscular).</li> <li>3. Manchas en la piel, por infecciones de estafilococo y deficiencia en vitamina A.</li> <li>4. Edema periorbitario (inflamación alrededor de los ojos).</li> <li>5. Vientre globoso, debido a la pérdida de tono muscular).</li> <li>6. Alteración en la función de genes.(adaptaciones fisiológicas).</li> <li>7. Deterioro en la función inmunológica.</li> </ol>
Desnutrición grave	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Anemia, lesiones en los labios, boca y lengua.</li> <li>2. engrosamiento conjuntival y sequedad en la córnea.</li> <li>3. Diarrea (por infección o de tipo funcional).</li> <li>4. Raquitismo.</li> <li>5. Alteración en la función de genes.(adaptaciones fisiológicas).</li> <li>6. Deterioro en la función inmunológica.</li> </ol>

Tabla 1.3 Desnutrición moderada y grave y las patologías que causan (Muñoz y Chávez, 2007).



**Kwarshiorkor**



**Marasmo**

Figura 1.1. Se muestran las diferencias entre diferentes tipos de enfermedades debido a un déficit proteínico y calórico [C. Prudhon. Evaluación y tratamiento de la desnutrición en situaciones de emergencia: manual del tratamiento terapéutico de la desnutrición y planificación de un programa nutricional: Icaria editorial; 2002: Cap. 1].

### **1.3.2 Patologías de la desnutrición en el sistema inmunológico.**

Como se había mencionado el sector infantil se ve perjudicado por la desnutrición. Se han hecho estudios desde los años 80's sobre el efecto que tiene la desnutrición grave en el sistema inmunológico, observando afectaciones en los mecanismos de respuesta, como una menor actividad de la interleucina IL-1 producida por los macrófagos, principalmente, viéndose disminuida en niños con marasmo y Kwashiorkor, comparados a uno normal (Bhaskaram y B. Sivakumar, 1986).

El efecto de la desnutrición proteínica, según mencionan algunos autores puede causar disminución en órganos del sistema inmunológico, como es el caso del timo, bazo, amígdalas y nodos linfáticos, que con lleva a una disminución de

linfocitos T, además se considera que el tamaño del timo puede funcionar como un barómetro que indica la gravedad de éste problema (Prentice 1999).

En México se han hecho estudios sobre infecciones oportunistas, por ejemplo, la Cándida bucal encontrada en niños desnutridos de la sierra Tarahumara, de la periferia de la ciudad de México y con VIH. Estos grupos fueron comparados con niños sanos siendo alta la incidencia de cándida bucal en los niños con desnutrición grave y con VIH (Cepeda, Morales, Vargas, Garcia, Ríos, Ruidiaz, Figueroa, 2002). Por otro lado, en una comunidad indígena en Tezonteopan se hizo un estudio sobre nutrición a 40 niños durante 25 años, los cuales se encontraron con desnutrición moderada por insuficiencia calórico-proteínica (deficiencia en la lactación, como de alimentos posteriormente). Los niños sufrían de enfermedades continuas y de tiempos más prolongados e intensos de enfermedad, comparados a niños de la misma comunidad pero que fueron suministrados con suplementos alimenticios (Muñoz y Chávez, 2007).

Como se había mencionado, no solamente el sector infantil se ve afectado por la desnutrición, también lo son pacientes adultos que se encuentran hospitalizados, que padecen de un sistema inmunológico disminuido (Ramos y Valverde, 2005, Espinoza et al. 2008).

Se han utilizado modelos animales para observar los efectos de la desnutrición moderada o grave. Algunas investigaciones han utilizado ratas Wistar de 21 días de edad, induciendo una desnutrición por competencia, es decir una desnutrición a temprana edad que se debe a la poca disponibilidad de leche materna al ser grande la camada (E. Cortés, E. Cortés, H. González, J.L. Gómez Olivares y R. Ortiz, 2010).

Estudios sobre desnutrición muestran afectación y disminución de linfocitos CD4+ y CD8+, una alteración de las moléculas CD71 y CD25 durante la activación de linfocitos T [19]. En otros estudios con desnutrición hay una menor capacidad de los linfocitos asesinos para reconocer y destruir tejidos extraños, como también una actividad reducida de estos mismos. La desnutrición calórico-proteínica lleva a un incremento en la producción de citocinas por células TH2 y un aumento en los niveles de IgE e IgG1 en roedores (Cunningham y McNeeley, 2005).

### **1.3.3. Patologías de la desnutrición en el metabolismo energético.**

Otro nivel también afectado por la desnutrición grave es el metabólico, hallándose una baja en la síntesis de ATP, una disminución de los citocromos  $a + a_3$  de hasta un 22 %, además de una baja en la oxidación de NADH de un 40%. Todos esos estudios fueron hechos en mitocondrias de hígado de ratas macho con 35 días de vida y una dieta libre de proteínas comparadas a las controles (Ferreira y Gil, 1984).

En resumen la desnutrición calórica-proteínica tiene repercusiones en la bioenergética, que podrían robustecer más el problema de la pobre respuesta del sistema inmunológico ante un panorama infeccioso.

## **2.0 SISTEMA INMUNOLÓGICO**

La desnutrición grave puede producir una inmunodeficiencia como el SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), que puede observarse en el estudio llevado a cabo en niños mexicanos con SIDA y con desnutrición grave, encontrándose una alta prevalencia de enfermedades oportunistas como la Cándida bucal (Cepeda, Vargas, Ruz, Hernández, Ham y Salobreña, 2012).

Los órganos linfoides como vimos en el Capítulo 1, se ven afectados por la desnutrición, trayendo consecuencias a bazo, ganglios o timo (Stinnett, 1983). En resumen, la desnutrición grave afecta diferentes órganos y tejidos del sistema inmunológico generando una inmunodeficiencia. Por la importancia antes dicha, se revisará la organización del sistema inmunológico.

### **2.1 Organización del sistema inmunológico**

En los mamíferos podemos encontrar que hay células encargadas de servir de protección al cuerpo ante agentes patógenos (bacterias, hongos, etc.). Es por eso que la naturaleza ha diseñado un sistema especial que produce células para combatir al invasor, este es el sistema inmunológico. El sistema inmunológico, como se había mencionado está compuesto de diferentes órganos, que son lugares de producción y de maduración de células que combatirán al agente patógeno.

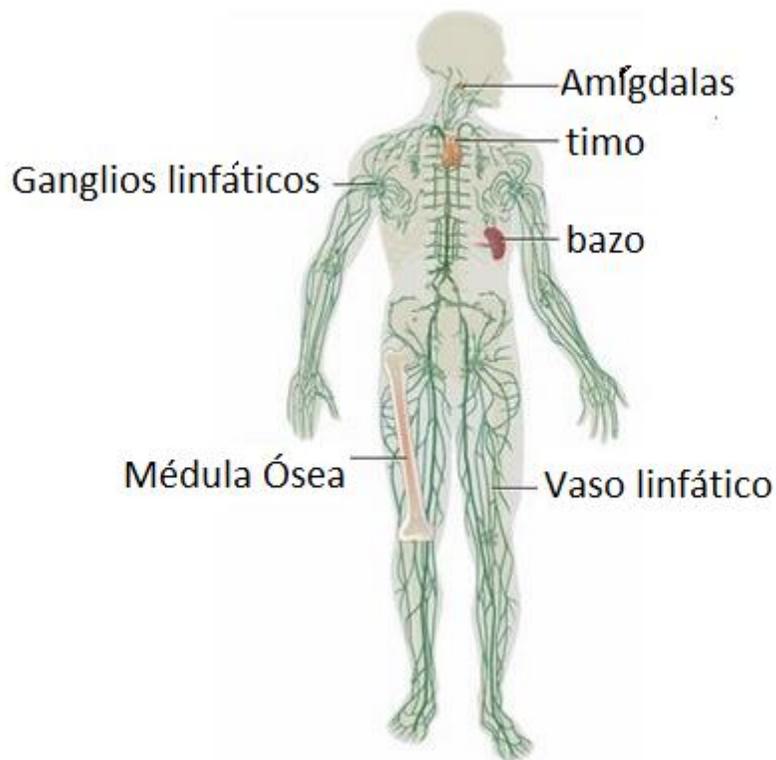


Figura 2.1. Diagrama de las diferentes regiones donde se encuentran los ganglios linfáticos, timo, bazo, médula ósea, etc., donde se producen o maduran las células del sistema inmunológico. [Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C., Mario Roseblatt S., Ulises Vergara C. Fundamentos de Inmunología básica y clínica. Editorial Universidad de Talca. (2009). Chile. Cap. 3,4,5,6,7,8].

Como se puede ver en la Figura 2.1, el organismo utiliza estos órganos linfoides y vías, para el transporte, producción y maduración de las células que componen al sistema inmunológico. Las células del sistema inmunológico, tienen su origen en la médula ósea, produciéndose las células precursoras, llamadas células madre hemotopoyéticas (Stites y Terr, 1993). A continuación se muestra en la siguiente figura, el diagrama de árbol, sobre el origen de cada célula del sistema inmunológico.

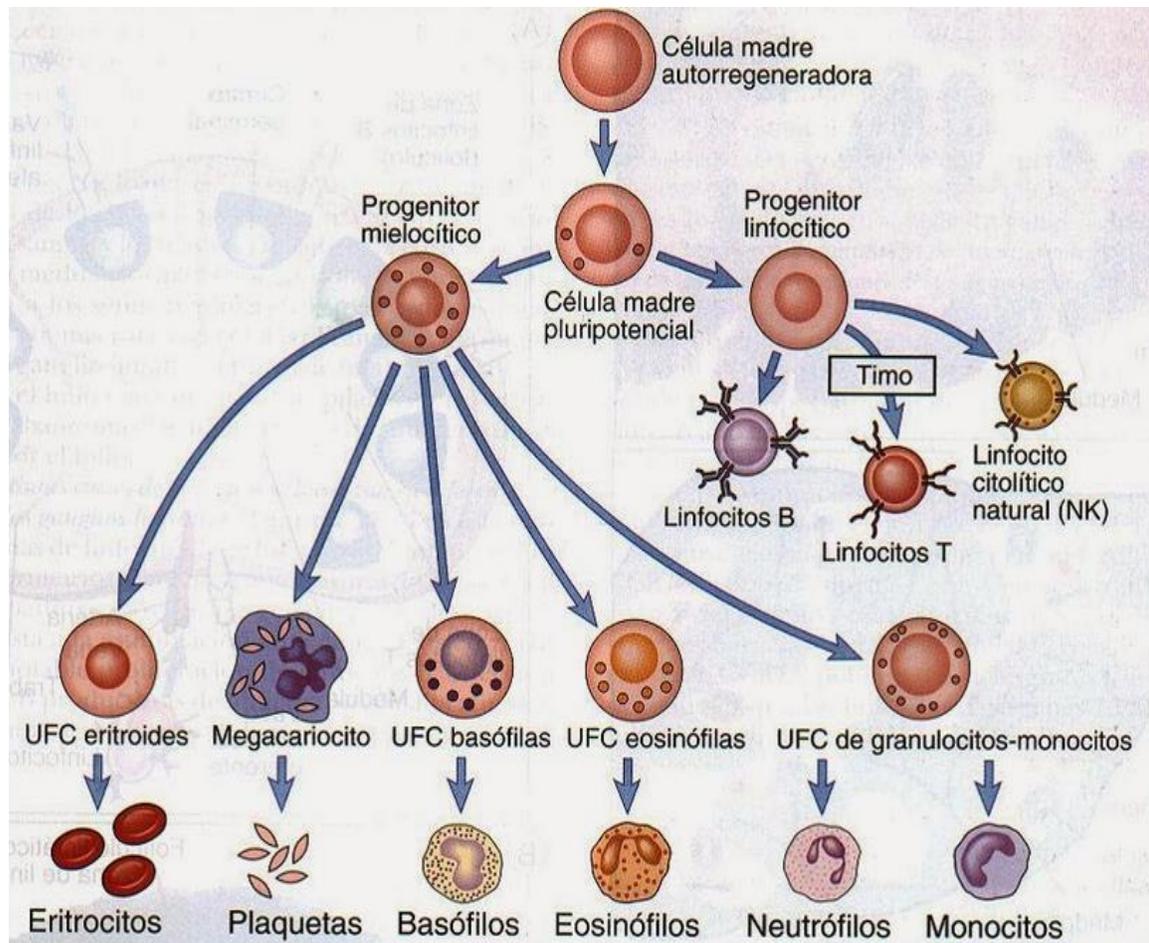


Figura 2.2 Diagrama de árbol del origen de cada una de las células del sistema inmunológico, donde a partir de una célula madre se producirá una célula pluripotencial dando origen a un progenitor mielocítico y linfocítico, después se producirán por procesos de diferenciación y maduración granulocitos y monocitos en el caso del progenitor mielocítico, y en el caso del progenitor linfocítico a linfocitos B y T. [Iván Palomo G., Arturo Ferreira V., Cecilia Sepúlveda C., Mario Roseblatt S., Ulises Vergara C. Fundamentos de Inmunología básica y clínica. Editorial Universidad de Talca. (2009). Chile. Cap. 3,4,5,6,7,8].

## 2.2 Sistema Inmunológico innato

Cuando un agente patógeno pasa la barrera como es la piel o epitelios que recubren al sistema digestivo o respiratorio y entra al organismo, se activa el sistema inmunológico innato y este actúa con rapidez para detener al agente invasor. En este caso las células que actúan son granulocitos, monoblastos y células dendríticas (como podemos ver en la Figura 2.2), estas se mantienen en vigilancia, gracias a unos receptores que tienen en la membrana que los ayudan a

reconocer glicoproteínas y lipo-polisacáridos bacterianos. Los granulocitos dan origen a un grupo muy numeroso que son los neutrófilos que son uno de los primeros migrantes hacia el sitio de la inflamación, también encontramos a los monoblastos que dan origen a los monocitos (estas son clasificadas dentro de las células mononucleares que son células con un solo núcleo). Los monocitos emigrarán a los tejidos formando macrófagos que se encargarán de fagocitar al agente patógeno del tejido que custodian.

El sistema inmunológico innato es modulado por hormonas hematopoyéticas que pueden aumentar el número de células inmunológicas como son la interleucina 3 que es producida por linfocitos y el factor de estimulación de granulocitos-macrófagos liberado por los linfocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos (Murray, et al. 2013; Devlin, 2004). Hay otras sustancias como las citocinas que son generadas por macrófagos en el sitio de infección, funcionando en algunos casos como alarma o proinflamatorias, encontrando a la interleucina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina 6 (IL-6), que producen una respuesta inflamatoria local. Otras citocinas como la interleucina 12 (IL-12) activan células NK y estimula macrófagos.

A continuación se muestra la respuesta que se produce en el sistema inmunológico innato debido a la entrada de un agente infeccioso:

- 1) Migración hacia los microbios (quimiotaxis). El movimiento se inicia cuando sus receptores quimiotácticos son ocupados por sustancias emitidas por el invasor (péptidos formilados) como son los productos de reacción del microbio con líquido extracelular (fragmento del complemento C5a) y productos liberados de otras células que participan en la defensa del huésped (proteínas quimioatrayentes). Estas sustancias tienen un receptor específico quimiotáctico, un ejemplo es el ácido hidroperoxieicosatetraenoico (HETE), que es un potente agente quimiotáctico para los neutrófilos que puede ayudar a generar sustancias que aumenten la permeabilidad vascular (Stites y Terr 1993; Barret, Baman, Boitano y Brooks, 2010).
- 2) Reconocimiento e ingestión de microbios (fagocitosis). Se reconoce al agente patógeno mediante receptores que detectan anticuerpos específicos que cubren al invasor, fragmentos del complemento que están ligados en forma covalente a la superficie del cuerpo extraño y porciones de oligosacáridos no presentes en el huésped. Esto desencadena que la membrana celular del macrófago se invagine para rodear al agente patógeno y formar una vacuola (fagosoma) (Stites y Terr 1993; Barret, et al., 2010).

- 3) Destrucción y digestión del microbio. El macrófago utiliza un mayor número de O<sub>2</sub> para producir ácido hipocloroso, peróxido de hidrógeno, superóxido, etc, siendo regulados cuidadosamente para evitar daño tisular. Estos son capaces de destruir la membrana celular del invasor. Los mecanismos microbicidas incluyen enzimas como la NADPH oxidasa, que utiliza al NADPH (nicotinamina adenina dinucleotido fosfato reducido) para transferir electrones al oxígeno molecular del interior del fagosoma (Stites y Terr 1993; Barret, et al., 2010).
- 4) Reclutamiento de células efectoras adicionales en el sitio de la infección. Una vez digerido el organismo invasor, se procesa partes de este y los productos polipeptídicos de la digestión del antígeno se unen con productos proteínicos de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), estos salen del citoplasma y son presentadas a otro tipo de células como son los linfocitos. Esto provoca la movilización de linfocitos hacia el lugar de la infección (Stites y Terr 1993; Barret, et al., 2010).
- 5) Células como los neutrófilos o los macrófagos pueden secretar sustancias en su activación. Se muestra en la Tabla 2.1 algunas de las sustancias secretadas.

<b>Actividad</b>	<b>Sustancia</b>
Sustancia quimiotáctica para los macrófagos	Leucotrieno B <sub>4</sub> , IL-8
Factores de crecimiento (cicatrización)	TGF- $\beta$ , factor de crecimiento derivado de plaquetas
Sustancias microbicidas	Lisozima, peróxido de hidrógeno
Sustancias citotóxicas	TNF- $\alpha$ , peróxido de hidrógeno, óxido nítrico
Factores de regulación de macrófagos	TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$
Factores de regulación de linfocitos	IL-1, IL-6

Tabla 2.1. Sustancias secretadas por células del sistema inmunológico innato

### 2.3 Sistema inmunológico adquirido

Ahora cuando el sistema inmunológico innato no es suficiente, entonces el sistema inmunológico adquirido entra en acción, este cuenta con dos características que lo definen: su especificidad y su memoria. Las células del sistema inmunológico adquirido son provenientes de un precursor linfoide, como se puede observar en la Figura 2.2. Las células que conforman el sistema inmunológico adquirido son los linfocitos T y los B (estas células también forman parte de las células mononucleares). Los linfocitos B maduran en la médula ósea y constituyen el 5 al 15 % del total de linfocitos, y los linfocitos T maduran en el timo o en el bazo para posteriormente pasar a un órgano linfoide secundario, constituyendo el 70 % del total linfocitario. Existe otro tipo de linfocitos que son las células citotóxicas naturales o NK que no entran en la categoría de linfocitos T o B, ya que no cuentan con receptores específicos a antígenos, estas células como otros linfocitos también son capaces de matar células anormales (tumores) o infectadas por un virus.

El sistema inmunológico adquirido se divide en humoral (linfocitos B) y en celular (linfocitos T) (Stites y Terr 1993; Barret, et al., 2010). La clasificación de las poblaciones de linfocitos se hace de forma funcional, a partir de las proteínas de su membrana celular, que es designada CD (grupo de diferenciación); por ejemplo, los linfocitos T citotóxicos expresan una proteína de superficie llamada  $CD8^+$  y los linfocitos T cooperadores una proteína  $CD4^+$ .

Ahora bien, los linfocitos T y B se encuentran circulando en la sangre para ser activados por antígenos, en caso de no haber activación, morirán al cabo de 1 a 3 meses. Cada linfocito cuenta con receptores específicos al antígeno y que solo se activan si tienen el tipo de receptor a ese antígeno en particular. Ejemplos de receptores para unir antígenos son las inmunoglobulinas de superficie en los linfocitos B (Stites y Terr 1993; Barret, et al., 2010).

Las etapas desde la activación hasta la eliminación del agente extraño son las siguientes:

1. Reconocimiento. En el caso de los linfocitos T hay una respuesta a antígenos proteínicos. Estos antígenos son procesados para reconocer los fragmentos peptídicos de la proteína antigénica. Las células del sistema inmunológico innato al fagocitar agentes patógenos como virus, degradan sus proteínas hasta péptidos, que son procesados y unidos a moléculas MHC clase I. Este complejo péptido-MHC es posteriormente puesto en la superficie de la célula del sistema inmunológico innato para presentar el antígeno a los linfocitos T (por lo que se les denomina células presentadoras de antígeno).

2. Cuando se presenta una molécula MHC de clase I que contiene al antígeno, esta se une al receptor del linfocito T que se encuentra en su membrana celular (receptor de células T) y se inicia el reconocimiento del antígeno, donde el linfocito T citotóxico producirá una proteína que perforará la membrana celular de la célula infectada por virus y generará sustancias totalmente tóxicas para la célula infectada. Por el otro lado, si el tipo de molécula presentadora de antígeno es de la clase II, el linfocito T que actúa es el cooperador, que se une al complejo antígeno-MHC II y al receptor de membrana del linfocito T cooperador, fabricando citocinas que estimularán la producción de macrófagos y aumentan la eficiencia para fagocitar (Stites y Terr 1993; Barret, et al., 2010).
3. Activación. El reconocimiento del antígeno activa a los linfocitos T, que sufren expansión clonal donde hay un aumento de linfocitos T con receptores idénticos frente a un antígeno, esto les permite a los linfocitos T crecer al ritmo del agente patógeno. Algunos linfocitos T sobrevivirán y serán células de memoria, si existiese un encuentro posterior con este mismo agente patógeno, se generará una respuesta acelerada que permitirá eliminar más fácilmente al agente patógeno. Los linfocitos T de memoria quedan alojados en las zonas de entrada del antígeno Stites y Terr 1993; Barret, et al., 2010).
4. Fase efectora. Al activarse las células proliferan y desarrollan su función efectora que son específicas. Cada linfocito produce un citocina específica como vemos en el siguiente cuadro.

<b>Linfocito</b>	<b>Citocina</b>	<b>Actividad principal</b>
Células T cooperadoras tipo 1	Interleucina-2.  Interferón- $\gamma$ .	Activación de linfocitos, células NK y macrófagos.  Activación de macrófagos e inhibe células T cooperadoras tipo 2.
Células T cooperadoras tipo 2	Interleucina-4.  Interleucina-5.	Activación de linfocitos, monocitos.  Diferenciación de eosinófilos (células polimorfonucleares).
Células T	Interleucina-8.	Quimiotáxis de neutrófilos, basófilos y células T.
Células B, T cooperadoras tipo 1	Factor de necrosis tumoral $\beta$ .	Promueve la inflamación.
Células T y B	Factor de necrosis tumoral $\alpha$  Factor de crecimiento y transformación $\beta$ .  Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos	Promueve la inflamación.  Inmunodepresión.  Promueve crecimiento de granulocitos y monocitos.

Tabla 2.3. Citocinas producidas por diferentes células del sistema inmunológico.

En la Figura siguiente se ilustra la activación del sistema inmunológico adquirido para eliminar al agente invasor.

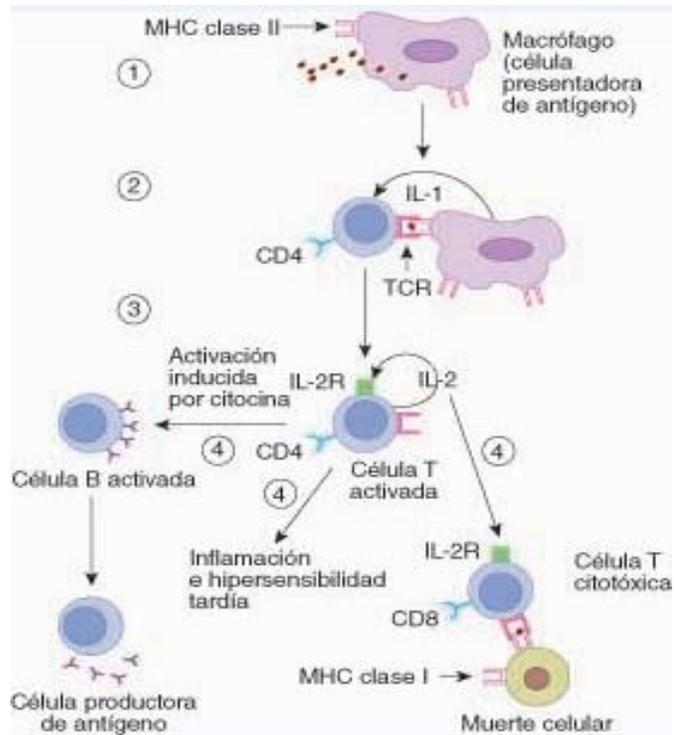


Figura 2.4. La parte (1) corresponde cuando un macrófago ingiere a un agente patógeno, parte de ese agente es un antígeno que se unirá a una molécula MHC II para ser presentada a un linfocito T CD4+, que formará una unión con dicha célula presentadora(2) y producirá IL-2 que actuará para producir una multiplicación celular y activar linfocitos B que generarán la producción de anticuerpos (3), también producirá la activación de células citotóxicas (4) [ilustración tomada de **Kim E. Barret, Susan M. Barman, Scott Boitano and Heddwen L. Brooks.** Ganong. Fisiología Médica. Mc Graw Hill Lange. Estados Unidos de América. Vol. 23 (2010). Cap 1.].

### 2.3.1 Respuesta inmunitaria humoral.

Se inicia por el reconocimiento del antígeno por los linfocitos B específicos. El antígeno se une a los receptores antigénicos que son inmunoglobulinas M (IgM) e IgD localizadas en la superficie de la membrana de los linfocitos B. La unión del antígeno al receptor provoca la activación del linfocito B, dando pie a la proliferación o expansión clonal o a la diferenciación a células plasmáticas que secretan anticuerpos específicos contra el antígeno. El anticuerpo puede estar unido a la membrana de los linfocitos B o ser secretado, en esta última forma el anticuerpo se une al antígeno y desencadena varios procesos en los que interviene el sistema inmunológico innato (células NK o mastocitos, por ejemplo) para eliminar al antígeno. Los anticuerpos unidos a los antígenos pueden producir las siguientes respuestas (y por tanto las respuestas del sistema humoral):

- 1) Neutralización. Para evitar que productos bacterianos se peguen a receptores celulares, por ejemplo, la IgG y la IgM neutralizan toxinas bacterianas (Stites y Terr 1993).
- 2) Oponización. La eficiencia de la fagocitosis aumenta cuando la membrana del fagocito se liga al objeto a ser fagocitado. Los anticuerpos IgG oponizan las bacterias favoreciendo su unión a macrófagos, monocitos y neutrófilos (Stites y Terr 1993).
- 3) Fagocitosis.
- 4) Activación del sistema del complemento. Tanto la IgM como la IgG unidas a su antígeno activan el sistema del complemento. Este sistema potencializa la respuesta inflamatoria, facilitando la fagocitosis y dirigiendo la lisis de células incluyendo la apoptosis (Stites y Terr 1993).

Por último hablaremos acerca de la inflamación, parte importante de la inmunidad y de la inmunodeficiencia en el sistema inmunitario, que se vio es provocado por la desnutrición grave.

## **2.4 Inflamación**

La inflamación se da como una respuesta aguda y localizada ante una sustancia extraña, en la que se hayan citocinas, neutrófilos, moléculas de adhesión, inmunoglobulinas IgE. En este estadio las arteriolas del sitio de inflamación se dilatan y aumenta la permeabilidad capilar (Stites y Terr 1993).

## **2.5 Inmunodeficiencia**

La inmunodeficiencia se da cuando el sistema inmunológico no cumple su papel de proteger al organismo ante a un agente patógeno, existiendo inmunodeficiencias primarias o secundarias. La inmunodeficiencia primaria es de origen congénito como es el caso del síndrome de Di George con alteración en una parte del cromosoma 22; esta enfermedad causa una maduración pobre o casi nula de los linfocitos T en el timo (Stites y Terr 1993).

Las inmunodeficiencias secundarias son causadas por agentes externos como son las infecciones virales como el SIDA, en donde causa una destrucción progresiva de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Como se había mencionado la desnutrición moderada es

una causa importante de inmunodeficiencia ya que afecta a linfocitos T y B e incluso a macrófagos (Muñoz y Chavez, 2007).

### **3.0 METABOLISMO CELULAR**

El metabolismo es fundamental en la producción de energía, como en la síntesis de nuevas sustancias vitales para el organismo vivo. Este se puede definir simplemente como la transformación de moléculas y sustancias químicas dentro de una célula. El metabolismo lo forman diferentes vías que producen energía en células (Röhm, 2004), a continuación se explican cada una de estas vías en células eucariontas.

#### **3.1 Glucólisis**

Una de la vías fundamentales y eje del metabolismo es la glucólisis, que transforma una molécula de glucosa de 6 carbonos en el citoplasma celular a una molécula de 3 carbonos o piruvato, esta vía metabólica produce 2 ATP (moléculas energéticas) y dos moléculas de NADH (Dinucleótido de nicotimina y adenina en su forma reducida) esta ultima molécula es importante en la cadena respiratoria.

Por lo que un mol de glucosa-6-fosfato produce dos moles de fosfogliceraldehído y estos mismos generarán 2 moles de ATP por mol de glucosa metabolizada hasta piruvato. Este ciclo metabólico no necesita de oxígeno molecular ( $O_2$ ) para funcionar, por lo que se le suele llamar glucólisis anaerobia (Devlin 2004).

Como se mencionó la glucólisis se realiza en el citoplasma celular, pero el mayor aporte de energía que necesita la célula vendrá de un organelo celular llamado mitocondria (como se ve en la Figura 3.1); este organelo tiene material genético propio para sintetizar proteínas. En la matriz mitocondrial se ejecutará el ciclo de Krebs, y en la membrana interna la fosforilación oxidativa (Devlin 2004).

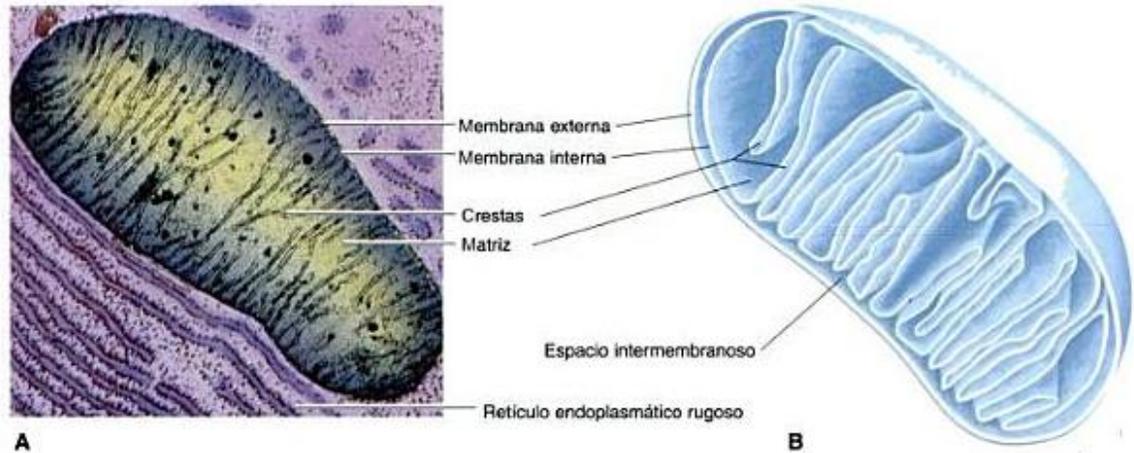


Figura 3.1. Diagrama de la mitocondria y de cada una de sus partes. [ilustración tomada de **Kim E. Barret, Susan M. Barman, Scott Boitano and Heddwen L. Brooks.** Ganong. Fisiología Médica. Mc Graw Hill Lange. Estados Unidos de América. Vol. 23 (2010). Cap 1.].

### 3.2 Ciclo de Krebs

Una vez obtenido piruvato, este es transformado en Acetil-CoA. En esta reacción se produce dos moléculas de NADH. La Acetil-CoA entra al ciclo de Krebs y se producen otras 6 moléculas de NADH, estas moléculas van hacer importantes ya que acarrean electrones y protones que son importantes para la cadena respiratoria. En la siguiente Figura se puede ver el ciclo de Krebs (Röhm, 2004).

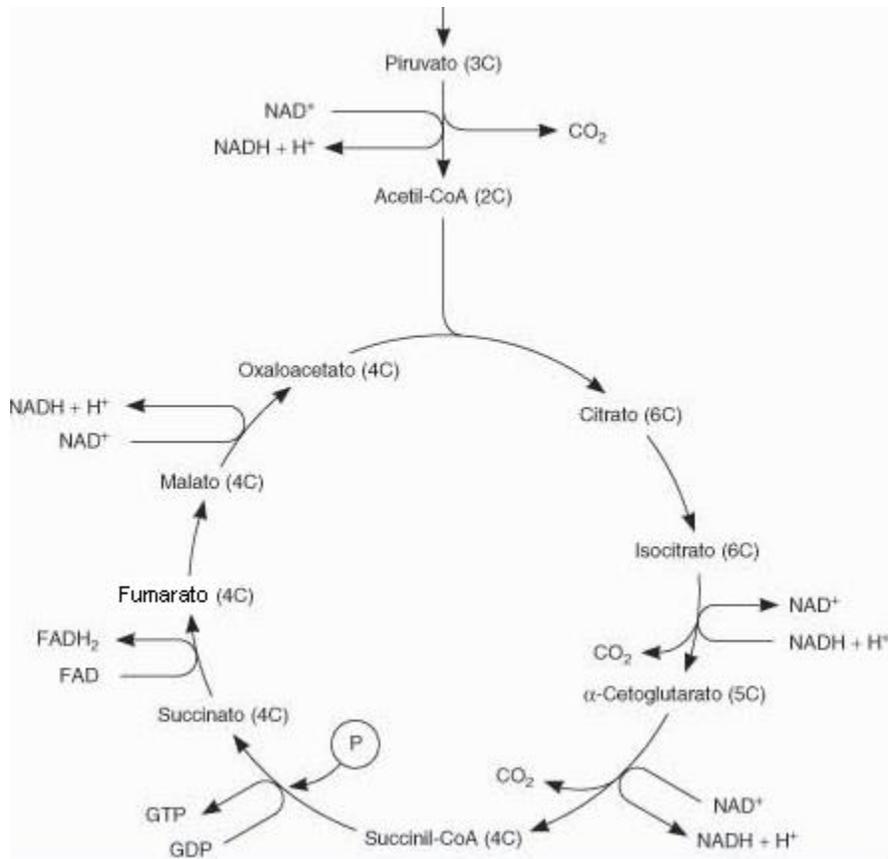


Figura 3.2. Se muestra el ciclo de Krebs, que es importante para la producción de acarrareadores de NADH para la cadena oxidativa. [ilustración tomada de Kim E. Barret, Susan M. Barman, Scott Boitano and Heddwen L. Brooks. Ganong. Fisiología Médica. Mc Graw Hill Lange. Estados Unidos de América. Vol. 23 (2010). Cap 1].

El ciclo de Krebs o del ácido cítrico genera  $CO_2$  y NADH. Este ciclo es la vía común de carbohidratos, lípidos y algunos aminoácidos. Este ciclo requiere oxígeno para su funcionamiento (Röhm, 2004).

### 3.3 Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa

Una vez que fueron reducidas las moléculas de  $NAD^+$ , serán oxidadas en la primera parte de la cadena respiratoria. La cadena respiratoria está formada de varios componentes (incrustados en la membrana interna de la mitocondria) encargados de acarrear los electrones donados por el NADH para poder producir un potencial electrostático y además de trasladar protones de la matriz mitocondrial al espacio entre membrana interna y externa. Este potencial electrostático funciona como una pila, la cual contiene energía que utilizará la

ATP-asa para fluir protones del medio intermembranal a la matriz mitocondrial provocando que se fosforile ADP para producir ATP. Cada NADH resultará en la formación de 3 ATPs (Röhm, 2004 y Barret y et al. 2010).

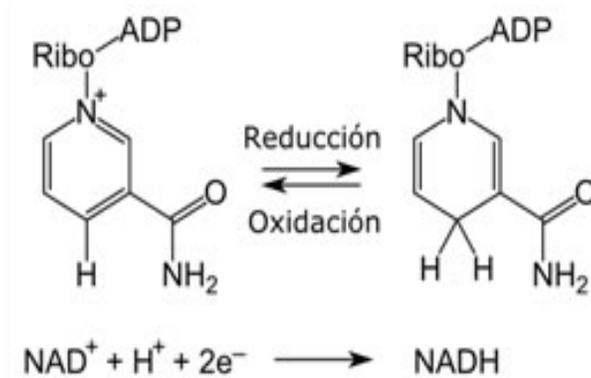


Figura 3.3. Podemos ver en esta figura la estructura del NAD<sup>+</sup> (izquierda) y la estructura del NADH (derecha). La obtención de las dos moléculas se da por reacciones de óxido reducción.

Los componentes que conforman la cadena respiratoria son el complejo I, II, III IV, V y las coenzimas ubiquinona coenzima Q y los citocromos a, b y c. (Röhm, 2004). La secuencia que lleva este proceso de generación de ATP es el siguiente:

1. Cuando se genera NADH de las etapas anteriores (ciclo de Krebs y glucólisis), es oxidada por el complejo I o NADH-deshidrogenasa que cataliza la transferencia de dos electrones del NADH a la ubiquinona. El complejo I también lleva acabo la traslocación de protones de hidrógeno de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal (Röhm, 2004; Königsberg, 1992).

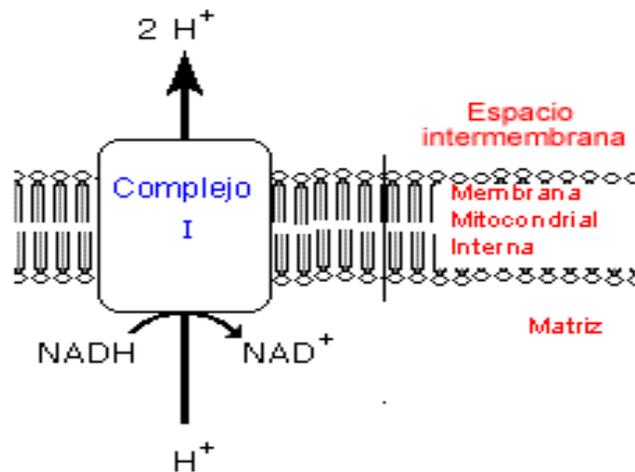


Figura 3.5. Se muestra el complejo I en la membrana interna de la mitocondria, que se encargará de oxidar al NADH y transportar dos protones de hidrógeno (Componentes y secuencia de la cadena de transporte de electrones [Imagen] (2014). Recuperado de: <http://www.bioquimicaqui11601.ucv.cl/unidades/cte/traselectfofox21fid.html>)

2. El complejo II se encargará de catalizar la transferencia de electrones de SUCCINATO a la ubiquinona. En este complejo no hay transferencia de protones de hidrógeno al espacio intermembranal (Röhm, 2004; Königsberg, 1992).
3. La ubiquinona o coenzima Q es un transportador móvil en la membrana mitocondrial interna que transporta los electrones donados del complejo I y II al complejo III (Röhm, 2004; Königsberg, 1992).
4. El complejo III catalizará la reducción del citocromo C por medio de la reducción de la coenzima Q. En este proceso se trasladan dos protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal (Röhm, 2004; Königsberg, 1992).
5. El citocromo C funciona como cofactor para proteínas, acarreado electrones. Este tiene un grupo hemo que ayudará a llevar los electrones al complejo siguiente. El cofactor puede moverse dentro de la membrana mitocondrial para trasladar los electrones (Röhm, 2004; Königsberg, 1992).

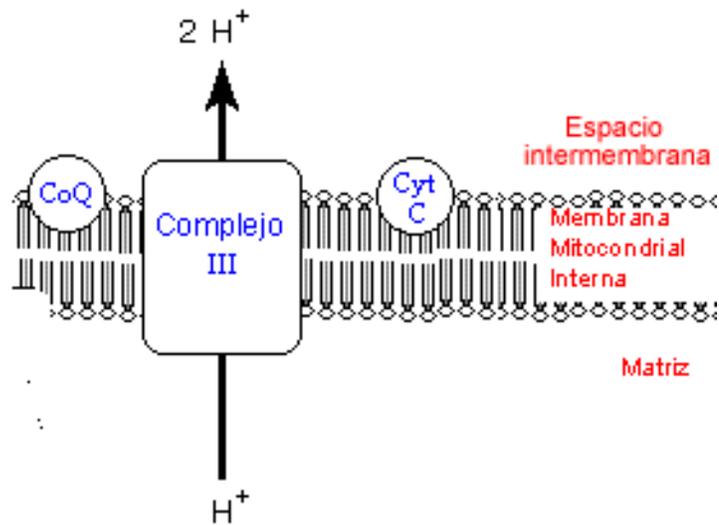


Figura 3.6. Se muestra el complejo III y a los transportadores móviles que son el citocromo C y ubiquinona Q. En el complejo III, se traslocarán 4 protones de hidrógeno al espacio intermembranal (Componentes y secuencia de la cadena de transporte de electrones [Imagen] (2014). Recuperado de:

<http://www.bioquimicaqui11601.ucv.cl/unidades/cte/traselectfofox21fid.html>).

6. Complejo IV contiene un centro  $Cu_A$ , que recibe del citocromo C un electrón, a su vez, este dona el electrón al citocromo  $a$ , que contiene este mismo complejo. Posteriormente el citocromo  $a$  cede el electrón al centro binuclear citocromo  $a_3-Cu_B$ , por último en este centro binuclear se reduce el oxígeno molecular en agua (utilizando el electrón cedido). En esta etapa también existe un aumento en el gradiente electroquímico (Röhm, 2004; Königsberg, 1992).
7. Complejo V o ATP-asa, es una máquina molecular compleja, donde a diferencia de los otros cuatro complejos, no forma parte de la cadena oxidativa, ya que no realiza reacciones de oxido-reducción, por lo que solo está acoplada a ellas para utilizar el gradiente electroquímico  $H^+$  generado por los otros complejos para fosforilar ADP y sintetizar ATP (Röhm, 2004; Königsberg, 1992).

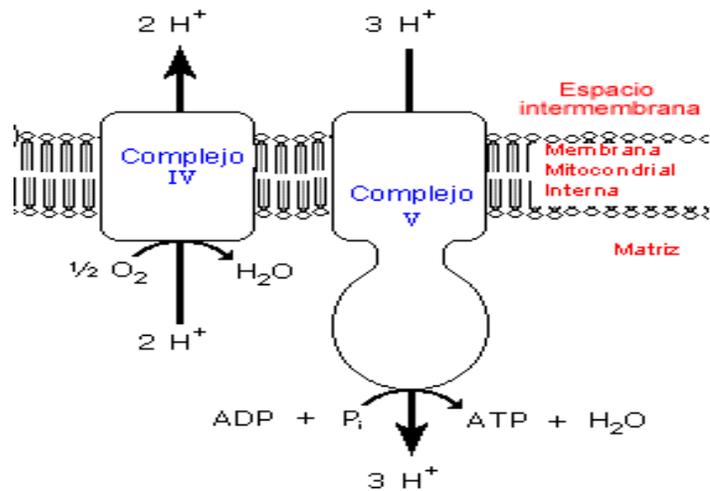


Figura 3.7. Se muestra el complejo IV que donará los electrones al oxígeno molecular para formar agua y aumentar el gradiente electrostático. Por otra parte el complejo V utilizará este mismo gradiente para producir ATP (Componentes y secuencia de la cadena de transporte de electrones [Imagen] (2014). Recuperado de: <http://www.bioquimicaqui11601.ucv.cl/unidades/cte/traselectfofox21cfid.html>).

En la siguiente figura se engloba lo antes visto en la fosforilación oxidativa para fabricar ATP.

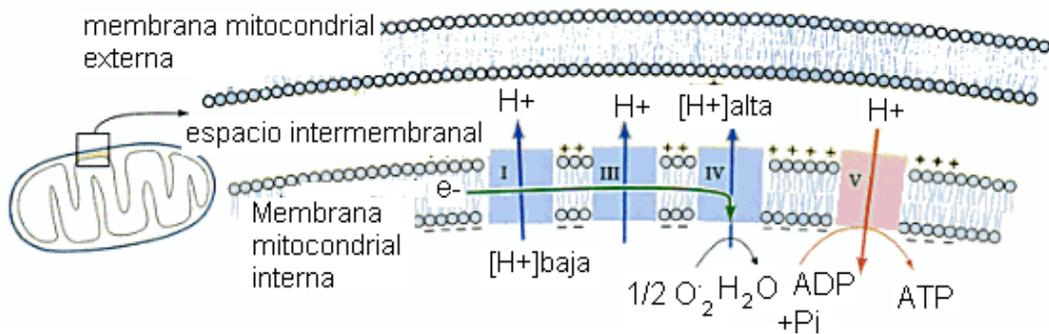


Figura 3.8. Se muestra la organización de cada uno de los complejos en la membrana interna de la mitocondria y como es que estas se llevan a cabo reacciones de oxido-reducción a partir del NADH producido por el ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs [ilustración tomada de **Donald Voer y Judith G. Voer. Bioquímica. Médica Panamericana. Argentina. Vol. 3 (2006). Cap. 22.**].

