

**ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA  
LASER EN LEUCOCITOS DE HUMANO**

Tesis que presenta  
**Agustín Silva Pérez**

Para la obtención del grado de  
**Maestro en Ingeniería Biomédica**

Mayo de 1999

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA  
DIVISION DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA**

---

## INDICE

### Introducción.

#### Capítulo 1. Espectroscopia de fluorescencia láser.

- 1.1 Introducción.
- 1.2 Espectroscopia.
- 1.3 Espectroscopia luminiscente molecular.
  - 1.3.1 Niveles de energía.
  - 1.3.2 Conversión interna y relajación vibracional.
  - 1.3.3 Fluorescencia.
  - 1.3.4 Cruzamiento entre sistemas.
  - 1.3.5 Principio de Frank-Condon.
  - 1.3.6 Tiempo de vida de la fluorescencia.
  - 1.3.7 Eficiencia cuántica de fluorescencia.
  - 1.3.8 Espectroscopia láser.
  - 1.3.9 El láser.
- 1.4 Fluoróforos I.
  - Referencias del capítulo 1.

#### Capítulo 2. Metabolismo celular.

- 2.1 Introducción.
- 2.2 Metabolismo.
- 2.3 Enzimas.
  - 2.3.1 Enzimas de óxido-reducción.
- 2.4 Dinucleótido de adenina y nicotinamida.
- 2.5 Dinucleótido de adenina y flavina.
  - Referencias del capítulo 2.

#### Capítulo 3. Interacción radiación electromagnética-células.

- 3.1 Introducción.
- 3.2 Absorción.
- 3.3 Fluoróforos II.
- 3.4 Leucocitos mononucleares.
- 3.5 Interacción radiación láser con tejido vivo.
  - Referencias del capítulo 3.

#### Capítulo 4. Arreglo experimental.

- 4.1 Introducción.
- 4.2 Esquema general del sistema.
  - 4.2.1 El láser de nitrógeno.
  - 4.2.2 El láser de pigmento.
  - 4.2.3 Monocromador.
  - 4.2.4 Integrador-promediador.
  - 4.2.5 Fotomultiplicador y fotodiodo.
  - 4.2.6 Adquisición de datos.
  - 4.2.7 Microceldas.
- 4.3 Funcionamiento del sistema.

4.4 Preparación de las muestras.

Referencias del capítulo 4.

Capítulo 5. Resultados experimentales.

5.1 Introducción

5.2 NADH y FAD.

5.3 Espectroscopia de fluorescencia láser en leucocitos in vivo de rata.

5.4 Espectroscopia de fluorescencia láser en leucocitos in vivo de humano.

5.5 Discusión.

Referencias del capítulo 5.

Capítulo 6. Conclusiones.

Perspectivas.

Referencias del capítulo 6.

## **Introducción.**

Por más de cincuenta años la espectroscopia de absorción y luminiscente ha servido como herramienta usual e importante para caracterizar diversos procesos físicos y químicos en materiales. Utilizando espectroscopia de absorción y luminiscente, químicos, físicos, y biólogos han adquirido muchos de los conocimientos fundamentales a cerca de la estructura molecular, así como de mecanismos de transferencia de energía en la materia.

Los químicos investigan por ejemplo propiedades de absorción y emisión de moléculas orgánicas tales como pigmentos para obtener información relativa a procesos radiativos y no radiativos. Los físicos investigan absorción y luminiscencia en semiconductores, en dieléctricos dopados con impurezas como posibles fuentes láser, sistemas optoelectrónicos etc.

Los biólogos por otro lado utilizan absorción y luminiscencia para entender la dinámica y constitución de moléculas orgánicas complejas. La mayoría de los sistemas moleculares investigados están constituidos por proteínas, nucleótidos y lípidos, con cromóforos fluorescentes o no fluorescentes. Sabemos que tales sistemas presentan luminiscencia principalmente en la región ultravioleta y visible del espectro electromagnético.

Las técnicas de espectroscopia óptica tales como absorción atómica y espectroscopia de emisión son rutinariamente usadas para el análisis de elementos presentes en los fluidos del cuerpo. Elementos de interés pueden ser iones alcalinos o metales pesados (en toxicología).

La cromatografía de líquidos y la electroforesis, en donde especies moleculares diferentes emigran a diferente velocidad en capilares, son importantes métodos para el análisis molecular. La sensibilidad de éstas técnicas ha sido recientemente aumentada empleando fluorescencia inducida por láser, para la detección de diferentes componentes moleculares que surgen de la separación en columnas a través del análisis de la distribución espectral de la luz de fluorescencia emitida.

Otras técnicas de análisis médico utilizando fluorescencia inducida por láser incluyen inmunoensayo y secuenciación de ADN utilizando marcadores fluorescentes. Estos marcadores también son utilizados en citometría y clasificación celular automática.

La espectroscopia con láseres esta encontrando muchas aplicaciones en medicina y biología. Los láseres se han estado usando para la generación de calor, cuando interactúan con el tejido. Sin embargo los aspectos espectroscópicos juegan un papel dominante en las nuevas aplicaciones. Es decir, mientras los aspectos espectroscópicos en términos de las propiedades de absorción son importantes en el tratamiento fototérmico, éstos además son muy importantes en los campos de la terapia fotoquímica y en el diagnóstico de tejido usando la técnica de fluorescencia inducida por láser.

La espectroscopia de fluorescencia es una técnica usada en medicina, ya que puede proporcionar información útil respecto a la concentración y a las propiedades físico-químicas de algún sustrato biológico, lo cual podría servir eventualmente como técnica de diagnóstico.

La emisión luminiscente producida por tejido irradiado con luz láser ultravioleta puede ser usada para localizar tumores, a través de la fluorescencia natural del tejido (autofluorescencia) o empleando marcadores tipo HpD (derivados hematoporfíricos). Ya se han reportado una gran cantidad de trabajos en animales y aplicaciones clínicas en humanos.

Un ejemplo muy ilustrativo es el uso de espectroscopia de fluorescencia para identificar plaquetas ateroscleróticas en arterias de humano. El análisis espectroscópico del plasma inducido por láser, obtenido cuando un haz láser normalmente pulsado interactúa con tejido, es muy útil cuando se remueven plaquetas (ateromas), así como para fragmentar cálculos en riñón y vesícula.

La motivación para realizar éste trabajo surgió de la posibilidad de usar el sistema de espectroscopia de fluorescencia láser como herramienta en el diagnóstico de algunos padecimientos. Sin embargo en el área de ingeniería biomédica no teníamos experiencia en espectroscopia óptica, además de no tener el sistema de espectroscopia de fluorescencia láser.

Por lo que el objetivo de éste trabajo consistió en armar un sistema de espectroscopia láser confiable, su caracterización y su empleo para obtener el espectro de autofluorescencia (espectroscopia de autofluorescencia inducida por luz láser, en inglés LIAFS) de leucocitos mononucleares de humano. Para eventualmente abordar el problema de emplear éste sistema como otra herramienta alterna de diagnóstico en algunos padecimientos (en un proyecto que involucre la captación de pacientes en algún hospital).

El primer capítulo de éste trabajo intenta describir las propiedades espectroscópicas fluorescentes de moléculas orgánicas, así como los procesos que ocurren cuando interactúa la radiación electromagnética con la materia y el concepto de radiación láser.

En el segundo capítulo tratamos de explicar brevemente el concepto de vida a nivel celular, para llegar a los procesos metabólicos intracelulares en donde intervienen los dinucleótidos (fluoróforos) tratados en éste trabajo. Además mencionamos las características espectroscópicas principales de éstos dinucleótidos.

En el siguiente capítulo mencionamos la interacción radiación-materia viva, en especial tejido vivo, así como las principales moléculas fluorescentes que existen en tejido vivo y las células con las que nosotros trabajamos.

El capítulo cuatro describe el arreglo experimental armado para la obtención de espectros de fluorescencia. También el método para la obtención de las muestras (leucocitos), conteo y viabilidad celular.

En el capítulo cinco se presentan todos los resultados experimentales obtenidos, en moléculas en solución acuosa, en células de rata y en células de humano. Así como la discusión de los resultados.

Finalmente en el último capítulo presentamos las conclusiones de manera global, y las perspectivas directas para el empleo de éste sistema como herramienta alterna de diagnóstico.

## Capítulo 1 Espectroscopia de fluorescencia láser.

### 1.1 Introducción.

La espectroscopia óptica es una extensa rama de las ciencias físicas, que se ocupa del estudio de los espectros. Este estudio es muy amplio y comprende desde los diversos métodos para la obtención de espectros, su medida y aplicaciones, hasta su interpretación teórica más profunda en relación con la estructura atómica-molecular de la materia.

Desde el punto de vista de la interacción de la radiación electromagnética con la materia, un espectro puede definirse [1] como una representación gráfica de la distribución de intensidad de la radiación electromagnética, emitida o absorbida por una muestra de sustancia, en función de la longitud de onda (o frecuencia) de dicha radiación.

Los primeros intentos para la interpretación teórica de los espectros de absorción y de emisión, en relación con la estructura atómica y molecular, se hicieron utilizando las leyes de Newton de la mecánica clásica. Sin embargo pronto se vio que estas leyes eran inadecuadas para estudiar el comportamiento de sistemas microscópicos como son los átomos o moléculas.

Hacia el final del siglo XIX se habían acumulado bastantes datos experimentales, que eran incompatibles con la idea, generalmente aceptada hasta entonces, de la continuidad de la energía. La espectroscopia de gases había sido estudiada, primero con espectroscopios de prismas y después con espectrógrafos con rejilla de difracción. Átomos en estado gaseoso excitados con descargas eléctricas emitían espectros consistentes en muchas líneas a frecuencias definidas, en contraste con el espectro continuo emitido por fuentes tipo “cuerpo negro” o por sólidos a alta temperatura. Los trabajos de Balmer (1885) y Rydberg (1890) a cerca del hidrógeno y metales alcalinos mostraban espectros de líneas que no concordaban con la continuidad de la energía. En 1900, Max Planck, para explicar la distribución espectral de la radiación emitida por el llamado cuerpo negro, tuvo que lanzar la idea revolucionaria de que la emisión de energía radiante sólo podía hacerse de manera discontinua, en forma de una especie de granos de energía, que llamo cuantos de energía. La energía  $E$ , de estos cuantos solo dependía de la frecuencia de la radiación  $\nu$ , en la forma:

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

siendo  $h$  una constante universal, conocida desde entonces con el nombre de constante de Planck,  $\lambda$  la longitud de onda y  $c$  la velocidad de la luz. La hipótesis de Planck fue utilizada y ampliada por Einstein en 1905 para explicar el efecto fotoeléctrico, y más tarde (1913) por Bohr, a través de sus postulados, para interpretar el espectro atómico del hidrógeno, habiendo sido después ampliamente confirmada por la experiencia, principalmente de tipo espectroscópico.

Experimentos importantes fueron realizados por Frank y Hertz (1914) sobre el potencial crítico de los átomos. Estos experimentos proporcionaron una medida, aunque sin embargo imprecisa, directa de los niveles de energía y potenciales de ionización de los átomos.

Einstein deriva las probabilidades de transición (1917) y muchos de los resultados de la teoría moderna de la radiación fueron obtenidos.

En el periodo entre 1926 y 1939 el desarrollo en el entendimiento de los procesos radiativos fue paralelo al desarrollo de la teoría de la estructura de átomos y moléculas.

Más recientemente la invención del máser (1959) y del láser (1960) a frecuencias ópticas a transformado el campo de la óptica y el de la espectroscopia en forma importante. En física atómica y molecular las aplicaciones de la radiación láser fueron inicialmente menos rápidas, sin embargo, siguiendo con el desarrollo de láseres de pigmento sintonizable en 1970, el interés en éste campo de investigación ha experimentado un crecimiento explosivo.

## 1.2 Espectroscopia.

Un espectro depende en principio de la separación entre los niveles de energía. Ahora bien, un sistema molecular puede tener diferentes tipos de energía, por ejemplo, energía de rotación, asociada al movimiento de giro o rotación de las moléculas; energía de vibración, debida a las oscilaciones periódicas o vibraciones de los átomos alrededor de sus posiciones de equilibrio; energía electrónica, que depende de las posiciones medias de los electrones respecto de los núcleos; energía nuclear, asociada con la disposición de las partículas componentes de los núcleos atómicos; energía de orientación de los spines electrónicos y nucleares respecto a un campo magnético etc.

Afortunadamente, los distintos tipos de energía de los sistemas atómicos o moleculares son de orden de magnitud bastante diferente, por lo que las transiciones entre los correspondientes niveles de energía dan lugar a emisión o absorción de radiación en zonas distintas de frecuencia. Por esto, se puede distinguir distintos tipos de espectros, según los niveles de energía que intervienen y las técnicas experimentales utilizadas para su observación.

Los niveles de energía de los núcleos atómicos son los de mayor energía, por lo que las transiciones entre ellos dan lugar a espectros en la región de mayor frecuencia o de menor longitud de onda. Son los espectros de rayos  $\gamma$ , que proporcionan información sobre la estructura nuclear, y son prácticamente independientes del entorno de los núcleos atómicos.

Los niveles energéticos asociados con los electrones internos de los átomos dan lugar a los espectros de rayos x, en la región de longitudes de onda de 0.05 a unos 10 nm. Estos espectros son característicos de cada átomo y prácticamente no dependen de los enlaces químicos, esto es, de la molécula en que se encuentran los átomos.

Los niveles energéticos de los electrones externos o electrones de valencia de los átomos, iones atómicos, moléculas o iones moleculares dan lugar a espectros en la región visible y ultravioleta (de 10 a unos 800 nm) llamados también espectros electrónicos. Los espectros de átomos aislados o iones atómicos son de aspecto muy distinto a los espectros moleculares. Los espectros atómicos consisten en líneas de emisión o absorción, muy estrechas, a determinadas frecuencias, por lo que se llaman espectros de líneas, mientras que los espectros electrónicos moleculares, debido a la influencia de los niveles de vibración y de rotación, presentan zonas de emisión o absorción a ciertos intervalos de frecuencia, más o menos anchos, por lo que reciben el nombre de espectros de bandas.

La energía de vibración de los átomos de una molécula es bastante menor que la energía electrónica, por lo que las transiciones entre los niveles moleculares de vibración dan lugar a los llamados espectros infrarrojos, por aparecer en la región infrarroja (de 1  $\mu$  m a

unas  $100 \mu\text{m}$ ). Debido a la influencia de los niveles de rotación, los espectros infrarrojos son también espectros de banda.

Las transiciones entre los niveles de rotación de las moléculas, de energía menor que los de vibración, originan espectros de líneas más o menos anchas en la región de microondas (de  $1000 \mu\text{m}$  a unos  $10 \text{cm}$ ) o en el infrarrojo lejano, en el caso de moléculas muy ligeras.

Por último, en la región de ondas de radio y de microondas, pueden aparecer espectros, originados por transiciones entre los niveles de muy baja energía debidos a las orientaciones de los momentos magnéticos de spin nuclear y electrónico, respectivamente en presencia de un intenso campo magnético exterior. Estos espectros reciben el nombre de espectros de resonancia magnética nuclear (RMN), y de resonancia magnética electrónica, llamados también de “spin” electrónico (RSE).

### 1.3 Espectroscopia luminiscente molecular.

La luminiscencia se define [2] como la emisión de fotones a partir de estados excitados de moléculas. Hay dos tipos de luminiscencia; fluorescencia y fosforescencia.

La fluorescencia surge debido a transiciones radiativas entre estados singuletes de una molécula, mientras la fosforescencia es causada por transiciones radiativas entre estados triplete y singulete.

Las moléculas son considerablemente más complejas en estructura que los átomos, y por lo tanto las aplicaciones cuantitativas de la mecánica cuántica a problemas moleculares han sido menos perfeccionadas.

Sabemos de la mecánica cuántica que para describir una molécula [3], debemos resolver la ecuación de Schrödinger correspondiente, es decir, encontrar los valores propios  $E_i$  y funciones propias  $\Psi_i$  del operador Hamiltoniano:

$$H \Psi = E \Psi$$

donde  $H$  es la suma de los operadores de energía cinética debidos al movimiento de los electrones  $T_e$ , al movimiento de los núcleos  $T_n$ , y de energía potencial  $V$  debida a las interacciones entre electrones, entre núcleos, y entre electrones y núcleos:

$$H = T_e + T_n + V$$

El Hamiltoniano depende de las coordenadas del núcleo  $X$  y las coordenadas de un electrón  $x$ :

$$H(x,X) \Psi(x,X) = E \Psi(x,X)$$

Esta ecuación no toma en cuenta los spines de los electrones y es válida para partículas con velocidades bajas comparadas con la velocidad de la luz.

Podemos emplear una simplificación, que es la base de todas las aproximaciones moleculares, debida al gran valor de la razón de la masa del núcleo entre la masa del electrón. Esto implica que la energía asociada con el movimiento del núcleo es mucho más pequeña que la asociada con el movimiento de los electrones alrededor del núcleo. Entonces



podemos considerar como una buena aproximación al núcleo fijo durante el cálculo del movimiento del electrón. Esta aproximación es llamada aproximación adiabática o de Born-Oppenheimer. En esta aproximación las funciones propias  $\Psi(x, X)$  de una molécula pueden ser representadas como un producto de las funciones propias electrónica  $\Psi_e(x, X)$  y nuclear  $\Psi_{nc}(X)$ :

$$\Psi(x, X) = \Psi_e(x, X) \Psi_{nc}(X)$$

La función propia electrónica  $\Psi_e(x, X)$  es determinada a partir de la ecuación de Schrödinger del electrón, que describe el movimiento de electrones para una configuración fija de los núcleos:

$$H_e(x, X) \Psi_e(x, X) = E_e(X) \Psi_e(x, X)$$

El Hamiltoniano está dado por

$$H_e = T_e + V_i = \left[ \left( \frac{-\hbar^2}{8\pi^2 m} \right) \sum_i \frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + V_i(x, X) \right]$$

donde  $V_i$  es el operador de energía potencial para interacciones entre electrones, entre electrones y núcleos, y entre núcleos [4],  $m$  es la masa del electrón, y  $\hbar$  es la constante de Planck.

La función propia del núcleo  $\Psi_{nc}$ , que describe el movimiento nuclear, es una solución de la ecuación de Schrödinger:

$$H_n(X) \Psi_{nc}(X) = (E_{nc} - E_e(X)) \Psi_{nc}(X)$$

donde  $H_n$  está dado por

$$H_n = T_n = \left( \frac{-\hbar^2}{8\pi^2} \right) \sum_k \left( \frac{1}{M_k} \right) \frac{\partial^2}{\partial X_k^2}$$

$M_k$  y  $X_k$  son la masa y las coordenadas del  $k$ -ésimo núcleo.

Entonces, como ya dijimos, las funciones propias electrónicas se obtienen resolviendo la ecuación de Schrödinger para posiciones fijas de los núcleos. Por ejemplo, si se resuelve esta ecuación para separación grande de los núcleos, de una molécula diatómica, obtenemos la curva típica de energía (mostrada en la figura 2).

La energía electrónica está en función de la configuración nuclear, esta energía es empleada por la energía potencial que actúa sobre el núcleo. Hay que notar que las funciones propias nucleares no dependen de coordenadas electrónicas, pero dependen de los estados electrónicos de la molécula, en la ecuación de onda nuclear los valores propios están dados como  $E_{nc} - E_e$  según la aproximación considerada [4]. Cada estado electrónico tiene su propio conjunto de funciones propias nucleares. La función de onda nuclear puede ella misma expresarse como el producto de funciones propias vibracionales y rotacionales.

La espectroscopia confirma la validez de la aproximación adiabática. En el espectro infrarrojo (IR), medimos transiciones entre diferentes niveles vibracionales del mismo estado electrónico. Este patrón del espectro vibracional puede ser descrito por las funciones propias  $\Psi_{ne}(X)$  y valores propios  $E_{ne}$ . En las regiones visible y ultravioleta del espectro, medimos transiciones entre diferentes niveles electrónicos, y el espectro resultante contiene estructuras de diferentes componentes vibracionales de estados electrónicos.

La función propia de un estado de partículas con spines depende de coordenadas espaciales y de variables de spin. Bajo acoplamiento débil spin-orbital, la función de onda electrónica total puede ser representada como un producto:

$$\Psi_e = \Psi_c \Psi_s$$

donde  $\Psi_c$  es la función de onda de coordenada y  $\Psi_s$  es la función de onda de spin.

Sabemos que el spin del electrón es  $s = \frac{1}{2}$ . Partículas con éstos valores de spin obedecen el llamado principio de exclusión de Pauli, es decir, la función de onda total del electrón deberá ser antisimétrica con respecto a la recolocación de cualquier electrón apareado. La función de onda del electrón  $\Psi_e$  describe la nube de electrones en una molécula; la densidad electrónica en cualquier punto en el espacio es proporcional a  $|\Psi_e|^2$ . Para cada molécula se puede mostrar una superficie que contiene la mayor parte de la nube de electrones. Esta superficie es una imagen adecuada del orbital electrónico. Moléculas complejas poseen gran número de estos orbitales que son descritos por funciones de onda  $\Psi_e$ .

Entonces para calcular el espectro electrónico, es decir, el diagrama de niveles de energía de una molécula deberíamos resolver la ecuación de Shrödinger, encontrar las funciones propias electrónicas  $\Psi_e(x,X)$  y valores propios  $E_e(X)$  del operador energía. El conjunto de valores propios del operador energía corresponde a una sucesión de posibles niveles de energía en la molécula. A partir de esto, se pueden conocer las reglas de selección e intensidades de transición. El conocimiento de la función de onda  $\Psi$  permite obtener el valor propio  $E$ :

$$E = \frac{\int \Psi^* H \Psi d\tau}{\int \Psi^* \Psi d\tau}$$

El calculo de la función de onda y los valores propios, de energía electrónica, para moléculas multiatómicas es muy complicado. Los cálculos son obtenidos para moléculas diatómicas simples.

### 1.3.1 Niveles de energía.

Una transición electrónica en una molécula inducida por la absorción de un fotón, puede ser representada por un esquema de niveles de energía. Estos esquemas usualmente muestran energías de los niveles vibracionales más bajos del estado base.

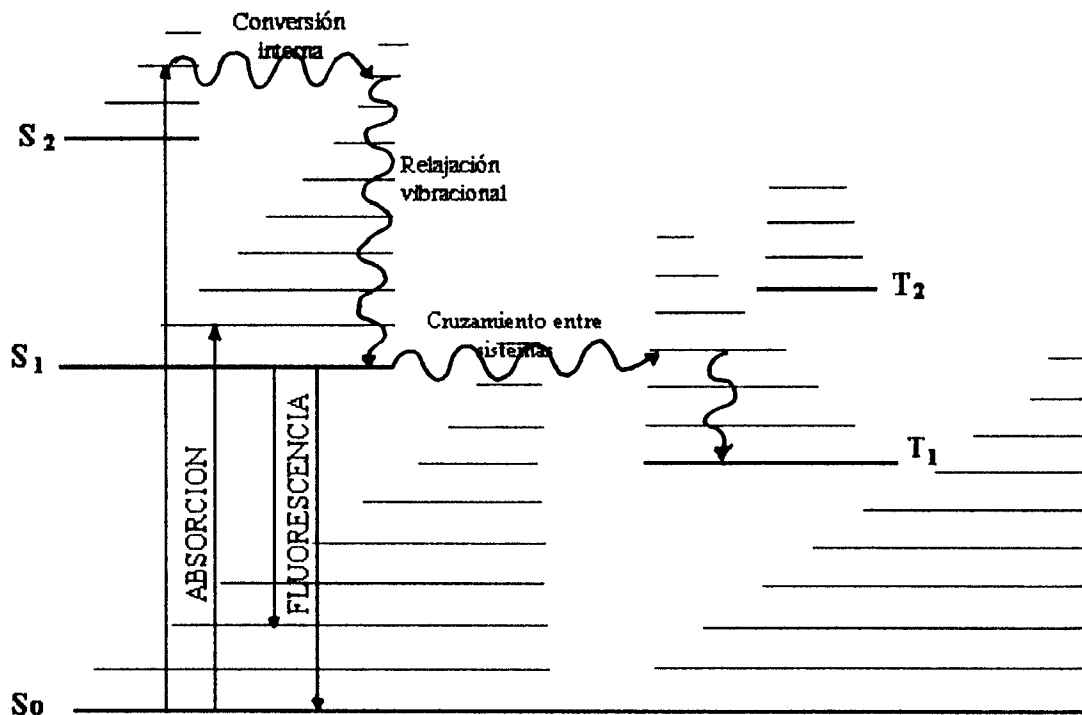


Figura 1. Esquema general de niveles de energía de una molécula orgánica.

La figura 1 muestra un esquema general de los niveles de energía más bajos de una molécula orgánica. En la parte izquierda de la figura se muestra un conjunto de estados singletes,  $S_k$ , es decir, los estados con spin total cero. En la parte derecha de la figura se muestra el esquema de estados tripletes  $T_k$ , es decir estados para los cuales el spin total de la molécula es igual a uno.

Los estados tripletes  $T_k$  poseen la misma configuración que los correspondientes estados singletes  $S_k$ . Estos estados difieren por la orientación relativa de los spines de dos electrones en el orbital externo. De acuerdo con la regla de Hund, la energía del nivel triplete es siempre inferior a la correspondiente del singlete. Las líneas más bajas (negras) de cada estado  $S_k$  o  $T_k$  en la figura denotan niveles electrónicos.

Realmente éstas líneas corresponden a hipersuperficies de energía potencial en un espacio multidimensional. Cada hipersuperficie puede intersectarse con cualquier otra hipersuperficie. La energía en un conjunto de estados se incrementa con el número de estados,  $S_0, S_1, S_2, \dots, S_i, \dots$

### 1.3.2 Conversión interna y relajación vibracional.

La absorción de un cuanto de luz, dependiendo de la energía, transforma una molécula de su estado base  $S_0$  a alguno de los niveles vibracionales de estados excitados  $S_1, S_2, S_3$ , etc.

Sabemos empíricamente (regla de Kasha) que en un medio condensado la energía de excitación del estado  $S_2$  o cualquier otro estado de mayor energía, se disipa rápidamente debido a colisiones inelásticas alcanzando la molécula, no radiativamente, el nivel cero vibracional del estado  $S_1$ . Transiciones no radiativas entre estados electrónicos de igual multiplicidad de spin son llamadas conversión interna. En el proceso de conversión interna la

energía es transferida desde un punto en la hipersuperficie de energía potencial de un estado (por ejemplo  $S_2$ ) a la hipersuperficie de energía potencial  $S_1$ . Después de esto, el exceso de energía vibracional que posee el estado quasidegenerado  $S_1$ , se disipa a través de una relajación vibracional y el sistema alcanza un estado en equilibrio  $S_1$ , de la molécula (ver fig. 1). En éste proceso la energía de excitación es transferida al medio externo. Puede también ocurrir una transición no radiativa  $S_1 \rightarrow S_0$ . Las constantes de razón de los procesos de conversión interna y relajación vibracional exceden  $10^{12} \text{ s}^{-1}$ .

### 1.3.3 Fluorescencia.

La fluorescencia se genera a partir de transiciones radiativas en una molécula entre niveles de la misma multiplicidad. La emisión ocurre como resultado de la transición de la molécula desde  $S_1$  al estado  $S_0$  (ver fig. 1).

A continuación se describen las principales propiedades de la fluorescencia molecular:

1. Debido al proceso de conversión interna y de acuerdo con la regla de Kasha la posición del espectro de fluorescencia no depende de la longitud de onda de excitación.
2. El espectro de fluorescencia se desplaza en dirección de longitud de onda mayor con respecto a la banda de absorción  $S_0 \rightarrow S_1$  (regla de Stokes) y es aproximadamente la imagen especular de ésta banda.
3. 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  $q$ :

$$I_f = I_0(1 - 10^{-D})q$$

donde  $I_0$  es la intensidad de la luz incidente,  $D$  es la absorbancia de la solución, es decir, el producto del coeficiente de extinción de la molécula  $\epsilon$ , la concentración de la molécula  $c$ , y la longitud de la trayectoria óptica  $l$  ( $D = \epsilon c l$ );  $q$  es la eficiencia cuántica de fluorescencia, definida como la razón del número de cuantos emitidos desde un estado excitado entre el número de cuantos absorbidos durante la transición al estado excitado por unidad de tiempo. Si la concentración  $c$  es baja, entonces:

$$I_f = 2.303 \epsilon c l I_0 q$$

### 1.3.4 Cruzamiento entre sistemas.

Transiciones no radiativas entre estados electrónicos de diferente multiplicidad son llamadas cruzamiento entre sistemas. Por ejemplo es posible tener  $S_1 \rightarrow T_1$  y  $T_1 \rightarrow S_0$ . El proceso de cruzamiento entre sistemas requiere cambios de spin, ya que éste proceso conecta estados de diferente multiplicidad. Cualquier transición radiativa o no radiativa entre estados de diferente multiplicidad es prohibida. Esta prohibición es parcialmente eliminada por una interacción entre dipolos magnéticos, como resultado de movimientos de spin y de orbital del electrón. Tal interacción es llamada interacción spin-orbital.

### 1.3.5 Principio de Frank- Condon.

El principio de Frank-Condon se formula como sigue; Las transiciones electrónicas son rápidas ( $10^{-15} \text{ s}$ ) en comparación con los movimientos vibracionales del núcleo ( $10^{-12} \text{ s}$ ), durante las transiciones electrónicas el núcleo no puede cambiar su velocidad ni su posición.

