



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

*Validación de una técnica de microscopía de
fluorescencia cuantitativa para medir
simultáneamente cambios en el volumen celular
acuoso y en el pH intracelular*

Tesis que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo
presenta:

José Jaime Herrera Pérez

Director de tesis: Dr. Francisco Javier Álvarez Leefmans
Asesor de tesis: Q.F.B. Ma. de los Ángeles Vidal Millán

México, D. F.

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis Padres

Quiero decirles que la meta lograda es de ustedes, ya que es el resultado del enorme esfuerzo que realizaron para apoyarme durante todos mis estudios, alentándome siempre a seguir adelante.

A Sandra e Itzel

Son el motivo que me impulsa a seguir adelante.

A mis hermanos

Porque siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados y al Instituto Nacional de Psiquiatría "Dr. Ramón de la Fuente Muñiz" por las facilidades brindadas para realizar este trabajo.

Al Dr. Fco. Javier Álvarez Leefmans por la oportunidad de desarrollar esta tesis en el laboratorio a su cargo, brindándome lo necesario y guiándome durante todas las fases del proyecto.

A la Q.F.B. María de los Ángeles Vidal Millán por sus recomendaciones y guía en el desarrollo de la tesis.

Al Ing. José Rodolfo Fernández Calderón por el apoyo técnico brindado.

Al Q.F.B. René Garduño Gutiérrez por proveerme de células durante todo el trabajo experimental de esta tesis.

A mis compañeros Andrés y Sergio por sus acertados comentarios.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	7
¿Por qué son importantes el pH intracelular y el volumen celular acuoso?	7
¿Cómo pueden medirse simultáneamente el pH intracelular y el volumen acuoso en una misma célula?.....	10
MARCO TEÓRICO	13
Validación de un método de medición.....	13
Medición del pH citosólico	17
El colorante fluorescente BCECF	17
Calibración de las señales del BCECF sensibles al pH. Calibración del cociente de fluorescencias	20
Medición del volumen celular acuoso mediante técnicas fluorométricas	25
Calibración del BCECF como un indicador del volumen acuoso	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
HIPÓTESIS	34
OBJETIVOS	35
SOLUCIONES EXPERIMENTALES	37
Determinaciones <i>in vitro</i>	37
Determinaciones en el interior celular	37
Calibración del cociente de las fluorescencias del BCECF intracelular	38
Método de puntos nulos	38

Método de alto K ⁺ y nigericina.....	39
<i>MATERIAL BIOLÓGICO</i>	41
<i>MEDICIONES DE LAS SEÑALES DE FLUORESCENCIA</i>	43
Determinaciones en la celda espectrofotométrica	43
Determinaciones en la cámara de experimentación y en el interior celular.....	44
<i>PROTOCOLOS</i>	47
Espectros de excitación del BCECF a diferente pH: Determinación del "punto isobéptico"	47
Determinación del punto isobéptico en celda	47
Determinación del punto isobéptico en la cámara de experimentación sin células	48
Determinaciones en el interior celular.....	50
Determinación del punto isobéptico en el citoplasma.....	53
Espectros de excitación del BCECF a diferentes concentraciones. Cociente de fluorescencias versus concentración del colorante	55
Determinaciones en la celda espectrofluorométrica	55
Determinaciones en la cámara de experimentación sin células	56
Linealidad del sistema de medición.....	57
Comparación de los métodos de calibración de las señales del BCECF sensibles al pH.....	58
Método de los puntos nulos.....	59
Método de alto K ⁺ y nigericina.....	60
Calibración <i>in vitro</i> . Método de diluciones recíprocas.....	60
Medición paralela de cambios en el volumen celular acuoso y en el pH intracelular	61
Transformación de los cocientes de fluorescencia en valores de pH intracelular	62
Transformación de las señales de fluorescencia a cambios en el volumen celular acuoso	62
Corrección de la deriva de los registros	64
Estado estacionario.....	69
Obtención de la fracción de fondo (F _b).....	70
Transformación de las señales fluorescentes en cambios del volumen celular acuoso	71
Precisión y exactitud de las determinaciones del VCA usando al BCECF como indicador.....	73

RESULTADOS	75
Propiedades espectrales del BCECF en una celda espectrofluorométrica. Determinación del punto isosbético	75
Propiedades espectrales del BCECF en la cámara de experimentación sin células. Determinación del punto isosbético	77
Propiedades espectrales del BCECF en el citoplasma de células vivas. Determinación del punto isosbético <i>in vivo</i>	79
¿Es el cociente de dos fluorescencias del BCECF independiente de la concentración del colorante?	83
Estudio del cociente de fluorescencias en el espectrofluorómetro	83
Estudio del cociente de fluorescencias en la cámara de experimentación.....	90
Determinación de la linealidad y del rango del sistema de medición.....	93
Comparación de los métodos de calibración del cociente de fluorescencias del BCECF.....	96
Efecto que tiene el tamaño y la posición de la región de registro sobre las medidas fluorescentes	101
¿Cuál es el tamaño óptimo de la región de registro para medir las señales fluorescentes?	101
¿Cuál es la posición ideal de la región para obtener las mejores señales fluorescentes?.....	103
Precisión del método para las determinaciones de volumen	105
Exactitud del método para las determinaciones de volumen	107
Determinación simultánea de los cambios en el volumen celular acuoso y en el pH intracelular ..	108
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	111
Propiedades espectrales del BCECF libre	112
Los aditamentos ópticos no tienen efecto sobre las propiedades espectrales del BCECF.....	113
El medio ambiente intracelular no afecta las propiedades espectrales del BCECF.	114
El cociente de fluorescencias es un indicador selectivo del pH.....	115

La relación lineal entre la fluorescencia y la concentración del colorante es importante para medir selectivamente al pH.....	116
La ordenada al origen de la relación entre la fluorescencia y la concentración del colorante es importante para medir selectivamente al pH.....	118
El cociente de fluorescencias es un indicador selectivo del pH intracelular.....	122
Linealidad y rango útil de la relación entre la fluorescencia del BCECF y su concentración.....	123
La calibración del cociente de fluorescencias <i>in vitro</i> es más adecuada que la calibración con alto K^+ /nigericina.....	127
El tamaño y la posición de la región de registro alteran la resolución del método para medir cambios en la intensidad fluorescente.....	132
Precisión.....	134
Exactitud.....	135
CONCLUSIONES	137
APÉNDICE	141
I. Comparación del pH medido con el potenciómetro y el predicho por la ecuación de Henderson-Hasselbalch.....	141
II. Derivación de la ecuación para la transformación de las señales de fluorescencia a volumen celular acuoso.....	145
III. Calibración de puntos nulos.....	151
REFERENCIAS	159

ABREVIATURAS

PI	Punto isobéptico
λ	Longitud de onda
λ_1	Longitud de onda de excitación que produce la fluorescencia sensible al pH
λ_2	Longitud de onda correspondiente al PI
u. a.	Unidades arbitrarias
nm	Nanómetros
VCA	Volumen celular acuoso
pH_i	pH intracelular
pH_e	pH en el exterior celular
π_0	Presión osmótica de la solución control
π_T	Presión osmótica de la solución experimental (de calibración o de prueba)
F_T	Fluorescencia en el estado estacionario de un pulso experimental
F₀	Fluorescencia en el estado estacionario basal
F_t	Fluorescencia al tiempo "t"
F_b	Fracción de fondo. Fracción del colorante osmóticamente inactiva
CF	Cociente de dos fluorescencias del colorante
V₀	Volumen en el estado estacionario basal
V_T	Volumen en el estado estacionario de un pulso experimental
V_t	Volumen al tiempo "t"
b	Ordenada al origen
\bar{x}	Media
DE	Desviación estándar
% CV	Porcentaje de coeficiente de variación
pH_N	pH nulo. pH _i teórico al cual la entrada de el ácido y la base débiles no provocan cambios netos en la concentración de H ⁺ intracelulares.

INTRODUCCIÓN

¿Por qué son importantes el pH intracelular y el volumen celular acuoso?

La integridad funcional de una célula depende de muchos factores, entre los que destacan el control del pH intracelular (pH_i) y el del volumen celular acuoso (VCA). Prácticamente no existe proceso celular que no sea o pueda ser influido por el pH. Así, la concentración intracelular de iones hidrógeno (H^+) afecta procesos celulares fundamentales como la generación de ATP por las mitocondrias a través de gradientes de H^+ (Mitchell, 1961), el crecimiento y diferenciación celulares, el transporte de sustancias a través de la membrana plasmática, la excitabilidad, la contracción muscular y muchas otras (Putnam, 1998). En la mayoría de las células animales, el pH_i en condiciones basales es de 6.8 a 7.2 cuando el pH extracelular (pH_e) es de 7.3 a 7.4 y el potencial de membrana (E_m) se encuentra en el rango de -30 a -90 mV. Si se tomara a una de estas células, se le bañara en una solución de pH 7.3 y se fijara su pH_i en 7.0, el potencial de equilibrio de los H^+ (E_H) sería de -18 mV; de esta manera los H^+ se encontrarían en equilibrio termodinámico a través de la membrana sólo si el E_m fuese igual al E_H . Ahora, si se tomara a otra célula y se fijara su E_m en -60 mV y el pH_e en 7.3, el pH_i calculado para el equilibrio termodinámico de los H^+ sería de 6.3. Es evidente que el H^+ está fuera de equilibrio termodinámico, es decir, el H^+ no se encuentra distribuido pasivamente a través de la membrana. Este desequilibrio termodinámico es generado y mantenido por

proteínas especializadas (sistemas de transporte) que se encuentran principalmente en la membrana plasmática. En la mayoría de los casos, estas proteínas transportadoras trabajan acopladas al flujo de otros iones que tienen "peso" o "presencia" osmótica tales como el Na^+ , el K^+ y el Cl^- , lo que relaciona estrechamente a la regulación del pH_i con la del equilibrio hidrosmótico. Un ejemplo de ello es el intercambiador Na^+/H^+ , una proteína con varias isoformas que se localiza en la membrana plasmática. En condiciones fisiológicas el intercambiador Na^+/H^+ en cada ciclo expulsa de la célula un H^+ a cambio de introducir a la misma un Na^+ . Mientras que el movimiento de un H^+ no tiene "peso osmótico" significativo a nivel macroscópico debido a la presencia de tampones intracelulares, la ganancia de Na^+ por la célula sí lo tiene.

El control del contenido de agua celular, es también fundamental para la supervivencia de las células. Constituye una de las funciones homeostáticas celulares más antiguas desde el punto de vista evolutivo. Se especula que apareció cuando las macromoléculas (ej. las nucleoproteínas) se rodearon de una membrana plasmática semipermeable que las aislase y protegiese del medio externo, creando un microambiente especializado: el medio intracelular. La consecuencia de esta adaptación evolutiva fue la distribución asimétrica de macromoléculas cargadas negativamente, a las cuales la membrana es impermeable. Esto resultó en la generación de fuerzas a través de la membrana plasmática (fuerzas de Donnan) que tienden a producir edema (hinchamiento) coloidosmótico en las células

animales, que además de ser permeables al agua, carecen, a diferencia de las vegetales, de una pared celular rígida. Para neutralizar el efecto Donnan, las células animales desarrollaron mecanismos que le permiten mantener constante su volumen acuoso, tanto en medios isosmóticos (con respecto al líquido extracelular) como en medios anisosmóticos. Mediante la operación orquestada de estos mecanismos, las células previenen el hinchamiento osmótico y la lisis. La falla de ellos compromete la integridad estructural de las células y la constancia del medio intracelular, causando alteraciones en la función de los órganos que forman. Estas alteraciones pueden ser letales, tal es el caso del edema cerebral producido por hiperamonemia, como el que ocurre en la insuficiencia hepática aguda. Para las neuronas y las células gliales, que son los principales constituyentes del sistema nervioso, el reto de mantener el equilibrio hidro-osmótico es más crítico aún que en el resto de las células. Esto se debe a que el cerebro y la médula espinal se encuentran contenidos en un estuche óseo rígido. De estas consideraciones se desprende la importancia de estudiar los mecanismos que regulan y mantienen el VCA en células nerviosas y gliales.

Existen evidencias que muestran una relación íntima entre los mecanismos de regulación del pH_i y los del VCA (Gleeson et al, 1990; Bevensee et al, 1999). Sin embargo, esta relación ha sido poco estudiada debido a la carencia de técnicas que permitan la medición simultánea del pH_i y del VCA con suficiente sensibilidad y resolución temporal en células individuales. *El objetivo fundamental del presente*

trabajo fue validar una nueva técnica de microscopía de fluorescencia que permite tales mediciones. Además, se muestran resultados obtenidos utilizando dicha técnica, encaminados a dilucidar el mecanismo mediante el cual el par amonio/amoniaco ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) produce cambios en el pH_i y en el VCA. Para ello se utilizaron células neuronales en cultivo, como un modelo "in vitro". La importancia de la determinación de cambios en el VCA y en el pH_i producidos por el par $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ radica en que éstos son considerados como agentes causales del edema citotóxico (cuya fisiopatología se desconoce) característico de la encefalopatía hepática (EH), un síndrome neuropsiquiátrico que se presenta en diversas patologías que implican un daño hepático agudo o crónico. El edema citotóxico causado por el par $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ es la base del edema cerebral masivo que puede culminar en la herniación del tallo cerebral. La técnica validada en esta tesis provee una herramienta útil para estudiar la fisiopatología de este edema citotóxico.

¿Cómo pueden medirse simultáneamente el pH intracelular y el volumen acuoso en una misma célula?

Para el estudio del pH_i en células individuales se emplea con frecuencia al colorante fluorescente 2',7'-biscarboxietil-5,6-carboxifluoresceína (BCECF), cuya fluorescencia cuando se excita a 505 nm, es muy sensible a cambios en el pH (Rink y Tsien, 1982). Este colorante ofrece muchas ventajas sobre otros que se emplean con el mismo fin, por ejemplo: su pK_a cercano a 7.0; la posibilidad de ser esterificado, lo que permite introducirlo a las células de manera no invasiva; el

hecho de que el colorante esterificado que ha entrado a la célula sea susceptible a la desesterificación por enzimas celulares nativas, lo que conduce a la exposición de sus 4 ó 5 cargas negativas, favoreciendo su retención en el interior celular; finalmente, la característica más relevante para este trabajo: el presentar un punto isobéptico (PI) en su espectro de excitación (ubicado en ~ 440 nm), en el cual la fluorescencia es insensible a cambios en el pH pero sensible a cambios en la concentración del colorante.

Al ser independiente del pH, la fluorescencia del BCECF en el punto isobéptico puede utilizarse como un indicador exclusivo de la concentración del colorante y por lo tanto, puede emplearse para medir cambios en el VCA (ver adelante). De esta manera, el BCECF puede usarse como indicador de cambios en el pH_i y en el VCA de manera simultánea. Esto se logra excitando alternadamente al colorante (previamente introducido a la célula) a 495 nm y a la longitud de onda (λ) correspondiente al PI (~ 440 nm); el cociente de estas dos fluorescencias reflejará los cambios en el pH_i , mientras que la fluorescencia en el PI reflejará los cambios en la concentración del colorante, lo que permitirá la estimación de cambios en el VCA, mediante una serie de algoritmos desarrollados para otro colorante fluorescente.

MARCO TEÓRICO

Validación de un método de medición

De acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) la validación de un método de medición se realiza con la finalidad de asegurar que una metodología analítica dada sea exacta, precisa, específica y reproducible; además provee una garantía de confiabilidad para el uso rutinario del método en cuestión. Algunas veces la validación se describe como *el proceso de aportar evidencias documentadas de que un método hace aquello para lo cual está diseñado* (Swartz y Krull, 1997)

Para considerar validado un método analítico se requiere que se satisfagan los siguientes criterios:

1. Exactitud. Es el grado de cercanía entre el valor medido y el valor que se acepta como real o el valor teórico. Las medidas de exactitud pueden realizarse por comparación de los resultados obtenidos a partir de una muestra, con aquellos obtenidos a partir de un estándar de referencia, o por comparación con los resultados obtenidos con un segundo método bien caracterizado. En el presente trabajo la exactitud para las determinaciones del volumen se expresa como: $100O/T$, donde O es el valor observado y T el valor teórico. La exactitud para las determinaciones del pH, se evaluó por comparación con un método de referencia.

2. Precisión. Es la medida del grado de repetibilidad de un método analítico bajo operación normal. Generalmente se expresa como el porcentaje relativo de la desviación estándar con respecto a la media para un número n de muestras. En este trabajo se expresó como el porcentaje del coeficiente de variación (C.V.), definido como $100s/\bar{X}$, donde s es la desviación estándar y \bar{X} es la media. Este parámetro debe evaluarse a tres niveles distintos: *repetibilidad*, *precisión intermedia* y *reproducibilidad*.

La *repetibilidad* o *precisión entre ensayos*, se refiere a la variación existente entre los resultados obtenidos con el método en cuestión, en un intervalo de tiempo relativamente corto, manteniendo las mismas condiciones experimentales durante todo el periodo de observación. La *precisión intermedia* se refiere a la variación que existe entre los resultados obtenidos con el método en cuestión en el mismo laboratorio debida a eventos al azar, tales como: diferencias en la duración de los experimentos, cambios de temperatura, de luminosidad, el analista o el equipo, entre otros. La *reproducibilidad* se refiere a la variación que existe entre los resultados obtenidos con el método en cuestión aplicado en diferentes laboratorios. En el presente trabajo solo se evaluó la precisión entre ensayos y la precisión intermedia para las determinaciones del volumen.

3. Especificidad. Es la capacidad del método para medir adecuada y específicamente él o los parámetros de interés en la presencia de elementos que

puedan producir interferencia en las medidas. En esta tesis se evaluó la insensibilidad al pH de la fluorescencia en el PI, que reporta cambios en el VCA así como la insensibilidad del CF (indicador de los cambios en el pH) a los cambios en la concentración del BCECF.

4. Límite de detección. Se define como el cambio mínimo de la variable o parámetro que se va a medir, que el método es capaz de detectar, aunque no sea necesariamente cuantificable.

5. Límite de cuantificación. Se define como el cambio mínimo del parámetro que pueda ser *medido* con el método, de tal manera que sea cuantificable con precisión y exactitud aceptables, bajo condiciones operativas.

6. Linealidad y Rango. La *linealidad* es la capacidad del método para dar medidas que sean directamente proporcionales a la concentración del parámetro en cuestión dentro de un rango dado. En este caso, se estudió la relación existente entre la concentración del BCECF libre y la fluorescencia emitida. La linealidad generalmente se expresa como la varianza de la pendiente de la regresión lineal ajustada a los datos. El *rango* es el intervalo cerrado entre el mayor y el menor nivel del parámetro en cuestión, que se determina con precisión, exactitud y linealidad adecuadas.

7. Reproducibilidad (Ruggedness). De acuerdo con la USP, es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos bajo una variedad de condiciones, expresado como el porcentaje relativo de la desviación estándar. Estas condiciones incluyen diferencias entre laboratorios, analistas, instrumentos, reactivos y periodos experimentales. De acuerdo con la ICH (International Conference on Harmonization), este parámetro queda ya incluido en la precisión, opinión con la que estoy de acuerdo.

8. Robustez. Es la capacidad que tiene un método para no verse afectado por pequeñas variaciones *deliberadas* en las condiciones de operación. Este parámetro evalúa el efecto que tienen sobre las mediciones las variaciones deliberadas de las condiciones experimentales, tales como el porcentaje de solventes orgánicos, el pH, la fuerza iónica o la temperatura.

Es importante destacar que no todas estas pruebas pueden o necesitan evaluarse para considerar validado a un método. Todo depende de la naturaleza y de la finalidad del mismo (Swartz y Krull, 1997). En este trabajo no fue posible evaluar la totalidad de los parámetros descritos, sin embargo se cumplió con las pruebas que demuestran que el método hace aquello para lo que fue diseñado: Exactitud, precisión, especificidad y linealidad.

Medición del pH citosólico

Hace tan sólo un cuarto de siglo, los interesados en medir el pH intracelular (pH_i) sólo se limitaban a obtenerlo a partir de la distribución de ácidos o bases débiles a través de la membrana plasmática, o lo medían directamente con microelectrodos sensibles al pH (Dixon y Wilson, 1995). Este último método podía utilizarse sólo en células "gigantes" como el axón de calamar, las neuronas de caracol u ovocitos de *Xenopus*. A partir de la introducción de colorantes fluorescentes sensibles al pH, comenzando con el BCECF sintetizado por Rink y colaboradores en 1982, estos indicadores han servido como herramienta invaluable para medir el pH_i en células pequeñas, como las que forman los tejidos de los vertebrados. Su uso ofrece enormes ventajas sobre los métodos mencionados anteriormente. La principal de ellas es que permiten la medición continua del pH_i en células individuales pequeñas o aplanadas que no pueden perforarse con microelectrodos sin producirles daño (Bevensee y Boron, 1998). Otra gran ventaja es que los métodos basados en el uso de indicadores fluorescentes son no invasivos o destructivos.

El colorante fluorescente BCECF

El BCECF es el indicador fluorescente que se usa actualmente con mayor frecuencia para medir el pH_i . Presenta su máxima sensibilidad al pH cuando se excita a ~505 nm y su fluorescencia en ese punto es proporcional al pH del medio en el que se encuentra diluido.

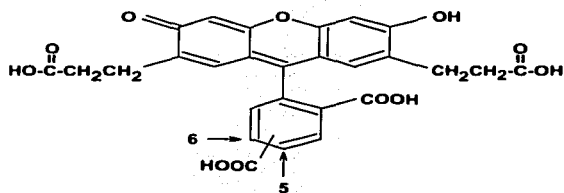


Figura 1. Estructura del colorante fluorescente 2,7-bis(carboxietil)-5,6-dimethylfluoresceína (BCECF).

Como ya se mencionó brevemente, el BCECF tiene varias características que le permiten ser más eficiente en la medición de pH_i que otros colorantes alternativos. Entre ellas destacan:

1. Su pK_a de ~ 7.0 . Dado que el BCECF es un ácido débil cuya fluorescencia depende de su disociación y que el valor de su pK_a es cercano al pH_i fisiológico, la medición de cambios en el pH_i a través de la fluorescencia de este colorante se puede realizar con gran sensibilidad dentro del rango fisiológico de interés (6.4 a 7.8).
2. La posesión de un punto isobéptico ($\sim 440 \text{ nm}$), que como ya se dijo, es la λ de excitación en la cual la fluorescencia del BCECF es insensible a cambios en el pH , esta fluorescencia es útil como un indicador de la concentración intracelular del colorante.

3. Su número de cargas (cuatro o cinco) cuando se encuentra al pH fisiológico. Estas cargas negativas impiden o disminuyen significativamente la salida del colorante de la célula y reducen su compartimentación en estructuras subcelulares. Esto se debe a que al estar cargado eléctricamente, el colorante es hidrofílico (no liposoluble) y por ende es relativamente incapaz de atravesar las membranas celulares, tanto la plasmática como las membranas internas.
4. La posibilidad de introducirlo a la célula de manera *no invasiva*. Para ello, se requiere de la protección de los sitios cargados de la molécula fluorescente del BCECF. Esto se logra fijando grupos acetoxi-metil-éster dando lugar al compuesto BCECF-AM, que no es fluorescente y que por ser lipofílico, gracias a los grupos éster, penetra fácilmente a la célula. Una vez que ha cruzado la membrana plasmática, las esterásas nativas intracelulares hidrolizan los enlaces éster del BCECF-AM, creando la forma iónica y fluorescente, el BCECF, que es prácticamente incapaz de atravesar la membrana celular, por lo tanto se retiene en el interior de la célula.
5. Los cambios en la forma de su espectro de excitación, inducidos por variaciones en el pH del medio en el que se encuentra diluido. Esta propiedad del BCECF permite la medición selectiva del pH_i mediante un cociente de fluorescencias (CF). Esto es, la medición del pH_i empleando el cociente de dos fluorescencias del BCECF, obtenidas cuando éste es excitado

a dos longitudes de onda diferentes (ej: 505 nm y 440 nm), evita los errores debidos a: cambios en la forma celular, salida de colorante, fotoblanqueamiento o apagamiento (Dixon y Wilson, 1995, Bevensee y Boron, 1998).

Calibración de las señales del BCECF sensibles al pH. Calibración del cociente de fluorescencias

La calibración del colorante como un indicador del pH brinda la posibilidad de transformar los valores de CF a valores de pH. Para ello, se registra el CF del colorante diluido en una solución acuosa a diferentes valores de pH conocidos. Esta solución puede estar contenida en una cubeta de espectrofluorimetría, en una cámara de experimentación, o en el líquido intracelular, es decir, en el citosol. Una vez determinado el valor del CF para cada valor de pH, se hace un ajuste no lineal a los datos (ver adelante), con el cual se obtienen parámetros "corregidos" que permiten calcular el pH_i a un tiempo determinado usando la siguiente expresión (James-Kracke, 1992; Boyarski et al 1996):

$$pH = pK_a + \log \frac{CF_t - CF_{min}}{CF_{max} - CF_t} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

$pK_a = pK_a$ del colorante

$CF_t =$ Cociente de las fluorescencias a cualquier tiempo

$CF_{max} =$ Cociente de las fluorescencias al nivel más alcalino

$CF_{min} =$ Cociente de las fluorescencias al nivel más ácido

Existen cuatro métodos para calibrar la señales del BCECF sensibles al pH:

1) *calibración en celda (método "in vitro"); 2) medidas de pH_i independientes de medidas de fluorescencia; 3) la aproximación del método con alto K^+ y nigericina y 4) el método de los puntos nulos.*

En el primer caso se calibra al colorante en un espectrofluorómetro convencional, empleando una solución con una composición parecida al fluido citosólico. Sin embargo, es peligroso extrapolar las señales obtenidas en la celda de un espectrofluorómetro a las que se obtienen en el citosol, dado que es muy probable que las propiedades espectrales del colorante dentro y fuera de la célula sean diferentes. Por lo tanto, la calibración en celda no se considera confiable.

En el segundo método, se obtiene una aproximación más satisfactoria para calibrar al colorante intracelular. En este caso se emplea un método alternativo (no fluorométrico) para obtener una estimación del pH_i en la misma célula o al menos en una célula comparable, posteriormente el pH_i estimado se relaciona con un valor de CF del colorante intracelular. El método alternativo para estimar al pH_i puede ser: el de microelectrodos selectivos a H^+ (Chaillet y Boron, 1984. Nett y Deitmer, 1996) o el de resonancia magnética nuclear (Roos y Boron, 1981). Los microelectrodos son excelentes pero son invasivos, destructivos y sólo pueden usarse en células muy grandes, como las de invertebrados. En lo que toca a la

resonancia, sólo pueden obtenerse calibraciones aproximadas y se tiene la desventaja de que los experimentos se deben realizar bajo condiciones comparables de temperatura y buffer (Bevensee y Boron, 1998) y no permite medidas con resolución temporal adecuada.

En la actualidad, el método de alto K^+ y nigericina es el más comúnmente usado. Éste consiste en exponer a las células a una solución conteniendo *nigericina* y K^+ como el catión predominante. La nigericina es un ionóforo que intercambia H^+ por K^+ (y en menor grado por Na^+) de un sitio de la membrana al otro. En ausencia de Na^+ , la nigericina se comporta como un intercambiador K^+/H^+ y el gradiente químico transmembranal del K^+ ($\Delta\mu_K$) se aproxima al gradiente químico transmembranal del H^+ ($\Delta\mu_H$). El $\Delta\mu_K$ y el $\Delta\mu_H$ se definen como:

$$\Delta\mu_K = RT \ln \frac{[K^+]_i}{[K^+]_e} \quad \text{Ec. 2}$$

$$\Delta\mu_H = RT \ln \frac{[H^+]_i}{[H^+]_e} \quad \text{Ec. 3}$$

donde R es la constante universal de los gases, T es la temperatura en grados Kelvin, $[K^+]$ y $[H^+]$ es la concentración de K^+ y H^+ respectivamente. Los subíndices *i* y *e* se refieren el espacio intra y extracelular, respectivamente. Ahora, si $\Delta\mu_K = \Delta\mu_H$, entonces:

$$\frac{[H^+]_i}{[H^+]_e} = \frac{[K^+]_i}{[K^+]_e} \quad \text{Ec. 4}$$

De aquí se puede deducir que si $[K^+]_e = [K^+]_i$, entonces $[H^+]_i$ se igualará a $[H^+]_e$, lo que implica que el pH_i será igual al pH_e . En la práctica, el método de alto K^+ y nigericina usa soluciones sin Na^+ que contienen nigericina y una $[K^+]_i$ igual a la intracelular, estas soluciones tienen un valor conocido de pH_i y cubren un rango de 5.8 a 8.6 unidades. Se ha demostrado que este método de calibración puede generar errores en la estimación del pH_i , por lo que se le considera sólo como una aproximación (Dixon et al, 1995; Boyarski et al, 1996; Bevenssee et al, 1998; Putnam, 1998). La magnitud de estos errores puede ser hasta de 0.3 unidades de pH (Boyarski et al, 1996).