Por tanto la producción de energía en condiciones aerobias es superior a una anaerobia. Ya que la glucólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa pueden generar hasta 38 moles de ATP por un mol de glucosa metabolizada, tomando en cuenta que la coenzima NADH produce 3 moléculas de ATP. En la siguiente tabla ponemos los ATP producidos en cada etapa (Röhm, 2004; Königsberg, 1992).

<b>Etapas de la glucólisis aerobia</b>	<b>No moles de ATP producidos por 1 mol glucosa</b>
2 moles de NADH producidos en la glucólisis	6 moles de ATP
2 moles de NADH producidos por la conversión de piruvato a Acetil-CoA	6 moles de ATP
6 moles de NADH y 2 moles de FADH <sub>2</sub> .	22 moles de ATP

Tabla 3.1. Etapas de la glucólisis aerobia y su producción de ATP por 1 mol de glucosa

Existen sustancias que pueden inhibir algunas de estas vías, para mencionar solo un ejemplo tenemos el caso del cianuro, el cual se fija al centro hemo  $\alpha_3$  del complejo IV, impidiendo que el oxígeno se una a este complejo y por tanto acepte electrones, produciendo un cese en la respiración mitocondrial provocando muerte celular (Röhm, 2004; Königsberg, 1992).

## 4.0 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

### 4.1 Interacción de la materia y la luz.

El estudio de las interacciones entre la luz y la materia han desencadenado en el siglo XX grandes avances tecnológicos. Las ciencias de la salud se han visto beneficiadas de estos avances, ya que ha ayudado al desarrollo en el conocimiento de los seres vivos. Estas interacciones se dan en diferentes procesos, siendo la absorbancia y la fluorescencia las ramas de la espectroscopia en las que se puede medir dicha interacción (Shaker y Bane, 2008). La espectroscopia utiliza la luz o energía electromagnética para poder caracterizar la materia, por lo que es esencial la considerar la siguiente ecuación.

$$\mathcal{E} = h\nu = hc/\lambda \quad 4.1.$$

Esta es la energía de un fotón ( $\mathcal{E}$ ), donde  $h$  es una constante de proporcionalidad que es la constante de Planck con valor de  $6.6256 \times 10^{-34}$  Js,  $\nu$  es la frecuencia y por tanto depende de la longitud de onda  $\lambda$  y de la velocidad de la luz  $c$ . Ahora bien para estudiar la materia utilizamos la luz a diferentes longitudes de onda para caracterizar sus propiedades y por consiguiente obtener diferentes espectros, que dan información de la materia, por ejemplo, si se utilizan rayos gama se aporta información sobre núcleos atómicos, en rayos x para electrones internos, en luz ultravioleta o visible para electrones externos y en luz infrarroja para niveles moleculares de vibración.

Los fenómenos de interacción de la luz con la materia, se han abordado a través del comportamiento de las moléculas, que es explicada por la mecánica cuántica y la ecuación de Schrödinger. La ecuación de Schrödinger independiente del tiempo (ec.4.2), se resuelve encontrando los valores propios de energía  $\mathcal{E}$  y las funciones propias de  $\psi$ :

$$\mathcal{H}\psi = \mathcal{E}\psi \quad 4.2.$$

Donde  $\mathcal{H}$  es el operador Hamiltoniano del sistema y la función propia o función de onda  $\psi$ , representa el estado de una molécula. La  $\psi$  es una función que se relaciona a la probabilidad de encontrar al sistema molecular en un estado dado como se muestra en la siguiente ecuación:

$$P = \int_V |\psi(V)|^2 dV \quad 4.3.$$

Donde  $P$  es la probabilidad de encontrar un electrón sobre un volumen finito  $V$  (Alonso y Finn, 1968).

En la solución de la ecuación 4.2 es frecuente hacer ciertas consideraciones en el sistema para simplificar el análisis utilizando la aproximación adiabática o de Born-Oppenheimer (Alonso y Finn, 1968), esta considera que el movimiento de los núcleos es mucho más lento que el de los electrones, por lo que tenemos núcleos fijos donde giran alrededor de una nube de electrones.

La ecuación de Schrödinger permite obtener los niveles de energía. La obtención del valor de  $\mathcal{E}$  que es la energía total de una molécula de la ecuación 4.2 se debe multiplicar por  $\psi^*$ , posteriormente se integra sobre todo el espacio (este proceso corresponde a promediar  $\mathcal{H}\psi$  en todo el espacio) (Cox y Nelson, 2009).

$$\int \psi^* \mathcal{H}\psi dt = \int \psi^* \mathcal{E}\psi dt = \mathcal{E} \int \psi^* \psi dt$$

$$\mathcal{E} = \frac{\int \psi^* \mathcal{H}\psi dt}{\int \psi^* \psi dt} \quad 4.4.$$

Sin embargo la ecuación de Schrödinger es difícil de resolver para cualquier sistema molecular, excepto para el hidrógeno, por lo que se hace uso de métodos de aproximación como el método del orbital de Hückel (Alonso y Finn, 1968).

Las funciones de onda también pueden aportar la descripción de orbitales moleculares, por ejemplo, un orbital molecular de  $H_2$  puede ser representado por dos tipos de orbitales moleculares.

$$\psi_Q = \psi_a + \psi_b \quad 4.5.$$

$$\psi_{Q'} = \psi_a - \psi_b \quad 4.6.$$

En la ecuación 4.5 se tiene un orbital molecular  $\psi_Q$  que es un orbital enlazante (representado por la letra Q) formado por la combinación constructiva de los orbitales  $\psi_a$  centrado en un átomo  $a$  y del orbital  $\psi_b$  centrado en un átomo  $b$  y la ecuación 4.6 es el orbital  $\psi_{Q'}$  que es un orbital antienlazante (representado por  $\sigma^*$ )

formado por la combinación destructiva de los orbitales  $\psi_a$  centrado en un átomo  $a$  y del orbital  $\psi_b$  centrado en un átomo  $b$  (Bhaskaram y Sivakumar, 1986).

## 4.2 Absorción

El sistema puede absorber un fotón ocurriendo transiciones de energía siempre y cuando se cumpla la condición entre dos niveles de energía:

$$\varepsilon_2 - \varepsilon_1 = h\nu > 0, \quad 4.7.$$

Donde  $\varepsilon_1$  es la energía del estado base y  $\varepsilon_2$  del estado excitado y  $\varepsilon_2 > \varepsilon_1$ . La energía de esos dos estados puede describirse en términos de la función de onda:

$$(\psi_1 | H | \psi_1) = \varepsilon_1 \quad 4.8.$$

$$(\psi_2 | H | \psi_2) = \varepsilon_2 \quad 4.9.$$

Donde  $\psi_1$  y  $\psi_2$  son las funciones de onda de una molécula, en su estado base y en el excitado respectivamente (Atkins y Jones, 2006).

Cumpliendo la ecuación, existe una transición de energía de un estado  $S_0$  que es el estado fundamental singulete a estados  $S_{1,2,3...}$  que son estados excitados singuletes. Cuando se absorbe el fotón ( $h\nu$ ), un electrón llega a ocupar un orbital de mayor energía y dependiendo de la orientación de su espín, que es el momento angular intrínseco de una partícula, se tendrá un estado singulete (electrones con diferente orientación de espín) o uno triplete (electrones con la misma orientación de espín) (Atkins y Jones, 2006).

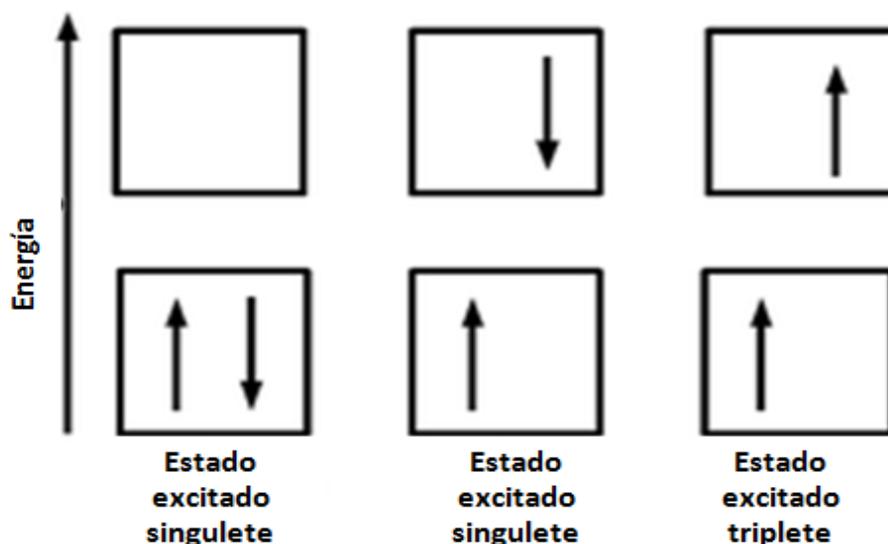


Figura 4.1 Este esquema representa a los estados de energía, donde se pueden encontrar a los electrones en los orbitales de una molécula, según el principio de exclusión de Pauli dos electrones en un orbital tienen espines opuestos.

La técnica de absorción en espectroscopia óptica es empleada para monitorear cambios en estados moleculares o ver el comportamiento de ciertos elementos biológicos. La espectroscopia de absorción puede ser usada para evaluar moléculas que son sometidas a transiciones electrónicas excitadas por luz ultravioleta y visible. Las sustancias biológicamente relevantes en esta región incluyen los enlaces peptídicos (aprox. 210 nm), bases de los ácidos nucleicos (aprox. 250-260 nm), anillos laterales de aminoácidos aromáticos (aprox. 260-280nm), grupos hemo (aprox. 400 - 600 nm) y flavinas (aprox. 450 nm) (Shaker y Bane, 2008).

Por lo que una molécula es capaz de absorber energía, elevando su estado base  $S_0$  a un estado excitado  $S_n$  ( $S_0 \rightarrow S_n$ ), estas transiciones entre estados electrónicos son mucho más rápidas que los cambios de posición o de momento que se puedan dar en los núcleos (principio de Frank-Condon) (Dinh y Cullum, 2003). En el principio Frank-Condon, una molécula puede absorber luz estando en el nivel vibracional más bajo de su estado electrónico base, las distancias y velocidades entre núcleos no cambian durante la transición electrónica y la absorción es permitida solo a niveles vibracionales en la región limitada por las

líneas que se ven en la Figura 4.2. Este principio también puede predecir probabilidades de transición entre diferentes niveles de energía.

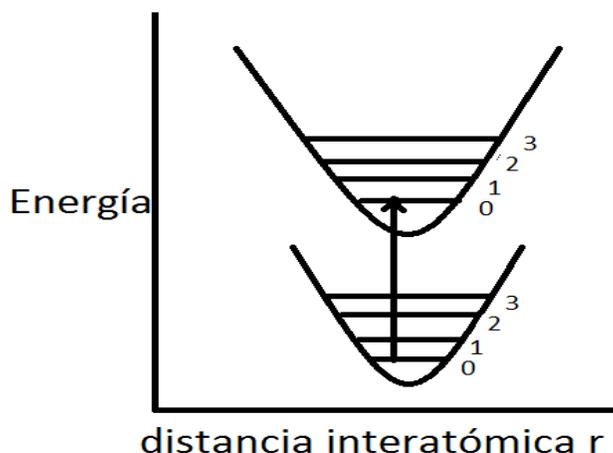


Figura 4.2 Curvas de potencial para una molécula diatómica.

La intensidad de esta absorción está supeditada a la intensidad de la fuente de emisión (número de fotones) y a la capacidad que posee la molécula para absorber fotones de una cierta longitud de onda (Dinh y Cullum, 2003), por lo que:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)G * l = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad 4.10.$$

Donde  $\varepsilon(\lambda)$  es el coeficiente de absorción a una cierta longitud de onda  $\lambda$ ,  $G$  es la concentración de la molécula en solución y  $l$  es la longitud atravesada por la luz en el medio. También podemos representar la absorción como el logaritmo base 10 de la intensidad de la fuente  $I_0$  y la intensidad de la muestra  $I$ .

### 4.3 Procesos de desactivación o relajación.

Una vez que la molécula absorbe energía, esta tiende a volver a un estado estable ya que los estados excitados son inestables, por lo que se producen fenómenos de desactivación. Dentro de estos fenómenos tenemos los radiativos y no radiativos. En los fenómenos no radiativos (ver Figura 4.3) tenemos a la conversión externa que es la colisión entre moléculas, la conversión interna que son transiciones entre estados del mismo número cuántico, la relajación vibracional que es la transición entre estados vibracionales de la molécula que producen calor y cruzamiento entre sistemas que es un proceso en el que la molécula se relaja a un estado de diferente multiplicidad del espín, es decir, pasa

de un estado singulete a uno triplete  $S_1 \rightarrow T_1$ . Estos procesos no radiativos pueden durar  $10^{-12}$  segundos y no generan una emisión electromagnética (Dinh y Cullum, 2003).

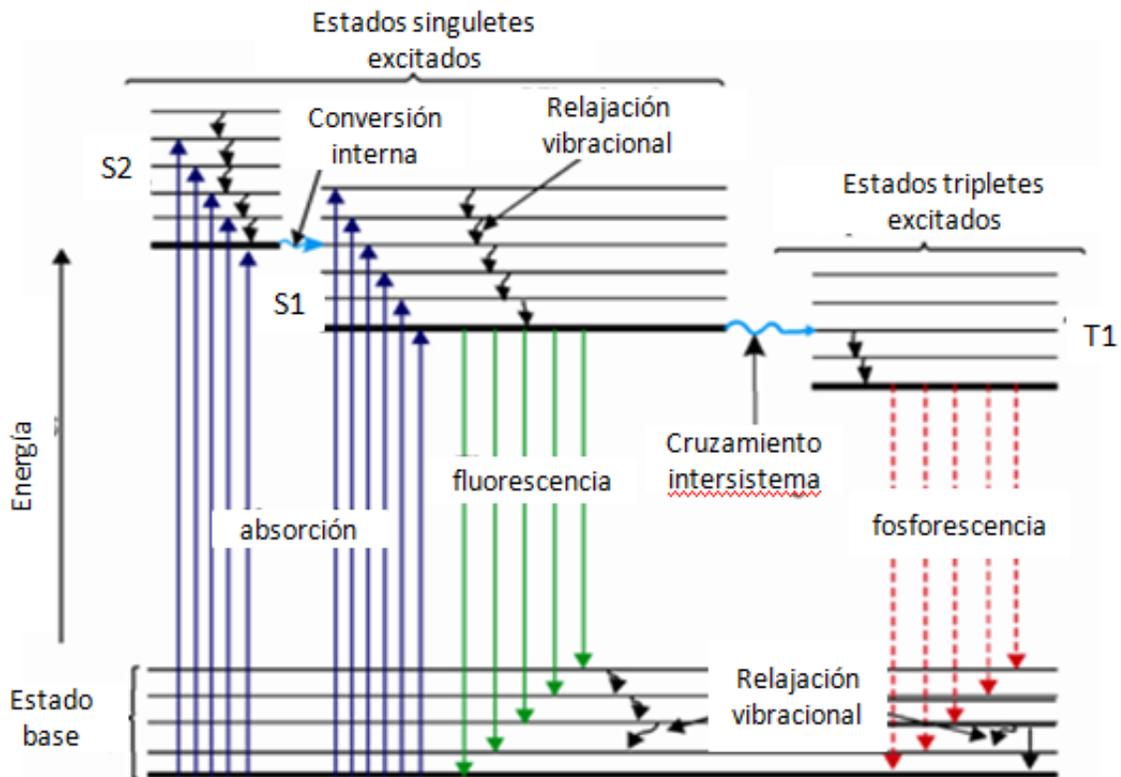


Figura 4.3 Diagrama de Jablonskii, donde se muestran las diferentes transiciones radiativas y no radiativas.

#### 4.4 Luminiscencia y fluorescencia.

Por otro lado los procesos radiativos (ver Figura 4.3) son luminiscentes, encontrando a la fluorescencia y a la fosforescencia, con fenómenos hermanos diferenciados por el tiempo de desactivación, siendo la fluorescencia un proceso más rápido ( $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  segundos) que la fosforescencia ( $10^{-3}$  segundos). Cuando una molécula absorbe energía, esta absorción puede llegar a niveles vibracionales mayores al nivel vibración base y a estados excitados (singulete o triplete), por lo que se puede producir energía vibracional, ocurriendo procesos no radiativos llegando a un nivel vibracional cero y/o produciendo un fotón, al alcanzar un estado  $S_1$  como se ve en la Figura 4.3.

En el caso de la fosforescencia se libera energía vibracional en el estado triplete hasta llegar al estado vibracional cero y posteriormente se produce un fotón como se observa en la Figura 4.3 (Dinh y Cullum, 2003).

En el caso de la fluorescencia, se libera energía del nivel vibracional cero del estado singulete excitado uno al estado fundamental ( $S_1 \rightarrow S_0$ ), como se ve en la Figura 4.3. El número de fotones emitidos por unidad de tiempo es proporcional al número de fotones absorbidos por unidad de tiempo (Dinh y Cullum, 2003). La fluorescencia depende de los siguientes parámetros:

- I. Emisión de fluorescencia.
- II. Tiempo de vida de fluorescencia.
- III. Eficiencia cuántica.
- IV. Polarización.

A continuación se explica cada una de estos fenómenos.

#### **4.4.1 Emisión de fluorescencia**

Cuando los electrones excitados están en estados superiores  $S_n$  y regresan al estado fundamental  $S_0$  de la molécula, sufren procesos de conversión interna que provocan que lleguen al estado  $S_1$  para luego desactivarse y emitir un fotón y volver al estado  $S_0$ , este proceso como se observó es la fluorescencia y se puede ver en las curvas de potencial de dos estados electrónicos (siguiente figura), obteniendo una gráfica del número de fotones emitidos a una longitud de onda (espectros de fluorescencia).

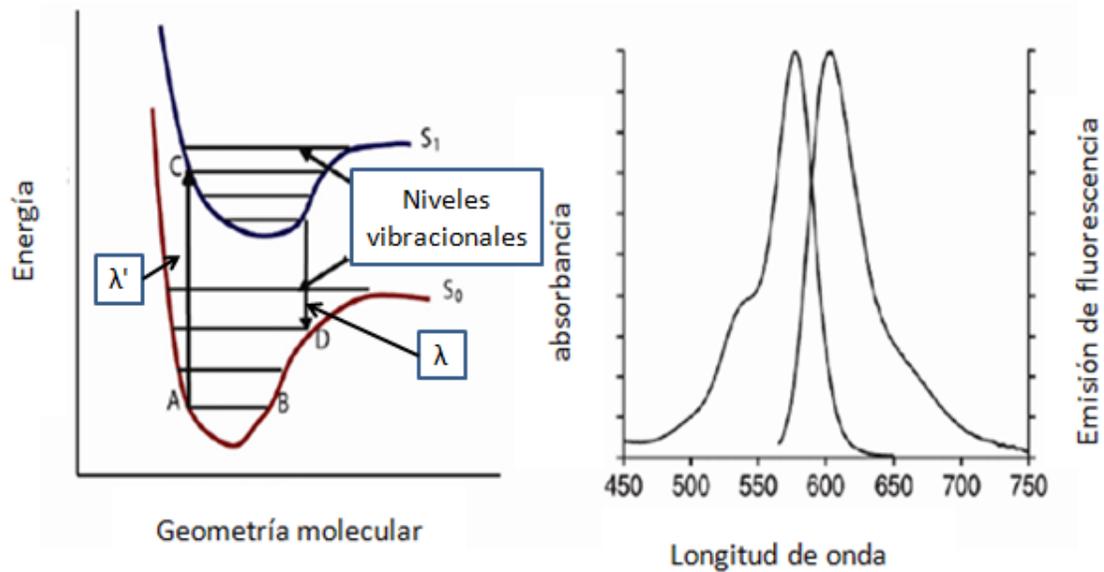


Figura 4.4. Diagrama que muestra las curvas de potencial de dos estados electrónicos donde la absorción de energía provoca que los electrones vayan a un estado elevado y se emita fluorescencia después de perder parte de la energía en procesos no radiativos (figura de la izquierda). La figura del lado derecho muestra los espectros de absorción y emisión de una sustancia x. [ilustración modificada de **Yin Yeh, Samantha Fore, and Huawen Wu**. *Fundamental Concepts in Biophysics*. Human Press. Estados Unidos de América. Vol. 1 (2009). Cap 4].

Los fotones que se emiten en la fluorescencia tienen menor energía (con longitud de onda  $\lambda$ ) que aquellos con los que se excitó a la molécula ( $\lambda'$ ), por lo que:

$$\lambda > \lambda' \quad 4.11.$$

Lo que indica un desplazamiento en la longitud de onda o desplazamiento de Stokes (la diferencia de longitud de onda entre la excitación y la emisión) (Shanker y Bane, 2008).

La emisión máxima de una molécula fluorescente se da en longitudes de onda mayores a la absorción máxima. Esto es una consecuencia de la pérdida de energía vibracional en el estado excitado antes de emitir un fotón. La magnitud del

desplazamiento de Stokes está en función de la estructura de la molécula fluorescente y de la naturaleza alrededor de los fluoróforos.

En la emisión, el número de fotones emitidos por unidad de tiempo es proporcional al número de fotones absorbidos por unidad de tiempo y a la eficiencia cuántica  $q$  (Shanker y Bane, 2008) como se observa a continuación:

$$F = I_i(1 - 10^{-A}) * q \quad 4.12.$$

Donde  $I_i$  es la intensidad de la luz incidente,  $F$  es la emisión de fluorescencia,  $A$  es igual a la absorbancia y  $q$  es la eficiencia cuántica.

#### 4.4.2 Tiempo de vida.

Es el tiempo de vida promedio que permanece una molécula en el estado excitado antes de volver al estado base (Shanker y Bane, 2008). Podemos calcular en la siguiente ecuación el decaimiento de la fluorescencia en el tiempo:

$$F = I_0 e^{-t/\tau} \quad 4.13.$$

Donde  $F$  es la intensidad de la emisión de fluorescencia,  $I_0$  es la intensidad en el tiempo  $t=0$ , y  $\tau$  es igual al tiempo de vida de fluorescencia. Esta es igual a la suma inversa de la constante de razón para decaimiento radiativo  $\gamma$  y a la constante de razón de decaimiento no radiativo  $\kappa$  (Shanker y Bane, 2008). La ecuación es:

$$\tau = \frac{1}{\kappa + \gamma} \quad 4.14.$$

#### 4.4.3 Eficiencia cuántica.

La eficiencia cuántica o el rendimiento de la fluorescencia va depender del número de moléculas excitadas que emiten fotones  $M_{ef}$  (moléculas fluorescentes), entre el número de moléculas excitadas  $M_{exc}$  (Shanker y Bane, 2008), por lo que se tiene en la ecuación:

$$q = \frac{M_{exc}}{M_{ef}} \quad 4.15.$$

La eficiencia cuántica también puede ser representada como una fracción de moléculas fluorescentes que decaen a través de procesos radiativos (Shanker y Bane, 2008). Por tanto se tiene.

$$q = \frac{\gamma}{\kappa + \gamma} \quad 4.16.$$

El tiempo de vida de fluorescencia conocido como tiempo de vida intrínseco puede quedar en ausencia de procesos no radiativos (Shanker y Bane, 2008) de la siguiente forma:

$$\tau_o = \frac{1}{\gamma} \quad 4.17.$$

Pudiendo representar la relación entre eficiencia cuántica y el tiempo de vida (Shanker y Bane, 2008).

$$q = \frac{\tau}{\tau_o} \quad 4.18.$$

En la siguiente tabla se muestra el rendimiento cuántico y el tiempo de vida de algunas moléculas biológicas.

Sustancia fluorescente	$\lambda_{exc} \lambda_{exc\ max.}$ (nm)	$\lambda_{emision}$ (nm)	$q$	$\tau$ (ns)
Fenilalanina	257	282	0.04	6.4
Tirosina	274	303	0.14	3.6
Triptofano	280	348	0.02	2.6
NADH	340	460	0.02	0.4

Tabla 4.1. Rendimiento cuántico y tiempo de vida de algunas sustancias biológicas en solución acuosa a pH 7 (Hoffman, 2014)

#### 4.4.4 Polarización.

La polarización está determinada por las orientaciones del momento dipolar eléctrico y la función de onda involucrada en las transiciones electrónicas. Una forma de medir el grado de polarización, es excitando la muestra con luz polarizada y midiendo la intensidad en la dirección perpendicular y paralela con respecto al ángulo de incidencia. La siguiente ecuación muestra como calcular el grado de polarización (Shanker y Bane, 2008).

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad 4.19.$$

Donde  $I_{\parallel}$  es la polarización paralela e  $I_{\perp}$  es la polarización perpendicular con respecto al ángulo de incidencia.

#### 4.4.5 Extinción de fluorescencia (“quenching”).

Existen procesos que afectan la emisión de fluorescencia como es extinción estática y dinámica (Shanker y Bane, 2008). A continuación se comentan cada uno de ellos.

#### 4.4.6 Extinción dinámica

La extinción dinámica se produce cuando el inactivador choca con el fluoróforo en su estado excitado, disipando energía sin liberación de fotones (Shanker y Bane, 2008). La inactivación dinámica de fluorescencia se puede describir con la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F}{F_{pre}} = 1 + k_q F_{pre} [Q] = 1 + K_D [Q] \quad 4.20.$$

Donde  $F$  es la intensidad de fluorescencia en ausencia del inactivador y  $F_{pre}$  es la intensidad de fluorescencia en presencia de este,  $k_q$  es la constante de inactivación biomolecular,  $[Q]$  es la concentración del inactivador y  $K_D$  es la constante de Stern-Volmer para inactivación dinámica (Shanker y Bane, 2008).

#### 4.4.7 Extinción estática.

Existe la posibilidad de formación de un complejo no fluorescente entre el inactivador y el fluoróforo que puede afectar el espectro de absorción. La ecuación de desactivación es muy parecida a la ecuación 4.22 (Shanker y Bane, 2008).

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_s [Q] \quad 4.21.$$

Donde  $K_s$  es la constante de asociación para la formación del complejo en la extinción estática y  $I_0$  e  $I$  son la intensidad que incide sobre la muestra y la luz transmitida respectivamente.

#### 4.4.8 Efecto de filtro interno

Cuando se quiere obtener un espectro de emisión se tiene que asumir que la radiación de excitación incide sobre la muestra de frente, obteniéndose la fluorescencia a un ángulo de 90 grados con respecto a la radiación de excitación, sin embargo, la emisión de fluorescencia puede verse afectada por la absorción fuerte de la muestra a la longitud de onda de emisión. La afectación puede ser evitada a través de disminuir el tamaño de la cubeta como se ve en la Figura 4.5 (Shanker y Bane, 2008).

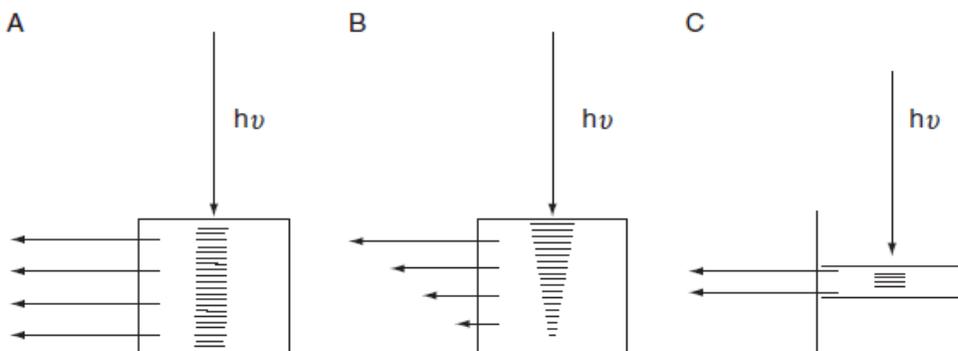


Figura 4.5. Se muestra en A que no hay efecto de filtro interno, en B hay una solución más concentrada por lo que hay una emisión de fluorescencia disminuida. En C la cubeta tiene un pequeño camino de excitación y el camino de emisión es mayor por lo que esto disminuye el efecto de filtro interno. [ilustración modificada de **Natasha Shanker and Susan L. Bane**. Biophysical tools for biologists: Vol. 1 in vitro techniques. Primera edición. Editorial Elsevier. E.U. A. Vol. 84 (2008). Cap. 8].

Este efecto también puede ser corregido, si se mueve la longitud de onda de excitación a una que tenga una banda estrecha de absorbancia molar.

#### 4.4.9 Efecto del ambiente sobre la fluorescencia

Existen sustancias fluorescentes que son sensibles al ambiente (solvente) donde están disueltas. La naturaleza de este tipo de sustancias fluorescentes puede ser examinado a través de la diferencia de los espectros de emisión y absorción (Stokes shift), un ejemplo es el triptófano (Shanker y Bane, 2008).

También hay otros factores que afectan la fluorescencia y entre ellos se tiene a la temperatura, al número de estructuras cíclicas que tenga la molécula fluorescente y a la destrucción fotoquímica de la molécula fluorescente (fotoblanqueo), también este último es debido a una intensidad prolongada de la fuente de excitación o a una cantidad mayor de esta en la muestra. Todo esto puede provocar que las características de fluorescencia se vean afectadas.

#### 4.4.10 Transferencia de energía de fluorescencia.

La transferencia de energía ocurre cuando una molécula se halla en estado excitado y transfiere su energía a otra molécula a través de interacciones dipolo-dipolo. La transferencia es dependiente de la distancia de una especie donadora D y un aceptor A. La fluorescencia del donador disminuye y al mismo tiempo que aparece la fluorescencia del aceptor (no necesariamente el aceptor A es fluorescente) (Shanker y Bane, 2008). La transferencia es descrita de la siguiente manera:

$$E = \left[ 1 + \left( \frac{R}{R_0} \right)^6 \right]^{-1}, \quad 4.22$$

Donde  $R$  es la distancia entre D y A y  $R_0$  es la distancia de Förster que es la distancia de transferencia de energía al 50% de eficiencia. Para que la transferencia de energía de fluorescencia pueda ocurrir es necesario cierto traslape entre el espectro del donador y el aceptor. La medición va depender de que tan separados están los espectros de excitación y emisión de fluorescencia del donador y aceptor. Este fenómeno tiene aplicaciones en cancerología (Shanker y Bane, 2008).

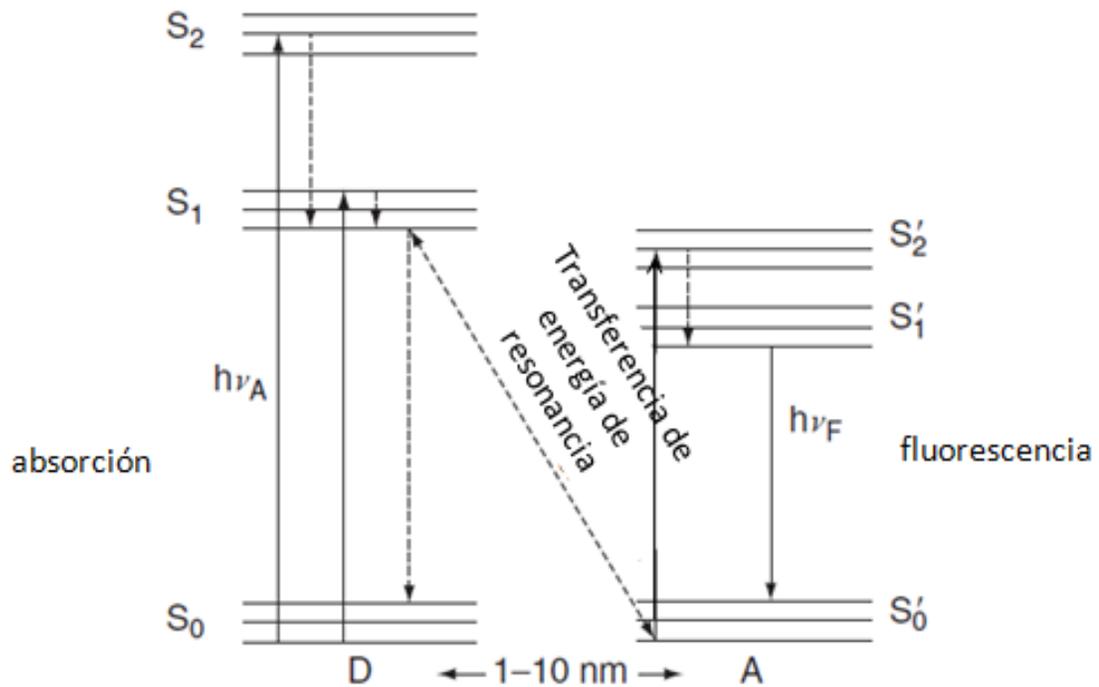


Figura 4.6. Transferencia de energía de una especie donadora D a una especie aceptora A y la emisión de fluorescencia de esta última [ilustración modificada de **Natasha Shanker and Susan L. Bane**. Biophysical tools for biologists: Vol. 1 in vitro techniques. Primera edición. Editorial Elsevier. E.U. A. Vol. 84 (2008). Cap. 8].

#### 4.4.11 Fluoróforos

Las sustancias que presentan el fenómeno de fluorescencia se les llama fluoróforos, que poseen electrones deslocalizados (son electrones de una molécula que no se encuentran en un solo átomo o enlace covalente sino pertenecen a un orbital de varios átomos adyacentes) presentes en enlaces dobles conjugados (Figura 4.8). Puede haber fluoróforos endógenos que absorben y emitan en la región ultravioleta, mientras que los fluoróforos que son exógenos pueden ser diseñados para absorber y emitir virtualmente a cualquier frecuencia de luz, incluyendo infrarrojo cercano (Shanker y Bane, 2008).

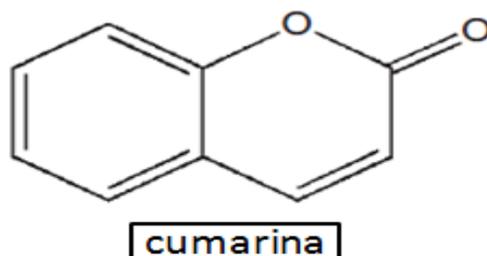


Figura 4.7 Se muestra la estructura molecular de la cumarina que presenta electrones deslocalizados y que es una molécula que absorbe y emite a longitudes de onda de 355 nm y 460 nm respectivamente.

Existen fluoróforos biológicos como el triptófano, tirosina, FAD y el NADH que son fluoróforos endógenos, siendo el último de suma importancia en este trabajo.

#### 4.4.12 Aplicación biomédica

La fluorescencia es un gran campo de investigación y en crecimiento, siendo actualmente una herramienta importante en la detección de cáncer que a partir de sus propiedades, se puede diferenciar entre células sanas y células neoplásicas o cancerosas, elaborándose un análisis de los componentes bioquímicos de la células in vivo o in vitro (esto se puede ver en la fluorescencia del NADH) (Yeh, Fore y Wu, 2009). El uso del triptófano, sus derivados y de sus características de interacción con proteínas ayudan a proveer información molecular alrededor del triptófano.

Existen aplicaciones también que abarcan a los ácidos nucleicos, utilizando la fluorescencia intrínseca de la timina excitada a 293 nm, proveyendo movimientos del DNA con tiempos de correlación de subnanosegundos. Otra aplicaciones utilizan la técnica de citometría de flujo, que permiten cuantificar ácidos nucleico y cuantificar células, por ejemplo, en situaciones de apoptosis (muerte células inducida) (Yeh, et al., 2009).

## 5.0 MOLÉCULA FLUORESCENTE.

En el capítulo anterior se vio que existen moléculas fluorescentes llamadas fluoróforos que encontramos en los seres vivos. Estos son capaces de absorber energía en una cierta longitud de onda y de emitir fluorescencia con una longitud mayor a la absorbida. Algunos ejemplos son los aminoácidos como el triptófano y tirosina [6], así como las riboflavinas como el FAD, coenzima que interviene en los procesos metabólicos de oxido-reducción (ver capítulo 4). Por otro lado se encuentra al NADH, molécula de sumo interés en investigaciones sobre metabolismo celular (Mayevsky y Rogatsky, 2007).

La importancia que tiene el NADH en el estudio del metabolismo celular, ha sido la capacidad para medir de forma indirecta la producción de ATP en una célula, esto gracias a sus características fluorescentes que han permitido estudiar el metabolismo en patologías como procesos apoptóticos, isquemias, Parkinson (Ortiz-Andrellucchi, 2007), etc., proporcionando información de interés en procesos metabólicos de oxido-reducción en células y tejidos enfermos. Debe agregarse también que la forma oxidada de esta molécula clave no es fluorescente (NAD<sup>+</sup>).

El estudio del NADH en células (por ejemplo en hepatocitos y miocitos) ha comenzado en los años 50's y en la actualidad sigue vigente su estudio en el que se utiliza la técnica de espectroscopía de fluorescencia por láser ya que el rango de absorción del NADH en 320-380 nm, permite utilizar fuentes de excitación láser, tales como láseres, que emiten luz en la región del ultravioleta (Mayevsky y Rogatsky, 2007). Algunos de estos estudios que emplean esta técnica, han encontrado información de relevancia sobre el metabolismo, que a continuación presentamos:

Se ha reportado que el NADH funciona como indicador de hipoxia (Rose, Martin, Macdonald y Chrisellis, 2006). Algunos artículos han observado que cuando se elimina el suministro de  $O_2$  suceden aumentos en la intensidad del NADH (Mayevsky y Rogatsky, 2007).

1. Se ha hecho espectroscopia láser en cáncer cervicouterino donde los espectros de tejido canceroso muestran una intensidad de fluorescencia del NADH más baja y un corrimiento hacia longitudes mayores (456 nm o 472 nm) comparados con el tejido sano (reportados en 444 nm a 452 nm) [Kasimova, Griegiene, Krab y Flyvberg, 2006]. También se ha utilizado para evaluar displasia en pacientes con Esófago de Barret (Georgakoudi, 2001).

2. Por otro lado también está involucrado en procesos no sólo metabólicos, sino también genéticos. Se ha encontrado que el NADH puede interactuar con enzimas, que regulan factores de transcripción genética, como es el caso del CtBP, que es un carboxil terminal unido a proteína que está involucrado en represores transcripcionales. El NADH al unirse a esta molécula presenta una emisión máxima en 425 nm (Fjeld, Birdsong, y Goodman, 2003).
3. Puede servir como indicador de muerte celular. En la apoptosis hay un aumento en la intensidad de fluorescencia comparado a la necrosis (Kulms, T. Schwarz, 2000).
4. Se han hecho experimentos con NADH en solución, mitocondrias en suspensión y en rebanadas perfundidas de riñón, encontrado diferencias en el espectro de fluorescencia (Mayevsky y Rogatsky, 2007).
5. También se ha encontrado que la intensidad de emisión de fluorescencia del  $\beta$ -NADH (que es el NADH purificado) no tiene cambios significativos por efecto del pH (Rose et al., 2006).
6. Por otro lado sean visto cambios de la fluorescencia del  $\beta$ -NADH debido a la temperatura. Al disminuir la temperatura a  $-192\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la emisión de fluorescencia del NADH aumenta y hay un corrimiento a longitudes menores (415 nm), comparado al espectro con una temperatura de  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Zelent, Troxler, Vanderkooi, 2007).
7. Estudios muestran que al bloquear la glucólisis, ocurre una disminución en la intensidad del NADH (Mayevsky y Rogatsky, 2007).
8. Se ha encontrado que en espectroscopía láser de fluorescencia, el NADH en citoplasma no contribuye significativamente a la señal de fluorescencia comparado al NADH mitocondrial (Mayevsky y Rogatsky, 2007).
9. En estudios con hígado de rata in vitro bajo condiciones de anoxia hay un aumento de la fluorescencia debido al NADH y no al NADPH (nicotinamina adenina dinucleotido fosfato reducido, esta molécula también es fluorescente, tiene una absorción máxima y una emisión máxima de fluorescencia igual al NADH) [Mayevsky y Rogatsky, 2007].

A partir de una recopilación de artículos hechos sobre fluorescencia del NADH, se presenta el siguiente esquema, controlando variables como el oxígeno, el ADP o substratos (Chance, Schoener, Oshino, Itshak y Y. Nakase, 1979; Mayevsky y Rogatsky, 2007).

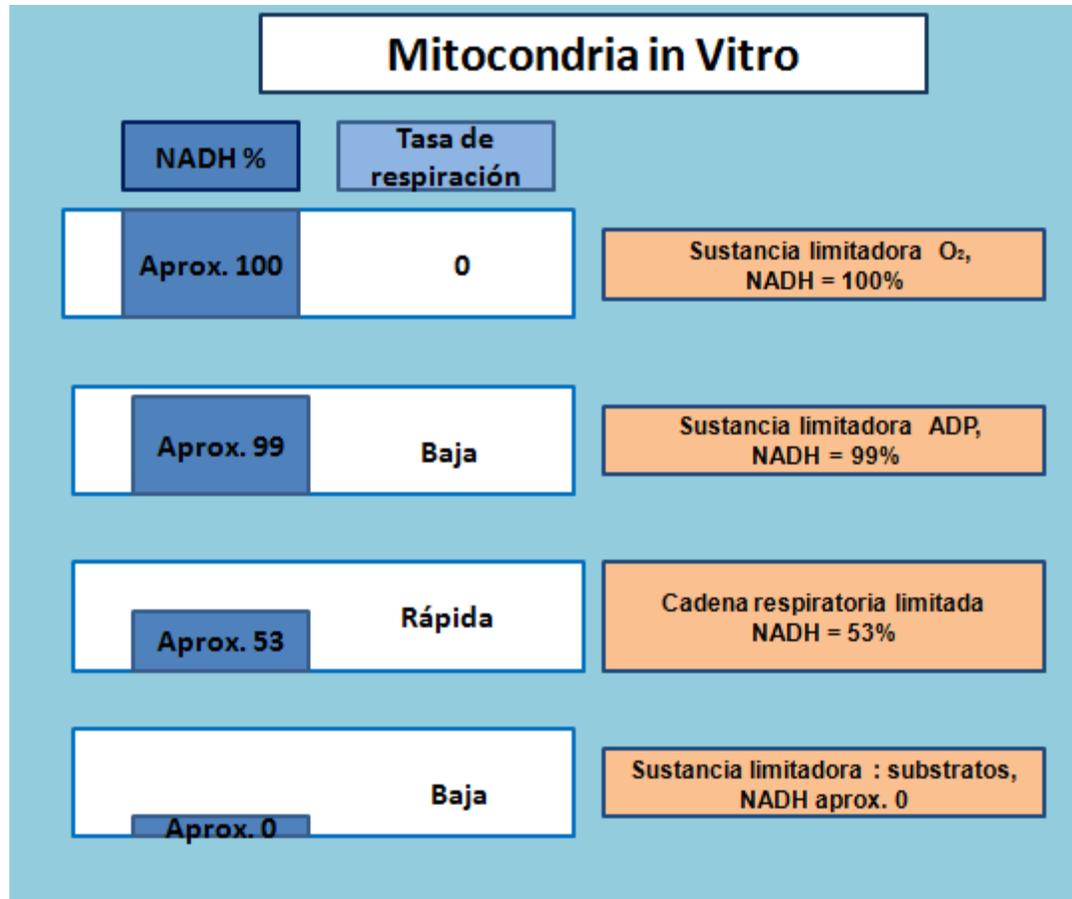


Figura 5.1. Esquema modificado sobre el cambio en el porcentaje del NADH y la tasa de respiración, cuando se limita algún sustrato. Este esquema se construyó a partir del artículo [Avraham Mayevsky and Gennady G.Rogatsky. mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. Am J. physiol cell Physiol. (2007). (292): C615-C640].

En la Figura siguiente, se muestran los corrimientos en longitud de onda de la emisión máxima de fluorescencia en diferentes situaciones, comparándolas con condiciones normales (en el esquema se recopilan los artículos anteriormente enumerados).

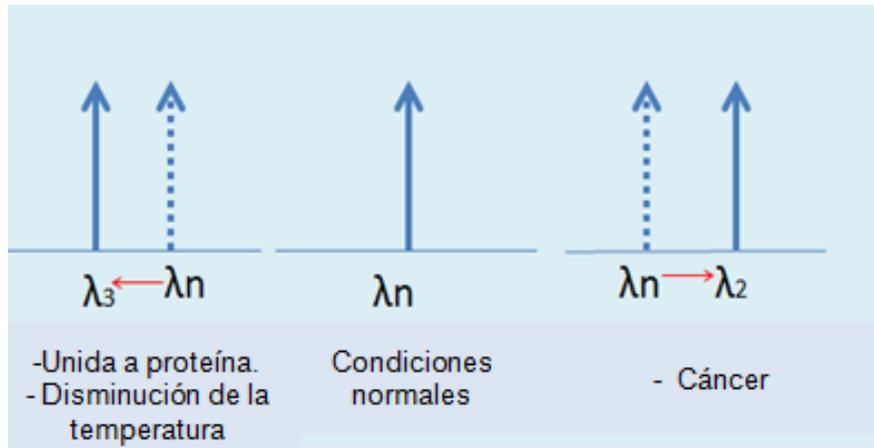


Figura 5.2. Se muestra las diferentes condiciones que producen cambios en la emisión máxima de la intensidad de fluorescencia del NADH en células. En  $\lambda_3$  es la longitud menor a la longitud  $\lambda_n$ ,  $\lambda_2$  tiene una longitud mayor a  $\lambda_n$ .