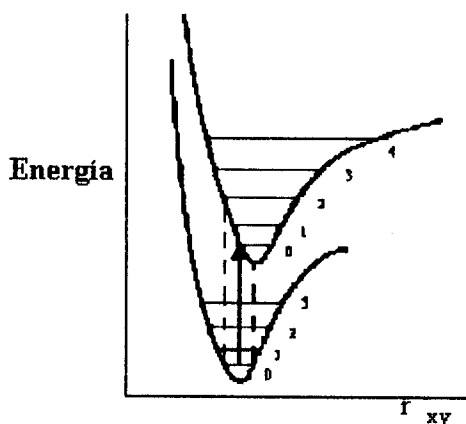
El principio refleja el hecho de la imposibilidad de una conversión rápida de energía electrónica en energía vibracional nuclear. Las consecuencias de éste principio son mostradas considerando las curvas de energía potencial. Para una descripción de una molécula multiatómica, se debe conocer un conjunto de superficies multidimensionales de energía. Es más simple considerar la curva de energía potencial para una molécula diatómica, se pueden extraer conclusiones a partir de esta consideración, que se usan para generalizarlas a moléculas multiatómicas.

La figura 2 muestra las curvas de potencial para los estados base y excitado de una molécula diatómica. La solución de la mecánica cuántica del problema de osciladores armónicos y no armónicos proporciona un resultado importante, no todas las energías son permitidas para la vibración de la molécula. Por ejemplo, para las vibraciones armónicas, solo las energías descritas por la ecuación

$$E = h\nu \left( v + \frac{1}{2} \right)$$

( $v$  es el número cuántico vibracional, que puede ser 0,1,2,... ;  $\nu$  es la frecuencia de las vibraciones del oscilador armónico; y  $h$  es la constante de Planck) son permitidas. Claramente vemos a partir de esta ecuación que la energía del estado vibracional más bajo

( $v=0$ ) no es igual a cero, es  $\frac{h\nu}{2}$ . En moléculas reales las vibraciones no son armónicas y sus curvas de energía potencial tienen la apariencia de la fig. 2. Las líneas horizontales sobre estas curvas muestran los niveles vibracionales permitidos de la molécula



**Figura 2** Curvas de energía para una molécula diatómica, XY

Si una molécula absorbe luz estando en el nivel vibracional más bajo de su estado electrónico base, de acuerdo con el principio de Frank-Condon, las distancias y velocidades

entre núcleos no cambian durante la transición electrónica, es decir, la absorción es permitida solo a niveles vibracionales en la región limitada por las líneas a trazos en la fig. 2. Transiciones verticales intersectan la curva potencial superior en un punto de ésta región, donde el núcleo esta “quieto” (para periodos cortos de tiempo). Transiciones a otros niveles vibracionales también son posibles si durante la absorción, las posiciones de los núcleos o sus velocidades no cambian. Entonces por medio del principio de Frank-Condon se puede predecir probabilidades de transición entre diferentes niveles. Las transiciones más probables son aquellas que no requieren cambios de las distancias internucleares ni de las velocidades del núcleo.

Las transiciones radiativas ocurren, en forma vertical (desplazamiento hacia mayores longitudes de onda) desde el nivel cero vibracional del estado excitado más bajo.

### 1.3.6 Tiempo de vida de la fluorescencia.

El tiempo de vida de la fluorescencia de una sustancia, usualmente representa la cantidad promedio de tiempo en que la molécula permanece en el estado excitado, antes de que retorne al estado base.

Consideremos la excitación de una molécula fluorescente con un pulso de luz (infinitamente corto), resultando en una población inicial ( $S_{10}$ ) de la molécula en el estado excitado. La razón de decaimiento de la población inicialmente en el estado excitado es

$$-\frac{d[S_1(t)]}{dt} = (\gamma + k)[S_1(t)]$$

donde  $S_1(t)$  es el número de moléculas en el estado excitado al tiempo  $t$  después de la excitación,  $\gamma$  es la constante de razón de decaimiento radiativo, y  $k$  es la constante de razón de decaimiento no radiativo (incluye conversión interna, cruzamiento entre sistemas, reacciones químicas, y otros). Si tenemos que  $S_1(t)=S_{10}$  a  $t=0$ , integrando la ecuación anterior

$$S_1(t) = S_{10} \exp[-t/\tau]$$

donde  $\tau=(\gamma+k)^{-1}$  es el tiempo de vida del estado excitado. Entonces, se considera que la intensidad de fluorescencia  $F(t)$ , la cual es proporcional a la población del estado excitado ( $F(t)=\gamma S_1(t)$ ), decae exponencialmente. El tiempo de vida de la fluorescencia es generalmente igualado con el tiempo requerido para que la intensidad de decaimiento sea  $1/e$  del valor inicial, para lo cual  $t=(\gamma+k)^{-1}$ .

### 1.3.7 Eficiencia cuántica de la fluorescencia.

La figura 3 muestra un esquema simplificado de niveles electrónicos en una molécula. Sin embargo se ilustran los procesos responsables del retorno al estado base. Una vez más  $\gamma$  es la constante de razón de decaimiento radiativo, y  $k$  es la de decaimiento no radiativo,  $h\nu_A$  es la energía de absorción y  $h\nu_F$  es la energía de fluorescencia.

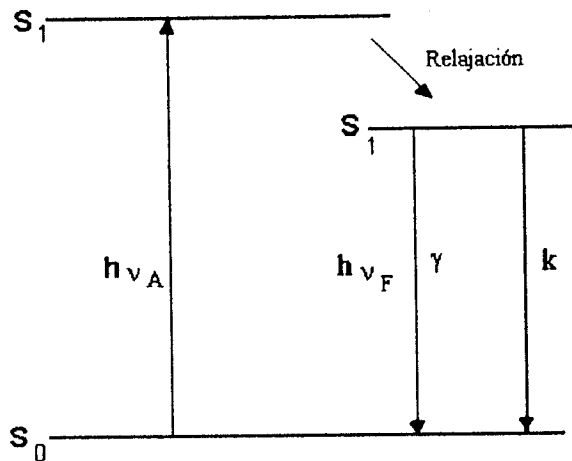


Figura 3. Esquema simplificado de niveles de energía de una molécula.

La eficiencia cuántica es la razón del número de fotones emitidos entre el número de fotones absorbidos. La fracción de moléculas fluorescentes que decaen a través de procesos radiativos (y entonces la eficiencia cuántica), esta dada por:

$$q = \gamma / \gamma + k$$

El tiempo de vida de la molécula fluorescente en ausencia de procesos no radiativos es llamado el tiempo de vida intrínseco, y esta dado por

$$\tau_0 = 1/\gamma$$

Esto permite obtener una relación entre la eficiencia cuántica y el tiempo de vida

$$q = \tau / \tau_0$$

### 1.3.8 Espectroscopia láser.

Los láseres han recibido gran reconocimiento hoy en día en varios campos de la ciencia y la tecnología. En algunos campos (medicina, procesamiento de materiales, separación de isótopos, etc.) la aplicación de luz láser a proporcionado sucesos inesperados. En otros campos relacionados por mucho tiempo con luz (espectroscopia, fotoquímica, metrología, etc.) el uso de láseres fue muy promisorio desde sus inicios. Pero tardo una década realizar experimentos exitosos aún en las más obvias aplicaciones de láseres, en espectroscopia, debido a que los primeros láseres pulsados y de emisión continua operaban a un número limitado de frecuencias discretas en el rango visible y cercano infrarrojo. Al mismo tiempo, muchos de los métodos de espectroscopia atómica y molecular requerían que la frecuencia de la radiación láser coincidiera con la frecuencia de una transición cuántica definida entre dos niveles de energía de un átomo o molécula a estudiar. Hacia finales de la década de los años sesenta varios métodos de generación de luz coherente con frecuencia sintonizable comenzaron a desarrollarse rápidamente. Entonces éste fue el periodo en que los métodos de espectroscopia láser comenzaron a progresar.

La influencia revolucionaria de los láseres sobre la espectroscopia óptica esta basada en una combinación de características únicas de la fuente de radiación láser.

### 1.3.9 El láser.

Cuando una onda electromagnética interactúa con la materia pueden ocurrir tres procesos fundamentales [5] llamados emisión espontánea, emisión estimulada y absorción.

Consideremos dos niveles 1 y 2, de cierto material dado, con energías  $E_1$  y  $E_2$  ( $E_1 < E_2$ ). Podríamos considerar mas de dos niveles, inclusive un conjunto infinito de niveles, pero por simplicidad consideramos solo dos, asociados al material. Consideremos al nivel 1 como el nivel base, asumamos que el átomo o molécula del material esta inicialmente en el nivel 2. Ya que  $E_2 > E_1$ , el átomo tiende a decaer al nivel 1. La diferencia de energía correspondiente ( $E_2 - E_1$ ) será liberada por el átomo. Cuando esta energía es liberada en forma de una onda electromagnética, el proceso se llama emisión espontánea. La frecuencia  $\nu$  de la onda radiada esta dada por la expresión

$$\nu = \frac{(E_2 - E_1)}{h} \quad (1)$$

Hay que notar que la emisión radiativa es solo una forma posible de que el átomo (o molécula) decaiga. El decaimiento también puede ocurrir en una forma no radiativa (por ejemplo en energía cinética cedida a las moléculas vecinas).

La probabilidad de emisión espontánea puede caracterizarse en la siguiente forma: suponga que al tiempo  $t$ , hay  $N_2$  átomos (por unidad de volumen) en el nivel 2. La razón de decaimiento de éstos átomos debido a emisión espontánea, es decir,  $\left(\frac{dN_2}{dt}\right)_{esp}$  es obviamente proporcional a  $N_2$ . Se puede escribir

$$\left(\frac{dN_2}{dt}\right)_{esp} = -AN_2 \quad (2)$$

El coeficiente  $A$  es llamado el coeficiente  $A$  de Einstein o probabilidad de emisión espontánea (la expresión para  $A$  fue obtenida por Einstein a partir de consideraciones termodinámicas). La cantidad  $\tau_{esp} = 1/A$  es llamada tiempo de vida de la emisión espontánea. El valor numérico de  $A$  depende de la transición particular involucrada.

Supongamos una vez mas que el átomo (o molécula) se encuentra inicialmente en el nivel 2 y que una onda electromagnética de frecuencia  $\nu$  dada por la ecuación (1) incide sobre el átomo. Ya que esta onda tiene la misma frecuencia que la frecuencia atómica ( $\nu$  dada por la diferencia de los niveles 2 y 1), hay una probabilidad finita de que esta onda fuerce al átomo a decaer en la transición  $2 \rightarrow 1$ . En este caso la diferencia de energía  $E_2 - E_1$  es liberada en forma de una onda electromagnética la cual se suma a la onda incidente. Este es el fenómeno de emisión estimulada. En el caso de emisión espontánea, un átomo emite una onda electromagnética que no esta en fase definida en relación con la onda electromagnética emitida por otro átomo. Más aún, la onda electromagnética puede ser emitida en cualquier dirección. En el caso de emisión estimulada, ya que el proceso es



forzado por la onda electromagnética incidente, la emisión de cualquier átomo esta en fase a la onda incidente. Esta onda también determina la dirección de la onda emitida.

En este caso el proceso se caracteriza por medio de la ecuación

$$\left(\frac{dN_2}{dt}\right)_{est} = -W_{21}N_2 \quad (3)$$

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 transición estimulada. También como en el caso del coeficiente  $A$ , el coeficiente  $W_{21}$  tiene dimensiones de inverso de tiempo. Sin embargo, a diferencia de  $A$ , el coeficiente  $W_{21}$  no solo depende de la transición particular sino también de la intensidad de la onda incidente. Para una onda electromagnética plana, podemos escribir

$$W_{21} = \sigma_{21}F \quad (4)$$

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) y depende solo de las características de la transición dada.

Asumamos ahora que el átomo esta inicialmente en el nivel 1. Si este es el nivel base, el átomo deberá permanecer en este nivel a menos que algún estímulo externo sea aplicado. Supongamos que una onda electromagnética de frecuencia  $\nu$  dada, otra vez, por la ecuación (1) incide sobre el material. En este caso hay una probabilidad finita de que el átomo se excite al nivel 2. La diferencia de energía  $E_2-E_1$  requerida para que el átomo sufra la transición se obtiene de la onda electromagnética incidente. Este es el proceso de absorción.

En forma similar a la ecuación (3), se define la razón de absorción con  $W_{12}$  por medio de la ecuación

$$\left(\frac{dN_1}{dt}\right) = -W_{12}N_1 \quad (5)$$

donde  $N_1$  es el número de átomos en el nivel 1 (por unidad de volumen), a un tiempo dado. También como en la ecuación (4), se puede escribir

$$W_{12} = \sigma_{12}F \quad (6)$$

donde  $\sigma_{12}$  es la sección transversal de absorción, que depende solo de la transición.

Hay que notar que, como demostró Einstein al comienzo del siglo [6] que las probabilidades de emisión estimulada y absorción son iguales. Entonces se puede escribir  $\sigma_{12} = \sigma_{21} = \sigma$  y  $\sigma$  es conocida como la sección transversal de la transición.

El número de átomos por unidad de volumen en algún nivel dado es llamado la población del nivel.

Considere dos niveles de energía arbitrarios 1 y 2 de un material dado y 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 la dirección  $z$  en éste material, el cambio elemental de éste flujo debido a los procesos de absorción y emisión estimulada, de acuerdo con las ecuaciones (3)-(6) esta dado por

$$\frac{dF}{dz} = \sigma F(N_2 - N_1) \quad (7)$$

esta ecuación muestra que el medio se comporta como un amplificador (es decir  $dF/dz > 0$ ) si  $N_2 > N_1$ , mientras que se comporta como un absorbedor si  $N_2 < N_1$ .

Por otro lado sabemos que en el caso de equilibrio térmico, la energía de los niveles poblados se describe por la estadística de Boltzmann. Entonces, si  $N_1^e$  y  $N_2^e$  son las poblaciones en equilibrio térmico de los niveles, tenemos que

$$\frac{N_2^e}{N_1^e} = \exp\left[\frac{-(E_2 - E_1)}{kT}\right]$$

donde  $k$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura absoluta del material. Entonces, para el caso de equilibrio térmico, tenemos que  $N_2 < N_1$ . De acuerdo a la ecuación anterior el material actúa como un absorbedor a frecuencia, esto es lo que ocurre en condiciones normales. Sin embargo en condiciones de no-equilibrio, en donde  $N_2 > N_1$ , el material actúa como un amplificador. En este caso se dice que existe una inversión de población en el material, en este caso la diferencia de población ( $N_2 - N_1 > 0$ ) es contraria en signo a la que existe bajo condiciones ordinarias. Un material con inversión de población se le llama medio activo.

Si la frecuencia de transición  $\nu = (E_2 - E_1)/h$  cae en la región de microondas, al amplificador se le llama máser, la palabra máser es el acrónimo de "microwave amplification by stimulated emission of radiation". Si la frecuencia  $\nu$  de transición cae en la región óptica, el amplificador es llamado láser, la palabra láser es también un acrónimo, obtenido de sustituir la letra  $l$  (light) por la letra  $m$  (microwave) en la palabra máser. La palabra láser, sin embargo, es comúnmente usada no solo para frecuencias de la luz visible sino también para cualquier frecuencia que este en las regiones: cercano o lejano infrarrojo, en el ultravioleta, y aún en la región de los rayos X.

Para hacer un oscilador a partir de un amplificador, es necesario generar una retroalimentación positiva. En el caso de un láser, la retroalimentación se obtiene colocando el medio activo entre dos espejos altamente reflejantes (cavidad óptica). En éste caso, una onda electromagnética plana viajando en la dirección ortogonal a los espejos, incide en uno de los espejos y regresa hacia el otro, vuelve a regresar a través del medio activo. Si uno de los dos espejos es parcialmente transparente, un haz podrá salir de la cavidad.

El proceso por el cual los átomos son excitados del nivel 1 a otro nivel cualquiera superior (para generar la inversión de población) se conoce como bombeo. Hay varias formas en las cuales puede ser realizado éste proceso por ejemplo: bombeo óptico (con lámparas u otro láser), bombeo eléctrico (descargas eléctricas), bombeo químico etcétera.

A continuación examinaremos de forma simple las características de la radiación láser, que hacen del láser un instrumento valioso y efectivo en la espectroscopia óptica [7].

1. La sintonizabilidad de la longitud de onda permite obtener radiación en alguna longitud de onda en el IR, visible y UV. De hecho la radiación láser puede ser sintonizada (incluyendo los métodos de conversión no lineal de frecuencia) a cualquier longitud de onda sobre un amplio rango desde 0.2 a 20  $\mu\text{m}$ , haciendo posible estudiar casi cualquier transición cuántica de átomos y moléculas.
2. La intensidad alta de la radiación láser permite la realización de efectos singulares, como la interacción no lineal de la luz con átomos y moléculas. En una interacción cuántica resonante la no-linealidad se manifiesta en el efecto de absorción saturada, cuando una considerable fracción de partículas es transferida a un estado excitado. A intensidades altas, transiciones entre niveles atómicos y moleculares prohibidas, que no pueden ser observadas a intensidades bajas, pueden ser probables.
3. La monocromaticidad de la radiación láser permite primero, medidas espectrales con casi cualquier requerimiento de resolución y segundo, excitación selectiva de cierta clase de átomos o moléculas en mezclas. Esta última consideración es particularmente importante para aplicaciones analíticas.
4. La coherencia espacial de la radiación láser hace posible formar haces de luz altamente colimados para pruebas espectrales de ciertas regiones o para enfocar la radiación sobre áreas pequeñas para análisis local.

Estas características únicas de la radiación láser han hecho posible resolver, o han proporcionado posibilidades de resolución, a los problemas básicos de la espectroscopia que son; adecuada resolución espacial y temporal, sensibilidad y selectividad.

La resolución de los métodos clásicos de espectroscopia atómica y molecular en fase gaseosa fue usualmente limitada por la resolución del espectrómetro. Esta limitación es particularmente notable en la región IR donde la resolución de solo algunos espectrómetros llega a alcanzar hasta  $0.01\text{ cm}^{-1}$ . La resolución de espectrómetros comerciales ordinarios es solo de  $0.1\text{ cm}^{-1}$ . Estos parámetros numéricos no se pueden comparar con el ancho doppler de la línea de absorción rotacional-vibracional de gases moleculares, que son del orden de  $10^{-3}\text{ cm}^{-1}$ . Láseres sintonizables con línea estrecha de radiación por ejemplo láseres IR de inyección y láseres de pigmento en la región visible (en combinación con conversión no lineal de frecuencia en el cercano UV y cercano IR), ha permitido la realización de alta resolución espectral en espectroscopia lineal.

La resolución temporal en espectroscopia cinética antes de la invención del láser, fue, la mejor, alrededor de  $10^{-8}\text{s}$  debido al uso de lamparas pulsadas e interruptores tipo celdas Kerr. La creación de láseres de pulsos ultracortos ha producido un rápido progreso en los métodos de espectroscopia láser de resolución en picosegundos. En años recientes se ha producido la generación de pulsos de subpicosegundos (del orden de  $30\text{ fs} = 3 \times 10^{-14}\text{s}$ ). Láseres de pulsos ultracortos con frecuencia sintonizable permiten excitación selectiva de una fracción considerable de moléculas a un estado cuántico definido y resolución de picosegundos de procesos fotofísicos y fotoquímicos con moléculas excitadas. Los métodos de espectroscopia láser de picosegundos son de gran importancia para el análisis de partículas de vida corta (radicales, complejos etc.).

Aunque toda la información espectral esta contenida en un átomo o molécula, la obtención del espectro es posible solo con un gran número de partículas en la muestra (desde  $10^{10}$  a  $10^{20}$  aproximadamente para diferentes métodos y objetos) debido a que la sensibilidad de todos los métodos espectrales es muy limitada. El desarrollo de los láseres sintonizables y su uso en espectroscopia ha incrementado la sensibilidad de todos los métodos conocidos de espectroscopia. Usando láseres es posible desarrollar algunos métodos (absorción intracavidad, fotoionización, fotoionización multipasos, dispersión Raman anti-stokes coherente etc.) de espectroscopia ultrasensitiva de átomos y moléculas, que permitan operar con mucho menor número de partículas (desde 1 a  $10^{10}$ ) en la muestra.

En el análisis de una muestra es de importancia fundamental la selectividad, esto es, la habilidad para detectar la presencia, en soluciones, de una clase definida de átomos o moléculas. La potencialidad de la espectroscopia óptica, a este respecto, ha sido siempre limitada. El uso de radiación láser ha hecho posible, en algunos casos, la simplificación (encontrar estructura fina) del espectro óptico de moléculas, por ejemplo el espectro de fluorescencia de moléculas en matriz a baja temperatura, y por lo tanto incrementar la selectividad del análisis

El espectro de emisión de luz a partir de fuentes lejanas ha sido usado para el estudio de la composición de la materia. A este respecto, el análisis espectral, es de objetos que estén radiando, tales como flamas, descargas o estrellas. La luz láser ha permitido que esta característica única de la espectroscopia óptica sea aplicada a objetos que no estén radiando. Es decir, un haz láser dirigido puede inducir fluorescencia o dispersión en regiones diversas (lejanas o no lejanas). Entonces es posible analizar la composición atómica-molecular de la región irradiada.

La coherencia espacial de la radiación láser permite que esta sea enfocada en una área muy pequeña del orden de la longitud de onda de la luz, esto es una fracción de micrómetro  $\mu$  m para el rango entre el visible y UV.

#### **1.4 Fluoróforos I.**

Las sustancias que presentan fluorescencia significativa, llamadas fluoróforos, generalmente poseen electrones deslocalizados formalmente presentes en enlaces dobles conjugados [8]. Algunas sustancias típicamente fluorescentes son: la quinina, presente en el agua tónica. Si se observa un vaso con agua tónica que este expuesto a la luz solar, un color azul tenue frecuentemente es visible y se hace más aparente cuando el vaso es observado perpendicularmente a la dirección de la luz del sol. La quinina presente en el agua tónica, es excitada por la luz ultravioleta del sol. Cuando la quinina retorna al estado base emite luz azul con longitud de onda cercana a 450 nm.

El color verde o rojo-naranja visto algunas veces en anticoagulantes es probablemente debido a pequeñas cantidades de fluoresceína o rodamina respectivamente. Los hidrocarburos aromáticos polinucleares, tales como el antraceno y el perileno, también son fluorescentes, y pueden ser responsables de la fluorescencia azul vista frecuentemente en gasolinas.

Una variedad de moléculas biológicas contiene fluoróforos intrínsecos, a continuación se menciona un resumen breve de los fluoróforos mejor conocidos:

Proteínas. El triptófano es el aminoácido más fluorescente en proteínas. Los residuos triptófano de las proteínas generalmente son responsables del 90 % aproximadamente del

total de la fluorescencia de las proteínas. Este fluoróforo natural es altamente sensible a la polaridad de sus alrededores (al medio donde se encuentre). Frecuentemente, corrimientos espectrales son observados como resultado de diversos fenómenos, tales como unión de ligandos (a la proteína original), asociación proteína-proteína, desnaturalización y otros. Las proteínas absorben luz cerca de 280 nm, y el rango de emisión máximo de fluorescencia esta entre 320 y 350 nm. Los tiempos de vida de la fluorescencia en los residuos de triptófano van desde 1 a 6 ns. El triptófano posee dos bandas de absorción: una con su máximo en 280 nm y la otra con máximo en 218 nm en solución acuosa a temperatura ambiente. En solución acuosa neutra (pH = 7) y temperatura ambiente el triptófano tiene una banda de fluorescencia con máximo en 353 nm y ancho de 60 nm [2].

La tirosina (aminoácido) es altamente fluorescente en solución, pero su emisión es generalmente débil cuando se encuentra como residuo en proteínas. En solución acuosa neutra la tirosina tiene un máximo de absorción en 275 nm [2]. En solución acuosa, pH neutro y temperatura ambiente la tirosina tiene una banda de fluorescencia con máximo en 304 nm y ancho de 34 nm. Otro residuo aminoácido fluorescente es la fenilalanina.

Acidos nucleicos. Los nucleótidos y ácidos nucleicos son generalmente no fluorescentes. Sin embargo, hay excepciones como en el ARN<sup>t</sup> (ácido ribonucleico de transcripción) de la levadura, contiene una base fluorescente conocida como Y-base, tiene un máximo de emisión cercano a 470 nm y un tiempo de vida cercano a 6ns.

Cofactores. El dinucleótido de adenina y nicotinamida en su forma reducida NADH es altamente fluorescente, en solución acuosa tiene absorción y emisión máxima a 340 y 450 nm respectivamente.

Riboflavinas. La riboflavina (vitamina), el mononucleótido de flavina FMN y el dinucleótido de adenina y flavina FAD absorben luz en el rango visible (aproximadamente 450 nm) y emiten en alrededor de los 515 nm. Tiempos de vida típicos del FMN y del FAD son 4.7 y 2.3 ns respectivamente.

Frecuentemente las propiedades fluorescentes naturales (intrínsecas) de las macromoléculas son inadecuadas para el diseño de algunos experimento. Entonces existen fluoróforos externos al sistema bajo investigación, llamados fluoróforos extrínsecos.

## **Referencias del capítulo 1.**

- 1) J. Morcillo Rubio, J.M. Orza Segade, "Espectroscopia", Alhambra, S.A., 1972 (cap. 1).
- 2) Eugene A. Permyakov, "Luminescent spectroscopy of proteins", CRC Press, Inc. 1993 (cap. 1 y 2).
- 3) Amnon Yariv, "An introduction to theory and applications of quantum mechanics", John Wiley & Sons, Inc., 1982 (cap.4).
- 4) J. N. Murrell, "The theory of the Electronic Spectra of Organic Molecules", Chapman and hall LTD., 1963 (cap.2).
- 5) Orazio Svelto, "Principles of lasers", Plenum Press, 1976 (cap.1).
- 6) Rodney Loudon, "The quantum theory of light", Oxford University Press., 1973 (cap. 1 y 3).
- 7) V.S. Letokhov, "Laser analytical espectrochemistry", IOP Publishing Ltd., 1986 (cap. 1 y 6).
- 8) Joseph R. Lakowicz, "Principles of fluorescence spectroscopy", Plenum Press, 1983 (cap. 1).

## Capítulo 2. Metabolismo celular.

### 2.1 Introducción.

La célula se considera la unidad estructural y funcional de la vida, ya que es la unidad más pequeña de materia viva capaz de realizar todas las actividades inherentes a los seres vivos; tipo preciso de organización, metabolismo, homeóstasis, movimiento, irritabilidad, crecimiento, reproducción y adaptación al cambio ambiental [1].

La teoría celular es una de las generalizaciones más amplias y fundamental de la biología. Dicha teoría establece que: 1) todos los seres vivos están formados por células y productos celulares; 2) sólo se forman nuevas células por división de células preexistentes; 3) existen similitudes fundamentales en los constituyentes químicos y las actividades metabólicas de todas las células, y 4) la actividad de un organismo, como un todo, puede entenderse como el conjunto de las actividades colectivas e interacciones de sus unidades celulares independientes.

Las células de las plantas y animales presentan una gran variedad de tamaños, formas, colores y estructuras internas, pero todas presentan también ciertas características en común. Casi todas las células contienen un núcleo y otras estructuras internas llamadas organelos, como: nucléolo, mitocondria, retículo endoplasmico, ribosoma, microtúbulos, microfilamentos, vacuolas, aparato de Golgi, lisosoma, membrana celular etc. La mayoría de los organelos subcelulares están limitados por membranas. Esos organelos dividen eficazmente el citoplasma (porción de la célula que está fuera del núcleo), generando varios compartimientos diferentes. La membrana actúa como una barrera, haciendo que el contenido químico de un organelo sea diferente del ambiente bioquímico del citoplasma general y otros organelos. Esas diferencias en el contenido permiten que los procesos metabólicos se efectúen de una manera eficaz y ordenada.

La mayoría de las células son microscópicas. Una célula animal promedio mide unos  $15\ \mu\text{m}$  de diámetro; una célula vegetal promedio mide unos  $40\ \mu\text{m}$ . Las células más pequeñas que se conocen, que son las de ciertos microorganismos, miden menos de  $0.3\ \mu\text{m}$  de diámetro.

La forma y tamaño de una célula guardan relación con las funciones específicas que esta debe efectuar aunque las células tienden a ser esféricas. Muchos tipos celulares presentan otras formas características, algunas células como las amibas y glóbulos blancos, tienen la capacidad de cambiar su forma conforme se mueven de un lugar a otro. Los espermatozoides poseen largos flagelos que utilizan para la locomoción. Las células nerviosas poseen largas extensiones que les permiten transmitir mensajes a grandes distancias dentro del cuerpo. Las células epiteliales, que se especializan para cubrir la superficie del cuerpo, se ven como pequeños tabiques.

Además los seres vivos están integrados por moléculas inanimadas [2]. Cuando se examinan individualmente, estas moléculas aisladas se ajustan a todas las leyes físicas y químicas que rigen el comportamiento de la materia inerte. Los seres vivos poseen estructuras internas intrincadas que contienen muchas clases de moléculas complejas. Se presentan, además, en una variedad asombrosa de especies diferentes. Por contraste, la materia inanimada de su entorno, representada por el suelo, el agua y las rocas, está constituida habitualmente por mezclas fortuitas de compuestos químicos sencillos, de organización estructural más bien escasa.

La mayor parte de los componentes químicos de los organismos son compuestos orgánicos de carbono en los que este elemento se halla relativamente reducido o hidrogenado. Muchas biomoléculas orgánicas contienen también nitrógeno. Los principales grupos moleculares que componen las células son los lípidos, las proteínas, los ácidos nucleicos y los carbohidratos.

