

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER EN CÉLULAS

A. SILVA-PÉREZ¹, J. R. GODÍNEZ-FERNÁNDEZ²,
M. FERNÁNDEZ-GUASTI³, E. HARO-PONIATOWSKI³

¹*Preparatoria “Salvador Allende”, Instituto de Educación Media Superior
del Gobierno del Distrito Federal, 07469 México D. F.,
anilo31@yahoo.com.mx*

²*Departamento de Ingeniería Eléctrica, UAM-Iztapalapa,
Apdo. Postal 55-532, 09340, México D. F.,
gfjr@xanum.uam.mx*

³*Departamento de Física, Laboratorio de Óptica Cuántica,
UAM-Iztapalapa, Apdo Postal, 55-534, 09340 México D.F.,
mfg@xanum.uam.mx, haro@xanum.uam.mx*

INTRODUCCIÓN

Por más de cincuenta años la espectroscopía de absorción y luminiscente ha servido como herramienta usual e importante para caracterizar diversos procesos físicos y químicos en materiales. Utilizándola químicos, físicos y biólogos han adquirido muchos de los conocimientos fundamentales acerca 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, 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.

La cromatografía de líquidos y la electrofóresis, en donde especies moleculares distintas emigran a diferente velocidad en capilares, son métodos importantes para el análisis molecular. La sensibilidad de estas técnicas ha sido aumentada recientemente, 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 que utilizan la fluorescencia inducida por láser incluyen inmunoensayo y secuenciación de ADN, utilizando marcadores fluorescentes. Estos marcadores también son utilizados en citometría y clasificación celular automática. Los láseres se han utilizado para la generación de calor, cuando interactúan con el tejido.

Los aspectos espectroscópicos juegan un papel dominante en las nuevas aplicaciones; son importantes en el tratamiento fototérmico, en términos de las propiedades de absorción de los átomos o moléculas; son fundamentales en los campos de la terapia fotoquímica y en el

diagnóstico de tejido, usando la técnica de fluorescencia inducida por láser.

La espectroscopía 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 que, eventualmente, podría servir 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 hematoporfirínicos). A la fecha, se ha reportado un número considerable de trabajos en animales y aplicaciones clínicas en humanos. Un ejemplo ilustrativo es el uso de espectroscopía de fluorescencia para identificar plaquetas ateroscleróticas en arterias humanas. El análisis espectroscópico del plasma inducido por láser, obtenido cuando un haz láser pulsado normalmente interacciona con tejido, es muy útil cuando se remueven plaquetas (ateromas), así como para fragmentar cálculos en el riñón y la vesícula.

1. ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER

Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía óptica es una extensa rama de las ciencias físicas que 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.

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, 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 la emisión o absorción de radiación en distintas zonas de frecuencia. Por esto, se pueden distinguir distintos tipos de espectros, según los niveles de energía que intervienen y las técnicas experimentales utilizadas para su observación.

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.

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 singuletes S_k , los estados con espín total cero. En la parte derecha de la figura se muestra el esquema

de estados tripletes T_k , estados para los cuales el espín total de la molécula es igual a uno. Las líneas más bajas (negras) de cada estado S_k o T_k en la figura denotan niveles electrónicos.

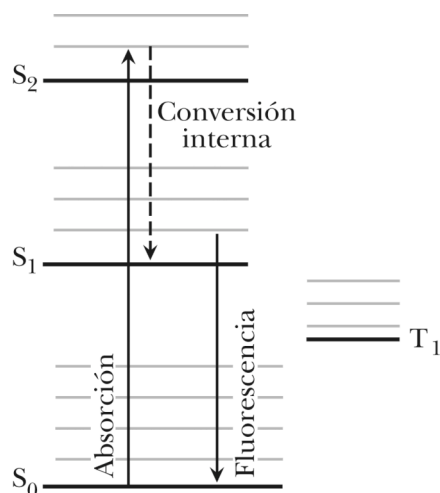


Figura 1. Esquema general de los primeros niveles de energía de una molécula orgánica. Se muestra la transición electrónica inducida por absorción de un fotón y posterior emisión fluorescente.