Como se observó, el estudio en espectroscopía láser de fluorescencia en NADH es una técnica que se sigue practicando en bioenergética celular para diferentes patologías. En este trabajo, se empleó la técnica de espectroscopía láser del NADH para el estudio del efecto de la desnutrición grave sobre el metabolismo energético de las células mononucleares, las cuales son fundamentales en la respuesta inmunológico. A la fecha, no existen datos en la literatura especializada sobre el efecto de la desnutrición grave en la bioenergética de las células del sistema inmunológico. Además de llenar este hueco en la literatura, consideramos que los resultados obtenidos en este trabajo, podrían explicar la gran diversidad de alteraciones que han sido reportadas por diferentes autores en la respuesta inmunológico de organismos que padecen desnutrición grave.

## **6.0 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

### **6.1 Hipótesis**

Si los nutrimentos son empleados en la producción de energía, es posible que su disminución altere el metabolismo energético de las células mononucleares afectando su respuesta a antígenos y provocando inmunodeficiencia en el organismo que padece desnutrición.

### **6.2 Objetivo general**

Mostrar que la desnutrición grave afecta la maquinaria bioenergética pudiendo ser uno de los mecanismos de la inmunodeficiencia.

### **6.3 Objetivos particulares**

1. Armado del instrumento de medición de fluorescencia para la presente tesis, como para trabajos futuros.
2. Obtención de las señales de fluorescencia de células mononucleares purificadas de los grupos testigo y con desnutrición grave.
3. Analizar el efecto de la desnutrición grave en el NADH celular.

## 7.0 ARREGLO EXPERIMENTAL

En la construcción del arreglo experimental de espectroscopia láser, se hicieron pruebas utilizando el pigmento cumarina 460, el cual es usado en láseres sintonizables. El pigmento tiene una máxima emisión de fluorescencia a una longitud de onda muy cercana al rango reportado del NADH (ver capítulo 5), esto ayudó a hacer mediciones a concentraciones muy parecidas a las fisiológicas (5  $\mu\text{M}$  en normoxia y 50  $\mu\text{M}$  en anoxia, en condiciones in vitro en mitocondrias) [Rose et al., 2006].

A continuación mencionaremos cada una de las partes que implementamos para el sistema de espectroscopía de fluorescencia láser.

### 7.1 Láser Nd:YAG

La interacción de una onda electromagnética con la materia puede ocurrir por tres procesos, llamados emisión espontánea, emisión estimulada y absorción (Capítulo 4).

Si consideramos un sistema de dos niveles, donde  $\mathcal{E}_1$  es el nivel base y  $\mathcal{E}_2$  es el estado excitado que es el estado del sistema, donde  $\mathcal{E}_2 > \mathcal{E}_1$ . Esta diferencia de energía será liberada por el sistema, esto se llama emisión espontánea (Svelto, 1998). De la Ecuación 4.7 se tiene que la energía emitida tiene una frecuencia :

$$\nu = \frac{\mathcal{E}_2 - \mathcal{E}_1}{h} \quad 7.1$$

La probabilidad de emisión espontánea puede darse como sigue: en el tiempo  $t$  hay  $N_2$  átomos (por unidad de volumen) en el nivel 2 (el número de átomos por unidad de volumen en algún nivel dado es llamado población de nivel) [Svelto, 1998]. La razón de decaimiento de estos átomos debido a la emisión espontánea, es proporcional a  $N_2$ , donde:

$$\left(\frac{dN_2}{dt}\right)_{\text{esp}} = -AN_2 \quad 7.2$$

El coeficiente  $A$  es la probabilidad de emisión espontánea (Svelto, 1998).

Supongamos de nuevo que el átomo (o sistema) se encuentra inicialmente en el nivel 2 y que una onda electromagnética de frecuencia  $\nu$  incide sobre el átomo. La

diferencia de energía es liberada en forma de una onda electromagnética, la cual se suma a la onda incidente. La emisión de energía está en fase con la onda incidente y además la misma onda incidente determina la dirección de la onda emitida (por lo que la onda electromagnética resultante es coherente) (Svelto, 1998). Este fenómeno se llama emisión estimulada. Este proceso se puede caracterizar con la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{dN_2}{dt}\right)_{est} = -W_{21}N_2 \quad 7.3$$

Donde  $\left(\frac{dN_2}{dt}\right)_{est}$  es la razón a la cual la transición  $2 \rightarrow 1$  ocurre como resultado de la emisión estimulada y  $W_{21}$  es llamada probabilidad de emisión estimulada y que depende de la intensidad de la onda incidente (Svelto, 1998). El coeficiente de emisión estimulada depende de las siguientes variables:

$$W_{21} = \sigma_{21}F \quad 7.4$$

Donde  $F$  es el flujo de fotones de la onda incidente y  $\sigma_{21}$  es una cantidad que tiene dimensiones de área (llamada sección transversal de emisión estimulada).

Ahora bien, si asumimos que el sistema o el átomo está inicialmente en el nivel basal  $N_1$  y que de igual manera es estimulada por una onda electromagnética de frecuencia  $\nu$  y que también provoca una diferencia de energía (Svelto, 1998). Este proceso se llama la razón de absorción, que se puede representar por medio de la ecuación

$$\left(\frac{dN_1}{dt}\right) = -W_{12}N_1 \quad 7.5$$

Donde  $N_1$  es el número de átomos en el nivel 1 o en el estado basal (por unidad de volumen), a un tiempo dado y  $W_{12}$  es el coeficiente de absorción. Se tiene la ecuación:

$$W_{12} = \sigma_{12}F \quad 7.6$$

Donde  $\sigma_{12}$  es la sección transversal de absorción, que depende solo de la transición del nivel 1 al 2 (Svelto, 1998).

Considere los dos niveles 1 y 2 de un material dado y que sean  $N_1$  y  $N_2$  sus poblaciones respectivas. Si una onda electromagnética con una intensidad dada correspondiente con un flujo de fotones  $F$  viaja a lo largo de  $z$  en este material, el cambio elemental de este flujo debido a los procesos de absorción y emisión estimulada (ecuaciones 7.3 y 7.6) está dado por:

$$\frac{dF}{dz} = \sigma F(N_2 - N_1) \quad 7.7$$

Esta ecuación muestra que el medio se comporta como un amplificador (es decir  $\frac{dF}{dz} > 0$ ) si  $N_2 > N_1$ , mientras que se comporta como un absorbedor si  $N_2 < N_1$ , este último caso ocurre en condiciones normales, sin embargo en condiciones de no-equilibrio, en donde el material (medio activo) actúa como un amplificador, se dice que existe una inversión de población. Las ecuaciones 7.2, 7.3, 7.5 y 7.7 son ecuaciones de razón de primer orden y acopladas.

El láser utilizado en el arreglo experimental es un láser Nd:YAG de estado sólido, que genera una longitud de onda monocromática a 1064 nm, con un medio activo que es una barra de cristal de granate aluminio ltrium y que está dopada (contiene impurezas que cambian su características del cristal) con neodimio.

En la obtención de la estimulación del material o en este caso de la barra de cristal del láser, se da por medio de lámparas de centelleo o por una descarga eléctrica que excitará al material que contiene los átomos a excitar (bombeo óptico) [Aboites, 2003]. Una vez que se obtiene una inversión de población (en este caso a través del bombeo óptico) se generará la emisión estimulada. La amplificación de fotones debe seguir una dirección, para evitar que salga la luz por todas partes y exista una pérdida de energía, se utilizan dos espejos casi planos uno 100% reflejante y otro 90% reflejante, saliendo los fotones en la dirección del espejo 90% reflejante (ver 7.1).

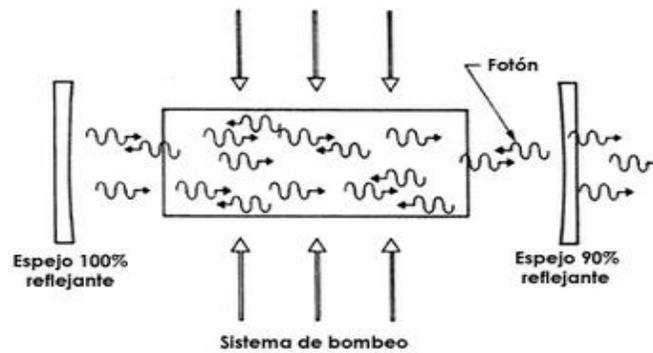


Figura 7.1. El esquema representa una cavidad óptica en la que un sistema de bombeo produce una inversión de población y genera fotones, que son reflejados por un espejo 100% reflejante para finalmente ser emitidos en una sola dirección que es el espejo 90% reflejante [V. Aboites. El láser. 3ª edición, México. Editorial. Ciencia para todos (2003) pag. 96.].

Este proceso le confiere al láser ciertas características de monocromaticidad (un ancho de banda muy estrecho) y coherencia (todos los fotones están en fase, es decir, el movimiento de los fotones se dan de forma sincronizada. En la figura de abajo se observa de forma ilustrativa tales características.

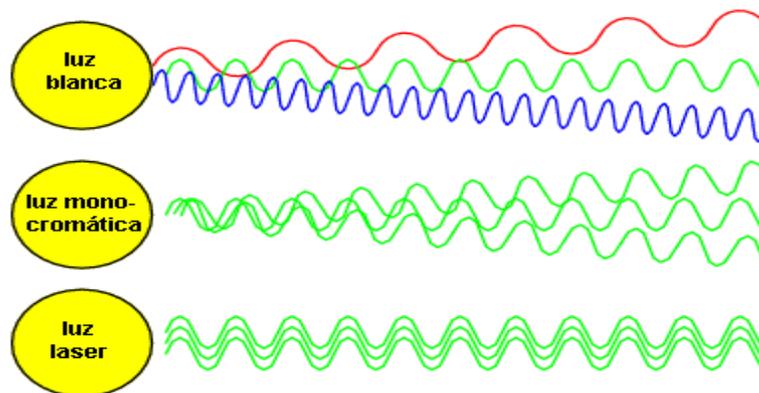


Figura 7.2. En la primera figura de arriba podemos observar la luz emitida por una fuente de luz blanca, que emite fotones en diferentes longitudes de onda, además de ser incoherentes. En la figura de en medio la luz es monocromática pero no está en fase. Por último la luz de un láser se presenta de forma coherente y monocromática.

Dependiendo del tipo de medio activo para obtener átomos excitados que generen fotones, se obtendrá como resultado diferentes longitudes de onda, confiriéndole al láser la característica de ser sintonizable en el rango visible, UV o infrarrojo. El

láser que se utiliza tiene un medio activo que es un cristal, que se va a encargar de doblar, triplicar y cuadruplicar la frecuencia (longitud de onda fundamental en 1064 nm) que equivale a producir luz visible en 532 nm y también luz ultravioleta en 355 nm y 266 nm.

El láser utilizado es pulsado, y puede generar pulsos de alta energía en corto tiempo. Lo anterior es gracias a la conmutación en Q o *Q-switching*, que es un interruptor que obstruye la salida de luz generada por la cavidad, provocando que la inversión de población sea aún mayor y aumente por tanto el número de fotones. Al retirarse el interruptor óptico se produce un pulso de luz con una muy alta energía y con una duración corta (Svelto, 1998).

El equipo utilizado contiene una celda pockels que funciona con la conmutación en Q (Figura 7.3). La celda pockels tiene un cristal con propiedades refrigerantes (un refrigerante puede cambiar la polarización de la luz al incidírsele voltaje) y un polarizador dieléctrico que se basa en el principio del ángulo de Brewster (es el ángulo en el que la luz reflejada es anulada ya que tiene una componente de polarización paralela al plano de incidencia) [Svelto, 1998]. En la siguiente figura se muestra su funcionamiento.

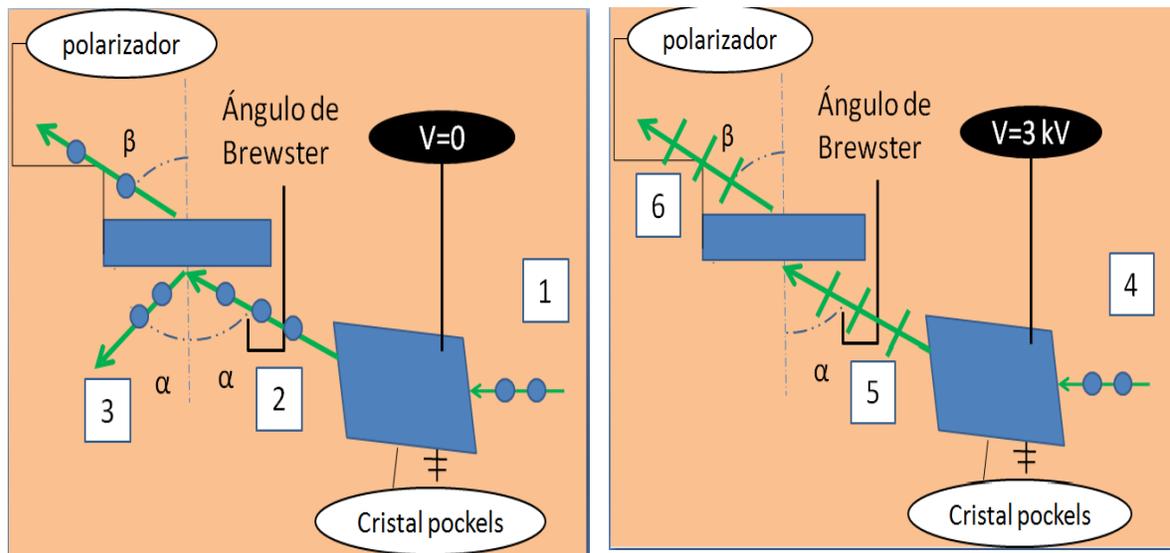


Figura 7.3. La imagen de la izquierda muestra una luz polarizada con componente de polarización perpendicular a la imagen (número 1), incide sobre el cristal pockels que deja pasar la luz sin modificar la dirección de polarización al aplicarse un voltaje igual a 0 (número 2), la luz que sale del cristal llega al polarizador dieléctrico. El polarizador dieléctrico refleja y refracta la luz (número 3). En la imagen de la derecha, el cristal pockels tiene un voltaje mayor a 0 (número 4) que provoca que la luz cambie su polarización (número 5)

y el polarizador dieléctrico elimine el haz reflejado debido al ángulo de Brewster (número 6), esto sirve como un interruptor aumentando la energía del láser. En este diagrama el haz utilizado por el láser es el haz reflejado del polarizador.

A continuación se muestra en la siguiente tabla, un resumen de las características que tiene nuestro láser que se utilizó en los experimentos.

Tipo de láser	Nd:YAG
Longitud de onda que se utiliza En la excitación	355 nm
Frecuencia	10 Hz
Ancho del pulso	8 nanosegundos
Celda pockels	Si
Potencia de salida	0.234 W
Diámetro del haz en la muestra	Aprox. 5 mm
Divergencia de un haz	1 mrad
Longitud de coherencia	4.5 mm

Tabla 7.3. Características del láser utilizado en el arreglo experimental.

## 7.2 Filtros de densidad neutra

En el arreglo experimental se utilizó filtro de densidad neutra, con el fin de atenuar la intensidad de emisión del láser un Nd:YAG y evitar producir apoptosis celular debido a la radiación ultravioleta (Svelto, 1998). La radiación altera y rompe el ADN en las células mononucleares.

Los filtros de densidad neutra son filtros que se encargan de atenuar de forma uniforme todas las longitudes de onda. Los filtros se clasifican de acuerdo a la densidad óptica o ND por sus siglas en ingles. Donde la densidad óptica es la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia, para una longitud de onda dada. Se tiene por ejemplo; un filtro ND a 0.3 correspondiente a una transmitancia del 50% y uno de 3.9 que tiene una transmitancia de 0.012% (la transmitancia es la fracción de luz incidente de una longitud de onda dada que pasa por la muestra) [Artigas, Perea y Ramo, 2002]. El filtro que se emplea tiene una densidad de 3.6.

### 7.3 Celda de cuarzo.

Se utilizó una celda de cuarzo con las cuatro caras transparentes para contener a la muestra, con volumen de 4 ml. La celda de cuarzo se fija a la mesa de trabajo dentro de una montura de aluminio.

El uso de una celda de cuarzo (además de contener a la muestra a analizar) es debido a que el cuarzo es transparente a longitudes de onda que se encuentran en un ancho de banda de 190 a 2,000 nm.

### 7.4 Arreglo 2f y fibra óptica

Se midió la fluorescencia con un arreglo óptico donde la muestra y su imagen se ubican a una distancia dos veces la distancia focal de la lente y en lados opuestos de la misma. Dicha configuración óptica se conoce como un arreglo 2f. También se utilizó una fibra óptica acoplada al arreglo, que transmite la señal de fluorescencia., con características que son las siguientes:

Fibra óptica	Fibra óptica multimodo, diámetro del núcleo de $400 \pm 8 \mu\text{m}$ , diámetro de revestimiento $424 \pm 10 \mu\text{m}$ , diámetro de la cubierta $730 \pm 30 \mu\text{m}$ , para 400 a 2200 nm.
--------------	--

Tabla 7.4. Características de la fibra óptica

### 7.5 Espectrómetro

Se utilizó un espectrómetro modelo Avaspec 2048-USB, que incluye las partes de detección de la señal de fluorescencia, procesamiento y la promediación de la misma. Las siguientes partes se describen a continuación:

7.5.2. Fotodetector.

7.5.3. Monocromador.

7.5.4. Integrador-promediador.

### 7.5.1 Fotodetectores CCD

Los fotodetectores para detección de fluorescencia por lo regular están contruidos a partir de materiales semiconductores. El material semiconductor interacciona con los fotones, provocando que cambie el electrón del elemento semiconductor su banda de valencia a uno de conducción. La energía detectada va depender del material con que se construya el fotodetector. Algunos de estos fotodetectores son los fotodiodos, CCD, que son los que se utilizan en el equipo empleado (Li y Nathan, 2005).

La tecnología CCD viene de sus siglas en ingles (charge-coupled device) que es dispositivo de cargas acopladas, que ha tenido éxito frente a la tecnología CMOS en cámaras fotográficas. Esta tecnología está integrada de una matriz de celdas llamadas pixeles, donde se generan electrones libres (electrones derivados del material de silicio que forma la celda) al momento de ser incididos por fotones, se generan pozos de potencial donde se encuentra almacenada la carga de electrones, estos pueden ser transportados aplicando voltaje sobre las compuertas o electrodos de interconexión a los registros de desplazamiento (shift registers) que están adyacentes a los pixeles. Por último se transporta la carga para posteriormente ser leída y convertida a una señal digital y ser mostrada en una computadora (Li y Nathan, 2005).

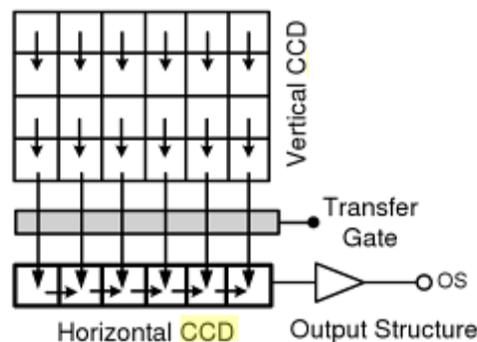


Figura 7.3. En esta imagen se muestra la arquitectura de un sensor ccd, las flechas muestran el movimiento de las cargas (electrones). Se pueden ver los registros horizontales y verticales, que transfieren las cargas, y entre estas existe una puerta de transferencia que evita que los electrones de los registros de desplazamiento vertical vayan hacia el registro desplazamiento horizontal mientras se está vaciando [ilustración modificada del libre de **F. Li, A. Nathan**. CCD Image Sensors in Deep-Ultraviolet: Degradation behavior and Damage Mechanisms. Netherlands, Springer (2005). Cap. 8.]

### **7.5.2 Monocromador tipo Czerny-Turner**

El instrumento Avantes, utiliza un monocromador que es un dispositivo compuesto de elementos ópticos que permiten separar la luz a una banda estrecha de longitudes de onda. Estos instrumentos utilizan:

- 1) Rendija de entrada que evita que una fuente externa entre al monocromador.
- 2) Rendija de salida que estrecha el ancho de banda de la radiación (consiguiendo una mejor resolución espectral).
- 3) Un sistema de colimación integrada por espejos, lentes y una rejilla de difracción (donde la colimación produce haces de luz totalmente paralelos entre sí), un sistema dispersante como son las rejillas de difracción. Estas difractan la luz en las diferentes longitudes de onda que la conforman (con poder de resolución proporcional al número de líneas que forman a la rejilla).
- 4) Un sistema de concentración y enfoque conformada por espejos o lentes.

El equipo tiene un monocromador tipo Czerny-Turner. El funcionamiento de dicho monocromador es el siguiente:

- 1) Se emite luz sobre una rendija, que se encuentra en el foco de un espejo cóncavo.
- 2) Posteriormente la luz es reflejada y colimada por este espejo hacia una rejilla de difracción encargada de aislar la longitud de onda deseada.
- 3) La rejilla de difracción va a difractar parte de la luz a un espejo cóncavo que reflejará la luz colimada y separada a una rendija que es la salida del monocromador.

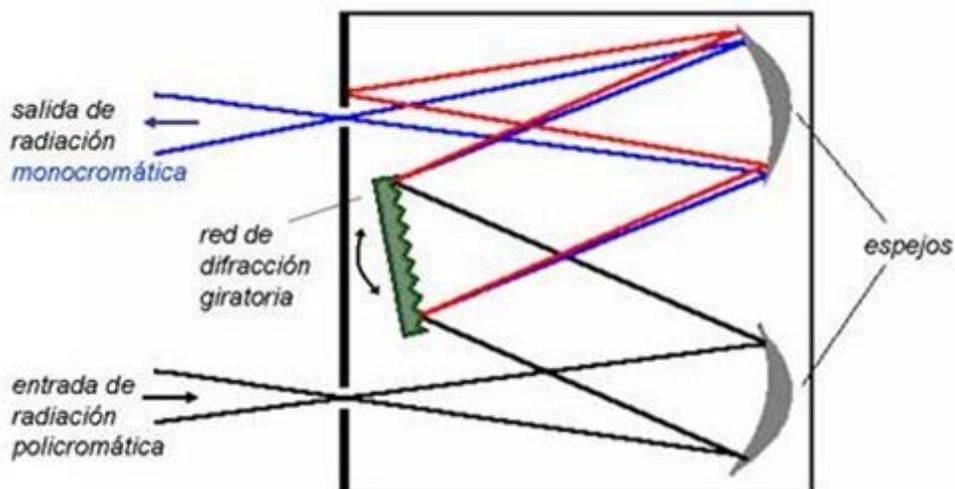


Figura 7.4. Se muestra la configuración de un monocromador tipo Czerny-Turner conformado por espejos, rejilla de difracción y rendija de entrada y salida [ilustración modificada del libro C. Silva García, M. J. García Bermejo. Laboratorio de bioquímica. Editorial MAD, S.L. Primera edición. España. (2006). Cap. 1.].

### 7.5.3 Integrador-promediador

El equipo Avantes tiene un integrador–promediador que es un dispositivo que sirve para integrar los pulsos de fluorescencia y mostrar su espectro, por lo que se forma una curva gaussiana y se promedia sobre cierto número de muestras para convergerla al valor medio de la señal y disminuirle el ruido.

Una vez mencionado cada uno de los elementos que conforman el equipo con el que se hicieron las mediciones de los espectros de fluorescencia, vamos a dar las características y los tipos de tecnología que utiliza.

El dispositivo cuenta con un arreglo lineal de fotodetectores CCD a 2048 pixeles, un dispositivo que funciona como un monocromador en configuración Czerny-turner con una longitud focal de 75 mm, también tiene un integrador-promediador, que integración la señal de 1.1 ms a 10 min y la relación señal a ruido es de 200 a uno. A continuación se muestran las características del contenido de este equipo

Configuración óptica del monocromador	Czerny-Turner, 75mm la distancia focal
Rango de longitud de onda	200- 1100 nm
Rejilla de difracción	300 líneas/mm
Resolución	0.05- 20 nm
Detector	Arreglo lineal CCD de 2048 pixeles
señal/ruido	200:1
Convertidor analógico digital	Resolución de 16 bits y muestreo de 200 MHz
Tiempo de integración	1.11 ms – 10 minutos
Fuente de alimentación	USB

Tabla 7.5. Características del espectrómetro Avantes (modelo Avaspec 2048-USB).

A partir de este equipo se obtuvieron los espectros de la señal de fluorescencia que provenían del arreglo 2f construido. La señal posteriormente se transmitió por vía USB a la computadora.

### 7.6 Funcionamiento del sistema.

La frecuencia del láser de Nd:YAG (1064 nm) es triplicada para obtener una señal en una longitud de onda a 355 nm, ya que como se explicó está dentro del rango de longitudes de onda de absorción de la molécula del NADH con el fin de excitarla y producir fluorescencia. El haz emitido por el láser es reflejado por dos espejos colocados a 45° al haz incidente, dirigiéndola a la celda de cuarzo que contiene la muestra (la celda de cuarzo es utilizada ya que no absorbe la luz ultravioleta). La detección de fluorescencia de la muestra se realizó a una distancia de 16 cm y a una altura de 6.5 cm, esto se realizó con un arreglo 2f que converge la señal a la fibra óptica, esta última a su vez conduce la fluorescencia captada al espectrómetro Avantes. La señal es promediada e integrada a 500 ms, por último, el espectro de fluorescencia se despliega en la computadora por medio del software del equipo Avantes. Se muestra a continuación dicho arreglo.

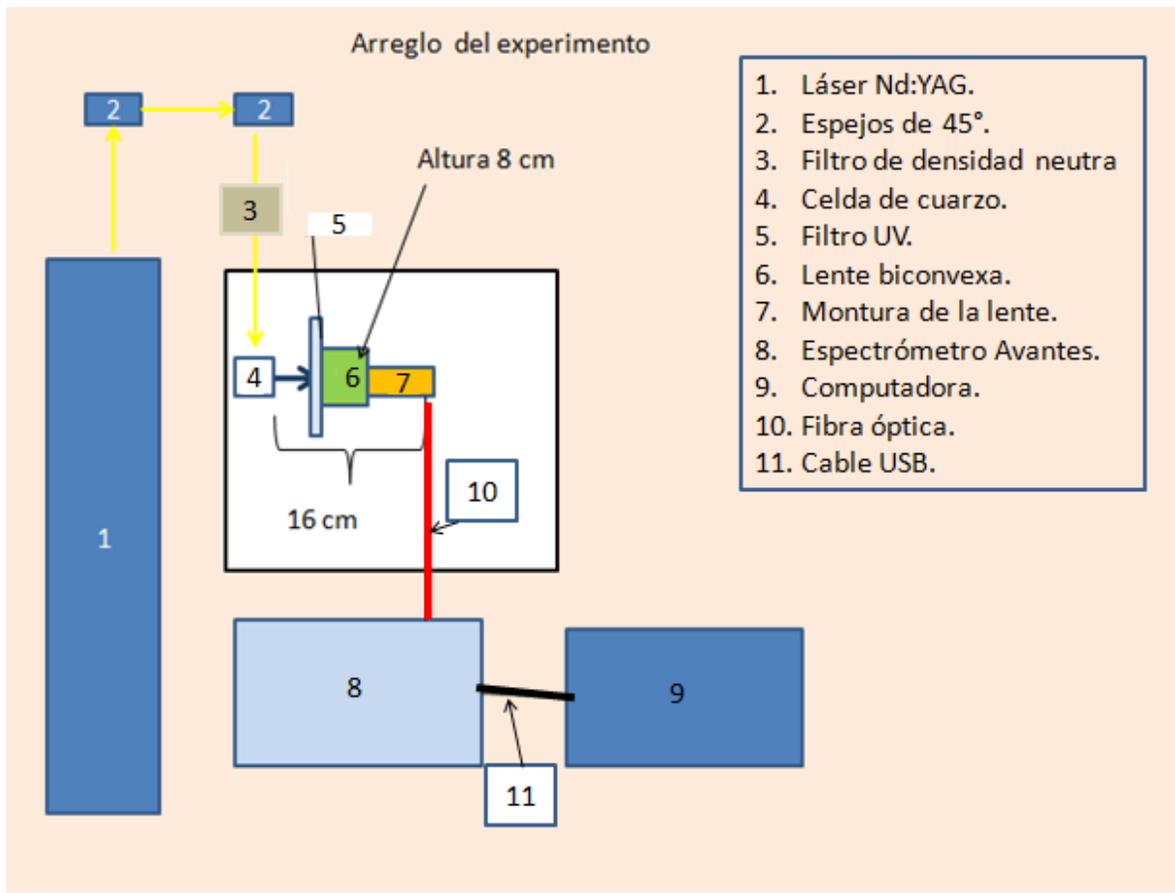


Figura 7.5. Diagrama que muestra los componentes de registro de los espectros de fluorescencia de las muestras. Las flechas amarillas indican la dirección del haz del láser hacia la muestra y la flecha azul corresponde a la emisión de fluorescencia.

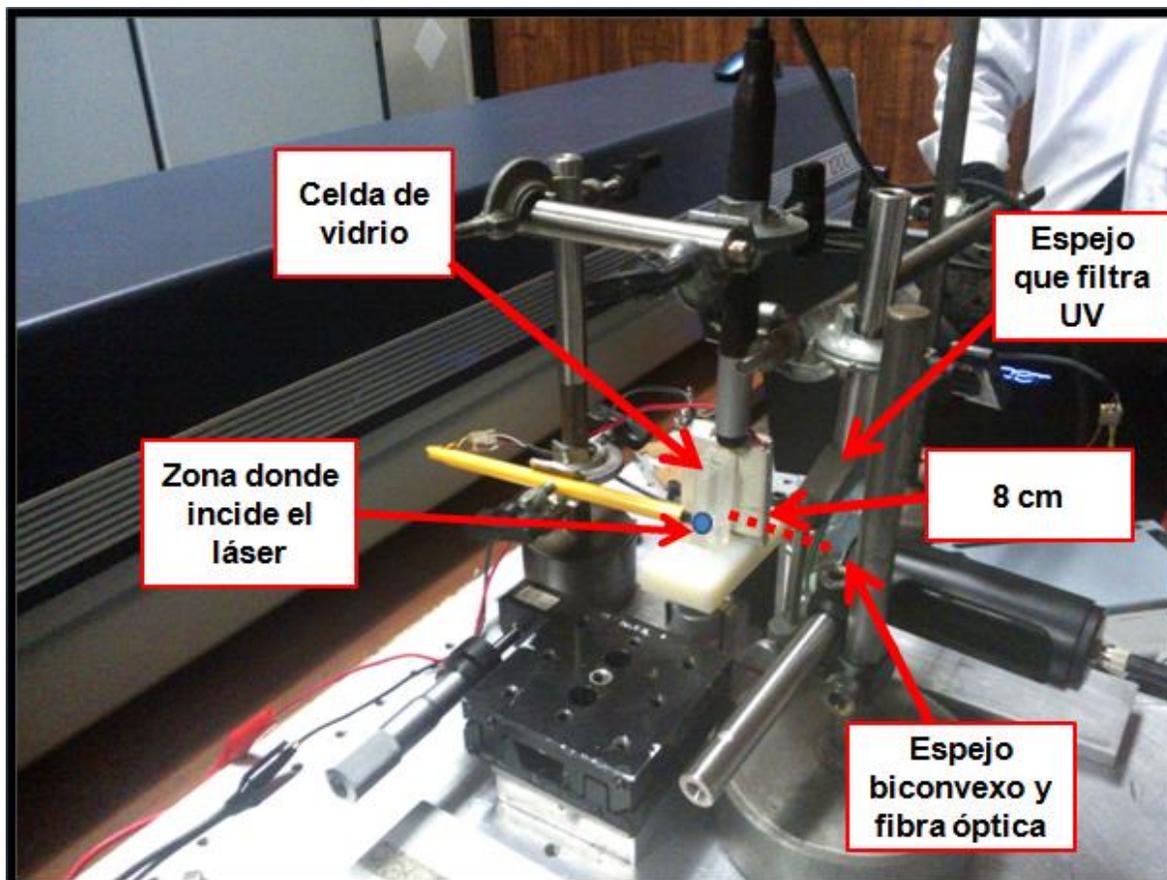


Figura 7.6. Arreglo experimental utilizado en el experimento.

A continuación se mostrarán los espectros de cumarina y NADH purificado que se obtuvieron para encontrar el lugar más sensible del equipo al rango de longitud de onda en 420-480 nm (Mayevsky y Rogatsky, 2007).

En la siguiente imagen se observa el espectro de la cumarina a una concentración a .2 mM utilizando como solvente Alcohol al 100%. Dicha concentración de la cumarina se llevó a cabo, a partir de las especificaciones del fabricante Exciton, con el fin de observar su fluorescencia.

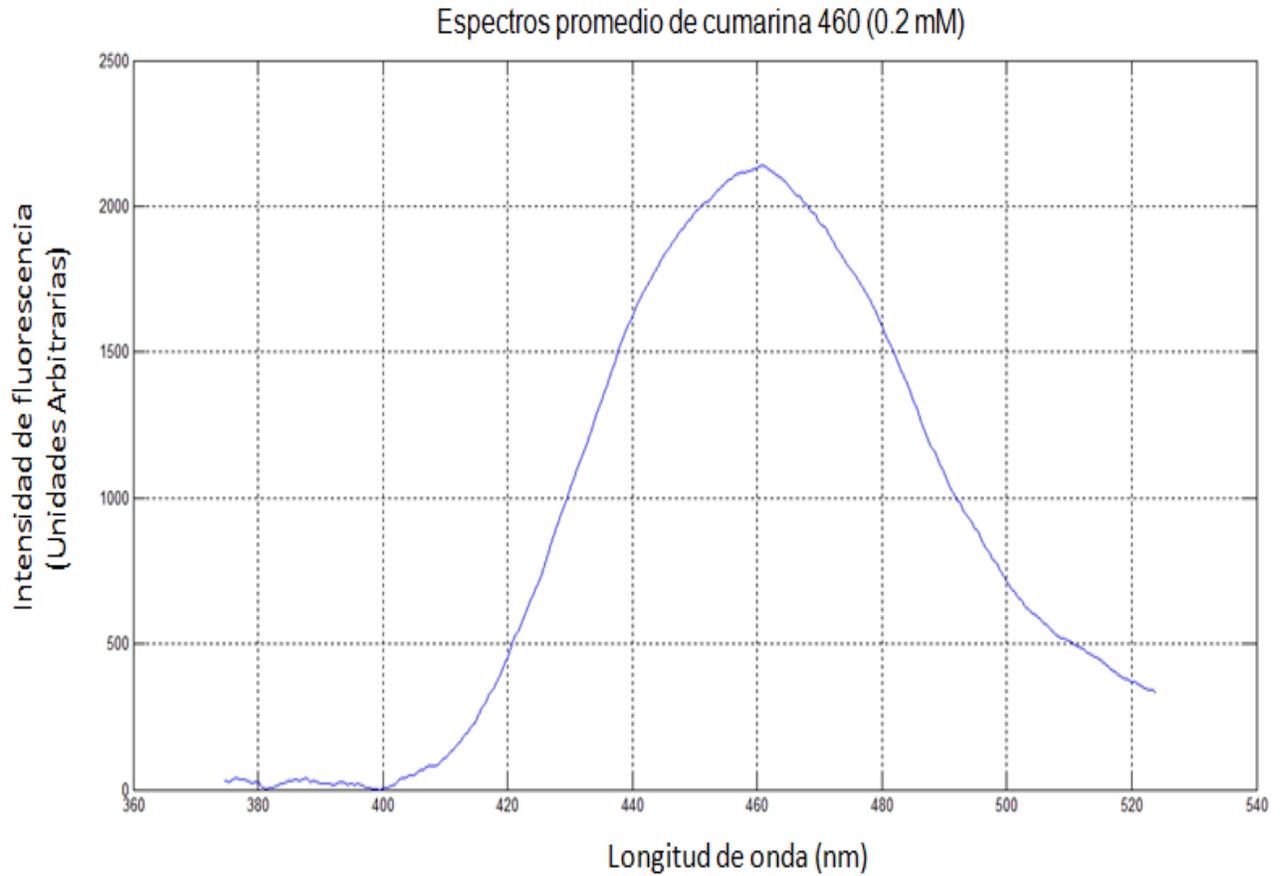


Figura 7.6. Espectro promedio de la cumarina 460 con una concentración de 0.2 mM. La emisión máxima se encuentra en 460 nm.

Se realizó una medición de la emisión máxima de la cumarina en el tiempo, (figura de la siguiente página) a una concentración de 50 mM y durante una hora, con el fin de monitorear la estabilidad del láser.

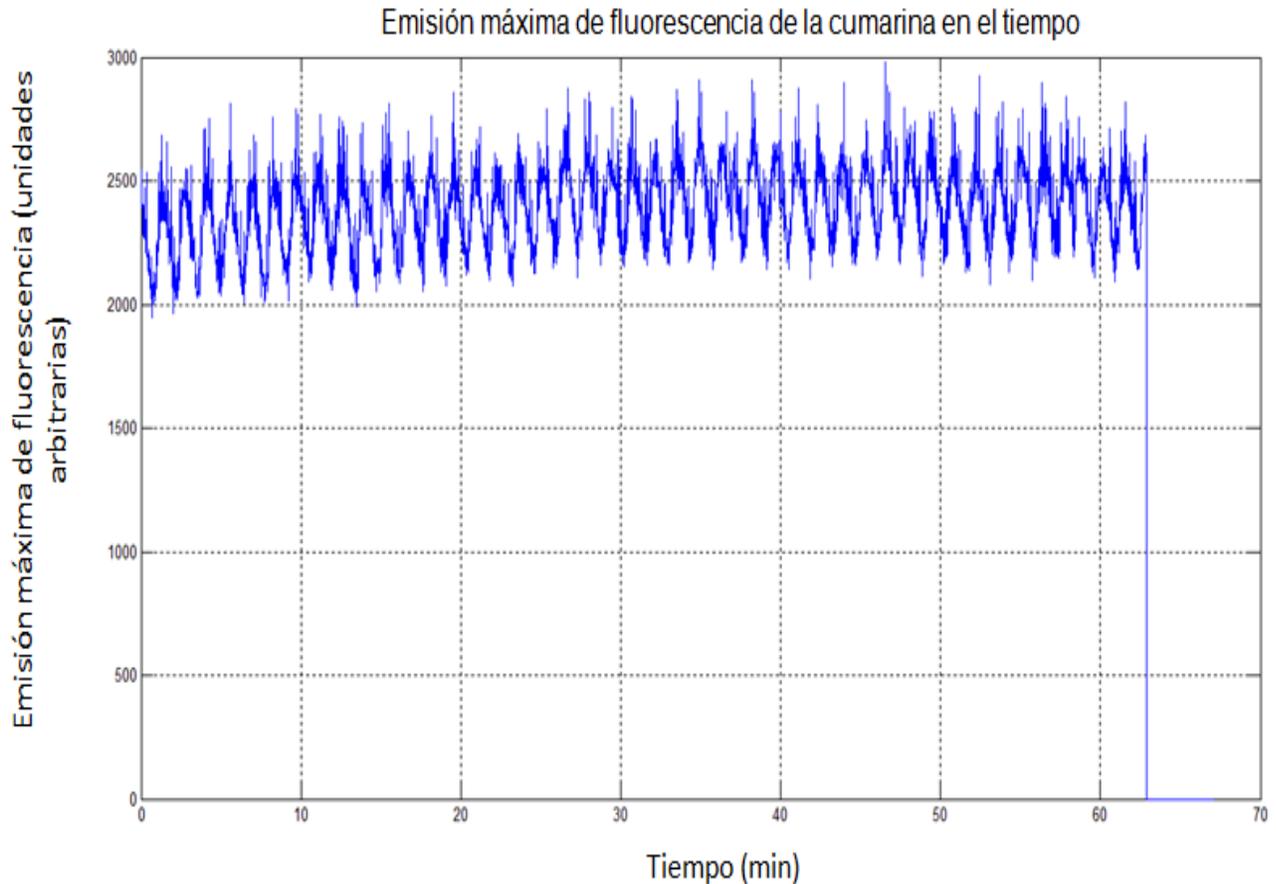


Figura 7.7. Registro durante una hora de la estabilidad del láser Nd: YAG con cumarina a 50 mM. Se observa una señal periódica senoidal con un periodo promedio aprox. de una hora.

En los siguientes espectros se utilizó un filtro de densidad neutra, que redujo la señal a 504  $\mu\text{W}$ . Como se había mencionado, esto se utilizó para no producir daños en las células, sobre todo porque la muestra sería incidida continuamente en el tiempo por la luz UV. Se muestra a continuación los espectros de fluorescencia de Cumarina a 50  $\mu\text{M}$ .

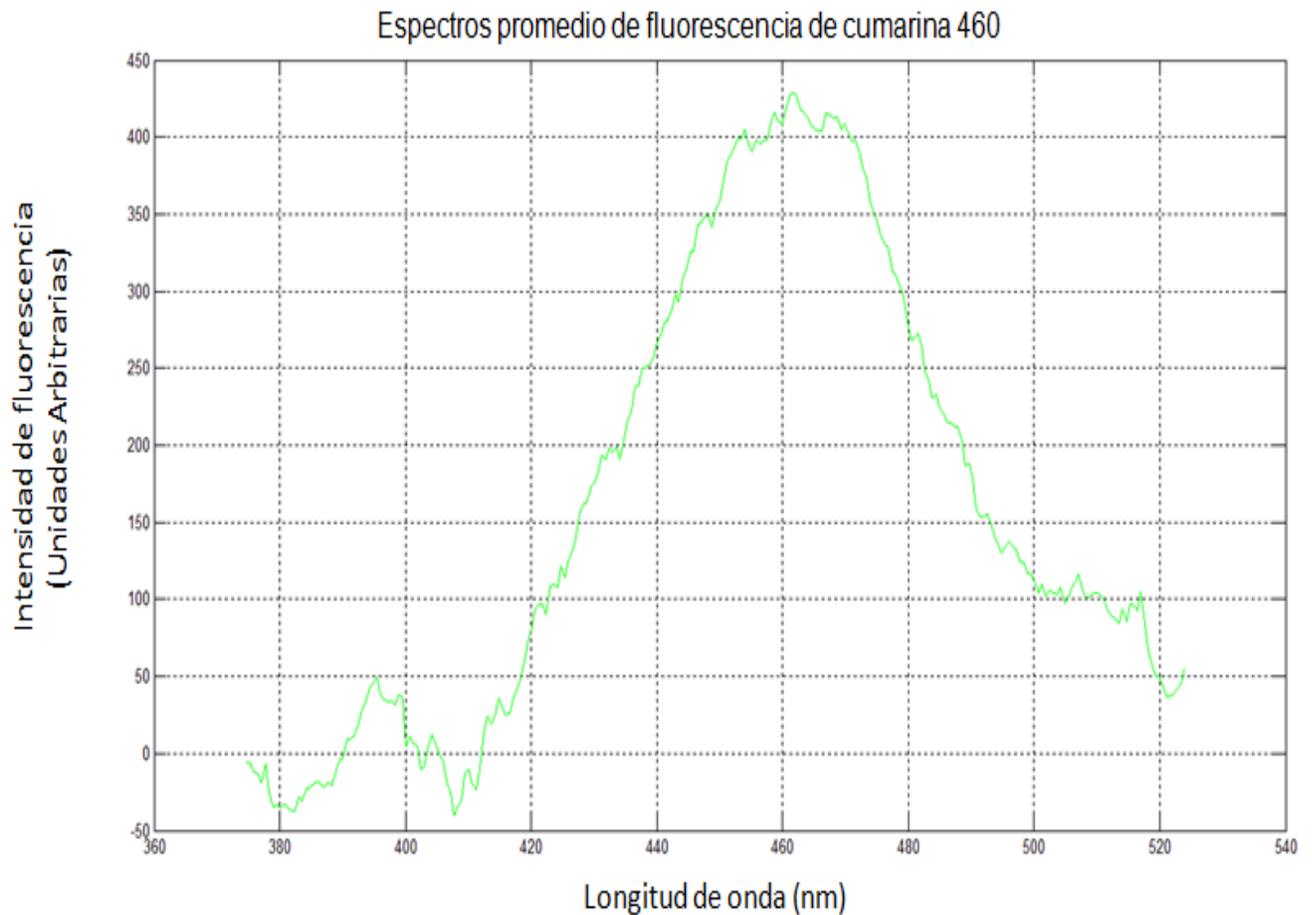


Figura 7.8. Espectro promedio de la cumarina 460 con una emisión máxima de fluorescencia en 468.7 nm. La muestra se encuentra 50  $\mu\text{M}$ .

También se obtuvieron las gráficas en el tiempo de la emisión máxima de la cumarina a la misma concentración.