Los organismos vivos presentan la capacidad de extraer y transformar la energía de su entorno a partir de materias primas sencillas, y de emplearla para edificar y mantener sus propias e intrincadas estructuras. Más aún pueden producir una replica exacta de si mismos.

Los compuestos orgánicos presentes en la materia viva muestran enorme variedad, y la mayor parte de ellos son extraordinariamente complejos. Aún las más sencillas de las células, las bacterias, contienen gran número de distintas moléculas orgánicas. Se calcula que la bacteria *Escherichia coli* contiene alrededor de 5000 compuestos orgánicos diferentes, entre ellos unas 3000 clases diferentes de proteínas y 1000 tipos diferentes de ácidos nucleicos. Además, la mayor parte de la materia orgánica en las células vivas está constituida por macromoléculas, de pesos moleculares muy grandes. Si consideramos ahora organismos mayores y más complejos, como son los animales y las plantas superiores, hallamos que también contienen proteínas y ácidos nucleicos, en mayor variedad. En el organismo humano, por ejemplo, puede haber hasta 100000 clases de proteínas diferentes. Aunque algunas de las proteínas de las células de *E. coli* actúan de modo muy semejante al que lo hacen determinadas proteínas de las células humanas, ninguna de las moléculas proteicas de *E. coli* es idéntica a cualquiera de las proteínas encontradas en el hombre.

Entonces la célula es un sistema complejo, altamente organizado, altamente estructurado, con su propio centro de control, un sistema de transporte interno, plantas de energía, fábricas para producir materiales necesarios, plantas de ensamble, y hasta sistemas de autodestrucción.

## **2.2 Metabolismo.**

El metabolismo puede definirse como la suma total de todas las reacciones enzimáticas que tienen lugar en la célula. Las funciones específicas del metabolismo [2] son cuatro: 1) la obtención de energía química de las moléculas combustibles o de la luz solar absorbida, 2) la conversión de los principios nutritivos exógenos en sillares de construcción o precursores de los componentes macromoleculares de la célula, 3) el ensamble de estos materiales para formar proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros componentes celulares, y 4) la formación y degradación de las biomoléculas necesarias para las funciones especializadas de las células.

El metabolismo se divide en dos fases principales: catabolismo y anabolismo. El catabolismo es la fase degradativa del metabolismo, en la cual moléculas nutritivas complejas y relativamente grandes (glúcidos, lípidos y proteínas) que provienen o bien del entorno o bien de sus propios depósitos de reserva, se degradan para producir moléculas más sencillas tales como ácido láctico, ácido acético,  $\text{CO}_2$ , amoníaco o urea.

El catabolismo va acompañado de la liberación de la energía química inherente a la estructura de las moléculas orgánicas nutritivas y a su conservación en forma de la molécula de trifosfato de adenosina (ATP), transferidora de energía.

El anabolismo constituye la fase constructiva o biosintética del metabolismo, en la cual tiene lugar la biosíntesis enzimática de los componentes moleculares de las células tales



como los ácidos nucleicos, las proteínas, los lípidos y los polisacáridos a partir de sus precursores sencillos. La biosíntesis de las moléculas orgánicas a partir de éstos, precisa del consumo de energía química aportada por el ATP generado durante el catabolismo. El catabolismo y anabolismo se desarrollan simultáneamente y de modo concurrente en las células, pero son regulados independientemente. Debido a que el metabolismo procede de modo escalonado a través de muchos intermediarios, se emplea con frecuencia el término de metabolismo intermedio para designar a las rutas químicas del metabolismo. Los productos intermedios del metabolismo se llaman también metabolitos.

### **2.3 Enzimas.**

Los enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas. Se encuentran entre las más notables de las biomoléculas conocidas debido a su extraordinaria especificidad y a su poder catalítico, que es mucho mayor que la de los catalizadores hechos por el hombre.

Se han identificado miles de enzimas diferentes. Muchos de ellos se han aislado en forma pura y homogénea y alrededor de unos cientos se han podido cristalizar. Aunque se han identificado la mayor parte de los enzimas relacionados con el metabolismo básico corriente de la célula quedan por resolver una gran cantidad de problemas importantes, entre ellos el control genético de la síntesis enzimática, y el papel de las formas múltiples de algunos enzimas en el desarrollo y la diferenciación. Pero sobre todo, todavía no se conoce en términos moleculares, cómo catalizan los enzimas las reacciones químicas con tal eficiencia, precisión y especificidad.

Una clasificación usual de los enzimas es dividirlos en sus clases principales, cada una de las cuales se divide a su vez en subclases, de acuerdo con el tipo de reacción catalizada. Las seis clases son: óxido-reductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

La actividad de algunos enzimas depende solamente de su estructura como proteínas, mientras que otras necesitan, además uno o más componentes no proteicos, llamados cofactores. El cofactor puede ser un ion metálico, o bien una molécula orgánica llamada coenzima; algunos enzimas necesitan de ambos. Los cofactores son generalmente estables frente al calor, mientras que muchas proteínas enzimáticas pierden la actividad por calefacción. Cada uno de los coenzimas catalogados contiene, como parte de su estructura, una molécula de alguna de las vitaminas; éstas son sustancias orgánicas que, en cantidades mínimas (trazas), son vitales para la función de todas las células, y deben figurar en la dieta de algunas especies. Los coenzimas actúan, por lo general, como transportadores intermediarios de grupos funcionales, de átomos específicos o de electrones, los cuales son transferidos en la reacción enzimática global. Cuando el coenzima se halla unido íntimamente a la molécula del enzima recibe normalmente el nombre de grupo prostético.

Un proceso metabólico determinado puede necesitar varias enzimas o inclusive todo un sistema enzimático, para llevarse a cabo. Los sistemas enzimáticos pueden comprender desde 2 hasta 20 o más enzimas actuando en secuencia.

En la organización de los sistemas multienzimáticos podemos distinguir tres niveles de complejidad. En los más sencillos, los enzimas individuales están disueltos en el citosol como moléculas independientes, no asociadas unas con otras en ningún momento durante su actuación. Los intermediarios en un sistema enzimático de esta naturaleza, que son,

generalmente, moléculas mucho menores que los enzimas y poseen por tanto velocidades de difusión elevadas, se difunden muy rápidamente desde una molécula enzimática a la siguiente de la secuencia.

Otros sistemas multienzimáticos poseen un grado de organización más elevado, de modo que los enzimas están físicamente asociados y funcionan conjuntamente como complejos multienzimáticos. Una molécula de cada uno de estos enzimas esta presente en una agrupación estrechamente unida, o complejo, que no se disocia fácilmente; de hecho, las moléculas de enzima separadas son inactivas. Este tipo de ordenación de moléculas enzimáticas secuencialmente activas formando un complejo no disociable, resulta biológicamente ventajoso, porque limita la distancia, por la cual deben difundirse las moléculas del sustrato durante el curso de la secuencia de reacciones químicas.

Los sistemas multienzimáticos más complicados y con mayor grado de organización, son los que se hallan asociados a grandes estructuras supramoleculares como por ejemplo las membranas o los ribosomas. Cuando más complicado es el sistema enzimático, más probable es que se halle asociado a algún organelo u otra estructura intracelular.

Entonces los diferentes enzimas y sistemas enzimáticos están localizados, en uno u otro organelo o en alguna parte de la estructura del citoplasma, como se puede apreciar en la figura 1.

La compartimentación de los sistemas enzimáticos permite también el control y la integración de algunas actividades intracelulares. Por ejemplo, la biosíntesis de la glucosa (molécula de seis átomos de carbono) a partir del piruvato (molécula de 3 átomos de carbono) precisa de una compleja interfuncionalidad de una serie de enzimas, algunos localizados en la mitocondria, y otros en la fase soluble del citoplasma.

### **2.3.1 Enzimas de óxido-reducción.**

Los enzimas de óxido-reducción actúan en el centro del metabolismo celular energético.

La energía liberada en oxidación o reducción por compuestos orgánicos o inorgánicos es capturada con eficiencias variables en formas muy diversas, tales como ATP, potenciales de membrana, o coenzimas reducidas.

Las enzimas redox u oxidoreductasas se dividen en cuatro clases principales [3].

- a) Las deshidrogenasas son enzimas que catalizan la transferencia de un hidrogeno de un sustrato. Este sistema reversible normalmente necesita una coenzima nicotinamida como el dinucleótido de adenina y nicotinamida  $\text{NAD}^+$ . Algunas deshidrogenasas contienen un átomo esencial de Zn.
- b) Las oxidasas son enzimas que catalizan la transferencia de un hidrógeno desde un sustrato al oxígeno molecular. Una coenzima flavínica, dinucleótido de adenina y flavina FAD es usualmente requerida. Dependiendo de la especificidad del enzima, los productos finales pueden ser agua o peróxido de hidrógeno.
- c) Las oxigenasas catalizan la incorporación de oxígeno, desde el oxígeno molecular hasta un sustrato. Las monooxigenasas incorporan un átomo o molécula de oxígeno a un sustrato. Las dioxigenasas incorporan dos átomos de oxígeno al sustrato.

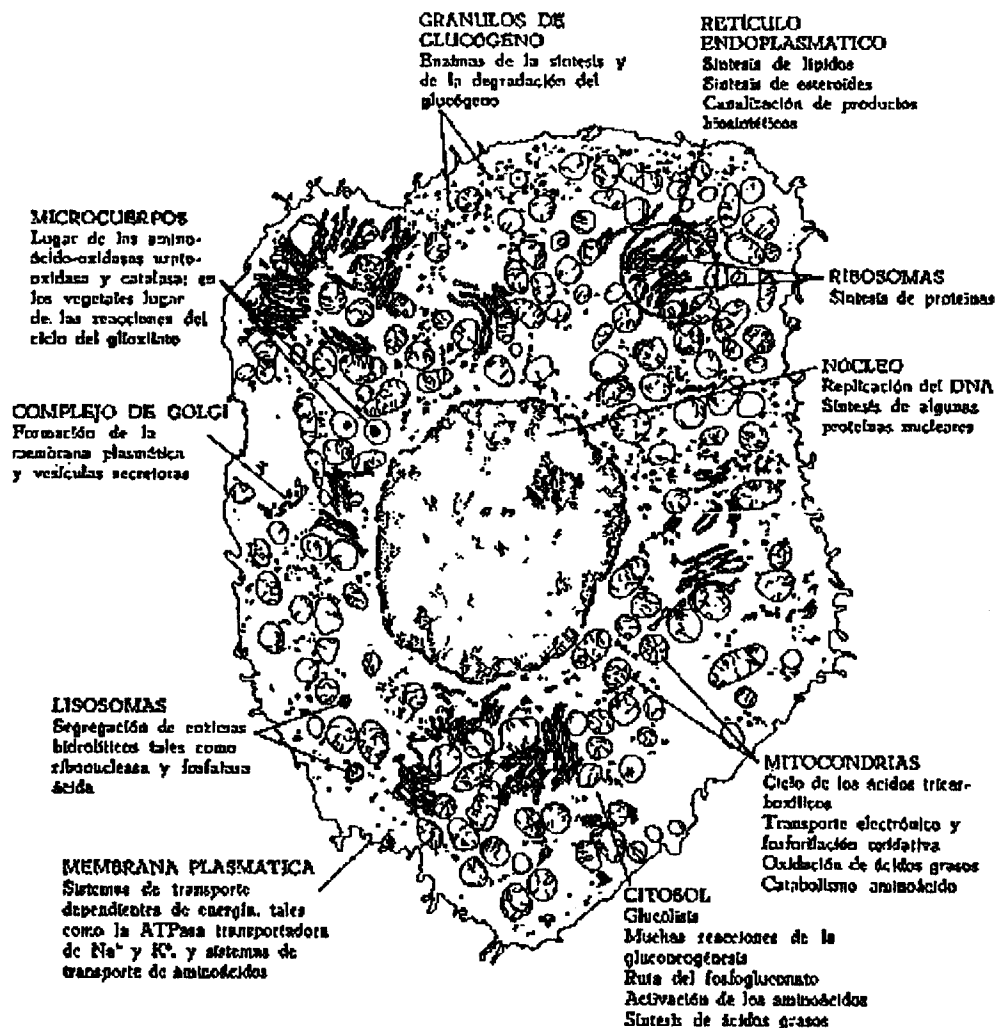
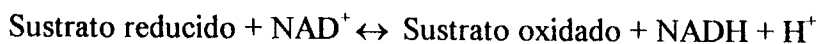


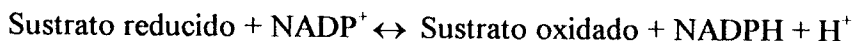
Figura 1. Compartimentación de algunos enzimas importantes y secuencias metabólicas en la célula hepática de rata.

d) Las peroxidasa y catalasa ambas catalizan las reacciones que involucran peróxido de hidrogeno como oxidante. Se produce la forma reducida del agua. Estos enzimas requieren iones de cobre y/o hierro para la catálisis.

Deshidrogenasas piridin-dependientes. Dado que los miembros de esta clase de deshidrogenasas necesitan como coenzimas al NAD o NADP (dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato), los cuales contienen nicotinamida, que es a su vez un derivado de la piridina, reciben, en general, el nombre de deshidrogenasas piridin-dependientes. Catalizan las reacciones generales



o bien,



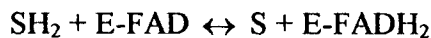
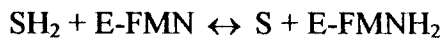
según cual sea el nucleótido de piridina que precisen o prefieran. Estas reacciones comprenden la transferencia reversible de dos equivalentes de reducción del sustrato en forma de un ion hidruro ( $H^-$ ) a la posición 4 del anillo de nicotinamida (en forma oxidada) del nucleótido de piridina; el otro hidrógeno se separa del sustrato en forma de ion  $H^+$  libre.

Los nucleótidos de piridina se hallan unidos de modo no covalente a la proteína de la deshidrogenasa, con una unión relativamente débil. Tanto el NAD como el NADP deben considerarse, por tanto, no como grupos prostéticos fijos, sino como sustratos, ya que en muchos casos se unen y se disocian del centro activo durante el ciclo catalítico. Los nucleótidos de piridina actúan así como transportadores disociables de electrones.

En las células animales, el NAD se da generalmente en cantidades mucho mayores que el NADP. En el hígado cerca del 60 % del NAD total se halla presente en las mitocondrias, y el resto en el citoplasma extramitocondrial. El contenido de NADP de las células se halla en proporción con su actividad biosintética.

Las deshidrogenasas NAD-dependientes, intervienen de manera primordial en la respiración, por ejemplo, en la transferencia de electrones desde los sustratos hasta el oxígeno, mientras que las deshidrogenasas NADP-dependientes intervienen principalmente en la transferencia de electrones desde los intermediarios del catabolismo hasta los intermediarios de la biosíntesis.

Oxidasa flavin-dependientes. Estos enzimas contienen como grupos prostéticos firmemente unidos, un mononucleótido de flavina FMN, o un dinucleótido de adenina y flavina FAD. La reacción se muestra formalmente como una transferencia directa de un par de átomos de hidrogeno del sustrato, para rendir las formas reducidas, designadas como  $FMNH_2$  y  $FADH_2$ .



Las oxidasa más importantes ligadas a las flavinas se hallan todas localizadas en las mitocondrias en la corriente principal de la respiración y del transporte electrónico.

Los nucleótidos de flavina no abandonan al enzima ni durante ni después del ciclo catalítico. Pueden disociarse, a veces, al ser expuesto a la acción de una fuerza iónica elevada o de un pH bajo. En la célula, el aceptor de electrones inmediato de las oxidasa flavin-dependientes es la ubiquinona (coenzima Q) de la cadena de transporte electrónico.

#### **2.4 Dinucleótido de adenina y nicotinamida.**

Los nucleótidos son compuestos formados por la unión de una base nitrogenada, purina o piridina (la purina puede ser el uracilo, la citosina o la timina, y la piridina puede ser la adenina o la guanina), con una pentosa (azúcar con cinco átomos de carbon) que puede ser ribosa o desoxiribosa, y un grupo fosfato (los más comunes son mono, di, y trifosfato).

Se dice que los nucleótidos son los precursores directos del ADN (ácido desoxirribonucleico) y del ARN (ácido ribonucleico), del ATP (adenosin trifosfato), AMPc (adenosin monofosfato cíclico), CoA (coenzima A) etc. Y participan también, como ya mencionamos, en el metabolismo como coenzimas, de ahí su importancia fundamental en las células.

Fundamentalmente todos los métodos de análisis enzimático dependen de los nucleótidos de piridina. En 1935 se describió [4] un método para la determinación de la actividad de la deshidrogenasa glucosa-6-P basada en el incremento de la absorción en el cercano UV cuando el NADPH (dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato reducido), era producido. Greengard [5] fue el primero en describir métodos fluorométricos basados en los nucleótidos de piridina para medir metabolitos.

La utilidad del NAD y del NADP para propósitos analíticos depende de algunas de sus inusuales propiedades [4].

- 1) Sirven como agentes naturales de oxidación o reducción en una amplia variedad de sistemas enzimáticos específicos. Con el apropiado enzima como catalizador, ellos pueden oxidar o reducir selectivamente un sustrato particular en presencia de otros muchos compuestos.
- 2) Las formas reducidas de los nucleótidos NADH y NADPH, además de absorber luz en el cercano UV, son fluorescentes (como ya mencionamos en el capítulo 1), mientras las formas oxidadas no lo son.
- 3) Las formas reducidas pueden ser destruidas completamente en medio ácido sin afectar las formas oxidadas. Las formas oxidadas pueden ser destruidas en medio básico sin afectar las formas reducidas.

NADH y NADPH tienen bandas de absorción idénticas, con el máximo en 340 nm. NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> no absorben a esta longitud de onda. De esta forma, cambios en el estado de oxidación o reducción pueden ser medidos por espectroscopia de absorción (con un espectrofotómetro). Una parte de la luz que es absorbida es remitida como fluorescencia. Aunque solo una pequeña fracción de la luz absorbida es emitida, ésta puede ser medida con mayor sensibilidad, que en el proceso de absorción. En el espectrofotómetro (medidas de absorción), la sensibilidad depende de la luz no absorbida que es registrada en el fototubo, y decrementos muy pequeños en la luz transmitida son difíciles de medir. Un espectrofotómetro ordinario requiere, para una buena precisión, un decremento en la luz transmitida del 5 % o más, por lo que sí se incrementa la intensidad de la luz incidente o la sensibilidad del fototubo no se logra aumentar la sensibilidad del espectrofotómetro.

Por otro lado, con un fluorómetro (medidas de emisión) el fototubo ve solo la fluorescencia emitida, como ésta es directamente proporcional a la intensidad de la luz incidente (capítulo 1, sección 1.3.5). Entonces la sensibilidad puede ser incrementada, casi sin límite, incrementando la intensidad de la fuente de luz, la amplificación, o la sensibilidad del fototubo.

Sabemos del capítulo 1, sección 1.3.5 que  $I_f = I_0(1 - 10^{-D})q$ , expandiendo el término exponencial e ignorando los términos de orden superior (que es una asunción razonable cuando  $D < 0.05$ ) obtenemos, como ya mencionamos,  $I_f = 2.303I_0 \epsilon clq$ .

Entonces podemos decir que la fluorescencia es proporcional a: la intensidad de luz incidente, la absorbancia, y a la eficiencia cuántica. Es decir, la fluorescencia es proporcional a la concentración del fluoróforo. Sin embargo, la asunción se aplica solo para soluciones con valores de absorbancia menores que 0.05 [6]. A valores mayores, se espera una dependencia no lineal de la fluorescencia con la concentración, y entonces se deben construir curvas de calibración apropiadas para hacer medidas analíticas.

Aunque la técnica de espectrofotometría no ofrece la sensibilidad de la fluorometría (espectroscopia de fluorescencia), es usada para propósitos de estandarización y como

medida de las concentraciones necesarias de NADH y NADPH para obtener un rango adecuado en donde usar la técnica de fluorometría.

El coeficiente de extinción molar  $\epsilon$  del NADH o NADPH a 340 nm es  $6270 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Esto significa que soluciones a 0.1 mM tienen una absorbancia de 0.627. Esto corresponde a 23.6 % de luz transmitida ( $I_t$ ) a través de 1cm de trayectoria óptica (de  $I_t=I_0 \cdot 10^{-D}$ ).

Con equipo ordinario, de espectrofotometría, medidas finas pueden hacerse con concentraciones de NADH desde 10 a 200  $\mu\text{M}$  (equivalentes a luz transmitida entre 86.55 y 5.57 % o absorbancias entre 0.0627 y 1.254). Con equipo especial (microceldas o amplificador diferencial especial) cantidades más pequeñas de NADH pueden medirse. Pero la fluorometría ofrece una forma simple y fácil de alcanzar sensibilidad alta.

En la técnica de fluorometría el rango usual analítico de concentraciones de NADH es de 0.1 a 10  $\mu\text{M}$ . Por lo tanto, el límite superior para la fluorometría está alrededor del límite inferior para la espectrofotometría (con equipo convencional).

Sin embargo las medidas de fluorescencia tienen ciertas peculiaridades y limitaciones que deben ser mencionadas:

Apagamiento (quenching) de la fluorescencia. Cualquier sustancia que absorbe luz de excitación, incluyendo a los propios nucleótidos de piridina, reducen la intensidad de la luz de excitación cuando ésta pasa a través de la solución. De esta forma se reduce la luz emitida (es decir, se apaga la fluorescencia). En consecuencia, la luz emitida es proporcional a la concentración de la sustancia (fluoróforo) solo cuando la absorción (de esta forma) de la luz de excitación es despreciable. Es por esta razón que el límite superior de concentración para medidas de NADH es del orden de 10  $\mu\text{M}$ , correspondiendo a una absorbancia de  $0.063 > 0.05$ .

Otra fuente de absorción de una parte de la luz de excitación o de la luz emitida (por fluoróforos), son algunas moléculas que pueden estar presentes (en los alrededores de los fluoróforos).

Efectos de los enzimas sobre la fluorescencia natural. La fluorescencia del NADH puede ser afectada (usualmente aumentada) por los enzimas. En muchas situaciones, esto no es un problema. Esto puede llegar a ser significativo cuando se usan concentraciones elevadas de cierto enzima o si el enzima tiene un efecto muy fuerte. La dificultad es que el aumento no es el mismo en todos los niveles de la coenzima, ya que solo la fracción de la coenzima que está en combinación con el enzima es afectada.

El pH. Al parecer no hay efectos fuertes sobre la fluorescencia del NADH o NADPH a pH entre 6 y 13. Sin embargo, pH por abajo de 7 es evitado por la inestabilidad de las formas reducidas.

Temperatura. Otra limitante (fuente potencial de error) es el coeficiente de temperatura negativo, que es característico de la fluorescencia en general. En el caso de los nucleótidos de piridina, el valor es de 1.6 % por grado. Si en los experimentos, las muestras y los estándares son todos tomados a la misma temperatura no habría problema, pero las diferencias de temperatura deberán ser evitadas.

Blanqueo de la fluorescencia. Muchos reactivos son débilmente fluorescentes o contienen impurezas fluorescentes. Con agua sola, es difícil reducir las lecturas del sistema por abajo del valor equivalente al producido por la fluorescencia de NADH a una concentración de 0.05  $\mu\text{M}$ . Parte de esto son fallas propias del sistema óptico, parte debido

a la exclusión de toda la luz dispersada hacia el fototubo, parte puede ser por una señal débil de la luz filtrada, y parte, es posible, debido al espectro Raman de la propia agua.

No hay que olvidar que todas estas consideraciones son cuando se trabaja en equipos de fluorometría convencional.

### **2.5 Dinucleótido de adenina y flavina.**

Las flavinas están presentes en casi todos los tipos de tejidos biológicos. Las flavinas de mayor importancia biológica son riboflavinas y los llamados nucleótidos FMN y FAD [7].

En muchos tipos de tejido biológico, las flavinas están presentes en muy bajas concentraciones en el rango de 1 µg/g de tejido o menos. Los métodos fluorométricos han sido comúnmente usados por años para el análisis de riboflavina y sus coenzimas, se considera que son los métodos fisicoquímicos más sensitivos.

Las flavinas cristalizadas son sustancias color amarillo-naranja. El FMN o sus sales son débilmente higroscópicas, el FAD y sus sales son higroscópicas.

Las flavinas son muy sensitivas a la luz de longitud de onda más pequeña que 600 nm. La riboflavina y el FMN en solución acuosa neutra muestran alta fotolabilidad, mientras el FAD es fotoestable.

Todas las flavinas muestran fuerte absorción en las regiones UV y azul del espectro. El FAD tiene tres bandas de absorción en 263, 375, y 450 nm, con coeficientes de extinción reportados [7] de 38, 9.3, y  $11.3 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  respectivamente.

La polaridad del solvente influye significativamente sobre el espectro de absorción de las flavinas. Cuando las flavinas se colocan en solvente poco polar (como el dioxano, pero suficientemente solubles para las flavinas), los principales cambios son: corrimiento hacia mayor frecuencia de la banda de 375 nm y decremento en la absorbancia, la formación de semibandas (shoulders) en ambos lados de la banda a 450 nm y una disminución en la longitud de onda de la banda de 263 nm.

Respecto a la fluorescencia los derivados de flavina exhiben una fluorescencia amarilla-verde intensa. Los espectros de fluorescencia de las flavinas en agua son bandas anchas, sin estructura con máximo alrededor de 530 nm. Las formas reducidas de las flavinas no muestran fluorescencia.

Temperatura. La fluorescencia de las flavinas depende de la temperatura, decrece con el incremento de la temperatura (aproximadamente 1 % por grado celsius).

El pH. La intensidad de la fluorescencia del FAD alcanza su máximo a pH entre 2.7 y 3.1.

Apagamiento (quenching). La intensidad de la fluorescencia de las flavinas es restringida por muchos factores. Se consideran al menos tres diferentes procesos conocidos como quenching. Estos resultan a partir de una concentración muy alta de la solución, colisiones entre moléculas, y formación de complejos. El límite de la concentración de flavinas deberá ser definido para cada experimento, en soluciones que contienen no más de 1 µg/ml de flavina no ocurre apagamiento. Además la fluorescencia es apagada por muchos electrolitos, incluyendo diferentes iones metálicos. Una causa específica de apagamiento es la formación de complejos (no fluorescentes) entre flavinas y fenoles, purinas, piridinas, y otras especies orgánicas, incluyendo solventes.

Polaridad. La fluorescencia de las flavinas es muy influenciada por la polaridad del solvente. Generalmente, la intensidad de la fluorescencia se incrementa cuando decrece la polaridad del solvente.

Cuando se emplea la fluorescencia para análisis cuantitativos y cualitativos, deben tomarse en cuenta las propiedades del fluoroforo. Para las flavinas, cada longitud de onda dentro de las bandas de absorción pueden ser usadas para excitación. Para trabajo cuantitativo es más conveniente, sin embargo, usar luz de longitud de onda en el rango de 430 a 460 nm debido a: 1) solo unos pocos compuestos fluorescentes presentes en extractos de tejido biológico, son excitados con esta longitud de onda; 2) El máximo de absorción de las flavinas entre 445 y 455 nm es casi insensible a cambios en la polaridad del solvente y a valores de pH entre 3.5 y 7.5.

Es importante mencionar que el proceso donde participan activamente éstos coenzimas (quizá donde existen en mayor concentración) es en la cadena respiratoria. Sistema multienzimático compuesto por cinco complejos oligoméricos [8], junto con la ubiquinona y el citocromo c, que son acarreadores móviles de electrones entre los complejos. Cada complejo está compuesto por polipéptidos unidos a grupos prostéticos específicos para cada uno. Los prostéticos son grupos no proteicos unidos a la cadena polipeptídica. La cadena respiratoria (oxidativa mitocondrial) se concibe como una serie de reacciones de óxido-reducción acopladas, de tal forma que los electrones transferidos desde los sustratos de la cadena respiratoria hasta el oxígeno molecular conllevan a una translocación de protones que genera una diferencia de potencial electroquímico, y ésta a su vez es utilizada para la síntesis de ATP.

Debido a su importante función fisiológica, el mecanismo de acción de las enzimas que catalizan el proceso de transferencia de electrones es activamente estudiado [9].



## Referencias del capítulo 2.

- 1) Claude A. Ville, Eldra Pearl Solomon, P. William Davis, "Biología", Nueva Editorial Interamericana, 1987 (cap. 4).
- 2) Albert L. Lehninger, "Bioquímica", Ediciones Omega, S.A., 1982 (cap. 1 y 9).
- 3) Herman Dugas, "Bioorganic Chemistry", Spring-Verlag New York, Inc., 1996 (cap. 7).
- 4) Janet V. Passonneau, Oliver H. Lowry, "Enzymatic Analisis", The Human Press Inc., 1993 (cap. 1).
- 5) Greengard, P. "Determination of intermediary metabolites by enzymatic fluorimetry", Nature (London) 178, (1956)632-643.
- 6) C. Lindsay Bashford en "Spectrophotometry & spectrofluorimetry", IRL Press Limited, 1987 (cap. 1).
- 7) Donald B. McCormick, Lemuel D. Wright, en "Vitamins and coenzymes", sección VIII, Academic Press, Inc., 1971 (cap. 4).
- 8) Mina Königsberg, "De la cadena respiratoria mitocondrial", Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, 1992.
- 9) González Halphen D., "El complejo bc<sub>1</sub> de la cadena respiratoria mitocondrial", Ciencia, **41**, 133-152, 1990.