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. 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 . En el proceso de conversión interna la energía es transferida desde un punto en la hipersuperficie de la 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 S_1 , se disipa a través de una relajación vibracional y el sistema alcanza un estado en equilibrio S_1 , de la molécula. La fluorescencia se genera a partir de transiciones radiativas en una molécula, entre niveles de la misma multiplicidad [2]. La emisión ocurre como resultado de la transición de la molécula desde S_1 al estado S_0 .

Espectroscopía de fluorescencia láser

A continuación examinaremos de forma simple las características de la radiación láser, que hacen del láser un instrumento valioso y efectivo en la espectroscopía óptica [3].

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 μ m, haciendo posible estudiar casi cualquier transición cuántica de átomos y moléculas.

2. 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.

3. 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 espectroscopía que son una adecuada resolución espacial y temporal, así como sensibilidad y selectividad.

2. METABOLISMO CELULAR

Células

La célula se considera la unidad estructural y funcional de la vida; 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 [4].

La teoría celular es una de las generalizaciones más amplias y fundamentales de la biología y 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.

Las células de las plantas y animales presentan una gran variedad de tamaños, formas, colores y estructuras internas, que guardan relación con las funciones específicas que éstas deben efectuar, pero todas exhiben ciertas características en común. Casi todas las células contienen un núcleo y otras estructuras internas llamadas organelos. Además, las células vivas están integradas por moléculas inanimadas [5]. 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.

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 tienen 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.

Metabolismo

El metabolismo puede definirse como la suma total de todas las reacciones enzimáticas que tienen lugar en la célula. Las funciones específicas principales del metabolismo [5] son: 1) la obtención de energía química de las moléculas combustibles o de la luz solar absorbida, 2) el ensamble de sillares de construcción para formar proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros componentes celulares y, 3) 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 las 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, CO_2 , amoníaco o urea. 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 ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y polisacáridos a partir de sus precursores sencillos.

Enzimas-coenzimas

Las 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, mucho mayor que la de los catalizadores hechos por el hombre. La actividad de algunas enzimas depende solamente de su estructura como proteínas, mientras que otras necesitan además, uno o más componentes no proteícos, llamados cofactores; éstos pueden ser un ion metálico, o una molécula orgánica llamada coenzima, aunque algunas enzimas necesitan de ambos. Por lo general, las coenzimas actúan como transportadores intermediarios de grupos funcionales, de átomos específicos o de electrones, los cuales son transferidos en la reacción enzimática global.

Un proceso metabólico determinado puede necesitar varias enzimas o inclusive todo un sistema enzimático, para llevarse a cabo. Los diferentes enzimas y sistemas enzimáticos están localizados, en uno u otro organelo o en alguna parte de la estructura del citoplasma.

Las enzimas de óxido-reducción actúan en el centro del metabolismo celular energético. La energía liberada en la oxidación o reducción por compuestos orgánicos es capturada con eficiencias variables en formas muy diversas, tales como ATP, potenciales de membrana, o coenzimas reducidas.

Las deshidrogenasas, enzimas de óxido-reducción, necesitan como coenzimas al NAD (dinucleótido de adenina y nicotinamida) o al NADP (dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato). Las deshidrogenasas NAD-dependientes, intervienen de manera primordial en la transferencia de electrones desde los sustratos hasta el oxígeno, en la respiración metabólica, proceso a través del cual obtiene energía la célula

La utilidad del NAD⁺ (+ por su forma oxidada) y del NADP⁺ para propósitos de análisis enzimático depende de algunas de sus inusuales propiedades [6]. 1) Sirven como agentes naturales de oxidación o reducción en una amplia variedad de sistemas enzimáticos específicos. Con la enzima apropiada como catalizador, pueden oxidar o reducir selectivamente un sustrato particular en presencia de otros muchos compuestos. 2) Las formas reducidas NADH y NADPH, además de absorber luz en el cercano UV, son fluorescentes, mientras las formas oxidadas no lo son. NADH y NADPH tienen bandas de absorción idénticas, con el máximo en 340 nm, NAD⁺ y NADP⁺ no absorben a esta longitud de onda. De esta forma, los cambios en el estado de oxidación o reducción pueden ser medidos por espectroscopía de fluorescencia.