El cuarto método de calibración es el *método de los "puntos nulos"*. Éste se basa en que al someter una célula a una solución que contiene un ácido (ej. propiónico) y una base débil (ej. amoníaco), la forma eléctricamente neutra de ambos, por ser capaz de atravesar la membrana plasmática, se equilibra a través de la misma (Jacobs, 1940); de manera que, la concentración de la forma eléctricamente neutra tanto de la base como del ácido débil es la misma dentro y fuera de la célula. Mientras la entrada de la especie ácida no cargada producirá un incremento de protones intracelulares (H^+_i), la entrada de la base sin carga causará el consumo de ellos. Tal incremento o disminución H^+_i estará determinada por el efecto del pH_i sobre las partículas neutras que han entrado a la célula. Si la producción y pérdida de H^+_i originados por la entrada del ácido y la base débiles

es de la misma magnitud, entonces el pH_i no se modificará. En este punto, suponiendo que el pK_a del ácido y de la base sea el mismo dentro y fuera de la célula, se puede determinar el valor del pH_i a partir de las concentraciones de las partículas extracelulares no cargadas, utilizando la siguiente expresión (Szatkowski y Thomas, 1986; Boyarsky et al, 1996):

$$pH_i = \frac{pK_{AD} + pK_{BD} + \log \frac{[B]_e}{[HA]_e}}{2} \quad \text{Ec. 5}$$

Donde:

pK_{AD} = pK_a del ácido débil

pK_{BD} = pK_a de la base débil

$[B]_e$ = Concentración extracelular de la forma neutra de la base débil

$[HA]_e$ = Concentración extracelular de la forma neutra del ácido débil

Experimentalmente, esta calibración consiste en exponer las células a diferentes soluciones nulas. Estas soluciones son isosmóticas y cada una contiene una mezcla específica de un ácido y una base débil (mezcla activa) cuyas concentraciones fueron calculadas con base en la Ec. 5 para que a un pH_i teórico, definido en este trabajo como pH nulo (pH_N), la producción y consumo de H^+ ocasionados por la mezcla activa sean iguales. De esta manera, si el pH_i real es igual al pH_N especificado para la solución nula a la cual se somete la célula, entonces no habrá ningún cambio neto en el pH_i . A este hecho se le llama PUNTO NULO y se manifestará experimentalmente como la invariabilidad del valor del CF

del colorante intracelular al cambiar la perfusión de la solución isosmótica a la solución nula.

Si el valor del pH_i estuviese por arriba del valor del pH_N especificado para la solución nula, la mezcla activa provocaría una acidificación celular, ocasionando una disminución del CF del colorante. Por otro lado si el valor del pH_i estuviese por debajo del valor del pH_N , la consecuencia sería una alcalinización del medio intracelular, por lo tanto el valor del CF se incrementaría (Boyarski et al, 1996 y Bevensee et al, 1998).

El método de los “puntos nulos” se considera el mejor método para estimar el pH_i , sin embargo, proporciona información acerca de un sólo punto además de que tiene poca resolución temporal y que la exposición de las células a las soluciones de calibración las puede dañar de manera irreversible. Sin embargo, tiene la enorme ventaja de que puede usarse para corregir el error introducido por el método de alto K^+ y nigericina, de tal manera que utilizando los dos métodos pueden obtenerse medidas del pH_i de la mayor exactitud.

Medición del volumen celular acuoso mediante técnicas fluorométricas

Recientemente se han desarrollado técnicas de microscopía de fluorescencia que permiten determinar cuantitativamente cambios en el volumen celular acuoso

(VCA) de un sólo elemento celular, ocasionados por estímulos fisiológicos tales como neurotransmisores y hormonas; o patológicos como sustancias químicas tóxicas y soluciones anisomóticas. Con estas técnicas es posible resolver cambios en el VCA del 2% o menos. Estas técnicas se basan en que a partir de la medición de cambios en la concentración de un colorante fluorescente impermeante, previamente introducido a una célula, es posible inferir los cambios en el VCA mediante la siguiente relación:

$$VCA = \frac{N_m}{C_m} \quad \text{Ec. 6}$$

Donde:

VCA = Volumen celular acuoso.

N_m = Número de moles del marcador fluorescente en el citosol.

C_m = Concentración intracelular del marcador fluorescente.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

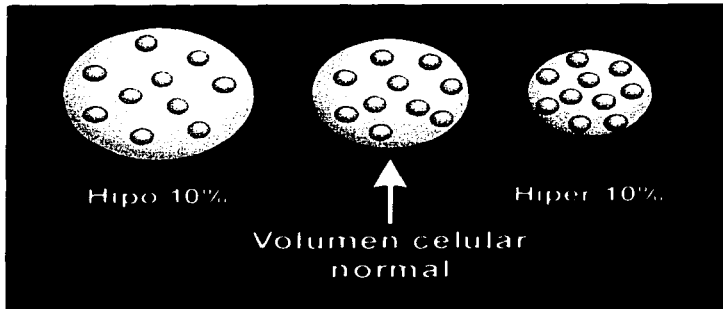


Figura 2. Relación entre la concentración del colorante intracelular y el VCA. Las esferas azules representan la misma célula en tres condiciones diferentes: CENTRO, en condición isomótica; IZQUIERDA en condición 10% hiposmótica; DERECHA, en condición 10% hiperosmótica. Nótese que al mantener constante la cantidad de colorante (esferas naranjas), la concentración intracelular de éste depende de manera inversa del VCA, como lo indica la Ec. 6.

De la Ec. 6 se deduce que si la cantidad de moléculas del marcador (N_m) se mantiene constante, los cambios en el VCA se relacionan de manera inversa a la concentración del colorante en el citosol (C_m) (véase la *figura 2*). Dentro de cierto rango, la fluorescencia emitida por el colorante (F) es directamente proporcional a su concentración (c) y la relación entre ambas puede describirse cuantitativamente por la siguiente expresión derivada de la ley de Lambert-Beer (Alvarez-Leefmans et al, 1995):

$$F = 2.3\phi r \epsilon c d \quad \text{Ec. 7}$$

Donde:

ϕ = Eficiencia cuántica

r = Constante que involucra los factores ópticos de instrumentación.

ϵ = Coeficiente de extinción

d = Espesor de la muestra

Esto indica que si la Ec. 7 se cumple, los cambios en el VCA pueden relacionarse de manera inversa con la fluorescencia del colorante que se ha introducido a la célula. De esta manera, los cambios en el VCA se manifestarán como variaciones en la intensidad de la fluorescencia del colorante debidas a la dilución o concentración del mismo en el agua citosólica. Experimentalmente, el registro de estos cambios de fluorescencia se realiza a partir de una pequeña región de la célula cargada con el fluoróforo, usando un microscopio de fluorescencia

convencional o un microscopio confocal. Tal región se ubica en la zona celular de mayor intensidad de fluorescencia (generalmente en el centro de la célula) y está delimitada por una apertura circular (mecánica o digital) en el plano focal, cuyo diámetro abarca del 3 al 10% del área total de la célula (véase la *figura 3*). La apertura circular digital se emplea solo en sistemas que pueden registrar imágenes de las células por medio de video-microscopía.

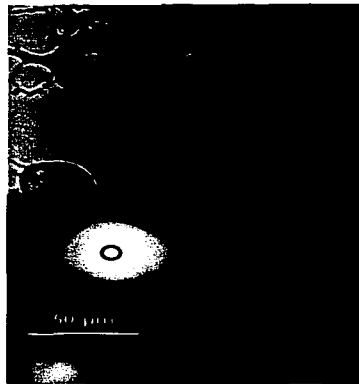


Figura 3. Posición y tamaño típicos de la región usada para medir cambios en el VCA. La fotografía superior muestra un grupo de células NG108-15 observadas con microscopía de contraste de fase. La fotografía inferior muestra el mismo grupo de células, ahora cargadas con un colorante fluorescente, observadas con microscopía de fluorescencia.

Los colorantes fluorescentes que se han empleado para medir cambios en el VCA de varias líneas celulares son: La Calceína, el BCECF y el Fura-2 (excitando a los dos últimos a la λ correspondiente a su punto isosbético). De estos fluoróforos, el que se emplea con mejores resultados, dadas sus propiedades, es la calceína.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La técnica que emplea a la calceína como indicador ha sido validada en varias líneas celulares: glioma C6, Neuroblastoma-Glioma NG108-15, Neuroblastoma N1E-115, fibroblastos NIH3T3 y células de ovario de hámster chino, entre otras. Los cambios del VCA obtenidos empleando esta técnica son consistentes con las medidas de volumen celular inferidas a partir del método de dispersión de luz (que mide cambios de volumen en poblaciones) o el de secciones ópticas obtenidas mediante contraste diferencial de interferencia y video-microscopía (Crowe et al, 1995).

Calibración del BCECF como un indicador del volumen acuoso

Las señales de fluorescencia del colorante intracelular pueden calibrarse para cada célula individual. Esto se logra exponiendo la célula a cambios discretos en la osmolalidad externa, durante los cuales la célula no regule su volumen. En estas condiciones las propiedades osmóticas de las células son lineales, siguiendo la ecuación de Boyle-Van't Hoff (véase la Ec. 8), de manera que cada célula funciona como su propio osmómetro y por ende cada una puede calibrarse "contra sí misma" (Alvarez-Leefmans et al, 1995).

La calibración de las señales de fluorescencia del BCECF sensibles exclusivamente a cambios en el VCA es la misma que se ha descrito para la calceína. En dicha calibración se emplea al cociente F_T/F_0 (fluorescencia relativa), donde F_0 es la fluorescencia de una región de una célula expuesta a una solución

control con una presión osmótica π_0 (solución isosmótica), y F_T es la fluorescencia de la misma región de la célula cuando ésta se expone a una solución de presión osmótica π_T . El gráfico de la recíproca de la fluorescencia relativa (F_0/F_T) como una función del cociente π_0/π_T , rinde una relación lineal que indica que los cambios en la fluorescencia reflejan cambios en el volumen celular. La pendiente de la regresión lineal aplicada a la gráfica F_0/F_T versus π_0/π_T es generalmente menor a la unidad, que es la pendiente esperada para una respuesta osmométrica ideal que se describe por la ecuación de Boyle-Van't Hoff:

$$\frac{F_0}{F_T} = \frac{\pi_0}{\pi_T} \quad \text{Ec. 8}$$

La diferencia entre la pendiente experimental y la respuesta ideal se debe a que no todo el colorante intracelular responde a cambios en la osmolalidad externa. Esto es debido a que hay una fracción del colorante intracelular, denominada en este trabajo *fracción de fondo* (F_b), que se encuentra enlazada a proteínas o atrapada en algún compartimento intracelular y que es insensible a cambios en la osmolalidad externa. Para transformar las señales fluorescentes a cambios en el VCA es necesario sustraer la F_b , que puede obtenerse por permeabilización de la membrana celular con sustancias tales como la digitonina. Sin embargo, el uso de digitonina subestima el valor de la F_b debido a que este agente no sólo permeabiliza a la membrana plasmática sino que también a las membranas internas. Más aún, los poros que la digitonina le hace a la membrana plasmática pueden ser tan grandes que permitan la salida de organelos intracelulares (Ahnert-

Hilger y Gratzl, 1988). Una mejor alternativa para la permeabilización selectiva de la membrana plasmática es la toxina alfa, una proteína secretada por Staphylococcus aureus. Esta toxina forma poros hidrofílicos de 1 a 3 nm de diámetro en la membrana plasmática de varios tipos celulares (Bhakdi y Tranum-Jensen, 1991). Debido a su elevado peso molecular (33,000) y al tamaño pequeño de los poros que forma, la toxina (bajo condiciones controladas) inicialmente sólo permeabiliza la membrana plasmática sin dañar los organelos intracelulares, de manera que la célula se permeabiliza solo para pequeñas moléculas (ej. la calceína). Se ha encontrado que la F_b obtenida por la permeabilización de la membrana con la toxina alfa corresponde a la intersección de la gráfica de F_0/F_t en función de π_0/π_t , con el eje de las ordenadas, por lo que esta intersección se adopta como F_b . (Crowe et al, 1995; Alvarez Leefmans, 1997). Finalmente los cambios relativos en el VCA, que son equivalentes a V_t/V_0 (donde V_t es el VCA al tiempo t y V_0 es el VCA inicial), se calculan empleando la siguiente ecuación (Alvarez-Leefmans et al, 1995):

$$\frac{V_t}{V_0} = \frac{\frac{F_0}{F_t} - F_b}{1 - F_b} \quad \text{Ec.9}$$

Donde:

V_t/V_0 = Volumen relativo al tiempo t

F_0/F_t = Recíproca de la fluorescencia relativa al tiempo t

F_b = Fracción de fondo

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe evidencia de que la regulación y/o el mantenimiento del pH_i y del VCA comparten varios mecanismos de transporte (Gleeson et al, 1990; Bevensee et al, 1999). Esto implica que cambios en el pH_i afectan al VCA y viceversa. A pesar de esta importante relación recíproca, el estudio de los mecanismos que participan en estos dos importantes parámetros de la fisiología celular, generalmente se enfoca de manera aislada, es decir, se estudian la regulación y el mantenimiento del pH_i sin medir el VCA ó viceversa. Como resultado de ello no hay medidas simultáneas de estos dos parámetros en una misma célula por lo que la naturaleza y la importancia de sus interacciones recíprocas se sospecha pero no se conoce. Esto se debe, en gran parte, a la falta de una técnica *validada* para la medición simultánea de cambios en el pH_i y en el VCA.

Se ha sugerido que la técnica de microscopía de fluorescencia cuantitativa que emplea al BCECF para medir el pH_i también puede usarse para medir el VCA. Esto es posible dado que el colorante en su espectro de excitación presenta un punto isobéptico (PI) alrededor de los 440 nm donde su fluorescencia es insensible a cambios en el pH_i pero es sensible a cambios en la concentración del colorante, de manera que puede emplearse como un indicador la concentración citosólica del colorante. De esta manera, el BCECF puede usarse para medir el pH_i y el VCA de

manera simultánea como se indica a continuación: Los cambios en el pH_i se siguen de manera continua registrando el cociente de las fluorescencias resultantes de excitar al colorante a 495 nm y a la λ correspondiente a su PI (~ 440 nm), mientras que los cambios en el VCA se infieren de la fluorescencia del colorante en su PI (Muallem et al, 1992).

HIPÓTESIS

Recapitulando, el BCECF es un colorante cuya fluorescencia es sensible a cambios de pH (excepto en el PI), que posee características muy favorables, tales como un pK_a de 7.0, varias cargas negativas y la posibilidad de ser introducido a la célula de manera no invasiva, que le permiten ser empleado exitosamente como indicador en las mediciones del pH intracelular (pH_i). En principio, es posible usar al BCECF para medir simultáneamente cambios en el pH_i y en el VCA, siempre y cuando sus propiedades espectrales no se afecten, ya sea por el sistema de medición o por las condiciones del medio citosólico, cuyas características fisicoquímicas se conocen de manera incompleta. Por ello, no es suficiente con caracterizar las propiedades del colorante en una celda bajo condiciones conocidas y controlables, sino que hay que estudiarlas *in vivo*, es decir, en el medio intracelular. La hipótesis central de esta tesis es que el BCECF puede usarse para medir simultáneamente pH_i y VCA en células individuales. Para ello es necesario validar el método, esto se logra entre otras cosas, probando la sensibilidad del

colorante al pH_i y determinando sus características espectrales en el interior celular, incluidas desde luego la determinación exacta de su PI *in vivo*, verificando que éste no cambie de valor y si cambia, por cuántos nanómetros lo hace. Una vez que estos puntos hayan sido aclarados, es necesario comprobar que la teoría desarrollada para medir VCA para el caso de la calceína (Crowe et al, 1995; Álvarez-Leefmans, 1995) puede adaptarse para el caso del BCECF.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Validar la técnica de microscopía de fluorescencia cuantitativa que emplea al colorante fluorescente 2',7'-biscarboxietil-5,6-carboxifluoresceína (BCECF) para la medición simultánea de cambios en el volumen celular acuoso y en el pH intracelular y proporcionar ejemplos de su uso.

Objetivos específicos:

1. Demostrar que las propiedades espectrales del BCECF no se alteran de manera significativa por factores instrumentales como son los aditamentos ópticos empleados.

2. Demostrar que las propiedades fisicoquímicas del medio intracelular no afectan de manera significativa a las propiedades espectrales del BCECF. Esto incluye la determinación del PI del BCECF en el interior celular.

3. Comprobar que el coeficiente de las fluorescencias (CF) del BCECF empleado para el seguimiento del pH_i no se afecta por cambios en la concentración del colorante cuando éste se encuentra en el interior celular.

4. Demostrar que las señales de fluorescencia obtenidas cuando se excita al BCECF en su PI son confiables para inferir de ellas los cambios en el VCA mediante los algoritmos empleados en la técnica con calceína.

5. Realizar un estudio de los métodos de calibración de las señales fluorescentes del BCECF que son sensibles al pH.

6. Mostrar un ejemplo del uso del método.

SOLUCIONES EXPERIMENTALES

Determinaciones *in vitro*

Para las determinaciones de los espectros de excitación del BCECF libre, *in vitro*, se emplearon soluciones con la siguiente composición:

Sustancia	Solución base de pH 6.4	Solución base de pH 9.4	Solución base de pH 7.3
KCl	130 mM	130 mM	130 mM
NaCl	10 mM	10 mM	10 mM
MgSO₄	1 mM	1 mM	1 mM
MOPS	10 mM	10 mM	10 mM
pH	* 6.4	* 9.4	* 7.3

* El pH se ajustó con NaOH 1 M

Tabla I. Soluciones para la determinación de espectros de excitación en la celda espectrofluorométrica y en la cámara de experimentación sin células.

Solución concentrada de BCECF ácido libre

Se preparó una solución de BCECF libre a una concentración 2 mM, empleando como disolvente una solución 10 mM de MOPS a pH 7.0.

Determinaciones en el interior celular.

La tabla II indica la composición de las soluciones empleadas en la determinación de los espectros de excitación del BCECF en el interior celular (*in vivo*) y en la medición de cambios en el pH_i y en el VCA.

Sustancia	SEE ¹	SI ²	HIPER 10% ³	HIPO 10% ⁴	NH ₄ Cl 20 mM ⁵
KCl	5.5 mM	5.5 mM	5.5 mM	5.5 mM	5.5 mM
CaCl ₂	2.5 mM	2.5 mM	2.5 mM	2.5 mM	2.5 mM
MgCl ₂	1.25 mM	1.25 mM	1.25 mM	1.25 mM	1.25 mM
HEPES	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	130 mM	120 mM	120 mM	120 mM	100 mM
Glucosa	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
NH ₄ Cl	0	0	0	0	20 mM
Sacarosa	5.5 g/l *	11.5 g/l *	23.0 g/l *	0	11.5 g/l *
Osmolalidad	306	306	331	275	306

Todas las soluciones se ajustaron a pH 7.3 con NaOH 1 M.

1 Solución Estándar Externa

* La cantidad necesaria para obtener la osmolalidad indicada

2 Solución Isosmótica

3 Solución 10% Hiperosmótica

4 Solución 10% Hiposmótica

5 Solución isosmótica con 10 mM de NH₄Cl

Tabla II. Soluciones empleadas en las determinaciones intracelulares.

Solución concentrada de BCECF AM.

Se preparó una solución de BCECF AM a una concentración de 10 mM, utilizando DMSO como disolvente.

Solución de carga

La solución de carga se preparó a una concentración de 5 μ M de BCECF AM diluyendo 2.5 μ l de la "solución concentrada de BCECF AM" en 5 ml de la solución estándar externa.

Calibración del cociente de las fluorescencias del BCECF intracelular.

Método de puntos nulos

La composición (en mM) de las soluciones empleadas en este método de calibración se indica en la siguiente tabla:

Sustancia	pH nulo					
	6.6	6.9	7.0	7.1	7.2	7.3
KCl	5.500	5.500	5.500	5.500	5.500	5.500
CaCl ₂	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500
MgCl ₂	1.250	1.250	1.250	1.250	1.250	1.250
HEPES	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000
NaCl	68.565	105.583	110.165	113.057	114.881	116.032
NH ₄ Cl	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000
NaProp.	49.435	12.417	7.835	4.943	3.119	1.968
Glucosa	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
Sacarosa	11.5 g/l	11.5 g/l	11.5 g/l	11.5 g/l	11.5 g/l	11.5 g/l

El pH de cada solución se ajustó a un valor de 7.3 con NaOH 1 M y la osmolalidad a 306 mOsm mediante la adición de sacarosa

Tabla III. Composición de las soluciones para la calibración con el método de puntos nulos

Método de alto K⁺ y nigericina.

1. Soluciones externas

La composición (en mM) de estas soluciones se indica a continuación:

Sustancia	A	B	C	D	E	F	G	H
KCl	130.00	130.00	130.00	130.00	130.00	130.00	130.00	130.00
CaCl ₂	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
MgCl ₂	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
HEPES	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67
MES	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67
EPPS	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67
Glucosa	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Sacarosa	12 g/l	10 g/l	11g/l	10 g/l	9 g/l	8 g/l	7 g/l	6 g/l
pH	5.8	6.2	6.6	7.0	7.4	7.8	8.2	8.6

El pH se ajustó con una solución de N-metil-D-Glucamina 1 M.

Tabla IV. Composición de las soluciones para la calibración con el método de alto K⁺/nigericina

2. Solución concentrada de nigericina

Se preparó una solución de nigericina a una concentración de 10 mM, usando etanol como disolvente.

3. Soluciones externas con nigericina

Momentos antes de realizar la calibración, se tomó una alícuota de 5 ml de cada solución externa y se le adicionaron 2.5 μ l de la solución concentrada de nigericina, para obtener una concentración final de 5 μ M del ionóforo.

NOTA:

Los reactivos NaCl, MgSO₄, MOPS, CaCl₂, Glucosa, Sacarosa, HEPES, propionato de sodio, NH₄Cl, NaOH, MES, N-metil-D-glucamina, DMSO y nigericina provinieron de Sigma Chemical Corporation, St. Louis, USA. El KCl y el MgCl₂ provinieron de J. T. Baker S. A. de C. V. Xalostoc, México. El EPPS provino de Fluka Chemical. El BCECF ácido libre y el BCECF AM provinieron de Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA.

La medición de las osmolalidad de las soluciones experimentales se realizó con un osmómetro de presión de vapor (5500, Wescor Inc.). El pH de las soluciones se midió con un potenciómetro (Accumet Basic pH meter, Fisher Scientific).

MATERIAL BIOLÓGICO

Como modelo experimental se utilizaron células NG 108-15, una línea celular neural en cultivo. Estas células son un híbrido obtenido a partir de una línea celular de glioma de rata y de otra de neuroblastoma de ratón, por lo tanto, expresan características tanto de células gliales como de células neuronales. Su desarrollo se llevó a cabo en frascos de cultivo conteniendo 90% del medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO Life Technologies, Grand Island, NY), suplementado con 10% de suero fetal (FCS, GIBCO), 1% de hipoxantina-aminoptericina-timidina (HAT) y 1% de L-glutamina (Sigma). Las células se incubaron en este medio a 37 ° C en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂/95% de aire atmosférico filtrado. Al alcanzar 90% de confluencia se "pasaron" a otros frascos para dividir las o se sometían al proceso de diferenciación.

Para diferenciarlas, las células se transfirieron a cajas de Petri conteniendo un cubreobjetos circular de 25 mm de diámetro, previamente esterilizado y tratado con poli-D-lisina para lograr la fijación de las células al cubreobjetos. La diferenciación celular se indujo mediante la adición de un medio bajo en suero fetal, compuesto de: 98% de DMEM, 1% de FCS, 1% de HAT, 1% de L-glutamina, 1 mM de teofilina y 10 μM de prostaglandina E₁ (Kasai y Neher, 1992). Las células se

incubaron a 37° C en 5% de CO₂/95% de aire atmosférico filtrado. Las células se utilizaron para los experimentos 2 a 7 días después de iniciada su diferenciación.

MEDICIONES DE LAS SEÑALES DE FLUORESCENCIA

Determinaciones en la celda espectrofotométrica

La determinación de los espectros de excitación del BCECF en la celda se realizó empleando un espectrofluorómetro SLM Aminco 8100, que utiliza como fuente de luz una lámpara de Xenón de 400 wats. El ancho de banda para el monocromador de excitación (DMX1100) se fijó en 8 nm y en 32 nm para el monocromador de emisión (MC200), el cual se centró en 535 nm. Se utilizó una celda especial de plástico, cuadrada, de un cm de ancho para contener la muestra y un filtro de densidad neutral de 10% de transmisión para atenuar la luz de excitación. Este espectrofluorómetro se controló mediante el programa de computación OS2 Versión 2.1 (IBM Corp., 1993).

Para determinar el buen funcionamiento del espectrofluorómetro, principalmente de los monocromadores (de excitación y emisión), se obtuvieron los espectros de emisión y de excitación de estándares de fluorescencia (Fluorescence Reference Set 6BF, Starna Cells Inc.). La comparación de los espectros obtenidos y los de referencia indicó que no había ningún corrimiento espectral ni en el monocromador de excitación ni en el de emisión.

Determinaciones en la cámara de experimentación y en el interior celular.

En estas determinaciones se empleó un microscopio invertido (ver adelante) equipado con un sistema de epi-iluminación. Este último consiste en un cubo que contiene un espejo dicroico (cuyo diseño le permite reflejar o transmitir la luz incidente, dependiendo de su λ) y un filtro que selecciona la λ de la luz emitida. El espejo dicroico se encuentra colocado en el cubo con un ángulo de inclinación de 45° con respecto al filtro.

La *figura 4* muestra el sistema usado para las mediciones realizadas en células cultivadas. Este sistema consistió en una lámpara de Xenón de 400 wats y un monocromador de excitación con un ancho de banda de 8 nm; estos dos componentes fueron los mismos que se usaron en el espectrofluorómetro SLM Aminco. El paso de la luz de excitación hacia las células se interrumpió con una compuerta que, al igual que el monocromador, fue controlada electrónicamente; se usaron además filtro(s) de densidad neutral (que permitieron manipular la intensidad de la luz de excitación), lentes condensadores, una fibra óptica que condujo la luz hasta el cubo de epi-iluminación colocado en el microscopio invertido Nikon Diaphot 300, donde el espejo dicroico reflejó la luz de excitación de $\lambda < 515$ nm hacia un objetivo Fluor 40X de inmersión en aceite con una apertura numérica de 1.3 (Nikon). El objetivo se puso en contacto a través del aceite con la superficie inferior del cubreobjetos que quedó sujetado en el fondo de la cámara de

experimentación. La luz de excitación pasó a través del objetivo el cual la "condensó" y la hizo incidir en las células (cargadas con el colorante fluorescente) que se encontraban fijadas en el cubreobjetos de la cámara de experimentación. Parte de la fluorescencia del colorante intracelular fue recolectada por el objetivo y conducida al cubo de epi-iluminación donde el espejo dichroico transmitió la luz de $\lambda > 515$ nm y el filtro centrado en 535 ± 12.5 nm seleccionó la luz de emisión que llegaría al intensificador de imágenes y de allí a una cámara de video (Hamamatsu C2400), que envió la señal hacia la computadora para realizar los registros y obtener una imagen en el monitor. Los datos se almacenaron en el programa Excel versión 4.0 para su análisis posterior. El control de este sistema y la adquisición de datos e imágenes se lleva a cabo mediante los programas de imágenes Metafluor y Metamorph (Universal Imaging, Co).

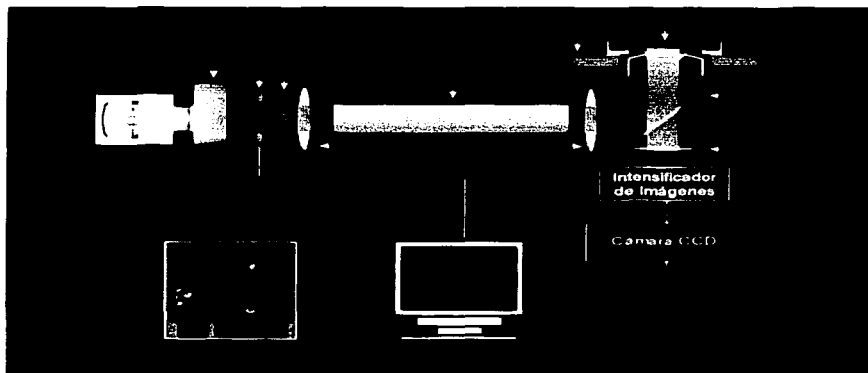


Figura 4. Diagrama del sistema de microscopía de fluorescencia utilizado en este trabajo. Este sistema se usó para la determinación de espectros de excitación del BCECF en la cámara de experimentación y en el interior celular, así como para la realización de experimentos con células cultivadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PROTOS

Espectros de excitación del BCECF a diferente pH. Determinación del “punto isobéctico”

Determinación del punto isobéctico en celda

Método de diluciones recíprocas

Este método consiste en modificar en etapas el pH de una solución de baja acidez, esto se logra mediante el reemplazo de alícuotas de la solución inicial con alícuotas equivalentes de una solución de alta acidez. Cada etapa de este método proporciona una solución con un pH diferente. De esta manera, si la solución de baja acidez y la solución de alta acidez tienen la misma concentración de BCECF, el método de diluciones recíprocas permite obtener soluciones con pH distinto pero con la misma concentración del colorante.