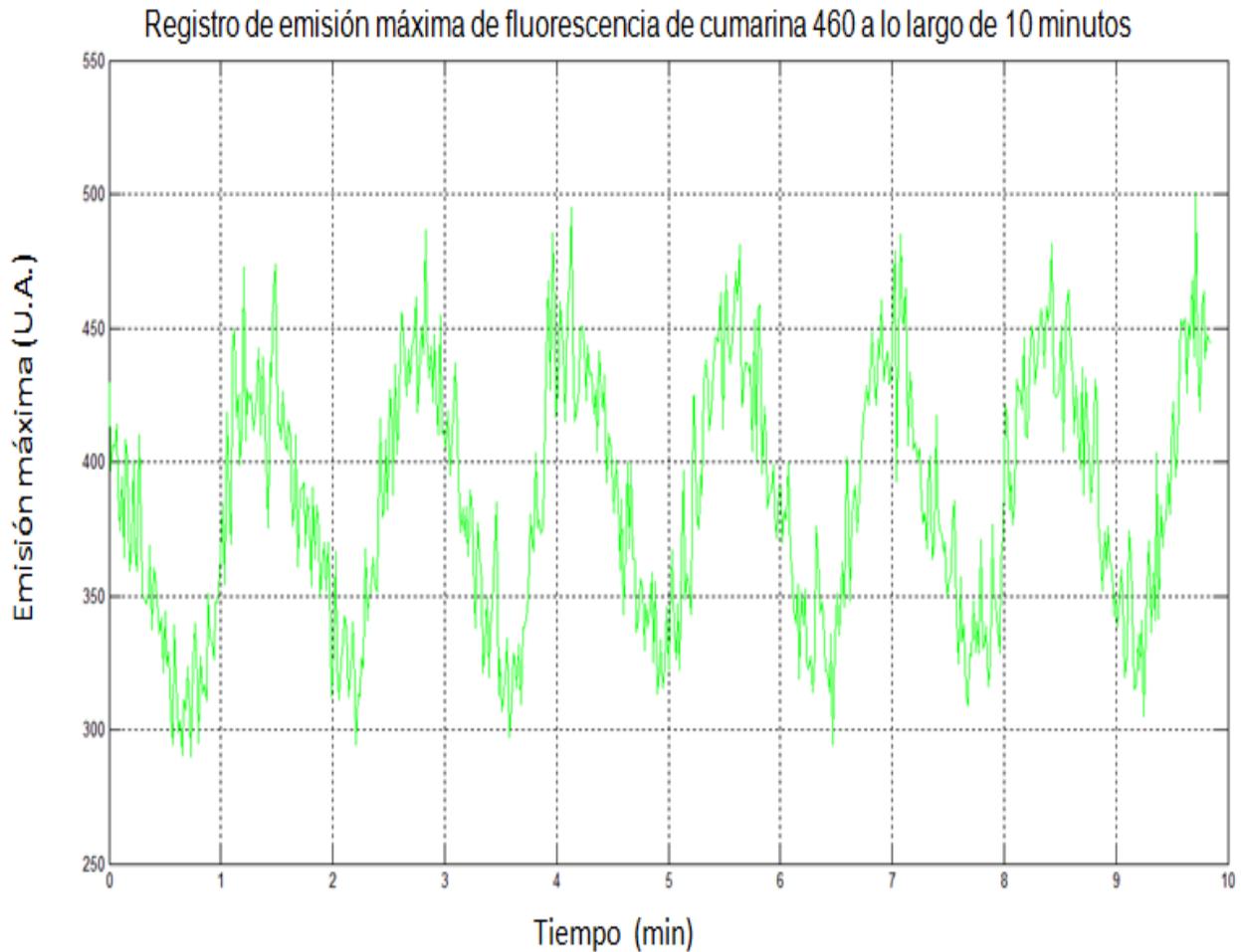


Figura 7.9. Gráfica en el tiempo de emisión de fluorescencia de la cumarina a una concentración de  $50 \mu\text{M}$ . Se puede observar que hay variaciones senoidales propias del láser como se ilustró en la Figura 7.7.

Se obtuvo el espectro del NADH purificado (marca Sigma) a concentraciones de  $50 \mu\text{M}$  que corresponden a valores fisiológicos. Se añadió un buffer de tris a  $.01\text{M}$  y a un pH de 7.2.

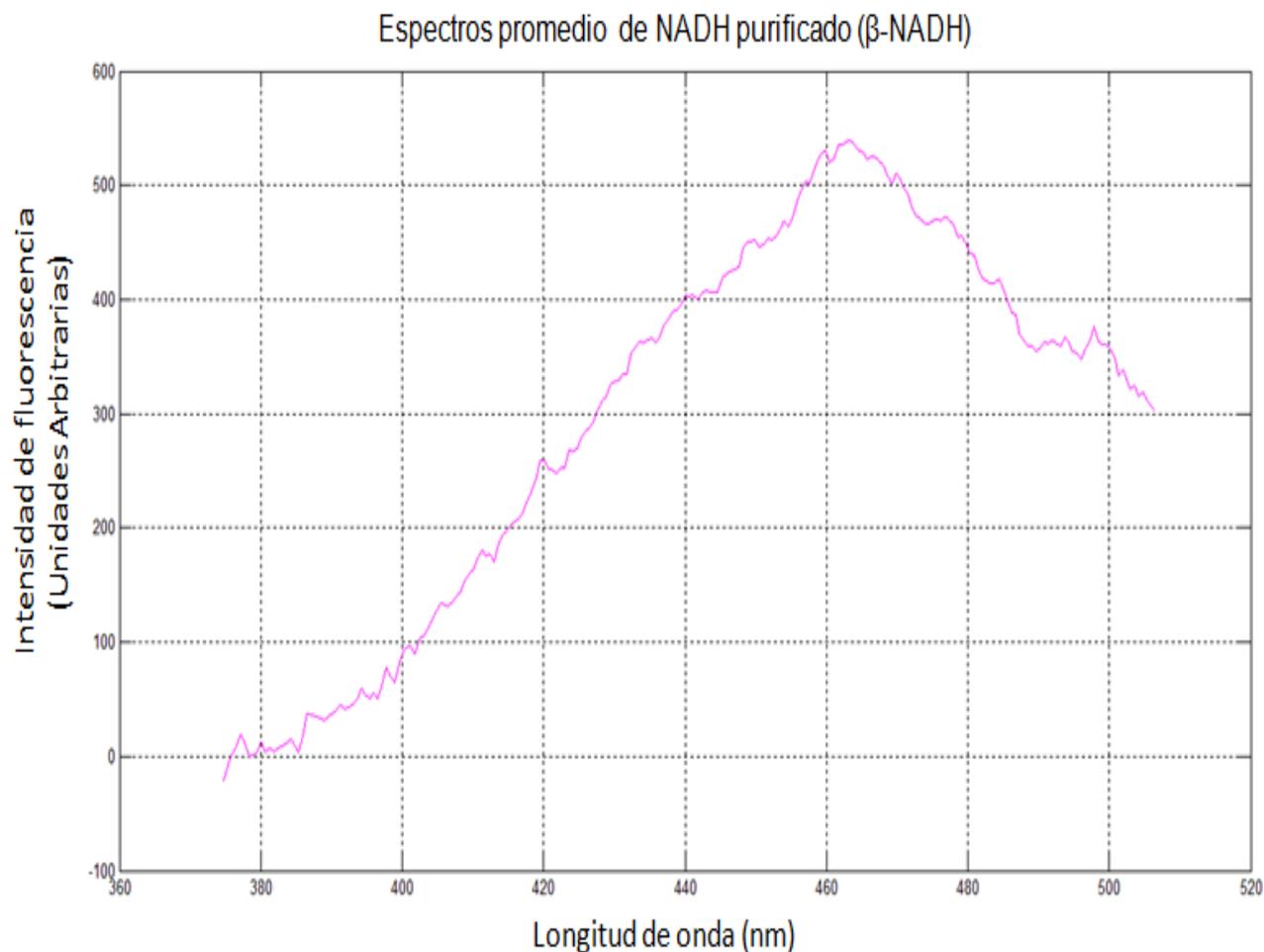


Figura 7.9. Espectro del  $\beta$ -NADH de la marca Sigma a la concentración de 50  $\mu$ M + Tris como buffer (emisión máxima de fluorescencia en 463 nm).

Posteriormente se utilizó PBS (solución salina amortiguada por fosfatos) como vehículo neutro para las células mononucleares, por lo que se registró el espectro de la misma, con el fin de observar alguna interferencia del PBS en la señal de fluorescencia del NADH en células.

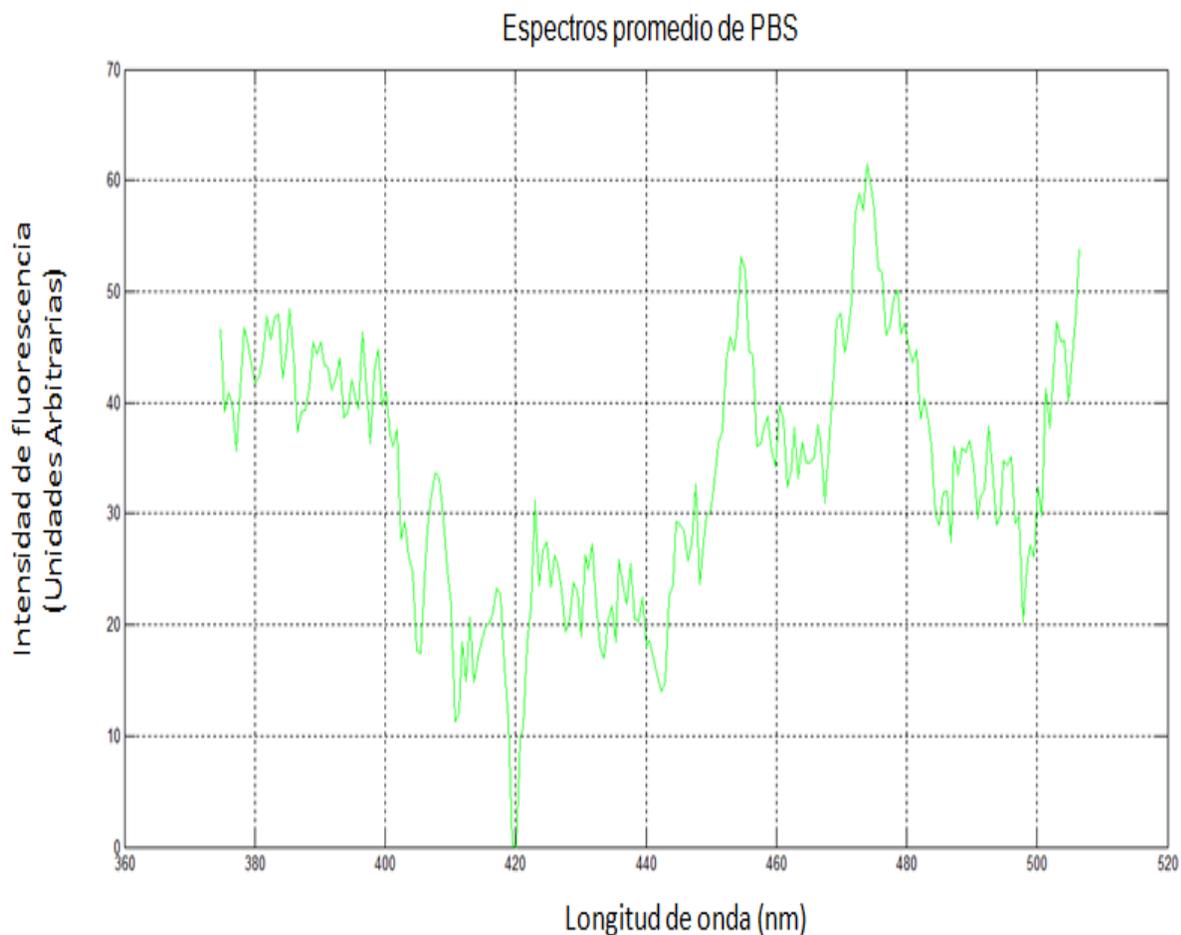


Figura 7.10: Espectro obtenido del PBS dentro del rango donde se obtiene la emisión de fluorescencia del NADH.

### 7.7 Obtención de la muestra.

La desnutrición en ratas se hizo por competencia de alimento (lactancia), se hizo el seguimiento del peso de la camada a lo largo de 21 días. La báscula a utilizar fue Salter Brecknell, con resolución de 0.001 kg y capacidad máxima de 6 kg. Las ratas tanto bien nutridas (control) como las ratas desnutridas (experimentales) fueron de la cepa Wistar. La sangre se obtuvo por una punción cardiaca en las ratas con desnutrición como control a la edad de 21 días.

Las ratas control y experimentales fueron anestesiadas con isofluorano en una cámara de acrílico. Dicha cámara fue diseñada para anestesiarse o sacrificarse a los animales del bioterio.

Se realizaron los experimentos con dos camadas, a las que se les practicó el protocolo de desnutrición. Se muestran a continuación, los pesos y el grado de desnutrición de las mismas. El grado de desnutrición se obtuvo a partir de los pesos del promedio de los controles comparándolos con los miembros de la camada de ratas desnutridas.

Camada 1: La camada se realizó con 14 ratas, alimentadas por una rata nodriza. A partir de la tabla de pesos de las ratas desnutridas y de la rata control se obtuvo el grado de desnutrición de las ratas experimentales. Los pesos que se registraron a los 21 días de edad son los siguientes:

<b>Tipo de rata</b>	<b>Peso en gramos</b>
Rata control 1	57

Tabla 9.1 Rata control de 21 días (primera camada).

<b>Tipo de rata</b>	<b>Peso en gramos</b>	<b>Grado de desnutrición</b>
Rata desnutrida 1	39	2°
Rata desnutrida 2	27	3°
Rata desnutrida 3	42	2°

Tabla 9.2 Ratas desnutridas de 21 días (primera camada).

Camada 2: La camada se hizo con 16 ratas, alimentadas por una rata nodriza. Se les midió su peso desde el día 0 (nacimiento) hasta el día 21 (obtención de la sangre periférica). Los pesos de las ratas se muestran a continuación:

<b>Tipo de rata</b>	<b>Peso en gramos</b>
Rata control 1	56
Rata control 2	57
Rata control 3	58
Rata control 4	60
Promedio	57.7

Tabla 9.3. Tabla con pesos de cuatro ratas control y su promedio, tomada a los 21 días de vida.

Numero de rata	Peso en gramos	Grado de desnutrición
Rata 1	34	3º grado de desnutrición
Rata 2	34	3º grado de desnutrición
Rata 3	34	3º grado de desnutrición
Rata 4	38	2º grado de desnutrición

Tabla 9.4. Pesos y tipo de desnutrición, el cálculo de la desnutrición se hizo con respecto al promedio de las ratas control a los 21 días de edad.

A continuación se muestran los porcentajes de los distintos grados de desnutrición de la segunda camada de ratas desnutridas:

### grados de desnutrición

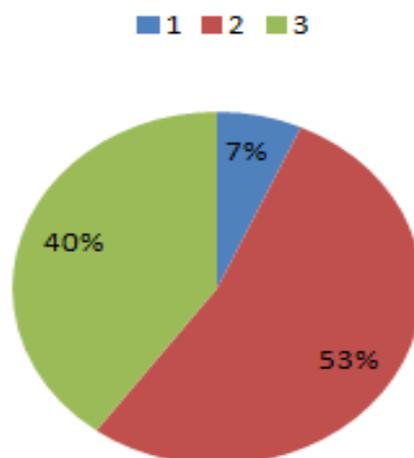


Figura 7.11. Aquí se muestran los porcentajes de grados de desnutrición que tuvo la camada de ratas desnutridas, este porcentaje se hizo comparando ratas desnutridas con el peso promedio de ratas bien nutridas (control).

#### 7.7.1 Obtención de las células mononucleares.

Se extrajeron 1.5 ml de sangre periférica (punción cardiaca) con una jeringa estéril de 3 ml con 0.1 ml de Heparina para evitar que se coagulará la sangre. Una vez obtenida la sangre se depositó en un tubo de ensayo y esta se diluyó con PBS (el PBS se hizo con NaCl a 138 mM, KCl 3 mM,  $Na_2HPO_4$  a 8.1 mM,  $KH_2PO_4$  1.5 mM y se ajustó el pH a 7.4 con HCl). Posteriormente se utilizó un gradiente de densidad (ficoll 1.077) en un tubo de ensayo y se colocó la sangre

diluida encima del gradiente de densidad y se centrifugó a 600 G (fuerza centrífuga) durante 15 minutos, con el objetivo de separar las células mononucleares de la sangre. Se recolectó la capa blanca de células mononucleares con una pipeta pasteur y se depositó en un volumen arbitrario, (usualmente se pone 1.5 ml de PBS). Se centrifugó a 400 G durante 15 minutos. Una vez centrifugado se obtuvo una pastilla blanca de células mononucleares, desechándose el líquido sobrenadante de la pastilla en el fondo del tubo de ensayo y resuspendiéndola con una pipeta pasteur. Al final de la resuspensión se colocan 1.5 ml de PBS para depositarlas en la celda de cuarzo.

### **7.8. Ajuste de curvas de espectros de fluorescencia del NADH del grupo de ratas desnutridas y bien nutridas.**

El NADH es una molécula con la función de transferir electrones a la cadena respiratoria, en el proceso se oxida para producir NAD<sup>+</sup> y regresar a la glucólisis y al ciclo de Krebs. En estas reacciones el NADH se puede encontrar ligado a enzimas, sin las cuales no se produciría ATP, por lo que es importante conocer la cantidad de NADH ligado a proteína y NADH-libre (NADH que no se encuentra unida a proteína o algún otra sustancia), ya que son indicadores sobre el metabolismo bioenergético en células. La deconvolución de las señales del NADH en células mononucleares controles y desnutridas (Figura 8.8), permitió obtener la relación del NADH-proteína/NADH-libre (Silva, 2010). La deconvolución de las señales se realizó usando el programa OriginLab versión 8; este programa hace un ajuste con el algoritmo de Marquardt-Levenberg.

Se realizó el ajuste de curvas del  $\beta$ -NADH y se obtuvo componentes patrones del NADH libre para compararlos con las emisiones máximas del NADH de células mononucleares. En la literatura las intensidades máximas del  $\beta$ -NADH con una concentración de 10  $\mu$ M en PBS, se han reportado en 456 nm (Mayevsky y Rogatsky, 2007), por otro lado con un amortiguador de pH (Mops) se ha encontrado en 470 nm (Lakowitz, Szmanski, Nowaczyk y Johson, 1992). Otros reportan que el NADH libre celular tiene una emisión máxima en 460 nm (Huber, Bücher, Li Schlieter, Dorte y Riepe, 2000). Para la obtención de las emisiones máximas en estos experimentos, se usó como fuente de excitación un láser en 355 nm.

El NADH ligado a proteínas, se ha reportado con una emisión máxima de fluorescencia desplazada a la izquierda comparada a la del NADH libre, por ejemplo, con CtPB (co-represor transcripcional), se encuentra la intensidad máxima en 425 nm, a partir de una fuente de excitación láser en 340 nm (Fjeld, Birdsong y Goodman). En otras proteínas como la enzima alcohol deshidrogenasa (40  $\mu$ M) se tiene en 451 nm (Huber et al., 2000), para la glutamato

deshidrogenasa (40  $\mu\text{M}$ ) en 463 nm. Otros autores han identificado al NADH unido a proteínas en 430 nm (Kasimova et al. 2006).

Los resultados de este ajuste de curvas para los dos grupos se muestran en el siguiente capítulo.

## **8.0 RESULTADOS**

### **8.1 Resultados de los espectros de fluorescencia del NADH de células mononucleares de ratas con desnutrición y bien nutridas**

Se hicieron dos experimentos con ratas desnutridas (dos camadas, como se mencionó en el capítulo anterior). La primer camada contaba con 14 individuos, con los que se obtuvieron tres espectros de fluorescencia del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas y otro espectro de una rata bien nutrida, ambas de 21 días de edad; sin embargo, se tenían problemas de estabilidad del láser Nd:YAG. En ese momento la potencia de salida era de 30 mW en el haz ultravioleta, sin utilizar el filtro de densidad neutra.

Posteriormente se hicieron ajustes al láser Nd:YAG (en el capítulo Anexo se muestra dicho ajuste), se alcanzó una región de estabilidad. Por lo que se hizo un segundo experimento con una segunda camada de 16 ratas desnutridas, obteniendo el espectro de NADH de células mononucleares de 4 ratas desnutridas (experimentales) y 4 ratas bien nutridas (control).

Así mismo, se tomaron espectros de fluorescencia con ratas sanas con muestras de células diluidas al 50%, con la intención observar efectos de la densidad celular en la emisión de fluorescencia del NADH celular.

A continuación se muestran los resultados de los espectros de fluorescencia del NADH de células mononucleares de la primera camada.

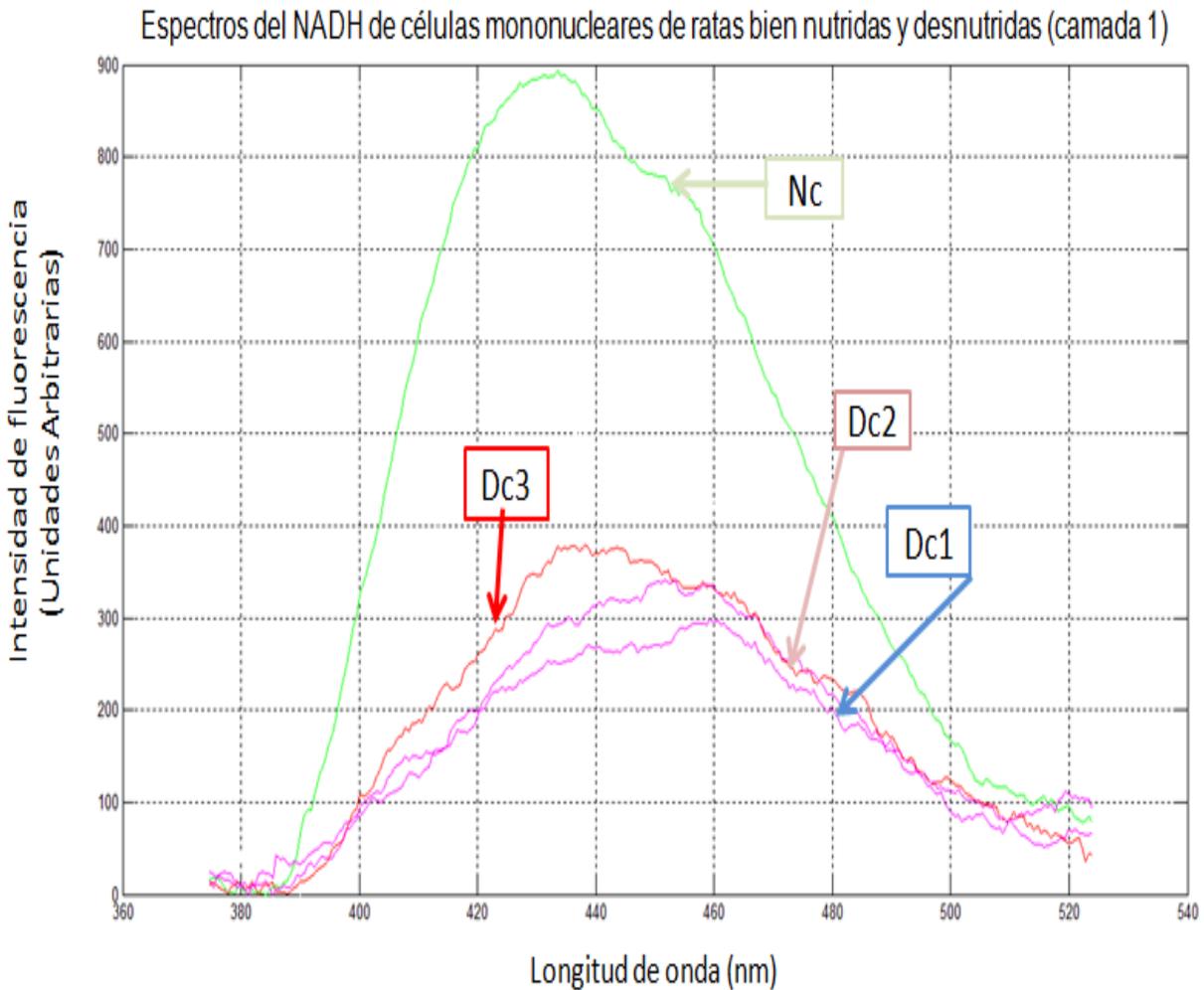


Figura 8.1 Espectro del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas de 21 días (Dc1, Dc2, Dc3) y de rata control (Nc).

Se obtuvieron espectros promedio de células mononucleares. Los espectros promedio (Nc, DC1, DC2 y DC3), provienen de 152 muestras obtenidas a lo largo de 10 minutos.

Tiempo después se promediaron los espectros de ratas desnutridas y se obtuvo un espectro promedio 65% menor comparado a la rata control, (Figura 8.2). La máxima emisión del espectro de NADH en la rata nutrida se encuentra a una longitud de onda de 431.1 nm y en la rata desnutrida 452.3 nm.

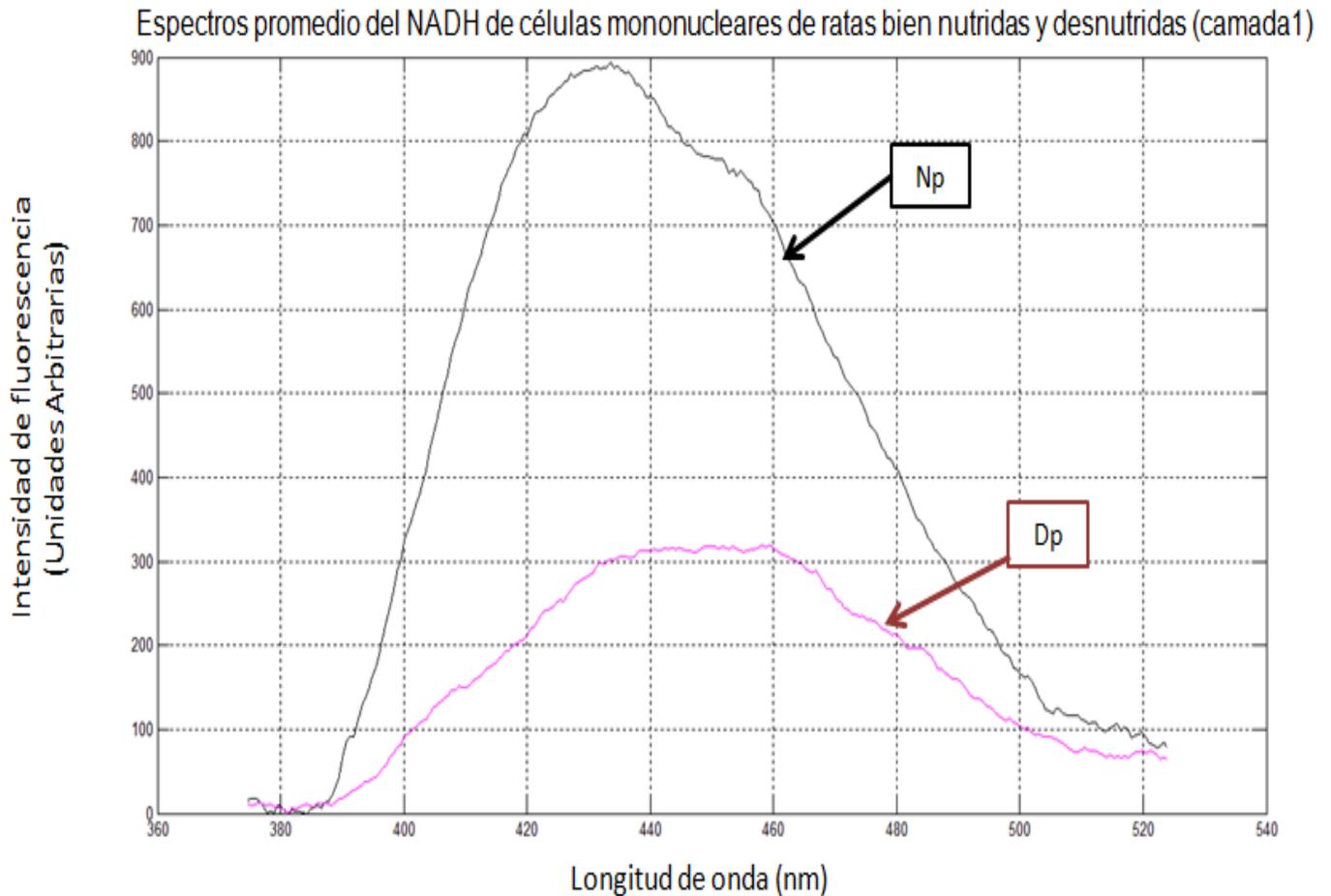


Figura 8.2 Espectro de fluorescencia promedio del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas de 21 días (Dp) y de rata control (Np), correspondientes a la camada 1.

Las ratas desnutridas tienen una menor densidad celular de células mononucleares que las ratas bien nutridas, por lo que se hicieron diluciones de las muestras con células mononucleares de 4 ratas bien nutridas. Las muestras fueron suspendidas en 1.5 ml de PBS y se obtuvo el espectro de fluorescencia de cada una de ellas. Posteriormente las mismas muestras se diluyeron en 3 ml de PBS y se tomaron los espectros de fluorescencia.

Espectros de NADH de células mononucleares diluidas y sin diluir

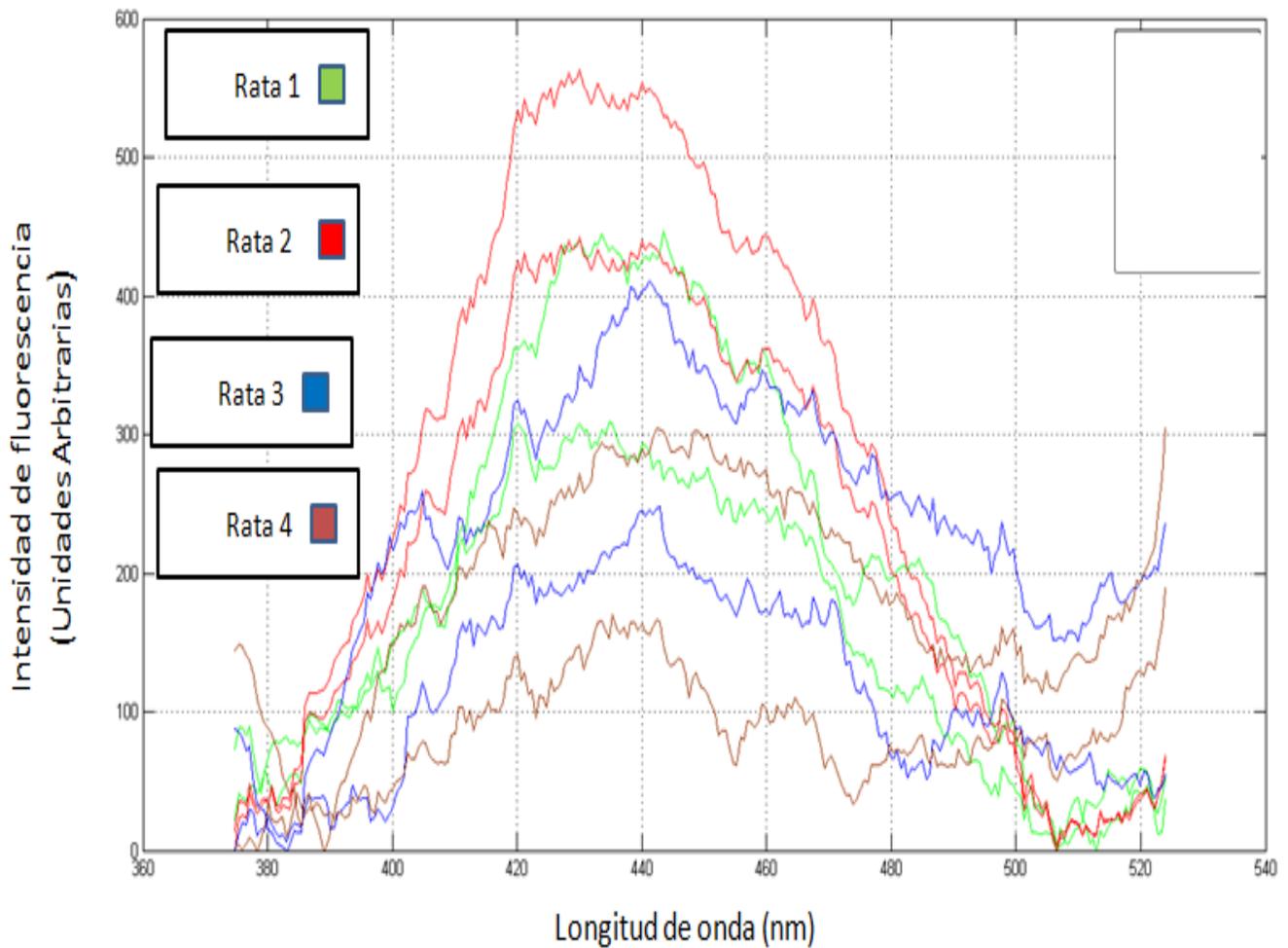


Figura 8.3. Espectro de cada una de las muestras obtenidas de 4 diferentes ratas (donde la rata 1 está en verde, la rata 2 en rojo, la rata 3 en azul y la rata 4 en café). Las muestras más grandes corresponden a las señales sin diluir y las señales menores a la muestra diluida al 50%. En estos espectros presentamos varias señales con dos que tienen el mismo color, siendo la señal menor la correspondiente a la diluida.

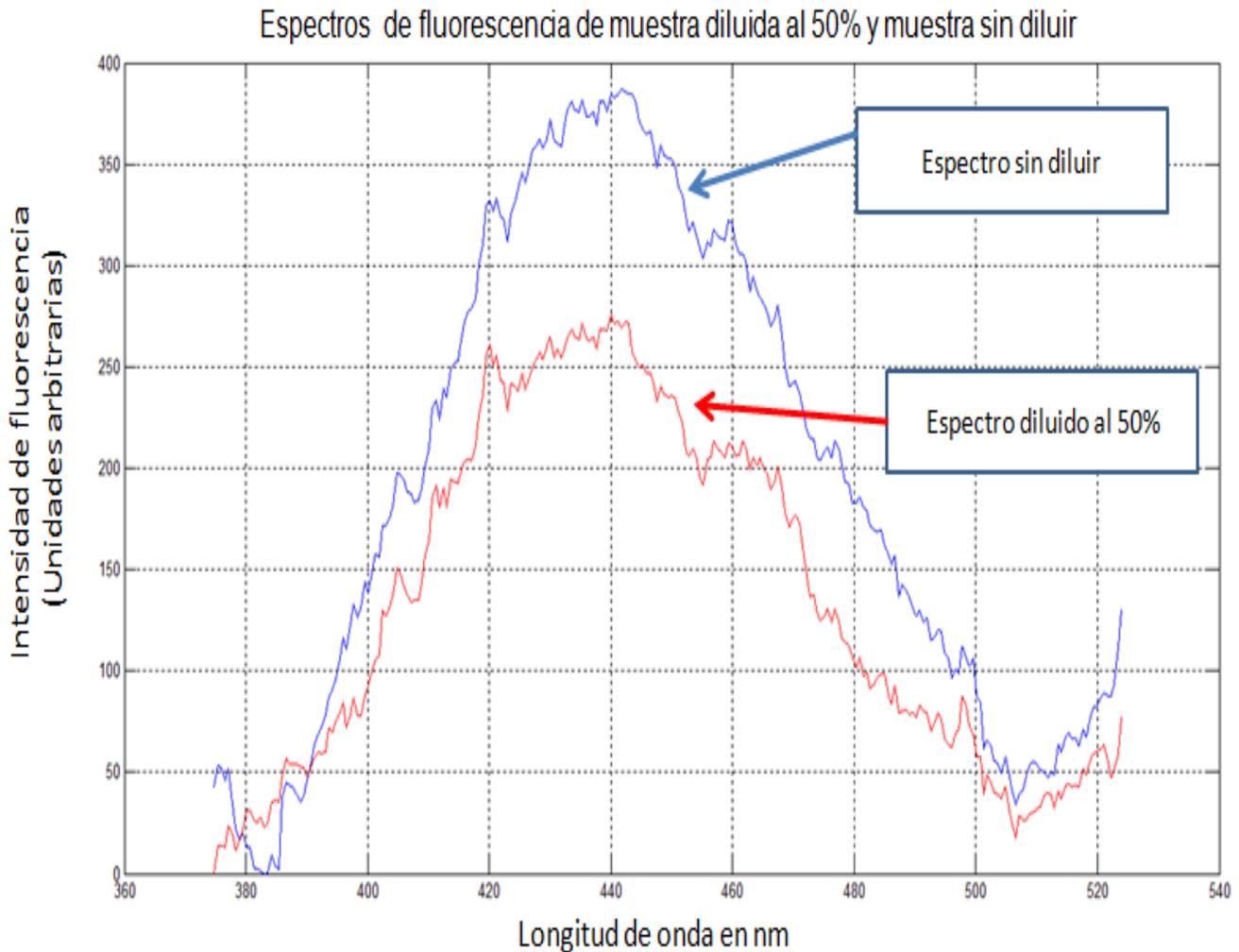


Figura 8.4. Espectro promedio de fluorescencia del NADH de células mononucleares de 4 ratas bien nutridas a lo largo de 10 minutos. El espectro azul corresponde a células mononucleares (suspendidas en 1.5 ml de PBS) y el espectro rojo está diluido al 50% con PBS. La diferencia de amplitud es del 30% entre el espectro azul y el rojo. En el espectro de muestras sin diluir, la emisión máxima se encuentra en 441.8 y en las muestras diluidas el promedio fue de 440 nm.

Se muestra a continuación la siguiente gráfica comparativa entre los promedios de intensidad de fluorescencia de las muestras diluidas y no diluidas de células mononucleares. Se muestra también el valor de  $p$ , obtenida a partir de la prueba  $t$ , la cual muestra que no hay diferencias significativas.

### Comparación de intensidad de fluorescencia de NADH de CM entre muestras diluidas y sin diluir

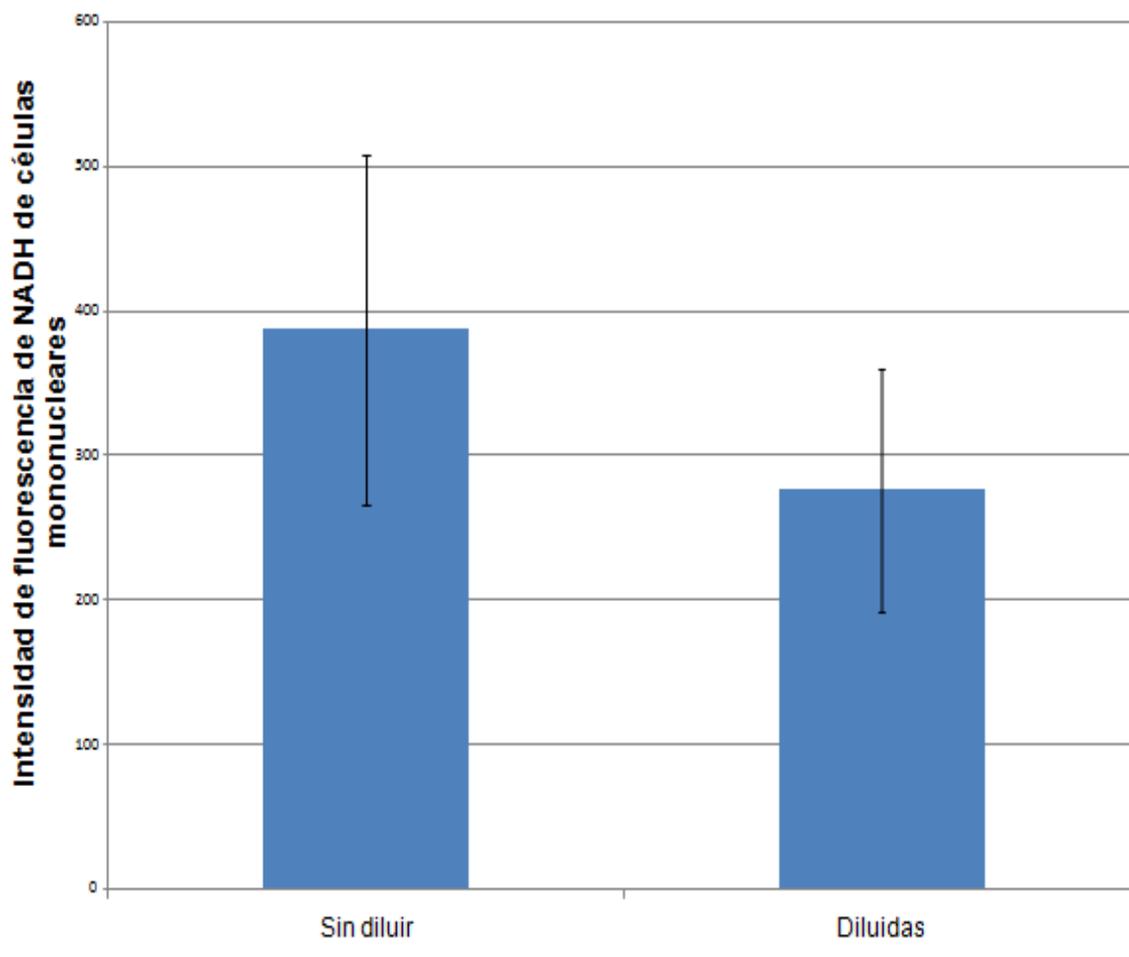


Figura 8.5. Gráficas comparativas de los promedios de intensidad de fluorescencia de NADH de células mononucleares (CM) entre el grupo sin diluir (4 ratas,  $I = 387 \pm 121.4$ ) y diluido (4 ratas,  $I = 276 \pm 84.6$ ) al 50% con una  $*p > 0.05$  (NOTA:  $I =$  intensidad de fluorescencia de NADH de células mononucleares).

Posteriormente, se obtuvieron espectros de fluorescencia del NADH de células mononucleares de 4 ratas bien nutridas (control) y de 4 ratas desnutridas (experimentales), provenientes de la segunda camada. Los espectros se adquirieron cada segundo a lo largo de diez minutos para el NADH de las células mononucleares tanto de ratas bien nutridas como desnutridas. Se muestran en las siguientes figuras (Figura 8.5 a 8.10), los espectros de fluorescencia de NADH, las gráficas en el tiempo de las emisiones máximas y de sus longitudes de onda en la

cual se encuentran, así como las respectivas gráficas comparativas con sus pruebas t.

Espectros del NADH de células mononucleares de ratas bien nutridas y desnutridas (camada 2)

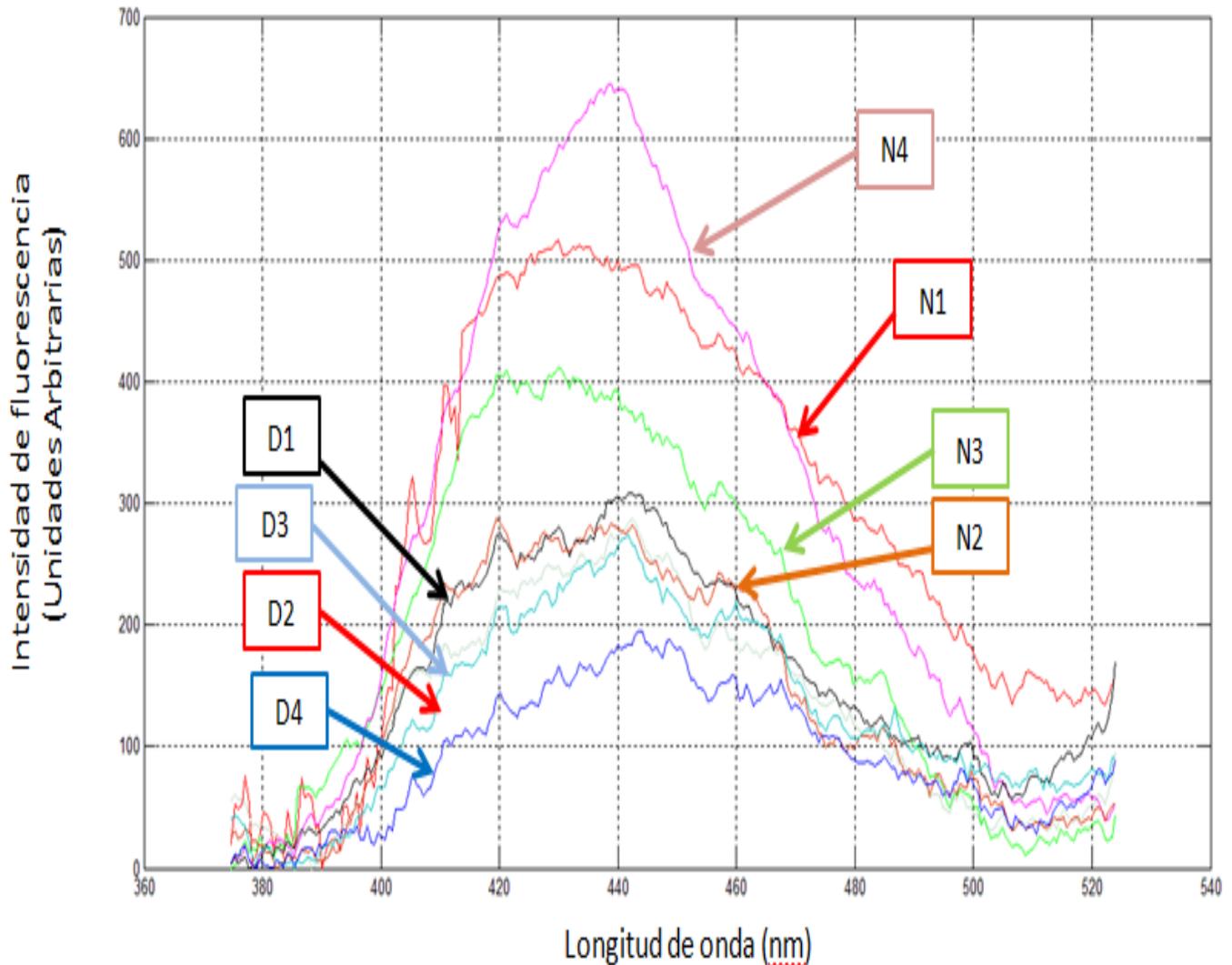


Figura 8.5. Se muestra el espectro de ratas control y desnutridas para hacer énfasis en la diferencia en la amplitud de la fluorescencia que hay entre uno y otro grupo. Donde N1 = rata bien nutrida 1, N2= rata bien nutrida 2, N3 = rata bien nutrida 3, N4 = rata bien nutrida 4, D1 = rata desnutrida 1, D2 = rata desnutrida 2, D3 = rata desnutrida 3 y D4 = rata desnutrida 4.