## Capítulo 3 Interacción radiación electromagnética-células.

### 3.1 Introducción.

Las células, tejidos y organismos, tienen como base estructural y funcional miles de moléculas cuyo comportamiento no obedece otras leyes que las generales de la física y la química. Para penetrar en el conocimiento del funcionamiento de las células, hay que comenzar por saber, de que tipo de moléculas están constituidas.

Aunque los organismos vivos están compuestos por una variedad limitada de átomos, la variedad de moléculas es enorme; ello se debe, en parte, a que en su composición el elemento central es el carbono. Los átomos de carbono pueden unirse entre sí hasta grados imposibles para los átomos de cualquier otro elemento. Pueden formar cadenas de miles de átomos o anillos de casi todos los tamaños; estas cadenas y anillos pueden tener ramificaciones y uniones cruzadas. A los carbonos de estas cadenas y anillos se unen otros átomos, principalmente de hidrógeno, nitrógeno, fósforo, azufre y otros menos abundantes.

La diversa naturaleza de las moléculas es solo una fase de la organización celular. Las células, los tejidos, los órganos, sistemas y los organismos mismos, resultan de la asociación organizada de las moléculas, que de maneras diferentes se reúnen y forman tipos de estructuras más complicadas, desde asociaciones relativamente sencillas de unas moléculas con otras, como sucede en el caso de las membranas biológicas. El siguiente nivel de asociación es el de moléculas más grandes, como las proteínas o los ácidos nucleicos, que se pueden unir para formar los llamados complejos supramacromoleculares, dentro de los cuales tal vez los más conocidos sean los virus. Finalmente, hay niveles de organización extraordinarios, resultado de la asociación de enormes cantidades de moléculas, con complicadísimos mecanismos de funcionamiento y estructura; éstos son llamados organelos celulares, que son los principales componentes identificables de las células.

### 3.2 Absorción.

Como se menciona en el capítulo 1, cuando la radiación electromagnética interactúa con la materia, pueden ocurrir tres procesos fundamentales: absorción, emisión espontánea o emisión estimulada. Estos procesos de interacción básicos entre radiación electromagnética y átomos, pueden ser tratados por medio de una teoría fenomenológica simple debida a Einstein (sección 1.3.9). La teoría permite un entendimiento cualitativo de una gran variedad de procesos radiativos, por ejemplo, la absorción y dispersión de luz por los átomos, y la amplificación de luz en los láseres [1].

Una molécula inicialmente en el estado  $S_0$  puede absorber luz de frecuencia  $\nu$ , excitándose al nivel  $S_1$  con energía mayor a  $S_0$ , por una cantidad  $E_1 - E_0 = h\nu$ . Decimos que la molécula ha absorbido un fotón de energía  $h\nu$ .

La probabilidad de que un fotón sea absorbido por unidad de tiempo, esta dada por  $W_{12}\rho(\nu)$ , donde  $\rho(\nu)$  es la densidad de radiación a frecuencia  $\nu$ , y  $W_{12}$  es el coeficiente de absorción de Einstein.

Desde el punto de vista molecular, cuando la radiación electromagnética incide sobre células, éstas absorben radiación, es decir, las moléculas que constituyen las células absorben la radiación electromagnética y se excitan.

La mecánica cuántica nos dice que se produce una transición entre niveles de energía de algunas moléculas que forman la célula, dependiendo de la longitud de onda de la radiación electromagnética (y del tipo de moléculas).

Por ejemplo, la absorción de radiación electromagnética por parte de las proteínas, en la región del UV cercano (200 a 400 nm) es debida a los residuos aminoácidos, principalmente al triptófano, la tirosina y la fenilalanina.

### 3.3 Fluoróforos II.

Una vez que las moléculas que constituyen las células se han excitado puede ocurrir algún proceso de desexcitación (sección 1.3.7) radiativo o no radiativo. Nosotros estamos interesados en los procesos de desexcitación radiativos en particular el fluorescente.

La motivación inicial para realizar este trabajo surgió de la posibilidad de usar el sistema de espectroscopia de fluorescencia láser como herramienta en el diagnóstico de algunos padecimientos.

R.R. Alfano y colaboradores trabajaron inicialmente en dientes con y sin caries analizando espectroscópicamente la dispersión, la fluorescencia y absorción [2]. También midieron la fluorescencia de células normales y células cancerosas de riñón de rata, encontrando diferencias substanciales en los espectros [3]. Ellos proponen como responsables de la fluorescencia (a nivel mitocondrial) a las flavinas, en especial al FAD. Usaron como longitud de onda de excitación  $\lambda=488$  nm, láser iónico de argón.

Una revisión más completa de los fluoróforos responsables de la fluorescencia de células, la encontramos en S. Andersson-Engels et al. [4], quienes mencionan como fluoróforos mejor conocidos en tejido biológico, que contribuyen a la señal de fluorescencia bajo excitación de luz en el cercano ultravioleta al triptófano (emisión a 350 nm), elástina y colágena (a 380 nm), NADH (a 470 nm), flavinas (a 520 nm), melanina (a 540 nm) y las porfirinas (en la región roja del espectro). Cromóforos no fluorescentes, tales como la hemoglobina, también influye en la señal de fluorescencia por reabsorción de la luz fluorescente.

En nuestro caso las células con las que trabajamos, fueron células sanguíneas, en particular leucocitos mononucleares que se componen únicamente de linfocitos y monocitos (siguiente sección). Por lo tanto, ya que la elástina y la colágena son elementos de sostén del tejido conjuntivo, es decir, son sustancias intercelulares, no tenemos estos elementos en nuestras muestras. Asimismo no tenemos melanina, presente principalmente en la coroides y la piel. Las porfirinas constituyen esencialmente los citocromos y la hemoglobina, sólo los citocromos se encuentran en los leucocitos.

Por lo tanto nuestro trabajo se centra en el estudio espectroscópico de dos fluoróforos intracelulares el NADH y el FAD. Empezamos con un estudio sencillo para conocer y corroborar sus propiedades ópticas (como moléculas solas), para después intentar monitorearlos dentro de las células vivas (capítulo 5), en donde realizan su función específica metabólica (sección 2.3.1).

Antes de continuar con la siguiente sección, conviene mencionar porque usamos un sistema de espectroscopia láser y no un fluorómetro convencional.

Por varios años se ha usado una técnica llamada LIF (del inglés Laser-induced fluorescence) en análisis químicos [5] y fotobiológicos [6]. Durante los últimos años ésta técnica a llamado la atención en la medicina especialmente en el diagnóstico de tejido. En ésta técnica [7] luz láser de baja potencia se dirige a un tejido particular. La fluorescencia se produce cuando una fracción de luz absorbida es reemitida a una longitud de onda mayor

que la de la luz incidente. El espectro de la luz emitida puede servir como una “huella” espectral del tejido particular irradiado.

Sin embargo medidas cuantitativas de cualquier fluoróforo en tejido son muy difíciles, debido a que varios fluoróforos en tejido, tienen espectros de fluorescencia y absorción con bandas anchas y parcialmente traslapadas. También la luz al propagarse en el tejido se dispersa. Y además la profundidad de penetración de la luz en el tejido biológico es de menos de pocos milímetros [4].

Actualmente se ha reportado el desarrollo de medidas de LIF para adquirir conocimientos estructurales de válvulas de tejido de cerdo comúnmente usado para reconstruir y remplazar válvulas de corazón humano.

El tiempo de vida del tejido de cerdo, usado en la implantación de válvulas, es típicamente de 10 a 15 años y su eficacia para válvulas humanas parece estar correlacionado con la composición y estructura natural del tejido antes del implante. Usando LIF con un láser de excímero, se puede mostrar que la parte de la válvula que soporta el flujo fuerte de sangre contiene una alta proporción de elastina que permite una válvula funcional. Y el lado de la válvula que soporta un flujo débil esta compuesta principalmente por colágena, además el tejido fibroso podría producir problemas en el flujo de sangre o en el proceso de abrir y cerrar la válvula. LIF puede ser usado para mejorar la efectividad del tejido desde el punto de vista de la ingeniería, si se desarrolla una evaluación integra no destructiva de la composición y estructura de la bioprótesis antes de la implantación.

En esta técnica se hace uso de las características particulares de la radiación láser, como son su monocromaticidad y su alta intensidades de energía (sección 1.3.9), para excitar a los fluoróforos con mayor selectividad y energía.

### **3.4 Leucocitos mononucleares.**

Una clasificación sencilla [8] del sistema hematológico es considerarlo como formado por: la sangre, la médula ósea, el bazo, los ganglios linfáticos y el sistema reticuloendotelial.

La sangre esta compuesta esencialmente de plasma y células. El plasma (55 % del total) contiene: agua, proteínas, albúminas, globulinas, fibrinógeno, electrolitos, urea, glucosa etc.

Las células son: eritrocitos  $\approx 5 \times 10^6/\mu\text{l}$ , leucocitos  $\approx 7 \times 10^3/\mu\text{l}$  y plaquetas  $\approx 3 \times 10^5/\mu\text{l}$ .

Los leucocitos se pueden dividir, dependiendo de su función, en dos tipos: los fagocitos y los inmunocitos. Los fagocitos se pueden dividir a su vez en granulocitos y monocitos. Los granulocitos son los neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos. Los inmunocitos se dividen también en linfocitos y células plasmáticas. Los linfocitos son de dos tipos linfocitos T y B.

Los monocitos se desarrollan en la médula ósea, entran a la sangre y permanecen en ella por un periodo de 30 a 70 horas, al cabo del cual abandonan el espacio intravascular mediante diapédesis y se transforman en macrófago, dotado de una prodigiosa capacidad fagocitaria. Los monocitos tienen diámetro de 12 a 18  $\mu\text{m}$ , según tinción de Wright [9].

Los linfocitos son el único tipo de células capaces de reconocer como extraño a un determinado antígeno y de desencadenar una secuencia de eventos que lleven a su destrucción y eliminación.

Los linfocitos pueden diferenciarse en el aspecto morfológico a lo largo de dos vías. Los que pueblan el timo se diferencian en linfocitos T, que son responsables de la inmunidad celular. Y los que aparentemente se desarrollan en la médula ósea linfocitos B, responsables de la inmunidad humoral. Los linfocitos tienen un diámetro entre 6 y 18  $\mu\text{m}$ , según tinción de Wright [9].

Los leucocitos son un tipo celular muy importante debido principalmente a que inmunológicamente involucran muchos procesos biológicos. Por ejemplo, los linfocitos maduros sufren una serie coordinada de cambios bioquímicos y morfológicos cuando reaccionan ante el estímulo de antígenos específicos (agentes extraños). Antes de que se establezca el contacto con el estímulo, estas células ya existen como linfocitos intermitóticos pequeños.

La interacción entre los antígenos y las células con capacidad de respuesta, depende de los receptores de la membrana celular; en el sistema de células B, éstos son inmunoglobulinas unidas a la membrana que tienen especificidad para el antígeno. Estos linfocitos reciben el estímulo para convertirse en células de proliferación activa y, en cierto sentido, volver a ser células madre. La célula se agranda, sintetiza ácidos nucleicos y proteínas nuevas y experimenta un proceso mitótico. Esta expansión proliferativa aumenta el número de células con capacidad para reaccionar ante los antígenos. Una vez que se ha completado esta fase, las células hijas maduran para convertirse en efectores inmunológicos.

Cada elemento celular de los leucocitos mononucleares realiza diversos procesos biológicos cuando lleva a cabo su función como fagocito o inmunocito.

### **3.5 Interacción radiación láser con tejido vivo.**

A nivel de tejido (agrupación de células, fibras y productos celulares varios que forman un conjunto estructural) podemos decir que todos los procesos que ocurren cuando la luz láser interactúa con tejido vivo son esencialmente químicos. Un efecto inevitable de la radiación láser es el calentamiento de la zona irradiada. En algunas aplicaciones, por ejemplo, en la reparación de tejido vía células fundidas o en algunos tipos de tejido removido, toda la energía irradiada se emplea como calor, sin importar su longitud de onda.

Sin embargo, algunas aplicaciones médicas dependen no solo del calentamiento, sino también de una longitud de onda específica (fotoquímica). Podemos dividir las interacciones en térmicas y fotoquímicas, aunque en vista de lo sensitivo de las células vivas a la temperatura, es esencial recordar que los efectos térmicos están siempre presentes, hay procesos en donde los dos efectos podrían ser empleados [10].

Efectos térmicos inducidos. Siempre que la luz láser interactúa con tejido vivo, la temperatura aumenta. Que ocurre al aumentar la temperatura, depende de cuánto aumente, por lo que consideraremos tres rangos principales: abajo de 45  $^{\circ}\text{C}$ , de 45 a 60  $^{\circ}\text{C}$  y arriba de 60  $^{\circ}\text{C}$ .

Se dice que cuando la radiación láser no incrementa la temperatura de las células más de 45  $^{\circ}\text{C}$ , hay pocos o ningún efecto sobre las células vivas, aunque puede haber efectos fotoquímicos [11].

Entre 45 y 60  $^{\circ}\text{C}$  cosas interesantes le ocurren a las células. Estas están relacionadas con la posibilidad de usar la luz láser para reparar tejido vía fundir células, en éstas células las proteínas fibricas salen fuera de la membrana por lo que pueden alcanzar y conectar otra célula cercana, pero el tejido permanece viable, con capacidad de autorepararse y eventualmente crecer [11].

Por arriba de 60 °C la célula sufre necrosis rápidamente y arriba de 150 °C es posible su carbonización [11]. Este rango puede ser útil, por ejemplo, en cirugía láser donde es necesario un corte con cauterización juntos [12].

En términos de energía cedida por pulsos, una guía comúnmente citada para efectos producidos por el láser se muestra en la tabla 1 [11].

Densidad de Energía	Efecto
< 0.04 Joules/mm <sup>2</sup>	Bioestimulación
> 0.04 Joules/mm <sup>2</sup>	Biosupresión
0.4 Joules/mm <sup>2</sup>	Fototerapia (citotoxicidad no térmica)
4.0 Joules/mm <sup>2</sup>	Fotocoagulación
40.0 Joules/mm <sup>2</sup>	Vaporización

**Tabla 1** Efectos producidos por la densidad de energía en células vivas.

Efectos fotoquímicos. Hay varios procesos en donde los efectos físicos dependen de la longitud de onda, por ejemplo, el espectro de absorción de la hemoglobina favorece el uso de láseres que emitan en el azul, en el tratamiento de lesiones de la retina, como en los casos de diabetes (la hemoglobina absorbe en el azul).

Otro aspecto significativo es la posibilidad que ofrece la fototerapia selectiva usando agentes fotosensitivos, por ejemplo, en el tratamiento de tumores, destrucción de áreas localizadas con infección bacteriana, o células dañadas individualmente como células leucémicas. En el primer caso, existe la posibilidad de concentrar ciertos agentes en regiones específicas y entonces inducir toxicidad localizada, vía irradiación con láser. La sustancia de interés puede ser completamente inocua en el estado no irradiado, el efecto tóxico es adquirido por moléculas que sufren la irradiación láser y, por esto, se ilumina sólo cierta región. Varias sustancias llamadas derivados hematoporfirínicos (HpD) son usadas de ésta forma para el tratamiento de tumores. El láser que se emplea es uno sintonizable para excitar los HpD selectivamente desde el estado base al estado singulete excitado de la molécula. De éste estado de excitación puede decaer al estado triplete metaestable cercano en energía. Durante las colisiones el estado triplete de las moléculas transfiere energía eficientemente al oxígeno. Esto produce una concentración alta local de moléculas de oxígeno en estado singulete tóxicas. Este proceso tiene el atractivo, respecto a otros, que el oxígeno tóxico está localizado y no hay una distribución general en el cuerpo.

### **Referencias de capítulo 3.**

- 1) Rodney Loudon, "The quantum theory of light", Oxford University Press., 1973 (cap. 1 y 3).
- 2) Robert R. Afano, et al., IEEE Journal of Quantum Electronics, QE-20, **12** (1984) 1512-1515.
- 3) Robert R. Afano, et al., IEEE Journal of Quantum Electronics, QE-20, **12** (1984) 1507-1511
- 4) S. Andersson-Engels, et al., Photochemistry and Photobiology, 53, **6** (1991) 807-814.
- 5) Joseph R. Lakowicz, "Principles of fluorescence spectroscopy", Plenum Press New York, 1983.
- 6) László Mátyus, Michael Edidin, en "Topics in fluorescence spectroscopy", Vol. 1, Plenum Press New York 1991 (cap. 8).
- 7) Kevin T. Shomacker, et al., Gastroenterology, **102** (1992) 1155-1160.
- 8) Robert L. Vick, "Fisiología Médica Contemporánea", McGraw-Hill de México S.A. de C.V., 1987 (cap.24 y 25).
- 9) John B. Miale, "Hematology", Editorial Reverté S.A., 1985 (cap. 4).
- 10) C. Kittrell, et al., Applied Optics, 24, **15** (1985) 2280-2281.
- 11) D.D. Burgess en "Lasers and applications", Sumer Course, Course K, Laser Applications in Medicine, Physics Department, Imperial College 1996.
- 12) Ronald Allen Kirchner, Michael Unger, "Cirugía con láser", Interamericana-McGraw-Hill, 1987.

## Capítulo 4. Arreglo experimental.

### 4.1 Introducción.

Al abordar el trabajo de espectroscopia de fluorescencia láser en células empezamos desde el armado del sistema de espectroscopia, ya que en el área de ingeniería biomédica no existían trabajos previos, continuar con la caracterización y optimización de cada una de las componentes, y finalmente asegurarnos de obtener resultados reproducibles.

El esquema general de un sistema de espectroscopia consta esencialmente de [1]: una fuente de luz de excitación, un monocromador (rejilla de difracción), un detector de luz, un analizador (amplificador-integrador-promediador) de la señal eléctrica, un aparato de registro, una celda para colocar la muestra, óptica de enfocamiento (lentes espejos etc.).

Con el apoyo del área de Fenómenos Ópticos y Transporte de la Materia del departamento de Física, tuvimos acceso al siguiente equipo: Un láser de nitrógeno molecular, un láser de pigmento, un fotodiodo con su fuente de voltaje, un monocromador, un fotomultiplicador con su fuente de alto voltaje, un integrador-promediador (boxcar), diversas monturas, lentes y espejos.

Este sistema se completó con una tarjeta de adquisición de datos en una computadora PC y microcelda de cuarzo donde se coloca la muestra.

Durante este proceso cabría señalar que tuvimos diversos problemas, pero el mayor problema fue que inicialmente la señal se intento analizar con un contador de fotones. La entrada del contador de fotones es de 50 ohms; cuando observamos la señal en osciloscopio, de una muestra de interés para nosotros, por ejemplo el NADH, ésta se veía traslapada con el ruido eléctrico (oculta) generado por la descarga eléctrica del láser de nitrógeno (éste láser no es comercial). Por esta razón no era posible obtener espectros bien definidos ni reproducibles. Obtuvimos algunos resultados, pero solo cuando la fluorescencia era muy intensa. Hicimos espectros bien definidos de cristales de halogenuros alcalinos dopados con impurezas, para este caso la señal vista en el osciloscopio se apreciaba clara, desfasada temporalmente respecto al ruido, y muy intensa (respecto al ruido).

Intentamos varias formas de eliminar el problema entre ellas una sugerida en el manual de operación [2] del contador de fotones, ésta consistía en colocar a la salida del fotomultiplicador un cable coaxial (de 50 ohms) de 25 cm de largo terminando en una resistencia de menos de 50 ohms. Nosotros colocamos inclusive una resistencia variable de 0 a 100 ohms, y buscamos las condiciones ideales según la ecuación para el coeficiente de reflexión de un cable con una impedancia conocida y terminado en una resistencia, variando la resistencia. Otra forma fue amplificando la señal, con un preamplificador (marca Stanford Research Systems, modelo SR445 a 300 Mhz) antes de conectar la señal al contador de fotones, pero desafortunadamente también se amplificaba el ruido eléctrico. Logramos obtener algunos espectros del NADH pero de mala definición. Todo esto obviamente retraso este trabajo.

Finalmente cuando cambiamos el contador de fotones por el integrador-promediador (boxcar), terminamos completamente con el problema mencionado. La entrada del boxcar es de  $1\text{ M}\Omega$ , cuando observamos la señal en osciloscopio, se apreciaba clara, intensa y sin ruido eléctrico (el ruido eléctrico aparece en otro rango temporal y de muy baja intensidad).



## 4.2 Esquema general del sistema.

El esquema general del sistema se muestra en la figura 1. En la figura se muestran los componentes principales del sistema previamente mencionados. Por simplicidad no se muestran algunas componentes como los accesorios del láser de nitrógeno (fuente de alto voltaje, tanque de nitrógeno etc.), el osciloscopio marca Philips, modelo PM 3092 a 200Mz sirve para detectar, el momento del disparo (trigger) que inicia el procesamiento de la señal (en el boxcar), la señal del fotomultiplicador para monitorear la fluorescencia de la muestra, la sincronización entre la ventana (gate) y la señal del fotomultiplicador.

### 4.2.1 El láser de Nitrógeno [3].

Los láseres de nitrógeno molecular (gaseoso) pueden operar tanto en el UV como en el IR y debido a las características de la estructura cuántica de la molécula el sistema es intrínsecamente pulsado. La emisión ultravioleta (337.1 nm) es superradiante, es decir, puede emitir coherentemente sin necesidad de cavidad óptica debido a su alta ganancia.

Los láseres de gas frecuentemente se subdividen en tres tipos según el medio activo: atómicos, iónicos y moleculares. Los sistemas moleculares a diferencia de los atómicos, además de tener niveles energéticos electrónicos, poseen subniveles vibracionales y rotacionales. La transición radiativa se puede llevar a cabo entre distintos niveles electrónicos, distintos niveles vibracionales, o en diversas combinaciones de ellos. En el láser usado en este trabajo la transición láser (radiativa) se lleva a cabo entre niveles vibracionales de un mismo estado electrónico (triplete).

La excitación inicial de las moléculas (bombeo) se lleva a cabo por impacto electrónico, dicha excitación puede ser longitudinal o transversal respecto a la dirección del haz de salida, en el láser empleado en este trabajo la excitación es transversal.

La avalancha electrónica de excitación debe ser lo suficientemente rápida, para poblar el nivel superior de la transición láser, antes de que éste decaiga al nivel inferior de la transición por emisión espontánea y no se permita la inversión de población. Para esto se emplea un circuito de descarga tipo blumlein para la generación de descarga de alto voltaje.

El láser que usamos en este trabajo se construyó en el laboratorio de Optica Cuántica del área de Fenómenos Opticos y Transporte de la Materia del departamento de Física. Proporciona una fuente de luz láser que puede usarse para excitar a la muestra, para excitar al láser de pigmento y también para iniciar el procesamiento de la señal (trigger), a través del fotodiodo. Sus principales características son:

Longitud de onda de emisión: 337.1 nm.

Energía por pulso: máxima 0.32 mJ.

Ancho temporal del pulso: 6 ns.

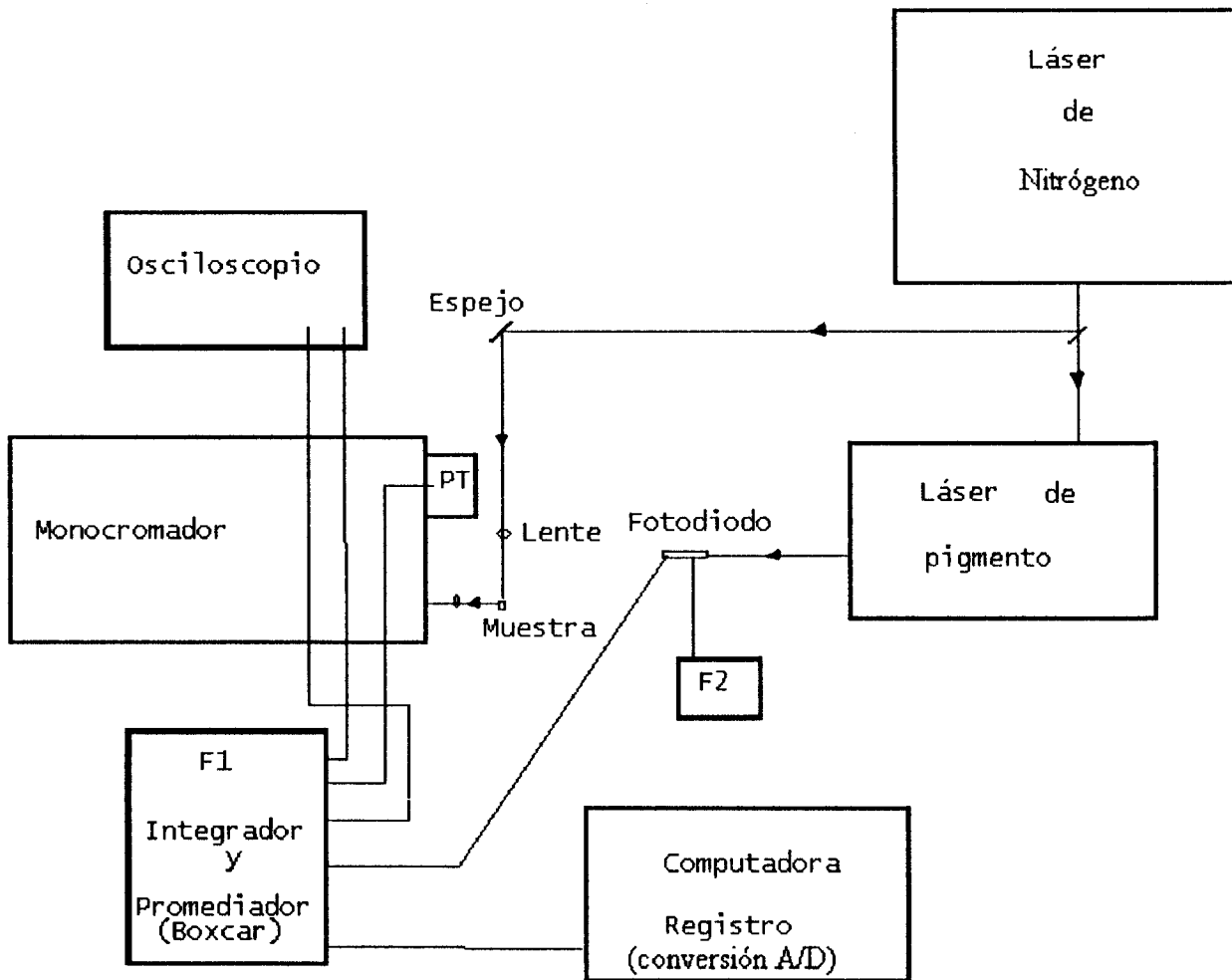
Variación de energía entre pulsos: hasta 10%.

Repetición de pulsos: hasta 5 Hz (variable).

Divergencia del haz: 7.5 mrad.

Potencia por pulso: 115 Kw (pico promedio).

Sección transversal del pulso: 0.005x0.02 m



**Fig.1 Esquema general.** PT es el fotomultiplicador, F1 es la fuente de alto voltaje para el fotomultiplicador, F2 es la fuente de voltaje del fotodiodo, el registro se refiere al convertidor A/D (adquisición de datos), las flechas indican la dirección de la luz (donde no hay flechas son cables).

#### 4.2.2 El láser de pigmento [4].

El láser de pigmento utiliza un pigmento orgánico disuelto en algún solvente como medio activo de emisión, el cual es bombeado ópticamente en general, por otro láser o por una lámpara de destello.

Los pigmentos son compuestos orgánicos con enlaces dobles conjugados, lo que hace que los electrones no estén localizados y se muevan en un potencial electrostático cuasi constante a lo largo de toda la molécula, es decir, se puede suponer que dichos electrones se encuentran en un pozo de potencial muy ancho por lo que sus niveles de energía forman un cuasicontinuo, lo que resulta en espectros de absorción y emisión con bandas muy anchas del orden de 50 nm. Esta característica tan peculiar le confiere a los láseres de pigmento su aspecto más sobresaliente: en estos sistemas se puede variar la longitud de onda que emiten, es decir, son sintonizables dentro de un amplio rango de frecuencias.

La posibilidad de sintonía y la posibilidad de cubrir todo el espectro visible con unos cuantos pigmentos distintos, han hecho de estos láseres una herramienta muy importante para la espectroscopia de alta y ultra alta resolución. Estos láseres se pueden operar de manera pulsada, obteniéndose pulsos de luz muy intensos y cortos (temporalmente), lo que por un lado permite realizar espectroscopia de resolución temporal, y por el otro los hace idóneos para experimentos de óptica no lineal, donde se requiere intensidades altas para producir efectos apreciables. La energía obtenida con éste láser aparentemente es pequeña, comparada con las altas potencias generadas por las lamparas empleadas en espectrofluorómetros convencionales, sin embargo ésta energía incide directamente en la muestra a una longitud de onda cuasimonocromática, por lo que tiene una alta intensidad espectral (a diferencia de un espectrofluorómetro).

En el láser empleado el sistema de bombeo consiste en un láser de nitrógeno molecular que proporciona energía al sistema oscilador para que este último genere luz láser en el visible. Este láser, como ya mencionamos, produce pulsos cortos (temporalmente) e intensos de luz ultravioleta (337.1nm).

En nuestro caso el láser de pigmento se usó para disparar (trigger) el inicio del procesamiento de la señal generada por la muestra (fig. 1), a través del fotodiodo, y también para excitar directamente a la muestra. Las principales características del láser son:

Rango de sintonía (con rodamina 6G): 570-600 nm.