Para preparar la *muestra de baja acidez*, se colocaron exactamente 2 ml de la solución base de pH 9.4 en una celda espectrofluorométrica, a este volumen se le añadieron 4 μl de la “solución concentrada de BCECF ácido libre”. La *muestra de alta acidez* se preparó diluyendo 8 μl de la “solución concentrada de BCECF ácido libre” en 4 ml de la solución base de pH 6.4. De esta manera, la muestra de alta y baja acidez tuvieron una concentración final del colorante de 4 μM . Para ambas muestras se obtuvo el espectro de excitación del colorante en un rango de 420 a 550 nm (a intervalos de 1 nm). Posteriormente, 200 μl de la muestra de baja acidez

contenida en la celda, se reemplazaron con el mismo volumen de la muestra de alta acidez; así, se obtuvo la muestra 1 con un *pH* de 8.2 y la concentración del colorante se mantuvo constante. Se determinó el espectro de excitación a la muestra 1, después se extrajeron 400 μl de ésta y se reemplazaron con 400 μl de la muestra de alta acidez; la solución resultante tuvo un *pH* de 7.7 (muestra 2) y la concentración de BCECF permaneció constante. Se obtuvo el espectro de excitación de la muestra 2 y las siguientes soluciones se prepararon de la forma ya descrita, atendiendo a la siguiente tabla:

pH inicial	Volumen reemplazado (μl)	pH resultante @
9.4	Baja acidez	9.4
9.4	200	8.2 (muestra 1)
8.2	400	7.7 (muestra 2)
7.7	600	7.3 (muestra 3)
7.3	800	7.0 (muestra 4)
7.0	1000	6.8 (muestra 5)
6.4	Alta acidez	6.4

@: El pH especificado para las soluciones intermedias (muestras) es el predicho por la ecuación de Henderson-Hasselbalch (véase el apéndice I)

Tabla V. Preparación de las soluciones de BCECF 4 μM a diferente pH. Método de diluciones recíprocas

Los espectros de excitación obtenidos se superpusieron para encontrar la λ de excitación a la cual el colorante es insensible a cambios en el pH, es decir el PI.

Determinación del punto isobéptico en la cámara de experimentación sin células

Estas determinaciones se realizaron a través de un objetivo Fluor 40X de inmersión en aceite con apertura numérica de 1.3 (Nikon), empleando el sistema

mostrado en la figura 4. Con un lápiz con punta de diamante se marcó una X en el centro del cubreobjetos que se aloja en el fondo de la cámara de experimentación (cámara de Leyden). Esta marca se enfocó con el microscopio durante las medidas, con el objeto de evitar errores debidos a la variación en el "grosor óptico" de la muestra.

Método de diluciones recíprocas

A 2 ml de la solución base de pH 9.4 se le añadieron 4 μ l de la solución 2 mM de BCECF para obtener una concentración de 4 μ M del colorante (*muestra de baja acidez*). La *muestra de alta acidez* se preparó diluyendo 4 μ l de la solución concentrada de BCECF, en 2 ml de la solución base de pH 6.4. Se añadió 1 ml de la muestra de baja acidez a la cámara de experimentación, la cual se colocó en la platina del microscopio invertido. Se procedió entonces a enfocar la marca del fondo de la cámara. Con apoyo del monitor de video, se observó la fluorescencia del colorante al excitarlo a 495 nm. Se fijó una región en el centro de la imagen del campo iluminado y la señal se amplificó hasta que la intensidad de la fluorescencia a partir de dicha región tuvo un valor cercano a 230-240 unidades arbitrarias (u. a.). Se determinó el espectro de excitación del colorante en el rango de 420 a 450 nm a intervalos de 1 nm y en el de 450 a 516 nm a intervalos de 2 nm. Posteriormente se reemplazaron 100 μ l de la solución en la cámara de experimentación con 100 μ l de la muestra de alta acidez, obteniendo así la *muestra 1* con un pH de 8.2 y la concentración de colorante se mantuvo constante. Se determinó el espectro de

excitación del colorante en la muestra 1 y entonces, de esta muestra se extrajeron 200 μl , los cuales fueron reemplazados con 200 μl de la muestra de alta acidez. La solución resultante tuvo un *pH* de 7.7 (muestra 2) y la concentración de BCECF no cambió. Se obtuvo el espectro de excitación de esta última solución y se prepararon las siguientes muestras de manera análoga a las anteriores, siempre partiendo de la solución usada para el espectro previo y con base en la siguiente tabla:

pH inicial	Volumen reemplazado (μl)	pH resultante @
9.4	Baja acidez	9.4
9.4	100	8.2 (muestra 1)
8.2	200	7.7 (muestra 2)
7.7	300	7.3 (muestra 3)
7.3	400	7.0 (muestra 4)
7.0	500	6.8 (muestra 5)
6.4	Alta acidez	6.4

@ El pH fue calculado empleando la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Véase el apéndice I.

Tabla VI. Preparación de las soluciones de BCECF 4 μM a diferente pH, para las determinaciones en la cámara de experimentación sin células. Método de diluciones recíprocas

Los espectros obtenidos se superpusieron para determinar la λ en la cual se encuentra en el punto isobéptico.

Determinaciones en el interior celular

Cargado de las células con BCECF

Para introducir el BCECF a las células se procedió de la siguiente manera: El cubreobjetos al cual se encontraban adosadas las células se fijó en la cámara de Leyden. Posteriormente, ésta se colocó sobre la platina del microscopio invertido, se enfocaron las células y se incubaron en la "solución de carga" (5 μM de BCECF

AM). El colorante se excitó a una λ sensible al pH (λ_1) y a la λ que corresponde al punto isobéptico (λ_2). La determinación exacta de estas dos λ s de excitación constituye un objetivo central del presente trabajo. El seguimiento de los cambios en la intensidad de las fluorescencias se realizó a partir de una región circular digital colocada en el centro de cada célula iluminada. Esta región tuvo un diámetro aproximado de 3-10 % del área del cuerpo celular. La frecuencia de muestreo fue de un ciclo cada 30 segundos y la escala del intensificador de imágenes se colocó inicialmente en un valor de 5.5. La incubación de las células en la solución de carga culminó hasta que la fluorescencia registrada alcanzaba lecturas cercanas a 230 u. a. (normalmente, este proceso tomó de 30 a 60 minutos). Posteriormente, las células se lavaron mediante la perfusión de la solución estándar externa (SEE) a una tasa de 5 ml/min por un lapso de 15 minutos. Terminado el lavado, las células se incubaron en SEE durante 45 minutos con el objeto de dar tiempo suficiente para que se completara la hidrólisis (desesterificación) del colorante intracelular esterificado.

Terminada la incubación, se ajustó el sistema para obtener una buena definición óptica de las células en la pantalla del video-monitor. Se perfundió nuevamente la SEE durante 10-15 minutos. A partir de este punto, la tasa de perfusión de las soluciones fue de 5-7 ml/min y la adquisición se llevó a cabo a una frecuencia de un ciclo cada 10 segundos, excitando a λ_1 y λ_2 .

Calibración de las señales fluorescentes usadas para la medición del volumen celular acuoso

Para calibrar las señales fluorescentes usadas para calcular los cambios en el VCA (calibración del volumen), se registraron los cambios de fluorescencia del colorante intracelular resultantes de exponer las células a soluciones moderadamente anisomóticas ($\approx \pm 10\%$) de osmolalidad conocida. Para ello se procedió de la siguiente manera: después de la perfusión con la SEE, las células se bañaron con solución isosmótica (SI) hasta obtener un registro de fluorescencia estable (línea basal de 5 a 10 minutos) que indicara estacionaridad. Entonces, se perfundió una solución nominalmente 10% hiperosmótica (+10%) hasta que el cambio de fluorescencia alcanzara un nivel constante (de 5 a 7 minutos). Una vez alcanzado el nuevo estado estacionario, se regresó a la perfusión con SI. La exposición de las células a esta última solución fue de 5 a 7 minutos, tiempo suficiente para obtener nuevamente un registro basal estable. Entonces se perfundió una solución nominalmente 10% hiposmótica (-10%), siguiendo un protocolo análogo al de la solución de calibración +10, es decir 5 a 7 minutos de duración del pulso hiposmótico, seguido de la perfusión con la SI durante 10 a 15 minutos, al final de los cuales se aplicó un pulso de prueba.

Aplicación de un pulso de prueba

Terminada la calibración de volumen y una vez obtenida una línea basal estable (de 10 a 15 minutos de duración), se registraron las señales fluorescentes resultantes de exponer las células a la solución de prueba, que en este caso fue una

solución isosmótica de NH_4Cl 10 ó 20 mM. La duración del pulso de prueba fue de 5 a 10 minutos. Posteriormente, las células se lavaron perfundiendo con la SI durante 30 a 45 minutos.

Calibración de las señales del BCECF usadas para calcular el pH_i

Terminada la perfusión de la SI, se calibraron las señales del BCECF sensibles al pH_i mediante el método de alto K^+ y nigericina de la manera que se describirá mas adelante.

Determinación del punto isobéptico en el citoplasma

La carga de las células con el colorante, el lavado y la preparación del sistema de medición se realizaron de la manera descrita en el apartado "Determinaciones en el interior celular". En este caso se registraron las fluorescencias resultantes de excitar al colorante a 495 nm (F_{495}) y a 440 nm (F_{440}). Esta última fluorescencia se usó como un indicador aproximado de la concentración del BCECF. Los cambios de pH_i se presentaron de manera "espontánea" en las células, las cuales se acidificaban gradualmente durante el transcurso del experimento, sin presentarse pérdida considerable de colorante (a juzgar por la F_{440}).

Para obtener los espectros de excitación del BCECF en el interior celular se procedió de la siguiente manera: Una vez cargadas las células, se obtuvo una

buena definición óptica de las células iluminadas y en cada una de ellas se fijaron dos aperturas circulares digitales (correspondientes al 30-50% y al 80-110% del cuerpo celular) adicionales a la que ya había sido fijada para seguir la carga; que correspondió al 3-10% del cuerpo celular. Dichas regiones se centraron en la zona de mayor intensidad de fluorescencia, de tal manera que fueron círculos casi concéntricos. Teniendo definidas todas las regiones, se siguió el protocolo descrito para calibrar las señales fluorescentes para la medición del VCA, excitando al colorante a 495 y 440 nm. Se realizaron tres barridos de excitación al colorante intracelular, cada uno en un periodo diferente de perfusión de la SI. El rango de los barridos fue de 420 a 516 nm, registrando la fluorescencia a intervalos de un nm de 420-450 nm y a intervalos de 2 nm de 450-516 nm. En ocasiones fue necesario obtener dos o tres espectros de excitación durante la aplicación del pulso de NH_4Cl 10 mM. Debido a que bajo estas condiciones la regulación celular del pH fue más notable que la regulación del volumen, los cambios en el pH_i durante el pulso fueron significativamente mayores que los cambios del volumen. Esto permitió obtener espectros de excitación del BCECF con escasa variación en la concentración del BCECF y con cambios suficientes en el pH_i para determinar el PI.

Para definir el PI se consideraron tres espectros de excitación del BCECF intracelular, tomados durante la calibración del volumen y/o durante el pulso de prueba.

Espectros de excitación del BCECF a diferentes concentraciones. Cociente de fluorescencias *versus* concentración del colorante

Determinaciones en la celda espectrofluorométrica

En la celda espectrofluorométrica se preparó una solución 4 μM de BCECF, diluyendo 4 μl de la solución concentrada de BCECF en exactamente 2 ml de la solución base de pH 7.3. Para esta solución se determinó el espectro de excitación de 420 a 550 nm, a intervalos de 1 nm. Posteriormente se eliminaron 250 μl de la solución en la celda y se añadió el mismo volumen de la *solución base de pH 7.3 sin colorante*, obteniéndose una solución 3.5 μM de BCECF. A esta solución se le corrió el barrido de excitación y las diluciones posteriores se prepararon de la manera descrita, reemplazando el volumen indicado en la siguiente tabla:

Concentración inicial (μM)	Volumen reemplazado (μl)	Concentración final (μM)
4.0	250	3.5
3.5	286	3.0
3.0	333	2.5
2.5	400	2.0
2.0	500	1.5
1.5	667	1.0
1.0	1000	0.5

Tabla VII. Preparación de las soluciones con diferentes concentraciones de BCECF, manteniendo constante el pH (7.3). Método de diluciones recíprocas.

Para cada espectro de excitación obtenido se calcularon los CFs mediante la división de cada fluorescencia del espectro entre la fluorescencia del colorante en el PI.

Determinaciones en la cámara de experimentación sin células

La preparación de la cámara de experimentación para estas determinaciones es la misma que se describió en el apartado "Determinación del punto isobéptico en la cámara de experimentación sin células". Para obtener los espectros de excitación del BCECF a diferentes concentraciones se procedió como sigue: A 2 ml de la solución base de pH 7.3, se añadieron 40 μl de la solución concentrada de BCECF libre, de manera que la concentración final fue de 40 μM . Se añadió un ml de esta solución a la cámara de experimentación y se enfocó la "X" marcada previamente en el cubreobjetos del fondo de la cámara. Se excitó al colorante a la λ que rinde la fluorescencia sensible al pH (λ_1) y a la que corresponde al PI (λ_2). Se registro la fluorescencia de esta solución durante 2 a 3 minutos, posteriormente se eliminaron 100 μl de la solución en la cámara y se sustituyeron por 100 μl de la solución base de pH 7.3 sin colorante, de esta manera, la concentración de la solución en la cámara disminuyó a 36 μM . Posteriormente se realizaron las siguientes diluciones, reemplazando de la forma descrita el volumen indicado en la tabla VIII. Se midió la señal fluorescente de cada solución durante 2-3 minutos.

[BCECF]inicial (μM)	Vol. Reemplazado (μl)	[BCECF]final (μM)
40	100	36
36	111	32
32	125	28
28	142	24
24	166	20

Tabla VIII. Preparación de las soluciones de BCECF libre a diferentes concentraciones, manteniendo el pH constante. Método de diluciones.

Las fluorescencias obtenidas para cada concentración de colorante se promediaron y se calculó el CF, el cual se graficó como una función de la concentración del colorante.

Linealidad del sistema de medición

Las medidas que permitieron establecer la existencia de una relación lineal entre la concentración del BCECF y su fluorescencia, se desarrollaron en la cámara de experimentación sin células, usando los parámetros comunes en las determinaciones celulares (intensidad de luz, factor de amplificación de la señal fluorescente y profundidad de foco). Para ello, se cargaron algunas células y se aplicaron los pulsos anisomóticos usados en la calibración del volumen, terminado esto, las células se eliminaron mediante la adición de agua desionizada. Una vez que la cámara se liberó de agua, se colocó en ella 1 ml de la solución base de pH 7.3, se adicionó la cantidad necesaria de la solución concentrada de BCECF libre para que la fluorescencia sensible al pH (registrada a partir de una región digital centrada en el campo iluminado) alcanzara un valor cercano a 230 u. a. La concentración final del BCECF obtenida fue de 8 a 18 μM . Posteriormente, se registraron las fluorescencias del colorante resultantes de excitarlo con la λ_1 y la λ_2 , durante un lapso de 3 minutos. Al terminar, se eliminaron 100 μL de la solución contenida en la cámara y se añadió el mismo volumen de la solución base pH 7.3 sin colorante, quedando solo el 90% del colorante inicial. Se midieron las

fluorescencias para esta solución durante 3 minutos y se procedió al reemplazo de 200 μl de la solución en la cámara por 200 μl de la solución base sin colorante, quedando solo el 72% del colorante inicial. Las mediciones de la fluorescencia y las diluciones restantes se realizaron de la manera descrita, siguiendo el protocolo resumido en la tabla IX.

%Inicial de Colorante	Volumen reemplazado	% final de colorante
100.00	100 μl	90.00
90.00	200 μl	72.00
72.00	300 μl	50.40
50.40	400 μl	30.24
30.24	500 μl	15.12

Tabla IX. Diluciones para determinar la linealidad del sistema de medición. Determinaciones en la cámara de experimentación sin células.

Finalmente se graficó la fluorescencia promedio para cada concentración a ambas longitudes de onda de excitación, como una función de la concentración porcentual del colorante.

Comparación de los métodos de calibración de las señales del BCECF sensibles al pH.

Como ya se ha mencionado, existen diversos métodos de calibración de las señales del BCECF sensibles al pH. En este trabajo se hizo una comparación entre tres de estos métodos. El primero de ellos fue la calibración con soluciones de pH conocido que contienen alto K^+ y nigericina. El segundo fue el método de puntos nulos, el cual emplea soluciones nulas, que son soluciones isosmóticas que contienen una mezcla de un ácido y de una base débil, a concentraciones tales que

a determinado pH_i no producen un cambio neto de la concentración intracelular de H^+ . El tercer método fue la calibración *in vitro* del colorante libre, en él se emplean soluciones de pH conocido que simulan la composición iónica intracelular.

La carga de las células y la preparación del sistema de adquisición se realizó de la manera descrita en el apartado de "Determinaciones en el interior celular", excitando al colorante con la λ_1 y la λ_2 . Posterior a la perfusión con SEE, las células se bañaron con SI a una tasa de 5-7 ml/min hasta obtener un registro de CF estable (usualmente de 5 a 10 minutos). Posteriormente se realizó la calibración de los puntos nulos y la de alto K^+ /nigericina como se indica a continuación:

Método de los puntos nulos

Una vez que el CF alcanzó un nivel estable en la SI (CF isosmótico), las células se bañaron con las soluciones "nulas" (una a la vez) durante 3 a 5 minutos. Después de dicho intervalo cada solución nula fue retirada perfundiendo con la SI hasta obtener nuevamente un CF isosmótico estable (normalmente de 5 a 7 minutos). Esta calibración finalizó una vez que la exposición de las células a alguna solución nula no provocara cambios en el CF isosmótico; así, el valor del pH_i en ese momento correspondió al pH nulo especificado por la solución nula ($pH_i = pH_N$).

Método de alto K^+ y nigericina.

Terminada la calibración con el método de los puntos nulos, las células se pusieron en contacto con las soluciones de alto K^+ /nigericina. La aplicación de éstas se realizó de manera consecutiva y en orden creciente de valores de pH. Las células se dejaron en contacto con estas soluciones por el tiempo que fuera necesario para alcanzar un valor estable del CF intracelular, lo cual ocurrió por regla general a los 3-5 minutos. Con esta calibración se obtuvo un valor de CF para cada valor de pH de las soluciones aplicadas.

Calibración *in vitro*. Método de diluciones recíprocas.

Concluida la calibración con el método de alto K^+ y nigericina, las células se eliminaron de la cámara de experimentación empleando agua destilada. Una vez que la cámara se liberó completamente de agua, se colocó en ella 1 ml de la solución de alta acidez (pH 5.4); se agregó una alícuota de la solución concentrada de BCECF libre, de manera que la fluorescencia sensible al pH fuera cercana a 150 u. a. La muestra de baja acidez se preparó añadiendo a 2 ml de la solución de pH 9.4 el doble de la alícuota añadida a la solución de la cámara. La solución del BCECF contenida en la cámara (de alta acidez) fue excitada alternadamente con la λ_1 y la λ_2 durante 3 minutos, a una frecuencia de un ciclo cada 5 ó 10 segundos. Posteriormente, 100 μ L de la solución en la cámara fueron reemplazados por 100 μ L de la solución de baja acidez (resultando una solución de pH 6.3) y se adquirieron

las señales fluorescentes de la manera ya descrita. La preparación de las siguientes muestras y el registro de la fluorescencia se realizó de la manera anteriormente descrita, reemplazando el volumen indicado en la siguiente tabla:

pH inicial	Volumen reemplazado	@pH final
5.40	100 μ l	6.31
6.31	200 μ l	6.81
6.81	300 μ l	7.20
7.20	400 μ l	7.56
7.56	500 μ l	7.93
7.93	500 μ l	8.24

@ pH calculado mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Véase el apéndice I.

Tabla X. Volúmenes reemplazados para realizar la calibración *in vitro* por el método de diluciones recíprocas.

Las medidas obtenidas para cada caso se promediaron con el fin de obtener un valor de CF para cada pH.

Medición paralela de cambios en el volumen celular acuoso y en el pH intracelular

La medición paralela de cambios en el VCA y en el pH_i se realizó de la manera descrita para el caso de las "Determinaciones en el interior celular". En este caso el pulso de prueba fue una solución isosmótica de 20 mM de NH_4Cl . Las señales de fluorescencia se obtuvieron excitando alternadamente a la λ_1 y a la λ_2 . El cociente de estas fluorescencias ($F\lambda_1/F\lambda_2$) se empleó para determinar los cambios en el pH_i , mientras que la fluorescencia emitida al excitar en el PI ($F\lambda_2$) se usó para inferir los cambios en el volumen celular acuoso. La calibración de las señales del BCECF sensibles al pH se realizó mediante el método de alto K^+ y nigericina.

Transformación de los cocientes de fluorescencia en valores de pH intracelular

Como ya se mencionó, el método de calibración de alto K^+ /nigericina y el método *in vitro* proporcionan varios puntos de equivalencia entre el CF y el pH. Estos puntos fueron ajustados a la Ec. 10 (derivada de la Ec. 1) para que posteriormente se pudiera transformar cualquier valor de CF en unidades de pH.

$$CF_t = \frac{CF_{max} + CF_{min} (10^{pK_a - pH})}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad \text{Ec. 10}$$

Donde:

pK_a = pK del colorante

CF_t = Cociente de fluorescencias a cualquier tiempo

CF_{max} = Cociente de fluorescencias al nivel más alcalino

CF_{min} = Cociente de fluorescencias al nivel más ácido

El ajuste a la Ec. 10 de los pares (CF, pH) obtenidos en la calibración proporcionó los valores de pK_a , CF_{max} y CF_{min} "corregidos", que al sustituirse en la ecuación 1, brindan la posibilidad de transformar cualquier valor experimental de CF a un valor de pH.

Transformación de las señales de fluorescencia a cambios en el volumen celular acuoso

Para transformar las señales de fluorescencia a cambios en el volumen celular acuoso (VCA) es necesario determinar la fracción del colorante intracelular

que responde a los cambios en la osmolalidad externa y la fracción del colorante que no lo hace. A esta última fracción se le denominará en este trabajo *fracción de fondo* (F_b). La mayoría de las células, si no todas, responden osmométricamente a cambios relativamente pequeños en la osmolalidad externa, tales como los que se producen con las soluciones de calibración (± 10 % anisomóticas). Este hecho permite utilizar cada célula como su propio osmómetro, de manera que es posible calibrar su respuesta a pulsos anisomóticos conocidos, lo cual servirá para cuantificar los cambios de volumen producidos por pulsos experimentales, como se discutirá posteriormente. A partir de los cambios de la fluorescencia del colorante intracelular resultantes de la exposición de las células a los pulsos anisomóticos de calibración, es posible elaborar una gráfica de la recíproca de la fluorescencia relativa (F_0/F_T) como función de la recíproca de la presión osmótica relativa (π_0/π_T), donde F_0 y F_T son la fluorescencia basal y la del estado estacionario para cada pulso de calibración, respectivamente; π_0 es la osmolalidad de la solución isomótica y π_T lo es de la solución de calibración. Dado que se ha encontrado que el valor de la ordenada al origen de la gráfica F_0/F_T versus π_0/π_T es muy cercano al valor de la F_b medida mediante la permeabilización celular con α -toxina de *S. aureus* (Crowe et al, 1995), la regresión lineal aplicada a dicha gráfica se emplea comúnmente para obtener la F_b , que se usa para calcular los cambios relativos en el VCA (V_0/V_i) a partir de las señales de fluorescencia, mediante la ecuación 9 de este trabajo (Alvarez-Leefmans et al, 1995).

Corrección de la deriva de los registros

Muy a menudo, durante el curso de un experimento, la fluorescencia basal no permanece constante durante todo el tiempo, sino que puede disminuir (o aumentar) gradualmente. La tasa de esta disminución (o aumento) de fluorescencia con respecto al tiempo se llama *deriva*. El trazo que se muestra en la *figura 5* ilustra un experimento celular hipotético que presenta deriva. En general, la deriva se debe a una pérdida lenta y gradual del colorante intracelular; sin embargo, no es el único factor causal. Otro factor que puede ocasionar deriva es el fenómeno de "fotoblanqueamiento" (photobleaching) debido a un proceso irreversible de fotodegradación del fluoróforo cuando éste se encuentra en estado de excitación.

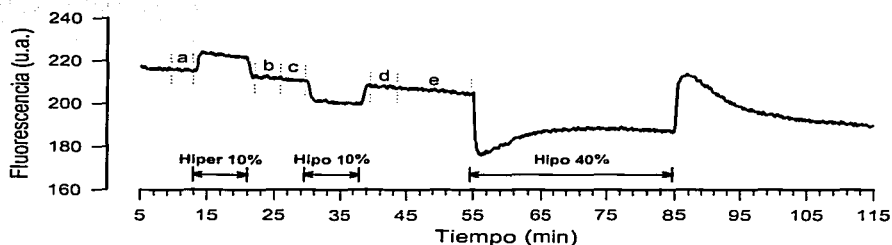


Figura 5. Señales de fluorescencia de un experimento en el que se estudió el efecto de una solución 40% hiposmótica sobre el VCA. Nótese que la fluorescencia basal no permanece constante sino que varía en función del tiempo.

Mientras que la deriva por pérdida del colorante es variable y difícil de controlar (ya que depende del diseño del fluoróforo, esto es, de sus cargas eléctricas y su grado de hidrofobicidad, entre otras características), la producida por disminución de la fluorescencia secundaria a fotodegradación del colorante

puede minimizarse reduciendo la exposición de las células a la radiación de excitación. Esto se logra, por ejemplo, haciendo barridos cortos, utilizando filtros de densidad neutral o utilizando objetivos de aumentos elevados con alta apertura numérica (esto reduce la profundidad de foco).

Para poder transformar las señales fluorescentes en cambios de VCA es necesario corregir la deriva. La situación ideal sería corregir el trazo de un experimento completo, como lo ilustra la línea punteada de la *figura 6*. Desgraciadamente esto, por regla general, no es posible dado que la deriva puede cambiar dentro de un mismo experimento. Por ello es conveniente corregirla por segmentos individuales, relativamente cortos, es decir, corregir la deriva a cada cambio producido experimentalmente.

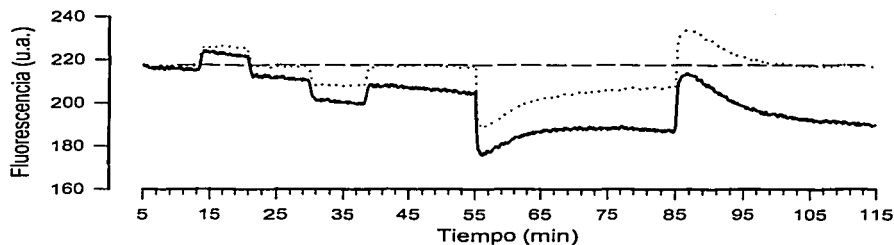


Figura 6. Corrección ideal de la deriva. La línea continua representa el experimento hipotético con deriva. La línea discontinua representa la corrección ideal de la deriva, en la que se corrige el trazo completo del experimento.

La corrección de la deriva por segmentos se ejemplificará con el trazo mostrado en la figura 5, iniciando con la respuesta celular a un pulso 10% hiperosmótico (comprendida entre los segmentos *a* y *b*). Primero, se seleccionan los registros que corresponden a este pulso de calibración (véase la figura 7), posteriormente se hace una regresión lineal a los datos de los segmentos *a* y *b* (con duración de 2 a 3 min cada uno, véase la figura 8) para obtener la pendiente estadística del trazo (*m*). Para estos pequeños cambios anisosmóticos se pueden usar los segmentos basales antes y después del pulso, dado que en general las células no regulan su volumen cuando son expuestas a pulsos cortos (5-7 min) de soluciones ligeramente ($\pm 10\%$) anisosmóticas (Crowe et al, 1995; Alvarez-Leefmans et al, 1995; Whener y Tinel 1998).

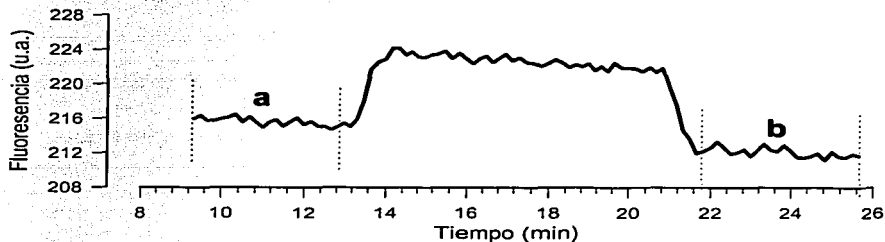


Figura 7. Trazo de la respuesta celular a un pulso 10% hiperosmótico

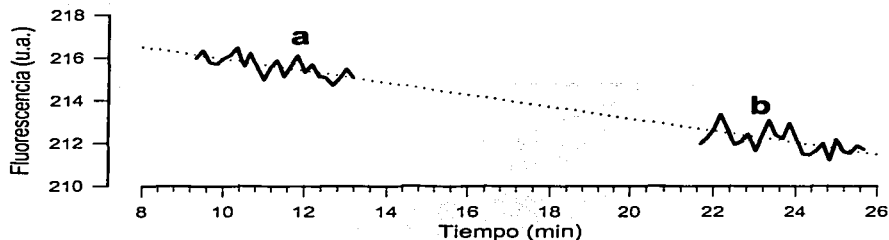


Figura 8. Regresión lineal para el trazo del pulso de calibración 10 % hiperosmótico. a y b son los segmentos isosmóticos antes y después del pulso anisosmótico, respectivamente.