3. INTERACCIÓN LÁSER-CÉLULAS

Desde el punto de vista molecular, cuando la radiación electromagnética incide sobre las 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 los 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. Una vez que las moléculas que constituyen las células se han excitado, puede ocurrir algún proceso de desexcitación, radiativo o no radiativo. Nosotros trabajamos en los procesos de desexcitación radiativos y en particular en el fluorescente.

R. R. Alfano *et al.*, trabajaron inicialmente en dientes con y sin caries analizando espectroscópicamente la dispersión, la fluorescencia y absorción [7]. También midieron la fluorescencia de células normales y células cancerosas de riñón de rata, encontrando diferencias substanciales en los espectros [8]. Ellos proponen a las flavinas como responsables de la fluorescencia (a nivel mitocondrial), en especial al dinucleótido de adenina y flavina (FAD). Usaron como longitud de onda de excitación la línea $\lambda = 488$ nm del láser iónico de argón.

Una revisión de los fluoróforos responsables de la fluorescencia de las células, se encuentra en S. Andersson-Engels *et al.* [9], 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), a la elástina y a la colágena (a 380 nm), NADH (a 470 nm), a las flavinas (a 520 nm), a la melanina (a 540 nm) y finalmente, a las porfirinas (en la región roja del espectro).

En nuestro caso, trabajamos, con células sanguíneas, en particular leucocitos mononucleares que se componen únicamente de linfocitos y monocitos. 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. Tampoco tenemos melanina, presente principalmente en la coroides y la piel. Las porfirinas constituyen esencialmente los citocromos y la hemoglobina, por lo que no están pre-

sentos en nuestras muestras celulares. Al triptófano no lo podemos excitar con los láseres que empleamos. Por lo tanto, nuestro trabajo se centra en el estudio espectroscópico del NADH, un fluoróforo intracelular, para intentar monitorearlo dentro de las células vivas en donde realiza su función específica de importancia fundamental en procesos metabólicos energéticos.

4. ARREGLO EXPERIMENTAL

Al abordar el trabajo de espectroscopía de fluorescencia láser en células vivas, en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, empezamos desde el armado del sistema de espectroscopía, para 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 espectroscopía consta esencialmente de una fuente de luz de excitación, un monocromador (rejilla de difracción), un detector de luz, un analizador y procesador de la señal eléctrica, un aparato de registro (hardware y software), celdas para colocar la muestra (microcelda), óptica de enfocamiento (lentes, espejos, etcétera) [10].

Utilizamos dos fuentes de luz de excitación, un láser de nitrógeno molecular (N₂) y un láser de Nd:YAG triplicado en frecuencia. El láser de nitrógeno que usamos en este trabajo se construyó en el laboratorio de óptica cuántica [11], del área de Fenómenos Ópticos y Transporte de la Materia, del Departamento de Física de la UAMI. Proporciona una fuente de luz que puede usarse para excitar a la muestra y también para iniciar el procesamiento de la señal (*trigger*), a través de un fotodiodo.

Sus principales características son: longitud de onda de emisión 337.1 nm, energía por pulso máxima 0.32 mJ, variación de energía entre pulsos hasta 10% y repetición de pulsos hasta 5 Hz (variable).

El láser de Nd: YAG es marca Lumonics de emisión pulsada a 355nm, energía por pulso máxima de 90 mJ y repetición de pulsos hasta 20 Hz (variable). En el arreglo [12] utilizamos un monocromador Pacific Instruments, modelo MP1018B, el cual usa una configuración Czerny-Turner. La rejilla de difracción es de 1,180 líneas/mm, que permite un barrido de longitud de onda desde 200 a 1,000 nm. La resolución es de menos de 0.1 nm. Como detector de luz se empleó un fotomultiplicador Hamamatsu, modelo IP21, con un rango de detección de 300 a 650 nm, con fotocátodo de Sb-Cs y ventana de borosilicato.