Energía por pulso: 70  $\mu$ J.

Ancho temporal del pulso: 7.5 ns.

Repetición de pulsos: 5Hz (variable).

Divergencia del haz: 3 mrad.

#### **4.2.3 Monocromador.**

Un monocromador es un aparato que sirve para separar la radiación ultravioleta, visible e infrarroja cercana, a través de una rejilla de difracción, en sus respectivas longitudes de onda para permitir su análisis.

El monocromador usado en el arreglo [5] es marca Pacific Instruments, modelo MP1018B, el cual usa una configuración Czerny-Turner. La rejilla de difracción es de 1180 líneas/mm que permite un barrido de longitud de onda desde 200 a 1000 nm. La rejilla puede girar manualmente o a través de un motor. Este tiene seis selecciones posibles de barrido: 2, 5, 10, 20, 50 y 100 nm/min. La resolución es de menos de 0.1 nm.

Las rendijas son ajustables desde menos de 5  $\mu$ m hasta 5 mm, en lectura de 2  $\mu$ m por división.

#### **4.2.4 Integrador –promediador.**

Para procesar la señal eléctricamente usamos un integrador de ventana de alta velocidad, tipo modulo NIM, que puede registrar señales analógicas rápidas extraídas del ruido de fondo, marca Stanford Research Systems, modelo SR250.

El modo más común para registrar estas señales consiste en hacer un muestreo de un voltaje de entrada durante un tiempo fijo a partir de una señal “disparo” de entrada (trigger).

El aparato consiste esencialmente [6] de un generador de ventanas (gate), un integrador de ventana rápido, y un promediador exponencial móvil.

El generador de ventana, que puede ser disparado interna o externamente, proporciona un retardo ajustable (delay) desde pocos nanosegundos a 100 milisegundos, antes de que genere una ventana, también ajustable continuamente desde 2 ns a 15  $\mu$ s.

El integrador de ventana de alta velocidad integra la señal de entrada únicamente durante el tiempo de ventana. La salida del integrador esta entonces normalizada por el ancho de la ventana para proporcionar un voltaje proporcional al promedio de la señal de entrada durante el muestreo.

La técnica de promedio exponencial móvil es tradicionalmente usada para mejorar la relación señal/ruido de señales pequeñas. Cuando una señal promediada consiste de muchas muestras con ruido, el promedio converge al valor medio de la señal, y el ruido converge a cero. En el caso de ruido de fondo tipo "ruido blanco" la razón señal ruido se incrementa como la raíz cuadrada del numero de muestras en el promedio. El promedio exponencial móvil cubre el rango desde 1 a 10,000 muestras.

#### **4.2.5 Fotomultiplicador y fotodiodo.**

El tubo fotomultiplicador [7] es un aparato fotosensitivo que consiste de un cátodo fotoemisor (fotocátodo), un enfocamiento de electrones, un multiplicador de electrones y un colector de electrones (ánodo) en un tubo de vacío. Cuando la luz llega al fotocátodo, éste emite fotoelectrones en el vacío. Estos fotoelectrones son dirigidos, a través de un enfocamiento por voltaje, en dirección al multiplicador de electrones (en nuestro caso es de tipo jaula circular) donde los electrones son multiplicados por el proceso de emisión secundaria. Los electrones multiplicados son recolectados en el ánodo como una señal de salida.

Debido al proceso de multiplicación por emisión secundaria los tubos fotomultiplicadores son únicamente usados en aparatos fotosensitivos, actualmente usados para detectar energía radiante en las regiones de espectro electromagnético que involucre el ultravioleta, visible e infrarrojo cercano.

Nosotros usamos un fotomultiplicador marca Hamamatsu, modelo 1P21, con un rango de detección de 300 a 650 nm, con fotocátodo de Sb-Cs, ventana de borosilicato, con un voltaje máximo entre ánodo y cátodo de 1250 Volts y con una corriente promedio en el ánodo de 0.1 mA.

El tubo fotomultiplicador se montó en un contenedor (housing) marca Pacific Instruments, modelo 3150RF, éste modelo es construido en una pieza sólida cuadrada de 50.8 mm de lado, y 159.14 mm de altura de aluminio y nickel, proporciona un escudo contra campos electrostáticos y alta conductividad.

Para alimentar al tubo fotomultiplicador se uso una fuente marca EG&G Ortec, modelo 478, tipo modulo NIM con las siguientes características: voltaje de salida de 0 a 2000 Volts, corriente de salida 1mA, resolución 1 Volt, voltaje necesario de entrada 12 V dc y 50 mA, 24 V dc y 83 mA.

Un fotodiodo [8] es un dispositivo que hace uso del efecto fotovoltaico, es decir, de un voltaje que cruza la unión P-N de un semiconductor cuando la unión es expuesta a la luz. El término fotodiodo puede ser ampliamente referido, incluso aún para baterías solares, éste usualmente se refiere a sensores que detectan la intensidad de la luz.

El fotodiodo que usamos es tipo PIN marca Hamamatsu, modelo S1722-02, ventana de silica, muy sensible al UV y con un rango de sensibilidad de 190 a 1064 nm. Para alimentarlo se usa una fuente de voltaje de 90 volts (construida con 10 pilas de 9 volts cada una).

#### 4.2.6 Adquisición de datos.

La tarjeta de adquisición [9] es marca Advantech Co., Ltd., modelo PCL-812 de alta velocidad, multifunción, para IBM PC, XT, AT, y computadoras compatibles.

La razón máxima de muestreo A/D es de 30 KHz en modo DMA, con rangos analógicos de entrada bipolar de: +/-1V, +/-2V, +/-5V, +/-10V, tiene 16 entradas-sencillas analógicas. La tarjeta esta integrada en una PC 486 a 40 MHz. El software usado es el Unkelscope para PCLabCards Advantech, copyright 1984 M.I.T., 1985, 1987.

#### 4.2.7 Microceldas.

Normalmente las muestras biológicas que se obtienen son de concentraciones muy pequeñas ( $\mu\text{M}$ ,  $\text{nM}$  etc.), por lo que necesitamos un contenedor muy pequeño.

Conseguimos microceldas con capacidad de 210  $\mu\text{l}$  y 825  $\mu\text{l}$ , marca American Instrument Company, modelo J4-8114 y J4-8137, de cuarzo (que evita absorción de luz en el UV) y trayectoria óptica de 3 mm y 5mm respectivamente, en el área de bioquímica, biofísica, y fisiología celular del departamento de Ciencias de la Salud. Así como diversos reactivos, micropipetas, microscopio, puntas, etc.

Para fijar la celda en posición única, evitando errores de enfocamiento de la luz emitida por la muestra, la celda se monto sobre una pieza circular (para poder girarla) con un cuadro (cuñero) del mismo tamaño que la celda, para poder quitarla y colocarla en el mismo lugar, sin perder la posición de alineamiento. Esta pieza se colocó sobre una montura comercial (Newport) con movimiento XYZ.

Finalmente cabria mencionar que empleamos dos lentes convergentes, dos espejos especiales para UV, dos espejos para luz visible y diversas monturas, para el arreglo de enfocamiento (ver la fig. 1, trayectoria del espejo a la entrada del monocromador).

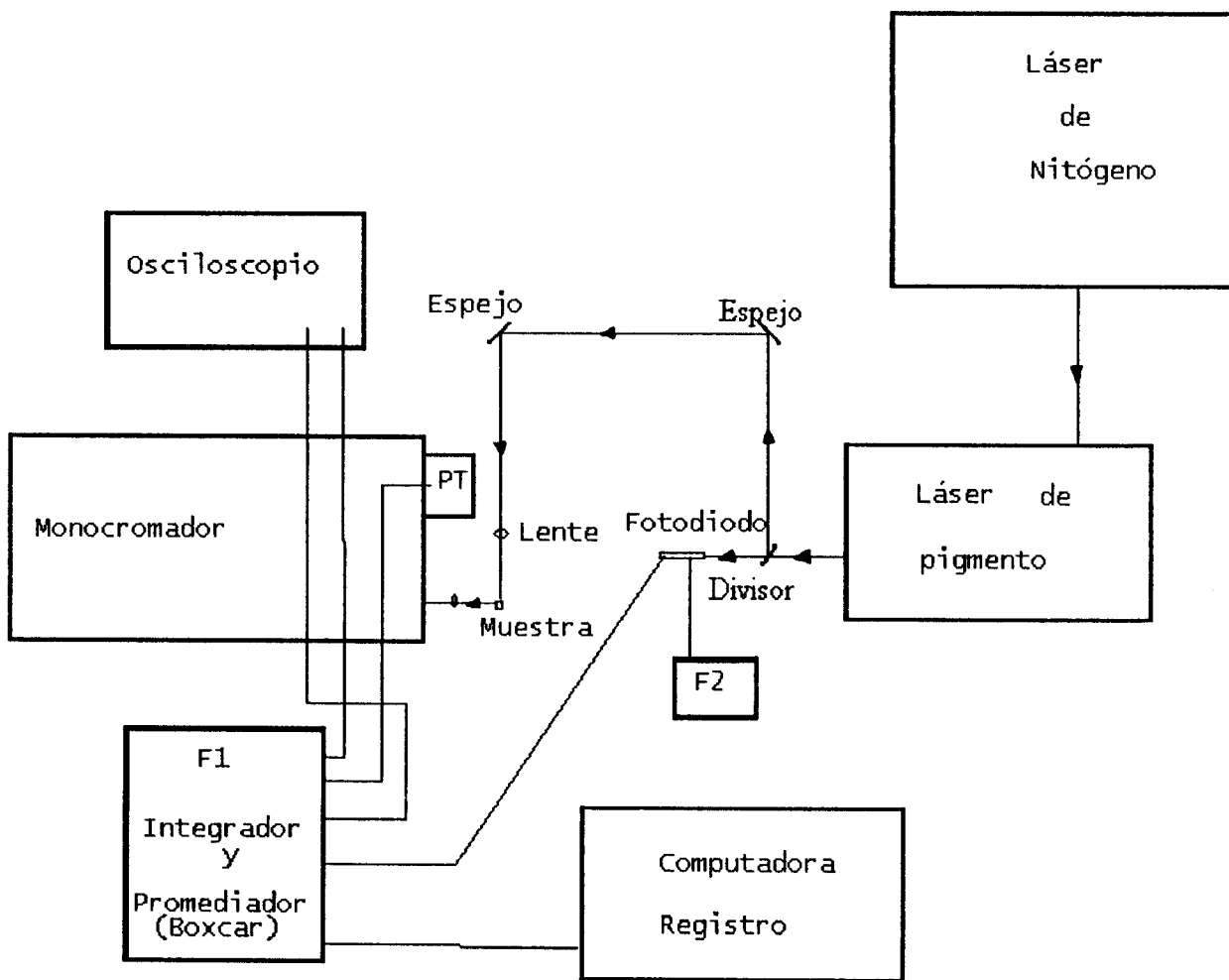
#### 4.3 Funcionamiento del sistema.

Se trabajó esencialmente con tres distintos arreglos. En el primero, mostrado en la fig. 1, se utilizó la luz láser UV (337.1 nm) para excitar la muestra. En éste arreglo el haz emitido por el láser de nitrógeno se divide en dos partes, una parte de la energía igual a 0.27 mJ, se dirige directamente al láser de pigmento (como bombeo) el cual genera un haz de  $\lambda=454$  nm (Cumarina 460) hacia el fotodiodo. En este elemento se produce una transducción de energía lumínica (fotones) en energía eléctrica (electrones). La señal eléctrica se conecta al boxcar para disparar (trigger) el inicio de la detección de la señal generada en el fotomultiplicador (por la otra parte del haz). La otra parte del haz de energía igual a 0.05 mJ se dirige a un espejo (UV) para enfocarse sobre la muestra. La luz reemitida por la muestra pasa al monocromador e incide en el fotomultiplicador, otra vez se produce una transducción de energía, la señal eléctrica resultante entra al boxcar (para su procesamiento) y finalmente se adquiere en la computadora como espectro (con tarjeta y software).

En el segundo arreglo, mostrado en la figura 2, se necesitaba del uso de luz láser en el visible (450 nm) para excitar la muestra. En éste arreglo el haz del láser de nitrógeno se dirige directamente (como bombeo) al láser de pigmento, éste emite en  $\lambda=454$  nm usando un pigmento comercial llamado Cumarina 460. El haz de salida se divide en dos partes iguales de 16  $\mu\text{J}$  de energía aproximadamente, una parte se dirige al fotodiodo y la otra parte a la muestra (con un espejo) como en el caso del primer arreglo, repitiéndose el

proceso de detección. La energía se midió con un medidor de potencia-energía, marca Melles Griot, modelo 13PEM001.

En el tercer arreglo la luz láser de 337.1 nm, se usó tanto para excitar la muestra, como para disparar el procesamiento de la señal. Una parte de la sección transversal del haz se dirige hacia la muestra (aproximadamente el 80 %) y la otra parte se dirige al fotodiodo. Este arreglo fue muy usado debido a que reduce la energía a la que trabajamos el láser de nitrógeno (no tenemos que excitar el láser de pigmento), ya que solo necesitamos 50  $\mu$ J para excitar la muestra, y esto reduce el ruido eléctrico que genera problemas en la tarjeta de adquisición (sección 5.5).



**Fig. 2** Arreglo experimental para el caso de longitud de onda de excitación  $\lambda=450$  nm. En este caso la misma longitud de onda excita la molécula e incide en el fotodiodo, después de ser dividido el haz de salida del láser de pigmento.

Por último describimos tres características del sistema de enfoque. La primera se refiere al enfocamiento (diámetro mínimo, cintura del haz) de la luz incidente sobre la

muestra. Un calculo de la cintura del haz (beam waist) ya se hizo para el láser de nitrógeno como fuente de excitación [4], nosotros tenemos las mismas condiciones (distancia focal 7.5 cm,  $\lambda=337.1$  nm y la cintura del haz  $w_{01}=0.5$  cm), resultando en  $89.4 \mu\text{m}$

Ya que tenemos el enfocamiento quisiéramos muy poca expansión del haz sobre la muestra (trayectoria óptica, sección 1.3.3), para que la región de excitación (de moléculas o células) sea homogénea. Una medida para cuantificar esto es a través del rango de Rayleigh [10], el cual se define como la distancia a la cual el haz se ha expandido la raíz cuadrada de dos por la cintura del haz, después de la cintura del haz. En nuestro caso, con un calculo sencillo que involucra la divergencia del haz del láser de  $\text{N}_2$  (sección 3.2.1), encontramos que el rango de Rayleigh es del orden de 5 mm, si sabemos que nuestra celda mide 3 mm de trayectoria óptica (sección 3.2.7) entonces estamos seguros de una excitación homogénea.

La última consideración se refiere al arreglo de enfoque para la luz emitida por la muestra hacia la rendija del monocromador (ver fig.3). Para capturar la mayor cantidad de luz emitida por la muestra, la celda debería colocarse exactamente en el lugar de la rendija del monocromador. Esto es físicamente imposible, sin embargo, se usó una lente convergente de distancia focal de 25.4 mm, colocada a una distancia de 50.8 mm de la entrada de la rendija, a ésta misma distancia (en la misma dirección, pero sentido contrario) pasa el haz que excita la muestra (ahí se produce la emisión de luz por la muestra, línea de fluorescencia). Con este arreglo la imagen formada en la rendija es igual a la línea de fluorescencia de la muestra, figura 3, ya que con éste arreglo se logra una magnificación igual a la unidad (es decir, la imagen formada es igual al objeto real), y además se produce aberración mínima [11].

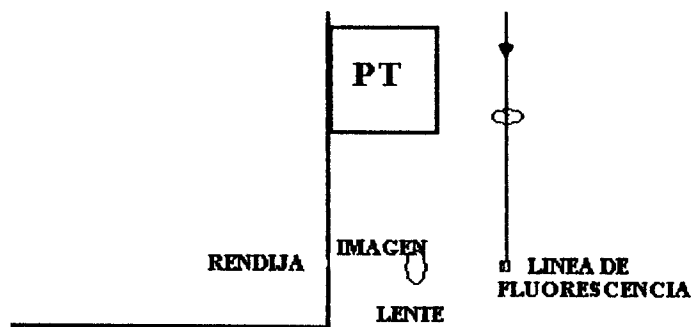


Fig. 3 Arreglo usado para el enfocamiento de la luz emitida por la muestra.

Vale la pena mencionar que debido al arreglo espacial de los componentes del sistema de espectroscopia, únicamente  $200 \mu\text{m}$  de los 3 mm (de largo) de la línea de fluorescencia entran en el monocromador, es decir, solo el 6.6 % de la señal total, fig. 4.

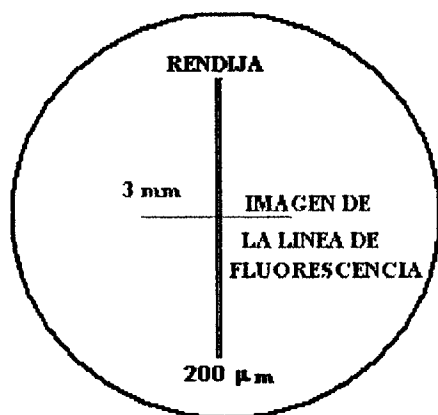


Fig. 4 Imagen de la línea de fluorescencia formada en la entrada de la rendija del monocromador.

#### 4.4 Preparación de muestras.

Las muestras de sangre se obtuvieron de individuos voluntarios aparentemente sanos, se extraen 3 ml de sangre, a través de venipuntura habitual, con jeringa previamente heparinizada (con 0.3 ml de heparina). Las células mononucleares de sangre periférica fueron separadas de las otras células sanguíneas por la técnica de centrifugación con gradiente de densidad. En nuestro caso empleamos como gradiente de densidad ficoll (densidad 1.077 gr/ml, osmolaridad isotónica) para humano (microlab), centrifugamos a 3000 r.p.m. durante 30 min. Después de centrifugar se forman las siguientes capas de arriba hacia abajo del tubo: plasma, mononucleares (monocitos y linfocitos), gradiente de densidad, basófilos, neutrófilos y eritrocitos junto con los eosinófilos. Con una pipeta Pasteur se extrae completa la segunda capa, y se coloca en otro tubo limpio, se le agrega solución salina (Na 150 mM, hepes 10 mM, ajustada a pH= 7.4 con hidróxido de sodio) y se centrifuga durante 10 min. a 3000 r.p.m., para lavar las células. Finalmente queda una capa compacta de células mononucleares formada en el fondo del tubo. Se tira la solución salina y se agrega la cantidad necesaria de solución fisiológica, según el diseño del experimento (ya que esta cantidad produce en principio la concentración celular), y se resuspenden las células (con pipeta Pasteur) con mucho cuidado para evitar dañarlas.

Entonces, las células se encuentran en solución fisiológica, cuando se obtiene el espectro de fluorescencia, que contiene: NaCl 160 mM, KCl 4.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Heps 5 mM, pH=7.4 ajustado con hidróxido de sodio. Esta solución intenta reproducir la osmolaridad del plasma sanguíneo, para evitar que las células sufran cambios osmóticos bruscos. Por lo tanto, fue necesario obtener espectros de fluorescencia de la solución fisiológica sola (también obtuvimos espectros de solución PBS sola), encontrando que la fluorescencia de la solución depende de la intensidad de la luz de excitación (láser de nitrógeno, sección 5.4). Por lo que procuramos obtener los espectros de fluorescencia con valores de energía alrededor de 50 μJ. Si consideramos un haz de sección transversal circular con diámetro igual a 89.4 μm, entonces la densidad de energía es igual a 0.00196 J/mm<sup>2</sup>, es decir solo tenemos bioestimulación (sección 3.5, tabla 1).



De la muestra obtenida, se extraen 100  $\mu$ l y se colocan en la microcelda. Antes y después de obtener el espectro de fluorescencia se mide la viabilidad de las células, por exclusión de azul de tripano, en un microscopio de contraste de fase, corroborando que las células estén vivas en un porcentaje de más de 98 %. Cuando fue necesario, el conteo celular se hizo con una cámara Neubauer [12].

Mediante la técnica descrita anteriormente, aplicada a la sangre extraída a individuos, a través de venipuntura, se obtienen células linfocitos T y B, y monocitos. Sabemos que del 60 al 80 % son linfocitos, del 20 al 40 % son monocitos y del 1 a 4 % son células polimorfonucleares. Aproximadamente de 1ml de sangre, se obtienen entre 1 y 2 millones de células mononucleares [13].

El obtener un sólo tipo celular es un proceso complicado y tardado [14], por lo que decidimos, en éste nivel, trabajar con las tres clases de células, ésta asunción es usada en algunos trabajos sobre fluorescencia de leucocitos [15].

También obtuvimos muestras con células mononucleares de rata de la cepa wistar. La técnica es similar a la anteriormente descrita para células de humano. Primero se anestesia el animal (joven o adulto) con éter, se obtiene por punción cardiaca entre 2 y 4 ml de sangre. Siempre debe evitarse producir burbujas en la sangre o intentar extraer la sangre de otro lugar que no sea el corazón (o alguna arteria principal), ya que esto produce hemólisis.

A continuación en un tubo limpio se coloca el gradiente de densidad, en nuestro caso usamos dos tipos nycodenz [16] para células animales (densidad 2.1 gr/ml y osmolaridad de 265 mOsmol) y ficoll para humano (densidad 1.077 gr/ml, osmolaridad isotónica) se agrega la sangre con cuidado de tal forma que no penetre el gradiente. Se centrifuga 15 min. a 2500 r.p.m. Nosotros probamos diversas alternativas, por ejemplo usamos dos tipos de gradiente, centrifugamos entre 15 a 20 min. Los mejores resultados los obtuvimos con gradiente ficoll y 18 min. de centrifugación a 2500 r.p.m.. También se lavaban las células como en el caso anterior, con solución salina.

#### **Referencias del capítulo 4.**

- 1) C.L. Bashford, D.A: Harris, "Spectrophotometry & Spectrofluorimetry", IRL Press Limited, 1987.
- 2) Stanford research systems, manual de operación del contador de fotones.
- 3) M. Fernández G, et al, Rev. Mex. Fís., **38**, 4 (1992).
- 4) M. Fernández G, et al, Rev. Mex. Fís., **36**, 1 (1990).
- 5) Pacific instruments, manual de operación del monocromador.
- 6) Stanford research systems, manual de operación del boxcar.
- 7) Hamamatsu, catálogo de información de tubos fotomultiplicadores, Oct/90.
- 8) Hamamatsu, catálogo de información de fotodiodos, Dec/87.
- 9) Manual de usuario, PC-LabCard, Laboratorio e ingeniería para PC/XT/AT, Mayo de 1990.
- 10) M. Grandolfo, A. Rindi, D.H. Sliney, "Light, lasers, and synchrotron radiation", Series NATO ASI, Plenum Press, 1991.
- 11) G. S. Landsberg, "Optica", Mir Moscú, 1983 (cap. 12).
- 12) Maxwell M. Wintrobe, "Hematología Clínica", Inter-Médica, 1979.
- 13) A. J. Ulmer y H.D. Flad, "Journal of Immunological Methods", **30** (1979) 1-10.
- 14) C. Gutiérrez, et al., Journal of Immunological Methods, **20** (1979) 57-63.
- 15) M. Monici, et al., "Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **30** (1995) 29-37
- 16) Panfleto comercial, "Isolation of blood cells", Nycomed Pharma.

## Capítulo 5 Resultados experimentales.

### 5.1 Introducción.

Durante el desarrollo del sistema de espectroscopia de fluorescencia láser, fuimos realizando espectros en diferentes muestras, éstos los hacíamos sin necesidad de tener todo el sistema completo (de hecho todavía le falta un compresor pequeño al láser de nitrógeno).

Empezamos trabajando con cristales de halogenuros alcalinos dopados con impurezas como  $\text{Eu}^{++}$ ,  $\text{Eu}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$  juntos, crecidos y caracterizados [1] en el área de Fenómenos Ópticos y Transporte de la Materia. Estos cristales, dependiendo de la concentración de las impurezas, pueden ser muy fluorescentes, con algunos de ellos hicimos espectros muy bien definidos y reproducibles. También hicimos espectros de pigmentos orgánicos como el stilbene y la rodamina 460 [2].

Antes de que nuestro sistema de espectroscopia quedara terminado, realizamos algunos experimentos en el Laboratorio de Óptica Cuántica del área de Fenómenos Ópticos y Transporte de la Materia. Obtuvimos espectros de fluorescencia del NADH a diferentes concentraciones en un sistema como el mostrado en la figura 1.

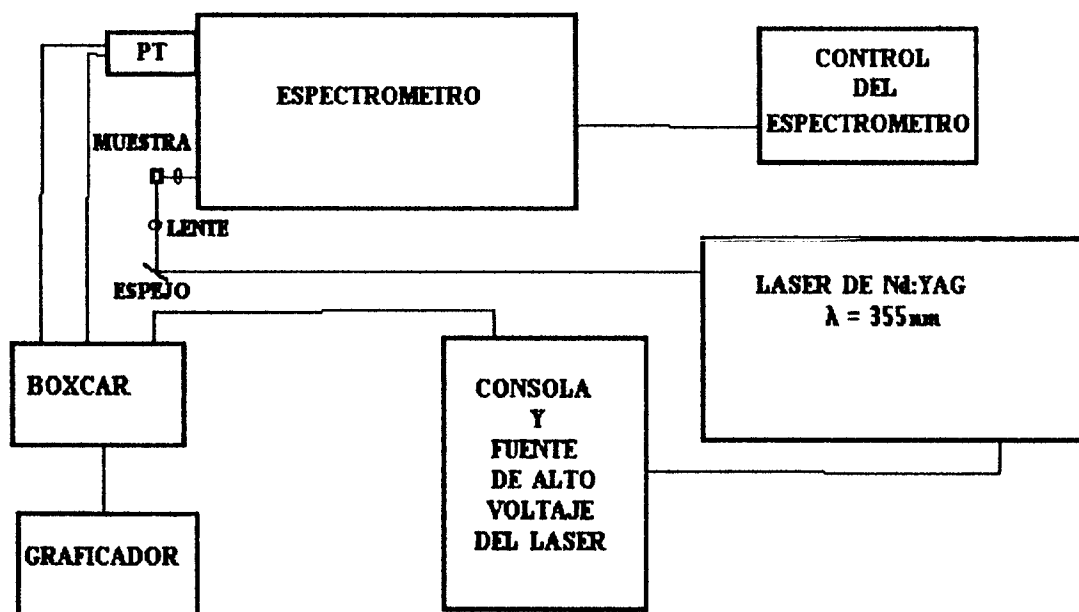


Figura 1. Sistema de espectroscopia láser con el que trabajamos en el laboratorio de Óptica Cuántica. PT representa el fotomultiplicador, en el cuadro del boxcar esta integrada la fuente de voltaje del fotomultiplicador.

En éste sistema la fuente de luz es un láser de Nd: YAG (YAG como abreviatura del inglés Yttrium-aluminum-garnet; granate de aluminio e itrio, dopado con neodimio), éste láser emite normalmente a una longitud de onda de 1064 nm (IR) pero a través de conversiones no lineales de frecuencia también emite a 532 nm, 355nm y 247 nm. El láser de Nd:YAG es de emisión pulsada, tiene un sistema electrónico mediante el cual genera un pulso eléctrico de salida (cercano a 10 volts), éste pulso eléctrico se uso para iniciar

(trigger) el procesamiento de la señal de fluorescencia en el boxcar. El espectrómetro (monocromador) tiene una resolución de 0.01 nm.

Nosotros trabajamos con  $\lambda = 355$  nm, con frecuencia de pulsos de 10 Hz para excitar las moléculas de NADH en solución acuosa a pH=7.2 y temperatura ambiente. Obteniéndose espectros bien definidos y acordes con los reportados.

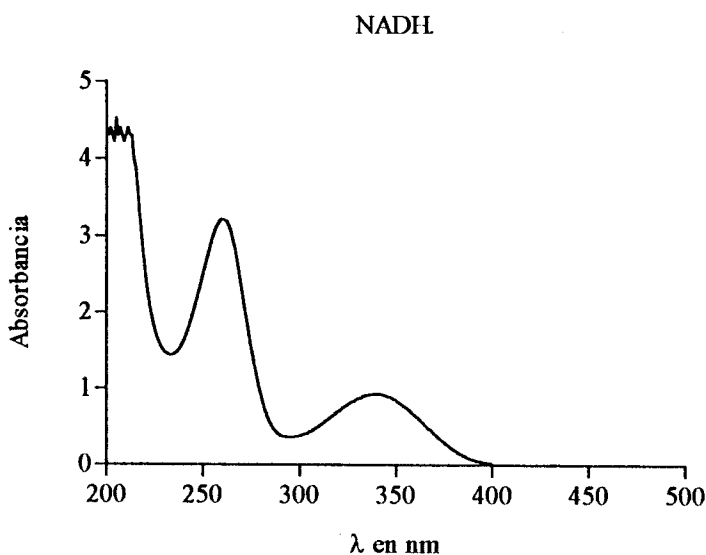
En éste capítulo presentamos los resultados obtenidos con nuestro sistema de espectroscopia láser. Iniciamos con el análisis de espectros de absorción y fluorescencia de moléculas de NADH y FAD. Después obtuvimos espectros de absorción y fluorescencia de células de rata. Para finalmente presentar el espectro de fluorescencia de leucocitos mononucleares de humano en diversas circunstancias para su caracterización.

## 5.2 NADH Y FAD.

Por razones previamente discutidas (sección 3.3) empezamos nuestro trabajo con el estudio de las propiedades espectroscópicas de moléculas de NADH y FAD.

Sabemos que el pH intracelular, fundándose en ocasiones en valoraciones indirectas, suele variar entre 4.5 y 7.4 según las células, con promedio de 7.2. Por lo que a las soluciones acuosas preparadas de moléculas de los dos dinucleótidos se les ajusto el pH a 7.2, antes de obtener sus espectros de absorción y fluorescencia.

De moléculas de NADH obtuvimos los espectros de absorción y de fluorescencia. El espectro de absorción aparece en la gráfica 1, fue adquirido con un espectrómetro comercial Cary-5E, UV-Vis-cercano IR en el área de Química inorgánica, departamento de Química, la referencia fue agua desionizada, y a un barrido de 600 nm/min.

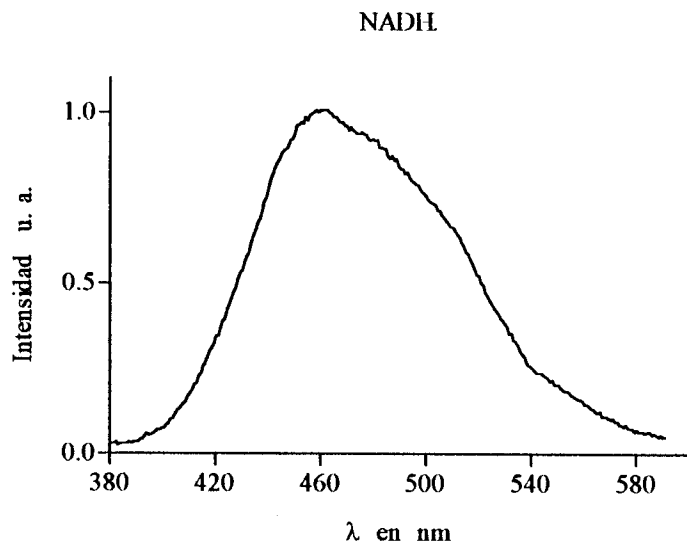


**Gráfica 1.** Espectro de absorción de la molécula de NADH a pH=7.2,  $1 \times 10^{-4}$  M y temperatura ambiente.

El espectro se obtuvo en solución acuosa a pH=7.2, temperatura ambiente, y concentración de  $1.4 \times 10^{-4}$  M. El espectro obtenido es igual al comúnmente reportado [3]. Para obtener éste espectro empezamos con concentraciones altas  $10^{-3}$ , con un cálculo simple  $D=6.27$  e  $I_t=0.5 \times 10^{-4}$  %. A estas concentraciones no cumple con los requerimientos para medidas finas, (sección 2.4) y es de esperarse que no se defina claramente, la primera

banda de absorción. Fuimos diluyendo hasta observar el espectro completo a una concentración de  $1.4 \times 10^{-4}$  M (en este caso  $D = 0.87$  e  $I_t = 13.27\%$ ). El espectro tiene dos máximos de absorción en 260 y 340 nm.

El espectro de fluorescencia fue obtenido con nuestro sistema de espectroscopia láser, gráfica 2. También éste espectro coincide con los reportados y con los realizados en el sistema con el láser de Nd :YAG.



**Gráfica 2.** Espectro de Fluorescencia de moléculas de NADH a pH=7.2, concentración a  $10^{-4}$  M y temperatura ambiente.

El espectro de fluorescencia es una representación de la distribución de intensidad de la radiación electromagnética, emitida por una muestra de sustancia, en función de la longitud de onda (sección 1.1). En éste trabajo en el eje de las abscisas siempre tendrá la longitud de onda en nm, y en el eje de las ordenadas la intensidad de la fluorescencia en unidades arbitrarias u. a. (sección 1.3.3).

Normalmente, para ambos espectros, la preparación en solución acuosa se realizó con una combinación de amortiguadores Trizma y Mes como indica Sigma Chemical Company [4], el NADH adquirido tiene una pureza de aproximadamente 98 %.

El espectro de fluorescencia se obtuvo con longitud de onda de excitación de 337.1 nm, la frecuencia de repetición fue de 4 Hz (en el láser de nitrógeno).

La velocidad de barrido en el monocromador fue de 20 nm/min, con 200  $\mu$ m en la apertura de la rendija, tanto de entrada como de salida (las dos se modifican en la misma magnitud con un solo control).

La fuente de alto voltaje que alimenta el fotomultiplicador se ajustó a 950 volts.

El integrador-promediador (boxcar) se trabajó a 15  $\mu$ s de ventana y 300 muestras, obviamente en el selector de disparo (trigger) externo.

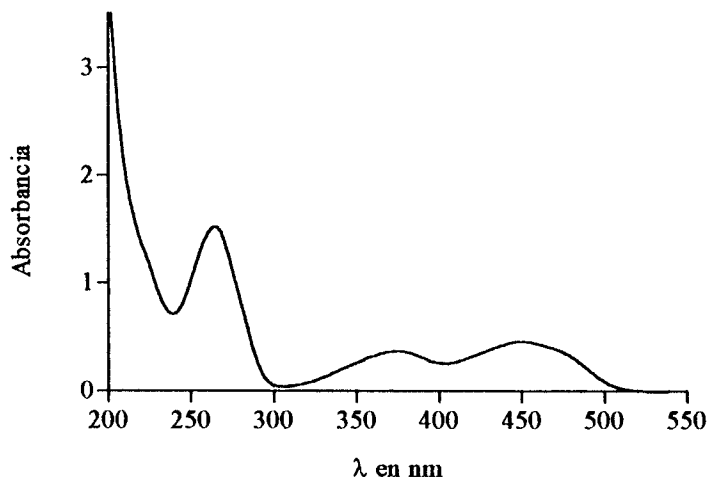
La adquisición se realizó a 1 Hz de muestreo.

El espectro tiene una sola banda de emisión con máximo alrededor de 460 nm.

El espectro de fluorescencia fue fácilmente obtenido, con nuestro sistema, ya que la señal es intensa. El NADH es un fluoróforo muy conocido y empleado para el análisis de procesos enzimáticos.

De moléculas de FAD obtuvimos los espectros de absorción y de fluorescencia. El de absorción se muestra en la gráfica 3, fue tomado bajo las mismas condiciones y con el mismo equipo que el espectro de absorción del NADH.

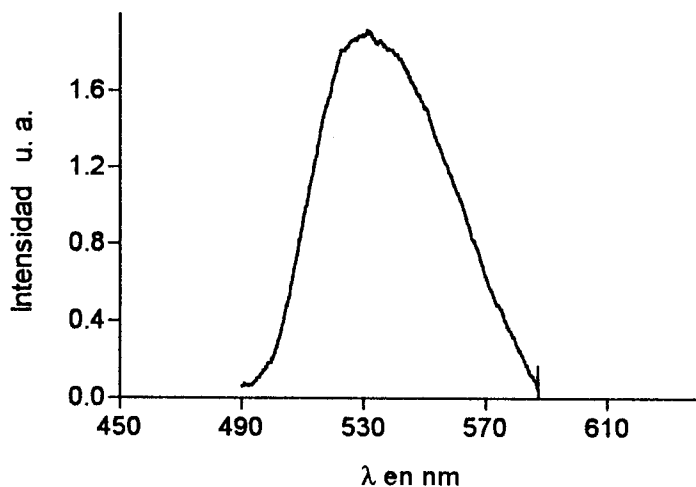
FAD.



**Gráfica 3.** Espectro de absorción de la molécula de FAD a pH=7.2, concentración de  $10^{-4}$  M y temperatura ambiente.

El espectro se obtuvo en solución acuosa a pH=7.2, temperatura ambiente y concentración de  $10^{-4}$  M. Tiene tres máximos de absorción en 265, 375, y 450 nm. El espectro de fluorescencia fue adquirido en nuestro sistema, gráfica 4. Se obtuvo bajo las mismas condiciones y parámetros que el espectro de fluorescencia del NADH.

FAD.

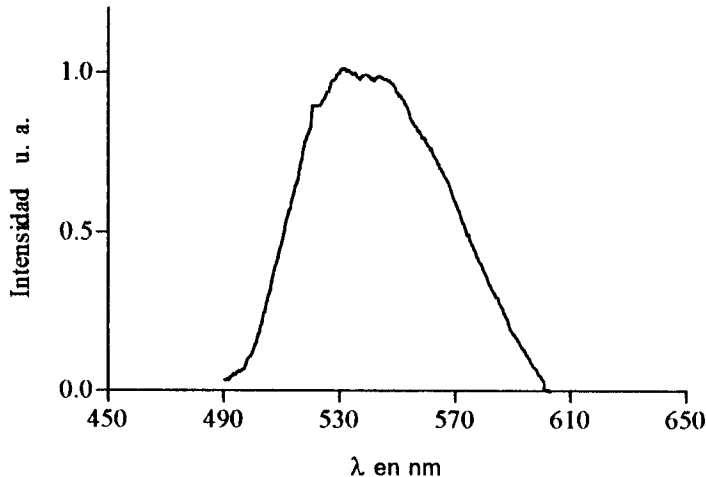


**Gráfica 4.** Espectro de fluorescencia de la molécula de FAD a pH=7.2, concentración de  $10^{-4}$  y temperatura ambiente.

Para ajustar el pH se usaron, como en el caso del NADH, la combinación de dos amortiguadores. La pureza reportada por Sigma es de 96 %. El máximo está en 530 nm.

También obtuvimos un espectro del FAD excitando con longitud de onda  $\lambda=454$  nm, ya que como podemos apreciar en la gráfica 3, hay una banda de absorción conteniendo ésta longitud de onda. El espectro se muestra en la gráfica 5.

FAD.



**Gráfica 5.** Espectro de fluorescencia de la molécula de FAD, pH=7.2, concentración  $10^{-4}$  M y temperatura ambiente.

Los parámetros son los mismos que en el caso del espectro del NADH, solo que la rendija del monocromador se abrió a  $300 \mu\text{m}$ . El máximo está en 530 nm.

Los resultados obtenidos en éstos dos espectros de fluorescencia confirman, por un lado, las propiedades conocidas de las moléculas fluorescentes (sección 1.3.3), y por otro lado, el hecho de poder sintonizar nuestro sistema a dos diferentes longitudes de onda (337.1 nm y 454 nm) de excitación.

### **5.3 Espectroscopia de fluorescencia láser en leucocitos mononucleares in vivo de rata.**

La espectroscopia de fluorescencia es una técnica ampliamente usada en biología y medicina, ya que proporciona información útil acerca de substratos biológicos, tanto de sus propiedades físico-químicas como de la cantidad de sustrato presente.

Esencialmente podemos emplear ésta técnica de dos formas. La primera a través de fluoróforos exógenos, como marcadores biológicos que se acumulan de manera preferente en ciertas células. La segunda, y más recientemente usada, consiste en usar las propiedades fotofísicas de biomoléculas y bioestructuras. Varias moléculas biológicas exhiben fluorescencia, cuando se irradian con luz a una adecuada intensidad y longitud de onda (fluorescencia natural o autofluorescencia), que puede cubrir el rango espectral entre el cercano UV y el visible, aún en ausencia de fluoróforos exógenos.

Los fluoróforos de éste tipo, ya mencionados (sección 1.4 y 3.3), se pueden clasificar en: 1) biomoléculas responsables del arreglo estructural de las células y tejidos como la colágena, la elástina y las proteínas debido a la presencia de residuos aminoácidos (triptófano, tirosina y fenilalanina), 2) biomoléculas involucradas en procesos metabólicos y funcionales tales como el NADH, FAD, y flavinas.

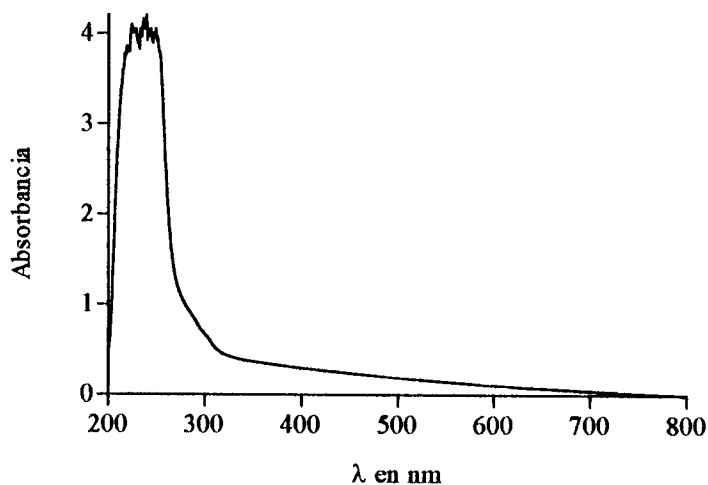
Un cambio en el estado del tejido, que puede ocurrir durante los procesos fisiológicos o asociado con condiciones patológicas, pueden modificar la concentración y distribución de los fluoróforos e inclusive las propiedades fisico-químicas de sus alrededores.

En nuestro caso siempre generamos autofluorescencia con láser. Este procedimiento tiene la ventaja de no introducir moléculas extrañas a la célula, se conoce en inglés por LIAFS (Laser-induced autofluorescence spectroscopy) [5].

El motivo de emplear leucocitos de rata en nuestros experimentos, se debió principalmente a que deseábamos demostrar que podíamos detectar la señal de fluorescencia con nuestro equipo en materia viva, así como para empezar a adquirir experiencia en todo el proceso que implica realizar espectroscopia en células (desde la obtención de la muestra hasta la realización del espectro de fluorescencia). No podemos justificar en principio razones biológicas para emplear los leucocitos de éste mamífero.

A continuación mostramos el espectro de absorción de células mononucleares de rata, a una concentración celular óptima, adquirido en el mismo espectrofotómetro que el empleado para las moléculas de NADH y FAD.

Mononucleares de rata.



**Gráfica 6.** Espectro de absorción de células mononucleares de rata en sol. fisiológica a pH=7.4 y temperatura ambiente.

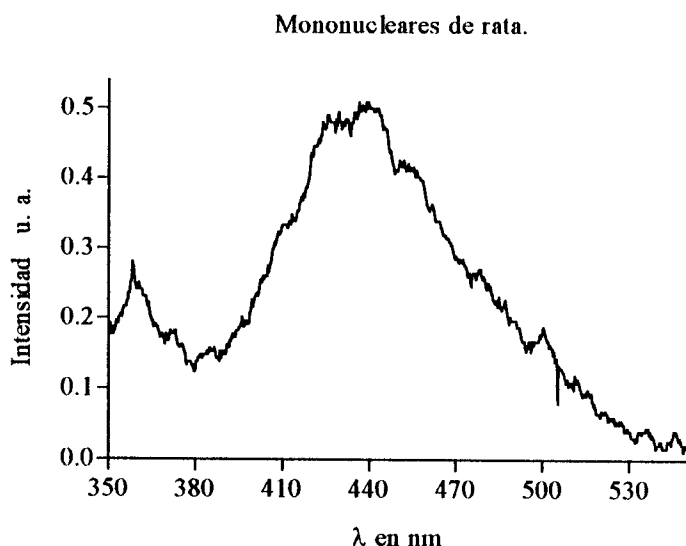
Aquí podemos apreciar un máximo en 240 nm. Hay que notar que el valor de la absorbancia es significativo a la longitud de onda que normalmente usamos para la obtención de los espectros de fluorescencia 337.1 nm, su valor es de 0.4. Pero también tenemos valores importantes a longitud de onda de 375 nm (0.3) y 450 nm (0.2).

A  $\lambda = 337.1$  nm podemos monitorear el NADH, y a  $\lambda = 375$  o 450 nm podemos monitorear muy selectivamente el FAD, debido a que si excitamos con  $\lambda = 450$  nm únicamente, en principio, las moléculas de FAD absorberían ésta radiación (ver gráfica 3).



En este trabajo empleamos de manera preferente  $\lambda = 337.1$  nm como fuente de excitación celular en los espectros de fluorescencia obtenidos de células sanguíneas mononucleares, es decir intentamos monitorear el NADH.

Uno de los primeros espectros de fluorescencia de células mononucleares de rata se muestra en la gráfica 7. Cabe mencionar que normalmente se observaban las células al microscopio de contraste de fase, en la cámara de Neubauer con azul de tripano, para constatar la viabilidad celular (del orden de 98 %).



**Gráfica 7.** Espectro de fluorescencia láser de células mononucleares,  $\lambda_{exc}=337.1$  nm, en solución fisiológica, pH=7.4 y temperatura ambiente.

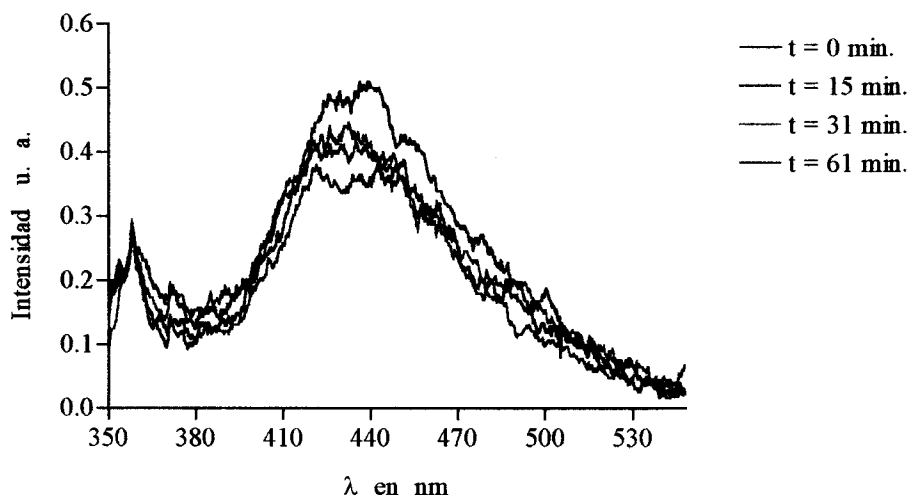
El espectro fue obtenido con un barrido del monocromador de 20 nm/min y la rendija estaba abierta a 300  $\mu$ m. El voltaje de alimentación del fotomultiplicador fue de 1000 volts. El boxcar se ajustó a 50 mV de sensibilidad, 15  $\mu$ s de ventana y 100 muestras, y la adquisición se hizo a 1 Hz.

En el espectro se pueden apreciar dos máximos en 358 nm y 438 nm, de diferente intensidad y ancho medio espectral. El ancho medio espectral del primer pico es de 6 nm y del segundo de 56 nm aproximadamente.

Del primer pico no sabemos que molécula (o moléculas) es la responsable (quizá proteínas conteniendo triptófano). El segundo pico o banda de emisión se puede asociar a la emisión fluorescente del NADH.

El tiempo que tardamos en obtener un espectro es del orden de 20 min, a 10 nm/min de 350 a 550 nm, de 10 min a 20 nm/min de 350 a 550 nm, etc. Como los mononucleares están en solución fisiológica, nos preocupaba que el espectro fuera afectado por la velocidad de sedimentación de las células [6]. Por lo que obtuvimos espectros a diferentes tiempos de la misma muestra, gráfica 8.

### Mononucleares de rata .



**Gráfica 8.** Comparación de los espectros de fluorescencia tomados a diferentes tiempos. En sol. fisiológica pH=7.4

Los espectros fueron tomados a 20 nm/min y 200  $\mu\text{m}$  en el monocromador. Con 1000 volts en el fotomultiplicador. A 50 mV de sensibilidad, 15  $\mu\text{s}$  y 100 muestras en el boxcar, y 1 Hz en la tarjeta de adquisición.

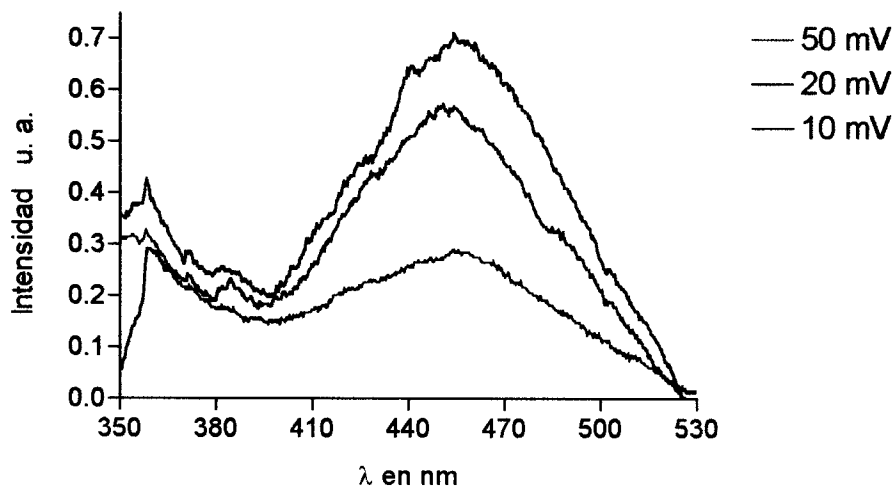
La gráfica muestra como va disminuyendo la señal de fluorescencia en el transcurso del tiempo (las células van sedimentando). En todos los espectros obtenidos posteriormente a éste (siguiente sección) decidimos después de colocar las células (cuando las células se colocan en la microcelda con una micropipeta, el proceso implica una resuspensión) adquirir inmediatamente el espectro, o si la muestra por algún motivo permanece mucho tiempo sin moverse, entonces antes de tomar el espectro resuspendemos las células con una micropipeta.

Esta gráfica obtenida a partir de varios espectros de fluorescencia nos permitió adquirir experiencia en el manejo del sistema trabajando en células.

Para evaluar la sensibilidad de nuestro sistema decidimos obtener espectros a diferentes condiciones de adquisición en la sensibilidad del boxcar, a 10, 20, y 50 milivolts, en la misma muestra. A 20 nm/min, 450  $\mu\text{m}$  en el monocromador, 920 volts en el fotomultiplicador (para evitar lo más posible ruido eléctrico, pero sin perder sensibilidad en el fotomultiplicador). Con 15  $\mu\text{s}$  "gate" y 300 muestras en el boxcar, y a 1 Hz en la adquisición.

En la gráfica 9 se presenta la comparación de tres espectros tomados a diferente sensibilidad.

Mononucleares de rata.

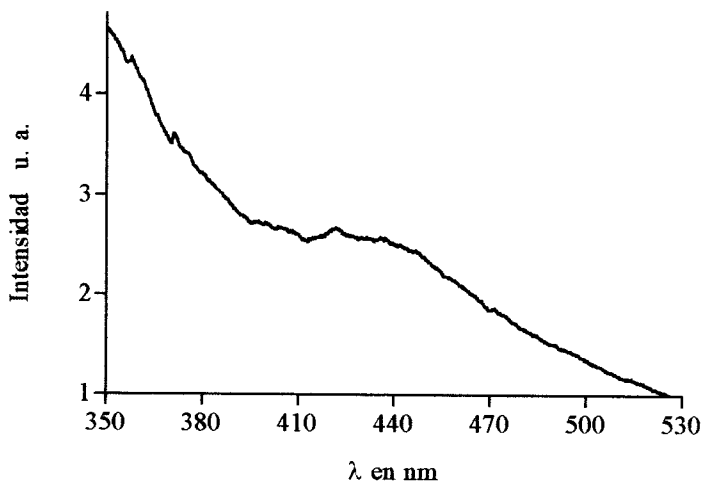


Gráfica 9. Comparación de los espectros de fluorescencia a diferente sensibilidad. En sol. fisiológica pH=7.4

En esta gráfica se pueden apreciar los dos máximos típicos encontrados, el primero en 358.9 nm y el segundo en 453.4 nm (promedio), con anchos de 2.5 nm (promedio) y 57.2 nm (promedio) respectivamente. Es claro que la sensibilidad mejora al disminuir el voltaje en el sistema del integrador-promediador.

Finalmente mostramos, en la gráfica 10 espectros de células mononucleares de rata contaminadas con membranas celulares, lo cual puede ocurrir cuando centrifugamos a valores elevados en la velocidad angular (esto produce el rompimiento celular y por lo tanto contaminación por membranas celulares e inclusive probablemente por moléculas intracelulares).

Mononucleares de rata.

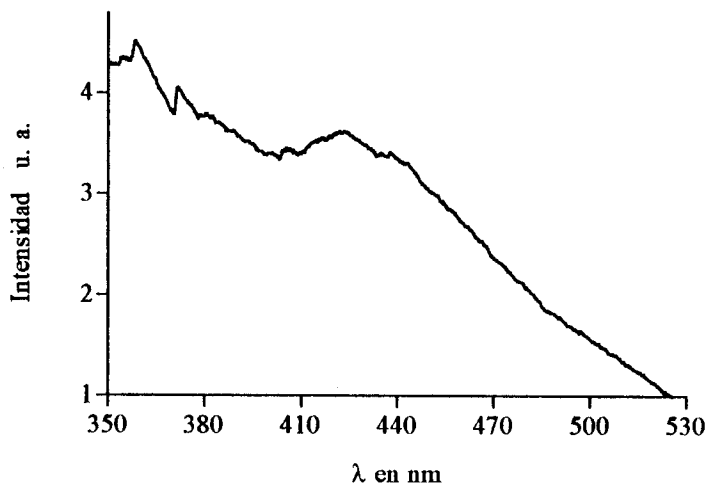


Gráfica 10. Espectro de fluorescencia, con alta contaminación de membranas de las mismas células. Debido al rompimiento celular, en sol. fisiológica a pH=7.4 y temperatura ambiente.

Este espectro se adquirió a 50 nm/min, 250  $\mu\text{m}$  en el monocromador. Al fotomultiplicador a partir de éste espectro ya no se le cambio el voltaje de alimentación (920 Volts). También en el boxcar se dejó fijo el tiempo de ventana (15  $\mu\text{s}$ ) y el número de muestras siempre fue de 300 o 100. Para éste espectro la sensibilidad fue de 20 mV y la adquisición a 0.1 Hz. Se pueden apreciar dos pequeños picos a 358 y 371 nm, y una aparente banda con máximo en 422 nm.

A continuación se abrió la rendija a 300  $\mu\text{m}$  y se adquirió la gráfica 11.

Mononucleares de rata.



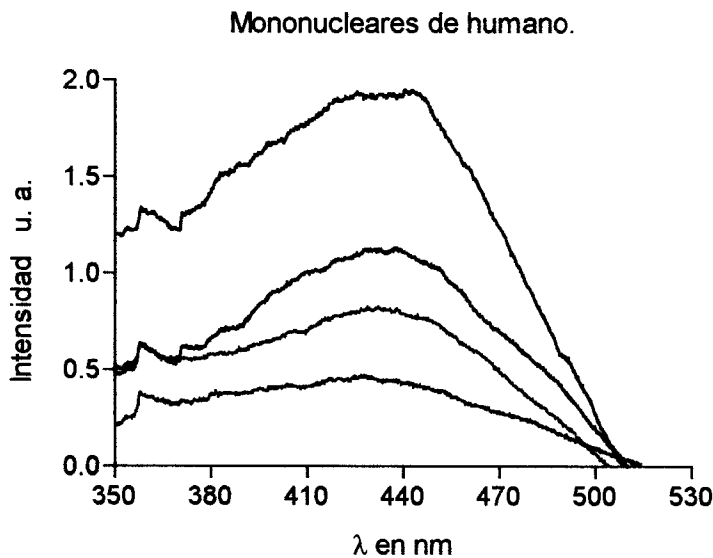
**Gráfica 11.** Espectro de fluorescencia, con alta contaminación de membranas de las mismas células. Debido al rompimiento celular, en sol. fisiológica a pH=7.4 y temperatura ambiente.

En éste espectro también se puede apreciar dos máximos pequeños a 358 y 372 nm y se distingue mejor la banda asociada al NADH con máximo en 423 nm. El pico a 372 nm, aparece apenas perceptible en los espectros anteriormente mostrados, por lo que lo asociamos a moléculas presentes en las membranas celulares.

#### **5.4 Espectroscopia de fluorescencia láser en leucocitos mononucleares in vivo de humano.**

La siguiente gráfica (gráfica 12) muestra un espectro de leucocitos mononucleares de humano en solución fisiológica a pH=7.4, y temperatura ambiente. Adquirido a 50 nm/min y 300  $\mu\text{m}$  en el monocromador, 20 mV de sensibilidad, y a 10 Hz.

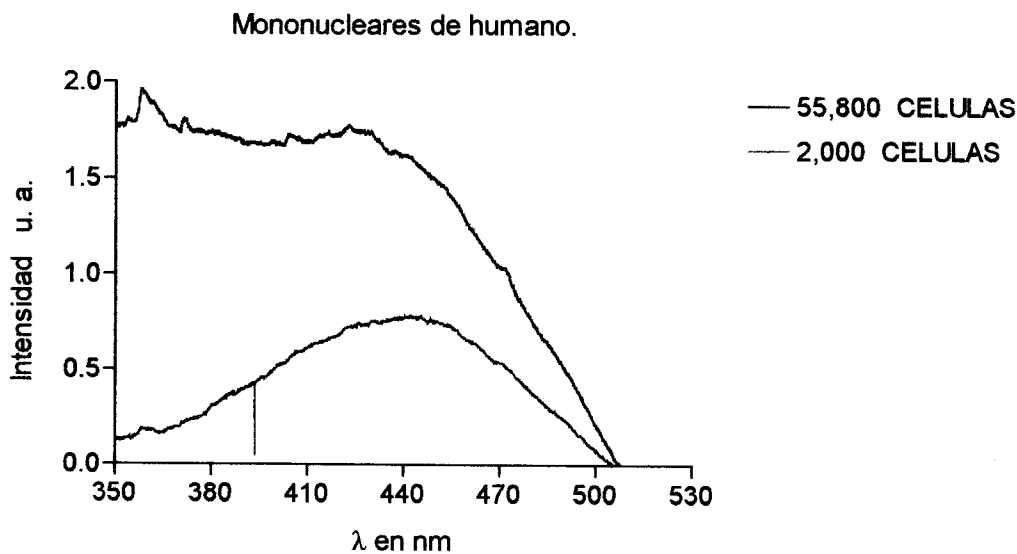
En ésta gráfica se comparan cuatro diferentes espectros tomados a diferentes voltajes de alimentación del láser de nitrógeno [7], es decir, a diferentes energías de excitación de las células. Como se dijo anteriormente el láser de nitrógeno no es comercial, por lo que no tenemos una especificación estricta de la energía, tampoco tenemos medidor de energía en este rango tan pequeño de energías. Sin embargo, en ésta gráfica, todas las energías empleadas son menores a 50  $\mu\text{J}$  (a través de medidas indirectas), estos valores de energía son normalmente empleados cuando se trabaja con tejido celular [5,8].