Para cuantificar la deriva, primero se ajusta el tiempo del pulso 10% hiperosmótico. El ajuste consiste en iniciar el trazo de la figura 7 en el minuto cero; esto es, desplazarlo sobre el eje del tiempo, de manera que el primer punto del trazo hiperosmótico coincida con el minuto cero. Matemáticamente, el ajuste se realiza mediante la sustracción del tiempo inicial del trazo a todo el conjunto de valores de tiempo involucrados en él. El tiempo ajustado se usa sólo en esta parte del análisis y para las gráficas y figuras se usa el tiempo real. Posteriormente, la deriva del trazo se obtiene multiplicando el tiempo ajustado por la m obtenida mediante la regresión lineal aplicada a los segmentos *a* y *b*. Para corregir la fluorescencia del pulso hiperosmótico, debe restarse la deriva a las señales de fluorescencia originales (véase la figura 9):

$$\text{Deriva} = \text{Tiempo ajustado} \times m$$

$$\text{Corrección de la deriva} = \text{Fluorescencia real} - \text{deriva}$$

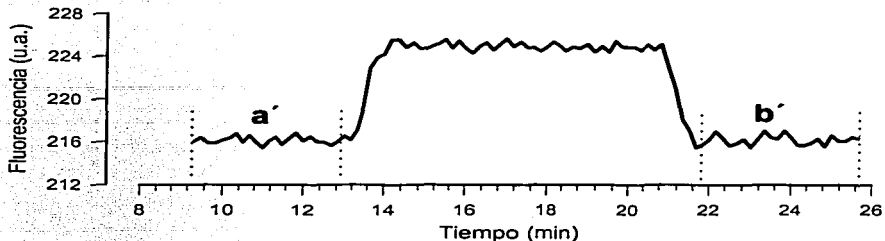


Figura 9. Trazo del pulso de calibración 10% hiperosmótico, una vez corregida la deriva. *a'* y *b'* representan los segmentos isosmóticos sin deriva.

La corrección de la deriva para el pulso hiposmótico de calibración (comprendido entre los segmentos *c* y *d*) se realiza de la misma manera descrita anteriormente para el pulso hiperosmótico.

Los segmentos *a*, *b*, *c* y *d* deben usarse sólo si sus pendientes son similares (sugiriendo que la deriva es lineal), de lo contrario se dificultará la corrección de la deriva, caso en el cual el experimento se rechaza.

Para corregir la deriva del cambio en fluorescencia producido durante la exposición de la célula a la solución de prueba o solución problema, por ejemplo una solución 40% hiposmótica, se deberá usar el segmento *e* de la figura 5, el cual deberá ser de 5 a 10 min de duración. Si el segmento *e* es muy corto (< 5 min), la deriva obtenida para este cambio no será representativa del cambio total y éste podría ser sobre o subestimado. No se puede usar el segmento isosmótico que

sigue inmediatamente al cambio en la solución de prueba debido a que la célula puede regular su volumen al ser sometida a esta condición y por lo tanto, como ocurre frecuentemente, puede no recuperar su volumen inicial.

Estado estacionario

La siguiente etapa en el análisis es medir la fluorescencia basal (F_0) y la fluorescencia estacionaria o la fluorescencia máxima (F_T) de cada pulso experimental. Para el caso de la calibración (es decir, los pequeños pulsos $\pm 10\%$ anisométicos) se debe proceder como sigue: F_0 se obtiene promediando los segmentos isosmóticos sin deriva que están antes y después de los pulsos anisométicos, esto es, los segmentos a' y b' para el pulso hiperosmótico y los segmentos c' y d' para el pulso hiposmótico (véase la figura 10). Para obtener F_T se promedia el estado estacionario de cada cambio anisomético que usualmente es de 1.5-2.0 min (véase los círculos negros en los pulsos hiper e hiposmótico en la Figura 10).

El promedio de las fluorescencias del segmento e' será la F_0 para el pulso de prueba. Para medir la F_T de este pulso (durante el cual la célula puede regular su volumen), se debe tomar un promedio de los valores correspondientes al máximo de la respuesta celular (0.5-1.0 min, véase el cuadrado en la figura No. 10).

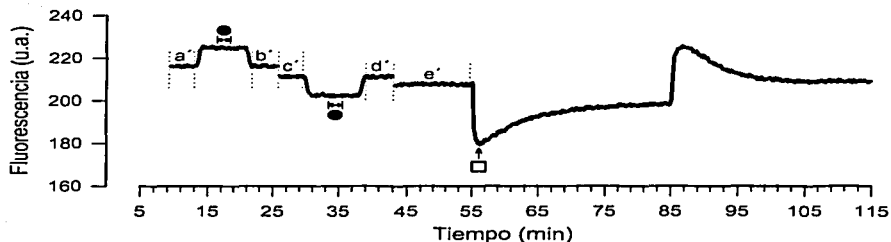


Figura 10. Trazo experimental con la deriva corregida. Los estados basales (F_0) para los pulsos de calibración corresponden a los segmentos a'-b', b'-c', c'-d', mientras que el F_0 para el pulso de prueba corresponde al segmento e'. Los círculos negros representan el estado estacionario (F_T) para los pulsos de calibración, mientras que el cuadrado representa el cambio de fluorescencia máximo durante el pulso de prueba.

Obtención de la fracción de fondo (F_b)

Para obtener F_b , se calcula el cociente F_0/F_T para cada pulso de calibración. Estos cocientes se grafican como una función de la inversa de la osmolalidad relativa (π_0/π_T) de las soluciones de calibración; por definición, no existen cambios en el VCA cuando la célula se encuentra expuesta a la solución isosmótica, por lo tanto, la gráfica debe incluir al par (1, 1) (véase la *figura 11A*). La regresión lineal (línea punteada de la *figura 11A*) para esta gráfica proporciona el valor de F_b , equivalente a la ordenada al origen. La línea continua representa la respuesta ideal, en la que todo el colorante sería osmóticamente activo, esto es, la F_b sería igual a cero y por lo tanto se cumpliría la Ec. 8. Por lo general el valor de F_b se encuentra alrededor de 0.6 y nunca puede ser mayor que uno o más pequeño que cero.

Los datos calculados para la(s) solución(es) de prueba (cuadrado blanco en la figura 11B) no se incluyen en la regresión, dado que éstos podrían representar una respuesta no lineal.

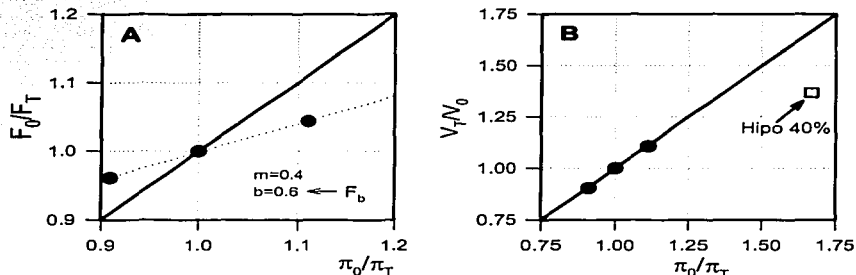


Figura 11. Obtención de la fluorescencia de fondo por el método gráfico. A es la gráfica de F_0/F_T como una función de π_0/π_T . La ordenada al origen (b) de la regresión lineal aplicada a esta gráfica (línea discontinua) corresponde al valor de F_b . La línea continua representa el comportamiento ideal descrito por la ec. 8. B muestra una gráfica del volumen relativo estacionario (V_T/V_0) como una función de la inversa de la presión osmótica (π_0/π_T), obsérvese que los puntos de calibración caen sobre la línea continua, que representa el comportamiento de un osmómetro perfecto.

Transformación de las señales fluorescentes en cambios del volumen celular acuoso

Una vez determinado el valor de F_b , los cocientes F_0/F_T para cada pulso experimental se transforman a volumen relativo (V_T/V_0) empleando la ecuación 9 de este trabajo. La figura 11B muestra la gráfica de V_T/V_0 como función de π_0/π_T . En ella se aprecia que los pulsos de calibración (círculos negros) caen sobre la respuesta ideal predicha por la ley de Van't Hoff para un osmómetro perfecto (línea continua en la figura 11B). Dado que las células generalmente no se comportan osmométricamente al ser sometidas a soluciones altamente

anisomóticas, por ejemplo una solución 40% hiposmótica, el pico de esta respuesta no cae sobre la línea ideal (véase el cuadrado blanco en la figura 11B).

Finalmente, para obtener los cambios en el VCA ocurridos durante todo el experimento se procede como sigue: Para cada segmento individual, a los cuales se les ha corregido la deriva (figura 10), se debe calcular cociente F_0/F_t , donde F_t es la fluorescencia a cualquier tiempo y F_0 es la fluorescencia basal correspondiente. Los resultados se muestran en la *figura 12*. Posteriormente estos cocientes se sustituyen en la Ec. 9 para obtener los valores relativos del VCA (V_t/V_0) durante todo el experimento, los cuales se muestran en la *figura 13*.

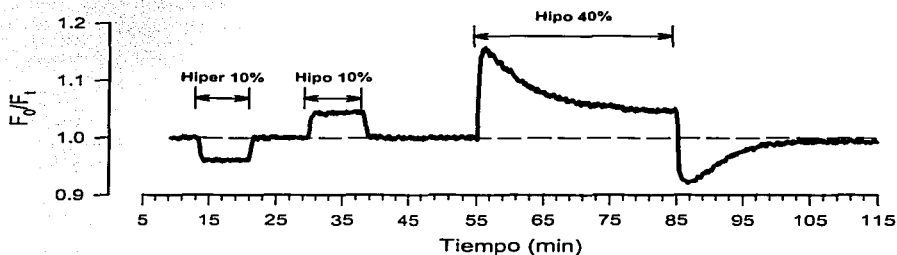


Figura 12. Cambios de la fluorescencia relativa (F_0/F_t) durante todo el experimento. F_0 es la fluorescencia basal de cada pulso experimental y F_t es la fluorescencia corregida al tiempo t .

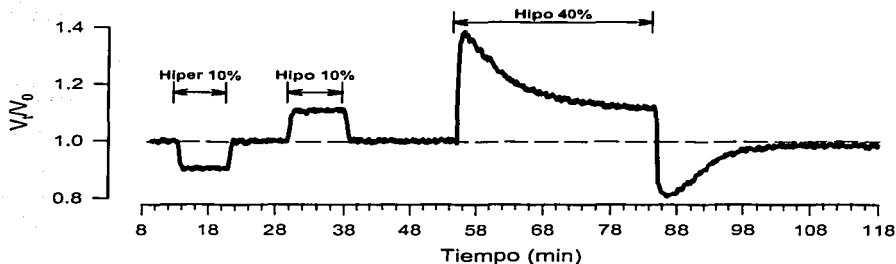


Figura 13. Cambios en el VCA relativo (V_i/V_0) durante todo el experimento. El cálculo de V_i/V_0 se realizó a partir del cociente F_0/F_i usando la Ec. 9

Precisión y exactitud de las determinaciones del VCA usando al BCECF como indicador

Para determinar con qué precisión el BCECF mide los cambios en el VCA, se siguió el procedimiento indicado para las "Determinaciones en el interior celular". En este caso no se usó ninguna solución de prueba sino que se aplicaron 4 ciclos de calibración, esto es, las células se sometieron 4 veces a una solución 10% hiposmótica y 4 veces a una solución 10% hiperosmótica de manera alternada. En estas mediciones se excitó al colorante a la λ_1 y a la λ_2 . La fluorescencia resultante de excitar a la λ_2 ($F\lambda_2$), se empleó para calcular los valores de VCA de la manera ya descrita, utilizando los primeros dos pulsos anisomóticos para obtener el valor de F_b .

Una vez obtenido el valor de F_b , se calculó el VCA en el estado estacionario para cada pulso 10% hiperosmótico (incluyendo el pulso de calibración). Estos

valores se compararon entre sí y el coeficiente de variación (C.V.) representó la precisión entre los ensayos (repetibilidad) para el pulso hiperosmótico. La repetibilidad para el pulso hiposmótico se obtuvo de manera similar a la descrita para el pulso hiperosmótico.

La precisión intermedia se estimó a través del C.V. obtenido al comparar los valores estacionarios de VCA de diferentes células cuando éstas fueron sometidas a pulsos de calibración de la misma osmolalidad.

Para determinar la exactitud se compararon los valores estacionarios de VCA de los pulsos de calibración obtenidos experimentalmente, con los valores esperados para un osmómetro perfecto. La exactitud se expresó como el porcentaje del valor experimental (O) relativo al valor teórico (T), esto es: $100O/T$.

RESULTADOS

Propiedades espectrales del BCECF en una celda espectrofluorométrica. Determinación del punto isobéptico

La *figura 14* muestra los espectros de excitación del BCECF a diferentes valores de pH obtenidos en una celda espectrofluorométrica cuadrada de plástico de 1 cm². Se puede apreciar que a la longitud de onda (λ) de excitación de 438 nm, la fluorescencia del colorante es constante e independientemente del pH del medio. A esta longitud de onda espectral se le denomina "punto isobéptico" y como ya se mencionó, se abrevia como "PI". La determinación del PI en celda se realizó por triplicado y en todos los casos se encontró el mismo valor (438 nm).

Como lo muestra la *figura 14*, a partir del PI pueden describirse dos comportamientos de la fluorescencia del BCECF con relación al pH. Primero, cuando la luz que excita al colorante es de menor λ que 438 nm, la fluorescencia es proporcional a la acidez del medio, aunque la sensibilidad al pH es relativamente modesta. Segundo, cuando la luz de excitación del BCECF es de mayor λ que 438 nm, la fluorescencia aumenta cuando se disminuye el nivel de acidez. Este efecto permite apreciar al PI como un punto de inflexión en todas las curvas (*figura 14*, trazos ampliados a 10X).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

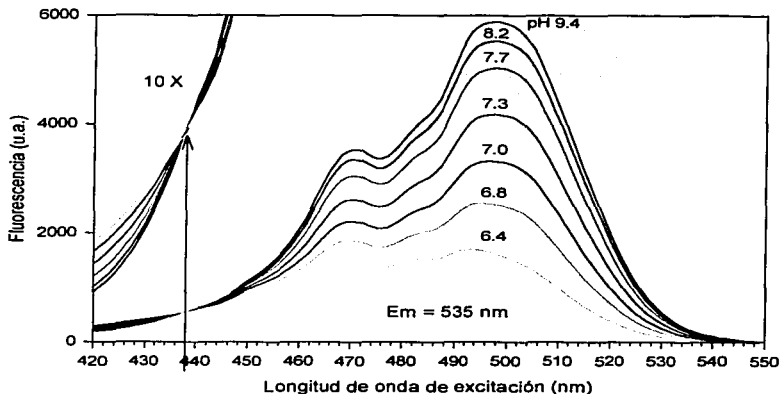


Figura 14. Espectros de excitación del BCECF a diferentes valores de pH. Los espectros de excitación se determinaron en una celda espectrofluorométrica. Los cambios en el pH se realizaron empleando el método de diluciones recíprocas. En los trazos amplificados 10 veces (10X) se aprecia que el punto isobéptico se presenta cuando el colorante se excita a 438 nm. Nótese que existen dos longitudes de onda de excitación que rinden fluorescencias que son muy sensibles al pH: ~ 470 nm y ~ 498 nm.

Examinando los espectros de excitación del BCECF a λ s mayores que el PI, puede observarse que la fluorescencia del colorante aumenta conforme se excita a λ s cada vez mayores, alcanzando cierta estabilidad al llegar a 468-472 nm. Posteriormente la fluorescencia disminuye hasta alcanzar un valle a 475 nm y vuelve a incrementarse hasta llegar su nivel máximo, que corresponde a una λ de excitación de 497-500 nm, zona del espectro en la cual la sensibilidad de la fluorescencia al pH alcanza su nivel máximo. Después de 500 nm, la fluorescencia y la sensibilidad al pH, disminuyen drásticamente. Finalmente, a λ s mayores de 540 nm el colorante ya no fluoresce.

Es importante destacar que la forma del espectro de excitación se modifica conforme cambia el pH del medio en el que se encuentra diluido el colorante, esto es, los picos se agudizan más conforme el medio se alcaliniza y viceversa. Este comportamiento espectral representa una ventaja importante para el método, ya que permite emplear al cociente de dos fluorescencias del colorante como un indicador selectivo del pH.

Los espectros mostrados en la figura 14 no están corregidos para cambios en la intensidad de luz de la lámpara. Esta corrección se realizó con una solución de Rhodamina B a una concentración de 8 g/mL, al hacerlo, el pico a 470 nm y el valle a 475 nm desaparecieron. Este tipo de correcciones sólo puede realizarse en las determinaciones en la celda espectrofluorométrica y no en las determinaciones *in vivo*, por lo que desde el punto de vista práctico la corrección del espectro es intrascendente.

Propiedades espectrales del BCECF en la cámara de experimentación sin células. Determinación del punto isobéptico

Estas mediciones son importantes ya que se realizan a través de la misma vía óptica utilizada para hacer las mediciones con células. Por lo tanto, son relevantes para evaluar la posible influencia de factores instrumentales sobre el espectro de excitación del BCECF. Estas determinaciones se realizaron empleando el método de diluciones recíprocas. Los resultados se resumen en la *tabla XI* y un

ejemplo se muestra en la *figura 15*. El promedio de 44 determinaciones del PI en la cámara fue de 437.5 ± 1.64 nm ($\bar{X} \pm D. E.$), valor que no dista significativamente del encontrado en las determinaciones en la celda. En la *figura 15* puede observarse que las características esenciales del espectro del BCECF, obtenidas en la celda espectrofluorométrica, se conservan en la cámara de experimentación. Tales características son: la forma del espectro de excitación, la posición de los picos, la sensibilidad a cambios en el pH y el punto isobéptico.

PI (nm)	Frecuencia
434	2
435	1
436	11
437	6
438	12
439	8
440	2
441	2
<i>n = 44</i> <i>Media = 437.52 nm</i> <i>D. E. 1.64 nm</i>	

Tabla XI. Puntos isobépticos determinados en la cámara de experimentación sin células, empleando el método de diluciones recíprocas

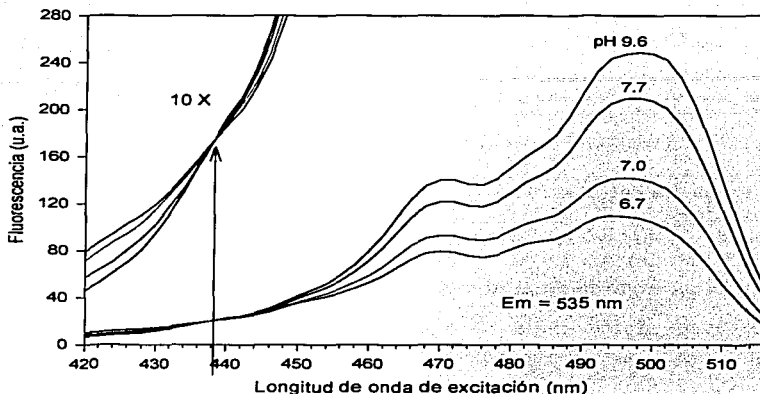


Figura 15. Espectros de excitación del BCECF libre a diferentes valores de pH del medio. Los espectros fueron obtenidos en la cámara de experimentación sin células. Los cambios del pH se realizaron mediante el método de diluciones recíprocas. En la amplificación del trazo a 10X se aprecia un punto isobéptico a una λ de excitación de 438 nm (media 437.5 ± 1.63 nm). También pueden observarse dos puntos de considerable sensibilidad al pH, que se localizan en ~ 470 y ~ 498 nm.

Propiedades espectrales del BCECF en el citoplasma de células vivas. Determinación del punto isobéptico *in vivo*

Con el objeto de probar si las propiedades espectrales del BCECF, particularmente aquellas necesarias para poder medir paralelamente el VCA y el pH_i , se conservan en el ambiente intracelular, se realizaron medidas espectrales del colorante previamente introducido al citoplasma celular. Los espectros de excitación a diferente pH se obtuvieron bajo tres condiciones:

1. Durante la acidificación "normal" de la célula.
2. Durante la aplicación de un pulso de NH_4Cl 10 mM.
3. Al retirar el pulso de NH_4Cl 10 mM.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

La determinación del PI se realizó considerando espectros de excitación obtenidos en la misma célula con un mínimo de tres pHs distintos. Estos espectros presentaron dos características: a) estaban claramente separados, al menos en la porción del espectro de mayor sensibilidad al pH (esto es, en el rango de ~ 450 a 515 nm) y b) la variación de la fluorescencia del colorante al excitarlo a 440 nm durante la perfusión de la SI antes de correr el espectro no fue mayor que el 3% entre un espectro y otro.

Se emplearon tres métodos para determinar el PI intracelular, la diferencia entre ellos solamente fue la condición en la que se tomaron los espectros de excitación. Así, en el "método A" se emplearon espectros tomados exclusivamente en la condición número 1, en el "método B" se usaron espectros obtenidos en las condiciones 2 y/o 3 y en el "método C" se consideraron los espectros obtenidos en las tres condiciones. La *Tabla XII* muestra los datos obtenidos en cada caso. Con el método A el valor promedio de PI fue de 436.7 ± 3.74 nm ($\bar{X} \pm D. E.$, n=79), con el Método B fue de 437.6 ± 3.93 nm ($\bar{X} \pm D. E.$, n= 51) y con el método C fue de 436.2 ± 2.75 nm ($\bar{X} \pm D. E.$, n=21). El análisis de varianza aplicado a estos datos (ANOVA) indicó que las condiciones en las que fueron tomados los espectros de excitación no ejercieron efectos significativos sobre la determinación del PI ($P>0.05$), lo que brinda la posibilidad de analizar todos los datos obtenidos como procedentes de una sola población.

PI (nm)	Frecuencia		
	Método A	Método B	Método C
430	3	3	1
431	1	1	1
432	10	0	0
433	6	0	1
434	3	5	3
435	5	8	2
436	11	10	1
437	8	3	3
438	4	0	6
439	9	3	1
440	7	2	2
441	2	4	0
442	5	5	0
443	2	3	0
444	2	4	0
446	1	0	0
	$n = 79$ $\bar{X} = 436.7 \text{ nm}$ $D.E. = 3.74 \text{ nm}$	$n = 51$ $\bar{X} = 437.6 \text{ nm}$ $D.E. = 3.93 \text{ nm}$	$n = 21$ $\bar{X} = 436.2 \text{ nm}$ $D.E. = 2.75 \text{ nm}$

Tabla XII. Puntos isobésticos determinados, por tres métodos diferentes, en el citoplasma de células vivas.

El número total de los PIs del BCECF obtenidos en el citoplasma celular de 75 células vivas diferentes fue de 151 (*tabla XIII*). El valor promedio de estos PIs fue de $437 \pm 3.70 \text{ nm}$ ($\bar{X} \pm D.E.$). La *figura 16* muestra un ejemplo del punto isobéstico determinado en una célula viva. Como puede apreciarse, las propiedades espectrales del colorante, relevantes para este trabajo, son comparables con aquellas de los espectros determinados en la celda y en la cámara de experimentación, por lo que se considera que el medio ambiente intracelular de la línea celular empleada no afecta ni la forma espectral del colorante ni la sensibilidad de su fluorescencia al pH ni el PI.

PI (nm)	Frecuencia
430	7
431	3
432	10
433	7
434	11
435	15
436	22
437	14
438	10
439	13
440	11
441	6
442	10
443	5
444	6
445	1

$n = 151$
 No. de céls = 75
 $\bar{X} = 436.96 \text{ nm}$
 D.E = 3.70 nm

Tabla XIII. Puntos isobsticos determinados en el citoplasma celular.

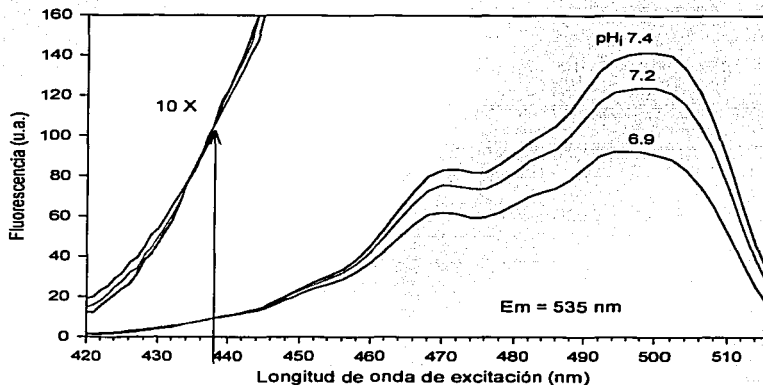


Figura 16. Espectros de excitación del BCECF registrados en el interior de una célula. Las características relevantes del espectro se conservan con respecto a aquellos registrados en la celda espectrofluorométrica o en la cámara de experimentación. En la amplificación (10X) de la gráfica se puede apreciar el punto isobstico, que corresponde a la λ de excitación de 438 nm (media 437.0 ± 3.70 nm; $n=151$). Se aprecian además dos regiones del espectro muy sensibles al pH, alrededor de 470 y de 498 nm. La estimación del pH se realizó calibrando al BCECF con el método de alto K^+ y nigericina

Finalmente, el análisis de varianza aplicado a los PI obtenidos en la celda espectrofluorométrica, en la cámara de experimentación sin células y en el citosol indicó que no existe diferencia significativa entre ellos ($P > 0.05$). Esto significa que la posición del PI no se modifica por las propiedades fisicoquímicas del medio intracelular, por lo tanto la fluorescencia resultante de excitar al colorante a 438 nm puede usarse como un indicador selectivo y confiable de la concentración del colorante en el citosol.

¿Es el cociente de dos fluorescencias del BCECF independiente de la concentración del colorante?

Estudio del cociente de fluorescencias en el espectrofluorómetro

El cociente de dos fluorescencias (CF) del BCECF se emplea universalmente como un parámetro indicador del pH y se le considera independiente de la concentración del colorante. Con el objeto de verificar tal independencia, se obtuvieron espectros de excitación del BCECF en su forma ácida, a partir de soluciones de pH 7.3 con diferentes concentraciones del colorante. Estas determinaciones son importantes dado que en el interior celular es muy probable que los cambios en el pH_i se acompañen de cambios en el VCA, ocasionando variaciones en la concentración intracelular del colorante. Por lo tanto, se debe tener la seguridad de que el CF es selectivamente sensible al pH_i. La *figura 17* presenta los cambios en la fluorescencia del espectro de excitación del BCECF (a un

pH de 7.3) causados por la disminución en la concentración del colorante (desde 10 hasta 2 μM). En teoría, los cambios de fluorescencia debidos a cambios en la concentración del BCECF ($[\text{BCECF}]$) son proporcionales en todo el espectro de excitación, esto es equivalente a multiplicar todas las fluorescencias del espectro por un mismo factor. Lo anterior implica que si se calcula el cociente de dos fluorescencias, por ejemplo F_{495}/F_{438} , el resultado debe ser el mismo independientemente de la $[\text{BCECF}]$.

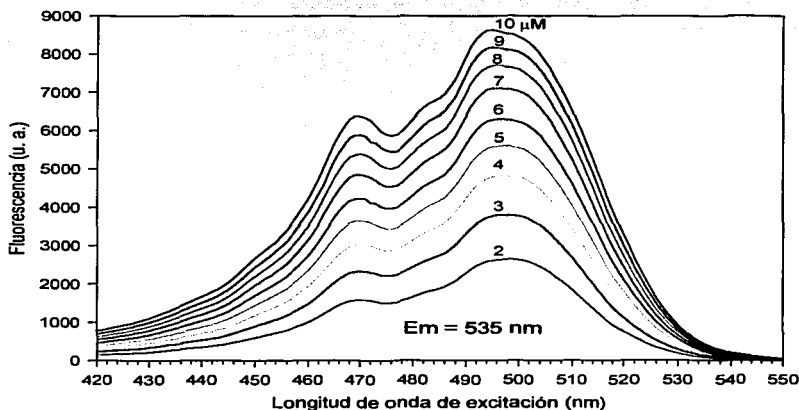


Figura 17. Espectros de excitación del BCECF a diferentes concentraciones. Estos espectros se determinaron en una celda espectrofluorométrica a partir de soluciones de pH 7.3 con diferente concentración del colorante.

Para evaluar si los cambios en la $[\text{BCECF}]$ tienen efecto sobre el CF, este último se calculó para cada uno de los espectros de excitación mostrados en la figura 17 de la siguiente manera: cada fluorescencia del espectro, producida al excitar desde 420 hasta 550 nm (F_λ), se dividió entre la fluorescencia del PI (F_{438}).

Los resultados se muestran en la *figura 18*, en la que se observa que, contrario a lo esperado, el CF no es constante sino que varía de manera inversamente proporcional a la concentración del colorante. Esta variación se acentúa en las longitudes de onda que originan mayor fluorescencia (entre 470 y 500 nm).

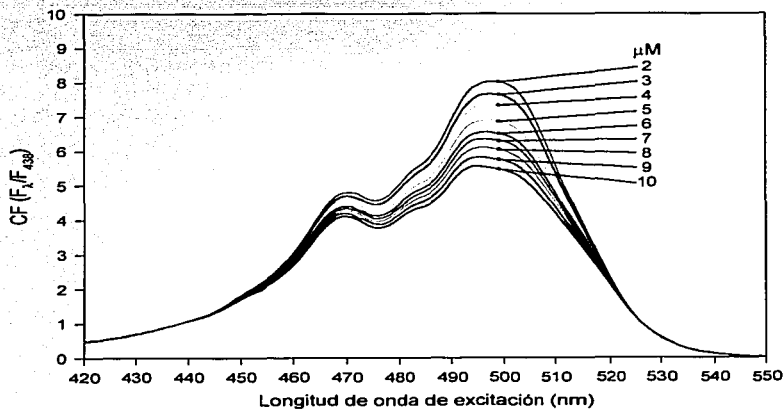


Figura 18. Relación del CF con la concentración del colorante. La gráfica muestra los CFs calculados para cada espectro del la figura 17. Los CFs se calcularon usando a la fluorescencia al excitar al colorante a 420-550 nm como dividiendo (F_x) y a la fluorescencia al excitarlo a 438 nm (F_{438}) como divisor. Teóricamente, todas las curvas mostradas en esta figura deben superponerse, sin embargo esto no ocurre, nótese que el CF aumenta cuando el colorante se va diluyendo, principalmente al excitar a longitudes entre 470 y 500 nm.