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 o “disparo” de entrada (*trigger*). El aparato consiste esencialmente de un generador de ventanas (*gate*), un integrador de ventana rápido y un promediador exponencial móvil [14].

Como contenedores de las células empleamos microceldas marca American Instrument Company, modelo J4-8114 y J4-8137, de cuarzo (que evita absorción de luz en el UV) con capacidad de 210 y 825 μ l y con trayectoria óptica de 3 y 5mm, respectivamente. El arreglo completo puede apreciarse en la figura 2.

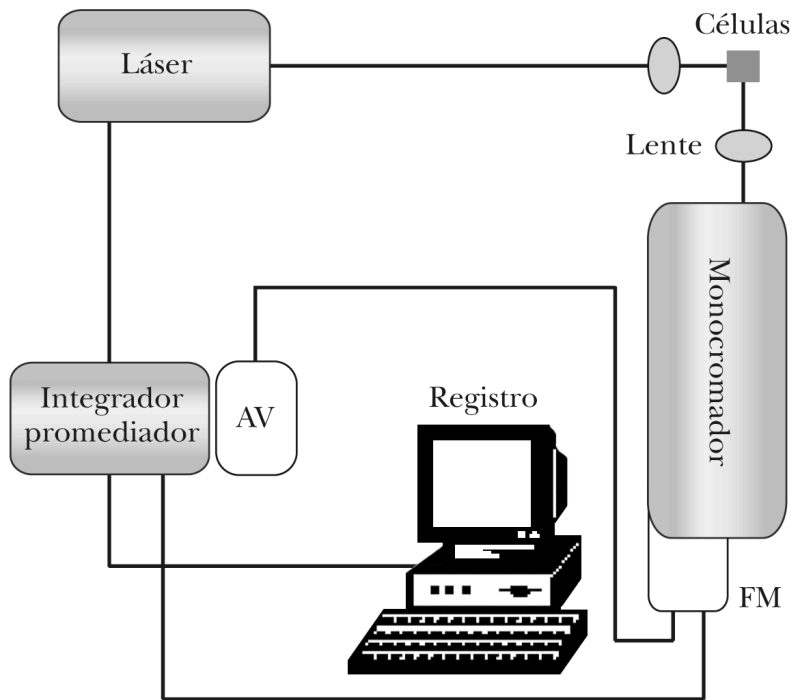


Figura 2. Arreglo experimental. FM representa al fotomultiplicador y AV la fuente de alto voltaje.

Preparación de las muestras

Se obtuvieron muestras de células mononucleares de sangre rata de la cepa *wistar*, que fueron separadas de las otras células sanguíneas por la técnica de centrifugación con gradiente de densidad. Primero se anestesia al animal 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 de centrifugación se coloca el gradiente de densidad, marca Nycodenz [15] para células animales con densidad 2.1 gr/ml y osmolaridad de 265 mOsmol; se agrega la sangre con cuidado, de tal forma que no penetre el gradiente. Se centrifuga 15 minutos a 2,500 rpm. Con una pipeta Pasteur se extrae la capa de células mononucleares, se colocan en solución salina para lavado biológico, a través de un nuevo proceso de centrifugación durante diez min. a 3,000 rpm. Finalmente se colocan en solución fisiológica para su estudio.

Resultados

Para calibrar nuestro sistema de espectroscopía se empezó obteniendo espectros de fluorescencia de cristales de halogenuros alcalinos, dopados con impurezas como Eu^{++} [16], así como espectros de pigmentos orgánicos como el stilbene y la rodamina 460 [17]. Se registraron los espectros de absorción y fluorescencia de las coenzimas NADH y FAD en solución acuosa, para corroborar sus características principales con nuestro sistema. En la figura 3 se muestra el espectro de fluorescencia de moléculas de la coenzima NADH.