**Gráfica 12.** Comparación de espectros de fluorescencia a diferentes energías de excitación.

La línea negra corresponde al mayor voltaje de descarga del láser [7] (28 en la carátula de la fuente de voltaje del láser), sigue la línea roja (25 en la carátula), después la verde (20 en la carátula) y al final la azul (15 en la carátula). De manera similar a las células de rata, se pueden apreciar dos máximos, el primer pico tiene su máximo en 358 nm y la banda ancha de emisión la tiene en 433.5 nm (promedio).

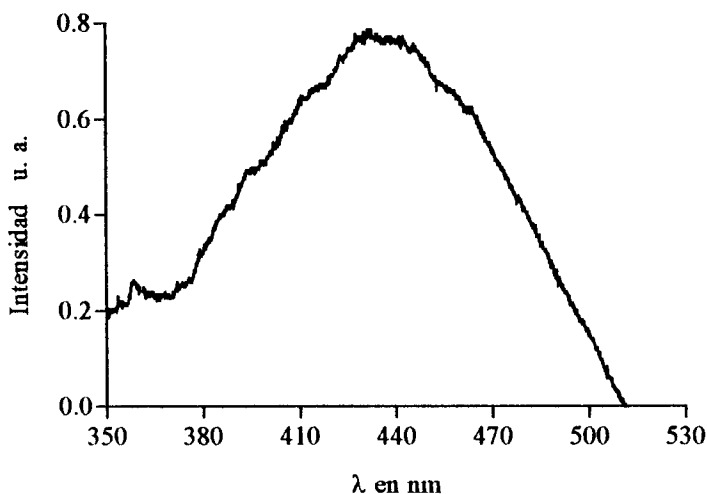
La cantidad de células fue de aproximadamente 21600, en un volumen de 120  $\mu\text{l}$ . La medida o conteo se hizo en una cámara de Neubauer; el error típicamente asociado es del 12 al 20 % en el conteo manual [9], empleando azul de tripano y un microscopio de contraste de fase. Con las células de este donador, realizamos los espectros de la gráfica 13 y 14.



**Gráfica 13.** Diferentes concentraciones celulares, en sol. fisiológica a  $\text{pH}=7.4$  y temperatura ambiente.

En la gráfica 13 se puede apreciar la gran diferencia entre espectros a diferentes concentraciones celulares. El primer pico del espectro a alta concentración, se encuentra en 358.3 nm (ancho de 4 nm) y la banda de emisión asociada al NADH no esta definida (o empieza a definirse). El primer pico del espectro de baja concentración celular se encuentra en 358.9 nm (ancho de 3.5 nm) y la banda ancha de emisión tiene su máximo en 441 nm.

Mononucleares de humano.



**Gráfica 14.** Espectro de fluorescencia típico de células mononucleares (linfocitos y monocitos) de humano a una concentración aparentemente óptima. En sol. fisiológica a pH=7.4 y temperatura ambiente.

El espectro de la gráfica 14 se obtuvo a una concentración celular entre 2,000 y 9,000 células en 120 µl de solución, se formó así la suspensión celular que se colocó en la microcelda de 825 µl de capacidad. El espectro de fluorescencia de mononucleares consta de dos máximos, un pequeño pico con máximo en 358 nm (y ancho de 3 nm) y una banda ancha de emisión con máximo en 434 nm (y ancho de 70 nm aproximadamente).

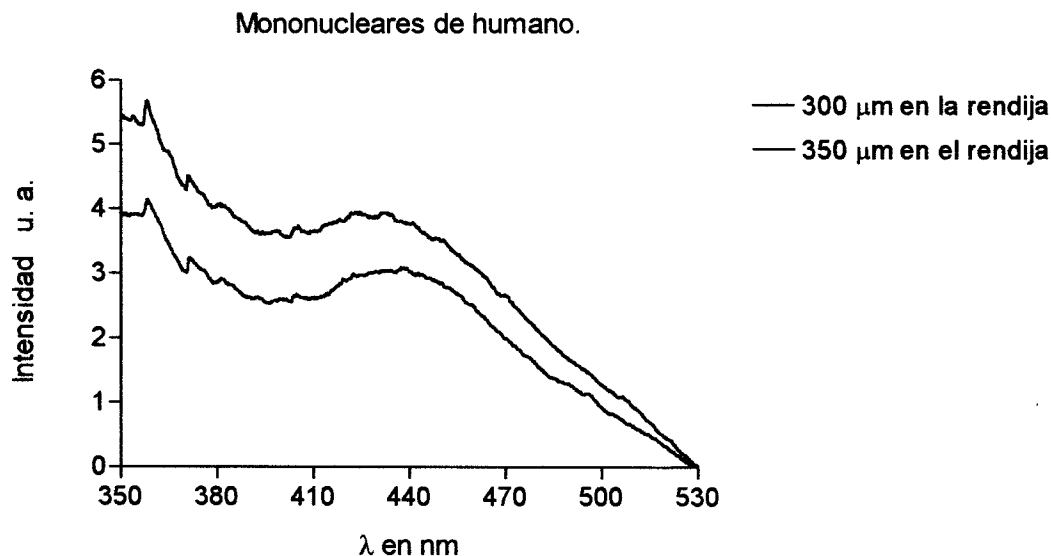
Este rango de concentración celular es el óptimo encontrado para obtener espectros de fluorescencia bien definidos, sin olvidar que debemos tener una preparación adecuada de las muestras.

Se obtuvo a 50 nm/min y 300 µm en el monocromador (las bandas de emisión de fluorescencia del tejido normalmente son anchas por lo que este valor no es inadecuado), a 20 mV de sensibilidad y a 10 Hz en la adquisición.

En ocasiones pueden surgir problemas, aparte de alta concentración celular, cuando la preparación celular no está completamente limpia. Esto produce que haya en la muestra, además de las células mononucleares, gran cantidad de bacterias e inclusive en alguna ocasión tuvimos levaduras.

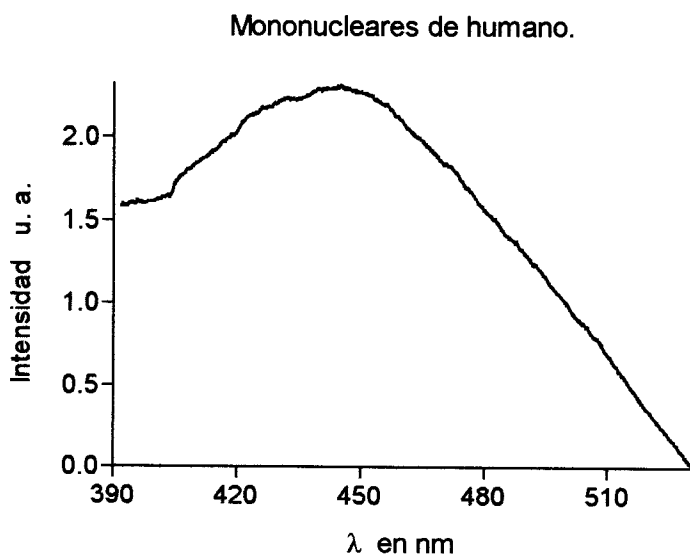
Las posibles causas de la contaminación pueden ser soluciones contaminadas, tubos para centrifugación sucios e inclusive algún reactivo contaminado (como el ficoll, la heparina, etc.).

En la gráfica 15 se muestran dos espectros de células mononucleares altamente contaminadas con bacterias y levaduras.



**Gráfica 15.** Espectros de células contaminadas con bacterias y levaduras. Tomados cambiando la apertura de la rendija del monocromador.

En este espectro se aprecian tres máximos, aparece un segundo pico como en el caso de las células de rata contaminadas con membranas celulares. Los máximos están en 358 nm, 372 nm, 432.2 nm (línea negra) y 437.6 nm (línea gris), los dos primeros están en la misma posición que los de células de rata contaminadas con membranas (ver gráficas 10 y 11). El espectro de la gráfica 16 es solo de la banda ancha, con máximo en 437.6 nm, asociado a la emisión de moléculas de NADH.



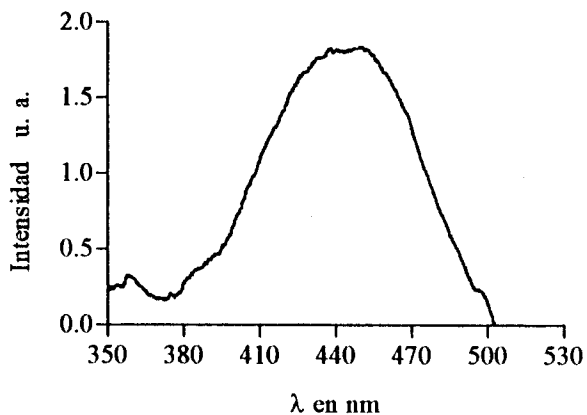
**Gráfica 16.** Banda ancha de emisión sola, del espectro en color negro de la gráfica 14, 350  $\mu\text{m}$  en la rendija del monocromador.

El siguiente experimento consistió en obtener espectros de fluorescencia a alta energía de excitación, mayor a 50  $\mu\text{J}$  (aproximadamente entre 60 y 100  $\mu\text{J}$ ). Esta energía produce fluorescencia de la solución fisiológica (donde están inmersas las células), por lo que empleamos otra solución menos fluorescente a esta intensidad de energía, llamada PBS (del inglés phosphate-buffered saline). Al igual que la solución fisiológica evita un choque osmótico de las células y les proporciona un medio óptimo para su estabilidad.

Se obtuvo una serie de espectros en los cuales se modificó la concentración celular. Se tomó también el espectro de fluorescencia de la solución PBS solamente. A todos los espectros obtenidos se les restó el espectro de la solución PBS sola, para observar la contribución real a la señal de fluorescencia producida por los leucocitos, gráfica 19.

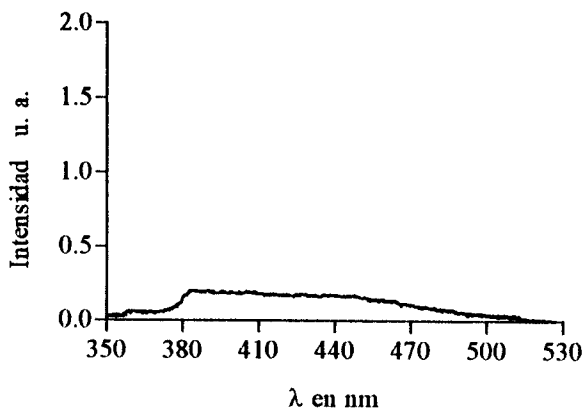
Antes de mostrar la gráfica 19, conviene presentar las gráficas 17 y 18 que muestran espectros de fluorescencia de células mononucleares de humano (sin restarle el espectro de la sol. PBS) y la solución PBS sola respectivamente (ambos espectros tienen en los ejes coordenados la misma escala).

Mononucleares de humano.



**Gráfica 17.** Espectro de fluorescencia de células mononucleares típicas, en solución PBS

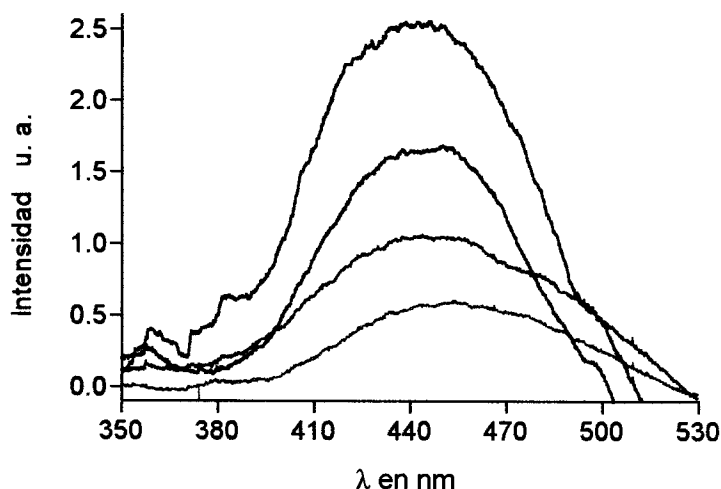
Solución PBS.



**Gráfica 18.** Espectro de fluorescencia de solución PBS sola, pH=7.4, temperatura ambiente.



Mononucleares de humano.

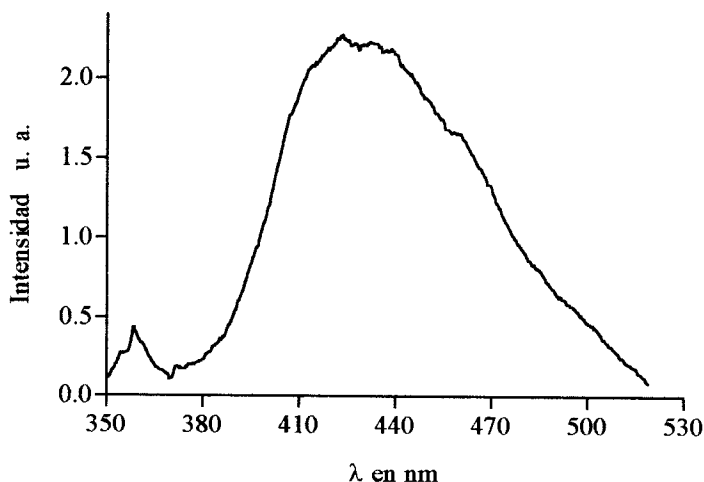


**Gráfica 19.** Comparación de espectros a diferente concentración celular, en solución PBS a pH=7.4 y temperatura ambiente.

La gráfica 19 representa cuatro espectros a diferentes concentraciones celulares. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración, es decir, la mayor concentración es la línea negra y la menor la azul claro. Desgraciadamente en este experimento no tenemos datos del número de células. Podemos notar el comportamiento de las dos curvas de baja concentración, el ancho de la banda de emisión es más grande respecto a la banda de las curvas a mayor concentración. Sin embargo el comportamiento espectral es muy similar, con dos máximos, el primero en 357 nm (promedio) y el segundo en 446 nm (promedio).

Finalmente mostramos los espectros de células mononucleares de humano, que consideramos se obtuvieron bajo las mejores condiciones gráficas 20, 21 y 22.

Mononucleares de humano.

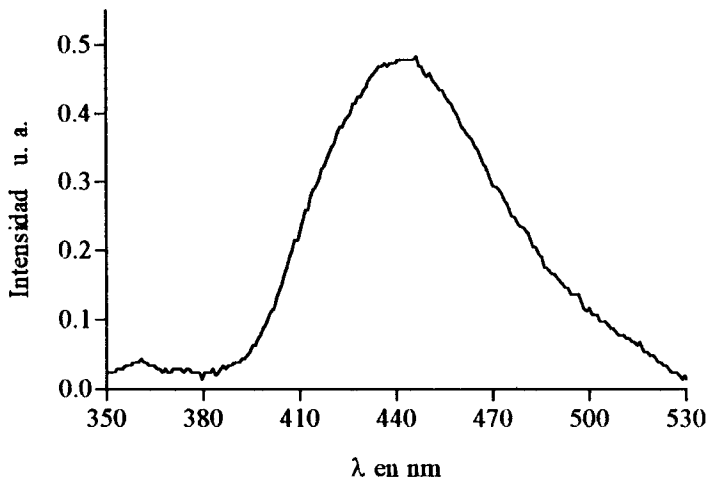


**Gráfica 20.** Estructura espectral típica de células mononucleares de individuos aparentemente sanos.

Este espectro fue obtenido a 20 nm/min y 400  $\mu\text{m}$  en el monocromador, 950 Volts en el fotomultiplicador; 50 mV de sensibilidad, 15  $\mu\text{s}$  de ventana y 100 muestras en el boxcar; y a 1 Hz en la adquisición.

Tenemos dos máximos, uno en 358 nm con ancho de 3 nm, y el otro en 430 nm (dependiendo de la velocidad de barrido en el monocromador) con ancho de 75 nm.

Mononucleares de humano.



**Gráfica 21.** Estructura espectral típica de células mononucleares de individuos aparentemente sanos.

En éste espectro (gráfica 21) se cambió en el monocromador la velocidad de barrido a 50 nm/min y en la rendija 500  $\mu\text{m}$ . Así como a 700 volts en la fuente que alimenta el fotomultiplicador, respecto a la gráfica 20.

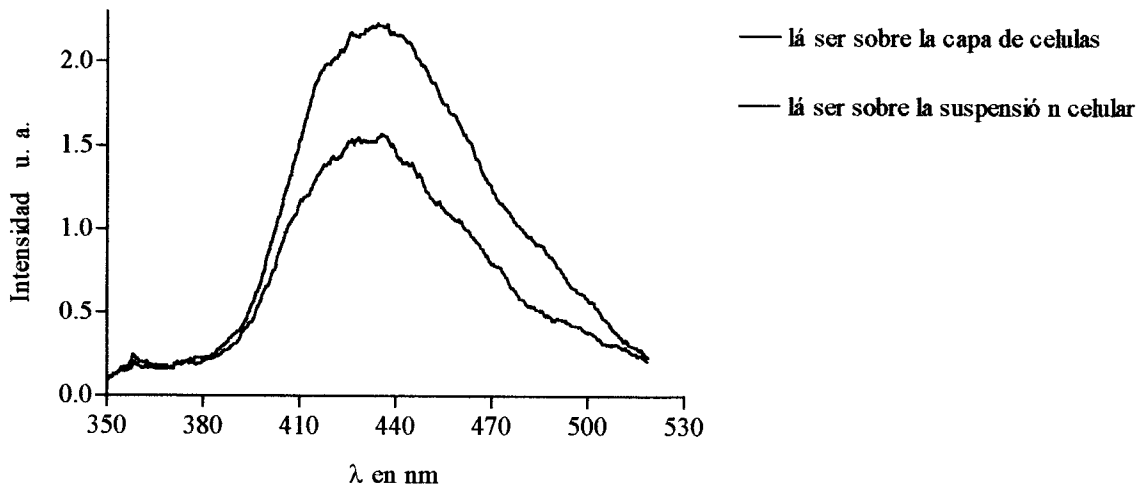
Tenemos dos máximos, uno en 359 nm con ancho de 3 nm, y el otro en 442 nm (dependiendo de la velocidad de barrido en el monocromador) con ancho de 63 nm.

En la siguiente gráfica (gráfica 22) se comparan dos espectros, el de menor intensidad se obtuvo con el haz láser incidiendo en la suspensión celular, y el de mayor intensidad se obtuvo, esperando que las células sedimentaran y formaran una capa en el fondo de la microcelda (de aproximadamente 1 mm de espesor, vista al microscopio), dirigiendo el haz láser a la capa de células en el fondo de la microcelda. Normalmente el haz láser incide en la microcelda a una altura de 2 mm a partir del fondo de la celda (sin considerar el espesor del cuarzo), por lo que únicamente tuvimos que hacer descender el haz alrededor de un milímetro, con el espejo para UV para incidir directamente sobre la capa de células.

Ambos espectros se obtuvieron a 20 nm/min y 200  $\mu\text{m}$  en el monocromador, 920 volts en el fotomultiplicador; 50 mV de sensibilidad, 15  $\mu\text{s}$  de ventana y 100 muestras en el boxcar; y a 1 Hz en la adquisición.

Siempre tenemos dos máximos, uno en 358 nm con ancho de 3 nm, y el otro en 442 nm (dependiendo de la velocidad de barrido en el monocromador) con ancho de 70.5 nm.

Mononucleares de humano.

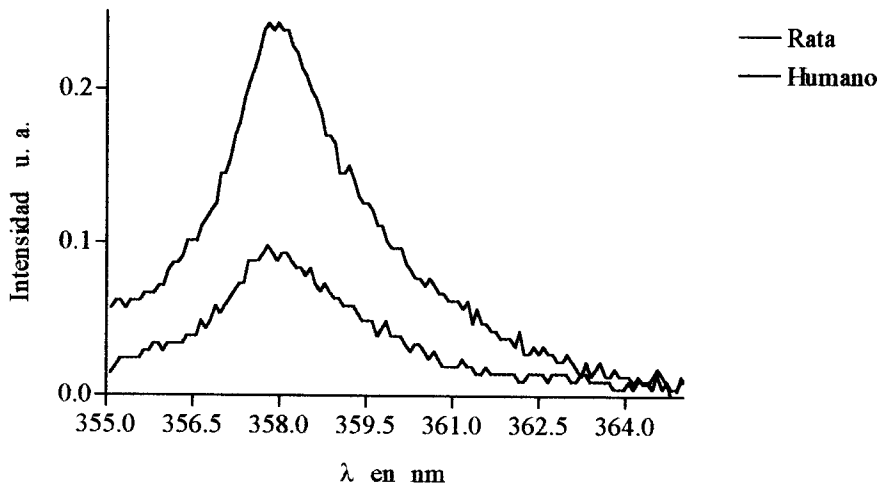


**Gráfica 22.** Comparación de espectros de fluorescencia con el haz en la suspensión celular y con el haz sobre la capa de células.

Posiblemente podríamos obtener la señal de fluorescencia de leucocitos sedimentados en todos nuestros experimentos, debido a que nuestro sistema de conteo celular introduce errores significativos cuando se igualan concentraciones celulares.

Con esta misma muestra de células, obtuvimos espectros de los dos máximos separados, con barridos de 355 a 365 nm y de 370 a 550 nm respectivamente, y ambos los comparamos con los máximos del espectro de células de rata en la gráfica 23 y 24.

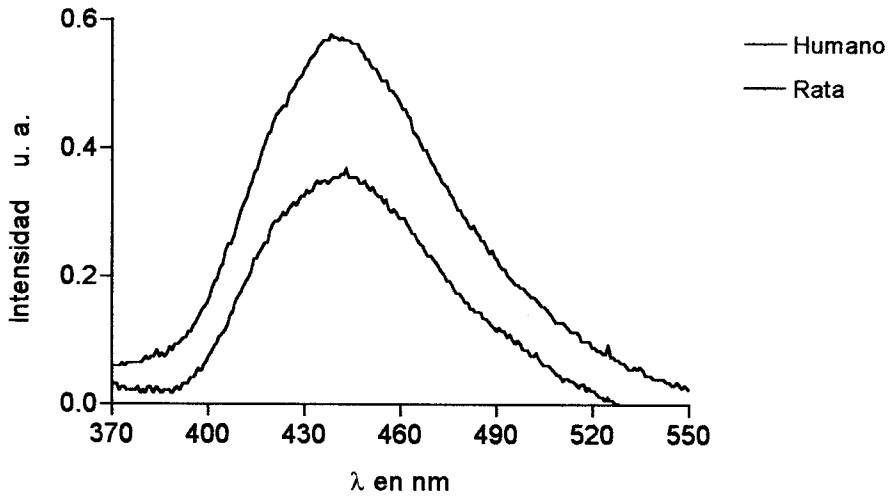
Fluorescencia de mononucleares.



**Gráfica 23.** Comparación entre la fluorescencia de mononucleares de humano y de rata.

En esta gráfica se puede apreciar la concordancia en la longitud de onda de emisión de ambos tipos de células. La intensidad de fluorescencia no indica nada, debido a que no sabemos la concentración celular de ambas muestras.

Fluorescencia de mononucleares.

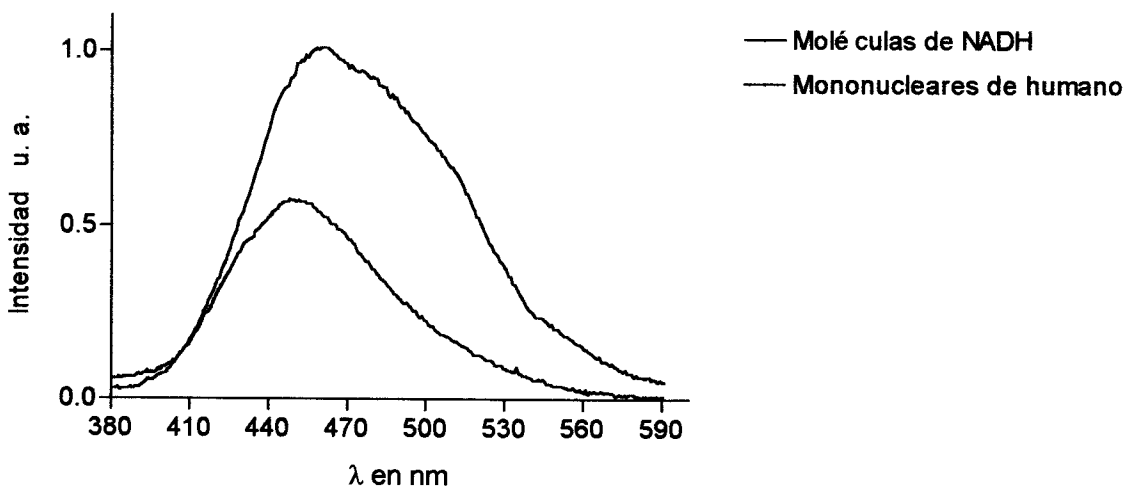


**Gráfica 24.** Comparación entre la fluorescencia de mononucleares de humano y de rata.

En esta gráfica se puede apreciar la concordancia en la longitud de onda de emisión de ambos tipos de células. La intensidad de fluorescencia no es relevante, debido a que no sabemos la concentración celular de ambas muestras.

En la siguiente gráfica (gráfica 25) se compara el espectro de fluorescencia de moléculas de NADH (gráfica 2), con el espectro de fluorescencia del segundo máximo de mononucleares (espectro en línea negra de la gráfica 24), obtenidos en el rango de 380 a 600 nm.

Fluorescencia.



**Gráfica 25.** Comparación de la fluorescencia emitida por moléculas de NADH en sol. acuosa pH=7.2 y células mononucleares de humano en sol. fisiológica pH=7.4. Temperatura ambiente.

En ésta gráfica los máximos están en 445 nm en el espectro de las células y 460 nm para el del NADH. La banda de emisión es claramente más ancha en las moléculas NADH. No obstante que nosotros estamos excitando muy selectivamente al NADH con 337.1 nm (máximo de absorción en 340 nm).

En cuanto a la intensidad relativa de las dos curvas no se obtiene información relevante, debido a que no tenemos datos precisos de la concentración de NADH en células mononucleares de humano.

El corrimiento de alrededor de 15 nm hacia mayores frecuencias se puede explicar, en primera instancia, considerando que el medio interno de la célula, en donde se encuentra el NADH, tiene polaridad diferente al de la solución del NADH [10-11]. Sin embargo también debemos tener muy claro que el NADH se encuentra dentro de las células junto con una cantidad extraordinariamente grande de otras moléculas. Esto también puede producir apagamiento [11], y por lo tanto reducir la emisión de fluorescencia.

#### **5.4 Discusión.**

Como mencionamos en el capítulo 4, éste trabajo inicia desde el armado del sistema de espectroscopia de fluorescencia láser y termina caracterizando el espectro de fluorescencia de células sanguíneas (leucocitos mononucleares) in vitro de humanos adultos, aparentemente sanos.

En el laboratorio de biofísica del área de ingeniería biomédica no teníamos experiencia previa en espectroscopia, por lo que hemos aprendido a optimizar el sistema durante el desarrollo de éste trabajo.

Iniciamos reproduciendo espectros bien caracterizados de cristales de halogenuros alcalinos dopados con impurezas. Después reproducimos espectros de fluorescencia de pigmentos orgánicos en solución principalmente de etanol.

También como ya dijimos al inicio de éste capítulo, trabajamos en el laboratorio de óptica cuántica con un sistema de espectroscopia láser y obtuvimos espectros de moléculas de NADH en solución acuosa. Además adquirimos experiencia en el manejo de un sistema de espectroscopia láser.

Iniciamos los resultados experimentales obteniendo espectros de moléculas en solución acuosa con pH ajustado normalmente a 7.2, con diferentes amortiguadores. Obtuvimos los espectros de absorción y de fluorescencia de dos dinucleótidos importantes en el metabolismo celular, el dinucleótido de adenina y nicotinamida y del dinucleótido de adenina y flavina. Conseguimos resultados acordes con los conocidos.

Cabe mencionar que el espectro de fluorescencia de moléculas de NADH obtenido en el sistema del laboratorio de óptica cuántica, resulto igual al conseguido, bajo las mismas condiciones (de la solución) en nuestro sistema. La longitud de onda de excitación en el laboratorio de óptica cuántica fue de 355 nm (tercer armónico del láser de Nd: YAG), mientras que la longitud de onda de excitación en nuestro laboratorio fue de 337.1 nm (láser de nitrógeno). Así mismo el espectro de fluorescencia del FAD se obtuvo en nuestro sistema con dos diferentes longitudes de onda de excitación 337.1 y 454 nm, consiguiéndose el mismo espectro (de acuerdo a las propiedades de la fluorescencia, sección 1.3.3).