Dado que el pH de las soluciones del BCECF fue constante, se deduce que la sensibilidad del CF a los cambios en la [BCECF] se debe a que las fluorescencias del espectro no fueron afectadas en la misma proporción por las variaciones en la concentración del colorante, esto se puede apreciar en la *figura 19A*. Esta figura muestra la relación entre la concentración del colorante y su fluorescencia cuando se excita a 495, 470, 450 y 438 nm (F_{495} , F_{470} , F_{450} y F_{438} , respectivamente). Nótese

que sólo la F_{450} y la F_{438} tienen un comportamiento lineal con relación a la $[BCECF]$. Los CFs calculados mediante la división de F_{495} , F_{470} o F_{450} entre F_{438} se muestran en la *figura 19B*, donde se encuentran graficados como una función de la concentración del colorante. En esta gráfica se aprecia que el único cociente que no se afecta drásticamente por la $[BCECF]$ es el calculado a partir de la F_{450} y la F_{438} , que son las fluorescencias que se relacionan linealmente con la concentración del colorante. Esto indica que el CF es independiente de la concentración del colorante sólo cuando las fluorescencias usadas para calcular el CF y la concentración del colorante se relacionan de manera lineal.

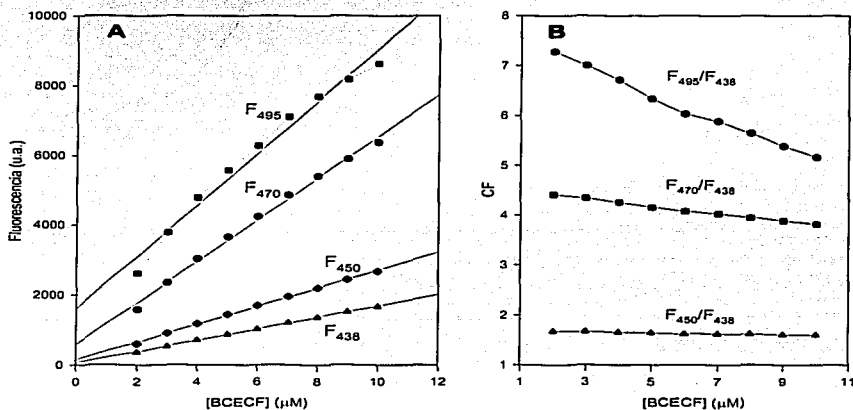


Figura 19. **A** Gráfica de la fluorescencia del BCECF libre en celda como una función de su concentración. F_{495} , F_{470} , F_{450} y F_{438} se refieren a la fluorescencia del BCECF al ser excitado a 495, 470, 450 y 438 nm respectivamente. Nótese que solo la F_{450} y la F_{438} presentan un comportamiento lineal con relación a la concentración del colorante. **B**. Se muestra una gráfica del CF (F_x/F_{438} , donde F_x puede ser F_{495} , F_{470} o F_{450}) como función de la concentración de colorante. Nótese que mientras F_{495}/F_{438} y F_{470}/F_{438} presentan variación conforme se va diluyendo el colorante, F_{450}/F_{438} prácticamente permanece constante. La variación en F_{495}/F_{438} y F_{470}/F_{438} como resultado de la dilución del colorante se atribuye a la no-linealidad de F_{495} y F_{470} con respecto a la concentración del BCECF.

Para confirmar la importancia que tiene la relación lineal entre la fluorescencia y la concentración del colorante sobre la selectividad del CF para medir pH, se obtuvieron espectros de excitación del BCECF a diferentes concentraciones, ahora de 3.5 a 0.5 μM , exactamente en las mismas condiciones en que se realizaron las determinaciones anteriores. Los espectros así obtenidos se muestran en la *figura 20*, en la que se aprecia una disminución proporcional de la fluorescencia conforme se diluye el colorante. El CF se calculó de la manera descrita anteriormente, empleando en todos los casos a la fluorescencia a 438 nm como divisor, los resultados se muestran en la *figura 21*. En dicha figura se aprecia que la dependencia del CF con la concentración del BCECF es mínima a concentraciones de 3.5 a 2.5 μM de colorante. Además se aprecia que conforme la concentración de colorante tiende a cero, el CF se hace más dependiente de la [BCECF], acentuándose tal dependencia en las longitudes del espectro de excitación que provocan mayor fluorescencia, esto es entre los picos a 470 y 498 nm.

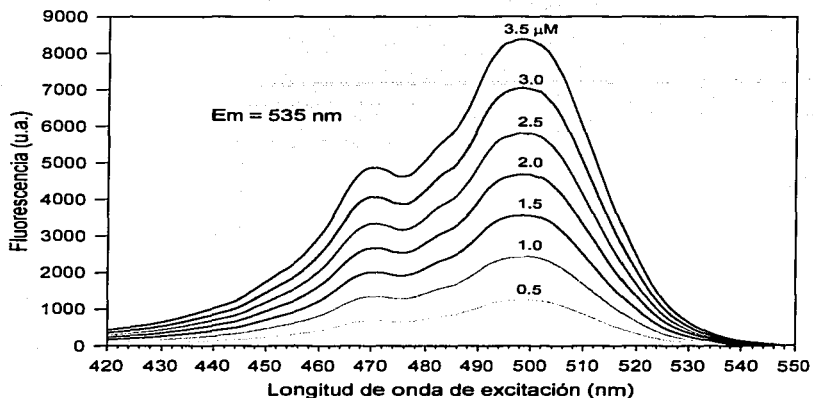


Figura 20. Espectros de excitación del BCECF libre en la celda espectrofluorométrica a diferentes concentraciones del colorante, manteniendo el pH constante. Las condiciones experimentales fueron exactamente las mismas que en la determinación de los espectros de la figura 17.

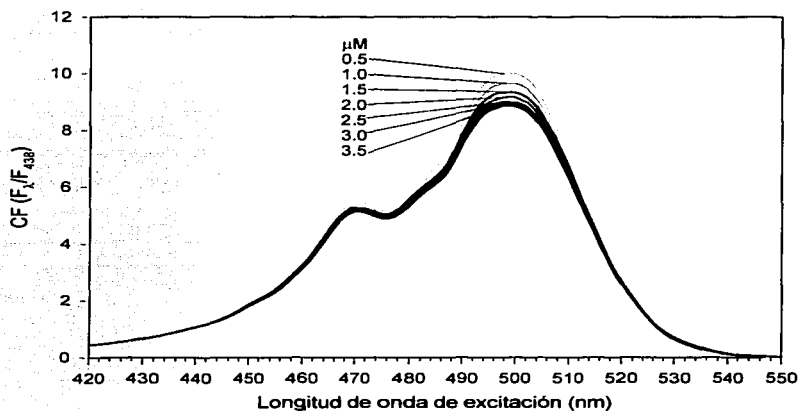


Figura 21. Relación del CF con la concentración del colorante. En esta figura se muestran los CFs calculados a partir de los espectros de la figura 20. Los CFs mostrados son el resultado de dividir todas las fluorescencias de un determinado espectro de excitación del BCECF (F_λ) entre la fluorescencia a 438 nm (F_{438}). Se aprecia una dependencia del CF con respecto a la concentración del colorante en las soluciones más diluidas ($< 2.0 \mu\text{M}$), principalmente en los puntos del espectro donde la fluorescencia es más intensa (465-510 nm).

El gráfico de F_{495} , F_{470} , F_{450} y F_{438} como función de la $[BCECF]$, se muestra en la figura 22A. Obsérvese que el comportamiento es prácticamente lineal en todas las fluorescencias. El CF de estas fluorescencias se muestra en la figura 22B, donde se grafica en función de la concentración del BCECF. En esta última gráfica puede observarse que a pesar de la relación lineal entre las fluorescencias y la $[BCECF]$, existe aún una modesta variación en los CFs calculados en la región de baja concentración de colorante (menor a $2.0 \mu\text{M}$). Esto se aprecia mejor en los CFs que tienen como numerador del cociente a F_{495} .

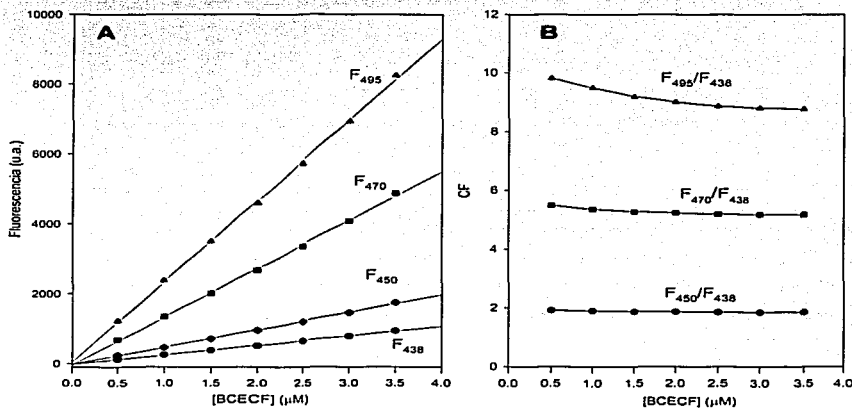


Figura 22. A. Gráfica de la fluorescencia del BCECF libre como una función de la concentración del colorante. Determinaciones hechas en una celda espectrofluorométrica. B. Gráfica del CF calculado a partir de las fluorescencias mostradas A como una función de la concentración del BCECF. En esta gráfica se observa que la variación del CF con la concentración del colorante es relativamente pequeña. Nótese que tal variación es mayor cuando el CF se calcula usando a la F_{495} o la F_{470} , especialmente en el rango de concentraciones más bajo ($< 2.0 \mu\text{M}$). Por otro lado, el cociente F_{450}/F_{438} es prácticamente independiente de la concentración, aún cuando el colorante está más diluido.

Dadas sus características, esta modesta sensibilidad del CF a la [BCECF] puede ser explicada como consecuencia de que la relación entre las fluorescencias usadas para calcular el CF y la [BCECF] no parte del mismo punto (véase el intercepto con el eje "y" para la F_{495} y la F_{438} en la figura 22A). En otras palabras, la variación del CF con los cambios de la concentración del colorante se debe a que la relación F_{495} *versus* [BCECF] y F_{438} *versus* [BCECF] tienen diferente ordenada al origen (b). Esta diferencia de b 's se vuelve más significativa conforme la intensidad de la fluorescencia disminuye por lo que el CF es cada vez más sensible a los cambios en la [BCECF] cuando esta última tiende a cero. Por otro lado, cuando la concentración del colorante tiende a aumentar ($> 2.0 \mu\text{M}$), el efecto de la b sobre el CF tiende a disminuir hasta volverse insignificante y por lo tanto el CF se vuelve insensible a los cambios en la [BCECF].

Estudio del cociente de fluorescencias en la cámara de experimentación

En esta parte del trabajo se realizó un estudio del CF como el desarrollado en el apartado anterior, pero ahora midiendo las fluorescencias en la cámara de experimentación. Esto tiene la finalidad de probar la insensibilidad del CF a los cambios en la concentración del BCECF, empleando todos los aditamentos ópticos implicados en el sistema para las determinaciones intracelulares. Esto es importante dado que dicho sistema tiene como detector una cámara de video (Hamamatsu, C2400-68 de 8 bits) con propiedades completamente distintas al fotormultiplicador (SLM Aminco, FP-145) usado en el espectrofluorómetro, por lo

que es indispensable determinar cual es el rango de fluorescencias de la videocámara en el que el CF no es afectado por los cambios en la concentración del colorante.

Las determinaciones se realizaron a un pH constante y variando la concentración del BCECF mediante diluciones. Los registros se llevaron a cabo excitando al BCECF a 438 y a 450 nm. Estas longitudes de ondas se eligieron con el objeto de que la intensidad de la fluorescencia estuviese comprendida dentro del rango dinámico de la cámara de video. La *figura 23A* muestra una gráfica de las fluorescencias al excitar a 450 y 438 nm (F_{450} y F_{438} respectivamente) como función de la concentración del colorante. En esta figura es evidente la relación lineal entre estas dos variables y la igualdad de la ordenada al origen b (obtenida a partir de la regresión lineal practicada a los datos) tanto para F_{450} como para F_{438} . A pesar de ello, como lo muestra la *figura 23B* (círculos negros), el CF calculado a partir de las señales fluorescentes mostradas en la figura 23A es diferente para cada concentración de colorante. Esta dependencia prácticamente se abolió al *corregir* las fluorescencias y calcular con ellas el CF (ver los cuadrados blancos en la figura 23B). La corrección consistió en restar el valor de b a todas las fluorescencias implicadas en la gráfica, esto es, se corrigió el eje de las fluorescencias de tal manera que la b fuera cero tanto para F_{450} como para F_{438} . Lo anterior implica que el CF es independiente de la concentración del colorante sólo si la b de la relación

lineal entre la concentración del BCECF y las fluorescencias usadas para calcularlo es igual a cero.

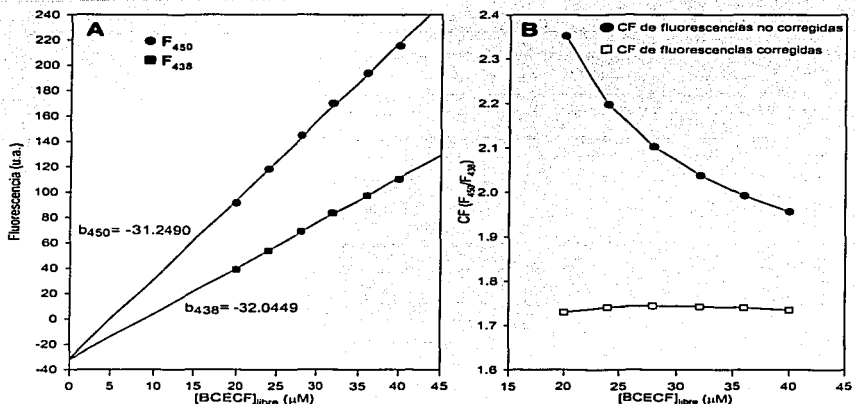


Figura 23. A. Fluorescencia del BCECF libre en la cámara de experimentación como una función de su concentración. F_{450} y F_{438} se refieren a las fluorescencias del colorante al ser excitado a 450 y 438 nm respectivamente. Se aprecia una relación lineal entre F_{450} y F_{438} y la concentración del colorante. Nótese que la ordenada al origen b tiene un valor negativo. **B.** Muestra el CF calculado a partir de los resultados de la gráfica anterior. Los círculos negros representan el CF de las fluorescencias experimentales no corregidas y los cuadrados blancos representan el CF calculado a partir de las fluorescencias corregidas mediante la sustracción del valor de b . Nótese que al efectuar la corrección, el efecto de la concentración del colorante sobre el CF disminuye significativamente.

Considerando estos hallazgos, el sistema de registro se ajustó para que la ordenada al origen del gráfico de la fluorescencia como función de la concentración de colorante fuera cero. De esta forma se determinaron valores de fluorescencia para diferentes concentraciones de BCECF (manteniendo constante el pH) y se calculó el CF. La *figura 24* muestra un registro de F_{450} y F_{438} cuando se excita el colorante libre en la cámara de experimentación. Se observa que la

disminución de la fluorescencia a causa de la dilución del colorante (gráfica A) no tiene efecto sobre el CF (gráfica B).

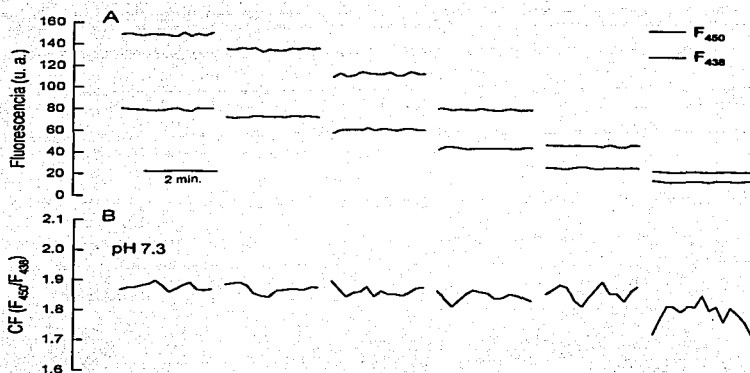


Figura 24. Insensibilidad del CF (F_{450}/F_{438}) a los cambios en la concentración del BCECF. A. Muestra la disminución de F_{450} (líneas rojas) y de F_{438} (líneas azules) provocada por la dilución del colorante. B. muestra que tal dilución prácticamente no afecta al CF.

La relación lineal existente entre la concentración del colorante y su fluorescencia (F_{450} y F_{438}) se mostrará con mayor detenimiento en los estudios de "linealidad del sistema."

Determinación de la linealidad y del rango del sistema de medición

La demostración de la relación lineal entre las fluorescencias del colorante y su concentración es importante por dos razones: 1) Determina, como ya se dijo, la insensibilidad del CF a los cambios en la concentración del colorante y 2); esta

relación es el fundamento de los algoritmos empleados para la transformación de las señales fluorescentes a cambios en el volumen celular acuoso (VCA). Para demostrar que el sistema de medición empleado en los experimentos con células es capaz de mantener dicha relación, se determinaron las fluorescencias del colorante excitándolo a 450 nm y a 438 nm, variando su concentración y manteniendo constante el pH (7.2). La *figura 25* muestra un ejemplo de la relación lineal que tienen la F_{450} (círculos negros) y la F_{438} (círculos blancos) con la concentración del colorante. Se realizaron tres determinaciones de este tipo en las cuales los valores de fluorescencia y de concentración del BCECF no eran los mismos, por lo que para normalizar los datos, ambos parámetros se expresaron como un porcentaje relativo a sus respectivos valores máximos, de esta manera se pudieron comparar las tres determinaciones. La *figura 26* muestra los tres experimentos ya normalizados, la *gráfica A* se refiere a la F_{450} y la *gráfica B* a la F_{438} . Los parámetros obtenidos al aplicar la regresión lineal a estas gráficas fueron: Para la gráfica A (F_{450}): $m=1.0074$, $b=-0.1573\%$, $r^2=0.9989$ y para la gráfica B (F_{438}): $m=1.0114$, $b=-1.0091\%$, $r^2=0.9992$. Estos resultados indican que los datos se ajustan a un comportamiento lineal, además permiten concluir que el sistema es capaz de determinar los cambios de concentración del colorante a través de cambios proporcionales a su fluorescencia, lo que implica la posibilidad de medir cambios en el pH y en el VCA adecuadamente empleando la F_{438} como un indicador exclusivo de la concentración del colorante y al cociente F_{450}/F_{438} como indicador selectivo del pH (véase la figura 24).

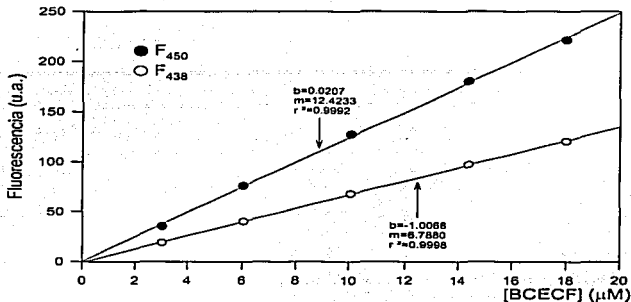


Figura 25. Ejemplo la relación que existe entre la concentración del BCECF y su fluorescencia. Los círculos negros representan a F₄₅₀ y los círculos blancos a F₄₃₈. Nótese que ambos casos se ajustan al comportamiento lineal y que su ordenada al origen es cercana a cero.

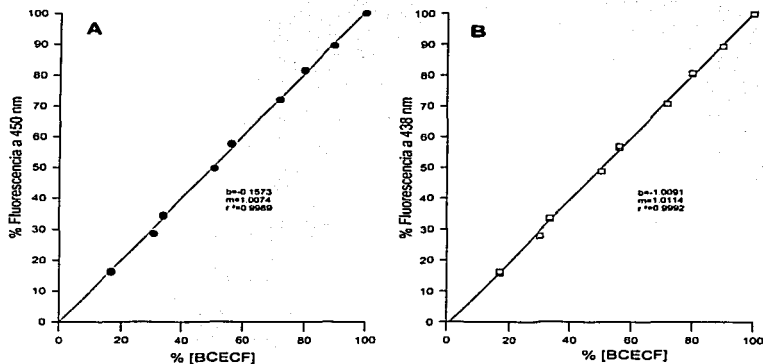


Figura 26. Gráfica que muestra la relación lineal de la fluorescencia del colorante y su concentración. En esta gráfica se involucran tres determinaciones diferentes, las cuales fueron normalizadas expresando a la fluorescencia y a la concentración del colorante como un porcentaje relativo a sus respectivos valores máximos. **A** muestra la F₄₅₀ mientras que **B** muestra a F₄₃₈. En ambos casos existe un ajuste lineal, a juzgar por los parámetros de regresión, con una ordenada al origen prácticamente de cero.

El rango dinámico lineal, esto es aquel en el cual la relación entre la intensidad de fluorescencia del colorante y su concentración es lineal, fue de 40 a

220 u.a. para la F_{450} y de 20 a 120 u.a. para la F_{438} . Esto se determinó para un rango de concentraciones del colorante de 8 a 40 μM . Lo anterior permite establecer dos condiciones para que el sistema permita mediciones simultáneas de VCA y pH_i : 1) La F_{450} debe tener como máximo una intensidad de 210 u.a., valor al cual aún no se ha iniciado la saturación del sistema y 2) La F_{438} debe tener como mínimo 50 u.a. ya que valores menores de intensidad de fluorescencia entorpecen la medición del VCA. Es importante mencionar que estas dos condiciones limitantes se deben a que el rango dinámico de la cámara de video es de 8 bits. Con cámaras de mayor rango dinámico (ej. 16 bits) es posible ampliar los límites de registro.

Comparación de los métodos de calibración del cociente de fluorescencias del BCECF.

Con el objeto de establecer la técnica más exacta para calibrar al CF y medir el pH_i , se estudió la diferencia entre tres métodos de calibración: 1) el de "alto K^+ y nigericina", comúnmente usado en las determinaciones de pH_i realizadas con BCECF y otros colorantes; 2) el de los "puntos nulos", que ha demostrado ser confiable en las determinaciones del pH_i y que además ha puesto en evidencia la sobre-estimación del pH_i que origina el uso del método de alto K^+ y nigericina (Boyarski et al., 1996) y 3) la "calibración del colorante *in vitro*". Para esta comparación, el método de puntos nulos se consideró como el método de referencia dado que los valores de pH_i obtenidos a partir de éste son confiables (Boyarski et al, 1996).

La *figura 27* muestra un ejemplo de las determinaciones de pH mediante el método de puntos nulos. Obsérvese en el registro mostrado en *A* que el valor del CF isosmótico disminuyó al aplicar las soluciones de pH_N de 6.9, 7.0 y 7.1, esto significa que el pH_i fue mayor al pH_N de las soluciones probadas. Al aplicar la solución de pH_N de 7.2 no se apreció ningún cambio (éste es el *punto nulo*), indicando que el pH_i basal de esta célula en particular fue de 7.2. Al aplicar la solución de pH_N de 7.3 se presentó un incremento en el valor del CF isosmótico dado que pH_i fue menor al pH_N . Para comparar los métodos de calibración, los valores de CF de la gráfica *A* se transformaron en valores de pH usando la calibración de alto K^+ y nigericina (*gráfica B*) y la calibración *in vitro* (*gráfica C*). En esta figura, se puede observar que el valor del pH_i en el punto nulo (7.2) corresponde de manera precisa al valor determinado por la calibración *in vitro*, contrario a lo que ocurre con el método de alto K^+ y nigericina, el cual produce una sobre-estimación del pH_i , en este caso de 0.11 unidades.

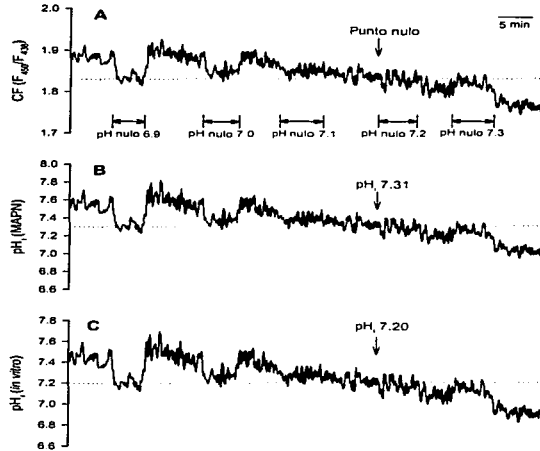


Figura 27. Comparación de los métodos de calibración de las señales fluorescentes del BCECF sensibles al pH. La gráfica A muestra la calibración de los puntos nulos, donde se aprecia que al aplicar la solución con pH_N 7.2 no se presentó ningún cambio en el CF isosmótico (punto nulo), por lo que el pH_i basal de la célula en cuestión se estableció en 7.2. La gráfica B es la transformación de los CF mostrados en A en valores de pH_i usando la calibración de alto K^+ y nigericina. Obsérvese que para el punto nulo (indicado por la flecha) el valor del pH_i corresponde a 7.31, indicando una sobre-estimación de 0.11 unidades de pH para este caso. La gráfica C es la transformación de los CFs mostrados en A en valores de pH_i , usando la calibración *in vitro*. Nótese que en este caso el valor de pH_i en el punto nulo corresponde al valor estimado con la calibración *in vitro*.

El resultado de 11 determinaciones como las descritas anteriormente se muestran en la tabla XIV, donde el valor promedio del pH_i basal determinado por el método de los "puntos nulos" fue de 7.15; de 7.30 por el método de alto K^+ y nigericina y de 7.13 por el método de calibración *in vitro*. El análisis de varianza (ANOVA) practicado a estos datos indicó que existen diferencias significativas entre los métodos de calibración ($P < 0.05$). La diferencia entre la determinación del pH_i con el método de los "puntos nulos" y con el de alto K^+ y nigericina es de 0.16 unidades de pH, mientras que la diferencia entre el método de los "puntos

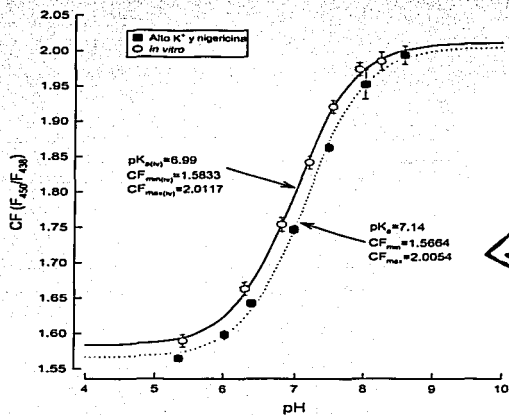
nulos" y la calibración *in vitro* fue de 0.02 unidades de pH. Esto, de acuerdo con la prueba estadística de la menor diferencia significativa (Least Significant Difference o LSD), cuyo límite es una diferencia de 0.10 unidades de pH (para una $P=0.01$), indicó que las mediciones del pH_i calibrando al colorante con el método de alto K⁺ y nigericina son significativamente diferentes de aquellas realizadas usando la calibración de los "puntos nulos"; mientras que tal diferencia no existe entre este último método y la calibración *in vitro*. De esto se concluye que la calibración del BCECF usando el método de alto K⁺ y nigericina sobre-estima al pH_i en 0.16 unidades y que los pHs calculados con la calibración *in vitro* son comparables con los obtenidos por el método de los "puntos nulos".

	Puntos nulos	Alto K⁺ y nigericina	<i>in vitro</i>
	7.20	7.34	7.11
	7.00	7.22	6.97
	7.10	7.24	6.98
	7.20	7.35	7.12
	7.20	7.39	7.22
	7.30	7.45	7.29
	7.20	7.31	7.20
	7.20	7.28	7.16
	7.10	7.27	7.14
	7.10	7.24	7.13
	7.00	7.23	7.08
Promedio DE n	7.146 0.0934 11	7.302 0.0739 11	7.127 0.0952 11

Tabla XIV. Valores de pH_i basal obtenidos mediante tres métodos de calibración diferentes: el método de "puntos nulos", el método de alto K⁺ y nigericina y el método *in vitro*. El análisis de varianza de los valores de pH_i obtenidos por estos tres métodos indica una diferencia significativa entre ellos. De acuerdo con la prueba estadística LSD, las variaciones más significativas se presentan entre el método de los puntos nulos, que es el método de referencia, y el método de alto K⁺ y nigericina. Esto indica que este último sobre-estima al pH_i en 0.16 unidades.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La figura 28 muestra la comparación de la calibración *in vitro* y la calibración con el método de alto K^+ y nigericina. En ella se aprecia que la diferencia entre una y otra curva es constante dentro del rango de pH de 6.2 a 7.8. También se observa que ambas curvas alcanzan un nivel de saturación para valores alcalinos de pH (CF_{max}) y un nivel de saturación para pHs ácidos (CF_{min}), de manera que con esos niveles el CF se vuelve cada vez más insensible al pH. Nótese además que el valor del pK_a determinado a partir de la calibración con alto K^+ y nigericina difiere en 0.15 unidades del pK_a determinado por la calibración *in vitro*. Esta diferencia es prácticamente la misma que existe entre las determinaciones del pH_i obtenidas calibrando al BCECF con alto K^+ / nigericina y con el método de los "puntos nulos".