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica ampliamente usada en biología y medicina, ya que proporciona información útil acerca de sustratos biológicos, tanto de sus propiedades físico-químicas, como de la cantidad de sustrato presente. Sin embargo, las muestras de tejido celular presentan dos problemas cuando son analizadas usando esta técnica. Por un lado, los fluoróforos presentes en el tejido tienen bandas de absorción y emisión parcialmente traslapadas, lo que limita las

medidas cuantitativas de fluoróforos específicos [18]. Por otro lado, la fuerte dispersión exhibida por el tejido también distorsiona estas medidas. Un inconveniente en óptica biomédica ha sido encontrar una forma eficiente de evitar estos problemas [19].

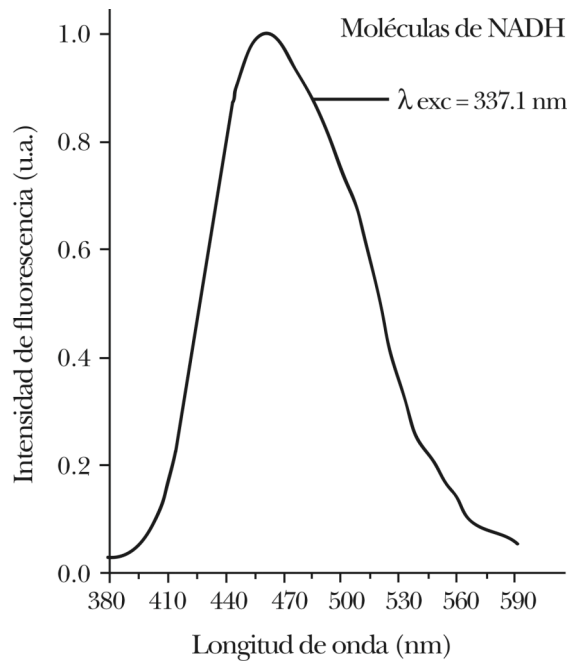


Figura 3. Espectro de fluorescencia de la coenzima NADH purificada en solución acuosa, pH = 7.2, concentración de 10^{-4} a temperatura ambiente.

Se intentó mejorar la obtención de esta información, empleando la espectroscopía de fluorescencia inducida por láser (LIF) (del inglés *laser induced fluorescence spectroscopy*) para ser más selectivos en la excitación de una molécula, y eligiendo un tipo específico de tejido sanguíneo, para evitar tener varios fluoróforos en las muestras. Esto se logró empleando el láser de N_2 como fuente de exci-

tación y se obtuvieron espectros de una sola molécula el NADH dentro de la célula. Sin embargo, se obtuvo poca intensidad de la señal de fluorescencia, probablemente por la fuerte dispersión de la luz debida a la concentración celular y por que, al parecer, no se excitaba al NADH eficientemente. En la figura 4A se puede apreciar un máximo de fluorescencia alrededor de 440 nm y otra estructura con un máximo probable alrededor de 455 nm. En la figura 4B se obtuvieron cinco espectros bajo las mismas condiciones experimentales, para considerar la posibilidad de que la velocidad de sedimentación de las células afectase la intensidad de la señal obtenida. El experimento muestra que es posible realizar las mediciones sin que los efectos de sedimentación sean significativos [20].

En una segunda etapa se decidió emplear el láser de Nd:YAG, debido principalmente a que la literatura especializada propone el rango de excitación entre 340 y 350 nm, para mejorar la eficiencia de excitación del NADH dentro de la células [21]. Además se trata de un láser comercial con un sistema eléctrico mediante el cual genera un pulso eléctrico de salida, que se empleó directamente para iniciar (*trigger*) el procesamiento de la señal en el integrador-promediador .