La siguiente gráfica muestra la señal de fluorescencia de ratas bien nutridas y desnutridas a lo largo de 10 minutos.

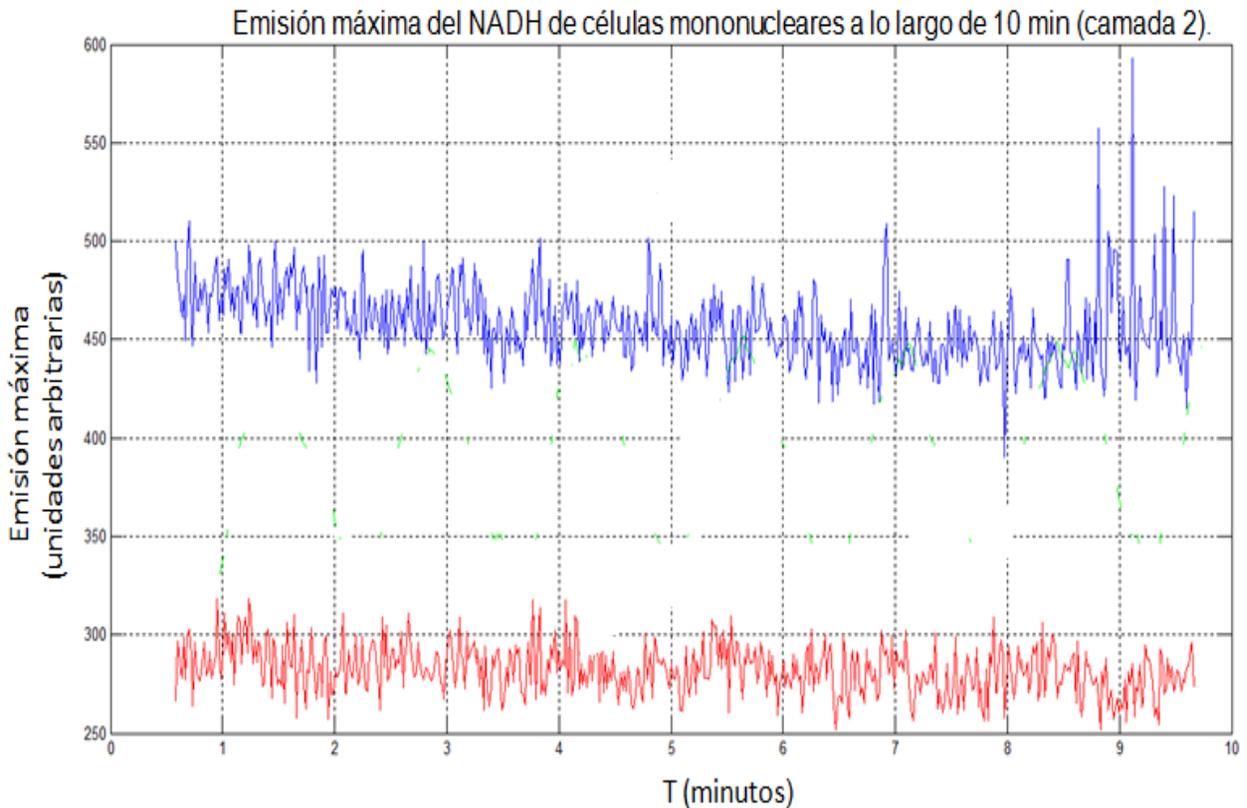


Figura 8.6. Espectros en el tiempo (10 minutos aproximadamente) que muestran diferencias en amplitudes, mostrándose en promedio constantes. Donde la señal en azul son las emisiones máximas del NADH de ratas bien nutridas y la señal en rojo de las emisiones máximas del NADH en ratas desnutridas.

A continuación se muestra el espectro promedio de ratas bien nutridas y desnutridas de la Figura 8.5.

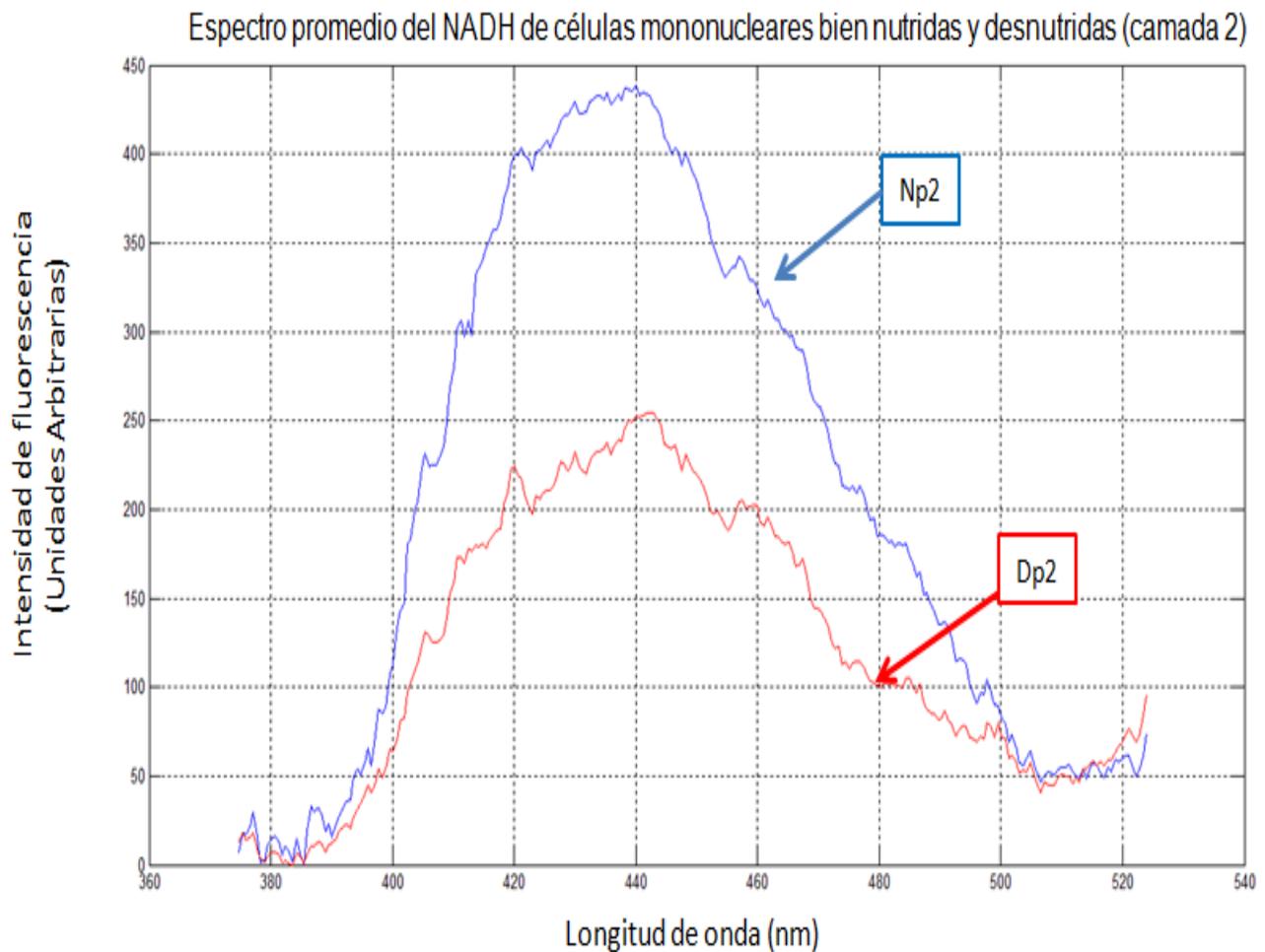


Figura 8.7. Espectro promedio del NADH de células mononucleares de 4 ratas bien nutridas (Np2) y en 4 ratas desnutridas (Dp2). La longitud de onda de la emisión máxima de fluorescencia del espectro en ratas desnutridas y bien nutridas está ubicada en 441.8 nm y 440 nm respectivamente.

La Figura 8.7 muestra los espectros promedio de la fluorescencia del NADH de células mononucleares de 4 ratas control (línea azul) y el espectro promedio de la fluorescencia del NADH de células mononucleares de 4 ratas desnutridas (línea roja) donde la fluorescencia del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas es 42% menor con respecto a las bien nutridas.

A continuación en las gráficas de la Figura de abajo, se compara los promedios de intensidad máxima de fluorescencia del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas y controles, donde la diferencia fue significativa.

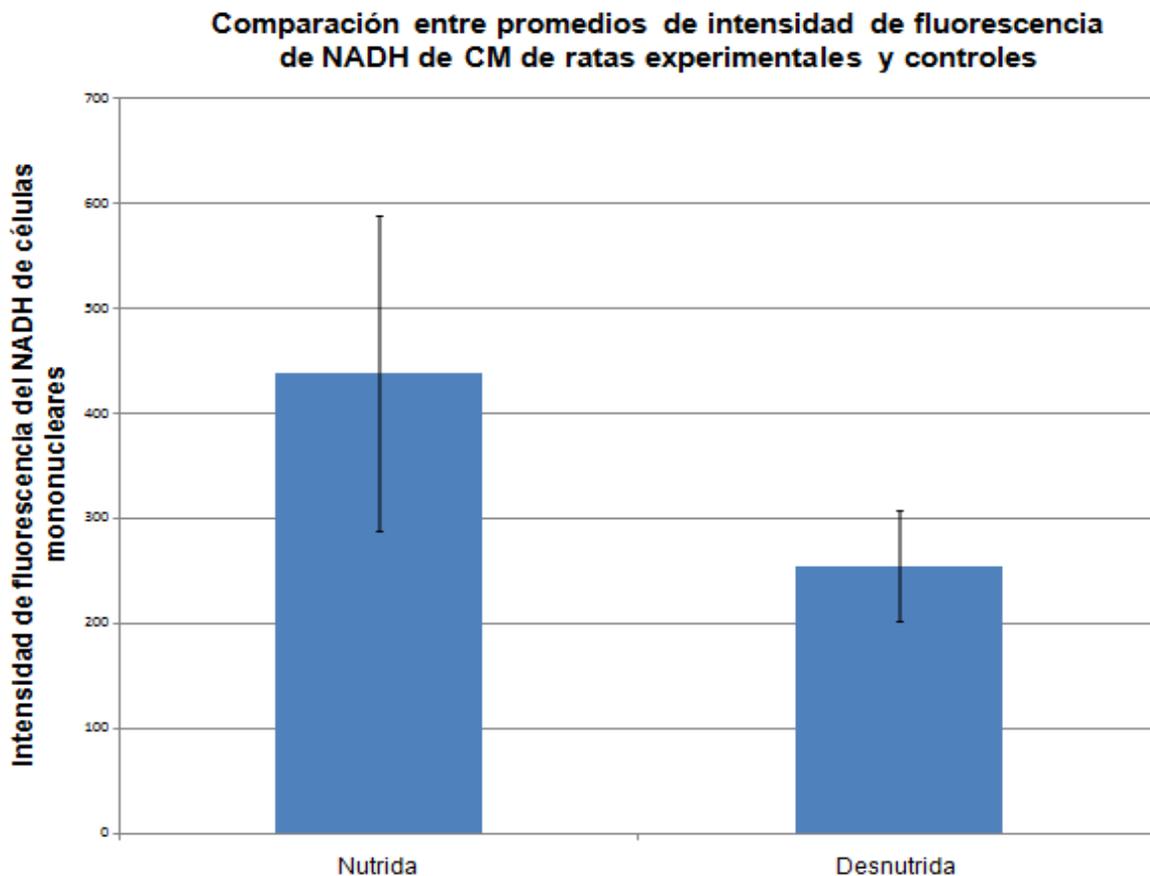


Figura 8.8 . Gráfica comparativa de promedios y desviación estandar de la intensidad de fluorescencia del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas (4 ratas,  $I = 438.7 \pm 150$ ) y controles (4 ratas,  $I = 254.7 \pm 53$ ), con  $*p < 0.05$  (NOTA:  $I =$  intensidad de fluorescencia de NADH de células mononucleares).

Se estudió la posibilidad de corrimiento en la longitud de onda del espectro promedio a lo largo del tiempo del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas con respecto a ratas bien nutridas.

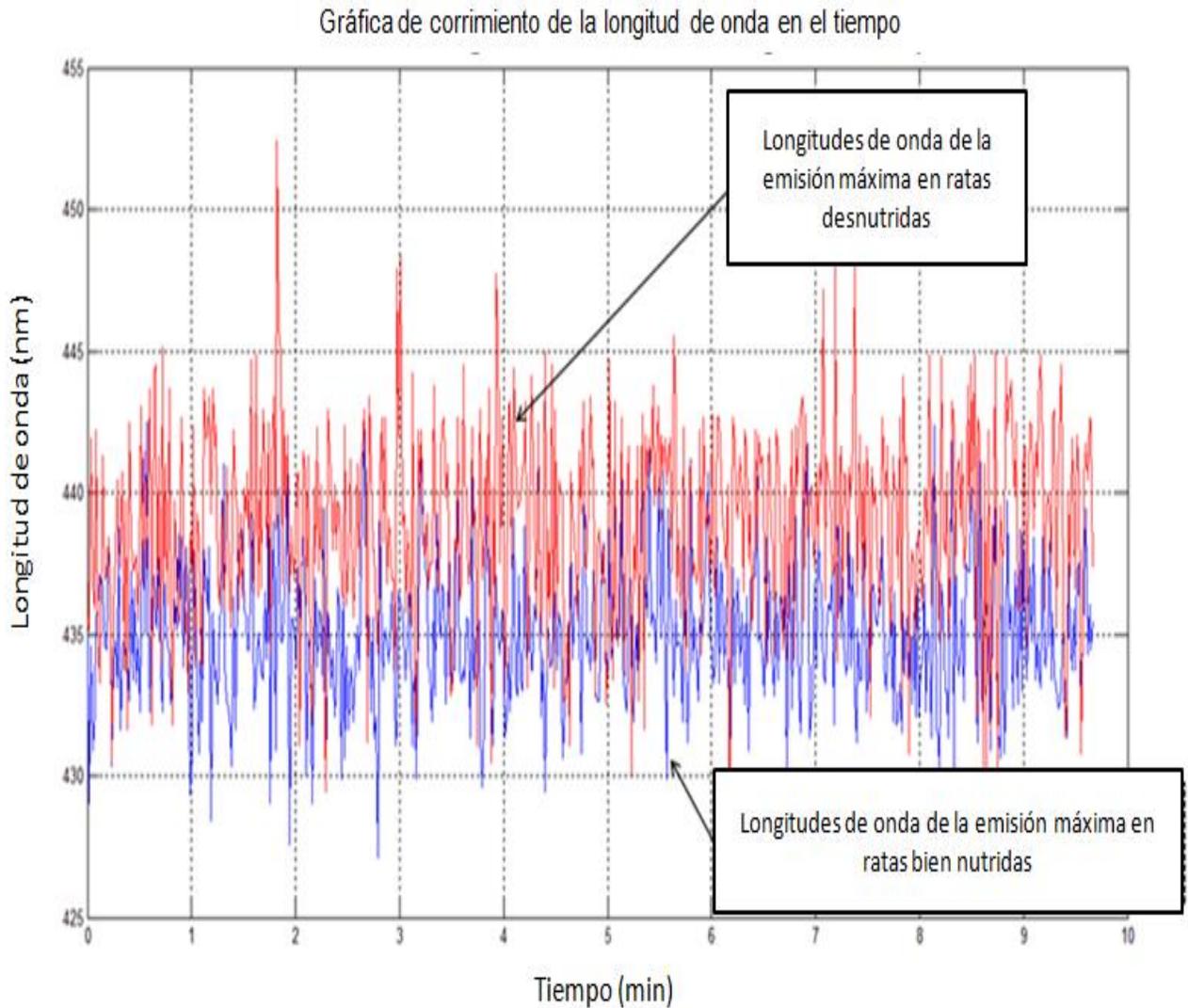


Figura 8.9. Posibilidad de corrimiento del espectro del NADH en células mononucleares en ratas desnutridas (línea roja) y ratas bien nutridas (línea azul).

En la señal de corrimiento en el grupo experimental (línea roja) aparece encimada a la señal de corrimiento en ratas bien nutridas (línea azul), por lo que se comparó estadísticamente para corroborar el posible corrimiento.

**Comparación entre la ubicación de la emisión máxima de fluorescencia de NADH de CM del grupo experimental y control**

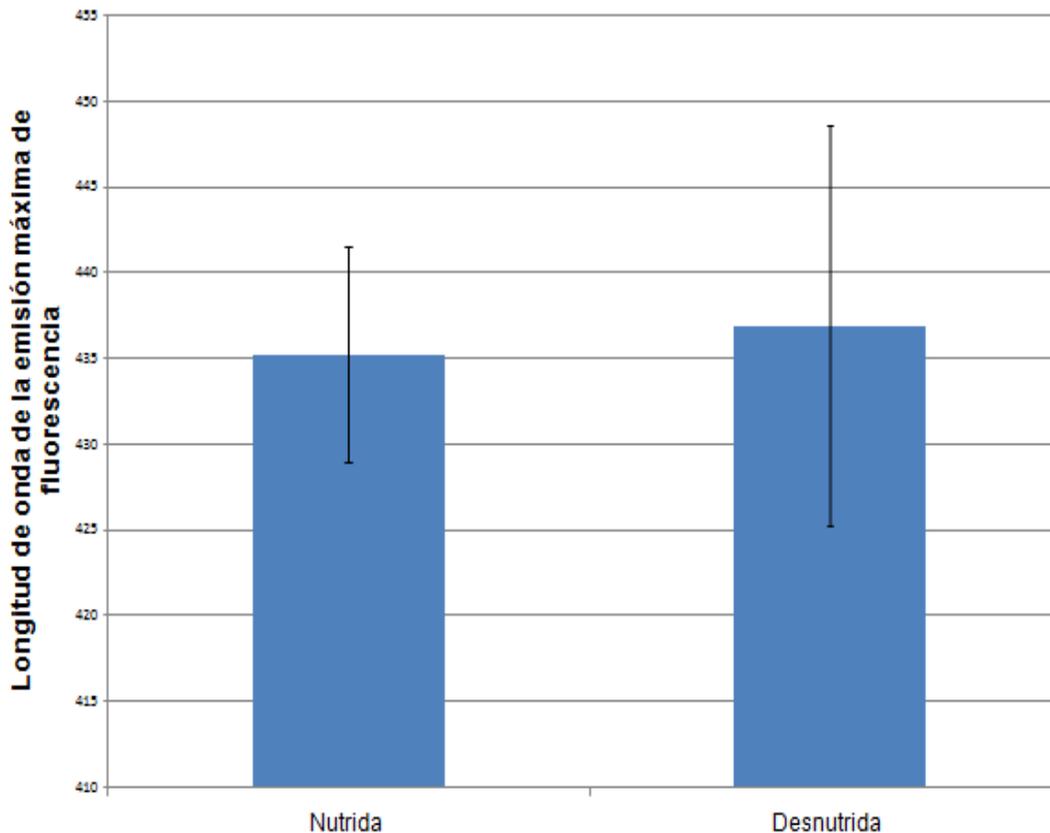


Figura 8.10. Gráfica comparativa de la longitud de onda en la que se encuentra la emisión máxima de fluorescencia de NADH de células mononucleares (CM) entre ratas control (4 ratas,  $L=435.3\pm 6.25$ ) y experimentales (4 ratas,  $436.32\pm 11.6$ ) con una  $*p>0.05$  y  $n=4$  (NOTA: L= longitud de onda de la intensidad de fluorescencia de NADH de células mononucleares).

La prueba t mostró que la diferencia del promedio de los corrimientos del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas y ratas bien nutridas, no es significativa (Figura 8.10).

## 8.2 Resultados de ajuste de curvas.

Con base en los datos mostrados, se determinaron los componentes de la deconvolución, donde se obtuvieron curvas parecidas al NADH libre y NADH ligado a proteína, tomando en cuenta la intensidad y área de cada curva para la relación de NADH-proteína/NADH-libre.

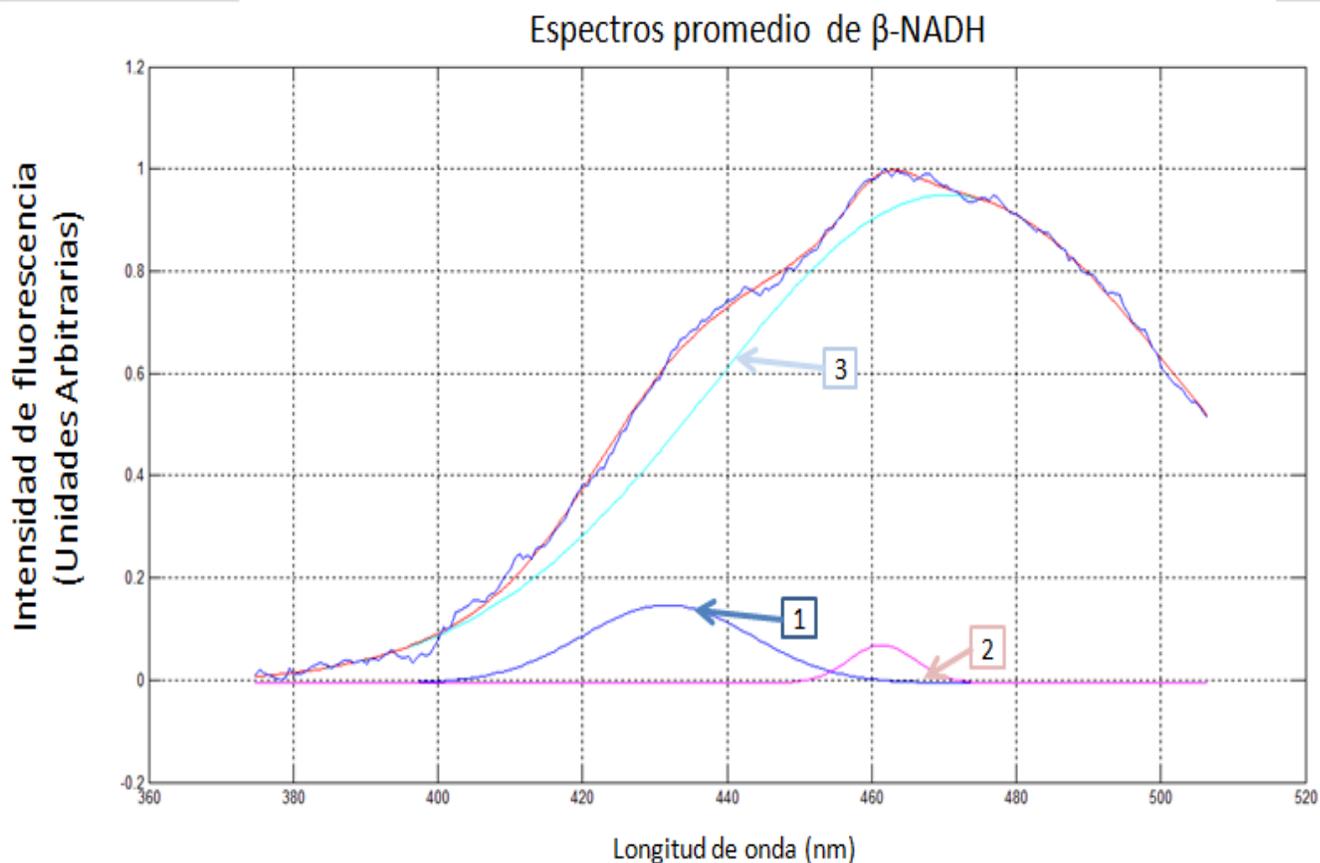


Figura 8.11. Deconvolución del espectro del  $\beta$ -NADH. El ajuste se realizó con 3 curvas, siendo la curva 1 correspondiente a 431 nm, la curva 2 es 461, la curva 3 es 470 nm. La intensidad máxima del espectro se encuentra en 465 nm, la concentración de  $\beta$ -NADH fue de 50  $\mu$ M.

## $\beta$ -NADH

Curvas	Altura máxima (nm)	Área	FWHM
curva 1	432	4.4	23.3
curva 2	461	0.8	9.2
curva 3	471	78	65.3

Tabla 8.5

El ajuste óptimo se hizo con tres curvas gaussianas (Figura 8.9). La deconvolución del espectro del  $\beta$ -NADH, permite obtener las componentes que corresponden al NADH libre en células (comparando la altura máxima de la curva con la emisión máxima reportada en la literatura), sin embargo, se debe tener en cuenta que el NADH libre en células está en un ambiente diferente al  $\beta$ -NADH, por lo que se debe tomar como una aproximación, esto debido al ensanchamiento por colisiones (ensanchamiento de los espectros causado por el entorno en el que está contenida la molécula fluorescente).

A continuación se muestra la deconvolución de los espectros promedio de ratas desnutridas y bien nutridas, con las que se hizo el análisis de componentes, para la obtención de la relación de NADH ligado a proteína/NADH libre.

### Deconvolución del espectro promedio del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas

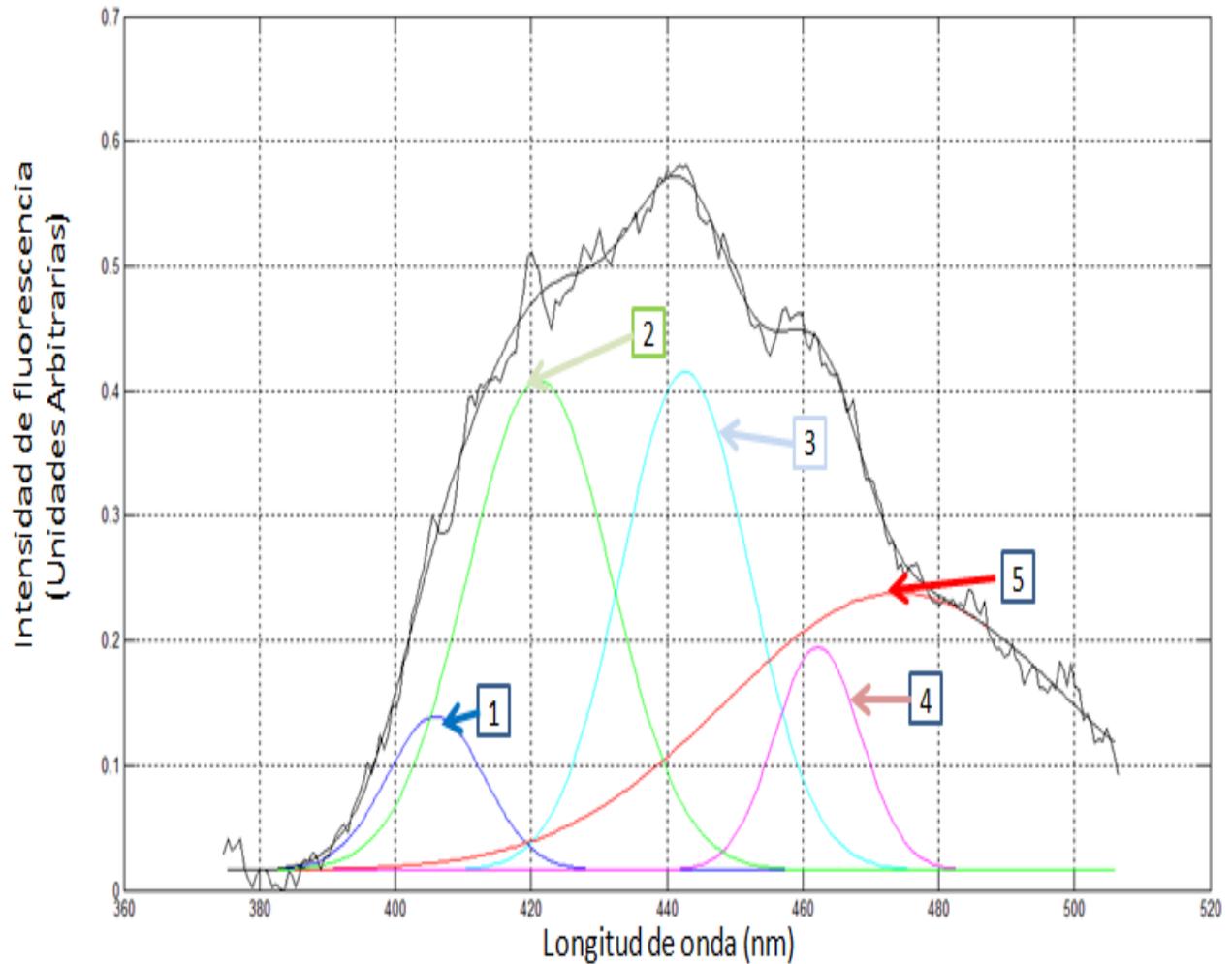


Figura 8.13. Deconvolución del espectro promedio del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas. El ajuste se realizó con 5 curvas gaussianas, la chi cuadrada es 0.00017 ( $R^2=.994$ ).

### Deconvolución del espectro promedio del NADH de células mononucleares de ratas bien nutridas

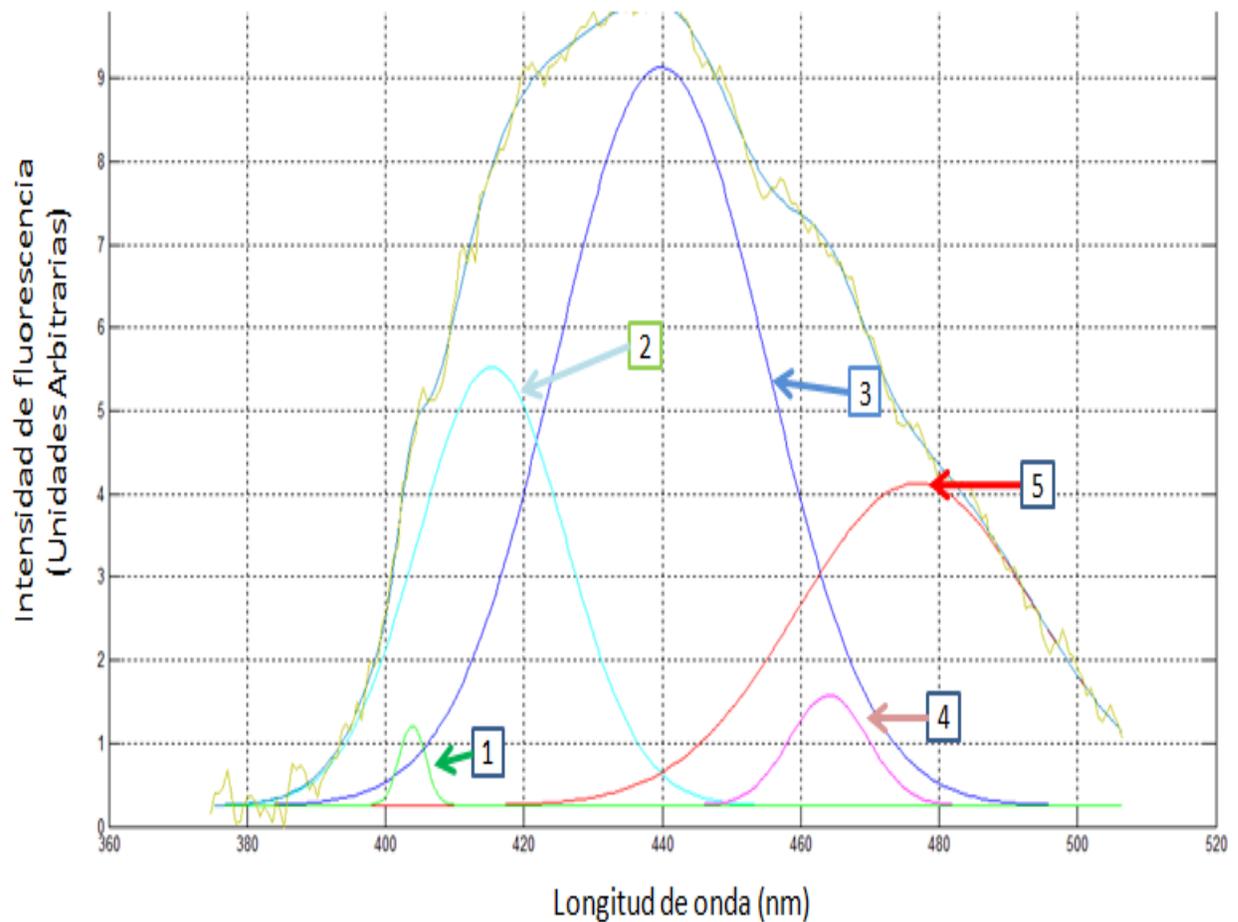


Figura 8.12. Deconvolución del espectro promedio del NADH de células mononucleares de ratas control. El ajuste de las curvas se realizó con 5 curvas gaussianas, con una chi cuadrada de 0.00022 ( $R^2=0.998$ ).

La curva 1 muestra una altura máxima en 403 nm, que pueden ser remanentes de la emisión de fluorescencia de la molécula piridoxina (S. Perez, 2010).

Se tomaron las áreas y la altura máxima de las curvas 3 y 4, para determinar la relación de NADH-proteína/NADH-libre. La curva 3 en ratas desnutridas y bien nutridas, tienen una altura máxima en una longitud de onda semejantes a la reportada para el NADH unida a proteína (utilizando una fuente de excitación en 355 nm); por otro lado la altura máxima de la curva 4 de ambos casos tiene una longitud de onda que se encuentra cercana a la curva 2 del  $\beta$ -NADH (Figura 8.8) y a la reportada en la literatura (Kasimova et al. 2006).

A continuación se muestra un cuadro con las características tomadas de cada una de las componentes de los espectros promedio de NADH de ratas bien nutridas y con desnutrición.

Tipo de rata	Rata bien nutrida				Rata desnutrida			
Curvas	$\lambda_c$ (nm)	I (u.a.)	Área (u.a. /nm)	FWHM (nm)	$\lambda_c$ (nm)	A (u.a.)	Área (u.a. /nm)	FWHM (nm)
Curva 1 (curva que se ha identificado con piridoxina)	404	0.12	16.8	3.8	407	0.149	2.2	14.36
Curva 2	415	0.56	14	21.4	422	0.418	10.4	21.05
<b>Curva 3 (curva que se ha identificado con el NADH ligado a proteína)</b>	<b>440</b>	<b>0.913</b>	<b>34</b>	<b>30.3</b>	<b>443</b>	<b>0.422</b>	<b>9.4</b>	<b>18.85</b>
<b>Curva 4 (curva que se ha identificado con el NADH libre)</b>	<b>464</b>	<b>0.15</b>	<b>2</b>	<b>11.3</b>	<b>463 *</b>	<b>0.2</b>	<b>3</b>	<b>12.64</b>
Curva 5	477	0.413	16.7	34.5	475 *	0.247	14	50.88

Tabla 8.6. Donde I= Intensidad (máxima altura de la curva),  $\lambda$ =longitud de onda que se encuentra centrada al valor máximo de la curva, FWHM= ancho de la curva, tomada a la mitad de la altura (Full Widht High Mid) y u.a.=unidades arbitrarias.

En seguida se presenta la tabla con las relaciones del NADH ligado a proteína/NADH libre, donde se tomaron las áreas e intensidades de la tabla 8.6, estas relaciones corresponden al promedio.

Parámetros	Ratas bien Nutridas		Ratas desnutridas	
	Áreas (curva 3 y 4)	Intensidades (curva 3 y 4)	Áreas (curva 3 y 4)	Intensidades (curva 3 y 4)
NADH- proteína/NADH-libre	17	7.6	3.13	2.11

Tabla 8.7

Ahora se presentan las diferencias porcentuales de las áreas e intensidades del grupo experimental y el control, estas se obtuvieron a partir de la diferencia entre ambos grupos (área e intensidad) y por último, el resultado se dividió entre el parámetro más grande (área e intensidad).

Parámetros	Áreas	Intensidades
Porcentaje de diferencia porcentual entre las relaciones de NADH unido a proteína/libre (experimental con respecto a control)	81.6%	72.23%

Tabla 8.10

La diferencia porcentual entre el grupo experimental y control, a partir de las áreas fue de 81.6% y de 73.23%, siendo mayores los controles con respecto a las desnutridas. Las siguientes figuras (Figura 8.14 y 8.15), comparan las curvas 3 y 4 en ambos grupos.

Comparación de componentes curva 3 del control y experimental NADH ligado a proteína

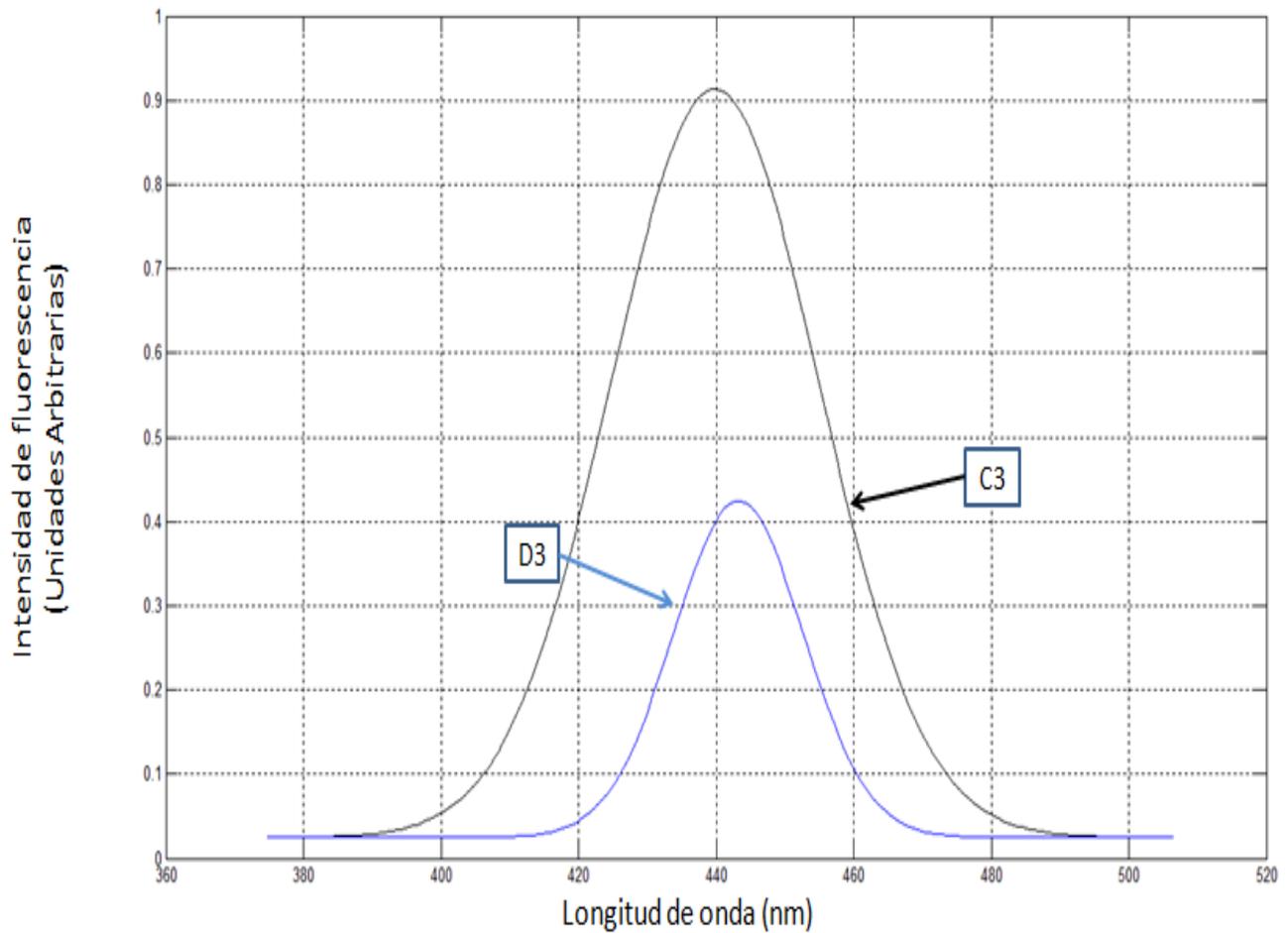


Figura 8.14. Comparación de las curvas 3 de controles y experimentales. Se muestra la curva 3 del control (C3) y experimental (D3). La componente unida a proteína C3 es 50 % más grande que D3.

### Comparación de componentes curva 4 del control y experimental (NADH libre)

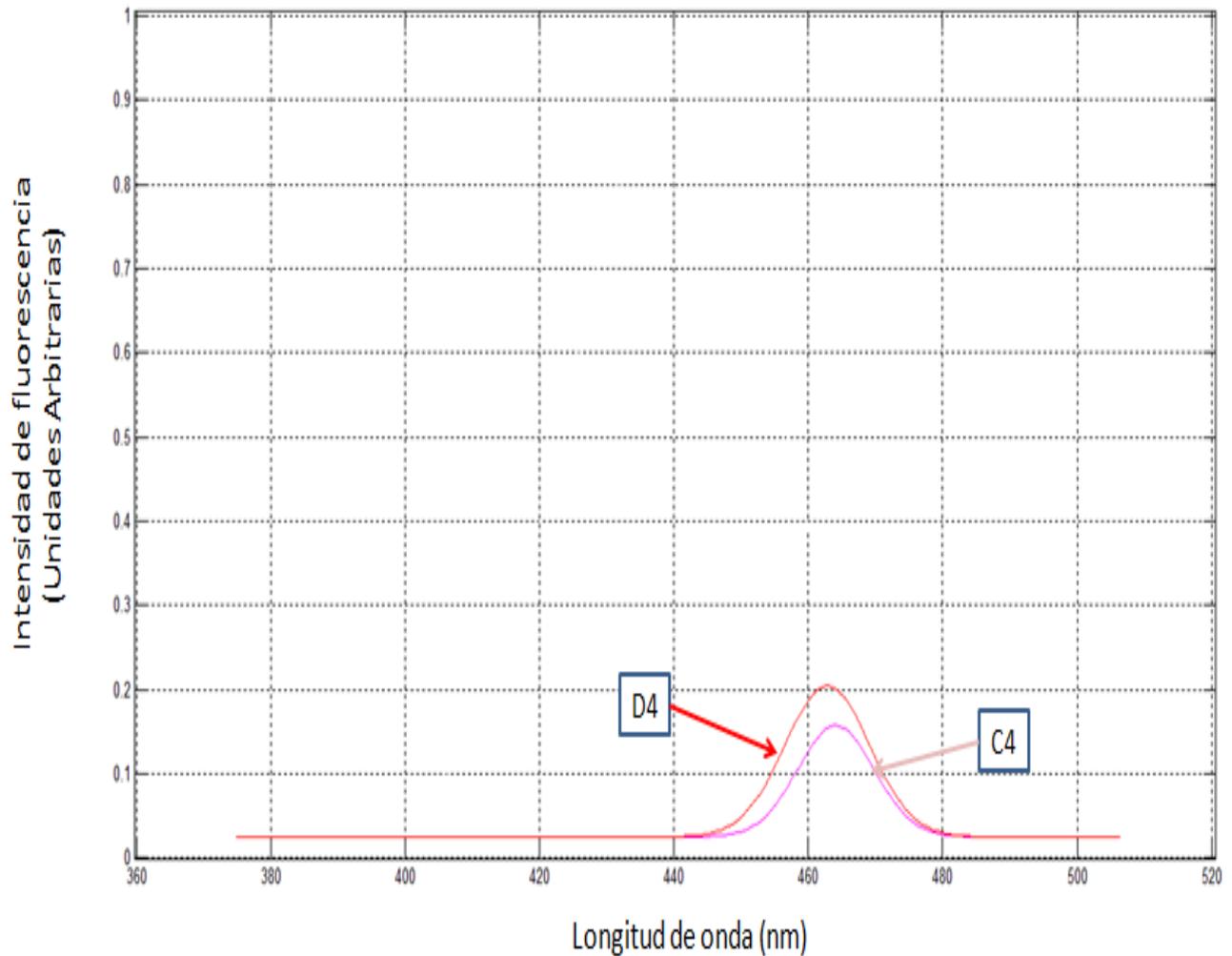


Figura 8.15. Comparación de las curvas 4 de controles y experimentales. Se muestra la curva 4 del control (C4) y experimental (C4). El NADH libre D4 es 4.6 % más grande que C4.

Cada uno de los resultados mostrados en este capítulo serán discutidos en la siguiente sección.

## **9. DISCUSIÓN**

### **9.1 Arreglo experimental**

Durante el proceso de implementación del arreglo experimental se diseñaron diferentes arreglos de medición de fluorescencia, se hicieron también optimizaciones dentro de la cavidad del Nd:YAG, con la intención de adquirir una mayor potencia en los pulsos laser de salida en 355 nm (UV) y contar con un arreglo experimental sensible a la longitud de onda de emisión de fluorescencia del NADH en células mononucleares.

La implementación del primer arreglo experimental permitió obtener espectros de fluorescencia de rodamina (pigmento fluorescente que se tenía en ese momento en el laboratorio), con el objetivo de tener experiencia en fluorescencia, donde se analizó sus características como la emisión máxima, la longitud de onda, etc., no obstante, se requería adquirir espectros de fluorescencia de NADH celular y reducir el número de parámetros ajustados manualmente en el arreglo (posición de la fibra óptica a la entrada del monocromador, así como la apertura de la rendija del mismo, etc.).

Se optó por un segundo arreglo experimental, que incluyera un equipo como el espectrómetro Avantes, que necesitó ajustar manualmente el parámetro de captación de la señal (altura y distancia). Se utilizó como muestra a la cumarina, ya que el pigmento tiene una emisión máxima de fluorescencia en el rango reportado del NADH de células (emisión en 460 nm) y permitió adquirir espectros con este pigmento a concentraciones de 5  $\mu\text{M}$  (normoxia) y 50  $\mu\text{M}$  (anoxia), correspondientes al NADH celular en tejidos (Rose et al., 2006). El resultado en las Figuras 10.9 y 10.10, muestran que el segundo sistema es sensible a bajas concentraciones.

Posteriormente, se llevó a cabo la adquisición de espectros de fluorescencia de NADH celular, sin embargo, no se tuvo éxito, por lo que se añadió un colimador para homogeneizar los rayos divergentes de fluorescencia en rayos paralelos. El colimador permitió convergerlos hacia la punta de la fibra óptica del espectrómetro. Se adquirió espectros de NADH de células Beta de cultivo celular y de células mononucleares de ratas bien nutridas (6 y 8 meses de edad), que presentan emisiones máximas entre 430-450 nm (ver Figuras 10.13 a 10.20), como se ha reportado en la literatura (Mayevsky y Rogatsky, 2007).

Se hizo a continuación dos pruebas en el sistema de medición. En el primero se aumentó la temperatura (cambios en la temperatura modifican la emisión de fluorescencia [Zelent et al., 2007]) y en el segundo se monitoreó en el tiempo la emisión máxima de la señal. Cada una de estas pruebas se realizó con diferentes ratas. Al aumentar la temperatura a temperaturas mayores a la del ambiente se

obtuvo un corrimiento en la emisión máxima hacia el rojo y una menor intensidad de fluorescencia del NADH al aumentar la temperatura con respecto al ambiente. El segundo experimento presentó una caída en la emisión máxima de fluorescencia del NADH a lo largo de 30 minutos (datos mostrados en la Figura 10.16 del capítulo del anexo)

Fue necesario captar una mayor señal, ya que no se conocía la intensidad de fluorescencia máxima en ratas desnutridas, por lo que sustituyó el colimador por una lente biconvexa para un arreglo 2f, que es un arreglo óptico donde la muestra y su imagen se encuentran a una distancia de dos veces la distancia focal de la lente y en lados opuestos de la misma.

Con este nuevo arreglo se logró captar el doble de la emisión máxima de fluorescencia del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas y bien nutridas, sin embargo, el experimento se tuvo que suspender al observar una disminución en la intensidad de los pulsos de salida del láser en el tiempo. Esto llevó a la re-optimización y re-alineación de la cavidad del láser, que ayudó a la estabilidad de los pulsos (355 nm). Una consecuencia de estos ajustes fue un aumento de la potencia (8 veces mayor a la anterior), por lo que se utilizó un filtro de densidad neutra para disminuir la potencia de salida y así evitar dañar las células mononucleares (Kulms y Schwarz, 2000).

Se comprobó la estabilidad del Nd:YAG, a través de espectros de fluorescencia de cumarina en el tiempo, y se encontró que la fluorescencia a lo largo de una hora no mostraba decaimiento [Figura 8.7], como la vista en la Figura 10.22, el arreglo además, mostró sensibilidad a bajas concentraciones de cumarina, por lo que el equipo mostraba ser capaz de detectar fluorescencia en el rango del NADH celular y permitió continuar con el experimento con ratas desnutridas y bien nutridas.

## **9.2 Obtención de espectros de NADH purificado, NADH de células mononucleares de ratas desnutridas y controles.**

Se obtuvieron espectros de fluorescencia de NADH purificado ( $\beta$ -NADH), con el objetivo de corroborar la emisión máxima en 450-460 nm, que es el rango reportado en la literatura (Mayevsky y Rogatsky, 2007). Los espectros muestran una emisión máxima promedio en 463 nm (ver Figura 8.9), cercana al rango antes mencionado, así mismo, estos resultados se utilizaron para identificar la componente de NADH libre en células mononucleares.

Una vez obtenido el espectro de fluorescencia de NADH purificado, se adquirieron los espectros de emisión de fluorescencia del NADH de células mononucleares de ratas control y desnutridas. Los primeros datos experimentales

(primera camada) muestran una disminución de la señal de fluorescencia de las ratas experimentales del 65%, comparadas con la rata control (Figura 8.1 y 8.2). A pesar de que estos resultados fueron adquiridos con el decaimiento de la intensidad de salida del Nd:YAG en el tiempo, se considera que los espectros obtenidos no se vieron afectados, dado que en ambos grupos se tomaron bajo las mismas condiciones experimentales.

Después de la última optimización de la cavidad del láser, se repitió el experimento (segunda camada) con ratas control y experimentales, donde se encontró nuevamente una disminución en la intensidad de fluorescencia del NADH en las células mononucleares en un 42% comparadas con las ratas bien nutridas (Figura 8.5 y 8.7). Las pruebas estadísticas muestran que hay una diferencia significativa (Figura 8.8).

Se quiso evaluar la intensidad de fluorescencia en el tiempo, con el fin de determinar alguna diferencia entre el grupo experimental y control. Para ello se utilizó la emisión máxima del espectro promedio de ratas de ambos grupos registradas a lo largo de 10 minutos, donde permanece constante la diferencia de intensidad de ambos (Figura 8.6), además los grupos experimentales y control no presentan decaimiento alguno de la intensidad de fluorescencia en el tiempo.

Otro análisis que se llevó a cabo, fue observar corrimientos de las emisiones máximas de ratas desnutridas y controles. Se graficó la longitud de onda donde se encuentran las emisiones máximas a lo largo de 10 minutos. Se puede observar en la Figura 8.9, que las ratas desnutridas se encuentran por arriba de la gráfica de los controles, es decir, los espectros están corridos hacia el rojo, sin embargo, no se halló una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (Figura 8.10)

La literatura menciona que las ratas desnutridas tienen una cantidad de células mononucleares de hasta un 50% menor a las ratas bien nutridas (Cortés, González, Gómez y Ortiz, 2008). Por tal motivo fue de interés observar el efecto de la densidad celular en la emisión de fluorescencia del NADH, se tomaron espectros de ratas bien nutridas diluidas al 50% y sin diluir, que muestran una aparente diferencia entre las intensidades de estos dos (Figura 8.4), no obstante, las pruebas estadísticas muestran que no hay diferencia significativa entre ambos grupos (Figura 8.5).

Estos resultados demuestran que las diferencias entre las intensidades de fluorescencia de las ratas desnutridas con respecto a las controles podrían

explicarse mejor por un efecto en el metabolismo energético que por densidad celular.

### **9.3 Deconvolución de espectros promedio de grupo de ratas bien nutridas y desnutridas.**

Se realizó la deconvolución de los espectros promedio de la Figura 8.7, por medio del programa Originlab versión 8. Este ajuste hace uso del algoritmo Marquard-Leverberg con 5 curvas gaussianas (ver Figuras 8.11, 8.12 y 8.13) con el propósito de obtener las componentes del NADH celular que son NADH libre y NADH unido a proteína (S. Perez, 2010). La elección de las componentes se realizó con base a espectros del NADH celular reportados en la literatura (excitados con láser en 355 nm) (Lakowicz et al. 1992) y las componentes de la deconvolución del NADH purificado de la Figura 8.11.

El componente 4 de la deconvolución en ratas bien nutridas y desnutridas están centradas en 463 y 464 nm respectivamente, que es aproximado a la emisión máxima de fluorescencia del NADH libre reportado (460 nm) [Kasimova et al., 2006], además la componente 2 de la deconvolución del  $\beta$ -NADH está centrada en 461 nm, cercana también a las curvas identificadas.

En el caso de la emisión de fluorescencia del NADH unido a proteína se ha encontrado en 430-435 nm, se eligió la curva 3. Varios autores mencionan que al unirse a proteína el NADH, su espectro de fluorescencia se recorre aprox. 20 nm hacia el azul (hacia la izquierda) con respecto al NADH libre (S. Perez, 2010).

Por otro lado, las componentes 2 y 5 no se pudieron establecer como NADH unido a proteína o NADH libre. En la Figura 8.14, se observa que la componente del NADH unido a proteína del grupo experimental es 50% menor con respecto al control. Este resultado podría explicarse por una disminución en las proteínas mitocondriales y en una alteración en la cadena respiratoria, como se ha descrito en otros tipos celulares (Ferreira y Gil, 1984). Las componentes del NADH libre son similares en ambos grupos (Figura 8.15), posiblemente por mecanismos que mantienen la homeostasis del NADH libre en células, mencionado por algunos autores (Kasimova et al., 2006).

#### 9.4 Conclusiones.

Los trabajos en células de hígado y corazón que utilizan técnicas bioquímicas han sugerido que la desnutrición grave muestra una disminución en la oxidación de sustratos (Ferreira y Gil, 1984), cuya consecuencia es una baja síntesis de NADH mitocondrial total. Los resultados que arrojó el presente trabajo de investigación, indican que el NADH unido a proteína es el más afectado comparado al NADH libre, por lo que se propone que no sólo existe una disminución en la producción de NADH sino también una menor producción de proteínas unidas al NADH debido al empobrecimiento de proteínas mitocondriales (Ferreira y Gil, 1984). Estos efectos podrían dar una explicación a los efectos prolíficos de la desnutrición grave en el sistema inmunológico, ya que la disminución de NADH unido a proteínas principalmente de la cadena respiratoria ocasionaría una pobre síntesis de ATP; la disminución de esta molécula afectaría las diferentes cascadas enzimáticas que se activan durante la respuesta inmunológica.

A partir de los resultados presentados y de lo encontrado en la literatura, se propone el siguiente esquema sobre el efecto de la desnutrición grave en la fosforilación oxidativa y en la producción de ATP.

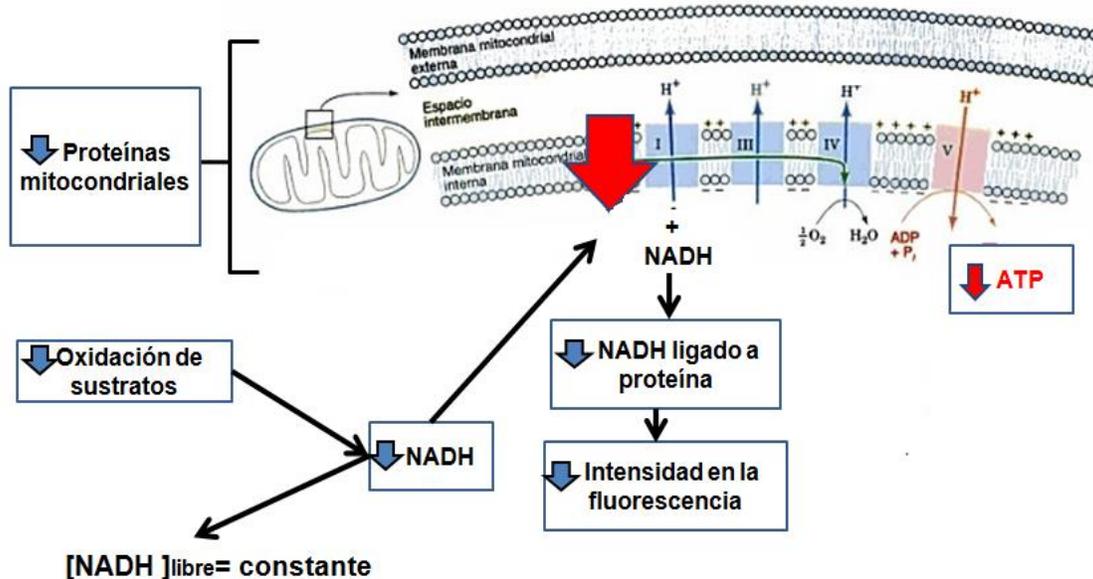


Figura 9.1 Esquema modificado de la cadena respiratoria de la mitocondria de ratas desnutridas de linfocitos y monocitos (células mononucleares), que muestra la implicación de encontrar una menor cantidad de NADH y proteínas mitocondriales, resultando en una menor oxidación del NADH y una cantidad disminuida de ATP.

Con base a los resultados que se presentan y a los antecedentes de esta tesis, se sugiere que el metabolismo energético produce una disminución en el número de linfocitos (no se descarta dicha disminución de linfocitos debida a la reducción en órganos linfoides) y en alteraciones en la liberación de interleucinas [Bhaskaram y Sivakumar, 1986], por lo que ilustramos estos efectos en la figura de abajo, con tal de mostrar el efecto devastador de este problema en las células del sistema inmunológico.

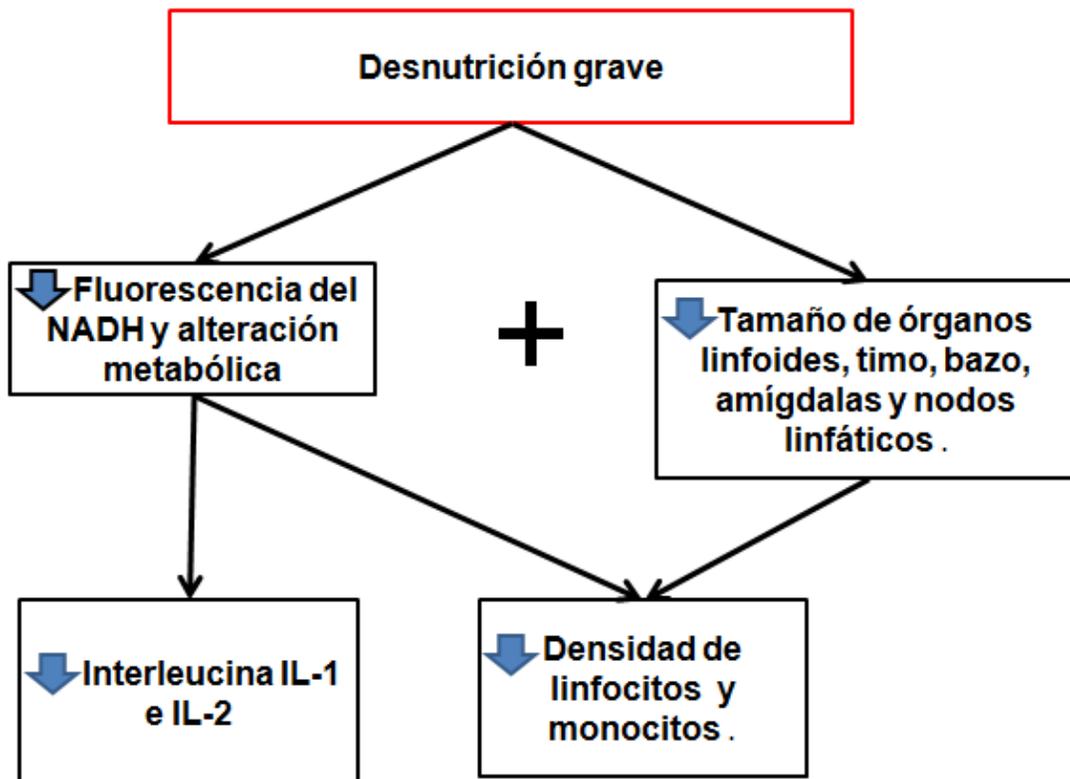


Figura 9.2. Esquema que muestra que la desnutrición grave implica una menor intensidad de la fluorescencia de NADH celular con una reducción en la cantidad de esta molécula en células mononucleares. La disminución en la producción de ATP afectaría la síntesis de interleucinas y la proliferación celular

Todas estas deficiencias en la maquinaria energética traen consigo daños graves en la capacidad de respuesta del sistema inmunológico, que hacen al organismo con desnutrición grave más susceptible a sufrir padecimientos de tipo infeccioso por bacterias, virus y hongos, por lo que se propone el siguiente esquema de los efectos de la desnutrición grave en base a resultados experimentales de esta tesis, como de artículos encontrados en la literatura, con el fin de observar el problema como un problema bioenergético celular, que está vinculado a uno infeccioso.

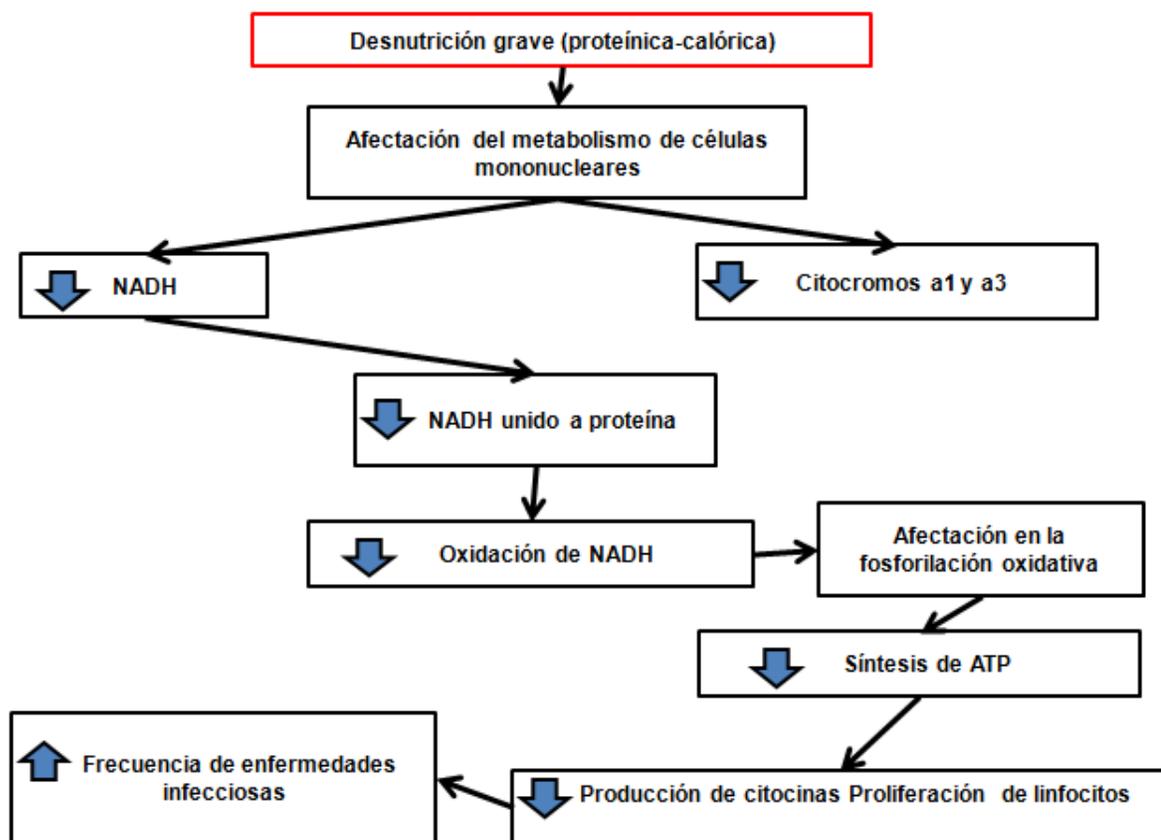


Figura 9.3. Esquema que se propone sobre los efectos de la desnutrición grave en la actuación del sistema inmunológico ante enfermedades infecciosas.

### **9.5 Trabajo a Futuro.**

Los resultados en esta investigación, confirman la hipótesis para esta tesis: la desnutrición grave afecta el metabolismo energético de las células mononucleares (linfocitos T, B y monocitos), por lo que se plantea en trabajos posteriores, conocer si los linfocitos T, B y monocitos son afectados de igual manera por este padecimiento.

En investigaciones futuras, se buscará realizar la activación de linfocitos in vitro por medio de técnicas bioquímicas, donde se mida simultáneamente la fluorescencia del NADH celular en ratas bien nutridas y desnutridas.

La deconvolución de los espectros promedio del NADH celular de ratas desnutridas y control, se llevaron a cabo con 5 curvas, de la cuales dos de ellas no se determinó a qué tipo de componente de NADH celular corresponden (NADH libre y NADH unido a proteína). En otro trabajo se sugiere continuar con este análisis.

Como observamos, los individuos con desnutrición grave sufren de una disminución del tamaño en timo y bazo con respecto a organismos bien nutridos, por lo que un estudio futuro implicaría repetir el estudio de espectroscopía de fluorescencia con láser en estos tejidos linfoides, con el fin de hallar el fondo común de los efectos reportados de la desnutrición grave en el sistema inmunológico.

## **10 ANEXO.**

### **10.1 Implementación del arreglo experimental.**

El propósito de este anexo es mostrar el proceso de implementación del arreglo experimental donde se optimizaron diferentes arreglos de medición para llevar a cabo la espectroscopia de fluorescencia láser. Los arreglos de medición de fluorescencia que se implementaron hacen uso de distintos elementos ópticos (espejos, lentes, etc.) y sustancias fluorescentes (por ejemplo, rodamina 6G marca exciton y cumarina 460 marca sigma), que permitieron encontrar una mayor intensidad de fluorescencia del NADH en células mononucleares.

El primer arreglo consistió de los siguientes elementos: rodamina 6G como muestra fluorescente, una cavidad de láser de pigmento (construido previamente en el laboratorio de óptica cuántica), un Monocromador tipo Czerny-Turner, un integrador-promediador (boxcar), un fotodiodo sensible al UV y un convertidor analógico digital de 24 bits (ver sección 10.1.5). El segundo arreglo de medición utilizó como muestra a la cumarina 460, un espectrómetro avantes (que contiene un promediador-integrador, un monocromador y un fotodetector), fibra óptica y algunos elementos del láser de pigmento (ver sección 10.2). El tercero y cuarto arreglos son mejoras en la optimización del segundo arreglo experimental.

### **10.2 Primer arreglo experimental.**

Se comenzó con la implementación del sistema de espectroscopia del laboratorio de óptica cuántica, utilizándose un generador de fluorescencia (láser de pigmento con rodamina 6G), la fluorescencia es analizada (monocromador), detectada y convertida la señal óptica a una señal eléctrica (fotodiodo), integrada y promediada (integrador-promediador) y transformada la señal eléctrica a una digital (convertidor A/D). El propósito de este primer sistema fue caracterizar espectros de fluorescencia excitada por el láser Nd:YAG y familiarizarse con el fenómeno de fluorescencia.

#### **10.2.1 Láseres de pigmento.**

Los láseres de pigmento emplean pigmentos orgánicos que se encuentran disueltos en un solvente orgánico (por ejemplo alcohol y metanol) y se bombean ópticamente con un láser Nd:YAG para excitar al fluoróforo. En este tipo de láseres se puede sintonizar a longitudes de onda que pueden cubrir todo el espectro visible, sin embargo, la emisión láser tiene una frecuencia menor a la de bombeo (Guasti y Rangel, 1990). El láser Nd:YAG (láser de bombeo) funcionó con la siguiente configuración, para excitar al pigmento:

Características del láser de bombeo:

Tipo de láser	Nd:YAG
Longitud de onda que se utiliza en la excitación	532 nm
Pulsos por segundo	10 Hz
Ancho del pulso	8 nanosegundos
Celda pockels	Si
Potencia del láser	3 mW

Tabla 10.1

### 10.2.2 Medio activo.

Como se mencionó, el medio activo en el sistema fue un pigmento, que se encuentra constituida de moléculas orgánicas con enlaces dobles conjugados, que hace que los electrones se encuentren en un pozo de potencial muy ancho, por lo que los niveles de energía forman un cuasicontinuo, resultando en espectros de absorción y emisión con bandas muy anchas (Guasti y Rangel, 1990). El pigmento utilizado es la Rodamina 6G que tiene las características:

Características del pigmento

Pigmento	Rodamina 6G
Concentración	1.19 g/l (2.5mM)
Rango de emisión	567-602 nm

Tabla 10.2 (Información de exciton).

Ahora mencionaremos el sistema que conforma al láser de pigmento características y funcionamiento.

### 10.2.3 Resonador óptico.

Se utilizó una cavidad óptica construida de tipo Littman Metcalf (Figura 12.1). La cavidad óptica nos ayuda a confinar el campo electromagnético y a seleccionar la frecuencia de alta energía del sistema. Existen cavidades resonantes de tipo estacionario o de anillo, el utilizado en este arreglo fue de tipo estacionario (sistemas que producen ondas con nodos que permanecen fijos). El tipo de elemento para seleccionar la frecuencia es una rejilla de difracción (por su fuerte dependencia angular con la frecuencia) y un espejo de sintonización (plano y de primera superficie) que permite aumentar el número de líneas iluminadas en la rejilla, resultando en una mayor resolución (Figura 10.1) [(Guasti y Rangel, 1990).

### Características de la cavidad

Tipo de arreglo (cavidad)	Littman Metcalf
Lente cilíndrica	Distancia focal 7.5 cm
Espejo de retroalimentación	Espejo de primera superficie
Celda de cuarzo	Capacidad 3.5 ml, tapa de teflón y agitador magnético
Rejilla de difracción	1800 líneas por mm de 5 cm de largo
Espejo plano de sincronización	De primera superficie

Tabla 10.3

#### 10.2.4 Funcionamiento del láser de pigmento.

El sistema de bombeo, como se había mencionado es el láser Nd:YAG, fuente de energía de nuestro sistema. La luz producida del Nd:YAG es reflejada por dos espejos de 45° (que reflejan la luz en 532 nm), la luz reflejada es enfocada de manera transversal por una lente cilíndrica (aumenta la densidad de energía) sobre una celda de cuarzo que contiene el pigmento disuelto en alcohol (esto produce una conversión de energía de una longitud de onda menor a una mayor conllevando a un calentamiento del solvente que degrada al pigmento, por lo que se utilizó un agitador magnético). La fluorescencia emana de la celda en forma perpendicular al haz reflejado e incide sobre el espejo posterior (refleja parte de la fluorescencia) y la rejilla de difracción. Parte de la fluorescencia que se refleja de la rejilla es regresada por el espejo de sintonización, que se ajustó por medio de tornillos milimétricos para obtener a la salida acción láser (Figura 10.2 b y c).

En la Figura 10.2, se puede observar las diferentes emanaciones al alinear el láser de pigmento; primero se obtuvo la fluorescencia del haz, posteriormente se ajustaron cada uno de los elementos de la cavidad para obtener acción láser como se ve en la Figura 10.2 b y este se enfocó en un punto con la intención de tener una densidad alta de energía (Figura 10.2 c).

En la Figura 10.1 se muestra la configuración del láser de pigmento con el fin de obtener acción láser (haz coherente, monocromático y de alta intensidad).

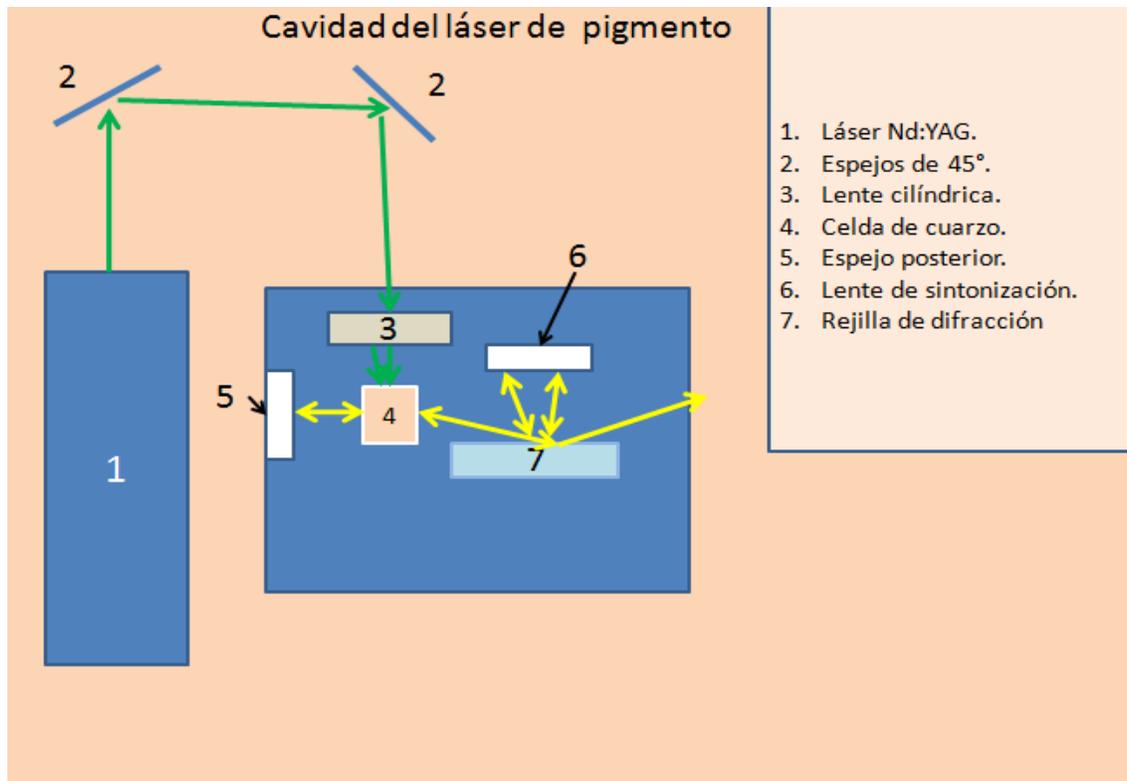


Figura 10.1 Cavidad del láser de pigmento reconstruido. Las líneas amarillas corresponden a la fluorescencia del pigmento y las líneas verdes al haz verde (532 nm) del láser Nd:YAG.

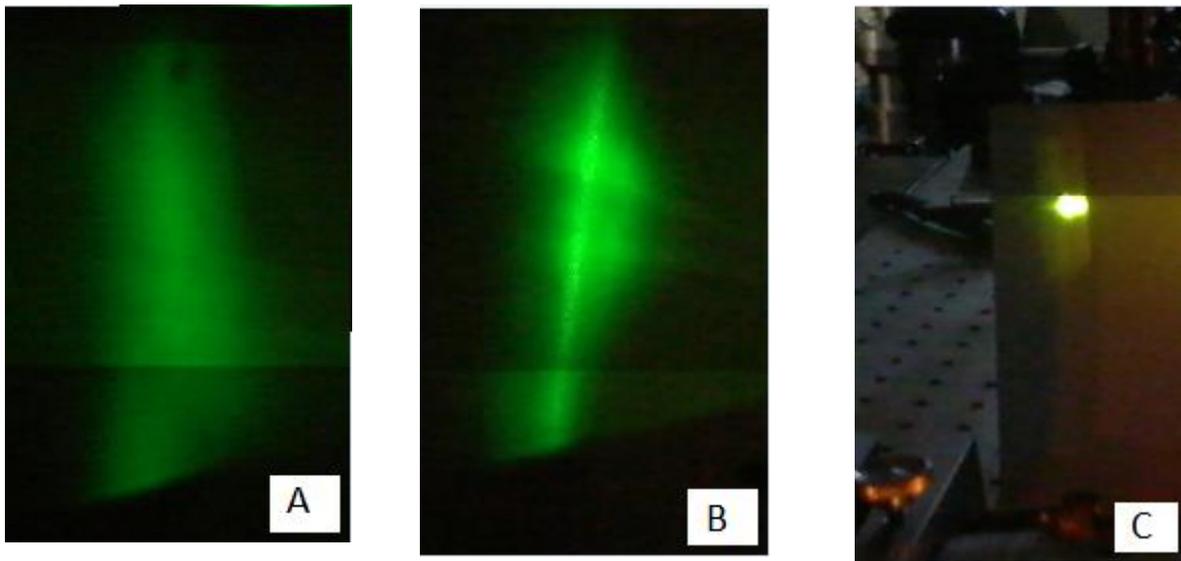


Figura 10.2. La fotografía A corresponde a la fluorescencia de la rodamina 6 G, la fotografía B a la emisión láser del mismo pigmento, y la fotografía C es la misma emisión láser enfocada en un punto.

Una vez construido el láser de pigmento se implementó el sistema de medición para obtener espectros de acción láser.

## 10.2.5 Sistema de medición.

### 10.2.5.1 Características del sistema de medición.

Los elementos empleados como se había mencionado son una fibra óptica, un monocromador, un fotodiodo, un integrador-promediador, un convertidor analógico digital y una computadora. Se explica a continuación cada una de las características y funcionamiento de estos elementos.

La fibra óptica que se utilizó en este arreglo fue una fibra utilizada anteriormente en un microscopio oftálmico.

#### Fibra óptica

Fibra óptica	Utilizada en un microscopio
Ancho	5 mm
Largo de la fibra	1.50 m

Tabla 10.4

El Monocromador utilizado tiene una configuración Czerny-Turner (ver capítulo 8), que se empleó para separar la longitud de onda de interés. Se ajustó la salida de la fibra óptica a la entrada del Monocromador, con el propósito de obtener una mayor señal de salida del Monocromador (Manual de operación de espectrómetro Avantes). Se controlaron automáticamente por software la velocidad de barrido y la apertura de las rendijas. Se muestra en la siguiente tabla las características de este equipo.

#### Monocromador

Monocromador	Marca Pacific Instruments, modelo MP1018B
Configuración	Czerny-Turner
Rejilla de difracción	1800 líneas
Selección de barridos	2,5,10,20,50 y 100 nm/min
Resolución de rejilla	0.1 nm
Rango de apertura de Rendijas	5

Tabla 10.5

El fotodiodo empleado tuvo que ajustarse a la señal de salida del Monocromador para captar la mayor cantidad posible de luz. El fotodiodo convertía la señal óptica en una señal eléctrica que iba al integrador-promediador. Se armó una configuración ultra-rápida del fotodiodo para captar las señales de luz del láser de pigmento (Catalogo de información Hamamatsu). Las características del fotodiodo son las siguientes:

#### Características del fotodiodo

Fotodiodo	Marca Hamamatsu, modelo S1722-02
Ventana	Ventana de sílica, sensible al UV
Sensibilidad	190 a 1064 nm
Configuración	Configuración del circuito para respuestas de luz ultrarrápidas

Tabla 10.6

La señal eléctrica del fotodiodo, es integrada por un boxcar (integrador-promediador), por medio de un generador de ventana que iniciaba a través de una señal de disparo dada por el láser Nd:YAG (el ancho de ventana de integración podía ser modificado). El boxcar se configuró para tomar un cierto número de muestras que son promediadas, cuyo fin es aumentar la razón Señal/ruido y el ruido converja a cero. Este equipo permite ver señales con pulsos rápidos para ser registrados por un convertidor Analógico-digital (Manual de operación boxcar, SR250). Las características utilizadas por el boxcar para la obtención de espectros se muestran a continuación:

#### Integrador-promediador

Integrador	Marca Stanford Research System, modelo SR250
Integrador de ventana de alta velocidad	Tipo NIM
Trigger:	Externo (dado por el láser)
Promediación (muestras/min)	10 a 100
Ancho de ventana	100 ns
Sensibilidad de la señal	20 mV
Retraso	100 ns

Tabla 10.7

La señal analógica de salida del boxcar es convertida a una digital por medio de un convertidor analógico/digital, para ser desplegada por software de nuestra computadora (matlab).

#### Convertidor Analógico-Digital

Convertidor AD	Marca Picolog, modelo ADC-20/24
Resolución	24 bits
Rango de voltaje	+/-2.5 volts
Terminal de conexión	PP310 ADC-20/ADC-24
Tiempo de conversión	60 ms

Tabla 10.8

El software utilizado fue diseñado en el laboratorio, para controlar el inicio de barrido de la señal y la velocidad a la que irá el Monocromador (dada en angstroms por minuto) para el registro del láser, además de comenzar la conversión de datos analógicos a digitales para ser mostradas las señales.

#### Software de adquisición

Matlab	Versión 2010
Numero de muestras	10 S/seg (10 muestras por segundo)
Tiempo de conversión utilizado	60 ms

Tabla 10.9

#### 10.2.5.2 Funcionamiento del primer arreglo experimental.

Se dará una explicación general del funcionamiento del sistema, acorde a cada una de los componentes antes vistos.

La acción láser fue conducida por un una fibra óptica hasta el Monocromador (para separar la longitud de onda a estudiar), la señal entra al monocromador y es conducida a una rendija ajustable. La rendija reflejará la señal a la longitud de onda de interés, para posteriormente salir del monocromador y ser recolectada por un fotodiodo que contiene un cátodo fotoemisor (fotocátodo). La señal captada es integrada y promediada por un boxcar para obtener una mayor relación señal/ruido. Una vez integrada y promediada, esta será convertida por una tarjeta Analógico digital y desplegada en una computadora. El esquema de abajo muestra como fue configurado el arreglo experimental.

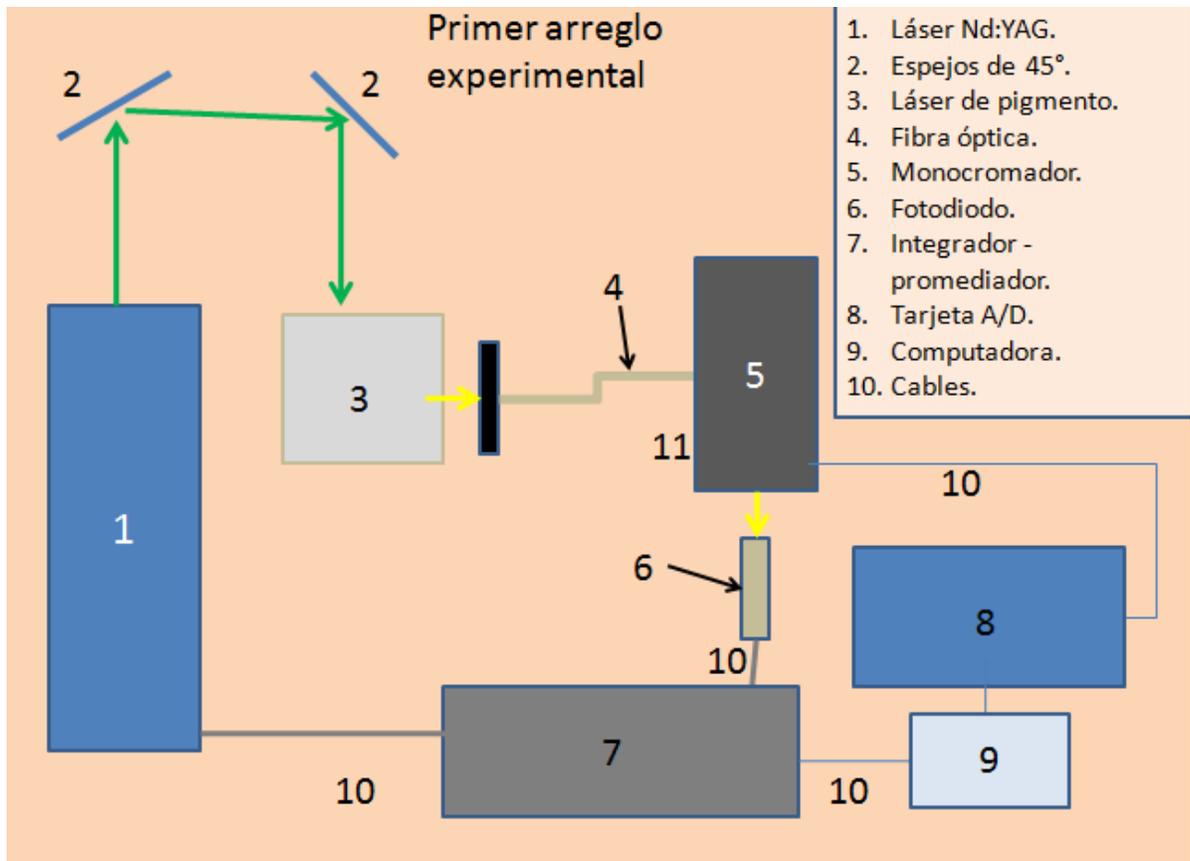


Figura 10.3. Primer arreglo experimental construido en el laboratorio para la caracterización del láser de pigmento (donde el pigmento es Rodamina 6G). En verde se tiene la emisión del láser del Nd:YAG en 532 nm y amarillo la emisión láser del pigmento.

### 10.2.5.3 Resultados del primer arreglo experimental.

Los espectros del láser de pigmento de la Figura 10.3, fueron obtenidos modificando los parámetros de velocidad de barrido (50 y 100 Anstrongs/min) y la apertura de la rendija de salida, ambos del monocromador. También se modificó la posición de la lente de sintonía del láser de pigmento y el número de muestras promedio por el boxcar. Las longitudes de onda de los resultados son mostrados en Anstrongs (1 Anstrong = 10 nm) debido a que el monocromador opera a estas unidades.

En la siguiente figura se muestran los espectros, modificando la apertura de la rendija del Monocromador y dejando fijo la velocidad de barrido (100 Å/min), el número de muestras promediadas (10 muestras) por el boxcar y el espejo de sintonización. En estas señales se observa la emisión máxima de acción láser y el FWHM o ancho a media altura, que es el ancho de una curva o función, medida a

partir de dos puntos extremos sobre la curva y que se encuentran a la mitad de la emisión máxima.

Espectros promedio del láser de pigmento rodamina 6G

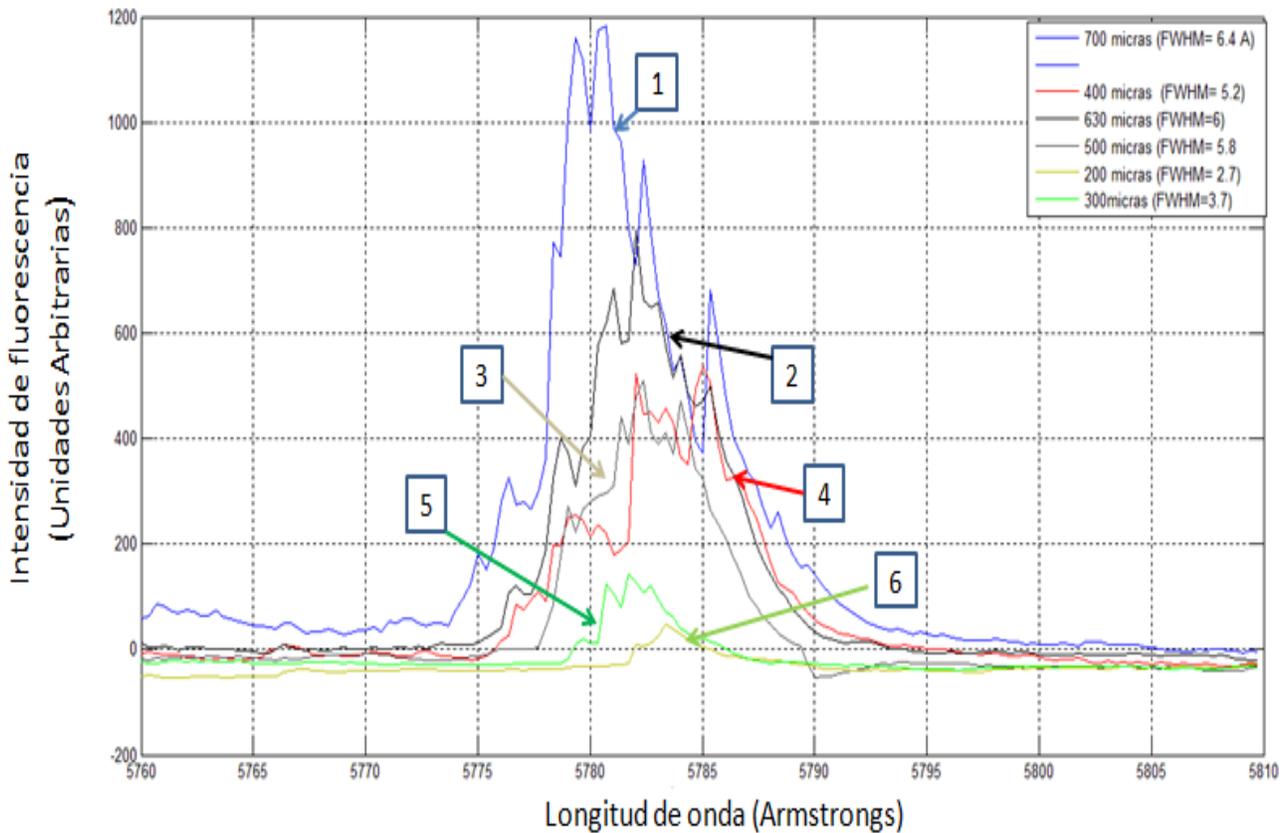


Figura 10.4. Espectros obtenidos a partir de una apertura de la rendija a: 1) 700 micras (emisión máxima 5781 Å), 2) 630 micras (emisión máxima 5782 Å), 3) 500 micras (emisión máxima 5782 Å), 4) 400 micras (emisión máxima 5785 Å), 5) 300 micras (emisión máxima 5782 Å), y 6) 200 micras (emisión máxima 5783 Å). El tamaño de 700 micras tiene la más alta intensidad y cuenta con una FWHM de 6.4 Armstrongs. Estas señales fueron tomadas a 10 Hz del haz del láser Nd:YAG con una velocidad de 100 Å/min (Monocromador), promediando a 10 muestras (boxcar).