TESIS CON
FALLA DE CALIBRACION

Figura 28. Comparación de la calibración del BCECF con el método de alto K^+ y nigericina y con el método *in vitro*. La gráfica muestra el ajuste a la Ec. 10 de la calibración *in vitro* (círculos blancos, $n=11$) y el ajuste de la calibración con el método de alto K^+ y nigericina (cuadros negros, $n=11$), las barras representan la desviación estándar de cada medición. Los valores de CF para ambas curvas tienden a un valor máximo (CF_{max}) y a un valor mínimo (CF_{min}), mientras esto ocurre, el CF se va independizando del pH. Nótese que la diferencia entre ambas curvas es constante entre 6.2 y 7.8 unidades de pH.

Efecto que tiene el tamaño y la posición de la región de registro sobre las medidas fluorescentes

La región de registro delimita una zona celular a partir de la cual se realizan las medidas fluorescentes cuando se estudian los cambios en el VCA usando microscopía de fluorescencia (véase la figura 3). Esto es, las mediciones se hacen a partir de una "muestra" del cuerpo celular total. La validación de la técnica de microscopía de fluorescencia tratada en esta tesis implica evaluar si la "muestra" empleada en las mediciones es adecuada para medir cambios en el VCA. Para ello se requiere estudiar el efecto que tiene el tamaño y la posición de la región registro sobre las medidas fluorescentes.

¿Cuál es el tamaño óptimo de la región de registro para medir las señales fluorescentes?

Para determinar la influencia que tiene el tamaño de la región de registro sobre las medidas fluorescentes, se colocaron regiones de diversos tamaños sobre una misma célula, centrándolas en la zona de mayor intensidad fluorescente tal como lo ilustra la *figura 29C*. La célula se expuso a soluciones anisomóticas ($\sim \pm 8\%$) y la fluorescencia se midió a partir de las regiones de registro previamente delimitadas. Las medidas de fluorescencia relativa obtenidas se muestran en la *figura 29A*, se aprecia que el cambio de fluorescencia al exponer la célula a las soluciones anisomóticas, al igual que el ruido de las señales, disminuye conforme el tamaño de la región de registro aumenta. Una forma de encontrar el tamaño

óptimo de la región de registro para realizar las medidas fluorescentes es a través del cociente señal-ruido (CSR), definido como (Srinivas y Bonanno, 1997):

$$CSR = \frac{|F_T - F_0|}{(\sigma_0 + \sigma_T)/2}, \quad \text{Ec. 11}$$

donde:

F_0 = Fluorescencia estacionaria basal

F_T = Fluorescencia estacionaria en los pulsos anisomóticos

σ_0 = Desviación estándar del estado estacionario basal

σ_T = Desviación estándar del estado estacionario en los pulsos anisomóticos

El tamaño de la región que mejor permitirá medir los cambios en la intensidad fluorescente será aquel que tenga el valor máximo del CSR. La relación que existe entre el tamaño de la región de registro y el CSR se muestra en la *figura 29B*. Se observa que el tamaño de región comprendido en el rango de 1.96 y 47.45% del cuerpo celular presenta un CSR mayor a 10, lo cual indica que la señal es al menos 10 veces mayor que el ruido cuando la célula se somete a cambios discretos en la osmolalidad externa ($\sim \pm 8\%$), esto implica que cambios en el VCA menores al 0.8% quedarían inmerso en el ruido, este límite obviamente disminuye conforme el CSR aumenta. Para el caso mostrado en la *figura 29*, el valor máximo del CSR se alcanzó con un tamaño de región del 20.55 % del área del cuerpo celular, valor que es muy diferente del tamaño de la región de registro usada normalmente para medir los cambios en el VCA, el cual es del 3 al 10 % del área del cuerpo celular. Este rango

está delimitado por las líneas punteadas en la figura 29B, se aprecia que los valores de CSR dentro de dicho rango son al menos de 15, indicando que con una región cuyo tamaño se encuentra en el rango del 3 al 10% del área del cuerpo celular, se tiene muy buena sensibilidad para medir cambios en el VCA a partir de las medidas fluorescentes.

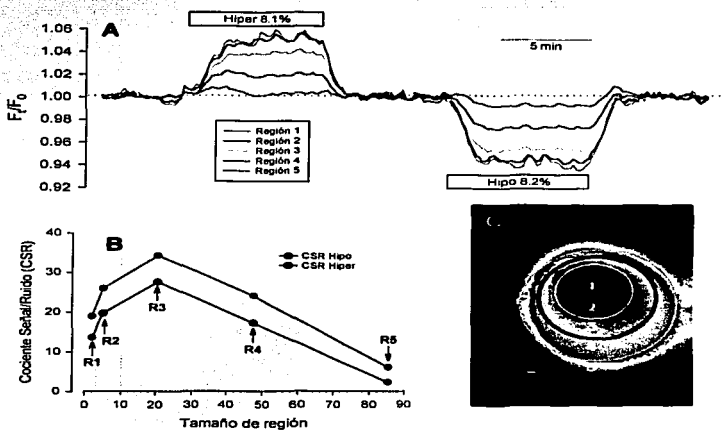


Figura 29. Efecto del tamaño de la región sobre las mediciones de fluorescencia. **A** muestra las señales de fluorescencia obtenidas a partir de regiones de diferentes tamaños colocadas sobre una célula cargada con BCECF, como se muestra en **C**. Nótese que la magnitud del cambio de fluorescencias, al igual que el ruido, disminuyen conforme el tamaño de la región aumenta. **B** muestra el efecto que tiene el tamaño de la región sobre el cociente señal/ruido (CSR). Nótese que en el rango que se usa normalmente en las determinaciones celulares (delimitado por las líneas punteadas), el CSR tiene un valor superior o igual a 15. **C** es la imagen (en pseudocolor) de una célula cargada con BCECF, tomada con microscopía de fluorescencia.

¿Cuál es la posición ideal de la región para obtener las mejores señales fluorescentes?

Para encontrar la localización óptima de la región de registro para medir los cambios en las señales fluorescentes, una célula cargada con BCECF se sometió a

pulsos modestamente anisomóticos ($\sim \pm 8\%$), las señales de fluorescencia se obtuvieron a partir de diferentes regiones del mismo tamaño (4.78 % del área del cuerpo celular) pero de diferente localización, como lo muestra la *figura 30C*. En la *figura 30A* se muestra la fluorescencia relativa registrada a partir de cada región. Se aprecia que las mejores señales fluorescentes se obtuvieron a partir de la región centrada en la zona celular de mayor fluorescencia y que conforme la región se aleja de tal zona (hacia la periferia celular) la señal se pierde y queda inmersa en el ruido. La *figura 30B* muestra los valores del CSR obtenidos para cada región. Se observa que el mejor cociente señal/ruido se presenta en la región 2, que corresponde a la zona celular de mayor intensidad fluorescente.

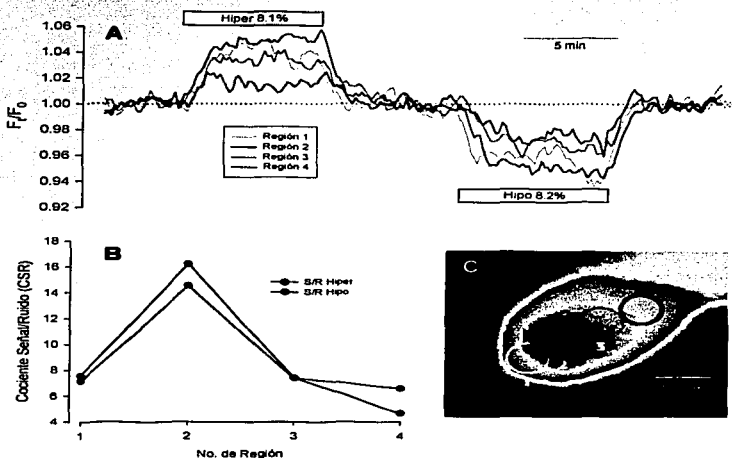


Figura 30. Efecto de la posición de la región sobre las medidas fluorescentes. **A** muestra la fluorescencia relativa obtenida a partir de las regiones mostradas en **C**. Se aprecia que la región colocada en la zona celular de mayor fluorescencia es la que brinda las mejores señales. **B** muestra los valores de CSR para cada región. Nótese que el mayor valor del cociente se obtiene con la región 2. **C** es la imagen (en pseudocolor) de una célula cargada con BCECF, tomada con microscopía de fluorescencia.

TESIS CON
ALLA DE ORIGEN

Precisión del método para las determinaciones de volumen

La transformación de las señales de fluorescencia a cambios en el VCA implica dos suposiciones. La primera, ya tratada en esta tesis, es que los cambios en la fluorescencia son proporcionales a los cambios en la concentración del colorante dentro del rango en que se efectúan las medidas. La segunda es que la F_b permanece constante durante todo el experimento. Para evaluar la segunda suposición, y determinar el error que ésta causa sobre las medidas de los cambios en el VCA, se determinó la precisión entre ensayos del método. Para ello se aplicaron de manera alternada varios pulsos anisomóticos ($\pm 10\%$), en una misma célula cargada previamente con BCECF. Se midieron las señales fluorescentes resultantes y se transformaron a los valores correspondientes de VCA, siguiendo el procedimiento descrito en la sección de Métodos. La *figura 31* es un ejemplo de estas determinaciones. En *A* se muestran los cambios de VCA calculados a partir de las señales fluorescentes resultantes de excitar al BCECF a 438 nm, se aprecia que la magnitud de los cambios de volumen son comparables para cada pulso anisomótico. En *B* se presenta la relación entre F_0/F_1 y π_0/π_1 para el primer par de pulsos anisomóticos (pulsos de calibración), que permite determinar F_b , mientras que *C* muestra que la célula en cuestión presenta un comportamiento osmométrico, ya que los pulsos de calibración (círculos negros) caen dentro de los valores predichos para un osmómetro ideal (línea continua). Los estados estacionarios para cada pulso de calibración se compararon entre sí y se determinó su variación. El

coeficiente de variación (CV) encontrado para la solución 10% hiperosmótica en una misma célula fue de 0.77% y para el pulso hiperosmótico de 0.42% (n=6). Esto significa que al suponer que la F_b permanece constante durante todo el experimento se introduce un error del 0.77% y del 0.42% en la determinación del VCA para los pulsos hiperosmótico e hiposmótico respectivamente.

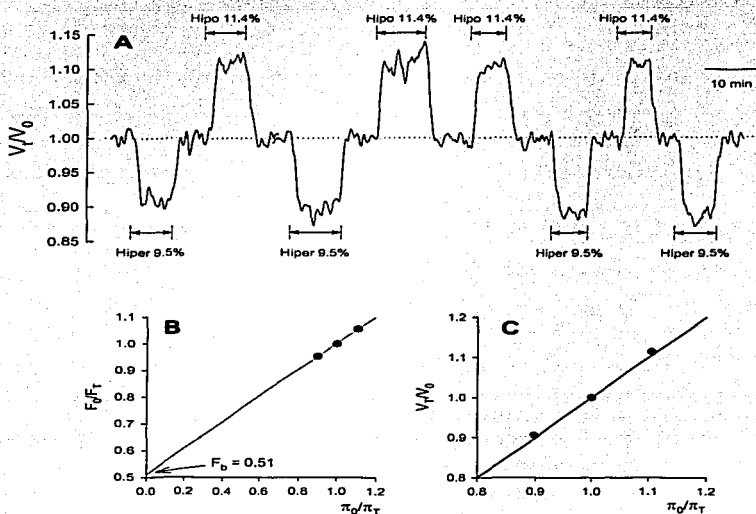


Figura 31. Precisión entre ensayos. **A** muestra los cambios de volumen de una célula cuando se somete a varios pulsos anisomóticos ($\sim \pm 10\%$). Nótese que la magnitud de los cambios del VCA son comparables. **B** es la gráfica que permite obtener el valor de la fracción de fondo (F_b), el cual corresponde a la ordenada al origen de la regresión lineal aplicada a los pulsos de calibración (círculos negros). **C** es la gráfica de los cambios de VCA estacionarios durante los pulsos de calibración como una función de π_0/π_T . Nótese los cambios de volumen celular durante los pulsos de calibración (círculos negros) prácticamente caen sobre la línea continua que representa el comportamiento de un osmómetro perfecto

También se obtuvo la precisión intermedia, esto es la precisión de las mediciones de los cambios de VCA provocados por las soluciones $\sim 10\%$

anisomóticas en diferentes células, encontrándose un CV de 1.01% para el pulso 10% hiperosmótico y de 0.87% para el pulso 10% hiposmótico (n=20).

Exactitud del método para las determinaciones de volumen

La ecuación que rige la relación ideal entre el VCA y la presión osmótica (π) es la de Van't Hoff:

$$\frac{V_T}{V_0} = \frac{\pi_0}{\pi_T} \quad \text{Ec. 12}$$

Donde V_T es el volumen en el estado estacionario al aplicar una presión osmótica π_T , V_0 es el volumen en condiciones isosmóticas, donde la presión osmótica es π_0 . Esta relación es seguida por un osmómetro perfecto dentro de cierto rango. Dado que se ha encontrado que las células se comportan como osmómetros perfectos al ser sometidas a pequeños cambios de la osmolalidad externa (por ej. $\pm 10\%$), es de suponerse que los cambios "ideales" del VCA (V_T/V_0) serán idénticos al cociente π_0/π_T , como lo indica la Ec. 12. Esto permite considerar los valores de π_0/π_T como los valores de VCA de referencia y compararlos con los obtenidos experimentalmente, para entonces determinar la exactitud del método. Con este fin, V_T/V_0 se expresó como un porcentaje de π_0/π_T y se tomó al valor promedio como la exactitud del método. Para el pulso $\sim 10\%$ hiperosmótico se encontró una exactitud de $99.38 \pm 1.20\%$ (n=20, Media \pm %CV) y de $99.49 \pm 1.03\%$ (n=20, Media \pm %CV) para el pulso $\sim 10\%$ hiposmótico.

Determinación simultánea de los cambios en el volumen celular acuoso y en el pH intracelular

La *figura 32* muestra un ejemplo de la determinación simultánea de cambios en pH_i y VCA empleando al BCECF como el indicador de ambos parámetros. En este experimento la célula fue sometida a una solución isosmótica conteniendo 20 mM de NH_4Cl . Los cambios en el VCA (obtenidos a partir de la F_{438}) mostrados en *A* de la *figura 32* son comparables con los resultados obtenidos a partir de la técnica que emplea a la calceína como indicador del volumen en estas mismas células, en las cuales la exposición a la solución de NH_4Cl 20 mM, origina un incremento del volumen celular acuoso (a) seguido por una fase de regulación (b); el retiro del estímulo provoca que la célula disminuya su volumen mas allá de su nivel inicial (c), el cual tiende a recuperarse (d). Los cambios en el pH_i (obtenidos a partir del cociente F_{450}/F_{438}) se muestran en *B*. Los cambios en el pH son consistentes con los reportados en multitud de células desde su descripción inicial por Boron y De Weer en 1976. Estos cambios consisten en una alcalinización inicial rápida (1), seguida por una regulación de pH conocida como fase de acidificación del Plateau (2) y una acidificación rápida al retirar el pulso de NH_4Cl , que va más allá del pH_i basal inicial (3). Se puede apreciar también que después de que la célula ha quedado ácida, ésta tiende a recuperar su nivel basal inicial de pH (4).

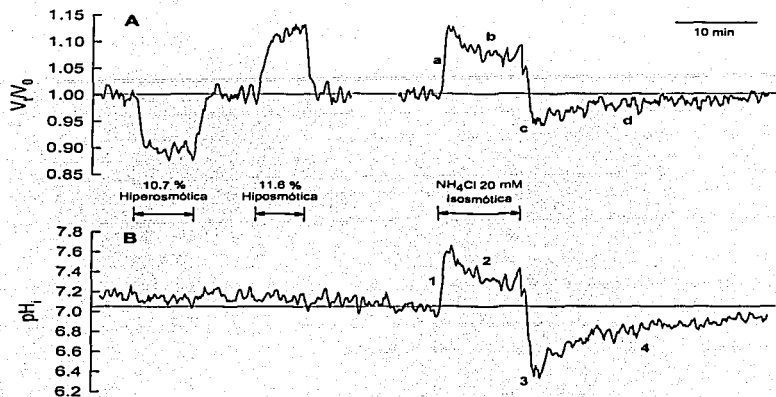


Figura 32. Cambios simultáneos de VCA y de pH_i en una célula expuesta a un pulso de NH_4Cl 20 mM. La A muestra los cambios en el VCA. B muestra los cambios del pH_i .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La técnica microespectrofluorométrica para medir cambios en el VCA que se describe y valida en este trabajo, tiene varias ventajas sobre otros métodos existentes. La más importante de estas ventajas es que permite medir cambios en el VCA en cualquier tipo de célula, sin importar ni su tamaño ni su forma. Además, las técnicas basadas en colorantes fluorescentes (dependiendo de la naturaleza de éstos) permiten la medida no invasiva de cambios en la concentración intracelular de iones (ej. H^+ y Ca^{2+}) en la misma célula, de manera simultánea.

El presente trabajo estuvo circunscrito al estudio de algunas propiedades espectrales del colorante fluorescente BCECF, que se caracteriza por presentar gran sensibilidad al pH a ciertas longitudes de onda de excitación, así como un punto isobéptico en el cual la fluorescencia es independiente de la concentración de H^+ . Esta peculiaridad brinda la posibilidad de emplear al BCECF como la base de una técnica de microscopía de fluorescencia que permite medir de manera simultánea cambios en el VCA y en el pH_i en una misma célula. La validación de esta técnica es indispensable para obtener mediciones cuantitativas y confiables de la regulación y/o el mantenimiento de ambos parámetros. Esto permite la realización de estudios cinéticos y moleculares de los mecanismos subyacentes a la fisiología y patología del control del pH_i y del volumen celular.

Propiedades espectrales del BCECF libre

En la determinación de las propiedades espectrales del BCECF fuera de la célula (*in vitro*), se empleó una solución que simulaba el contenido iónico del citosol de la línea celular empleada (NG-108). Esto tuvo la finalidad de evitar diferencias entre los espectros de excitación determinados *in vitro* e *in vivo*, causadas por alguna diferencia de fuerza o composición iónica.

En la figura 14 se muestra que la fluorescencia del BCECF al ser excitado a 438 nm es independiente del pH (punto isobéptico -PI-), esto permite emplear a esta fluorescencia como un indicador exclusivo de la concentración del colorante, haciendo posible su uso para medir los cambios en el volumen celular acuoso (VCA). Por otro lado, la fluorescencia del BCECF muestra una exquisita sensibilidad al pH cuando es excitado a 470 o 498 nm, puntos del espectro en los que el BCECF funciona como un estupendo indicador de pH. Esto, junto con el hecho de que la forma del espectro de excitación del BCECF varía conforme cambia el pH de la solución en la que se encuentra diluido el colorante, permite el seguimiento del pH a través de un cociente de fluorescencias (CF), que es, como se discutirá más adelante, insensible a cambios en la fluorescencia debidos a dilución o concentración del colorante en el espacio citosólico, así como al fotoblanqueamiento y apagamiento del colorante o a su salida de la célula.

Los aditamentos ópticos no tienen efecto sobre las propiedades espectrales del BCECF.

Existe el antecedente de que los aditamentos ópticos empleados comúnmente en las determinaciones microespectrofluorométricas celulares pueden interferir con las propiedades espectrales de algunos colorantes fluorescentes, tal es el caso del Fura-2, empleado en las determinaciones de calcio intracelular (Negulescu y Machen, 1990). Por lo tanto, existe la posibilidad de que la vía óptica usada afecte las propiedades espectrales del BCECF, por lo que es importante asegurarse de que los parámetros en los que se basa el método aquí descrito (el PI y la sensibilidad de la fluorescencia del BCECF al pH), no se modifiquen de manera significativa. Si así fuese las medidas y las conclusiones derivadas del método quedarían invalidadas.

La figura 15 presenta los espectros de excitación del BCECF determinados en la cámara de experimentación a diferentes valores de pH. En ella se aprecia que tanto la sensibilidad del colorante al pH como la forma de su espectro son comparables con aquellas registradas con el espectrofluorómetro. El rango de valores para el PI en las determinaciones en la cámara fue de 434-441 nm, con un valor promedio de 437.5 ± 1.64 nm ($\bar{X} \pm D.E.$, n=44). No obstante la variabilidad, el valor del PI no es significativamente distinto del obtenido en la celda (438 nm). Por lo tanto, las propiedades relevantes del colorante, que permiten su uso confiable para medir simultáneamente los cambios en el pH_i y en el VCA, no se alteran por

la vía óptica implicada en el sistema de medición empleado en este trabajo. La variabilidad en la determinación del punto isosbético en la cámara de experimentación cae dentro del error experimental. Probablemente la variación es introducida por dificultades técnicas inherentes al método; como son el mezclado de las soluciones en la cámara y las variaciones estocásticas en la salida del detector.

El medio ambiente intracelular no afecta las propiedades espectrales del BCECF.

La figura 16 muestra que la forma espectral del BCECF en el interior celular y la gran sensibilidad al pH de su fluorescencia se mantienen, en lo esencial, sin cambios con relación a las características registradas tanto en el espectrofluorómetro como en la cámara de experimentación. El valor del PI determinado intracelularmente cae dentro del rango de 430 a 446 nm, siendo 437 ± 3.7 nm ($\bar{X} \pm D.E.$, n=151) su valor promedio. Claramente, estas determinaciones del PI presentaron mayor variabilidad que las realizadas en la cámara de experimentación dada la existencia de un mayor número de fuentes de error experimental, tales como la variabilidad biológica y la imposibilidad de controlar adecuadamente la concentración del colorante en el interior celular. No obstante, estadísticamente no existe diferencia significativa entre la determinación del PI en la celda espectrofluorométrica, en el interior celular y en la cámara de experimentación ($P > 0.05$).

Los resultados experimentales apoyan la idea de que el medio ambiente citoplásmico de las células utilizadas en este estudio no afecta la sensibilidad de la fluorescencia del colorante al pH ni la posición espectral del punto isobéptico, que son los parámetros relevantes para poder emplear al BCECF como indicador de cambios simultáneos en el pH_i y en el VCA.

El cociente de fluorescencias es un indicador selectivo del pH

Una vez establecido que las características espectrales y la sensibilidad del colorante al pH no se alteran significativamente ni por efecto de los aditamentos ópticos, ni por las condiciones de medio ambiente intracelular, es crucial determinar si el CF mide selectivamente al pH.

El CF es la razón de dos fluorescencias obtenidas a partir de la excitación del colorante a dos longitudes de onda (λ_s) determinadas. Para los fines del presente trabajo, una de estas λ_s debe corresponder al PI (438 nm, expresada como λ_2), que es el denominador del cociente. La segunda λ es cualquiera que rinda una fluorescencia sensible al pH (denotada como λ_1). En teoría, cualquier punto del espectro de excitación del colorante (que no sea el isobéptico) puede emplearse como λ_1 , pero la sensibilidad y la relación señal/ruido son diferentes para cada caso, por lo tanto, es importante establecer la λ_1 que ofrezca la mejor resolución.

Esta λ estará determinada, entre otros factores, por el rango dinámico del sistema de registro.

Para seleccionar λ_1 se descartó la región del espectro de excitación que corresponde a las longitudes de onda menores al PI, dado que en esa región la fluorescencia presenta escasa sensibilidad al pH (véase la figura 14). Además, la cercanía de estas λ s con la región UV del espectro electromagnético puede resultar dañina para las células. Por otro lado, la fluorescencia del BCECF al excitarlo a 470 ó a 498 nm tiene sensibilidad adecuada para el pH, además de que la fluorescencia en estos puntos (debido a que se encuentra en los "picos" del espectro) presenta la mejor relación señal/ruido al momento de detectar cambios en el pH. Por lo tanto, la determinación más adecuada de los cambios en el pH_i puede realizarse empleando como indicador al cociente de las fluorescencias resultantes de excitar al colorante a 470 ó 498 nm y a 438 nm.

La relación lineal entre la fluorescencia y la concentración del colorante es importante para medir selectivamente al pH.

El CF se emplea con mucha frecuencia en las determinaciones fluorométricas de pH, calcio, magnesio y otros iones en virtud de que se le considera un parámetro independiente de la concentración del colorante, del fotoblanqueamiento y del apagamiento de la fluorescencia. Sin embargo, no existen pruebas experimentales que fundamenten esta suposición, ni se han evaluado las limitaciones o precauciones que deben considerarse para su empleo

en la medición del pH_i . La validación del método desarrollada en este trabajo requiere demostrar que el CF es selectivamente sensible a los cambios en el pH . Para tal fin se determinaron espectros de excitación del colorante libre en celda, manteniendo el pH constante y variando su concentración (2 a 10 μM). Teóricamente cualquier CF obtenido en estas condiciones debería ser independiente de la concentración del colorante y las curvas de la figura 18 tendrían que superponerse. Sin embargo, esto no fue así; como se aprecia en esa misma figura, el CF varía inversamente a los cambios en la concentración del colorante. El origen de este efecto es la desviación de la linealidad de la fluorescencia con respecto a la concentración del BCECF, que se observa en la figura 19A, donde las longitudes de onda de excitación que producen mayor fluorescencia (470 y 498 nm) se alejan mucho del comportamiento lineal, provocando la variación evidente en sus respectivos CF, mientras que lo contrario ocurre con las fluorescencias a 450 y 438 nm (véase la figura 19B). La importancia de la relación lineal entre las fluorescencias usadas para calcular el CF y la concentración del colorante se comprobó al obtener espectros de excitación del colorante exactamente en las mismas condiciones anteriores, dentro de un rango de concentraciones más bajo (0.5 a 3.5 μM). Nótese en la figura 21 que el efecto de la concentración del colorante sobre el CF disminuye, pero no se elimina completamente, a pesar de que el comportamiento de las fluorescencias es prácticamente lineal con respecto a la concentración del BCECF (véase la figura 22A). Dado que la dependencia se acentúa a las concentraciones más bajas y en los

máximos de fluorescencia (véase la figura 22B), se considera que la ordenada al origen diferente de cero, que puede inferirse de la figura 22A (intercepto de líneas continuas con el eje "y"), es la causa de la variación remanente, como se verá posteriormente.

La ordenada al origen de la relación entre la fluorescencia y la concentración del colorante es importante para medir selectivamente al pH

Ya se estableció que para obtener un CF adecuado para el seguimiento del pH_i , es indispensable que las fluorescencias registradas tengan un comportamiento lineal con respecto a la concentración del colorante. Por lo tanto, es preciso establecer que esta relación se cumple en el sistema empleado para las determinaciones celulares.

Para comenzar con esta discusión, es importante destacar que el sistema de detección tiene un rango dinámico útil limitado, esto es, tiene un rango lineal acotado por las fluorescencias mínima y máxima (0-254 u.a; 8 Bits), que confina las medidas a una región relativamente pequeña en el rango de intensidades de fluorescencia. El rango dinámico de un sistema de video-imágenes se expresa operacionalmente como el cociente de la máxima y la mínima intensidades de luz útiles para obtener una medida sin distorsión de la señal (Inoué y Spring, 1997). A las intensidades de luz más altas, el sistema se satura y a las más bajas la señal queda inmersa en el ruido.

El estudio del CF en la cámara de experimentación requirió seleccionar una λ de excitación cuya fluorescencia fuera altamente sensible al pH (λ_1) al mismo tiempo que cayera dentro del rango dinámico del sistema de video-registro. Como ya se ha mencionado, el empleo de la fluorescencia del colorante excitado a 470 ó 495 nm representa la mejor opción. Sin embargo, el rango dinámico del sistema de detección (videocámara) no lo permite debido a que existe una diferencia muy grande entre la intensidad de la fluorescencia al excitar al colorante a 470 o 495 nm y la fluorescencia en el PI. Esto ocasiona que la fluorescencia de intensidad más alta (F_{470} o F_{495}) sature al sistema mientras que la obtenida al excitar en el PI no ha alcanzado aún valores adecuados para obtener una buena relación señal/ruido para medir cambios en el VCA (mayores a 50 u.a.). Por lo tanto, se buscó otro punto en el espectro de excitación que fuera sensible al pH y que cayera en el rango dinámico útil. El punto óptimo estuvo a 450 nm. En este punto la fluorescencia tiene suficiente sensibilidad al pH y a la vez queda alejada del PI en el espectro, por lo que no hay interferencia, como lo demuestran los registros de la *figura 33*.

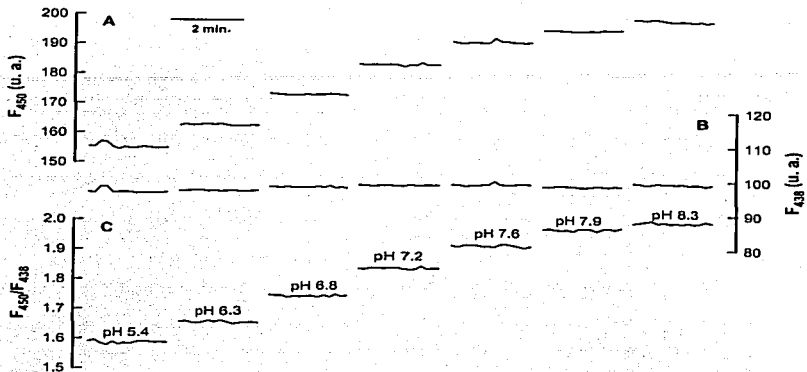


Figura 33. Insensibilidad al pH de la fluorescencia en el PI. Se muestran las señales fluorescentes resultantes de excitar al BCECF a 450 nm (F_{450}) y a 438 nm (F_{438}). Los cambios en el pH de la solución se realizaron por el método de diluciones recíprocas, de manera que la concentración de colorante fue constante. La gráfica A muestra la variación de F_{450} con el pH. La gráfica B muestra que la F_{438} no se afecta por los cambios en el pH. La gráfica C muestra el cociente de F_{450} y F_{438} . Nótese que el cociente varía con el pH.