En la figura 5A se muestra el espectro de fluorescencia del dinucleótido NADH en células vivas de rata. La viabilidad celular se constató observando las células en la cámara de Neubauer en azul de tripano con el microscopio de contraste de fase; normalmente obtuvimos una viabilidad del 95%. Esta señal se suavizó y se promedió con cuatro diferentes muestras celulares. Se puede observar el máximo alrededor de 444 nm, pero también se encuentra una estructura cerca de los 465 nm y quizá otra alrededor de los 408 nm.

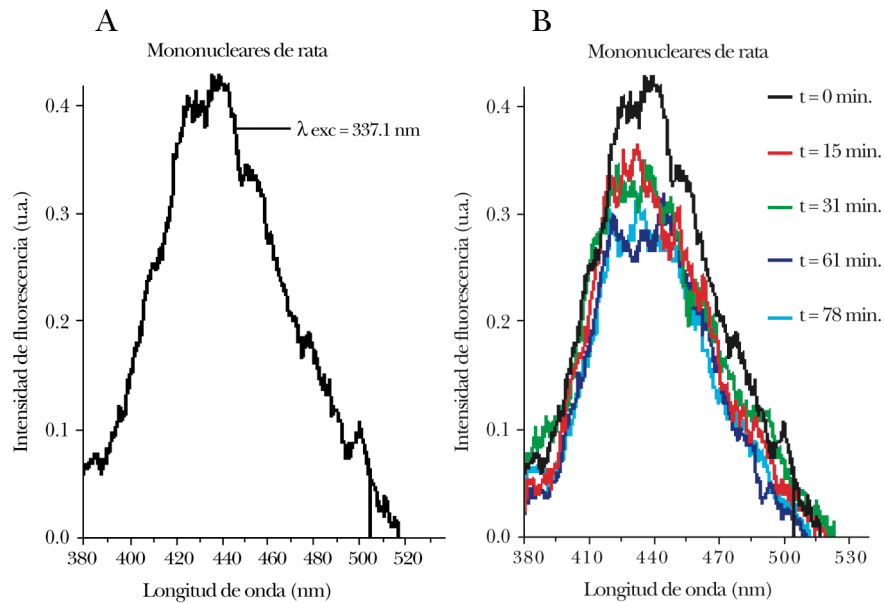


Figura 4. Espectro de fluorescencia de células mononucleares en solución fisiológica, pH=7.4 a temperatura ambiente. A) espectro inicial, B) espectros tomados a tiempos posteriores para evaluar la velocidad de sedimentación de las células.

La figura 5B es un primer intento por ajustar la señal de fluorescencia celular, con una curva de doble gaussiana, cuya deconvolución exhibe un máximo en 446 nm y otro en 462 nm. Se sabe que la molécula de NADH se encuentra en dos estados dentro de las células: unida a la enzima (como coenzima realizando su función metabólica con la enzima) o separada de ésta (sólo como un sustrato). Cuando se encuentra unida el máximo de la señal de fluorescencia se corre hasta 25 nm hacia el azul, es decir, menores longitudes de onda [22]. Esto sugiere que si podemos encontrar la razón NADH unido a NADH libre, podremos conocer de manera indirecta y en cierto grado, el estado metabólico de las células [23, 24].

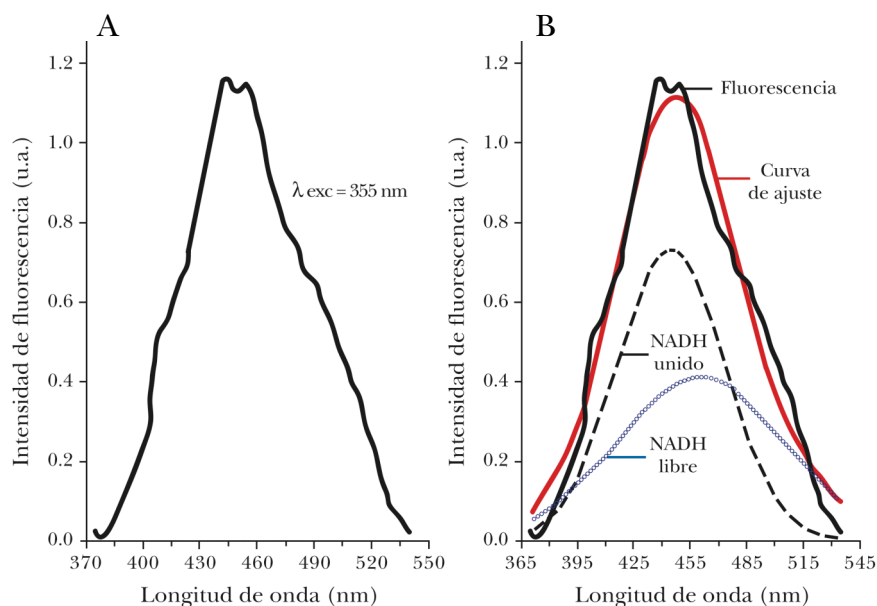


Figura 5. Espectro de fluorescencia del dinucleótido NADH en células vivas de rata en solución fisiológica, pH=7.4 a temperatura ambiente. A) espectro suavizado y promediado con cuatro diferentes muestras celulares. B) ajuste mediante una curva doble gaussiana de la señal de fluorescencia y su deconvolución

en dos gaussianas.

Empleando este proceso de deconvolución obtuvimos razones NADH unido a NADH libre del orden de 1.2, lo cual sugiere una cantidad mayor de moléculas de NADH unidas a la enzima realizando su función metabólica.

CONCLUSIONES

En una primera etapa se mostró que es posible hacer mediciones de LIF con un láser de N_2 . El resultado principal es que el tiempo (o los efectos) de sedimentación no intervienen significativamente durante el registro de los

espectros. Sin embargo la razón señal-ruido y la longitud de onda de excitación no son óptimos. La utilización de un láser de NdYAG resuelve parcialmente estos problemas. Este procedimiento permite medir la razón de NADH unido/NADH libre, lo cual proporciona información metabólica de la célula. Debido al papel clave que juega el NADH en el metabolismo energético de las células, ha sido estudiado ampliamente con técnicas bioquímicas; sin embargo, estas técnicas implican la destrucción del tejido, por lo cual no es posible estudiar el NADH en su función natural.

El NADH puede encontrarse en dos estados: libre en el citoplasma y la matriz mitocondrial o unido a enzimas, como en la cadena respiratoria. El conocimiento de los mecanismos detallados del metabolismo energético requiere la cuantificación, no solo del NADH total como tradicionalmente se presenta, sino también de las fracciones unida y libre de la enzima [23]; por lo anterior, se ha realizado un trabajo bioquímico intenso para conocer la razón NADH unido/NADH libre. Sin embargo, el avance ha sido lento debido a las limitaciones que presentan distintas técnicas bioquímicas. En los últimos años, se ha empleado la técnica de espectroscopía de fluorescencia, la cual hace uso de las propiedades de autofluorescencia del NADH. Esta técnica permite monitorear el NADH *in situ*, esto es, respetando la integridad física de las células lo que permite observar los cambios en su concentración ante diferentes estados metabólicos de las células.

Empleando muestras purificadas de NADH y enzimas a las cuales se une éste, se ha mostrado un cambio en el espectro de emisión de la forma unida con respecto a la forma libre [22]. Esta propiedad del NADH se empleó en éste trabajo para discriminar entre su forma unida ó

libre en células intactas y obtener así la relación NADH unido/NADH libre. Nuestros resultados y análisis indican una relación aproximada de 1.2 : 1; esto es, que las formas libre y unida del NADH se encuentran en porcentaje similar. Este resultado es consistente con el trabajo publicado recientemente por Vishwasrao H. D. *et al.* (2005). En su caso se emplean técnicas de fluorescencia y decaimiento anisotrópico en neuronas del hipocampo, reportan una razón de 1.2 bajo condiciones experimentales similares, en ausencia de gas carbónico en la solución extracelular [25]. Estos resultados podrían sugerir que la relación NADH unido/NADH libre se conserva bajo circunstancias ambientales similares independientemente del tipo celular.