Los espectros muestran una disminución en la captación de intensidad del láser, conforme se acorta el ancho de la rendija. La apertura de 200 micras es la que presenta la más baja emanación de la señal óptica. Existen corrimientos en la emisión máxima de hasta 4 Å; sin embargo se mantiene en una emisión aproximada de 5780 Å.

En los espectros mostrados a continuación se fijó la apertura del Monocromador a 300 micras y se modificó la posición del espejo de sintonización (el movimiento se

hizo girando el tornillo milimétrico) comenzando en una posición de 0 mm hasta de .45 mm con la intención de no perder acción láser y obtener una mayor intensidad en la emisión.

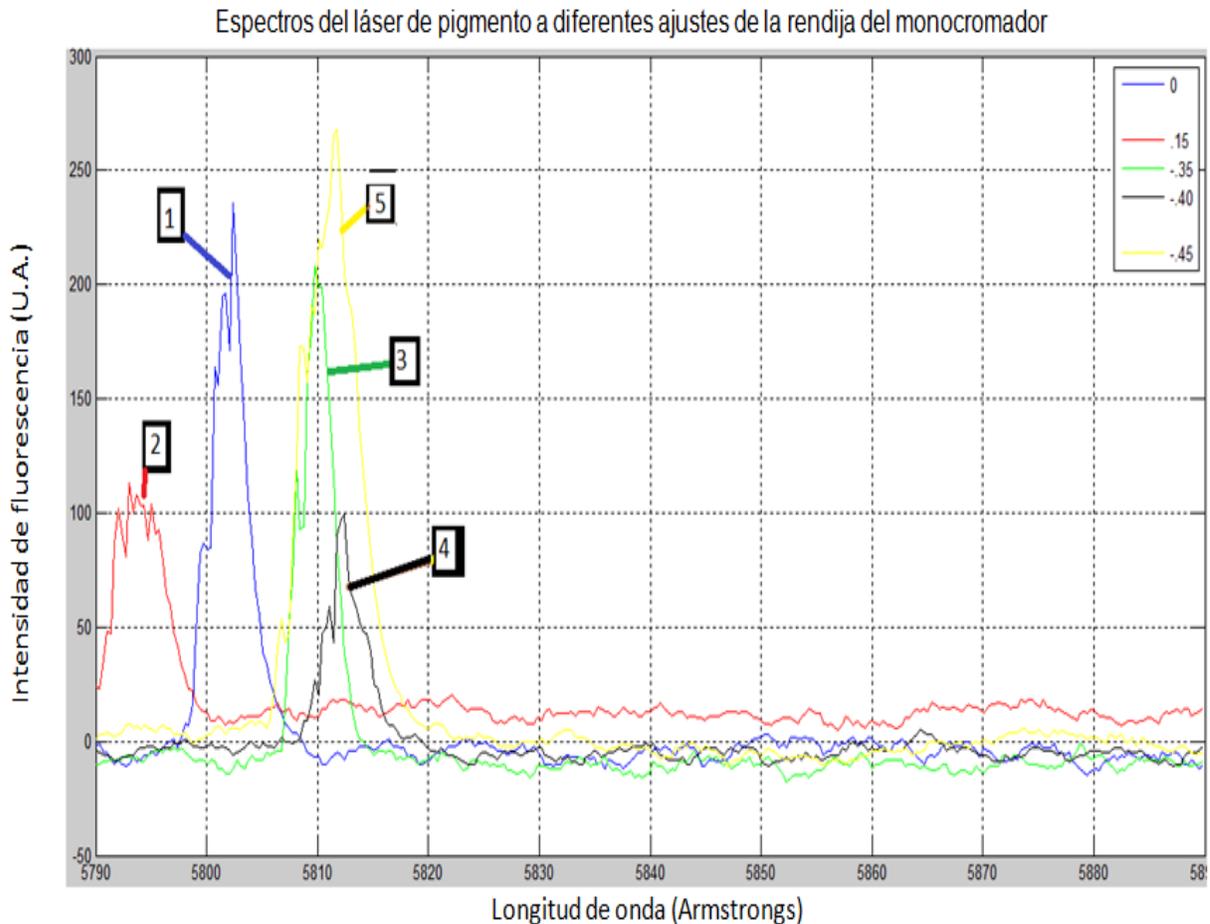


Figura 10.5. Espectros obtenidos a partir del ajuste del espejo de sintonización siendo 1) inicio (0 mm) con una FWHM de 2.9 Å, 2) .15 mm (contrario a las manecillas del reloj) con FWHM de 5.8 Å., 3) .35 mm (manecillas del reloj) con FWHM de 2.6 Å., 4) .40 mm (manecillas del reloj) con FWHM de 3.3 Å. y .45 mm (manecillas del reloj) con FWHM de 5.29 Å. Se hicieron las mediciones con una rendija de salida de 300 micras y a 10 muestras promedio y a 10 Hz.

En la Figura 10.5 existe un corrimiento en longitud de onda y en algunos casos un aumento en la intensidad. Se muestra que el espectro 4 tiene una menor intensidad de la acción láser y se encuentra en una posición de .40 milímetros (a favor de las manecillas del reloj) con respecto a la posición inicial de 0 milímetros. En estos resultados existe un posible problema con el espectro 5 ya que la emisión debería de disminuir en lugar de aumentar al mover el espejo de sincronización más a favor de las manecillas del reloj, por lo que pudo haberse desalineado la cavidad del láser de pigmento al mover el espejo de sintonización.

El primer arreglo nos ayudó a caracterizar espectros del láser de pigmento para rodamina 6G y familiarizarnos con la captación de espectros y con el sistema de medición, sin embargo se necesitaba observar cual era la intensidad de fluorescencia en células. Se usó otro tipo de equipo que fuera más sencillo de ajustar los parámetros de obtención de espectros y observar la intensidad de fluorescencia del NADH en células, este fue el caso del espectrómetro Avantes que es un Monocromador, fotodiodo, integrador-promediador y convertidor A/D. Los siguientes arreglos fueron elaborados con este equipo y con elementos ópticos adicionales para captar fluorescencia del NADH de células mononucleares.

### **10.3 Segundo Arreglo experimental.**

En este segundo arreglo experimental se empleó el espectrómetro Avantes, que está constituido por un arreglo de fotodetectores CCD, un Monocromador de tipo Czerny-Turner, un integrador-promediador para reducir el ruido y un convertidor analógico digital. La señal captada de fluorescencia de la muestra es conducida por una fibra óptica multimodo hasta el Espectrómetro Avantes (ver capítulo 8). Se ocuparon en un principio varios elementos de la cavidad del láser de pigmento sin hacer uso del agitador magnético y sin ajustar los espejos de la cavidad para producir acción láser.

En este segundo arreglo experimental se re-optimizaron espejos de la cavidad del láser Nd:YAG, se hicieron ajustes al montaje del generador de armónicos para mover los cristales y tener la mayor intensidad de salida en el haz a 355 nm (10 mW). Se hicieron mediciones de intensidad de fluorescencia con Cumarina 460, disuelta en alcohol y con una concentración de 1.1 mM. La emisión máxima de este pigmento se encuentra a una longitud de onda cercana a la molécula NADH que es de 450 nm (sigma). La ventaja de la cumarina es que no se degrada tan fácilmente como el NADH comercial y es más barato su uso.

La distancia y altura de captación de fluorescencia fueron variándose a partir de la intensidad de los espectros mostrados por el software del Avantes. En estas mediciones se colocó un trozo de papel albanene en la fibra óptica con el propósito de no dañar los fotodetectores del espectrómetro Avantes (ver Figura 10.7). La Figura 10.6 muestra la configuración final de este segundo arreglo.

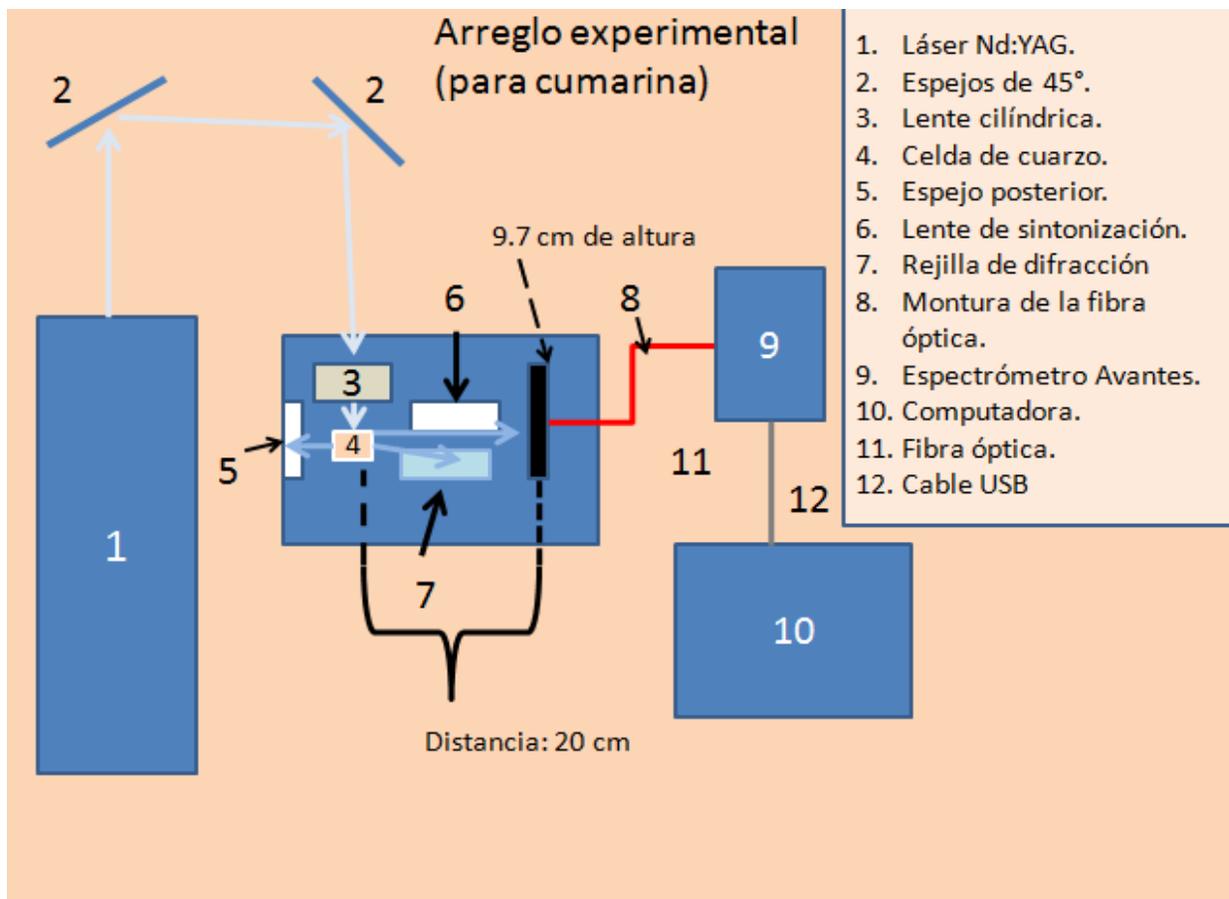


Figura 10.6. Las flechas de color azul claro que salen del láser Nd:YAG son del haz 355 nm que inciden sobre la cavidad. Las flechas de color azul que salen de la celda de cuarzo y que entran a la montura de la fibra óptica pertenecen a la fluorescencia de la cumarina.

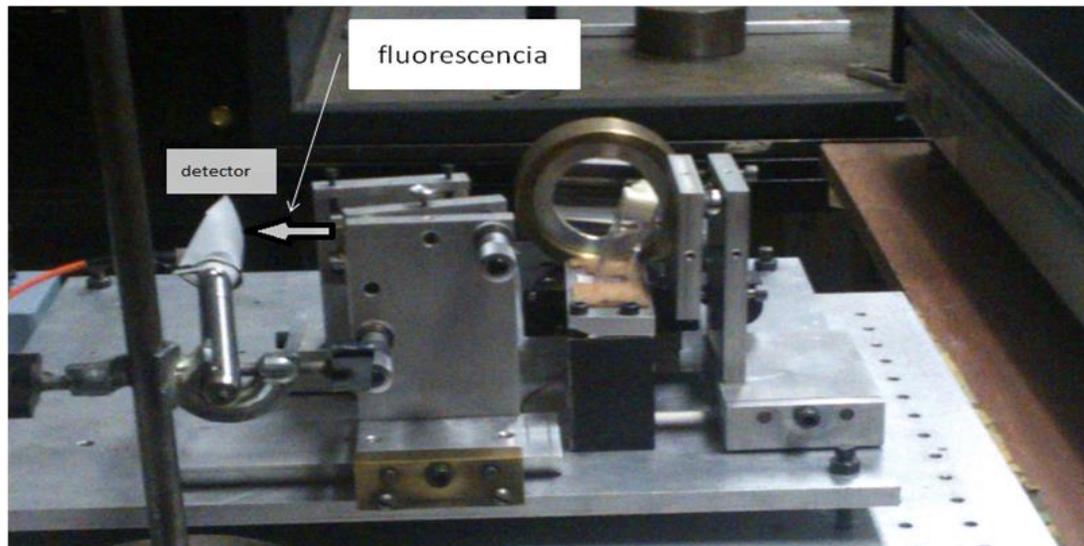


Figura 10.7. Fotografía del arreglo para obtención de muestras de cumarina. La montura que sostiene la fibra óptica, tiene papel albanene con el fin de proteger el detector del espectrómetro Avantes.

Los espectros de fluorescencia que se obtuvieron con este arreglo, muestran que la fluorescencia emitida tiene una gran variabilidad en la intensidad, debida a la fuente de excitación (Nd:YAG). A continuación se muestran dichos espectros.

## Espectro de Cumarina 460

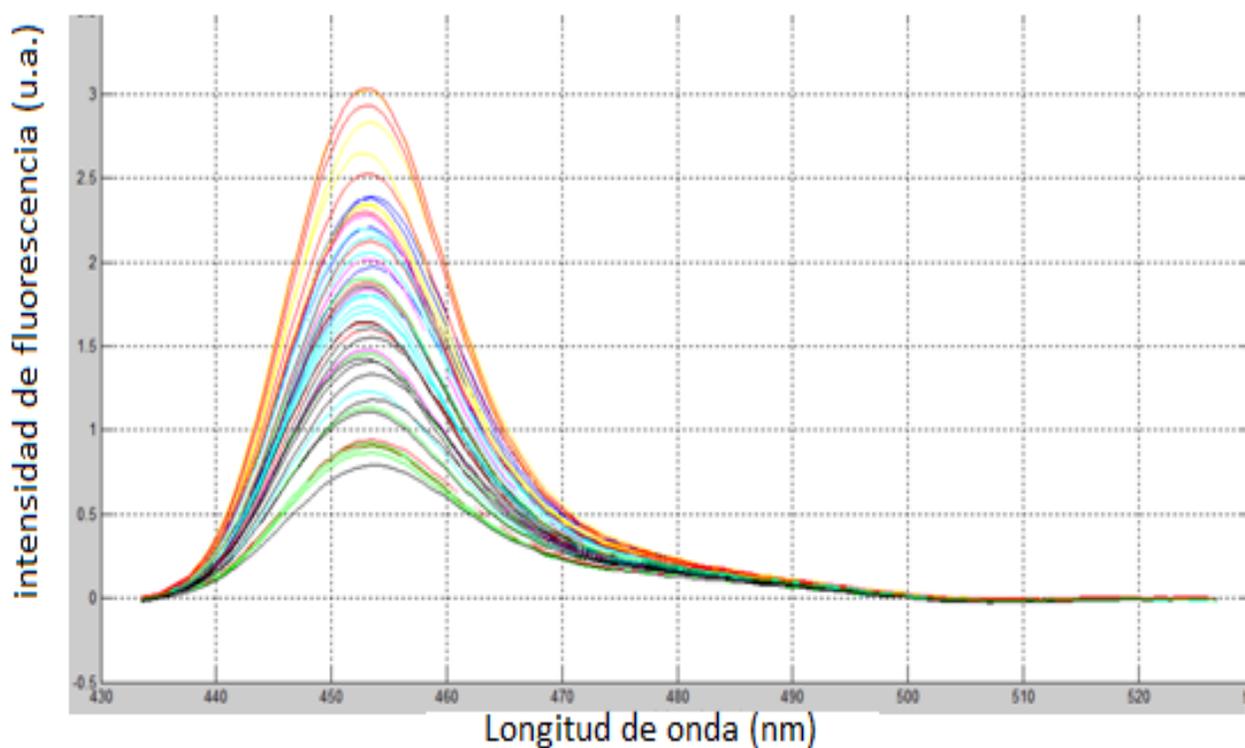


Figura 10.8. El número total de espectros son 58 obtenidos cada 30 segundos, con una intensidad máxima en 455 nm, sin embargo como se ve en la Figura hay una gran variabilidad en la intensidad en cada una de las muestras.

A pesar de la variabilidad de la intensidad se prosiguió con las mediciones, ocupándose una menor cantidad de cumarina 460 disuelta en alcohol, ya que las cantidades fisiológicas del NADH in vitro reportadas en algunos artículos en estado de normoxia y anoxia son de 5  $\mu\text{M}$  y de 50  $\mu\text{M}$  respectivamente.

Espectros de cumarina 460 con una concentración de 50  $\mu\text{M}$

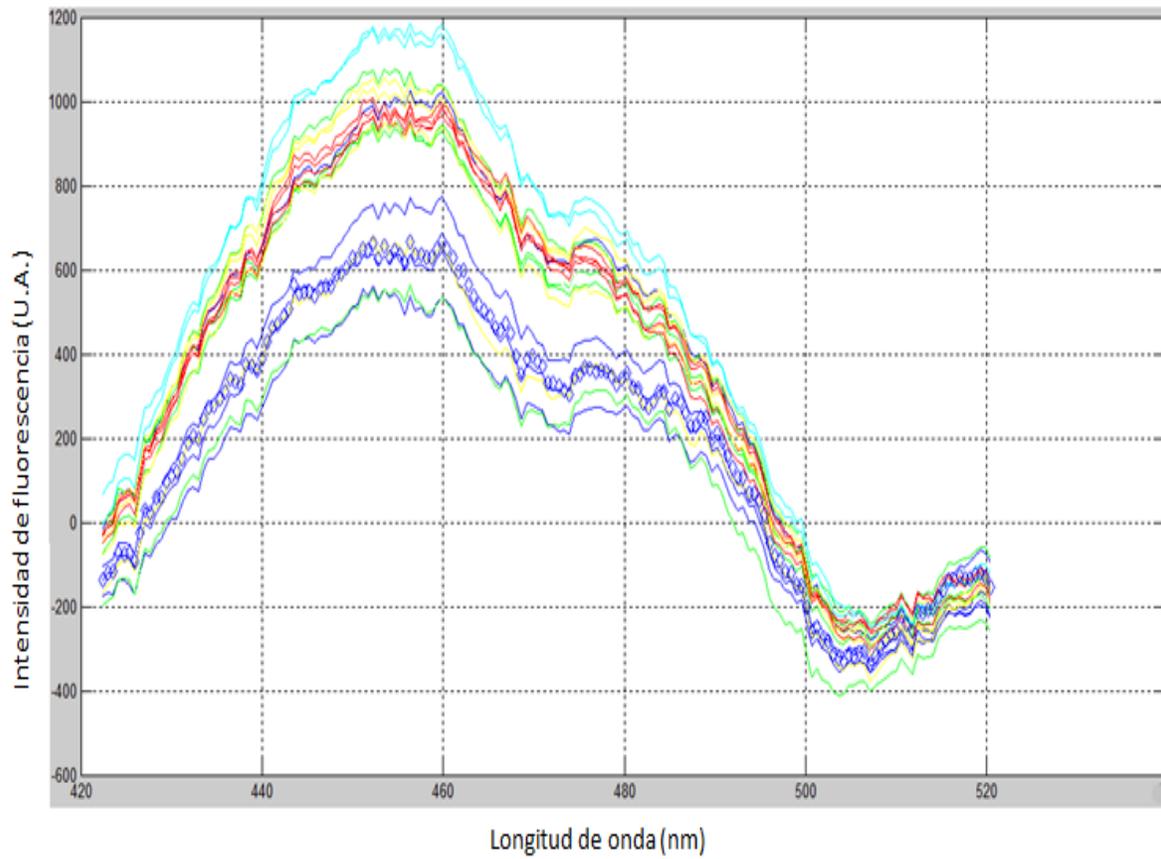


Figura 10.9. Los espectros se obtuvieron cada 15 segundos, siendo un total de 21 espectros para la cumarina 460 a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ . La máxima intensidad cercana a 1200 u.a.

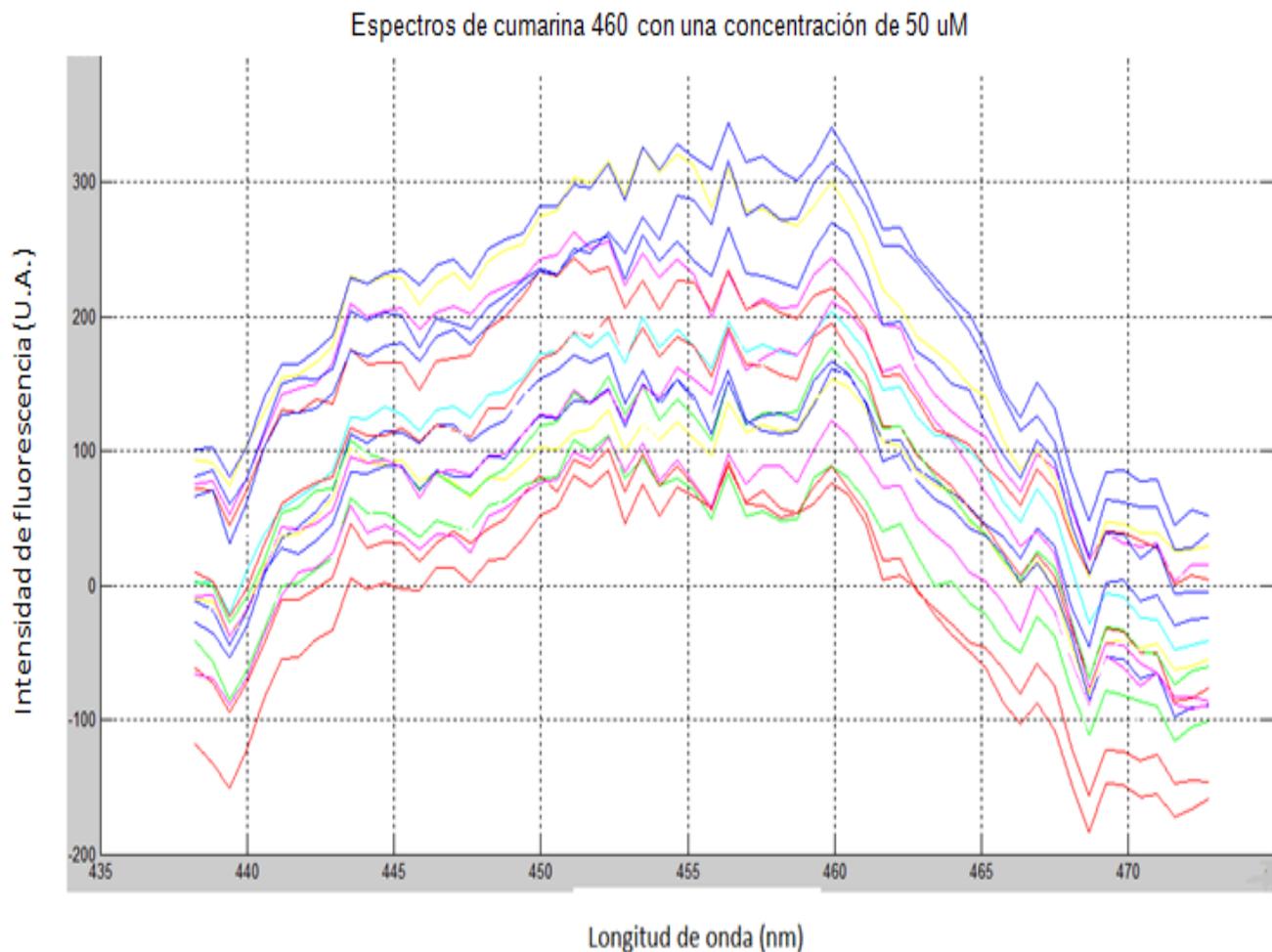


Figura 10.10. Los espectros se obtuvieron cada 15 segundos, siendo un total de 21 espectros para la cumarina 460 a una concentración de 5  $\mu\text{M}$ . La máxima intensidad de 346 u.a. que es un 70% menor a la concentración de 50  $\mu\text{M}$ .

Estos resultados suponían que el segundo arreglo experimental era capaz de poder medir la fluorescencia del NADH en células, por lo que se pidieron células Beta al laboratorio de biofísica. Sin embargo las necesidades de captar la señal de fluorescencia del NADH en células, llevó a modificar el arreglo experimental nuevamente. A continuación se describe el tercer sistema de medición.

#### 10.4 Tercer Arreglo experimental.

El tercer arreglo necesitó remover algunos elementos ópticos del láser de pigmento que no contribuían a mejorar la intensidad de fluorescencia, como es el caso del espejo de sintonización, espejo trasero, rejilla de difracción y la lente cilíndrica, dejándose solo el soporte de la muestra.

El sistema de medición ocupó un colimador con el fin de tener un haz de rayos paralelos a la entrada del espectrómetro Avantes, además de conseguir una mayor captación de fluorescencia. También se utilizó un filtro de luz ultravioleta para disminuir la cantidad del láser reflejado por la muestra. La tabla de abajo muestra las características de los elementos antes dichos.

Característica del filtro y del colimador

Filtro UV	Filtro de la señal en ultravioleta. Marca uvex.
Colimador	Colimador de la serie LC-22, con rango de 380-2200 nm, con apertura de 2.2 cm, y 3.175 cm dentro del alojamiento de aluminio.

Tabla 10.10

En esta nueva configuración del arreglo experimental, se midió NADH de células Beta (provenientes de un cultivo celular, centrifugándose y suspendiéndolas en PBS) y de células mononucleares (obtenidas del protocolo del capítulo 8), en estas mediciones no se llevó a cabo conteo celular.

Con los nuevos elementos introducidos se buscó fluorescencia dentro del rango de 400- 500 nm, a partir de esto se obtuvo la siguiente configuración:

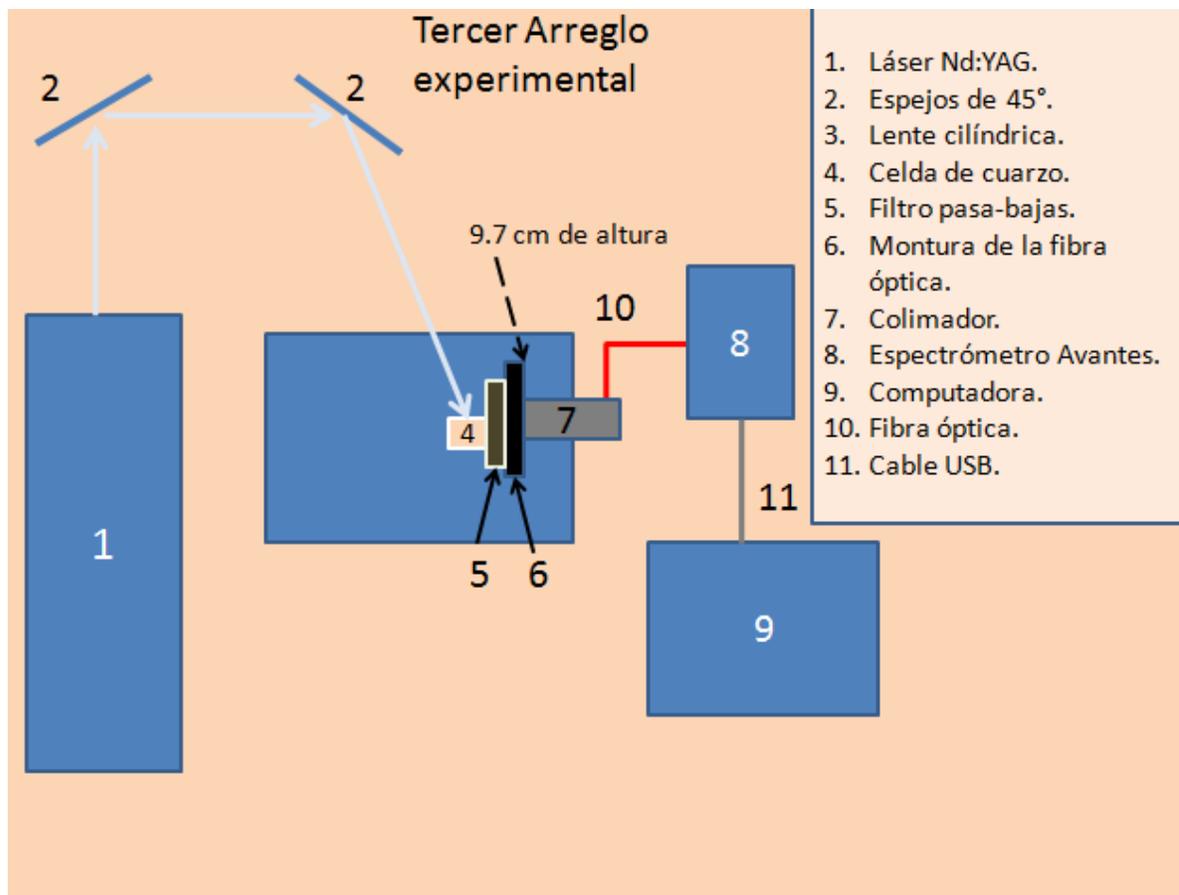


Figura 10.11. Nuevo arreglo experimental para la obtención de espectros de NADH de células mononucleares y beta. El arreglo experimental mostró tener sensibilidad a las longitudes de onda donde se encuentra la fluorescencia del NADH. La distancia entre el colimador y la muestra es pequeña (los elementos están en contacto).

Los espectros del NADH de células Beta mostraron una intensidad menor a la presentada en los de cumarina con concentraciones de 5  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ , a pesar de haberse encontrado una posición óptima para la intensidad de fluorescencia con cumarina. El primer espectro promedio muestra las primeras mediciones obtenidas por el arreglo (ver Figura 10.9) y el segundo fue obtenido después de hacer una re-suspensión de células beta (ver Figura 10.10). Los espectros se promediaron a partir de 7 muestras.

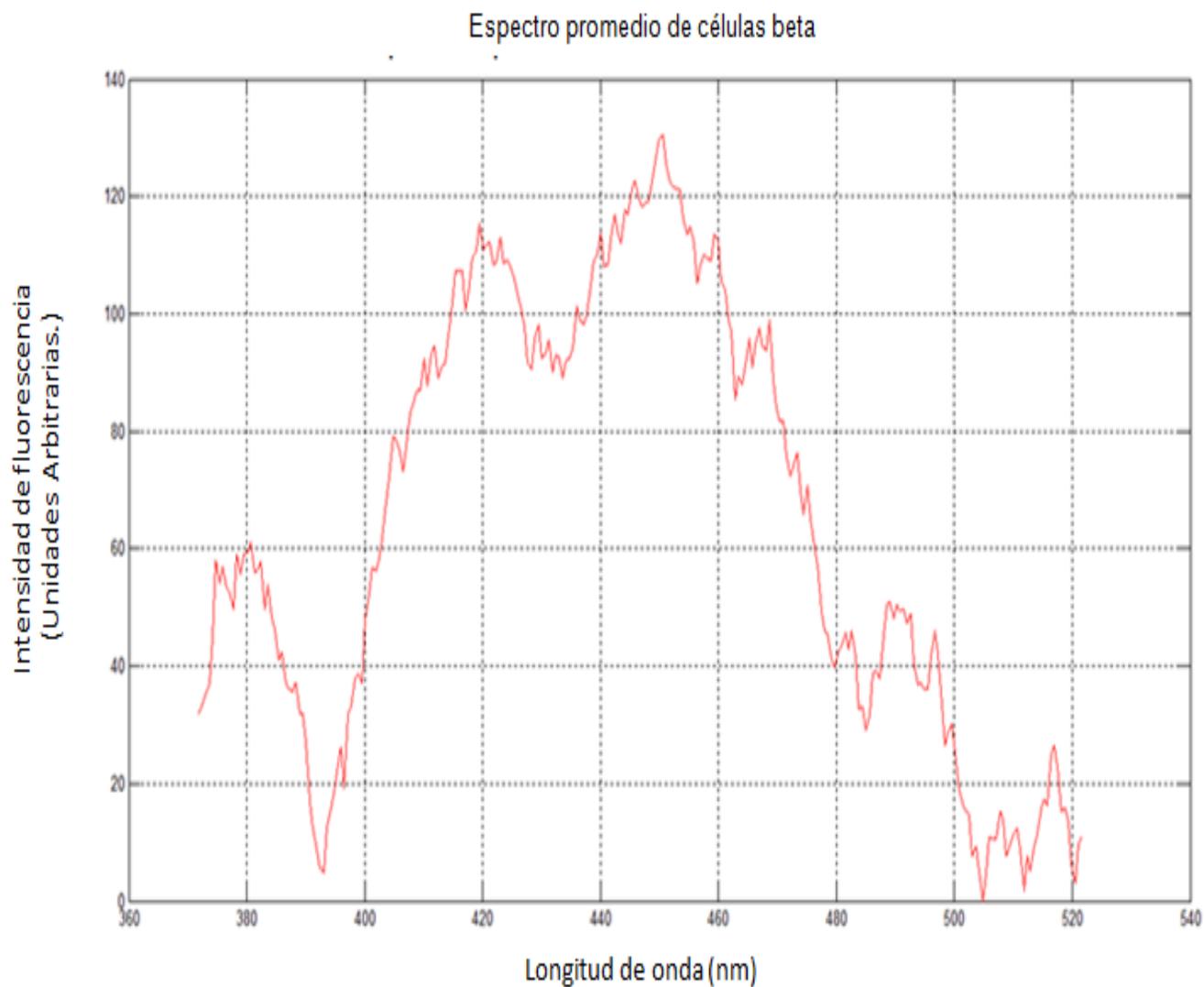


Figura 10.12. Espectro de NADH de células beta. Se obtuvieron de un total de 7 espectros de células Beta. La emisión máxima promedio fue de 107.82 u.a. con una longitud de onda promedio en 453. nm. El FWHM es de 81.63 nm.

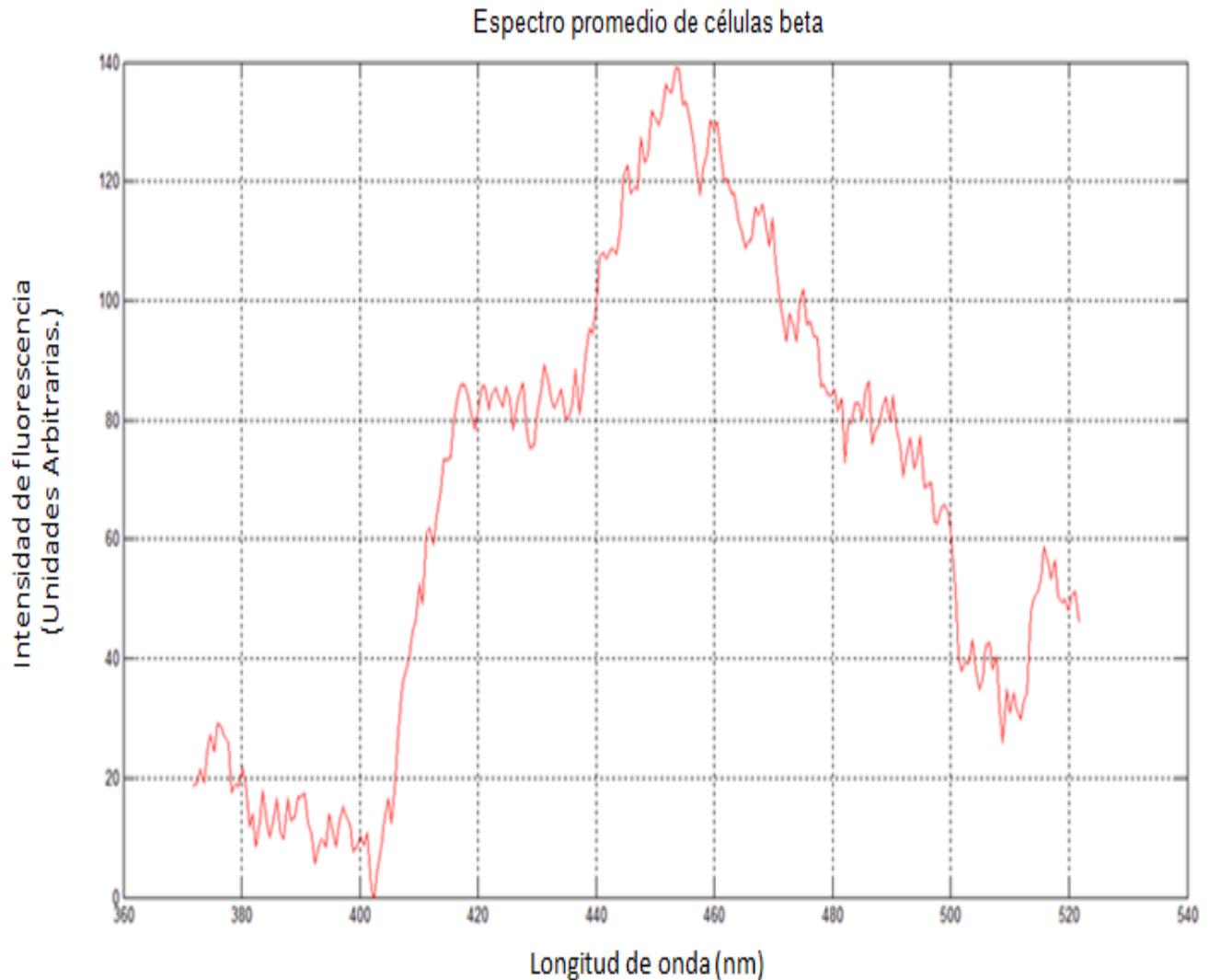


Figura 10.13. Segundo espectro promedio de NADH de células beta con una emisión máxima en 450 nm. Esta se obtuvo, después de haberse resuspendido la muestra, 15 minutos después. El FWHM es de 72.27 nm.

A continuación se empezó a medir la fluorescencia del NADH en células mononucleares. La obtención de la muestra se llevó a cabo a partir del protocolo de obtención de células mononucleares en ratas Wistar (ver capítulo 8). La medición fue de ratas maduras de distintas edades (6 meses y 8 meses).

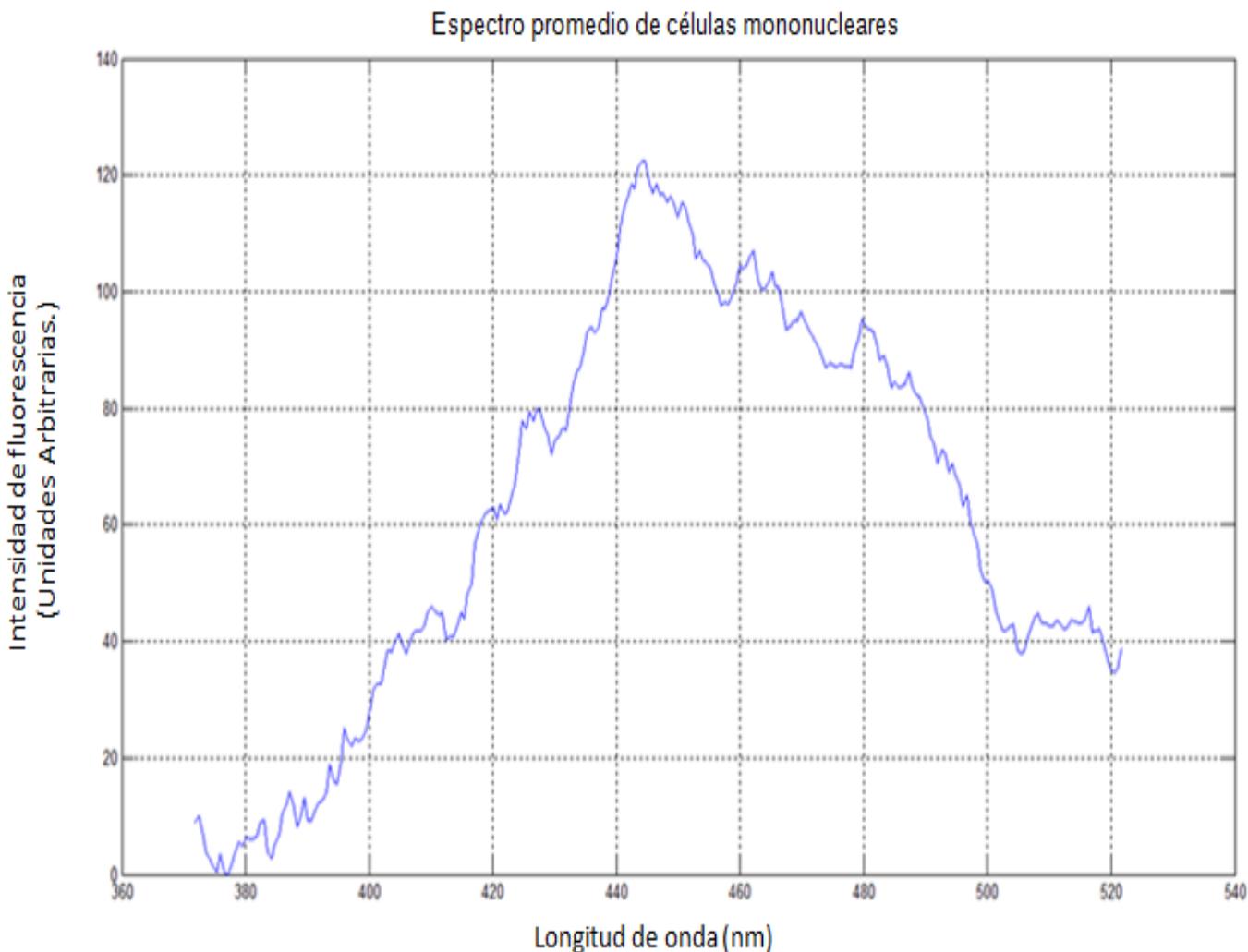


Figura 10.14. Espectro promedio del NADH de células mononucleares. La intensidad máxima es de 122.5 u.a. con una longitud de onda de 444.7 nm. El FWHM es de 78.8 nm. El número promediadas fueron 15. Este espectro corresponde a una rata de 6 meses de edad.

Se realizó un experimento que fue aumentar la temperatura de la celda de cuarzo, utilizando una placa peltier, el funcionamiento de esta placa consiste en inducir una diferencia de voltaje que provoca un flujo de corriente a través de dos placas semiconductoras unidas por soldaduras. Esta corriente produce una transferencia de calor desde una unión, que se enfría, a otra que se calienta (Senner, 1994). Se utilizó con la finalidad de observar el efecto de la temperatura en la fluorescencia del NADH en células mononucleares. El experimento se llevó a cabo con una rata de 8 meses. Estos espectros muestran un corrimiento en la intensidad máxima.

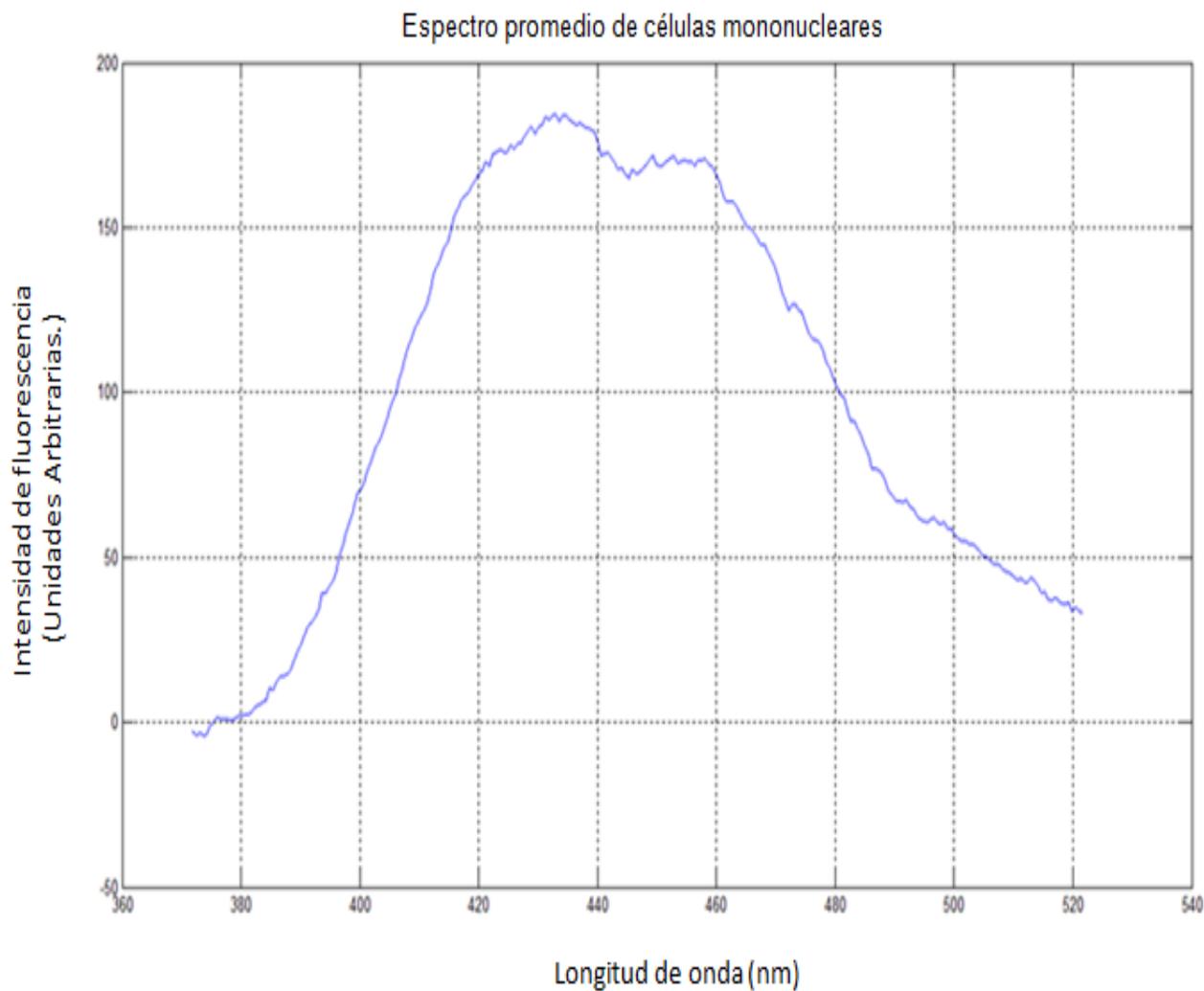


Figura 10.15. Segundo espectro promedio de NADH de células mononucleares. La intensidad máxima es de 184 u.a. con una longitud de onda de 433 nm. El FWHM es de 77.8 nm.

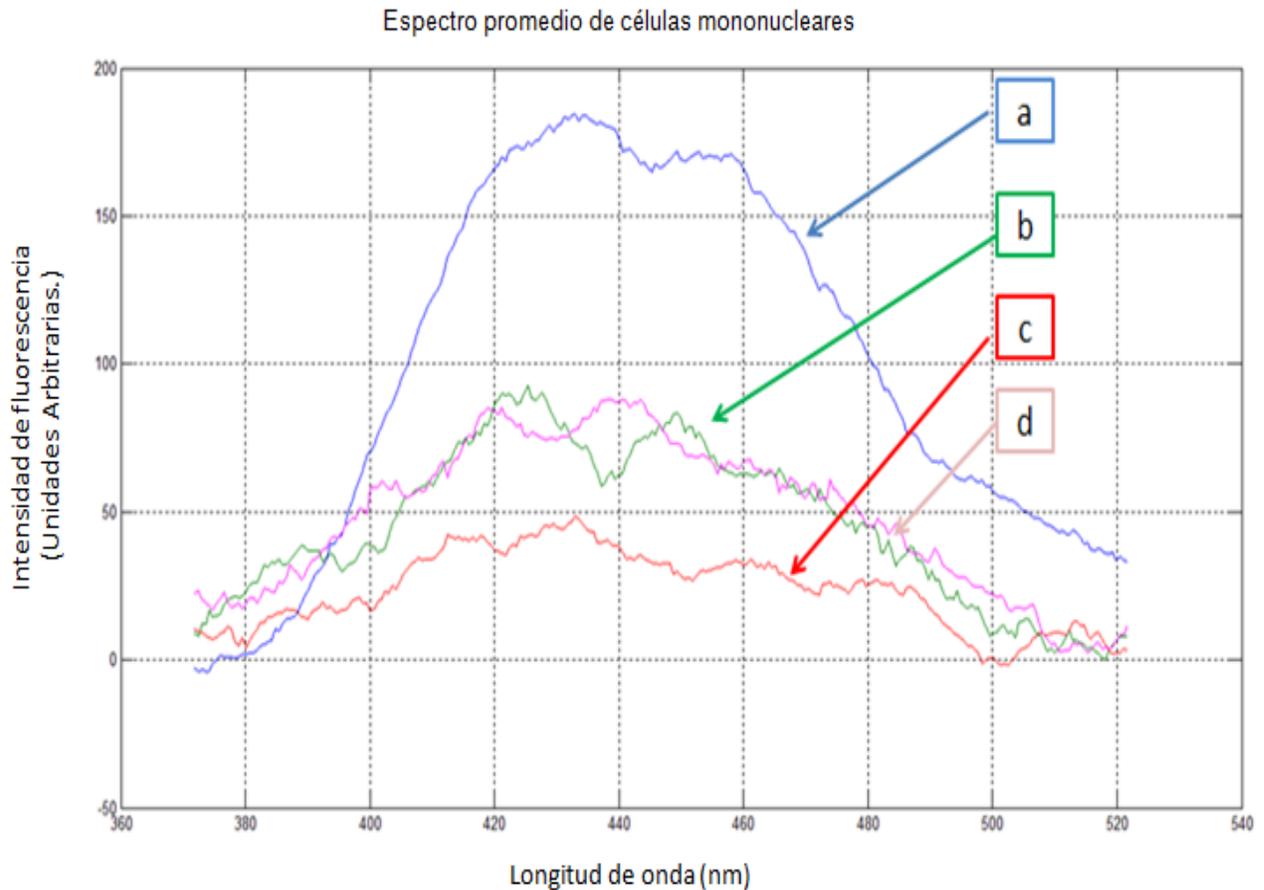


Figura 10.16. Espectros promedio del NADH de células mononucleares al aumentar la temperatura. El espectro **a** corresponde a 24 °C (emisión máxima en 432 nm) y FWHM de 77.86 nm., el espectro **b** corresponde a una temperatura de 32.3 °C (425 nm) y FWHM de 75.5 nm., el espectro **c** es 41 °C (433 nm) y FWHM de 87.2 nm. y el espectro **d** a 61 °C (443 nm) y FWHM de 66.12 nm.

Estos espectros muestran que la temperatura afecta la intensidad de fluorescencia del NADH de células mononucleares y que hay un corrimiento en la emisión máxima. Ahora bien a pesar de obtener espectros de fluorescencia, se realizó una nueva re-optimización del haz en 355 nm ajustándose espejos de la cavidad del láser y de la región de los hornos que contienen los cristales generadores de armónicos. El resultado fue un aumento en la captación de fluorescencia del NADH en células mononucleares, además de obtener una señal de fluorescencia posterior a 500 nm (pensándose que era la fluorescencia del FAD), sin embargo, esta era una emisión en 532 nm del láser Nd:YAG. El espectro se muestra abajo.

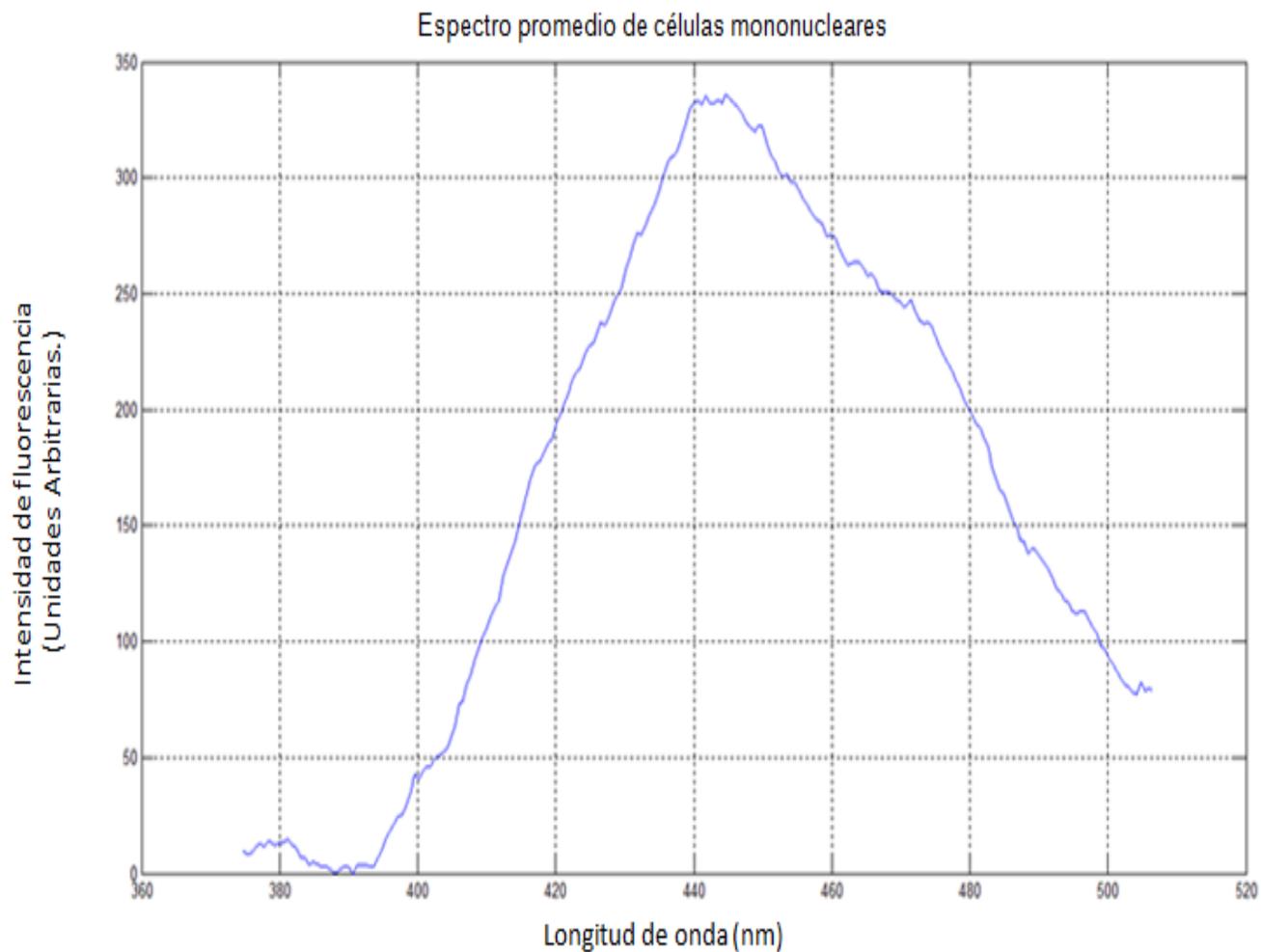


Figura 10.17. Espectro de NADH de células mononucleares con una emisión máxima mayor a los anteriores espectros. La intensidad máxima es de 337.6 u.a. y su longitud de onda es de 445 nm. El FWHM es de 67.96 nm.

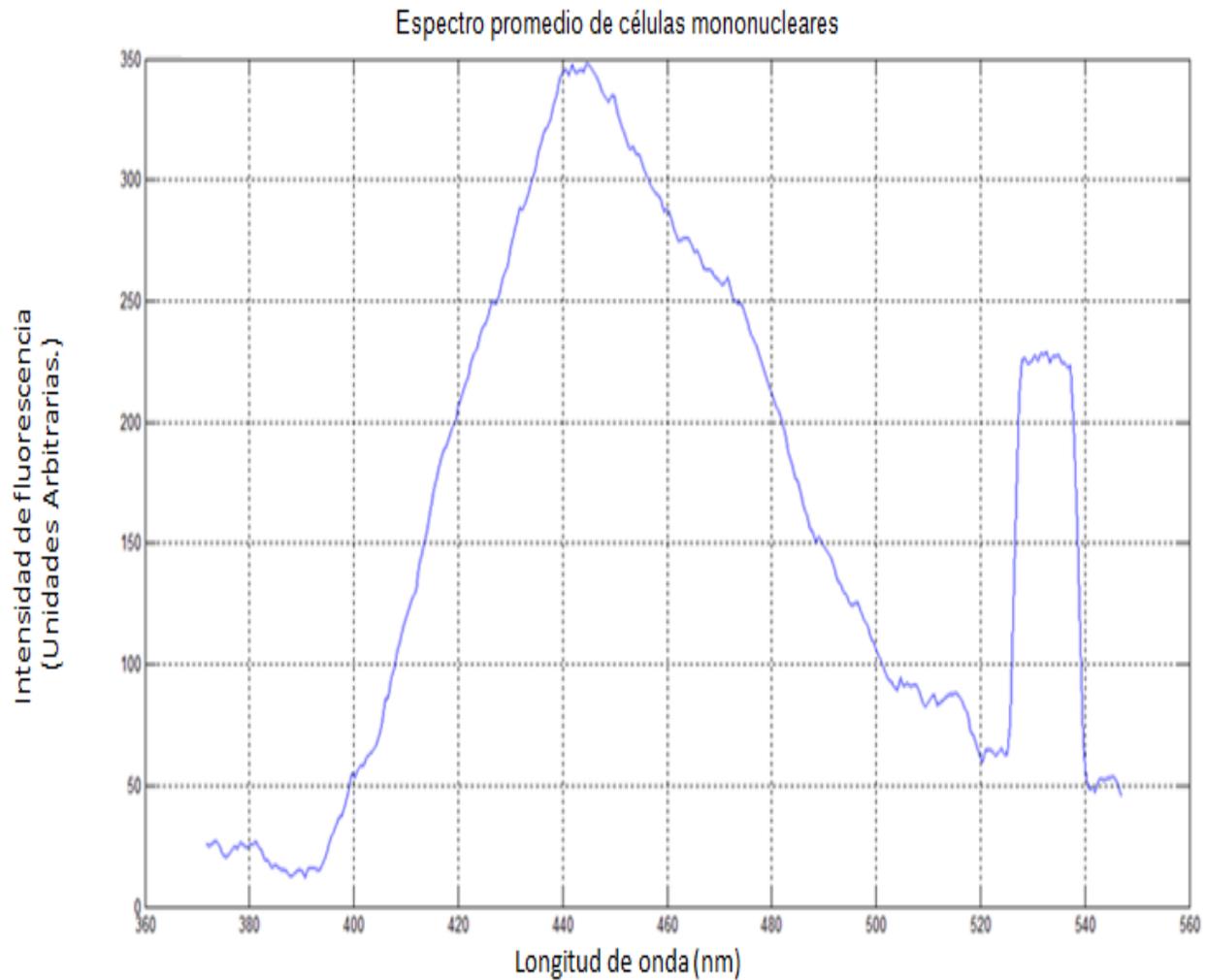


Figura 10.18. Espectros de NADH de células mononucleares y de la señal reflejada del láser en 532 nm con una emisión entre 520 y 540 nm con un FWHM de 14 nm.

Se evaluó el espectro de fluorescencia del NADH en células mononucleares en el tiempo. La medición se hizo a lo largo de 29.7 minutos, donde se muestra una caída en la fluorescencia, esto tal vez a una disminución no propiamente de la molécula, sino de una cierta inestabilidad del láser. La Figura 10.19, muestra el espectro promedio con una emisión máxima en 433 nm.

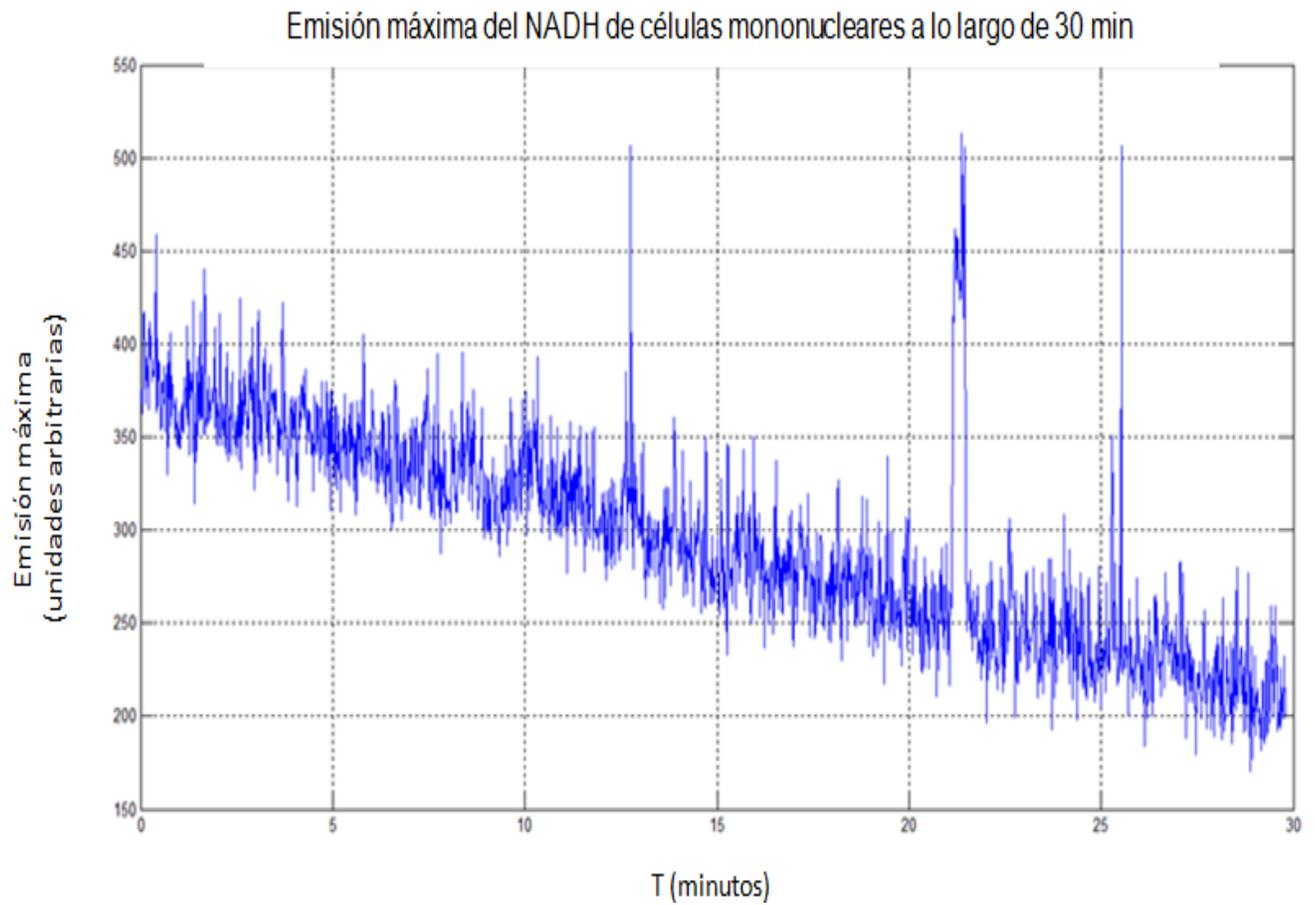


Figura 10.19. Gráfica en el tiempo de la emisión máxima de fluorescencia a lo largo de 29.7 minutos.

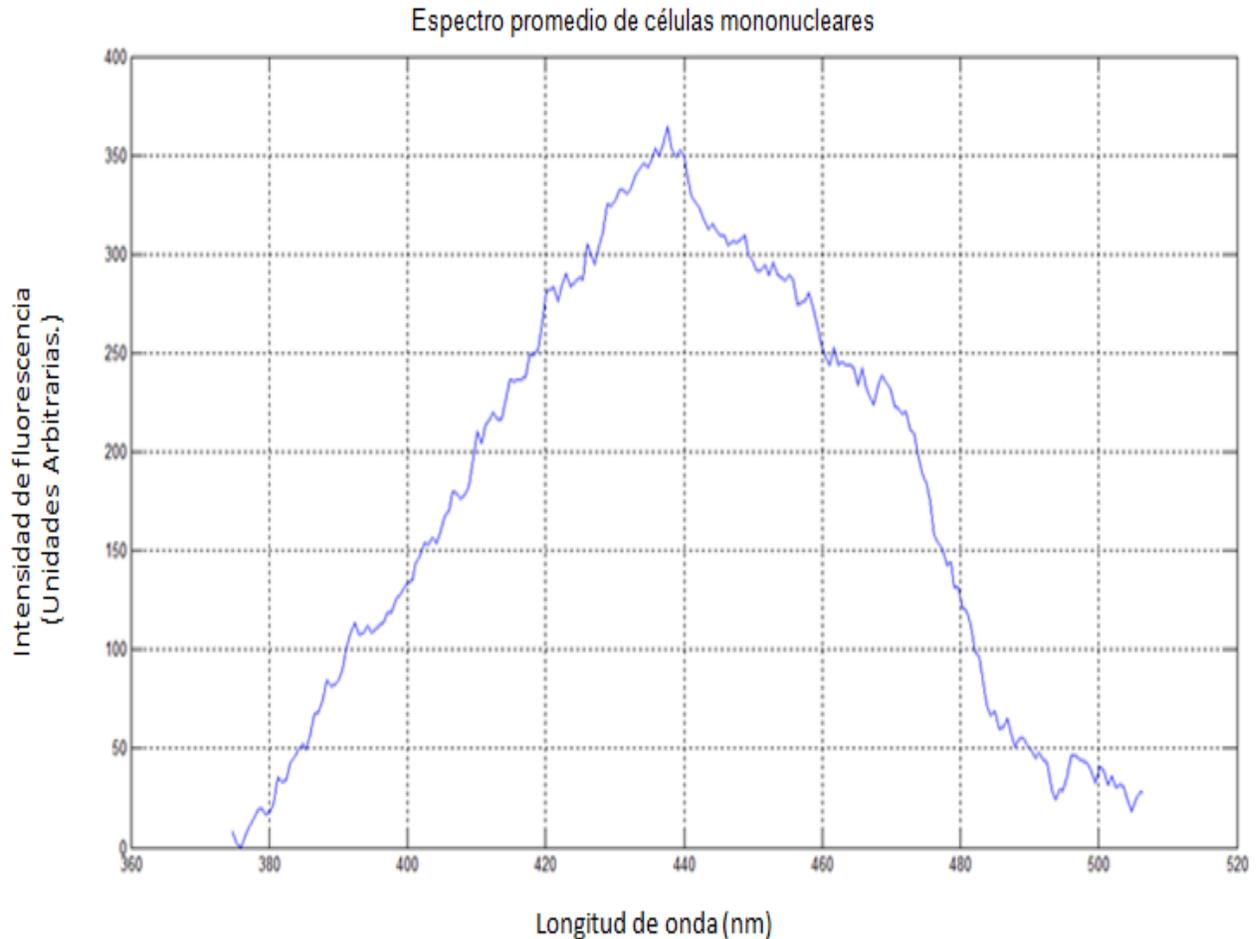


Figura 10.20. Espectro promedio de la medición hecha a lo largo de 29.7 minutos. La intensidad máxima se encuentra en 433. El FWHM es de 68 nm.

### 10.5 Cuarto arreglo experimental.

En este arreglo experimental se utilizó un arreglo 2f, remplazándose el colimador por una lente biconvexa. Esto mejoró la captación de fluorescencia, detectando más cantidad de esta en el espectrómetro Avantes. El cuarto arreglo experimental y último se muestra en el capítulo 8.

A pesar de tener este último arreglo experimental se tenían aún problemas con el láser Nd:YAG, se sospechaba que aún no se encontraba en una región estable, debe agregarse que la señal del láser en 355 nm se perdía, por lo que se revisó, la estabilidad en el tiempo. El resultado fue la gráfica en el tiempo que se hizo a lo largo de 1.5 horas (figura 10.19), mostrándose un decaimiento en el tiempo. El sistema de enfriamiento del láser (sistema de enfriamiento por agua) no tuvo la



- 2) Se colocaron dos polarizadores a los lados del montaje del polarizador-celda pockels, un difusor en la entrada de este y una tarjeta blanca en el oscilador (ver Figura 10.24) [Manual de operación y mantenimiento, HY1200, Lumonics]
- 3) Se alineó la celda pockels con la intención de obtener la cruz de malta en la tarjeta blanca. Se ajustaron los planos horizontal y vertical para tener una cruz centrada (Figura 10.25). Este ajuste garantiza una correcta alineación de la celda pockels. Todo esto se llevó a cabo con el láser apagado [Manual de operación y mantenimiento, HY1200, Lumonics].
- 4) Se prendió el láser y se encendió el sistema de la celda pockels midiéndose la potencia a la salida del oscilador, ajustando el espejo posterior, los espejos de 45° y el telescopio de la intracavidad (ver Figura 10.23) [Manual de operación y mantenimiento, HY1200, Lumonics].
- 5) Una vez teniendo una potencia en la longitud de onda fundamental de 0.5 Watts, con una potencia mayor a las obtenidas en anteriores optimizaciones, se alineo el haz de salida de la cavidad ajustando los espejos que reflejarán el haz hacia los hornos que contienen los cristales que triplicaran el haz a 355 nm (ver Figura 10.23) [Manual de operación y mantenimiento, HY1200, Lumonics].
- 6) Se colocó el medidor de potencia a la salida del láser y se ajustaron los hornos que contienen a los cristales con intención de obtener la máxima potencia a la longitud de 355 nm (Manual de operación y mantenimiento, HY1200, Lumonics).

Con estos ajustes se pudo obtener una mejor intensidad de fluorescencia. Se muestran abajo los diagramas mencionados en la serie de pasos que se llevaron a cabo para la re-optimización del láser (Manual de operación y mantenimiento, HY1200, Lumonics).

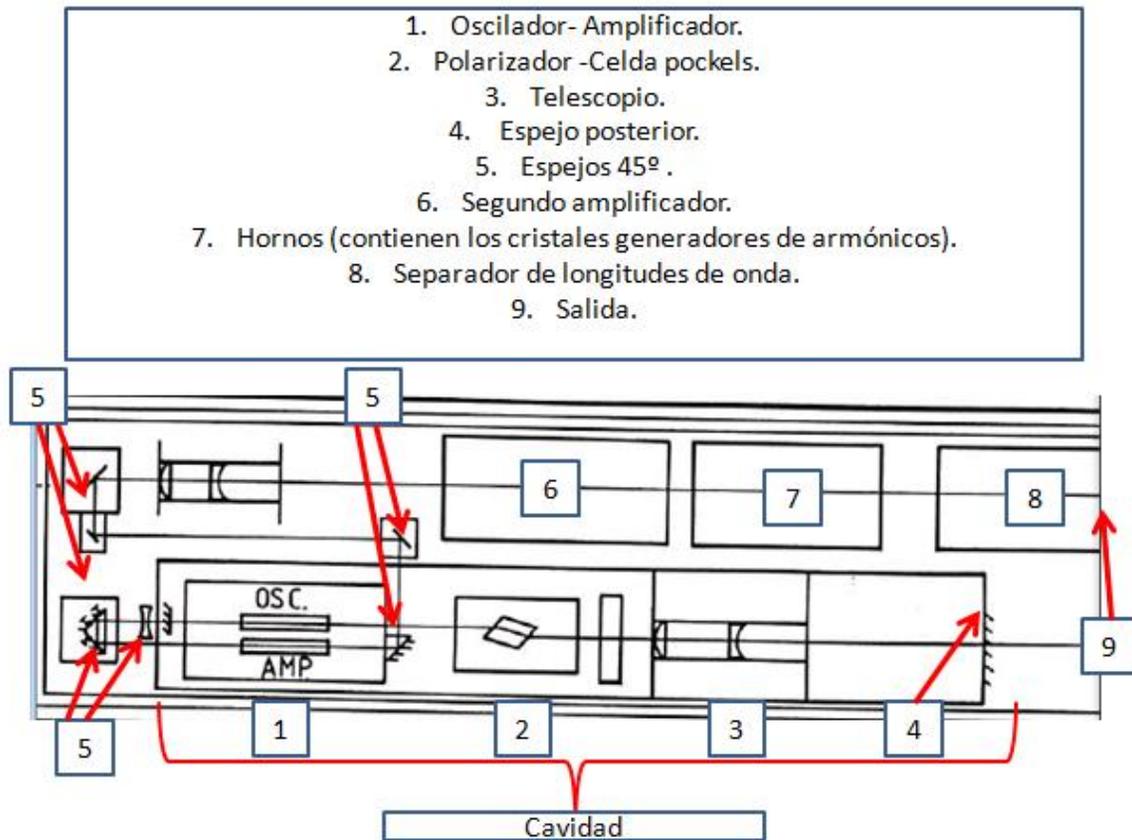


Figura 10.23. Esquema facsimilar del láser que muestra cada una de sus partes (Manual de operación y mantenimiento, HY1200, Lumonics).

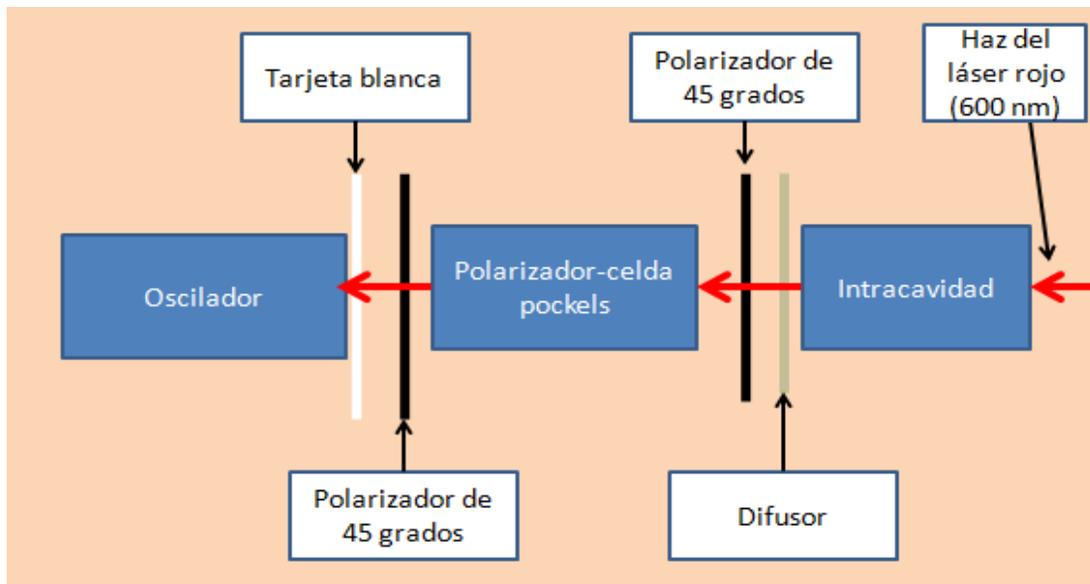


Figura 10.24. Esquema que muestra donde se colocaron los polarizadores de  $45^\circ$ , la tarjeta blanca y el difusor, para obtener la cruz de malta.



Figura 10.25. Patrón de la cruz de malta obtenida con el alineamiento de la celda pockels.

La última optimización del láser y el último arreglo experimental permitió obtener los resultados con células mononucleares de ratas desnutridas y control que se observan en el capítulo 8, también permitió obtener una mayor intensidad de fluorescencia.

## 11.0 REFERENCIAS.

**A. A. Maiz y Velasco N.** Manual de Nutrición Clínica del Adulto. Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo. Santiago: Universidad Católica de Chile; 1994.

**A. Hofmann.** Methods of Molecular Analysis in the Life Sciences. Cambridge: Cambridge University Press; 2014: Cap. 2.

**A. M. Prentice.** The thymus a barometer of malnutrition. Brit J Nutr 1999; 81:345-347.

**A. Macias, L. Dagdug.** New Trends in Statistical Physics. London: World Scientific Publishing Co; 2010:Cap. 13.

**A. Mayevsky and G. G. Rogatsky.** Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. Am J physiol cell Physiol 2007; 292:C615-C640.

**A. Ortiz-Andrellucchi.** Nutrición e inmunidad. Rev. Soc Med Quir, Hosp Emer Perez de Leon 2007; 38:12-18.

**A. Senner.** Principios de electrotecnia. Barcelona: Reverté; 1994:Cap. 5.

**A. S. Perez, J.R. G. Fernandez, M. F. Guasti, E. H. Poniatowski, C. C. Muñiz, L. Llorente.** Laser-Induced fluorescence in mononuclear cells: direct estimate of the NADH Bound/free Ratio. WSPC 2010; 13:199-214.

**B. Chance, B. Schoener, R. Oshino, F. Itshak and Y. Nakase.** Oxidation-reduction Ratio Studies of Mitochondria in freeze\_trapped Samples. J Biol Chem 1979; 254:4764-4771.

**B. Chance, G. Williams.** The respiratory chain and oxidative phosphorylation in: Advances in Enzymology. New York: Interscience; 1956:Cap 1.

**B. S. Giraldo, J. O. Arcila, B. A. Samper, A. R. Rivera.** Estudio de precánceres en biopsias de mama a través de la técnica de espectroscopía óptica de fluorescencia. Rev Col Fis; 2012;212-215.

**B. Zelent, T. Troxler, J. M. Vanderkooi.** Temperature Dependence for Fluorescence of  $\beta$ -NADH in Glycerol/Water Solution and in Trehalose/Sucrose Glass. Springer 2007;17:37-42.

**C. C. Fjeld, W. T. Birdsong, and R. H. Goodman\***, Differential binding of NAD<sup>+</sup> and NADH allows the transcriptional corepressor carboxyl-terminal binding protein to serve as a metabolic sensor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:9202-9207.

**C. Prudhon.** Evaluación y tratamiento de la desnutrición en situaciones de emergencia: manual del tratamiento terapéutico de la desnutrición y planificación de un programa nutricional: Icaria editorial; 2002: Cap.

**C. S. García, M. J. G. Bermejo.** Laboratorio de bioquímica. Madrid: MAD, S L; 2006:Cap. 1.

Catálogo de información de fotodiodos, Hamamatsu.

**D. Kulms, T. Schwarz.** Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. Photodermatol photoimmunol photomed 2000;16:195-201.

**D. P. Stites, A. I. Terr.** Inmunología básica y clínica. 7a. ed. México: Manual Moderno;1993:Cap.4,5.

**D. Voer y J. G. Voer.** Bloquímica. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006:Cap 22.

**E. Cortés, H. González, J.L. Gómez Olivares y R. Ortiz.** Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. Brit Soc Immunol 2008;152:585-592.

**E. Cortés.** Evaluación de la activación de linfocitos de ratas desnutridas durante la lactación. E. C. Barberena. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. División Ciencias Biológicas y de la Salud, 2010. Tesis doctoral.

**F. Li, A. Nathan.** CCD Image Sensors in Deep-Ultraviolet: Degradation behavior and Damage Mechanisms. Berlín: Springer; 2005:Cap. 8.

**F. Monckeberg.** Crear para compartir para compartir para seguir creando. Santiago: Andres Bello; 1980:Cap.1, 2.

**G. Prats.** Microbiología clínica. 2a. ed. Madrid: médica panamericana; 2008:Cap1.

**G. Velásquez.** Fundamentos de alimentación salubre. Antioquía: Universidad de Antioquia; 2006:Cap.1.

**Galilea Centro de formación y Empleo.** Nutrición y dietética. Madrid: INNOVA; 2010: Cap.1, 2.

**I. Georgakoudi, B. C. Jacobson, J. V. Dam, V. Backman, M. B. Wallace, M. G. Müller, Q. Zhang, K. Badizadegan, D. Sun.** Fluorescence, Reflectance, and Light-Scattering Spectroscopy for Evaluating Dysplasia in Patients With Barrett's Esophagus. Rev Gastroenterol 2001; 120: 1620-1629.

**J. D. Stinnett.** Nutrition and the Immune Response. Florida: CRC Press, Inc; 1983:Cap.11.

**J. Ferreira and L. Gil.** Nutritional effects on mitochondrial bioenergetics (alterations in oxidative phosphorylation by rat liver mitochondria. Biochem J 1984; 218: 61-67.

**J. R. Lakowicz, H. Szmazinski, K. Nowaczyk and M.L. Johson.** Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 1271-1275.

**J. Rose, C. Martin, T. Macdonald, and Chrisellis.** High-resolution In Vitro NADH Fluorescence Microscopy Allows Measurements of Tissue Bioenergetics in Rat Ileal Mucosa. Rev Microcirculation 2006; 13: 14-47.

**J.M. Artigas, P. C. Perea, P. Ramo.** Tecnología del color. Valencia: INO Reproducciones; 2002:Cap. 7.

**K. E. Barret, S. M. Barman, S. Boitano, H. L. Brooks,** Ganong. Fisiología Médica. 23a. ed. México: Mc Graw Hill; 2010: Cap. 3.

**K. Röhm,** Bloquímica, Texto y Atlas. 3a. ed. Alemania: médica panamericana; 2004: Cap. 8.

**L. A. G. Cepeda, J. Morales, L. S. Vargas, S. A. Garcia, R. F. Ríos, V. C. Ruidiaz, C. A. Figueroa.** Prevalence of oral lesions in Mexican children with perinatally acquired HIV: association with immunologic status, viral load, and gender. Rev AIDS patient care STDS 2002; 16:151-156.

**L. A. G. Cepeda, L. O. S. Vargas, N. P. Ruz, R. M. Hernández, J. V. Ham y A. C. Salobreña;** Candida Bucal en niños con VIH/sida, desnutrición o marginal social. Rev Panam Salud Pub 2012; 31: 48-53.

**L. Parra-Gómez, J. R. Téllez-Girón, C. E. Briones.** La desnutrición y sus consecuencias sobre el metabolismo interno. Rev. Facult Med UNAM 2003; 46:32-36.

**L.V. Tarasov.** Laser Physics and Applications. Unión Sovietica: Mir Publishers; 1986:Cap.1,2,3.

**M. Alonso, E. J. Finn.** Fundamental University physics, quantum and statistical physics. EUA: Addison\_wesley; 1968: Cap. 1,2 y 3.

**M. C. E. Boquera.** Comunicaciones ópticas: conceptos esenciales y resolución de ejercicios. Madrid: Díaz de Santos S.A; 2005:Cap.3.

**M. F. Guasti. y R. Rangel.** Diseño y construcción de láseres de pigmento. Rev. Mex Fis 1990; 36: 118-190.

**M. J. G. Ramos, F. M. G. Valverde.** Alta prevalencia de la desnutrición en ancianos españoles ingresados en un hospital general y factores asociados. Rev. Arch Latin Nutr 2005; 55:10.

**M. Königsberg.** Bioenergética de la cadena respiratoria mitocondrial. México: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa; 1992:Cap.1-8.

**M. Michael M. Cox, Davud L. Nelson.** Lehninger, Principios de bioquímica. 5ª. Ed. España: Ediciones Omega S.A; 2009:Cap.13,19.

**M. Muñoz y A. Chávez .** Desnutrición. Su impacto en la salud humana y en la capacidad funcional. México. 2007.

**M. Orchin y H. H. Jaffé.** Simetría, orbitales y espectros. España: Ediciones bellaterra, S.A.; 1975:Cap. 10.

**M.R. Kasimova, J. Griegiene, K. Krab, P. H., H. Flyvberg.** The free NADH concentration is kept constant in plat mitodhondria under different metabolic conditions. Plant Physiol 2006; 18: 688-698.

Manual de operación de del boxcar. SR250. Standford research system.

Manual de operación de espectrómetro Avantes. Avaspect-2048. Avantes.

Manual de operación del Monocromador. MP1018B. Pacific instruments.

Manual: Operación y mantenimiento. HY1200. Lumonics.

**M. C. García, M. G. Agustín.** Problemas y cuestiones de bioquímica. España: Universitat Jaume; 1998:Cap.1.

**N. Ramanujam, M.F. Mitchell, A. Mahadevan, S. Warren, S. Thomsen, E. Silva,** alln-vivo diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser-induced fluorescence Proc Natl Acad Sci U S A 1994, 91:10193–7.

**N. Shanker and S. L. Bane.** Biophysical tools for biologists: in vitro techniques. New York: Elsevier; 2008:Cap. 8.

Natural Resources Management and Enviroment Department, FAO, [en línea], 2015, Disponible en la red: <http://www.fao.org/docrep/x0262e/x0262e05.htm>.

**O. Svelto.** Principles of Lasers. 5a. ed. New York: Springer; 1998:Cap.1, 8.

**Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.** Vidas en peligro, las proteínas y el niño. Italia: FAO; 1970:Cap. 1,2,3,4.

**P. A. Tripler/R. A. Llewellyn.** Modern Physics W.H.6a. ed. New York: Freeman and Company; 2012:Cap. 6.

**P. Bhaskaram y B. Sivakumar.** Interleukin-1 in malnutrition. Arch Dis Child 1986; 61: 182-185.

**P. Hlawickza.** Introducción a la electrónica cuántica. España: Reverté; 1977: Cap. 8.

**P. S. Down, J. Kelleher, B.E. Walker and P.J. Guillou.** Nutrition and cellular immunity in hospital patients. Rev. Brit J Nutr 1986; 55:515-527.

**P. W. Atkins, L. Jones.** Principios de química: Los caminos del descubrimiento. 3a. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006:Cap. 3.

**R. Huber, M. Bücher, H. Li, M. Schlieter, A. Dorte and M. W. Riepe.** Protein Binding of NADH on chemical Preconditioning. J Neurochem 2000;75: 329-335.

**R. K. Chandra.** Symposium on "Nutrition and immunity in serous illness". Proc Nutr Soc 1993; 52: 77-84.

**R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell, P. A. Weil.** Harper Bioquímica Ilustrada, 29ª. ed. México:Mc Graw Hill; 2013:Cap.3 ,4.

**R. O. Cortés E. Pérez, L. González, C. Betancourt** M.Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation. Res Med Sci 1996; 24:843-6.

**S. Cunningham-Rundles, D. F. McNeeley.** Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. J Allergy Clin Immunol 2005; 115:1119-28.

**S. Ferone.** Prevalencia de desnutrición y evaluación nutricional con parámetros objetivos y subjetivos en dos centros hospitalarios de Santiago. Tesis Programa de Magister en Nutrición. Escuela de Medicina. P. Universidad Católica de Chile (1999). Pag. 20-350.

**T. M. Devlin.** Bioquímica. 4ª ed. España: Reverté; 2004:Cap. 13.

**T. Vo-Dinh and B. M. Cullum.** Biomedical Photonics. New York: CRC Press; 2003: Cap. 28.

**V. Aboites.** El láser. 3ª ed. México: Ciencia para todos; 2003:Cap. 1,2.

**V. -Espinoza, L.E.; Zafra-Tanaka, S. Saavedra, B. Flores, M. Sanchez.** Prevalencia y factores asociados a desnutrición hospitalaria en un hospital general. Rev. Nutr Hosp 2013; 28: 1236-1243.

**V. Fuchs, D. Mostkoff, G. G. Salmeán y O. Amancio.** Estado nutricional en pacientes internados en un hospital público de la ciudad de México. Rev Nutr Hosp 2008; 23: 294-303.

**V. Pattabhi N. Gautham.** Biophysics. Boston: Kluwer Academic publishers; 2002: Cap. 4.

**W. R. Biesel.** Nutrition and Immune Function: Overview. Rev J Nutr 1996; 126:2511S-2615S.

**W. Woo, Z. Feng, C Hubbard, S.A. David, X.-L. Wang, B. Clausen, T. Ungár.** In-situ Time-Resolved Neutron Diffraction Measurements of Microstructure Variations during Friction Stir Welding in 6061-T6 Aluminum Alloy. Rev. ASM International 2009; 1: 407-412.

**Y. Yeh, S. Fore, and H. Wu.** Fundamental Concepts in Biophysics. California: Human Press; 2009: Cap. 4.