Una vez establecida λ_1 , fue preciso demostrar que la fluorescencia del BCECF al excitarlo a 450 nm (F_{450}) y a 438 (F_{438}) son adecuadas para calcular el CF que mida selectivamente los cambios en el pH. En la figura 23A se observa que tanto la F_{450} y la F_{438} presentan una relación lineal con respecto a la concentración del colorante y que la ordenada al origen es prácticamente la misma. No obstante, el CF sigue siendo dependiente de la concentración, tal como lo muestra la figura 23B (círculos negros). La causa de esta dependencia ahora es la ordenada al origen (b), que tiene un valor negativo, como se muestra en la regresión lineal en la figura 23A (líneas continuas). Este tipo de b indica que cuando la concentración del colorante es cero, la fluorescencia tiene un valor negativo, el cual no puede medirse

experimentalmente. Si se aprecia la regresión lineal para cada trazo en la figura 23A, se puede deducir que la F_{438} llega a cero cuando la F_{450} tiene aún un valor cuantificable, esto le da como consecuencia un valor infinito al CF; esto es, bajo estas condiciones, el valor del CF tiende a aumentar conforme la concentración del colorante disminuye, como se aprecia en la figura 23B. Esta conclusión se comprueba simplemente al corregir las fluorescencias y calculando el CF para ellas. Tal corrección consistió en sustraer el valor de la b a las fluorescencias correspondientes, entonces a partir de ellas se calculó el CF que, como se ilustra en la figura 23B (cuadrados blancos), presenta escasa variación con la concentración del colorante. Lo anterior significa que el CF es un indicador selectivo del pH solo si se cumple lo siguiente: 1) las fluorescencias usadas para calcular el CF tienen una relación lineal con respecto a la concentración del colorante y 2) el valor de la b de esa relación es cero.

Como ya se demostró, es posible corregir el error que introduce en el cálculo del CF una b diferente de cero. Si el valor de esta última es conocido, entonces las fluorescencias pueden corregirse de la manera descrita en el párrafo anterior, de esta forma el CF calculado será independiente de la concentración del colorante. Experimentalmente esto sólo es posible cuando el valor de b de la relación fluorescencia *versus* [BCECF] es positivo, es decir, tal corrección puede realizarse sólo cuando en ausencia del colorante, el sistema detecta alguna señal fluorescente.

Con las bases anteriores, se ajustaron los parámetros del sistema empleado en las determinaciones celulares y como puede apreciarse en la figura 24, el CF se independizó de la concentración del BCECF. Con esto, queda establecido que el CF elegido, bajo estas condiciones experimentales, puede emplearse de manera confiable para registrar exclusivamente los cambios de pH.

El cociente de fluorescencias es un indicador selectivo del pH intracelular

Hasta ahora se ha estudiado el CF *in vitro*, a concentraciones de BCECF quizás muy diferentes de las que se pudieran encontrar en el interior celular. Sin embargo, las determinaciones en la celda espectrofluorométrica y en la cámara de experimentación han permitido conocer la naturaleza del CF.

Los estudios realizados sobre la concentración intracelular de la calceína en estas células, bajo las condiciones de carga descritas en este trabajo, indican que el colorante llega a alcanzar concentraciones de $\sim 500 \mu\text{M}$ en el interior celular (Álvarez-Leefmans et al, 1995), por lo que es muy probable que el BCECF, que es un compuesto estructuralmente muy cercano a la calceína, alcance concentraciones similares. La diferencia entre los rangos de concentraciones usados en las determinaciones *in vitro* (de 0.5 a $10 \mu\text{M}$ en el espectrofluorómetro y de 8 a $40 \mu\text{M}$ en la cámara de experimentación) y la probable concentración intracelular del BCECF ($\sim 500 \mu\text{M}$) es muy grande, por lo que podría dudarse que existe una

relación lineal entre la fluorescencia del colorante y su concentración en el interior celular. Esto repercutiría en la independencia del CF, de manera que éste podría verse afectado por los cambios en la concentración del BCECF, lo que provocaría incertidumbre en las mediciones del pH_i . Sin embargo, hay que destacar que existe gran diversidad de factores intracelulares tales como la fuerza iónica, el espesor de la muestra y la viscosidad, que pueden afectar el rango de las concentraciones del colorante que se relacionan linealmente con su fluorescencia, lo cual afectaría de la misma manera el rango de concentraciones que permiten tener un CF independiente de la concentración del colorante. Una forma de poner a "prueba" la insensibilidad del CF intracelular a la concentración de colorante es sometiendo a una célula cargada con BCECF a pulsos anisomóticos, durante los cuales la célula no regule su volumen (ej. pulsos $\sim 10\%$ anisomóticos). Bajo estas condiciones la concentración del BCECF cambia y el CF, en teoría, debe permanecer constante. La figura 32 muestra que éste es el caso. En ella se aprecia que durante los pulsos anisomóticos de calibración, el pH_i permanece prácticamente constante, indicando que la dilución y la concentración del colorante en los rangos de utilidad experimental no afectaron al CF.

Linealidad y rango útil de la relación entre la fluorescencia del BCECF y su concentración.

La determinación de la linealidad de la relación entre la fluorescencia del colorante y su concentración es importante por dos razones:

- 1) Como ya hemos visto, el CF es independiente de la concentración del BCECF siempre y cuando las fluorescencias medidas en las dos longitudes de onda que conforman dicho cociente tengan un comportamiento lineal con relación a la concentración del colorante. Además, es necesario que la ordenada al origen de dicha relación sea cero.

- 2) El tratamiento matemático aplicado a las fluorescencias para su transformación a cambios en el VCA supone que la relación entre la fluorescencia y la concentración del colorante es lineal.

Por lo antedicho, es indispensable demostrar que existe una relación lineal entre la fluorescencia y la concentración del BCECF cuando se emplea el sistema de medición descrito en este trabajo. Dado que los experimentos destinados a probar la linealidad del sistema se realizaron con distintas ganancias (amplificación) del sistema de detección, distintas profundidades de foco, distintas concentraciones del colorante y distintos rangos de fluorescencia, fue necesario normalizar los datos de fluorescencia y de concentración del colorante, expresándolos como un porcentaje relativo a su valor máximo respectivo (véase la figura 26). De esta manera fue posible analizar los tres experimentos realizados independientemente de la muestra. Es importante destacar que la normalización de los datos de fluorescencia y de concentración del colorante implica que el 100% de la

concentración del colorante corresponda al 100% de la fluorescencia y que en la ausencia del colorante la fluorescencia sea cero. De esta manera, la línea de regresión *teórica* para la relación que existe entre la concentración y la fluorescencia tiene pendiente unitaria y ordenada al origen de cero.

Los parámetros de regresión y la desviación que presentaron los valores experimentales (figura 26) con respecto a la línea de regresión obtenida para esos mismos datos (alrededor del 1% para ambas longitudes de onda) indican que existe una relación directamente proporcional entre la fluorescencia del colorante y su concentración en el rango explorado (de 8 a 40 μM). Dicha relación puede describirse por la ecuación de la línea de regresión. La evaluación estadística de los parámetros de la regresión aplicada a los datos experimentales (la ordenada al origen $-b-$ y la pendiente $-m-$), se llevó a cabo mediante la prueba t (Glantz 1992). Para el caso de la b , tanto en la F_{450} como en la F_{438} , no hubo diferencia significativa ($P>0.05$) con respecto al valor teórico (cero). De la misma manera, no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) para el caso de la m experimental de cada fluorescencia con respecto a la pendiente teórica (unitaria). Esto significa que no existe diferencia significativa entre las regresiones lineales experimentales y la teórica.

Lo anteriormente expuesto permite concluir que en el rango de concentraciones de BCECF explorado:

- 1) Existe una relación lineal entre la fluorescencia del colorante y su concentración utilizando el sistema de medición aquí descrito.
- 2) La F_{450} y la F_{438} pueden emplearse para calcular el CF, que indicará los cambios en el pH de manera independiente de los cambios en la concentración del colorante.
- 3) Es posible realizar la transformación de la fluorescencia a cambios en el VCA mediante los algoritmos descritos para otros colorantes (Álvarez-Leefmans et al, 1995).

El rango de fluorescencias en el que el sistema de medición presenta un comportamiento lineal con respecto a la concentración del BCECF, fue de 40 a 220 u.a. para la F_{450} y de 20 a 120 u.a. para la F_{438} . Este rango debe determinarse cada vez que se cambian las condiciones del sistema (ej.: lámpara, vía óptica ó video cámara).

Es importante determinar los valores óptimos de fluorescencia que permitan la medición precisa de los cambios en el pH_i y en el VCA. Para ello deben considerarse las dos fluorescencias medidas (F_{450} y la F_{438}). Dado que la F_{450} es la de mayor intensidad, debe tenerse cuidado de que al iniciar cada experimento su intensidad no exceda el límite máximo (indicado en el párrafo anterior), es decir, la F_{450} debe ser < 220 u.a. Aunque el rango de la cámara de video permita mediciones de hasta 254 u.a., las fluorescencias mayores a 220 u.a. pueden comportarse de manera no lineal debido a que se opera cerca de la saturación del rango dinámico del detector. Por otro lado, se debe considerar que los posibles cambios de pH en las determinaciones celulares pueden incrementar la

F_{450} , por lo tanto es importante establecer un valor considerablemente menor al iniciar un experimento. Este valor de fluorescencia dependerá del efecto que pueda tener la solución de prueba sobre el pH_i . Para el ejemplo mostrado en el presente trabajo, se determinó experimentalmente que la intensidad máxima que la F_{450} debe tener al iniciar el experimento es de 210 u.a.

Por otro lado, la F_{438} debe tener una intensidad mayor a 20 u.a. (límite menor del rango en el cual se determinó su linealidad con respecto a la concentración de BCECF). También se debe considerar que la F_{438} es el indicador de los cambios en el VCA, por lo tanto es necesario que esta fluorescencia tenga un valor que permita medir al VCA de manera precisa; para el caso tratado en este trabajo, dicho valor se estableció en 50 u.a. ya que a intensidades menores de fluorescencia las señales que reflejan cambios en el VCA pueden quedar inmersas en el ruido.

De acuerdo con lo anterior, la condición para determinar con precisión los cambios en el pH_i y en el VCA de manera paralela es que la intensidad de la F_{450} sea como máximo de 210 u.a. y que la intensidad de la F_{438} sea como mínimo de 50 u.a.

La calibración del cociente de fluorescencias *in vitro* es más adecuada que la calibración con alto K^+ /nigericina

Una vez establecido que el CF es un indicador selectivo del pH_i , es indispensable discutir y evaluar los métodos disponibles para calibrar las señales fluorescentes y transformarlas en valores de pH_i . No obstante el hecho demostrado de que la calibración con el método de alto K^+ /Nigericina no da resultados confiables (Boyarski et al., 1996), éste se emplea con mucha frecuencia por razones prácticas y porque no se cuenta con otro método mejor que proporcione la

calibración del colorante que incluya el rango de pH de interés biológico (6.2-7.8). Por otro lado, el método de los puntos nulos ha demostrado ser muy confiable en la determinación del pH_i . Sin embargo, tiene el inconveniente de que sólo proporciona *un punto* de calibración. Se ha reportado que existe una discrepancia significativa entre los valores de pH_i obtenidos usando los dos métodos de calibración mencionados. Esta diferencia depende del valor del pH que se esté midiendo, es decir, la diferencia no es constante (Boyarski et al, 1996). En el presente trabajo se evaluó si existe tal diferencia entre el pH_i medido usando la calibración de los puntos nulos (considerado como el método de referencia) y aquél determinado por el método de alto K^+ y nigericina. Por otra parte, dado que ni los aditamentos ópticos ni el medio intracelular tuvieron efecto sobre las propiedades espectrales del BCECF, es lógico pensar que una calibración *in vitro*, es decir afuera de las células, puede proporcionar resultados comparables con los obtenidos usando el método de alto K^+ y nigericina o el de los “puntos nulos”. Por lo tanto, también se realizó un estudio comparativo entre la calibración *in vitro* y la calibración con los “puntos nulos”.

La figura 27 muestra la comparación entre los métodos de calibración de “puntos nulos”, alto K^+ y nigericina y el *in vitro*. El análisis de varianza (ANOVA) aplicado a los resultados mostrados en la tabla XIV indica que existen diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los métodos empleados para determinar el pH_i . La prueba estadística de LSD (Least Significant Difference), indica que tales

diferencias están determinadas por la variación existente entre el método de los "puntos nulos" y el método de alto K^+ y nigericina, dado que la diferencia de sus valores promedio de pH_i (0.16, $n=11$) es mayor que el valor del LSD (0.103, $P=0.01$). Esto indica que el método de alto K^+ y nigericina sobre-estima los valores de pH_i . Por otro lado, la calibración *in vitro* no mostró diferencias significativas con respecto a la calibración de los "puntos nulos". La diferencia entre el promedio de los valores de pH_i entre los dos métodos fue de apenas 0.02 unidades de pH, que es mucho menor al establecido por la prueba de la LSD, lo cual significa que la calibración *in vitro* puede usarse para estimar el pH_i de mejor manera que la calibración con el método de alto K^+ y nigericina (Boyarski et al, 1996).

La sobre-estimación del pH_i introducida por el uso del método de alto K^+ y nigericina para calibrar al colorante es debida a que el equilibrio de la $[H^+]_e$ y la $[H^+]_i$ no se realiza de la manera esperada (la $[H^+]_e$ debería ser igual $[H^+]_i$). Este equilibrio puede afectarse por las siguientes causas: 1) una selección inadecuada de la concentración del K^+ extracelular; 2) cambios en la concentración del K^+ intracelular durante la calibración y 3) la presencia de procesos de transporte ácido-base diferentes al de la nigericina (Boyarski et al, 1996). La presencia del Na^+ en el interior celular (Na^+_i) es otro factor que puede entorpecer el equilibrio de los H^+ a través de la membrana plasmática cuando se usa alto K^+ y nigericina para calibrar al BCECF. La explicación de ello es la siguiente: dado que la nigericina es un ionóforo que también intercambia Na^+ por H^+ y que las soluciones de

calibración no tienen Na^+ , el Na^+_{i} podría intercambiarse por protones extracelulares de manera que la $[\text{H}^+]_{\text{e}}$ sería diferente a la $[\text{H}^+]_{\text{i}}$, lo cual se puede reflejar en una sobre-estimación del pH_{i} .

La consecuencia de la sobre-estimación del pH_{i} cuando se emplea alto K^+ y nigericina para calibrar al BCECF es la sobre-estimación del valor del pK_{a} del colorante, que se establece mediante el ajuste a la Ec. 10 de los pares ordenados (pH_{i} , CF) determinados en la calibración. Esto repercute directamente sobre el cálculo de los cambios en el pH_{i} ocurridos durante un experimento celular. El hecho que sustenta la sobre-estimación del pK_{a} del colorante como la causa del error introducido por la calibración de alto K^+ y nigericina en el cálculo del pH_{i} es que la diferencia (0.16) de los valores de pH_{i} calculados por éste método y el de los "puntos nulos" es prácticamente igual a la diferencia (0.15) que existe entre el pK_{a} calculado mediante la técnica de nigericina ($\text{pK}_{\text{a}(\text{MAPN})}$) y el pK_{a} del colorante obtenido mediante la calibración *in vitro* ($\text{pK}_{\text{a}(\text{iv})}$). El valor de esta diferencia es constante (véase figura 28) en el rango de pH de interés experimental (6.2 a 7.8). Lo anterior indica que las mediciones de pH_{i} usando el método de alto K^+ y nigericina pueden corresponder de mejor manera con aquellas obtenidas con el método de los "puntos nulos" si en lugar de emplear el $\text{pK}_{\text{a}(\text{MAPN})}$ se usa el $\text{pK}_{\text{a}(\text{iv})}$ para calcular los valores del pH_{i} de todo el experimento; lo cual, de acuerdo con la Ec. 1 es equivalente a restar 0.16 unidades de pH a los valores de pH_{i} con el método de alto K^+ y nigericina.

De acuerdo con la figura 28, el valor del CF en ambas curvas de calibración tiende hacia un valor máximo (CF_{\max}) cuando el pH se incrementa y hacia un nivel mínimo (CF_{\min}) cuando el pH disminuye. Considerando que al acercarse a dichos límites, el CF pierde su sensibilidad al pH, es posible establecer un método de calibración del BCECF menos complejo y más rápido de desarrollar que los descritos anteriormente. En este método se emplearían sólo dos soluciones de calibración, cuya composición sería idéntica a las usadas en el método de alto K^+ y nigericina. Con la finalidad de determinar el valor de CF_{\min} se aplicaría una solución de alto K^+ /nigericina con un pH de aproximadamente 4.5 y para determinar el valor de CF_{\max} se aplicaría una solución semejante pero con un pH de aproximadamente 9.5. Dado que estos valores de pH se encuentran en las regiones donde el CF es prácticamente independiente del pH, no es indispensable que los H^+ se equilibren perfectamente a través de la membrana plasmática para obtener valores adecuados de CF_{\min} y CF_{\max} , los cuales se emplearían para transformar los valores de CF de todo un experimento celular en valores de pH_i . El valor del pK_a del colorante que se usaría en este método sería el determinado *in vitro* (~ 7.0). Un método de calibración semejante ha sido descrito por James-Kracke en 1992.

El tamaño y la posición de la región de registro alteran la resolución del método para medir cambios en la intensidad fluorescente.

La figura 29 muestra como las medidas de fluorescencias, obtenidas al exponer a una célula a soluciones anisomóticas, se ven afectadas por el tamaño de la región de registro. Se aprecia que la magnitud del cambio de la fluorescencia provocada por las soluciones anisomóticas y el nivel del ruido de las señales disminuyen conforme el tamaño de la región aumenta. Para evaluar la "eficacia" de la región de registro para determinar los cambios en la fluorescencia debidos a manipulaciones experimentales, se usó el cociente señal/ruido (CSR), definido como lo indica la Ec. 11. Mientras mayor sea el cociente, mayor será la sensibilidad con la que se miden los cambios de fluorescencia debidos a manipulaciones experimentales. El tamaño ideal para este caso corresponde a un 20.55% del área del cuerpo celular, valor que se aleja mucho del usado normalmente en las determinaciones microespectrofluorométricas del VCA que es del 3 al 10% (Álvarez-Leefmans et al, 1995). Sin embargo, es importante considerar que la forma y el tamaño celular (influenciados por el tiempo de diferenciación) pueden afectar el valor del tamaño óptimo de la región de registro, de manera que el tamaño de óptimo aquí encontrado no sería el más adecuado para otra célula más ó menos diferenciada. Por lo tanto, es necesario establecer un valor del CSR que permita medir con una buena sensibilidad los cambios en la fluorescencia provocados por

las manipulaciones experimentales y con base en ello decidir si determinado tamaño de región es o no adecuado. En este caso, los cambios del VCA de una célula expuesta a soluciones moderadamente anisomóticas ($\sim \pm 8\%$) son alrededor del 8%. Si se considera que el error permitido en las mediciones del VCA es del 1%, el valor mínimo del CSR sería de 8, lo que implicará que la señal fuese al menos 8 veces la magnitud del error, esto significa que con las medidas fluorescentes obtenidas con un tamaño de región que tenga un CSR de al menos 8 se podrían resolver cambios en el VCA apenas mayores al 1%. Como lo muestra la figura 29B, el tamaño de región dentro del rango de 3 al 10% del cuerpo celular cumple con lo anteriormente expresado. El valor del CSR en ese rango es de al menos 15 unidades, lo que indica que las regiones incluidas en ese rango brindan una sensibilidad adecuada para resolver cambios en el VCA incluso del 1%.

En la figura 30 se aprecia que la localización de la región que presenta el mejor CSR es en la zona celular de mayor intensidad fluorescente (véase la región 2). El desplazamiento de la región de registro hacia otra zona celular distorsiona las señales fluorescentes hasta dejarlas inmersas en el ruido cuando la localización de la región es en la periferia celular. Esta distorsión puede explicarse por la salida de la célula del elemento óptico de análisis.

Lo anterior permite concluir que el tamaño de la región usada normalmente para medir los cambios en el VCA mediante técnicas espectrofluorométricas,

permite resolver cambios de fluorescencia resultantes de cambios incluso del 1% del VCA. Por otro lado, la posición óptima de la región de registro es en la zona celular de mayor fluorescencia.

Precisión

En este trabajo se determinaron dos tipos de precisión: a) entre ensayos y b) la intermedia. La precisión entre ensayos permitió evaluar el error de medición del VCA resultante de la corrección de la deriva de la fluorescencia y todas las suposiciones que subyacen a la transformación de las señales fluorescentes a cambios de VCA. Para el caso del pulso 10% hiperosmótico el error fue del 0.77%, mientras que para el pulso 10% hiposmótico fue del 0.42%. Estos valores indican un error en las mediciones del VCA menor al 1%, que es muy aceptable, considerando que se trabaja con sistemas biológicos que son inherentemente fluctuantes y difíciles de controlar. Por lo tanto, la transformación de las señales fluorescentes a cambios de VCA descrita en este trabajo puede emplearse de manera confiable. Cabe mencionar, como dato curioso, que la precisión de un buen osmómetro de laboratorio es de alrededor del 1%.

Se ha encontrado empíricamente que para soluciones ligeramente anisomóticas las células responden como osmómetros perfectos. Este es el caso para soluciones 10% anisomóticas, por lo que los valores de VCA de células diferentes expuestas a un pulso anisomótico idéntico deben ser comparables. La

variación entre tales mediciones se estimó por la precisión intermedia. El porcentaje del C.V. para este caso fue de 0.87 para la solución hiposmótica y de 1.01 para la solución hiperosmótica, es decir, existe una variabilidad un poco mayor que en la precisión entre ensayos, esto es probablemente debido a que, dada la variabilidad biológica, algunas células regularon en cierto grado su volumen al ser sometidas a alguno de los pulsos 10% anisomóticos dando una respuesta no lineal, es decir una respuesta que no sigue la ley de Van't Hoff. Sin embargo, este grado de error es aceptable en fenómenos biológicos y por ende para los usos del método de medición tratado en este trabajo.

Exactitud

La exactitud se calculó con el fin de determinar qué tanto se acercan los valores de VCA calculados mediante el tratamiento matemático descrito en esta tesis a los valores de VCA predichos por la ecuación 12, que describe el comportamiento de un osmómetro perfecto. Tal ecuación indica que el VCA es idéntico a la inversa de la presión osmótica relativa de la solución a la cual son sometidas las células, por lo tanto, es posible determinar la exactitud de los valores experimentales con relación a la recíproca de la osmolalidad relativa. La exactitud se estimó mediante el promedio de los porcentajes de los valores experimentales relativos a su respectivo valor teórico. De esta manera, la exactitud para el pulso hiposmótico fue de 99.4882 ± 1.0377 % (Media \pm CV) y para el pulso hiperosmótico

fue de 99.3805 ± 1.2114 % (Media \pm CV). Esto es, la exactitud del método es aproximadamente del 99%, lo que representa un voto de confianza para su empleo.

CONCLUSIONES

1. El punto isobéptico del BCECF medido en el interior celular es de 437 ± 3.7 nm ($n = 151$). Este valor no difiere significativamente del medido en una celda espectrofluorométrica (438 ± 0 nm, $n = 3$) ni del valor medido en la cámara de experimentación (437.5 ± 1.64 nm, $n = 44$) a través del sistema óptico utilizado para las determinaciones *in vivo* (Nikon Diaphot 300, objetivo Nikon fluor X40, AN 1.3). El análisis de varianza de las tres determinaciones mostró que no hay diferencias significativas entre ellas ($P >> 0.05$), por lo tanto, el punto isobéptico (~ 438 nm) puede usarse de manera confiable para estudiar cambios en la concentración del colorante en el espacio intracelular. Estos cambios pueden a su vez emplearse para calcular cambios en el VCA.
2. La sensibilidad al pH de la fluorescencia del BCECF y las propiedades espectrales del mismo no se afectan de manera significativa por las propiedades ópticas del sistema empleado en las determinaciones intracelulares, ni por el medio citoplásmico de las células NG108-15.
3. Para que el cociente de fluorescencias pueda utilizarse como un indicador selectivo a cambios en el pH, las fluorescencias individuales (que forman al cociente) deben presentar un comportamiento lineal con respecto a la

concentración de BCECF y la ordenada al origen de dicha relación (F versus [BCECF]) debe ser cero. El cociente de fluorescencias empleado en el presente trabajo (obtenidas al excitar al BCECF a 450 y 438 nm) cumple con esta condición, es decir, es independiente de la concentración del colorante, por lo que puede usarse como un indicador selectivo de los cambios en el pH_i .

4. Es posible determinar simultáneamente cambios en el VCA y en el pH_i empleando al BCECF como indicador intracelular. El seguimiento del pH_i se realiza con el cociente de las fluorescencias resultantes de excitar al colorante a 450 y 438 nm. El seguimiento del VCA se relaciona con la fluorescencia del colorante cuando éste se excita a 438 nm.
5. La sobre-estimación del pH_i basal, observada cuando el BCECF se calibra con el método de alto K^+ /nigericina fue, en las células estudiadas, de 0.16 unidades de pH. Esta diferencia es constante dentro del rango fisiológico y de interés experimental (6.2 – 7.8). Conociendo esta diferencia es posible corregir las medidas de pH_i obtenidas mediante del método de alto K^+ /nigericina, obteniéndose mayor exactitud en las determinaciones de pH_i .
6. El tamaño y la posición de la región de registro tienen influencia sobre las medidas fluorescentes usadas para determinar cambios en el VCA. El tamaño de la región del 3 al 10% del área del cuerpo celular es lo suficientemente

sensible para resolver cambios en el VCA incluso del 1%. La localización óptima de la región para medir las señales fluorescentes es en la zona celular de mayor fluorescencia.

7. Los algoritmos empleados para transformar las señales fluorescentes obtenidas al excitar al BCECF en su punto isobéptico a cambios en el VCA son confiables, con una precisión del 1 % y una exactitud de ~ 99 %.

APÉNDICE

I. Comparación del pH medido con el potenciómetro y el predicho por la ecuación de Henderson-Hasselbalch

Las soluciones para determinar los espectros de excitación del BCECF tanto en la celda espectrofluorométrica como en la cámara de experimentación sin células se prepararon por el método de diluciones recíprocas (véase pág. 47), el cual consiste en modificar escalonadamente el pH de una solución de baja acidez mediante el reemplazo de alícuotas sucesivas de ésta con alícuotas idénticas de una solución de alta acidez. Cada escalón representa una solución, denominada solución intermedia, con un pH distinto.

Para calcular el pH de las soluciones intermedias fue preciso conocer la concentración del tampón de pH empleado (MOPS) en las soluciones de baja y alta acidez, tanto de su forma ácida (HT) como la de su sal (T⁻). Para ello se consideró el equilibrio de disociación del tampón de pH (HT):



del cual la constante de equilibrio es:

$$K_a = \frac{[\text{T}^-][\text{H}^+]}{[\text{HT}]}, \quad \text{Ec. A1.1}$$

que puede escribirse en forma logarítmica (ecuación de Henderson-Hasselbalch) de la siguiente manera:

$$pH = pK_a + \log \frac{[T^-]}{[HT]} \quad \text{Ec. A1.2}$$

Ahora, dado que la concentración total del tampón (10 mM en este caso) es igual a la suma de [T⁻] y [HT], entonces:

$$[T^-] = 10 - [HT] \quad \text{Ec. A1.3}$$

Sustituyendo la Ec. A1.3 en la Ec. A1.2, se obtiene:

$$pH = pK_a + \log \frac{10 - [HT]}{[HT]} \quad \text{Ec. A1.4}$$

finalmente resolviendo para [HT] se obtiene:

$$[HT] = \frac{10}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad \text{Ec. A1.5}$$

La concentración del tampón no disociado ([HT]) presente en las *soluciones de alta y baja acidez* se calculó mediante la Ec. A1.5. Una vez conocido [HT], la concentración del anión ([T⁻]) se calculó mediante la Ec. A1.3.

Para conocer la concentración de HT en las *soluciones intermedias*, entre la máxima y mínima acidez, se usó la siguiente expresión:

$$[HT] = C_t \left(1 - \frac{a}{m} \right) + C_m \frac{a}{m} \quad \text{Ec. A1.6}$$

Donde:

a = Volumen de la alícuota

m = Volumen de la muestra

C_i = Concentración de HT al pH del cual se parte

C_m = Concentración de HT en la muestra de alta acidez

Una vez conocida la $[HT]$, la concentración de T^- en las soluciones intermedias se calculó mediante la Ec. A1.3.

Finalmente, para calcular el pH de cada solución intermedia se usó la Ec. A1.2, en la cual se sustituyeron los valores de $[HT]$ y de $[T^-]$ previamente calculados para cada caso.