El auge reciente en la medición del NADH con técnicas de espectroscopía de fluorescencia, no se ha limitado a la posibilidad de estudiar el metabolismo energético en condiciones normales, sino también en condiciones patológicas como el cáncer. En diferentes tipos de neoplasias, se ha observado un decremento en la intensidad del espectro de fluorescencia, con respecto al tejido normal; estos resultados podrían explicarse por hipoxia de las células cancerosas, por aumento de la razón de consumo oxígeno/riego vascular, o bien, por alteración del metabolismo energético concomitante que presentan las células neoplásicas. Estos estudios fluorométricos del NADH total han dado resultados alentadores para el diagnóstico de diferentes tipos de cáncer; sin embargo, no permiten conocer en detalle las alteraciones asociadas en la maquinaria bioenergética. El estudio de la relación NADH unido/NADH libre ayudará a comprender y diagnosticar las alteraciones en el metabolismo energético de las células neoplásicas.

REFERENCIAS

- [1] J. Morcillo-Rubio, J. M. Orza-Segade, *Espectroscopía*, Alhambra, S.A., 1972 (cap. 1).
- [2] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, 1983 (cap. 1).
- [3] V. S. Letokhov, *Laser analytical spectrochemistry*, IOP Publishing Ltd., 1986 (cap. 1 y 6).
- [4] C. A. Ville, E. Peal Solomon, P. William Davis, *Biología*, Nueva Editorial Interamericana, 1987 (cap. 4).
- [5] A. L. Lehninger, *Bioquímica*, Ediciones Omega, S.A., 1982 (cap. 1 y 9).
- [6] J. V. Passonneau, O. H. Lowry, *Enzymatic Analysis*, The Human Press Inc., 1993 (cap.1).
- [7] R. R. Alfano, *et al.*, *IEEE Journal of Quantum Electronics*, QE-20, 12 (1984) 1512-1515.
- [8] R. R. Alfano, *et al.*, *IEEE Journal of Quantum Electronics*, QE-20, 12 (1984) 1507-1511.
- [9] S. Andersson-Engels, *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, 53, 6 (1991) 807-814.
- [10] C. L. Bashford, D. A. Harris, *Spectrophotometry & Spectrofluorimetry*, IRL Press Limited, 1987.
- [11] M. Fernández G. *et al.*, *Rev. Mex. Fís.*, 38, 4 (1992).
- [12] Manual de operación del monocromador, *Pacific Instruments*.
- [13] Catálogo de información de tubos fotomultiplicadores, *Hamamatsu*, Oct/90.
- [14] Manual de operación del boxcar, *Stanford Research Systems*.
- [15] Panfleto comercial, *Isolation of blood cells*, *Nycomed Pharma*.
- [16] J. Rubio O., *Ciencia*, 37 (1986) 169-184.
- [17] Panfleto comercial, *Exiton laser dyes*, *Exiton, inc*, 1992.
- [18] T. G. Papazoglou, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 28 (1995) 3-11.
- [19] R. Richards-Kortum, E. Sevick-Muraca, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 47 (1996) 555-606.
- [20] A. Silva Pérez, *Espectroscopía de Fluorescencia Láser en Leucocitos de Humano*, Tesis de Maestría, UAM-Iztapalapa, Mayo 1999.
- [21] M. Monici, *et al.*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 30, 29-37 1995.
- [22] J. M. Salmon *et al.*, *J. Chimie Physique*, 74, 2 (1977) 239-245.
- [23] J. M. Salmon *et al.*, *Photochem Photobiol.* 36 (1982) 585-593.
- [24] A. C. Croce *et al.*, *Photochem. Photobiol.* 69 (1999) 364-374.
- [25] H. D. Vishwasrao *et al.*, *J. Biol. Chem.* Vol 280, No 26, (2005) 25119-25126.