Estos resultados nos mostraron que nuestro sistema estaba funcionando correctamente, aunque seguimos teniendo problemas de ruido eléctrico, en la tarjeta de adquisición de datos, debido a la descarga eléctrica generada en el láser de nitrógeno.

Normalmente antes de medir fluorescencia en los experimentos con células, adquiriríamos un espectro de fluorescencia de moléculas de NADH a una concentración de  $1 \times 10^{-5}$  en solución fisiológica a  $\text{pH}=7.4$  y temperatura ambiente, como referencia de detección de fluorescencia en nuestro sistema.

Decidimos entonces tratar de monitorear a las moléculas de NADH o FAD en células sanguíneas (leucocitos mononucleares) de rata. Para esto, primero obtuvimos el espectro de absorción de células mononucleares de rata gráfica 6. Se observa una banda ancha de alta absorbancia con máximo alrededor de 240 nm, quizá debida a proteínas (a los residuos aminoácidos). Pero lo importante es observar el valor de la absorbancia a longitudes de onda en donde absorben los fluoróforos considerados, y además que podamos generar con nuestro sistema, es decir, longitudes de onda a 337.1 nm (absorción del NADH), 375 y 450 nm (absorción del FAD). Los valores son muy significativos, 0.4 a 337.1 nm, 0.3 a 375 nm y 0.2 a 450 nm (ver sección 2.4), para su posible estudio espectroscópico dentro de la célula.

Antes de adquirir espectros de fluorescencia de suspensión celular, intentamos obtener el espectro de la solución fisiológica sola. Al principio con baja energía ( $<50 \mu\text{J}$ ) no conseguimos nada. Sin embargo, cuando la energía del láser se incrementa a más de  $200 \mu\text{J}$ , se puede obtener el espectro de fluorescencia de la solución fisiológica, de la solución PBS (gráfica 18) e inclusive de agua destilada y desionizada solas.

El espectro de fluorescencia típico de células mononucleares de rata, tiene dos máximos, el primero en 358 nm (muy estrecho) y el segundo alrededor de 445 nm (muy ancho).

El primer máximo es difícil asociarlo a alguna biomolécula, debido a que todos los fluoróforos biológicos normalmente tienen bandas anchas de emisión. Sin embargo puede deberse a la emisión del triptófano unido a proteínas (modificándose su banda de emisión debido a su posición en las células, así como por interacción con una gran cantidad de moléculas), podemos mencionar que este máximo siempre surge cuando colocamos células en la muestra por lo que puede ser una buena referencia. En algunos espectros el ancho medio de la banda de fluorescencia aumenta, pero no sabemos cuál puede ser la causa.

La emisión fluorescente centrada en 445 nm se asocia con las moléculas del NADH, sin embargo, el máximo está corrido hacia mayor frecuencia, y el ancho medio de la banda es menor a la generada por las moléculas de NADH (se discutirá con mayor profundidad cuando analicemos los espectros de las células de humano). Una indicación de que esta banda de fluorescencia se puede asociar a la emisión fluorescente de NADH, es que hemos obtenido espectros en células con más de 24 horas de almacenamiento a baja temperatura (en refrigeración) y solo aparece el primer pico en 358 nm, quizá debido a que el metabolismo celular se termina y el NADH puede cambiar su estado a la forma oxidada, que no absorbe radiación de 337.1 nm (sección 2.4).

Las células sanguíneas mononucleares de humano son un tejido celular con ciertas características propias, consiste de tres tipos de células, como ya mencionamos en la sección 3.4. En este tipo de tejido tenemos dos ventajas importantes respecto a otro tipo de tejido celular. La primera ventaja se debe a que en estas células solo tenemos, en principio, dos de

los diferentes fluoróforos conocidos de interés biomédico, sección 3.3. El análisis del espectro de fluorescencia es entonces más simple, ya que cuando el tejido bajo estudio (colon, vejiga, cuello uterino, etc.) posee varios fluoróforos, la interpretación del espectro puede ser complicada [12-13].

La segunda es que es de fácil acceso, a través de punción venosa, que se puede realizar fácil y rápidamente. Los donadores voluntarios fueron estudiantes de esta Universidad.

Sin embargo, no debemos olvidar que biológicamente es un tejido muy importante, sección 3.4, debido a que reacciona ante agentes externos. Los leucocitos obtenidos en nuestras muestras podrían estar activados o no activados (encontrarse en alguna etapa del ciclo celular diferente a otros leucocitos de otro donante). En éste trabajo no tenemos control estricto sobre el estado de los leucocitos.

Generalmente la señal de fluorescencia de tejido celular es débil y poco estructurada debido a que las eficiencias cuánticas (sección 1.3.7) de los fluoróforos en el tejido son relativamente bajas. Asimismo la energía de excitación es limitada por efectos no deseados cuando se ilumina tejido, tales como blanqueamiento por luz (fotobleaching) de los fluoróforos, luz dispersada y efectos fotodinámicos [12]. Por estos motivos escogimos un sistema de espectroscopia que minimizara estos problemas, una fuente de excitación pulsada, una detección acotada en tiempo (gate), con tiempos cortos de detección, así como una fuente cuasimonocromática.

Por éstas mismas razones decidimos realizar los experimentos descritos en la sección anterior. Empezamos por colocar una suspensión celular, y obtener espectros a diferentes energías de excitación, la fluorescencia como se puede apreciar en la gráfica 12, es dependiente de la energía de excitación (a esta concentración celular fija) aunque podemos apreciar dispersión de luz (debida principalmente a muestras turbias o altas concentraciones celulares), como luz de fondo (background) en la base de los espectros.

Con el siguiente experimento, gráfica 13, se consiguió cuantificar un rango de concentración celular adecuado para evitar, por un lado dispersión de luz, y por otro lado señales de fluorescencia con intensidad detectable con nuestro sistema de espectroscopia. Consideramos que la concentración celular ideal para obtener la señal producida por las células (autofluorescencia) está en el rango de 2000 a 9000 células en 120  $\mu$ l de solución fisiológica a pH=7.4.

También es importante considerar suspensiones celulares contaminadas gráfica 15. Ya que es relativamente fácil que haya bacterias u otros contaminantes en la muestra, debido a que nosotros no trabajamos en medio estéril. Es importante mencionar que, a pesar de tener una alta contaminación por bacterias y levaduras, se puede apreciar los dos máximos típicos de fluorescencia en casi la misma posición, respecto al espectro de fluorescencia de células no contaminadas. El segundo máximo que aparece en alrededor de 372 nm, está en la misma posición que el que surge en células de rata contaminadas con membranas. Es interesante observar que éste pico surge debido a elementos más pequeños que las células bajo estudio, en este caso membranas, bacterias o levaduras. Los espectros muestran que había luz de fondo, debido seguramente a la alta concentración de contaminantes.

La gráfica 19 considera diferentes concentraciones celulares excitadas a una misma energía, en este caso alta energía. Esta gráfica puede ser muy significativa ya que al tener alta concentración celular pueden ocurrir algunos procesos considerados de apagamiento

(quenching) de la fluorescencia, debidos por ejemplo, a valores grandes de absorbancia y muestras turbias. Si observamos las curvas con menor concentración celular, vemos que tienen menor pérdida de fluorescencia por apagamiento (bandas anchas), mientras que las curvas a mayor concentración son menos anchas (más intensas debido a la mayor concentración celular).

En la gráfica 20, 21 y 22 mostramos espectros de fluorescencia típicos de células sanguíneas, leucocitos mononucleares, obtenidos bajo condiciones ideales, tanto de la muestra como del sistema de espectroscopia. El primer máximo se encuentra en 358 nm y el segundo en alrededor de 440 nm. El segundo máximo claramente se puede asociar con la emisión fluorescente del NADH.

La curva en color negro mostrada en la gráfica 22, se realizó pensando en tratar de obtener todos nuestros espectros a partir de la fluorescencia de leucocitos sedimentados, sabemos las dimensiones de la celda y la sección transversal del haz láser (considerada como circular), es decir, conocemos el volumen de excitación, por lo que si dejamos sedimentar las células en todos nuestros experimentos, excitamos al mismo volumen celular. Esto debido a que bajo nuestras condiciones experimentales de conteo celular (sección anterior), puede resultar difícil (e introducir errores importantes) igualar concentraciones celulares en dos diferentes muestras. Esta opción no ha sido descartada para futuros experimentos.

Una constante en nuestros experimentos, tanto en mononucleares de humano como de rata, fue la aparición de los dos máximos. Por lo que comparamos las posiciones de ambos, en mononucleares de humano y rata, en las gráficas 23 y 24. Es interesante mencionar la concordancia en la posición de ambos máximos; el primer máximo se encuentra en la misma posición para ambas células 357.8 nm, con ancho de banda medio de 2.9 nm para mononucleares de humano y 3.7 nm para mononucleares de rata (normalmente el ancho de banda de células de rata es más grande), el segundo máximo se encuentra en 440.8 nm en células de humano y 441.4 en células de rata, con anchos de banda medios de 79.2 y 67.8 nm en células de humano y rata respectivamente. En un estudio relativamente reciente en células mononucleares de humano, se observó la presencia de dos máximos de fluorescencia en 340 y 440 nm. La posición del máximo de excitación (obteniendo el espectro de excitación) para 340 nm está alrededor de 280 nm y para 440 nm está alrededor de 350 nm. Este trabajo se hizo con un espectrofotómetro (no usaron luz láser), en suspensión celular, y desafortunadamente en el artículo no se muestra el espectro de fluorescencia con máximo en 440 nm [14].

Como regla general la intensidad de fluorescencia del primer máximo en células de rata siempre fue mayor a la correspondiente en células de humano y por otro lado la intensidad de fluorescencia del segundo máximo siempre fue mayor en células de humano a la correspondiente en células de rata. Esta última conclusión la rescatamos de todos los experimentos realizados en mononucleares, no hicimos el experimento igualando la cantidad de las dos clases de células (mononucleares de humano y de rata).

Los métodos espectroscópicos son adecuados para realizar medidas cuantitativas cuando se llevan a cabo experimentos en donde se involucran interacciones entre proteínas y otras moléculas (por ejemplo el enzima lactato deshidrogenasa con el NADH), para estudios de sitios de unión en las proteínas que interactúan con los ligandos, así como sobre la afinidad de los sitios de unión para el ligando.



Sabemos que los métodos de fluorescencia son varios ordenes de magnitud más sensibles que los métodos de absorción en términos absolutos, sección 2.4. Además que ocurren cambios en la magnitud de la fluorescencia (normalmente aumenta) a partir de la transferencia de un ligando dentro de un medio menos polar (agua → interior de la proteína) y un corrimiento perceptible hacia mayores frecuencias de la emisión [15].

Es bien conocida la sensibilidad de los fluoróforos a los solventes, se ha trabajado en el análisis del espectro de fluorescencia de fluoróforos unidos a proteínas, membranas, ácidos nucleicos y complejos macromoleculares.

En la gráfica 25 podemos apreciar un corrimiento hacia mayores frecuencias de la fluorescencia producida por las células. Así como probablemente una aumento de la luz dispersada o apagamiento de la fluorescencia de leucocitos, respecto a la fluorescencia de moléculas de NADH en solución a pH=7.4.

Como sabemos el NADH intracelular esta interactuando directamente con una cantidad grande de moléculas (principalmente enzimas). Por ejemplo en el proceso de la glucólisis aeróbica interactua con la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, y al inicio de la cadena respiratoria (quizá en donde se encuentra la mayor concentración de NADH) con el complejo NADH: Ubiquinona óxido-reductasa. Estas interacciones pueden producir los efectos mencionados anteriormente, sin olvidar la presencia de todas las estructuras celulares e inclusive otras células (en la solución).

Existen modelos matemáticos para tratar de cuantificar el corrimiento en frecuencia de la emisión fluorescente, debidos al cambio en la polaridad del medio en donde se encuentra el fluoróforo. Podemos mencionar como modelo importante el propuesto por Von E. Lippert [11].

La ecuación de Von E. Lippert es una expresión completamente general que describe el corrimiento de Stokes para un fluoróforo dado en medios con diferente polaridad.

El modelo considera las interacciones físicas y químicas entre el fluoróforo y las moléculas del solvente.

La interacción del fluoróforo con el solvente puede ser descrita en términos de los momentos dipolares de sus estados base  $\mu$  y excitado  $\mu^*$ , y el campo reactivo alrededor de estos dipolos. Estos campos pueden dividirse en aquellos debidos a factores electrónicos y los debidos a reorientación del solvente. Estos campos involucran dos factores importantes  $f(n)$  y  $f(\epsilon)$ , donde  $f(n)$  es la llamada polarizabilidad de alta frecuencia (reorientación instantánea de electrones del solvente) y  $f(\epsilon)$  polarizabilidad de baja frecuencia (reorientación de la molécula solvente). Estas están dadas en función del índice de refracción y de la permitividad eléctrica

$$f(n) = \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \qquad f(\epsilon) = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1}$$

Con estas consideraciones obtenemos la ecuación de Lippert

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_b = \frac{2}{hc} \left( \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu^* - \mu)^2}{a^3} + cte$$

Donde:  $a$  es el radio de la cavidad, en donde se encuentra el fluoróforo.  
 $\nu_a - \nu_b$  son los números de onda en  $\text{cm}^{-1}$  de absorción y emisión.  
 $h$  es la constante de Planck.  
 $c$  es la velocidad de la luz.

Quizá podríamos medir paulatinamente los corrimientos espectrales de la fluorescencia y tratar de cuantificarlos con éste modelo para evaluar alteraciones en la polaridad del medio interno de la célula. Existen diversos padecimientos en donde el origen de la alteración es el metabolismo, en especial en procesos que ocurren en la mitocondria [16]. Células que presenten estos padecimientos podrían ser un buen modelo para medir corrimientos espectrales paulatinos, y evaluar en lo posible alteraciones de la polaridad (del medio interno de la mitocondria, al parecer aquí es donde existe la mayor concentración de NADH) asociadas con defectos metabólicos en la mitocondria.

Existen diversos padecimientos en donde las células mononucleares sufren alteraciones significativas, podríamos intentar aplicar nuestra técnica de espectroscopia en éstos para detectar diferencias entre leucocitos de individuos sanos y enfermos.

La mononucleosis infecciosa es una enfermedad aguda, generalmente benigna, causada por el virus de Epstein-Barr (EBV). Se presenta con más frecuencia entre los adolescentes y adultos jóvenes que muestran un cuadro clínico característico consistente en fiebre, faringitis, linfadenopatía, aumento del número de linfocitos periféricos, con una alta proporción de células atípicas. En estudios de laboratorio se encuentra un aumento relativo y absoluto en el número de linfocitos y monocitos, incluyendo la aparición de un 10 a 20 % de formas atípicas. En los primeros estadios de la enfermedad, con frecuencia es difícil de distinguir la mononucleosis infecciosa de otras formas de enfermedades febriles exudativas con faringoamigdalitis.

Esta enfermedad podría ser un buen modelo para intentar estudiar espectroscópicamente las células atípicas, mismas que obtenemos nosotros con nuestra técnica. Y establecer, si es posible, diferencias espectrales entre células normales y enfermas, como ayuda alterna para el diagnóstico médico.

También se producen cambios morfológicos en mononucleares por enfermedades causadas por los siguientes virus; citomegalico, hepatitis viral y toxoplasmosis.

Así mismo existe una amplia variedad de enfermedades que pueden afectar al sistema de célula madre hemopoyética (precursora de los leucocitos mononucleares), las cuales influyen sobre la producción de células hemopoyéticas diferenciadas en lo que se refiere a cantidad, calidad o ambas. Sin embargo, ciertas enfermedades se deben a anomalías específicas del sistema de célula madre hemopoyética. Entre las principales se encuentran las neoplasias clonales.

En la vía mieloide, como leucemias podemos mencionar la leucemia granulocítica crónica, la leucemia mieloblastica aguda, y como linfomas tenemos la enfermedad de Hodgkin, la policitemia vera, la mielofibrosis idiopática y la hemoglobinuria paroxística nocturna.

Respecto a la vía linfoide, podemos mencionar como leucemias, la linfocítica crónica, la linfoblástica aguda, y como linfomas tenemos linfocíticos bien diferenciados, linfocíticos poco diferenciados y mieloma múltiple.

Consideremos la leucemia linfoblástica aguda. Puede ser una enfermedad de la célula madre hemopoyética linfoide pluripotencial o quizá de una célula madre hemopoyética más específica. Algunos pacientes tienen linfoblastos con características antigénicas y de superficie de células T o B maduras, aunque no la mayoría. Sin embargo, la presencia de un antígeno semejante al I<sub>a</sub>, sugiere que la mayor parte de éstas células son del tipo B. La célula madre hemopoyética mieloide normal está presente pero la producción de células maduras se encuentra reducida, lo que se manifiesta por anemia, neutropenia y trombocitopenia en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, los linfoblastos leucémicos no reprimen necesariamente la función normal de los linfocitos, porque hasta que los pacientes con leucemia linfoblástica aguda reciben tratamiento su sistema inmunitario es casi normal.

Esta enfermedad es la forma más frecuente de leucemia en niños. Se puede lograr la curación aproximadamente en el 50 % de los casos. Los pacientes en fase temprana no presentan anomalías inmunológicas importantes, principalmente a que se conservan una cantidad casi normal de células maduras.

Podríamos obtener de pacientes células mononucleares de éste tipo y hacer un estudio espectroscópico riguroso, para tratar de encontrar diferencias significativas entre células normales y células inmaduras (linfoblastos).

## Referencias del capítulo 5.

- 1) Julio Rubio O., *Ciencia*, **37** (1986) 169-184.
- 2) Panfleto comercial "Exiton laser dyes", Exciton, inc., 1992.
- 3) Albert L. Lehninger, "Bioquímica", Ediciones Omega, S.A., 1982 (cap.1 y 9).
- 4) Panfleto comercial Sigma Chemical company.
- 5) Maurice Anidjar, et al., "Assessment of different excitation wavelengths for photodetecting neoplastic urothelial lesions by laser-induced autofluorescence spectroscopy", 204/SPIE Vol. 2679.
- 6) John B. Miale, "Hematology", Editorial Reverté S.A., 1985 (cap. 4).
- 7) M. Fernández Guasti, et. al., "Diseño y construcción de láseres de nitrógeno molecular", *Revista Mexicana de Física* **38**, No. 4 (1992) 588-610.
- 8) Kevin T. Shomacker, et al., *Gastroenterology*, **102** (1992) 1155-1160.
- 9) Matthew J. Lynch, et al. "Métodos de laboratorio", Nueva editorial interamericana S.A. de C.V. 1977.
- 10) Robert R. Afano, et al., *IEEE Journal of Quantum Electronics*, QE-20, **12** (1984) 1507-1511
- 11) Joseph R.Lakowicz, "Principles of fluorescence spectroscopy", Plenum Press NewYork, 1983.
- 12) S. Andersson-Engels, et al., *Photochemistry and Photobiology*, 53, **6** (1991) 807-814.
- 13) Kevin T Shomacker, et al., *Lasers in Surgery and Medicine* **12** : (1992) 63-78.
- 14) M. Monici, et al., "*Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **30** (1995) 29-37
- 15) C.L. Bashford, D.A: Harris, "Spectrophotometry & Spectrofluorimetry", IRL Press Limited, 1987.
- 16) H. R. Scholte, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, Vol. 20, No. 2, 1988

## Capítulo 6 Conclusiones.

Al iniciar éste trabajo no se contaba con ninguna referencia de trabajos previos en la UAM, de hecho hasta donde nosotros sabemos sólo en el Centro de Instrumentos de la UNAM junto con el Instituto Nacional de Cardiología se ha trabajado con espectroscopia en tejido biológico. Como ya mencionamos existe un sistema en el laboratorio de Optica Cuántica del área de Fenómenos Opticos y Transporte de la Materia, pero ahí no se realizan trabajos en células.

Con la ayuda de ésta área se nos fueron proporcionando los aparatos necesarios. Primero conseguimos los dos láseres (nitrógeno y pigmento) con sus accesorios, los instalamos, alineamos y entonces conseguimos el monocromador. Con el monocromador pudimos detectar diferentes longitudes de onda (con diferentes pigmentos), y tuvimos acceso al fotomultiplicador.

Normalmente el procesamiento de la señal involucra otra señal de inicio (trigger), los láseres comerciales tienen en su diseño (como ya dijimos) una señal de salida de voltaje que coincide temporalmente con la emisión de la radiación láser, por lo tanto, únicamente conectando la señal de voltaje al procesamiento (boxcar) se da inicio el análisis de la señal. En nuestro caso como el láser no es comercial tuvimos que conseguir también un fotodiodo.

Las primeras detecciones de señales las hicimos sólo en el osciloscopio (con muestras de cristales), simplemente detectando el voltaje generado por el fotomultiplicador.

Conseguimos el contador de fotones (sección 3.1) pero tuvimos problemas. Con el boxcar obtuvimos excelentes resultados.

Todos los espejos, monturas, lentes, etc. (hasta herramienta, cables, tornillos, pigmentos, etc.) amablemente los obtuvimos del laboratorio de Optica Cuántica.

Así mismo en el laboratorio de Biofísica Celular y Molecular del área de Bioquímica, Biofísica y Fisiología Celular del departamento de Ciencias de la Salud, amablemente nos ayudaron en la preparación de las muestras y en el conteo celular, además de poner a nuestra disposición todo el equipo necesario para nuestro trabajo.

La computadora con la que adquirimos los espectros se formo de la siguiente manera. El monitor se consiguió de un regalo de varias terminales que nos dio el departamento de física. El disco duro lo obtuvimos de una máquina "vieja" de un profesor. El teclado inicialmente lo compró el laboratorio de Optica Cuántica. Y si, finalmente, la tarjeta de adquisición de datos pertenece al área de Ingeniería Biomédica.

Podemos concluir que pese a todos los inconvenientes (como la falta de presupuesto), se logro con éxito obtener un sistema de espectroscopia láser con, por un lado, adecuada sensibilidad. Podemos detectar señales de fluorescencia muy poco intensas, podemos detectar señal cerrando la rendija del monocromador hasta  $40 \mu\text{m}$  (si la señal de fluorescencia es intensa), e inclusive podemos detectar la señal del láser con la rendija más cerrada. En nuestro caso las bandas de emisión de las moléculas biológicas normalmente son anchas por lo que no tuvimos que buscar mejor resolución espectral.

Por otro lado el sistema posee alta potencialidad espectroscópica, ya que podemos cubrir todo el espectro visible y parte del UV para excitar moléculas. Es decir podríamos buscar alguna transición electrónica particular de algunos fluoróforos, y entonces tratar de monitorearlos espectroscópicamente. Además nuestra fuente de excitación posee alta intensidad espectral, es decir, la energía de la radiación cuasimonocromática del láser incide

directamente sobre la muestra, a diferencia de los espectrofluorómetros convencionales (en donde se usan lamparas de alta potencia, pero una parte significativa de la energía se pierde en el enfocamiento).

Consideramos que nuestro sistema se puede emplear en diversos estudios espectroscópicos de fluorescencia en moléculas orgánicas e inorgánicas, en complejos macromoleculares, en organelos, para monitorear procesos intracelulares con fluoróforos intrínsecos (como la clorofila, proteínas flavínicas, NADH etc.) o extrínsecos (como las acridinas, cianinas, quininas, etc.). Debemos mencionar que éste sistema no es un sistema original, simplemente se llevo a cabo el armado.

Respecto a la caracterización del espectro de fluorescencia de leucocitos mononucleares Empezamos con mononucleares de rata para probar si podíamos detectar la señal de fluorescencia de leucocitos, así como para adquirir experiencia en espectroscopia de células. No conocemos trabajos previos de espectroscopia láser en mononucleares de rata (wistar).

Pensamos que el espectro de fluorescencia de leucocitos mononucleares de humano se caracterizó adecuadamente. Consideramos que el espectro de fluorescencia se debe a la emisión de algún aminoácido (pequeña contribución) y del dinucleótido de adenina y nicotinamida NADH. Realizamos algunos experimentos para tratar de monitorear el FAD en leucocitos, pero no pudimos detectar la señal de fluorescencia (excitando a los leucocitos con longitud de onda de 450 nm), creemos que necesitamos mayor energía del láser de pigmento (cumarina 460).

Existen trabajos previos en leucocitos mononucleares con espectrofluorómetros convencionales [1], nosotros no hemos encontrado trabajos previos donde la fuente de luz de excitación sea un láser. En el espectro mencionado (no mostrado, ver sección 5.5) en éste trabajo no se menciona el primer máximo de fluorescencia en 358 nm.

### **Perspectivas.**

Como ya mencionamos la motivación para realizar éste trabajo surge de la posibilidad de emplear el sistema de espectroscopia como herramienta alterna en el diagnóstico de algunos padecimientos, a través del análisis de los espectros de células sanas y enfermas [2]. El caso ideal es aquel en el que pudiéramos detectar paulatinamente cambios espectrales entre uno y otro estado (diagnóstico). Se dice que la espectroscopia óptica tiene la potencialidad de ser selectiva así como sensitiva (ver sección 1.3.9) con respecto a la detección de varias especies moleculares y puede ser usada para diagnóstico médico semiinvasivo o no invasivo (o como técnica alterna en el diagnóstico). En particular LIF (Laser-induced fluorescence) puede ser muy útil en la detección primaria de tejido enfermo. Esto debido al hecho de que el estado de alteración del tejido puede incidir en la concentración de varios cromóforos [3].

En el tejido neoplásico bronquial se ha demostrado que los niveles de concentración de  $\text{NAD}^+$  y NADH cambian, generando las células cancerosas un espectro de fluorescencia de menor intensidad y un corrimiento de 30 nm hacia mayores frecuencias, respecto a las células normales [4].

Diversos trabajos se han hecho para diferenciar, en el caso de neoplasias, tejido normal de tejido inflamado, displásico, metaplásico escamoso, y carcinoma in situ, en cáncer de vejiga [5]. Tejido normal de tejido inflamado crónico, con virus del papiloma humano, y

tejido neoplásico cervical intraepitelial en sus tres estadios en cáncer cervical intraepitelial [6].

Respecto a los leucocitos se producen alteraciones en el número y las funciones de éstos en una amplia variedad de afecciones hematológicas, infecciosas, inflamatorias, metabólicas y neoplásicas.

Nosotros sentimos la necesidad de tener relación con hospitales para captar pacientes, con enfermedades, en este momento, relacionadas con los leucocitos. Por lo que estamos por realizar un convenio con el departamento de hematología del hospital 20 de Noviembre de la Secretaría de Salud.

En este departamento se atienden a enfermos (adultos y niños) con enfermedades que involucran a los leucocitos. Entre éstas afecciones se encuentran las que afectan directamente a los leucocitos como las leucemias. Otras afecciones, como en la uremia, insuficiencia cardíaca congestiva, linfomas (especialmente enfermedad de Hodgkin), lupus eritematoso [7], inciden indirectamente en los leucocitos, pero probablemente se podría obtener información del análisis espectral de éstos.

Respecto al hecho de analizar el espectro de fluorescencia para detectar diversos padecimientos, actualmente se propone que no únicamente podemos obtener información a partir de la intensidad de fluorescencia o del corrimiento espectral, sino también del tiempo de vida de la fluorescencia.

Medidas del tiempo de vida son frecuentemente necesarias en espectroscopia de fluorescencia. Estas medidas pueden revelar la frecuencia de colisiones con agentes apagadores, la razón de transferencia de energía, y la razón de reacciones del estado excitado. La naturaleza precisa del decaimiento de la fluorescencia puede revelar detalles a cerca de las interacciones de los fluoróforos con sus alrededores.

En años recientes se ha encontrado que muchas moléculas fluorescentes (sensores normalmente extrínsecos) presentan cambios en el tiempo de vida de la fluorescencia (ver sección 1.3.6), en respuesta a la presencia de diversos elementos; oxígeno, calcio [8], pH [9]. Sensores basados en tiempos de vida son deseables debido (a diferencia de la intensidad de fluorescencia) a que el tiempo de vida de la fluorescencia es normalmente independiente de la concentración.

Entonces se podría medir el tiempo de vida del NADH intracelular, en células normales y en células enfermas, como otro parámetro de ayuda en el diagnóstico médico.

Las aplicaciones clínicas del uso de fluorescencia han aumentado e introducido métodos novedosos para inmunoensayos, inmunoensayos de encadenamiento de enzimas (ELISA), pigmentación de proteínas y ADN, y secuenciación de ADN.

## **Referencias del capítulo 6.**

- 1) M. Monici, et al., "Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **30** (1995) 29-37
- 2) Robert R. Afano, et al., IEEE Journal of Quantum Electronics, QE-23, **10** (1987) 1806- 1811.
- 3) Theodore G. Papazoglou, Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology **28** (1995) 3-11.
- 4) V. Betz et al., "Evaluation of changes in the NADH levels between carcinogenic and normal tissue samples by use of fluorescence spectroscopy", 284/SPIE Vol.2324.
- 5) Frank Koenig, et al., The Journal of Urology, **156** (1996) 1597-1601.
- 6) Rebecca Richards et al., Journal of Cellular Biochemistry, Supplement **19**, (1994) 111-119.
- 7) George W. Thorn, et al., "Medicina Interna Harrison", La Prensa Medica Mexicana, S.A.1979 (cap. 10).
- 8) Lakowicz J. R., et al., Cell Calcium, **13** (1992) 131-147.
- 9) Szmackinski H., et al., Anal. Chem., **65** (1993) 1668-1674.