Para establecer qué tan adecuados eran los valores de pH calculados de la manera anteriormente descrita, se prepararon varias soluciones de diferente pH empleando el método de diluciones recíprocas, a cada solución se le midió el pH con un potenciómetro (Accumet basic pH meter, Fisher Scientific) y se compararon los pH calculados con la Ec. A1.2. Las soluciones extremas en esta determinación tuvieron valores de pH (medidos con el potenciómetro) de 9.6 para la solución de "baja acidez" y de 6.3 la solución de "alta acidez". El pH de las soluciones

intermedias medido con el potenciómetro y el calculado se muestran en la siguiente tabla:

pH inicial	% reemplazado	pH_{POT}	pH_{HH}
9.60	5	8.60	8.50
8.6 (8.50*)	10	8.04	8.02
8.04 (8.02*)	15	7.68	7.70
7.68 (7.70*)	20	7.39	7.40
7.39 (7.40*)	30	7.10	7.15
7.10 (7.15*)	40	6.84	6.9

* pH inicial predicho por la ec. A1.2

Tabla A1.1. Comparación del pH medido con el potenciómetro (pH_{POT}) y el pH obtenido mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach (pH_{HH}).

La prueba t aplicada a estos datos indicó que no existen diferencias significativas ($P=0.9927$) entre el valor del pH calculado mediante la Ec. A1.2 (ecuación de Henderson-Hasselbalch) y el valor medido con el potenciómetro.

II. Derivación de la ecuación para la transformación de las señales de fluorescencia a volumen celular acuoso.

Esta derivación es esencialmente la misma que se desarrollo para transformar señales fluorescentes la calceína en cambios en el VCA (Álvarez-Leefmans et al, 1995). Por principio, se asume que existe una relación lineal entre la cantidad de colorante intracelular y la fluorescencia total dentro del campo de análisis; independientemente de que el colorante se encuentre atrapado en compartimentos intracelulares, enlazado a proteínas o libre en el citosol. Esta suposición implica que toda la fluorescencia proviene del colorante, de manera que:

$$F = \frac{KQv}{V^T}, \quad \text{Ec. A2.1}$$

Donde K es la constante de proporcionalidad relativa a la cantidad del colorante (Q) y a la intensidad total de fluorescencia (F); v es el elemento de volumen contenido dentro del campo de análisis, el cual está determinado por la región circular fijada en la célula y la apertura numérica del objetivo; V^T es el volumen celular total en el cual el colorante se encuentra enlazado o diluido, del cual v es una muestra. En una célula homogénea (v. g. un eritrocito) V^T representa el volumen celular completo. En una célula nucleada cuyo citoplasma sea homogéneo, V^T debe ser el volumen citoplásmico. Si el citoplasma es heterogéneo, entonces es improbable que v sea representativo del volumen citoplásmico total y la identificación precisa de V^T no es posible. Ordinariamente, V^T debe ser

considerado como una porción hipotética del citoplasma de la cual v es representativa. Esta definición de V^T puede no ser satisfactoria, pero es quizá la mejor que se puede hacer. Una segunda suposición es que Q es constante y no existe redistribución del colorante dentro de los compartimentos intracelulares o salida del mismo hacia el exterior celular.

Cuando se aplica un cambio osmótico a una célula cargada con un fluoróforo, se registran los cambios en la fluorescencia relativa (F_T/F_0). Sin embargo, para trabajar con relaciones lineales entre fluorescencia y presión osmótica externa es conveniente el empleo de la recíproca de la fluorescencia relativa (F_0/F_T), donde F_0 es la fluorescencia en la condición control y F_T es la fluorescencia en la condición experimental; de manera que, con base en la ecuación A2.1, se obtiene la siguiente relación:

$$\frac{F_0}{F_T} = \frac{\frac{KQv}{V_0^T}}{\frac{KQv}{V_T^T}} \quad \text{Ec. A2.2}$$

Dado que Q , v , y K son constantes:

$$\frac{F_0}{F_T} = \frac{V_T^T}{V_0^T} \quad \text{Ec. A2.3}$$

Ahora, V^T es la suma de dos fracciones de volumen: 1) el volumen celular acuoso en el cual se diluye el colorante en el citosol (V^{os}) y representa la fracción

que responde a alteraciones en la osmolalidad externa; 2) la fracción denotada como V^b , que no cambia con la osmolalidad externa y representa el volumen en el que el colorante está enlazado a proteínas u otros componentes citoplásmicos o se encuentra atrapado en algún compartimento intracelular. Esto equivale a decir que la fluorescencia total F tiene una fracción que proviene de V^{os} , que varía con la osmolalidad externa y otra que proviene de V^b , que es independiente de la osmolalidad externa y que para efectos prácticos puede considerarse constante. Dado que lo importante en medir cambios en V^{os} , es necesario sustraer la fluorescencia que proviene de V^b , dado que:

$$V^T = V^{os} + V^b, \quad \text{Ec. A2.4}$$

y definiendo los componentes de V^T con respecto al tiempo se obtiene que:

$$V_0^T = V_0^{os} + V^b \quad \text{Ec. A2.4.1}$$

y

$$V_T^T = V_T^{os} + V^b, \quad \text{Ec. A2.4.2}$$

donde V_0^{os} es el volumen celular acuoso en la condición control y V_T^{os} es el estado estacionario del volumen celular acuoso alcanzado después de un cambio osmótico.

Sustituyendo las ecuaciones A2.4.1 y A2.4.2 en la ecuación A2.3, se obtiene:

$$\frac{F_0}{F_T} = \frac{V^b + V_T^{os}}{V^b + V_0^{os}}. \quad \text{Ec. A2.5}$$

Para pequeños cambios en la osmolalidad externa, V^{os} responde idealmente, es decir, de acuerdo con la ecuación de Boyle-Van't Hoff:

$$V_T^{os} = V_0^{os} \frac{\pi_0}{\pi_T}, \quad \text{Ec. A2.6}$$

donde π_0 es la presión osmótica de la solución extracelular control y π_T es la presión osmótica de la solución de prueba.

Sustituyendo la ecuación A2.6 en la ecuación A2.5, se obtiene:

$$\frac{F_0}{F_T} = \frac{V^b + V_0^{os} \frac{\pi_0}{\pi_T}}{V^b + V_0^{os}}, \quad \text{Ec. A2.7}$$

rearrgando,

$$\frac{F_0}{F_T} = \frac{V^b}{V^b + V_0^{os}} + \frac{V_0^{os}}{V^b + V_0^{os}} \frac{\pi_0}{\pi_T}. \quad \text{Ec. A2.8}$$

Sustituyendo la ecuación A2.4.1 en la ecuación A2.8 y rearrgando, se obtiene:

$$\frac{F_0}{F_T} = \left(\frac{V_0^{os}}{V_0^T} \frac{\pi_0}{\pi_T} \right) + \frac{V^b}{V_0^T}. \quad \text{Ec. A2.9}$$

La ecuación A2.9 es una línea recta donde la fluorescencia producida por la fracción V^b/V_0^T es la fluorescencia de fondo F_b . Esta última puede determinarse de la intersección de la gráfica de F_0/F_T como función de π_0/π_T donde V^{os}_0/V_0^T será la pendiente.

La ecuación A2.9 puede también expresarse en función de π_0/π_T :

$$\frac{\pi_0}{\pi_T} = \frac{\frac{F_0}{F_T} - \frac{V^b}{V_0^T}}{\frac{V_0^{os}}{V_0^T}}, \quad \text{Ec. A2.10}$$

sustituyendo la ecuación A2.4.1 en A2.10 y reorganizando, se obtiene

$$\frac{\pi_0}{\pi_T} = \frac{\frac{F_0}{F_T} - \frac{V^b}{V_0^T}}{1 - \frac{V^b}{V_0^T}}. \quad \text{Ec. A2.11}$$

Para normalizar, definamos a $V^T=1$, y la ecuación A2.11 se transforma en la siguiente:

$$\frac{\pi_0}{\pi_T} = \frac{\frac{F_0}{F_T} - V^b}{1 - V^b}, \quad \text{Ec. A2.12}$$

de acuerdo con la ecuación A2.1, F_b proviene de V^b , que es constante, por lo que:

$$\frac{\pi_0}{\pi_T} = \frac{\frac{F_0}{F_T} - F_b}{1 - F_b}. \quad \text{Ec. A2.13}$$

Se ha demostrado experimentalmente que F_b , determinada a partir de la intersección de la gráfica de F_0/F_T como función de π_0/π_T , corresponde al valor

medido por permeabilización controlada de la membrana plasmática con α -toxina de *S. aureus* (Crowe et al., 1995). El cambio en la fracción osmóticamente activa de V_T , es decir V_T^{os}/V_0^{os} , puede calcularse con la siguiente ecuación:

$$\frac{\frac{F_0}{F_T} - F_b}{1 - F_b} = \frac{V_T^{os}}{V_0^{os}} = \frac{\pi_0}{\pi_T} \quad \text{Ec. A2.14}$$

III. Calibración de puntos nulos

La técnica de los puntos nulos tiene su origen en las observaciones de que la exposición de las células a una base débil como el amoníaco (NH_3) produce una alcalinización intracelular y que la exposición a un ácido débil como el propiónico (HP) produce una acidificación; por lo que se supone que la forma neutra de ambos se equilibra rápidamente a través de la membrana celular, al hacerlo, las especies neutras tienden a formar su respectiva especie iónica provocando un cambio neto en el pH intracelular (Jacobs, 1940). Además, en esta técnica se supone que la constante de disociación (K_a) de ambos es la misma en el exterior y en el interior de la célula, de tal forma que, independientemente del lado de la membrana en que se encuentre el ácido o la base débil, siempre se cumple el siguiente equilibrio:

Para la base:



$$K_{ab} = \frac{[\text{NH}_3][\text{H}^+]}{[\text{NH}_4^+]}, \quad \text{Ec. A3.1}$$

$$[\text{NH}_4^+] = \frac{[\text{NH}_3][\text{H}^+]}{K_{ab}}, \quad \text{Ec. A3.2}$$

Para el ácido:



$$K_{ad} = \frac{[P^-][H^+]}{[HP]}, \quad \text{Ec. A3.3}$$

$$[P^-] = \frac{K_{ad} [HP]}{[H^+]}. \quad \text{Ec. A3.4}$$

De las reacciones anteriores se deduce que la producción o consumo de protones como consecuencia de la entrada del HP o del NH_3 a la célula está determinado por el efecto del pH intracelular (pH_i) sobre estas partículas no cargadas; de manera que si se aplican simultáneamente estas dos sustancias a una concentración tal que la producción y consumo de protones sea equivalente y por lo tanto no exista un cambio neto en la pH_i (éste es el denominado *punto nulo*), entonces es posible determinar el valor del pH_i a partir de las concentraciones de HP y de NH_3 aplicadas, con base en el siguiente razonamiento:

Considerando que el HP y el NH_3 se equilibran rápidamente a través de la membrana plasmática; la producción o consumo de protones (H^+) se da como se ilustra a continuación:

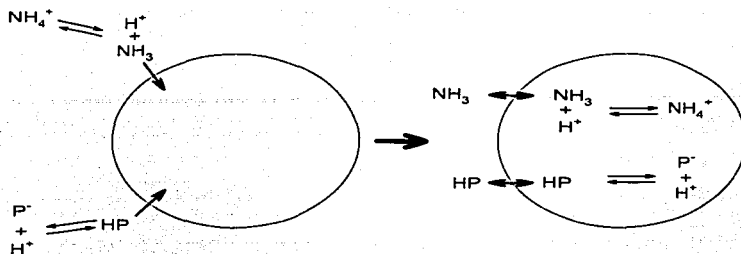


Figura A3.1. Esquema que ilustra el fundamento de la técnica de los puntos nulos. El círculo de la izquierda representa una célula expuesta a una solución que contiene una base (NH_3) y un ácido (HP) débiles. El círculo de la derecha esquematiza el equilibrio tanto del NH_3 y del HP a través de la membrana celular. Nótese que al entrar, el NH_3 consume H^+ formando el ión amonio NH_4^+ , mientras al entrar el HP , libera H^+ al formar su par conjugado P^- .

Si se retoma la definición de *punto nulo*, la entrada de protones ($[H^+]_e$) será equivalente al "consumo" de los mismos ($[H^+]_c$). Considerando la estequiometría de las reacciones de disociación en equilibrio (Rx. A3.1 y Rx. A3.2), se puede afirmar que la generación del ión propionato (P^-) y del ión amonio (NH_4^+) en el interior celular será exactamente igual, esto es $[P^-]_i = [NH_4^+]_i$.

Por lo anterior podemos entonces igualar las ecuaciones A3.2 y A3.4:

$$\frac{[NH_3]_i [H^+]_i}{K_{ab}} = \frac{K_{ad} [HP]_i}{[H^+]_i} \quad \text{Ec. A3.5}$$

y resolviendo para $[H^+]_i$ tenemos que:

$$[H^+]_i^2 = \frac{K_{ad} K_{ab} [HP]_i}{[NH_3]_i} \quad \text{Ec. A3.6}$$

$$[H^+]_i = \sqrt{\frac{K_{aA} K_{aB} [HP]_i}{[NH_3]_i}} \quad \text{Ec. A3.7}$$

Aplicando logaritmos:

$$\log[H^+]_i = \log \sqrt{\frac{K_{aA} K_{aB} [HP]_i}{[NH_3]_i}} \quad \text{Ec. A3.8}$$

$$\log[H^+]_i = \frac{1}{2} \log \frac{K_{aA} K_{aB} [HP]_i}{[NH_3]_i} \quad \text{Ec. A3.9}$$

$$\log[H^+]_i = \frac{1}{2} \left(\log K_{aA} + \log K_{aB} + \log \frac{[HP]_i}{[NH_3]_i} \right) \quad \text{Ec. A3.10}$$

$$-\log[H^+]_i = \frac{1}{2} \left(-\log K_{aA} - \log K_{aB} - \log \frac{[HP]_i}{[NH_3]_i} \right) \quad \text{Ec. A3.11}$$

$$pH_i = \frac{1}{2} \left(pK_{aA} + pK_{aB} + \log \frac{[NH_3]_i}{[HP]_i} \right) \quad \text{Ec. A3.12}$$

Como NH_3 y HP se equilibran rápidamente a través de la membrana plasmática, entonces $[NH_3]_i = [NH_3]_e$ y $[HP]_i = [HP]_e$. Por lo tanto, la Ec. A3.12 puede escribirse:

$$pH_i = \frac{1}{2} \left(pK_{aA} + pK_{aB} + \log \frac{[NH_3]_e}{[HP]_e} \right) \quad \text{Ec. A3.13}$$

Esto indica que si la producción y pérdida de protones dentro de la célula como consecuencia de la exposición al NH_3 y al HP , es de la misma magnitud, entonces el pH_i no se modificará y se podrá calcular su valor a partir de las

concentraciones de las partículas no cargadas en el exterior, mediante la ecuación A3.13.

Con el fin de encontrar el *punto nulo* experimentalmente, las células se exponen a soluciones isomóticas conteniendo concentraciones determinadas de HP y de NH_3 (soluciones nulas) calculadas con base en la Ec. A3.13. A cada solución nula le corresponde un pH nulo (pH_N) que es el pH_i teórico al cual las concentraciones de ácido y base débiles contenidas en la solución nula no producen cambio neto de $[\text{H}^+]$. De manera que, el *punto nulo* estará indicado por el hecho de que el CF en solución isomótica normal permanece sin alteración al cambiar a la solución nula, bajo esta condición el pH_i es igual al pH_N de la solución nula en turno.

Para calcular la concentración del ácido y de la base débil que debe contener una solución de determinado pH_N es preciso fijar la concentración ya sea de la base o del ácido débil. Para este caso la concentración de NH_4Cl se fija en 2mM. Para calcular la concentración del NH_3 presente en 2mM de NH_4Cl , se debe considerar el equilibrio descrito por la Rx. 1. La Ec. A3.2 puede escribirse de forma logarítmica de la siguiente manera:

$$\text{p}K_{aB} = \text{pH} + \log \frac{[\text{NH}_4^+]}{[\text{NH}_3]} \quad \text{Ec. A3.14}$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Si $[\text{NH}_3] + [\text{NH}_4^+] = 2\text{mM}$, entonces $[\text{NH}_4^+] = 2 - [\text{NH}_3]$. Sustituyendo a $[\text{NH}_4^+]$ en la ecuación A3.14 se tiene que:

$$pK_{ab} = pH + \log \frac{2 - [\text{NH}_3]}{[\text{NH}_3]} \quad \text{Ec. A3.15}$$

Resolviendo para $[\text{NH}_3]$ se obtiene:

$$[\text{NH}_3] = \frac{2}{10^{pK_{ab} - pH} + 1} \quad \text{Ec. A3.16}$$

La concentración de NH_3 presente en 2mM de NH_4Cl puede calcularse con la Ec. A3.16, donde:

$pH = pH$ de la solución nula (generalmente 7.3)

$pK_{ab} = pK_a$ de la base débil que en este caso, a 25°C es de 9.25.

El valor de $[\text{NH}_3]$ determinado con estos parámetros es de 0.022 mM .

Una vez conocida la concentración de NH_3 , el valor de la concentración del HP se calcula mediante la siguiente expresión derivada de la Ec. A3.13:

$$[\text{HP}]_e = \frac{[\text{NH}_3]_e}{10^{2pH_N - pK_{at} - pK_{ab}}} \quad \text{Ec. A3.17}$$

Donde:

$pH_N = pH$ intracelular teórico al cual la producción y consumo de protones, al aplicar la solución, son equivalentes. Este valor de pH_N se fija a diferentes

valores: 6.6, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2 y 7.3, de tal manera que al aplicar estas soluciones a la célula y observando los cambios en el CF puede determinarse el punto nulo ya sea de manera directa o por interpolación.

$pK_{aA} = pK_a$ del ácido débil (a 25° C es de 4.87)

$pK_{aB} = pK_a$ de la base débil (a 25° C es de 9.25)

$[NH_3]_0 = 0.022$ mM.

Una vez obtenida la concentración de HP para las distintas soluciones nulas, la concentración de P^- para cada solución se calcula mediante la siguiente expresión, obtenida considerando el equilibrio mostrado en la Rx. 2:

$$[P^-] = \frac{[HP]}{10^{pK_{aA} - pH}} \quad \text{Ec. A3.18}$$

Para determinar la cantidad de propionato de sodio (NaP) que debe contener la solución nula sólo se suman las concentraciones de HP y de P^- calculadas para cada caso.

La preparación de las soluciones nulas debe realizarse con base en la solución isosmótica normal, sustituyendo equimolarmente al NaCl por NH_4Cl o NaP (véase la tabla A3.I). De esta manera la osmolalidad de todas las soluciones nulas es aproximadamente la misma.

pH nulo	[NH₃]_e mM	[NH₄Cl] mM	[HP]_e mM	[P] mM	[NaP]_r mM	[NaCl] mM
iso	0	0	0	0	0	120
6.6	0.022	2.000	0.183	49.252	49.435	68.565
6.9	0.022	2.000	0.046	12.372	12.417	105.583
7.0	0.022	2.000	0.029	7.806	7.835	110.165
7.1	0.022	2.000	0.018	4.925	4.943	113.057
7.2	0.022	2.000	0.012	3.108	3.119	114.881
7.3	0.022	2.000	0.007	1.961	1.968	116.032

Tabla A3.I. Concentraciones de NH₄Cl y de NaP, para preparar diferentes soluciones nulas. En esta tabla se muestran las concentraciones de NH₄Cl, NaP y NaCl que deben contener las soluciones nulas preparadas con respecto a una solución isosmótica normal que contiene 120 mM de NaCl. Nótese que la NaCl de la solución isosmótica se va reemplazando por el NH₄Cl y NaProp de manera equimolar. De esta forma que la suma de las concentraciones de NaCl, del NH₄Cl y HProp es siempre 120 mM

REFERENCIAS

1. Álvarez Leefmans, F. J. (1997). Osmotic properties of neuronal cells studied with fluorescent probes. *Abstract Boehringer Ingellheim Foundation Meeting of Neuroscientists from Europe and Latin-America*. pp. 6-8. Taxco, Guerrero, México.
2. Álvarez Leefmans, F.J. Altamirano, J. and Crowe, W. E. (1995). Use of ion-selective microelectrodes and fluorescent probes to measure cell volume. *Methods in Neurosciences*. 27. 361-391.
3. Álvarez Leefmans, F.J. and Reuss, L. (1996). Operación orquestada de los sistemas de transporte a través de la membrana plasmática: Regulación y mantenimiento del volumen celular. *Biofísica y Fisiología Celular*. Capítulo 7. pp. 178-212. Universidad de Sevilla. España.
4. Álvarez-Leefmans, F.J. (1997). Measurement of volume changes in single cells with fluorescent probes. *Focus on Methods. Axobits* 20:10-13. USA.
5. Ahnert-Hilger, G. and Gratzl, M. (1988). Controlled manipulation of the cell interior by pore-forming proteins. *Trends pharmac. Sci. (TIPS)*:9. 195-197.

6. Baumgarten, C.M. and Feher J. (1998). Osmosis and the regulation of cell volume. *Cell Physiology. Source Book*. Chapter 19. Second edition. pp 253-292. Academic Press. USA.
7. Bevensee, M.O. and Boron, W.F. (1998). Fluorescence indicators. *pH and Brain Function*. Chapter 8. Edited by Kai Kaila y Bruce R. Ransom. Wiley Liss Inc. USA. pp 129-151.
8. Bevensee, M.O. and Boron, W.F. (1998). pH Regulation in mammalian neurons. *pH and Brain Function*. Chapter 12. Edited by Kai Kaila y Bruce R. Ransom. Wiley Liss Inc. USA. pp 211-231.
9. Bevensee, M.O. and Boron, W.F. (1998). Thermodynamics and Physiology of cellular pH regulation. *pH and Brain Function*. Chapter 10. Edited by Kai Kaila y Bruce R. Ransom. Wiley Liss Inc. USA. pp 173-194.
10. Bevensee, M.O. Bashi, E. Schlue W. R. Boyarsky, G. and Boron, W.F. (1999). Shrinkage-induced activation of Na^+/H^+ exchange in rat renal mesangial cells. *Am. J. Physiol.* **276**:C674-C683.
11. Bhakdi, S. Tranum-Jensen, J. (1991). Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Revs.* **55**. 733-751.

12. Boron, W.F. and De Weer, P. (1976). Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO₂, NH₃, and metabolic inhibitors. *J. Gen. Physiol.* **67**:91-112.
13. Boyarsky, G. Hanssen, C. and Clyne, L.A. (1996). Inadequacy of high K⁺/nigericin for calibrating BCECF I. Estimating steady-state intracellular pH. *Am. J. Physiol.* **271**: C1131-C1145.
14. Boyarsky, G. Hanssen, C. and Clyne, L.A. (1996). Inadequacy of high K⁺/nigericin for calibrating BCECF II. Intracellular pH dependence of the correction. *Am. J. Physiol.* **271**: C1146-C1156.
15. Boyarsky, G. Hanssen, C. and Clyne, L.A. (1996). Superiority of *in vitro* over *in vivo* calibrations of BCECF in vascular smooth muscle cells. *The FASEB Journal*. **10**: 1205-1212.
16. Chaillet, J.R. Boron W.F. (1985). Intracellular calibration of a pH-sensitive dye in isolated, perfused salamander proximal tubules. *J. Gen. Physiol.* **86**:765-794.
17. Corasanti, J.G. Gleeson, D. and Boyer, D. (1990). Effects of osmotic stresses on isolated rat hepatocytes I. ion mechanisms of cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* **258**: G290-G298.

18. Crowe, W.E. Altamirano, J. Huerto, L. and Álvarez Leefmans, F.J. (1995). Volume changes in single N1E-115 neuroblastoma cells measured with a fluorescent probe. *Neuroscience*. **69** (1): 283-296.
19. Dixon, S.J. and Wilson, J.X. (1995) Fluorescence measurement of cytosolic pH in cultured rodent astrocytes. *Methods in Neurosciences*. **27**: 196-213.
20. Ferraris, J.D. Williams, C.K. Ohtaka A. and García-Pérez, A. (1999). Functional consensus for mammalian osmotic response elements. *Am. J. Physiol.* **276**: C667-C673.
21. Glantz, S. A. (1992). *Primer of biostatistics*. 4th edition. Mc Graw-Hill, Inc. Health Professions Division. USA. 440 pp.
22. Gleeson, D. Corasanti, J.G. and Boyer, J.L. (1990). Effects of osmotic stresses on isolated rat hepatocytes II. Modulation of intracellular pH. *Am. J. Physiol.* **258**: G299-G307.
23. Grinstein S., Rothstein, A. Sarkadi, B. and Gelfand, E.W. (1984). Responses of lymphocytes to anisotonic media: volume-regulating behavior. *Am. J. Physiol.* **246**: C204-C215.

24. Herman, B. (1998). *Fluorescence microscopy*. Second edition. Bios Scientific Publishers. USA.
25. Inoué, S. and Spring, K. (1997). *Video microscopy*. Second Edition. Plenum Press 741 pp.
26. Jacobs, M. H. (1940). Some aspects of cell permeability to weak electrolytes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biol.* **8**. 30-39
27. James-Kracke, M. R. (1992). Quick and accurate method to convert BCECF fluorescence to pH_i : Calibration in three different types of cell preparations. *J. Cell. Physiol.* **151**: 596-603.
28. Kasai, H. Neher, E. (1992). Dihydropyridine-sensitive and ω -conotoxin-sensitive calcium channels in a mammalian neuroblastoma-glioma cell line. *J. Physiol., Lond.* **448**: 161-188.
29. Lakowicz, J.R. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Second edition. Kluwer Academic/Plenum Publishers. USA. pp 1-93.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

30. Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*. **191**: 144-148.
31. Muallem, S. Zhang, B-X. Loessberg, P. A. and Star, R. A. (1992). Simultaneous recording of cell volume changes and intracellular pH or Ca^{2+} concentration in single osteosarcoma cells UMR-106-01. *J. Biol. Chem.* **267**: 17658-17664.
32. Nagaraja, T. N. and Brookes, N. (1998). Intracellular acidification induced by passive and active transport of ammonium ions in astrocytes. *Am. J. Physiol.* **274**: C883-C891.
33. Negulescu, P. A. and Machen, T. E (1990). Intracellular ion activities and membrane transport in parietal cells measured with fluorescent dyes. *Methods in Enzymology*. **192**: 38-81.
34. Nett, W. Deitmer, J.W. (1996). Simultaneous measurements of intracellular pH in the leech giant glial cell using 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein and ion-selective microelectrodes. *Biophys. J.* **71**:394-402.
35. Pasantes Morales, H. Chacón, E. Murray, R.A. and Morán, J. (1994). Properties of osmolyte fluxes activated during regulatory volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* **37**: 720-727.

36. Pasantés-Morales, H. Maar, T. E. and Morán, J. (1993). Cell volume regulation in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* **34**: 219-224
37. Putnam, R.W. (1998). Intracellular pH Regulation. Transport physiology, pumps and exchangers. *Cell Physiology Source Book*. Second edition. Academic Press. USA. pp 293-311.
38. Reviewer guidance, validation of chromatographic methods. Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration. 1994
39. Rink, T. J. Tsien, R. Y. and Pozzan, T. (1982). Cytoplasmic pH and free Mg^{2+} in lymphocytes. *J. Cell Biol.* **95**: 189-196.
40. Roos, A. and Boron, W. F. (1981). Intracellular pH. *Physiological Reviews.* **61** (2): 296-434.
41. Rothstein, A. and Mack, E. (1990). Volume-activated K^+ and Cl^- pathways of dissociated epithelial cells (MDCK): Role of Ca^{2+} . *Am. J. Physiol.* **258**: C827-C834.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

42. Rothstein, A. and Mack, E. (1992). Volume-activated calcium uptake: its role in cell volume regulation of Madin-Darby canine kidney cells. *Am. J. Physiol.* **262**: C339-C347.
43. Sánchez Armass, S. Martínez Zaguilán, R. Martínez, G.M. and Gillies, R.J. (1994). Regulation of pH in rat brain synaptosomes I. Role of Sodium, Bicarbonate and Potassium. *Journal of Neurophysiology.* **71** (6): 2236-2248.
44. Schlue, W.R. and Thomas, R.C. (1985). A Dual mechanism for intracellular pH regulatory by leech neurons. *J. Physiol.* **364**: 327-338.
45. Shah, V.P. Midha, K.K. Dighe, S. McGilveray, I.J. Skelly, J.P. Yacobi, A. Layloff, T. Viswanathan, C.T. Cooke C.E. McDowall, R.D. Pittman, K.A. and Spector, S. (1992). Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Sci.* **81** (3): 309-312.
46. Srinivas, S. P. and Bonanno, J. A. (1997). Measurement of changes in cell volume based on fluorescence quenching. *Am. J. Physiol.* **272**:C1405-C1414.
47. Swartz, M. and Krull, I. S. (1997) *Analytical development and validation*. Chapter 3. Marcel Dekker, Inc. USA. pp. 53-73.

48. Szatkowski, M. S. and Thomas R. C. (1986). New method for calculating pH_i from accurately measured changes in pH_i induced by a weak acid and base. *Pfluegers Arch.* **407**: 59-63.
49. Thomas, R.C. and Schwiening, C.F. (1998). Intracellular pH regulation in invertebrate neurons. *pH and Brain Function*. Chapter 11. Edited by Kai Kaila and Bruce R. Ransom. Wiley Liss Inc. USA. pp. 195-209.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN